



HAL
open science

Synthèse et développement de nouvelles molécules hétérocycliques tricycliques : étude de leurs propriétés immunomodulatrices

Nour Bou Karroum

► **To cite this version:**

Nour Bou Karroum. Synthèse et développement de nouvelles molécules hétérocycliques tricycliques : étude de leurs propriétés immunomodulatrices. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier; École doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2018. Français. NNT : 2018MONTT014 . tel-01907834

HAL Id: tel-01907834

<https://theses.hal.science/tel-01907834>

Submitted on 29 Oct 2018

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En CHIMIE PHARMACEUTIQUE et PHARMACOCHEMIE

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Institut de Biomolécules Max Mousseron – UMR5247

En partenariat international avec l'Université Libanaise – Ecole Doctorale de Sciences et Technologie (EDST)

Synthèse et développement de nouvelles molécules hétérocycliques tricycliques. Etude de leurs propriétés immunomodulatrices

Présentée par Nour BOU KARROUM
Le 25 juin 2018

Sous la direction de Professeur Pierre-Antoine BONNET
et Professeur Issam KASSAB

Devant le jury composé de

Pierre-Antoine BONNET, PU, Université de Montpellier
Mona DIAB-ASSAF, PU, Université Libanaise
Jean-François GUICHOU, PU, Université de Montpellier
Majida JALBOUT, PU, Université de Montpellier
Issam KASSAB, PU, Université Libanaise
Carine MASQUEFA, PU, Université de Montpellier
Georges MOARBESS, Professeur associé, Université Libanaise
Mohamad MROUEH, PU, Lebanese American University
Thierry TERME, PU, Université Aix-Marseille

Directeur de thèse
Membre invité
Examinateur
Président du jury
Co-Directeur de thèse
Encadrant de thèse
Co-encadrant de thèse
Rapporteur
Rapporteur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé en cotutelle entre l'Université de Montpellier et l'Université Libanaise. A Montpellier, j'ai travaillé au sein de l'équipe d'Oncopharmacochimie et Pharmacotoxicologie Cutanée. Au Liban, j'ai effectué mes travaux de recherche au sein de l'équipe d'Immunologie à la Faculté de Santé Publique II à Fanar.

*Je tiens donc à remercier mon directeur de thèse, Monsieur **Pierre-Antoine Bonnet**, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, pour m'avoir fait confiance, pour son soutien et qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Merci de m'avoir fait connaître Paris en trois heures...Merci pour les délicieux Haribo ☺*

*J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse libanais, Monsieur **Issam Kassab**, qui grâce à lui j'ai pu voyager et effectuer ce travail de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, merci pour votre aide, pour vos conseils et j'espère être toujours à la hauteur de votre confiance.*

*Que Messieurs **Thierry Terme** et **Mohamad Mroueh** trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **Jean-François Guichou** et Madame **Majida Jalbout** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.*

*Je suis particulièrement honorée de la présence du Madame **Mona Diab-Assaf** dans ce jury de thèse. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour vos conseils et votre soutien.*

*J'attache une importance particulière à exprimer ma profonde gratitude à mes encadrants de thèse : Madame **Carine Masquéfa** et Monsieur **Georges Moarbess** :*

***Carine**, vraiment je ne trouve pas les mots pour exprimer ma profonde gratitude, Les mots ne suffisent pas pour te remercier...la thèse s'est très bien passée grâce à ta présence à mes côtés... merci de m'avoir écoutée à chaque fois que j'ai eu un problème, merci pour tes conseils précieux qui me remontent le moral, merci pour ton aide, ton humanité ...même si je*

veux te dire mille mercis ne seront jamais à la hauteur de ton implication dans la réalisation de ce travail.

***Georges**, je te remercie de tout mon cœur pour tes conseils, ton soutien, ton aide, tes encouragements qui me remontent le moral et renforcent ma confiance en soi. Merci pour les moments inoubliables que nous avons passés dans le laboratoire de culture cellulaire. Merci de m'avoir toujours orientée vers le bon chemin, merci de m'avoir écoutée, et j'espère être à la hauteur de vos attentes.*

*Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à mon amie **Cindy Patinote**. Cindy merci beaucoup pour ta présence à mes côtés, pour ton aide, pour tes conseils... merci d'avoir écouté mes soucis... Nous avons passé de moments inoubliables dans le laboratoire, merci pour ton aide à la paillasse, merci pour tes explications...j'attends votre visite au Liban !*

*Un très grand merci pour mon amie **Stéphanie Paniagua**...Voilà Steph, les trois années de thèse sont passées très vite...J'étais très contente de travailler avec toi, je n'oublie jamais les bons moments que nous avons passés ensemble sur la paillasse et notre galère avec la purification du produit chloré ☺ Steph, merci de m'avoir écoutée, merci pour tes conseils qui me soulagent toujours et j'attends votre visite au Liban !*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **Thierry Durand**. Merci pour votre aide, pour vos conseils assez précieux, pour votre soutien. Merci pour les moments inoubliables que j'ai passés au sein de votre famille. Je vous remercie de tout mon cœur.*

*Un grand merci à **Adrien Chouchou** pour son aide, ses conseils et son soutien. Merci pour les bons moments que nous avons passés ensemble lors des congrès internationaux et surtout celui de Paris.*

*Mes plus vifs remerciements vont bien évidemment à toute l'équipe du Monsieur Thierry Durand : **Camille, Céline, Alex, Jean-Marie, Valérie, Jean-François, Guillaume, Espérance et Laurence**. Je vous remercie tous pour votre soutien et votre aide.*

*Un grand merci également à l'équipe du Monsieur Alain Chavanieu : **Alain, Lucie, Sébastien et Yen**, je vous remercie pour vos conseils, votre aide et votre bonne humeur.*

*Un grand merci à Madame **Christelle Roques** pour son aide, son soutien et sa patience.*

*J'adresse mes remerciements à Madame **Hasnaa Bouharoun-Tayoun** et Madame **Soulaima Chamat** de l'Université Libanaise de m'avoir accueillie au sein de leur Laboratoire d'Immunologie où j'ai effectué la partie culture cellulaire. Mes remerciements vont aussi aux membres de l'équipe : **Catherine, Najibe, Leila, Joelle, Stephanie, René et Hanadi.***

*Cela va de soi, je remercie évidemment ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Merci **Papa Doureid, Maman Salma, mon frère Jad et ma petite sœur Fifi** pour vos sacrifices, merci pour votre aide financière, sans vous je n'en serais pas là. Cette thèse est un peu la vôtre, aussi. Merci aussi à mes oncles **Afif, Mounif, Akram, Samir, Walid, Haitham, Mostafa** et à mes tantes **Daad, Raafat, Nada, Hanane, Lamia et Anaam** pour leur aide, leur soutien et leurs conseils. J'espère que je resterais toujours à la hauteur de vos attentes.*

*Je voudrais dire merci également à mes amis qui m'ont supportée jusqu'au bout : **Racha, Ruba, Hala et Nizar.***

RESUME

Les Toll-like récepteurs 7 et 8 (TLR7 et TLR8) jouent un rôle important dans l'activation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Leur stimulation conduit à la production des cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I. L'imiquimod et son dérivé le résiquimod sont les premières molécules de faible poids moléculaire décrites comme agonistes du TLR7 et TLR8. Ces deux molécules ont montré des activités anticancéreuses et adjuvantes très importantes. Récemment, les TLR 7 et 8 ont fait l'objet de plusieurs publications visant à développer de nouveaux agonistes TLR7 et/ou TLR8 dans la perspective d'être utilisés comme adjuvants vaccinaux. Malgré les rôles essentiels de TLR7 et TLR8 dans la stimulation du système immunitaire, une activation immunitaire chronique peut être responsable de plusieurs maladies infectieuses et auto-immunes. D'où l'importance de développer également des antagonistes du TLR7 et/ou TLR8.

Ce travail de thèse est consacré à la synthèse et le développement de nouvelles molécules hétérocycliques, analogues de l'imiquimod et de résiquimod, dans le but d'identifier de nouveaux ligands TLR7 et/ou TLR8. Des voies de synthèse innovantes, permettant une modulation chimique importante grâce à des couplages croisés pallado-catalysés, ont été mises au point et ont permis d'obtenir une cinquantaine de molécules appartenant à trois séries chimiques différentes de type imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. De nombreux essais d'alkylation ont été tentés sur ces trois séries chimiques afin d'introduire une large variété de substituants sur le cycle à cinq sommets. L'application du couplage croisé de Sonogashira nous a permis d'établir une liaison C-C et introduire diverses chaînes alkyles. Ces composés ont été testés pour leur activité agoniste et antagoniste du TLR7 et 8. Aucun des composés cibles n'a présenté d'activité agoniste du TLR7 et TLR8, dans l'intervalle des concentrations testées. Par contre, tous les composés ont montré une activité antagoniste sélective du TLR7. Les composés les plus actifs, **5.35a** et **5.35b**, membres de la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline ont montré des IC₅₀ de l'ordre de 10 µM. Ces résultats prometteurs nous ont permis la découverte d'une activité antagoniste TLR7 importante pour la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline, une série très peu développée dans la littérature. La modulation chimique des molécules actives nous permet de donner naissance à de nouveaux leaders, qui peuvent jouer un rôle important dans la thérapie de plusieurs maladies infectieuses et auto-immunes.

Mots-clés : Toll-like récepteurs 7 (TLR7), Toll-like récepteurs 8 (TLR8), agonistes du TLR7/8, antagonistes du TLR7/8, imidazo[1,2-*a*]pyrazines, imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

ABSTRACT

Toll-like receptors 7 and 8 (TLR7 and TLR8) play an important role in immune system activation. Their stimulation leads to the production of pro-inflammatory cytokines and type I interferons. Both receptors recognize viral ssRNA, as well as synthetic tricyclic imidazoquinoline derivatives such as imiquimod (TLR7 agonist) and resiquimod (TLR7/8 agonist). These two molecules showed significant anti-cancer and adjuvant activities. Many reports in the literature have been focused on the development of new TLR7/8 agonists belonging to different chemical series. These agonists strongly induce the production of T helper 1-polarizing cytokines and may therefore serve as promising candidate vaccine adjuvants. Despite the essential roles of TLR7 and TLR8 in the immune system stimulation, chronic immune activation may be responsible for several infectious and autoimmune diseases. Consequently, the development of TLR7 inhibitors may play an important role in the therapy of these diseases.

In this study, we are interested in the synthesis and development of new heterocyclic molecules, analogs of imiquimod and resiquimod, in order to identify new TLR7 and/or TLR8 ligands. Different synthetic pathways have been developed, using cross coupling reactions, in order to obtain a wide variety of molecules belonging to three chemical series: imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Various alkylation reactions were attempted on these three chemical series in order to introduce a wide variety of substituents on the five-membered ring. The application of Sonogashira's cross-coupling allowed us to establish a C-C bond and introduce various alkyl chains. All compounds have been tested for their TLR7/8 agonistic and antagonistic activity using HEK-Blue™-hTLR7/8 cells. The synthesized compounds are completely inactive as TLR7/8 agonists and are selective TLR7 antagonists. Two compounds of the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series, compound **5.35a** and **5.35b**, bearing butyl and isobutyl chain respectively, are potent and selective TLR7 antagonists with low micromolar IC₅₀. Results allowed us to discover significant activity for the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series as selective TLR7 antagonists, which may therefore play an important role in the therapy of several infectious or autoimmune diseases.

Keywords : Toll-like receptor 7 (TLR7), Toll-like receptor 8 (TLR8), TLR7/8 antagonists, TLR7/8 agonists, imidazo[1,2-*a*]pyrazines, imidazo[1,5-*a*]quinoxalines and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AEP	Asparagine EndoPeptidase
Ag₂O	Oxyde d'argent
AOSD	Adult Onset <i>Still's disease</i>
AP	Adaptor Protein
AR	Adenosine receptor
ARN	Acide RiboNucléique
ArX	Halogénures d'aryle
BtH	Benzotriazole
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
CBS	Centre de Biochimie Structurale
CCM	Chromatographie Couche Mince
CDI	Carbonyldiimidazole
CHK1	Checkpoint kinase 1
CI	Complexe Immunitaire
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigène
CRP	Complement Reactive Protein
Cu(OTf)₂	Triflate de cuivre (II)
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DC	Dendritic Cells
DCp	Dendritic Cells plasmacytoid
DCm	Dendritic Cells myeloid
DCB	1,2-dichlorobenzène
DCE	Dichloroéthane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
dG	2'-désoxyguanosine
DMA	Diméthylacétamide
DME	Diméthoxyéthane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EC₅₀	Concentration efficace médiane
FDA	Food and Drug Administration

HBF₄	Acide tetrafluoroborique
HBr	Acide bromhydrique
H₅IO₆	Acide orthopériodique
HMDS	Hexaméthylidisilazane
H₂O	Eau
HRS/ESCRT	HRS/endosomal sorting complex required for transport
HSV-2	Herpès simplex II
I₂	Diiodure
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IFN-α	Interféron alpha
IKKs	I κ B Kinases
IL	Interleukine
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IPA	Isopropanol
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
IRF7	Interferon regulatory factor 7
IRS 954	Immunoregulatory sequences 954
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KF	Fluorure de potassium
KHCO₃	Bicarbonate de potassium
LAMP	Lysosome-associated membrane glycoproteins
LB	Lymphocytes B
LDL	Low Density Lipoprotein
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
LiOH	Hydroxyde de lithium
LPS	LipoPolySaccharide bactérien
LRO	Lysosomes Related Organelles
LRR	Leucine Rich Repeat
LRRC59	Leucine Rich Repeat Containing Protein 59
LT	Lymphocytes T
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Me₃NSO₃	Triméthylamine trioxyde de soufre
M.O.	Micro-ondes
Myd88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NaBO₃.H₂O	Perborate du sodium
NaH	Hydruure de sodium

NaHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de sodium
NaHSO₃	Hydrosulfite de sodium
NaN₃	Azoture de sodium
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NiCl₂(dppe)₂	[1,2-Bis(diphénylphosphino)ethane]dichloronickel(II)
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NK	Natural Killer
NLR	NOD-like Receptor
NLS	Nuclear Localization Signals
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Carcinoma
ODN	Oligodésoxynucléotides
8-OHdG	8-hydroxydésoxyguanosine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
P(<i>t</i>Bu)₃	Tri- <i>tert</i> -butylphosphine
PC	Proprotéine Convertase
Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂	[1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II), complex with dichloromethane
Pd₂(dba)₃	Tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium(0)
Pd(OAc)₂	Acétate de palladium (II)
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(triphénylphosphine)palladium(0)
PEPPSI-<i>i</i>Pr	Pyridine-Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation
PhPdCl	Chlorure de phénylpalladium
P₂O₅	Pentoxyde de phosphore
POCl₃	Oxychlorure de phosphore
PRR	Pattern Recognition Receptors
RA	Rheumatoid Arthritis
RE	Réticulum Endoplasmique
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RLR	RIG-I-like Receptor
RNH₂	Alkylamines
Sc(OTf)₃	Triflate de scandium (III)
SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase
SIDA	Syndrôme d'ImmunoDéficiency Acquis
SPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diméthoxybiphényl
TAB	TAK1 binding protein
TAK1	Transforming growth factor β-activated kinase-1

TCR	T-Cell Receptor
TFE	Trifluoroéthanol
Th1	Voie T helper 1
THF	Tétrahydrofurane
TIR	Toll/IL-1 Receptor
TIRAP/MAL	TIR-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like
TLR	Toll-like Receptor
TMB	Triméthylboroxine
TMEDA	Tétraméthyléthylénédiamine
TMS	Triméthylsilyle
TMSCN	Trimethylsilylisocyanure
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRIF/TICAM1	TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β (IFN- β)/TIR domain-containing adaptor molecule 1
TRAF6	TNF-receptor-associated factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAM/TICAM2	TIR domain-containing adaptor molecule/TRIF related adaptor molecule 2
TsCHR''NC	Tosylméthylisocyanures
TsOH	Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
UPEC	UroPathogenic <i>Escherichia coli</i>
UNC93B1	Uncoordinated 93 homolog B1
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
XantPhos	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène
XPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényl
Z-loop	Boucle Z

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	57
Schéma 2 : Construction de l'imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-one.	58
Schéma 3 : Construction de l'imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-one.	59
Schéma 4 : Construction de l'imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-one.	59
Schéma 5 : Synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	59
Schéma 6 : Mécanisme général de la cyclisation décarboxylative	60
Schéma 7 : La thermolyse éclair sous vide pour la synthèse d'une grande variété d'hétérocycles.	61
Schéma 8 : Synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines à partir du cycle imidazole.	62
Schéma 9 : Cyclisation réductrice	62
Schéma 10 : Construction des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-amine	63
Schéma 11 : Synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-ones	63
Schéma 12 : Synthèse du cycle imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline en one-pot.	64
Schéma 13 : Mécanisme général de la réaction multicomposants de Van Leusen.....	64
Schéma 14 : Première stratégie de synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines développée dans notre laboratoire.....	65
Schéma 15 : Deuxième stratégie de synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines développée dans notre laboratoire.....	65
Schéma 16 : Construction du cycle imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-one en utilisant la réaction multicomposant d'Ugi.....	66
Schéma 17 : La synthèse sélective de la forme réduite et oxydée des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines via la réaction modifiée de Pictet-Spengler.....	67
Schéma 18 : Synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines par l'intermédiaire du couplage croisé déhydrogénatif catalysé par l'iode (I ₂)	68
Schéma 19 : Synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines en utilisant le DMSO.	69
Schéma 20 : Construction du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline.....	70
Schéma 21 : Synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxalin-4-amine.	70
Schéma 22 : Construction du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline en utilisant le couplage croisé de Sonogashira.	71
Schéma 23 : Synthèse du cycle quinoxaline via la réaction multicomposants de Groebke-Blackburn.	72
Schéma 24 : Synthèse du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline via deux réactions multicomposants séquentielles	72
Schéma 25 : Synthèse du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline via la formation de la liaison C(3a)-C(4).	73

Schéma 26 : Synthèse du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline via la formation de la liaison C(3a)-C(4).	73
Schéma 27 : Construction du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline par cyclisation intramoléculaire.	74
Schéma 28 : Construction du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline en utilisant le CDI.	74
Schéma 29 : Synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxalines par la réaction d'Ullman.	75
Schéma 30 : Stratégie de synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxalines développée au sein de notre laboratoire.....	75
Schéma 31 : Construction du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine par condensation de la pyrazine avec la 1,3-dichloroacétone et le bromopyruvate d'éthyle.....	76
Schéma 32 : Synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines par condensation de la pyrazine avec le bromopyruvate d'éthyle.	77
Schéma 33 : Synthèse du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine substitué.....	77
Schéma 34 : Stratégie de synthèse du 5,8-dibromoimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine.	78
Schéma 35 : Stratégie de synthèse du 5,8-dibromoimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine.	78
Schéma 36 : Stratégie de synthèse du 5,8-dibromoimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine.	79
Schéma 37 : Synthèse d'une grande variété des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines substitués.	80
Schéma 38 : Une nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines en utilisant la réaction multicomposants d'Ugi.	81
Schéma 39 : Synthèse assistée par micro-ondes d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines.	81
Schéma 40 : Différentes stratégies de synthèse d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines substitués sur le cycle d'imidazole.....	81
Schéma 41 : Construction du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine via la réaction multicomposants d'Ugi. .	82
Schéma 42 : Synthèse d'imida[1,2- <i>a</i>]pyrazines via la réaction multi-composants de Groebke-Blackburn.	82
Schéma 43 : Synthèse des 3-aminoimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines via la réaction multicomposants de Groebke-Blackburn	83
Schéma 44 : Synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines substituées en position 6 et 8.	83
Schéma 45 : Synthèse de 2-haloimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine par cyclisation oxydante catalysée par le cuivre.....	84
Schéma 46 : Synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines par la réaction d'Ugi.	84
Schéma 47 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.	85
Schéma 48 : Réaction d'Ullman pour la synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.	86
Schéma 49 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines en one-pot.	86
Schéma 50 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines en one-pot.	87
Schéma 51 : Procédé Wacker	91
Schéma 52 : Réaction de Tsuji-Trost	91
Schéma 53 : Réaction de Heck en 1965	92

Schéma 54 : Le mécanisme de la réaction de Heck.....	93
Schéma 55 : Réaction de Kumada.....	93
Schéma 56 : Réaction de Corriu.....	94
Schéma 57 : Réaction de Murahashi.....	94
Schéma 58 : Réaction de Negishi.....	94
Schéma 59 : Réaction de Stille.....	95
Schéma 60 : Réaction de Hiyama.....	95
Schéma 61 : Réaction de Backwald et Hartwig.....	95
Schéma 62 : Cycle catalytique général classique d'une réaction de couplage organométallique catalysée par du palladium.....	96
Schéma 63 : Réaction de Suzuki-Miyaura.....	97
Schéma 64 : Mécanisme réactionnel du couplage croisé de Suzuki-Miyaura.....	98
Schéma 65 : Réaction de Heck avec l'alcyne en 1975.....	101
Schéma 66 : Réaction de Cassar.....	101
Schéma 67 : Réaction de Cassar.....	102
Schéma 68 : Réaction de Stephens-Castro.....	102
Schéma 69 : Mécanisme réactionnel du couplage croisé de Sonogashira.....	103
Schéma 70 : Réaction de Hay/Glaser.....	104
Schéma 71 : Couplage de Suzuki-Miyaura en série des imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxalines.....	104
Schéma 72 : Couplage de Suzuki-Miyaura en série des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	105
Schéma 73 : Couplage de Suzuki-Miyaura en série des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines.....	106
Schéma 74 : Couplage de Sonogashira en série des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines.....	107
Schéma 75 : Premier essai de synthèse de la série des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	108
Schéma 76 : La voie de synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines méthylés.....	109
Schéma 77 : Nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	110
Schéma 78 : Premier essai de synthèse de la série des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	112
Schéma 79 : Deuxième essai de synthèse de la série des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	112
Schéma 80 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	113
Schéma 81 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura sur la série des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	114
Schéma 82 : Méthylation par couplage croisé de Suzuki-Miyaura en présence du Pd(dppf)Cl ₂ .CH ₂ Cl ₂ comme catalyseur et Cs ₂ CO ₃ comme base.....	114
Schéma 83 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant l'oxyde d'argent.....	115
Schéma 84 : Synthèse des dérivés de pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline.....	121
Schéma 85 : Le profil des molécules à synthétiser appartenant à la série des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines (I), imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines (II) et pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines (III).....	139
Schéma 86 : Alkylation du composé 5.27a via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant le chauffage traditionnel.....	141

Schéma 87 : Alkylation du composé 5.2 via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant le Pd(dppf)Cl ₂ .CH ₂ Cl ₂ ou Peppsi. <i>i</i> Pr comme catalyseur.....	142
Schéma 88 : Couplage croisé pallado-catalysé en utilisant des organolithiens.....	143
Schéma 89 : Couplage croisé pallado-catalysé du composé 5.15 et le <i>n</i> -BuLi.....	143
Schéma 90 : Couplage croisé catalysé par le fer du composé 5.15 et le <i>n</i> -BuLi.....	144
Schéma 91 : Bromation du cycle imidazole.....	144
Schéma 92 : Alkylation du cycle imidazole.....	144
Schéma 93 : Essais d'alkylation via le couplage croisé de Sonogashira.....	145
Schéma 94 : Alkylation du composé 5.30 via couplage croisé de Sonogashira.....	145
Schéma 95 : Stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines alkylés.....	146
Schéma 96 : Stratégie de synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines.....	147
Schéma 97 : Iodation du cycle imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline.....	148
Schéma 98 : Transfert d'halogène brome-iode.....	148
Schéma 99 : Iodation de l'imidazole en utilisant le diiode et l'acide orthopériodique.....	148
Schéma 100 : Iodation du composé 5.1	148
Schéma 101 : Alkylation de l'imidazole via le couplage croisé de Sonogashira.....	149
Schéma 102 : Nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines alkylés.....	149
Schéma 103 : Synthèse du 1-butylimidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalin-4-amine.....	150

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Transduction du signal et les différentes voies de signalisation lors de l'activation des TLRs par leurs ligands naturels [44].	9
Figure 2 : Le trafic intracellulaire du TLR7 : Depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à leur destination finale l'endosome [62].	13
Figure 3 : Structure du TLR8 humain. (A) Représentation schématique de l'ectodomaine du TLR8 (hTLR8) : la région N-terminale est colorée en vert et la région C-terminale en orange. (B) La forme dimérique inactive du hTLR8, le premier monomère est coloré en vert (hTLR8) et son partenaire est coloré en bleu (hTLR8*). (C) La forme active du TLR8 en liaison avec son ligand CL097. Les atomes oxygène O, azote N et soufre S sont colorés en rouge, bleu et orange respectivement [63].	15
Figure 4 : L'interface protéine-protéine dans la forme inactive du TLR8 (la surface colorée en orange) [63].	16
Figure 5 : L'interface de dimérisation dans la forme active du TLR8. L'interface protéine-protéine est représentée en orange et l'interface induite par le ligand est représentée en rouge [63].	17
Figure 6 : Les résidus d'acides aminés du TLR8 impliqués dans la liaison avec les agonistes : CL097 (A) , CL075 (B) et R848 (C) . Les atomes de carbone C du ligand sont colorés en jaune, les atomes d'azote N en bleu. Les molécules d'eau sont représentées par des cercles rouges et les liaisons d'hydrogènes par des lignes pointillées [63].	18
Figure 7 : Le changement de conformation du TLR8 induit par la liaison à l'agoniste [63].	19
Figure 8 : La structure du TLR8 en liaison avec les produits de dégradation de l'ARNsb sur le premier et sur le second site. L'uridine sur le premier site et l'UG sur le second site sont représentés en jaune et violet respectivement. Les atomes C, O, N et P du ligand sont colorés en jaune (uridine) ou violet (UG), rouge, bleu et orange respectivement. Les molécules d'eau sont représentées par des cercles rouges et les liaisons d'hydrogènes par des lignes pointillées [64].	20
Figure 9 : Représentation schématique des interactions entre TLR8 et l'uridine [64].	21
Figure 10 : Le mécanisme d'activation probable des TLR8 par clivage de la boucle Z. TLR8 avec une boucle Z non clivée est en forme monomérique. Une fois la boucle Z est clivée, le récepteur forme un dimère non lié. Après liaison à l'agoniste, le dimère sera active [65].	22
Figure 11 : (A) Représentation schématique du TLR7 du singe (<i>MmTLR7</i>). La partie N-terminale, la boucle Z et la partie C-terminale sont représentées par vert, violet et gris respectivement. Les LRRs qui forment le premier site et le second site sont représentés par des cercles rouges et bleus respectivement. La ligne jaune indique la liaison disulfure entre C98 et C475. (B) Le dimère du <i>MmTLR7</i> -G-polyU. Le premier monomère est coloré en vert alors que son partenaire est coloré en gris. Les atomes C, O, N et P du ligand sont colorés en jaune (guanine) ou gris (UUU), rouge, bleu et orange respectivement. (C) Le dimère du <i>MmTLR7</i> avec le resiquimod R848. Les atomes C du R848 sont colorés en violet [66].	23

Figure 12 : Interaction du <i>Mm</i> TLR7 avec le resiquimod R848 au niveau du premier site [66].	25
Figure 13 : Interaction du <i>Mm</i> TLR7 avec la guanosine au niveau du premier site [66].	25
Figure 14 : Interaction du <i>Mm</i> TLR7 avec le polyU (UUU) au niveau du second site [66].	26
Figure 15 : Les différentes voies de signalisation lors de l'activation des TLR7/8 par leurs ligands naturels (ssARN) ou synthétiques (Résiquimod, R848).	29
Figure 16 : Structures chimiques de l'imiquimod et de son dérivé le résiquimod.	32
Figure 17 : Structure chimique de la Loxoribine, agoniste TLR7 [133].	34
Figure 18 : Structure générale des imidazo[4,5- <i>c</i>]quinolines.	37
Figure 19 : Structure des agonistes TLR7 et TLR8 : 3M-001 , 3M-002 et 3M-003 [134].	37
Figure 20 : Structure du gardiquimod et des agonistes du TLR7 [141].	38
Figure 21 : Structure générale du cycle imidazo[4,5- <i>c</i>]quinoline[142].	39
Figure 22 : Structure générale du cycle imidazoquinoline avec les différentes substituants en position N1 [144].	40
Figure 23 : Structure générale du 9-benzyl-8-hydroxyadénine avec les différentes substituants en position C ₂ [145][146].	41
Figure 24 : Structure des agonistes du TLR7 appartenant à la série des 9-benzyl-8-hydroxyadénines, SZU-101 [148] et CL264 [145].	41
Figure 25 : Structure chimique du composé 2.4 avec la structure générale des composés substitués en position R ₁ [150].	42
Figure 26 : Structure générale des thiazoloquinolines avec la structure chimique du composé 2.5 [151].	43
Figure 27 : Structures chimiques des composés 2.6 et 2.7 [152][153].	43
Figure 28 : Les interactions du composé 2.6 avec l'ectodomaine du TLR8 humain [153].	44
Figure 29 : Structures chimiques des composés 2.8 , 2.9 , 2.10 et 2.11 [154].	44
Figure 30 : La structure cristalline de l'ectodomaine de TLR8 humain complexé avec le composé 2.10 , montrant les interactions clés dans la poche de liaison [154].	45
Figure 31 : Structures chimiques des composés 13 [165], 14 [166] et 15 [167].	45
Figure 32 : Structure chimique du composé 2.15 [168].	46
Figure 33 : Structure chimique du composé 3M-052 .	46
Figure 34 : Structure chimique du gardiquimod, des composés 3.16 et 3.17 [202].	50
Figure 35 : Structures chimiques des composés 2.18 , 2.19 , 2.20 [193].	51
Figure 36 : Structure générale des dimères d'imidazoquinolines liés en position C2 [204].	51
Figure 37 : Structure chimique du CU-CPT8m [205].	52
Figure 38 : Structure cristalline du complexe TLR8-CU-CPT8m. (a) Vue de face (en haut) et vue latérale (en bas) des complexes sans ligand (gauche), TLR8-cu-cpt 8m (milieu) et TLR8-R848 (droite). TLR8 et son partenaire de dimérisation, TLR8 *, sont respectivement de couleur verte et cyan. Les distances entre les extrémités C-terminales de deux monomères du dimère tLR8 (TLRR8-	

CU-CPT8m) sont similaires à celles du dimère sans ligand (à droite). Les atomes c, o et n des ligands sont colorés en jaune, rouge et bleu, respectivement. (b) vue rapprochée du site de liaison de l'antagoniste du TLR8 sans ligande (à gauche) et du TLR8-CU-CPT8m (à droite). Les molécules d'eau sont indiquées par des cercles rouges. (c) Représentation schématique des interactions entre CU-CPT8m et le TLR8. La poche hydrophobe et les liaisons hydrogène sont représentées par des arcs gris pointillés et des lignes rouges pointillées, respectivement [205]. 53

Figure 39 : Mécanisme antagoniste proposé des composés **CU-CPT** (en haut) et représentation schématique de l'arrangement des domaines dans chaque forme du TLR8 (en bas). LRR8, LRR11-13, LRR15-16 et LRR17-18 sont respectivement colorés en jaune, vert, bleu et violet. Dans le schéma du bas, l'antagoniste et l'agoniste sont illustrés par des cercles jaunes et orange [195]. 54

Figure 40 : Structures chimiques du **CU-CPT9a** et **CU-CPT9b** [205]. 54

Figure 41 : Structure générale des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines..... 56

Figure 42 : Structure générale des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines..... 69

Figure 43 : Structure générale des imidazo[1,2-*a*]pyrazines..... 76

Figure 44 : Imidazo[1,2-*a*]pyrazines et leur activité inhibitrice PDEIV. 88

Figure 45 : Imidazo[1,2-*a*]quinoxalines et leur activité inhibitrice PDEIV et PDEIII..... 88

Figure 46 : L'activité anticancéreuse de la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines 89

Figure 47 : Structure chimique des deux composés les plus actifs : **EAPB0203** et **EAPB0503**. 90

Figure 48 : Structure chimique de la bromoimidazoquinoxaline **3.165**. 90

Figure 49 : Spectres RMN NOE des deux isomères bromés **5.15** et **5.16**..... 111

Figure 50 : Sécrétion de la phosphatase alcaline embryonnaire (SEAP) suite à la stimulation du TLR7 ou TLR8 par des ligands chimiques dans les cellules HEK-Blue™ hTLR7/hTLR8. 122

Figure 51 : Structure chimique du **CL264** 124

Figure 52 : Structure chimique du résiquimod 124

Figure 53 : Les composés de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines testés pour leur activité antagoniste TLR7. 125

Figure 54 : Interactions entre le 2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine et l'ectodomaine du TLR8. 140

Figure 55 : Interactions entre le 2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine et l'ectodomaine du TLR7. 140

Figure 56 : Structure chimique du catalyseur PEPPSI-*i*Pr 142

Figure 57 : Structure chimiques de deux antagonistes TLR7..... 151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des principaux PRRs en fonction de leur localisation cellulaire et de la nature des ligands reconnus.....	5
Tableau 2 : Les dérivés pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines obtenus après la réaction de Suzuki-Miyaura	114
Tableau 3 : Tableau montrant l'activité antagoniste TLR7 de la série des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.	126
Tableau 4 : Conditions de l'alkylation via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura et rendements. ...	141
Tableau 5 : Conditions d'alkylation du composé 5.2 via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura.	142
Tableau 6 : Conditions d'alkylation du composé 5.15 via un couplage croisé catalysé par Pd ou Fe.	144

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Les Toll-Like récepteurs (TLR)	4
1. Système immunitaire	4
1.1 Définition du système immunitaire	4
1.2 Immunité innée.....	4
1.3 Immunité adaptative	6
2. Les Toll-like récepteurs (TLR).....	6
2.1 Localisation	7
2.2 Structure	7
2.3 Différents types des TLRs avec leurs ligands	7
2.4 Voies de signalisation des TLR.....	8
2.4.1 Voie du Myd88.....	9
2.4.2 Voie du TRIF.....	10
3. Les récepteurs Toll-like 7 et 8 (TLR7/8).....	11
3.1 Expression cellulaire	11
3.2. Le trafic intracellulaire des TLR7 et 8 : Depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à leur destination finale l'endosome.....	12
3.2.1 La délivrance du TLR7 à l'endosome	12
3.2.2. La délivrance du TLR8 à l'endosome	14
3.3 Structure du TLR8.....	14
3.4 Structure du TLR7.....	22
3.5 Signalisation des TLR7 et TLR8.....	27
4. TLR et immunité adaptative.....	29
Chapitre II : Développement des ligands ciblant les TLR7 et TLR8	31
1. Introduction	31
2. Les agonistes des TLR7 et TLR8	31
2.1 Premières molécules synthétisées décrites comme agonistes du TLR7 et TLR8.....	31
2.1.1 L'imiquimod.....	32
2.1.1.1 Mécanisme d'action de l'imiquimod.....	32
2.1.2 Le résiquimod.....	33
2.2 ARN simple brin agoniste physiologique du TLR7 et 8	35
2.3 Agonistes synthétiques du TLR7 et TLR8	36
2.3.1 Les agonistes appartenant à la série des imidazo[4,5- <i>c</i>]quinolines	36

2.3.2 Les agonistes appartenant à la série des 8-hydroxyadénines.....	40
2.3.3 Les agonistes appartenant à d'autres séries chimiques.....	42
3. Les Antagonistes du TLR7 et TLR8	47
3.1 Les oligonucléotides.....	49
3.2 Les antagonistes appartenant à la série des imidazo[4,5- <i>c</i>]quinolines, des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidines et des quinolines.....	50
Chapitre III : Les hétérocycles : Imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines, Imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxalines, Pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines et Imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines	56
1. Synthèse des composés de type imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline	56
1.1 Synthèse à partir du cycle quinoxaline.....	56
1.2 Synthèse à partir du cycle imidazole.....	61
2. Synthèse des composés de type imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline	69
2.1 Synthèse à partir du cycle quinoxaline.....	69
2.2 Synthèse à partir du cycle imidazole.....	73
3. Synthèse des composés de type imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine	75
3.1 Condensation de la 2-aminopyrazine avec des composés α -halocarbonyles.....	76
3.2 Synthèse des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazines par réaction multicomposants : Réaction d'Ugi ..	80
4. Synthèse des pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxalines.....	84
5. Activités biologiques.....	87
Chapitre IV : Les réactions de couplage croisée pallado-catalysées	91
1. Introduction	91
2. Couplage croisé de Suzuki-Miyaura	96
2.1 Généralités.....	96
2.2 Mécanisme.....	97
2.3 Les différents partenaires de la réaction.....	98
3. Couplage croisé de Sonogashira.....	101
3.1 Généralités.....	101
3.2 Mécanisme.....	102
3.3 Conditions de la réaction.....	103
4. Applications du couplage croisé de Suzuki-Miyaura et Sonogashira en serie imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine, imidazo[1,2- <i>a</i>]quinoxaline et imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline.....	104
Chapitre V : Travaux réalisés	108
1. Premières synthèses réalisées	108
1.1 Synthèse des composés de type imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline	108
1.2 Synthèse des composés de type pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline	112
1.3 Résultats complémentaires sur la série pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline	121

2.	Evaluation de l'effet immunomodulateur des premières molécules synthétisées	121
2.1	Le modèle expérimental	122
2.2	Evaluation in vitro de l'activité agoniste TLR7 et TLR8	123
2.2.1	Résultats des études de l'effet agoniste sur les cellules HEK-Blue™ hTLR7 et hTLR8	123
2.3	Evaluation in vitro de l'activité antagoniste sur les cellules HEK-Blue™ hTLR7	124
2.3.1	Résultats des études de l'effet antagoniste sur les cellules HEK-Blue™ hTLR7	125
3.	Activité inhibitrice IκB kinase (IKKs)	126
4.	Etude de modélisation moléculaire et optimisation de la synthèse chimique.....	139
4.1	Modélisation moléculaire « docking virtuel ».....	139
4.2	Difficultés liées à l'alkylation de la série des imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline, pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline et imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine	141
4.2.1	Problèmes liés au couplage croisé de Suzuki-Miyaura	141
4.2.2	Problèmes liés au couplage croisé avec les organolithiens	143
4.2.3	Difficultés liées à l'alkylation de l'imidazole.....	144
4.2.4	Alkylation via le couplage croisé de Sonogashira.....	145
4.3	Synthèse des composés alkylés de type pyrazolo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline.....	145
4.4	Synthèse des composés de type imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazine	146
4.5	Synthèse de composés alkylés de type imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline.....	147
4.5.1	Iodation en position 1 du cycle imidazo[1,5- <i>a</i>]quinoxaline	147
4.5.2	Iodation en position 2 du cycle imidazole	148
5.	Détermination de l'effet immunomodulateur de la deuxième librairie de molécules	151
	Annexes.....	186
	Références	201

INTRODUCTION GENERALE

L'immunité innée est la première ligne de défense, non spécifique, contre les agents pathogènes. Elle est induite par un signal danger émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*) et des motifs structuraux très conservés présents sur l'enveloppe des micro-organismes appelées PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Il existe trois groupes des PRR : les PRR solubles comme la protéine C réactive (CRP), les PRR membranaires comme les récepteurs au mannose, les récepteurs scavengers et les récepteurs Toll-like (TLR) et les PRR intracellulaires tels que « NOD-like receptor » (NLR) et « RNA helicase » (RLR). Les récepteurs Toll-like (TLRs) représentent un groupe particulièrement important des PRR. Les TLR sont des récepteurs cellulaires qui existent chez l'homme et les mammifères et sont homologues au produit du gène de drosophile Toll. Dix TLR différents (TLR1 à 10) ont été identifiés chez l'homme et qui sont exprimés dans les cellules immunitaires innées telles que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages ainsi que les cellules non immunitaires telles que les cellules fibroblastiques et les cellules épithéliales. Les TLR sont divisés en deux groupes en fonction de leur localisation, des TLR de surface cellulaire et des TLR intracellulaires. Les TLR de surface cellulaire comprennent TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10 et reconnaissent les composants de la membrane microbienne, tandis que les TLR intracellulaires sont localisés au niveau de la membrane de l'endosome et comprennent TLR3, TLR7, TLR8, TLR9. Ces derniers reconnaissent les acides nucléiques comme l'ADN et l'ARN.

Parmi les TLR endosomaux, TLR7 et TLR8 possèdent un important degré d'homologie et de similitude au niveau de la séquence et de la fonction à la fois. Les deux récepteurs reconnaissent des ARN simple brin viraux, ainsi que des dérivés tricycliques de la série des imidazo[4,5-*c*]quinolines tels que l'imiquimod (agoniste de TLR7) et le résiquimod (agoniste de TLR7/8). Durant ces dernières années, de nombreux travaux se sont concentrés sur le développement de nouveaux agonistes TLR7/8 appartenant à différentes séries chimiques. Le pouvoir immunostimulant de ces agonistes leur permet d'intervenir dans la thérapie de plusieurs maladies et d'être des candidats adjuvants vaccinaux. En revanche, une activation immunitaire chronique peut être à la base de plusieurs maladies infectieuses et auto-immunes. Pour cela, le développement d'antagonistes de TLR7/8 peut jouer également un rôle important dans la thérapie de ces maladies.

Notre laboratoire d'Oncopharmacochimie et Pharmacotoxicologie Cutanée travaille depuis une dizaine d'années sur des molécules hétérocycliques analogues de l'imiquimod afin d'évaluer leur activité anticancéreuse sur le mélanome et le lymphome. Ces molécules appartiennent à trois séries chimiques : imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Vu les propriétés anticancéreuses importantes de la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, notre laboratoire a poursuivi ses travaux de recherche sur cette série tant en chimie qu'en biologie. De nouveaux dérivés

d'imidazo[1,2-*a*]quinoxalines ont été synthétisés afin d'augmenter la diversité structurale de cette série. Parallèlement à la synthèse chimique, plusieurs tests biologiques ont été effectués concernant les voies de transduction de signal impliquées dans le mode d'action des molécules actives.

Récemment, notre laboratoire a accordé de l'importance au potentiel immunomodulateur de ces hétérocycles. L'analogie structurale entre les imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, les pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines, les imidazo[1,2-*a*]pyrazine et l'imiquimod, connu par son activité agoniste TLR7, a permis de fixer les futurs axes de recherche tant en chimie qu'en biologie, notamment autour des effets immunomodulateurs des dérivés tri- et bi-cycliques, et particulièrement leur activité agoniste ou antagoniste vis à vis des TLR7 et TLR8. Il m'a donc été proposé d'initier ce travail et de développer des molécules de type imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline et imidazo[1,2-*a*]pyrazine afin d'évaluer leur activité agoniste ou antagoniste TLR7 et TLR8.

Ce travail de recherche est effectué en cotutelle entre l'université de Montpellier et l'Université Libanaise et sera présenté sous la forme de thèse sur articles contenant cinq chapitres.

Dans les deux premiers chapitres, nous exposerons les données bibliographiques concernant la localisation, l'expression, le trafic intracellulaire, la signalisation ainsi que la structure des TLR7 et TLR8. Ensuite une recherche bien détaillée sur les différents types de ligands TLR7/8 incluant notamment des études de relation structure-activité qui seront développées.

Le troisième et le quatrième chapitre seront consacrés aux différentes stratégies de synthèse conduisant à la construction des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines et des imidazo[1,2-*a*]pyrazines. Puis, un rappel bibliographique concernant les couplages croisés pallado-catalysés sera exposé.

Après une étude bibliographique détaillée, nous aborderons les travaux réalisés dans le cinquième chapitre :

Dans un premier temps, nous exposerons les différentes stratégies de synthèse qui nous a permis d'obtenir les molécules de deux séries chimiques différentes, les imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et les pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines. Par l'intermédiaire du couplage croisé de Suzuki-Miyaura, nous avons pu augmenter la diversité structurale de ces séries. Cette première librairie de molécules a été évaluée pour l'activité agoniste et antagoniste TLR7/8 dans le Laboratoire d'Immunologie à la Faculté de Santé Publique II à l'Université libanaise. En se basant sur les résultats biologiques obtenus, les molécules nouvellement synthétisées ont été également testées pour leur activité inhibitrice I κ B kinases (IKKs).

Dans un second temps, des études de modélisation moléculaire ou de docking virtuel ont été effectuées en vue de concevoir un profil bien précis de molécules à synthétiser. Cette partie a été effectuée en collaboration avec le Centre de Biochimie Structurale (CBS) à Montpellier.

Par rapport aux résultats des chapitres précédents, des essais d'alkylation ont été réalisés via de couplages croisés pallado-catalysés afin d'introduire une chaîne alkyle sur le cycle à cinq sommets. Une deuxième librairie de molécules a été ainsi synthétisée en utilisant de nouvelles stratégies de

synthèse. L'activité immunomodulatrice des molécules nouvellement synthétisées a été également testée sur des cellules HEK-Blue™ hTLR7 et hTLR8 exprimant soit le TLR7 soit le TLR8.

Dans la conclusion générale, nous résumerons les principaux résultats et exposerons les perspectives de ce travail.

CHAPITRE I : LES TOLL-LIKE RECEPTEURS (TLR)

1. Système immunitaire

1.1 Définition du système immunitaire

L'immunité fait référence aux mécanismes de défense d'un organisme vivant contre les agents pathogènes responsables de maladies, tels que les virus, les bactéries, les parasites ou contre certaines molécules « étrangères » toxiques. Il est également capable de détecter et de détruire les cellules de son propre organisme quand elles sont transformées par un virus ou un processus cancéreux et devenues du « soi modifié ». L'ensemble des cellules, tissus et molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections est appelé système immunitaire. Ce dernier est composé d'une multitude de cellules et de molécules composant un réseau dynamique capable de reconnaître spécifiquement et d'éliminer un grand nombre de micro-organismes étrangers ainsi que des cellules du soi transformées par un virus ou un processus cancéreux. L'organisme dispose de deux systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

1.2 Immunité innée

L'immunité innée correspond à une réponse constitutive d'action immédiate, non spécifique de l'agent pathogène et non adaptative. Elle repose sur une distinction globale du soi et du non-soi. Cette première ligne de défense, très efficace, empêche la plupart des infections de se propager et permet ainsi d'éliminer l'agent infectieux dans les heures qui suivent sa rencontre avec l'organisme. D'abord, le système immunitaire utilise ses barrières physiques. En effet, le premier obstacle rencontré par les pathogènes sont les barrières anatomiques protectrices de l'hôte. C'est l'exemple de la peau et de la surface des muqueuses qui constituent des barrières efficaces contre l'entrée de la plupart des microorganismes. L'acidité de l'estomac et de la transpiration empêche également le développement des organismes incapables de se développer dans des conditions acides. Les enzymes, comme le lysozyme, qui sont présentes dans les larmes peuvent également contribuer à cette défense en altérant la paroi cellulaire de certaines bactéries. Au-delà de ces premières barrières, l'immunité innée comporte non seulement des acteurs cellulaires, comme les phagocytes [1] et les cellules tueuses naturelles (NK) mais aussi des composants anti-microbiens synthétisés par l'hôte, et des molécules solubles comme les interférons et les facteurs du complément. L'ensemble de ces mécanismes permet de reconnaître et neutraliser les organismes étrangers. Cependant, les éléments de reconnaissance du système immunitaire inné, capables de discriminer le Soi du non Soi, ne sont pas spécialisés dans la reconnaissance des différences subtiles entre les molécules étrangères. La plupart des molécules de

l'immunité innée ont ainsi développé la capacité de reconnaître des groupes ou "*patterns*" de molécules communément retrouvés sur certains pathogènes via des récepteurs appelés PRR (Pattern-Recognition Receptors) [2] [3]. Ces récepteurs reconnaissent des molécules aux motifs structuraux conservés présents sur l'enveloppe des microorganismes mais absents des cellules eucaryotes : les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) [2] [3] (Tableau 1). Parmi ces PRR, on peut distinguer trois groupes de PRR :

- les PRR solubles comme la protéine C réactive (CRP) responsable de l'activation du complément et de l'opsonisation.
- les PRR membranaires comme
 - o Les récepteurs au mannose [4] impliqué dans la phagocytose.
 - o Les récepteurs scavengers [5] liant les lipoprotéines oxydées véhiculant le cholestérol destinées à être éliminées par phagocytose et jouant un rôle dans la clairance des corps apoptotiques et dans le métabolisme lipidique.
 - o Les récepteurs Toll-like (TLRs) [6] [7] permettant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, d'interféron de type I, ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes faisant un lien avec l'immunité adaptative [8] [9] [10].
- Les PRR intracellulaires tels que « NOD-like receptor » (NLR) [11] [12] et « RNA helicase » (RLR) [13] permettent une reconnaissance cytosolique des composés bactériens et viraux, respectivement.

Tableau 1 : Liste des principaux PRRs en fonction de leur localisation cellulaire et de la nature des ligands reconnus.

PRR	PAMP	Localisation
Récepteur scavenger	LDL, LPS (bactéries)	Membrane plasmique
Mannose récepteur	Mannose (levures, bactéries)	Membrane plasmique ou plasmatique
TLR2	Peptidoglycans (Gram+)	Membrane plasmique
TLR4	Lipopolysaccharides (Gram-)	Membrane plasmique
TLR3	ARN double brin (virus)	Endosome
TLR7, 8	ARN simple brin (virus)	Endosome
RIG-1 like helicase	ARN double brin (virus)	Cytosol
Nod-like receptor (NLR)	Parois bactérienne ou motifs bactériens (flagelline, toxine), signaux de danger endogènes	Cytosol

1.3 Immunité adaptative

Cependant, il arrive que l'immunité innée ne soit pas suffisante et que le pathogène parvienne à échapper à cette première ligne de défense. Ainsi, afin de reconnaître et d'éliminer cette fois-ci sélectivement les pathogènes, il existe une seconde voie d'immunité, connue sous le nom d'immunité adaptative, qui se met en place quelques jours après l'infection initiale. Cette réponse constitue une seconde ligne de défense qui permet d'éliminer les pathogènes qui ont échappé à la réponse innée ou qui persistent malgré cette réponse. Cette réponse adaptative nécessite la communication entre deux populations cellulaires : les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Parce qu'ils produisent et exposent à la surface membranaire des récepteurs qui fixent l'antigène, les lymphocytes portent les attributs spécifiquement immunologiques de spécificité, de diversité, de mémoire et de reconnaissance du Soi et du non Soi. Deux populations de lymphocytes coexistent dans l'organisme : les lymphocytes B (LB), sécréteurs d'anticorps, conduisant à une immunité humorale et les lymphocytes T (LT), schématiquement divisés en cellules auxiliaires et en cellules cytotoxiques, conduisant majoritairement à une immunité cellulaire. Les cellules présentatrices d'antigènes, quant à elles, sont en charge de capturer l'antigène et de le présenter aux lymphocytes afin d'initier cette réponse adaptative.

2. Les Toll-like récepteurs (TLR)

Les PRRs ont été identifiés dans le sérum, la surface cellulaire, l'endosome, et dans le cytoplasme. Les récepteurs Toll-like (TLRs) représentent un groupe particulièrement important des PRR. Les TLRs sont des récepteurs cellulaires qui existent chez l'homme et les mammifères et sont homologues au produit du gène de drosophile Toll [6] [7].

La drosophile est un modèle génétique puissant, pour lequel de nombreux outils génomiques et protéomiques sont disponibles, qui a fait ses preuves pour l'élucidation des mécanismes moléculaires contrôlant le développement, l'oncogenèse ou plus récemment les mécanismes de défense de l'hôte. Une des caractéristiques de la réponse immunitaire de la drosophile est la synthèse de puissants peptides antimicrobiens en réponse à l'infection. Ces peptides inductibles, qui sont actifs contre des bactéries à Gram positif et/ou négatif ou des champignons, peuvent être utilisés comme marqueurs de la réponse immunitaire. L'analyse génétique de la régulation de l'expression des gènes codant pour ces peptides a mené à l'identification de deux voies de signalisation : la voie Toll, activée en réponse à des infections par des bactéries à Gram positif ou des champignons, qui contrôle notamment l'expression du peptide antifongique drosomycine ; et la voie IMD « *Immune Deficient* », activée par infections bactériennes à Gram négatif, et qui contrôle l'expression des gènes codant pour des peptides antibactériens comme la diptéricine [6] [14].

Les paralogues TLR sont situés sur les surfaces cellulaires ou à l'intérieur des endosomes et jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les organismes pathogènes. Suite à la mise en évidence du rôle critique joué par le récepteur Toll chez la drosophile, une famille de 13 récepteurs apparentés à Toll, les *Toll-like receptors* (TLRs1-13), a été identifiée chez les mammifères. Cette famille est capable de reconnaître une variété des molécules aux motifs structuraux conservés présents sur l'enveloppe des microorganismes (PAMPs).

2.1 Localisation

Le premier TLR identifié chez les mammifères a été le TLR4 en 1998 [7] [15]. Les TLR sont exprimés sur des cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T, les neutrophiles, les cellules tueuses naturelles (NK), les monocytes, les éosinophiles et sur des cellules non immunitaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules épithéliales des tractus intestinal, respiratoire et urogénital [16] [17]. Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, identifiés chez la souris et l'homme, sont exprimés sur la membrane plasmique cellulaire [18] [19] alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés sur la membrane de l'endosome chez la souris et l'homme, par contre, TLR11, TLR12 et TLR13 sont des récepteurs endosomaux spécifiques de la souris [20] [21] [22] [23].

2.2 Structure

Chaque TLR est composé d'un domaine extramembranaire avec des répétitions riches en leucines (LRR) qui sont responsables de la reconnaissance des éléments du pathogène (PAMPs), d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine cytoplasmique comprenant une séquence Toll/IL-1 receptor (TIR) qui ressemble à celle du récepteur de l'IL1 et qui est responsable de la transduction du signal. L'ectodomaine présente une structure semblable à celle d'un fer à cheval, et les TLR interagissent avec leurs PAMPs en tant qu'homo ou hétérodimère avec un corécepteur ou une molécule accessoire [24] [25].

2.3 Différents types des TLRs avec leurs ligands

Les TLRs sont subdivisés en deux catégories basées sur leur localisation : les TLR exprimés sur la surface cellulaire et les TLRs exprimés dans la membrane des endosomes.

Les TLRs exprimés à la surface cellulaire reconnaissent principalement les composants de la membrane microbienne comme les lipides, les lipoprotéines et les protéines. TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide bactérien (LPS) [15], le TLR2 en formant un complexe dimérique avec le TLR1 ou le TLR6 sur la membrane plasmique reconnaît une grande variété des PAMPs incluant des

lipoprotéines, des peptidoglycanes, l'acide lipotéichoïque, le zymosane, le mannane [26]. Le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne [27]. TLR10 en collaboration avec TLR2 reconnaît des ligands provenant de *Listeria monocytogenes* [28] et il est impliqué dans l'induction de la réponse immunitaire innée suite à une infection par le virus d'influenza [29].

Les TLRs intracellulaires reconnaissent des acides nucléiques dérivés des bactéries et des virus. TLR3 reconnaît l'ARN viral double brin et les petits ARN interférents [30] [31]. TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin d'origine viral ou bactérien [32] [33]. TLR9 reconnaît l'ADN d'origine viral ou bactérien riche en motifs CpG non méthylés, l'hémozoïne (dérivé de l'hémoglobine) du *Plasmodium falciparum* [34]. TLR11 est localisée dans l'endolysosome et reconnaît la flagelline [35] ou un composant protéique inconnu d'*Escherichia coli* uropathogène (UPEC) ainsi qu'une molécule ressemblant à la profiline dérivée de *Toxoplasma gondii* [21]. TLR12 est principalement exprimé dans les cellules myéloïdes et il est très similaire à TLR11 et reconnaît la profiline de *T. gondii* [22]. TLR12 fonctionne comme un homodimère ou un hétérodimère avec TLR11 [36] [37]. TLR13 reconnaît l'ARN ribosomale 23S bactérien [38] [39] [40] et les composants inconnus du virus de la stomatite vésiculaire [41].

2.4 Voies de signalisation des TLR

Les TLRs activent une voie de signalisation menant à l'activation des facteurs de transcription nucléaire qui migrent vers le noyau et régulent l'expression des cytokines inflammatoires et des molécules costimulatrices. Après la liaison avec leurs ligands, les TLRs recrutent un ensemble des protéines adaptatrices qui se fixent sur les domaines TIR des TLRs. Cette fixation déclenche une cascade de signalisation qui aboutit à la translocation des facteurs nucléaires et permet la synthèse de différentes cytokines et chimiokines (Figure 1).

Il existe quatre protéines adaptatrices dans la signalisation des TLRs. Le facteur de différenciation myéloïde 88 (Myd88) est utilisé par tous les TLRs à l'exception du TLR3 et active la voie de NF- κ B et la voie des MAPKs pour l'expression des gènes des cytokines inflammatoires. TIRAP/MAL (TIR-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like) est une protéine adaptatrice qui recrute Myd88 aux TLRs exprimés à la surface cellulaire comme le TLR2 et TLR4. Une étude montre que TIRAP participe à la signalisation des TLRs endosomaux comme le TLR9. TRIF/TICAM1 (TIR-containing adaptor inducing interferon- β (IFN- β)/TIR-domain-containing adaptor molecule 1) est recruté par les TLR3 et 4 et déclenche une voie de signalisation alternative qui conduit à l'activation de l'IRF3, NF- κ B et MAPKs pour l'induction de l'IFN type I et des cytokines inflammatoires. TRAM/TICAM2 (TIR-domain-containing adaptor molecule/TRIF related adaptor molecule 2) est sélectivement recruté par le TLR4 et non le TLR3 afin d'établir la liaison entre TRIF et TLR4. TLR3 interagit directement avec TRIF.

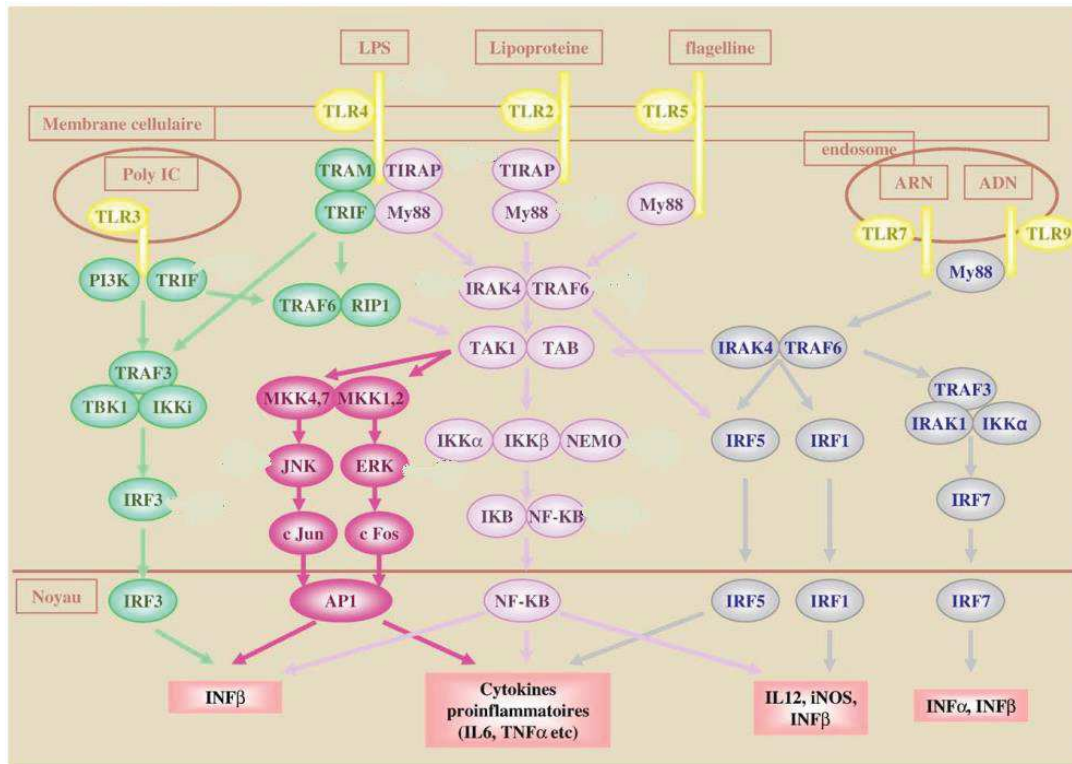


Figure 1 : Transduction du signal et les différentes voies de signalisation lors de l'activation des TLRs par leurs ligands naturels [44].

En gros, la signalisation des TLRs est divisée en deux voies : La voie Myd88 dépendante et la voie TRIF dépendante [24].

2.4.1 Voie du Myd88

Les TLRs interagissent par leur domaine TIR avec une molécule cytoplasmique contenant elle-même un domaine TIR, c'est la protéine adaptatrice Myd88. Cette molécule contient un domaine de mort (DD : Death domain) aminoterminal qui va interagir avec les sérine-thréonine kinases à domaine DD de la famille *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK). Myd88 joue un rôle d'adaptateur entre les TLRs et les kinases impliquées dans la signalisation. IRAK4 est la première kinase activée. IRAK4 active IRAK1, qui est ensuite autophosphorylée sur plusieurs sites et libérée de Myd88. IRAK1 interagit avec *TNF-receptor-associated factor* (TRAF6). Cette molécule à domaine RING active alors les facteurs Uev1a et Ubc13 qui catalysent la polyubiquitination de TRAF6. Le complexe IRAK1-TRAF6 formé initie quatre voies. La première aboutit à la translocation des facteurs nucléaires NF-κB et AP1, les trois autres aboutissant à la translocation d'autres facteurs, les *Interferon regulatory factor* (IRF).

La première voie : La polyubiquitination du TRAF6 lui permet d'interagir et d'activer le *transforming growth factor-β-activated kinase-1* (TAK1) et *TAK1 binding protein* (TAB). Le complexe TAK1-TAB formé et activé initie deux voies : la voie de l'IkB kinase (IKK) qui entraîne la

translocation de NF- κ B et la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) qui aboutit à la translocation d'AP1.

- ✓ **Voie des IKKs** : Dans la voie de l'IKK, TAK1-TAB phosphoryle le complexe IKK α , IKK β , NEMO, qui à son tour phosphoryle I κ B lié à NF- κ B. I κ B se détache et libère NF- κ B qui migre vers le noyau et entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires : l'INF- β , p35, IL12 et *inductible nitric oxide synthetase* (iNOS).
- ✓ **Voie des MAPK** : le complexe TAK1-TAB active aussi les membres de la famille des MAPK comme ERK1/2, p38 et JNK, qui vont activer le facteur de transcription AP1. Il existe trois classes de MAPK qui sont phosphorylées en cascade : les MKKK (MEKK), les MKK (MEK) et les MAPK. TAK1 est une MKKK qui active la MKK 4 et la MKK7 qui phosphorylent c-Jun N-terminal *kinase* (JNK) qui est une MAPK. JNK active le facteur nucléaire « c-Jun » qui est une partie d'AP1. TAK1 peut également activer le complexe « p105 (NF- κ B)–Tpl 2 (MKKK).» Ce complexe activé stimule MKK1 et MKK2 qui activent le facteur *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Le facteur ERK active à son tour le facteur « c Fos » qui constitue la deuxième partie d'AP1 et entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de l'INF- β [42].

La deuxième voie initiée par le complexe IRAK4-TRAF6 est la translocation d'IRF5 qui migre vers le noyau et entraîne la synthèse de l'IL6, le TNF α .

La troisième voie aboutit à l'activation d'IRF1 qui entraîne la synthèse de l'INF β , p35, IL12 et iNOS.

La quatrième voie déclenchée par le complexe IRAK4-TRAF6 est celle qui active le complexe TRAF3-IRAK1-IKK α . Ce dernier initie la translocation de IRF7 en phosphorylant sa partie C terminale. Deux IRF7 activés forment un homodimère qui migre vers le noyau pour activer les gènes des IFN α et β . Ces deux dernières voies sont utilisées uniquement par TLR7 et TLR9 [43].

2.4.2 Voie du TRIF

Cette voie est utilisée par le TLR3 et le TLR4. Le TLR3 fixe directement TRIF sur son domaine TIR, alors que TLR4 utilise TRAM comme intermédiaire pour fixer TRIF. Deux voies sont possibles : la voie de TRAF6 et celle de TRAF3. Dans la voie de TRAF6, TRIF active TRAF6 qui va recruter le *receptor-interacting protein 1* (RIP1). Le complexe TRAF6-RIP1 active TAK1-TAB conduisant à l'activation du NF- κ B et la voie des MAPK [43] ce qui va permettre l'expression des cytokines inflammatoires. Dans la voie du TRAF3, TRIF active TRAF3 qui va recruter TBK1 et IKKi pour la

phosphorylation d'IRF3. Ce dernier forme un homodimère et se dirige vers le noyau pour l'induction de l'IFN β .

3. Les récepteurs Toll-like 7 et 8 (TLR7/8)

Parmi les TLRs qui sont exprimés à la membrane des endosomes, nous citons les TLR7 et 8. Ces deux types de récepteur possèdent un important degré d'homologie et de similitude au niveau de la séquence et de la fonction à la fois [44] [45] [46] [47]. Les deux récepteurs reconnaissent des ARNs simple brin riches en guanosine et uridine comme les ARNs simple brin exogènes dérivant des virus comme le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH), le virus de l'hépatite C et le virus d'influenza A, considérés comme des ligands naturels pour ces récepteurs. Ils reconnaissent aussi des structures chimiques hétérocycliques de faible poids moléculaire comme le résiquimod et l'imiquimod appartenant à la famille des imidazo[4,5-*c*]quinolines [48].

Des différences spécifiques de l'espèce existent dans la reconnaissance de la séquence de l'ARN simple brin et le résiquimod [45]. Par exemple, l'ARN simple brin riche en guanosine et en uridine provenant du virus VIH est reconnu par le TLR7 murin et le TLR8 humain mais non par le TLR7 humain et le TLR8 murin. Par contre, le résiquimod est reconnu par le TLR7 humain et murin ainsi que par le TLR8 humain et non murin.

3.1 Expression cellulaire

L'expression du TLR7 est prédominante dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (DCp) et dans les cellules B [17] [49] [50]. De faibles niveaux de TLR7 ont également été observés dans les cellules non immunitaires telles que les hépatocytes, les cellules épithéliales et les kératinocytes [51] [52] [53] [54]. Contrairement aux TLR7, TLR8 est plus fortement exprimé dans les cellules dendritiques myéloïdes, et à un degré moindre dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, et il est exprimé aussi au niveau des monocytes [17] [55]. Dans certaines circonstances, l'expression de TLR7 est inducible dans les cellules exprimant un niveau basal, indétectable de TLR7, y compris les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules non immunitaires comme les hépatocytes et les kératinocytes [51] [54] [56] [57] [58]. Par exemple, l'expression de l'ARNm du TLR7 est induite par la stimulation de l'IFN- γ au niveau des macrophages. De même l'infection par les virus tels que l'hépatite C, le virus de l'immunodéficience (VIH) et le virus d'influenza A entraîne une sur-régulation de l'expression des TLR7 dans les hépatocytes, les cellules immunitaires circulantes et les macrophages primaires respectivement [51] [56] [59]. Dans ces circonstances, il est probable que les cytokines induites par l'infection virale soient responsables du déclenchement de l'induction de l'expression du TLR7. En effet, l'infection des macrophages primaires par le virus d'influenza entraîne une sur-régulation de l'ARNm du TLR7 d'une manière

dépendante d'IFN type I [59]. En outre, l'expression augmentée de TLR7 et 8 est observée dans le cancer comme le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC : Non-Small-Cell lung carcinoma) et le carcinome hépatocellulaire ainsi que dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé (LED) [57] [60] [61].

3.2. Le trafic intracellulaire des TLR7 et 8 : Depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à leur destination finale l'endosome.

De nombreuses études ont décrit les mécanismes de localisation ainsi que le trafic intracellulaire de TLR7. La plupart de ces études ont été réalisées sur des modèles murins. En comparaison avec le TLR7, les mécanismes contrôlant la localisation du TLR8 sont moins compris, et cela peut être dû à un manque des modèles murins appropriés pour l'étude du TLR8, vu que le TLR8 murin est non fonctionnel.

3.2.1 La délivrance du TLR7 à l'endosome

Le TLR7 est synthétisé sous la forme d'une protéine inactive dans le réticulum endoplasmique (RE) et il doit être replié correctement avant de quitter le RE [62] (Figure 2). Deux protéines chaperonnes résidentes dans le RE : la protéine de choc thermique gp96 et la protéine associée au TLR4 (PRAT4), sont impliquées dans le repliement du TLR7 ainsi que d'autres TLRs. Une autre protéine chaperonne du RE est la protéine 59 contenant des répétitions riches en leucine (LRRC59) qui induit la localisation du TLR8 ainsi que le TLR9 et 3 dans les cellules humaines. La localisation endosomale du TLR8 et TLR9 nécessite l'implication du LRRC59, et l'absence de cette protéine a entraîné une diminution de la signalisation TLR8 et TLR9. Une des molécules chaperonnes du RE, la plus étudiée, est la protéine UNC93B1 « *Uncoordinated 93 homolog B1* », qui joue un rôle important dans l'exportation des TLRs endosomaux qui vont du RE à l'appareil de Golgi puis à l'endosome. En réponse à la signalisation des cytokines pro-inflammatoires, la transcription du TLR7 est induite par le facteur de transcription nucléaire NF- κ B. TLR7 est synthétisé dans le RE où résident les protéines chaperonnes, gp96 et PRAT4, qui sont nécessaires au repliement du TLR7 avant de quitter le RE. Lors d'une stimulation cellulaire (par exemple par l'imiquimod) ou d'une infection, LRRC59 va favoriser un emballage du TLR7 médié par la protéine chaperonne UNC93B1 dans des vésicules recouvertes du complexe II, lui-même composé des protéines d'enveloppe COPII. Ainsi, COPII contenant le TLR7 va migrer du RE jusqu'à l'appareil du Golgi. Dans ce dernier, UNC93B1 va subir l'ubiquitination du TLR7 et la machine HRS/ESCRT (*HRS/endosomal sorting complex required for transport*) prépare le TLR7 ubiquitiné pour le transport endolysosomal. Une famille de protéines adaptatrices (AP 1-4) est nécessaire au transport du TLR-UNC93B1 jusqu'à l'endosome. AP4 et AP3 délivrent le TLR7 de l'appareil du Golgi aux organites apparentés aux lysosomes (LRO) tels que « NF- κ B endosomes » et

« IRF-7 endosomes » respectivement. « IRF-7 endosomes » sont des protéines membranaires associées au lysosome (LAMP)-1⁺/LAMP2⁺ qui agissent par l'intermédiaire de l'IRF-7 pour la production de l'IFN type I. Par contre la production des cytokines pro-inflammatoires se produit lors de la liaison des ligands aux TLRs dans les endosomes NF-κB. Ces endosomes sont formés de protéines membranaires associées au lysosome (LAMP-3⁺/LAMP2⁻) qui agissent par l'intermédiaire du NF-κB.

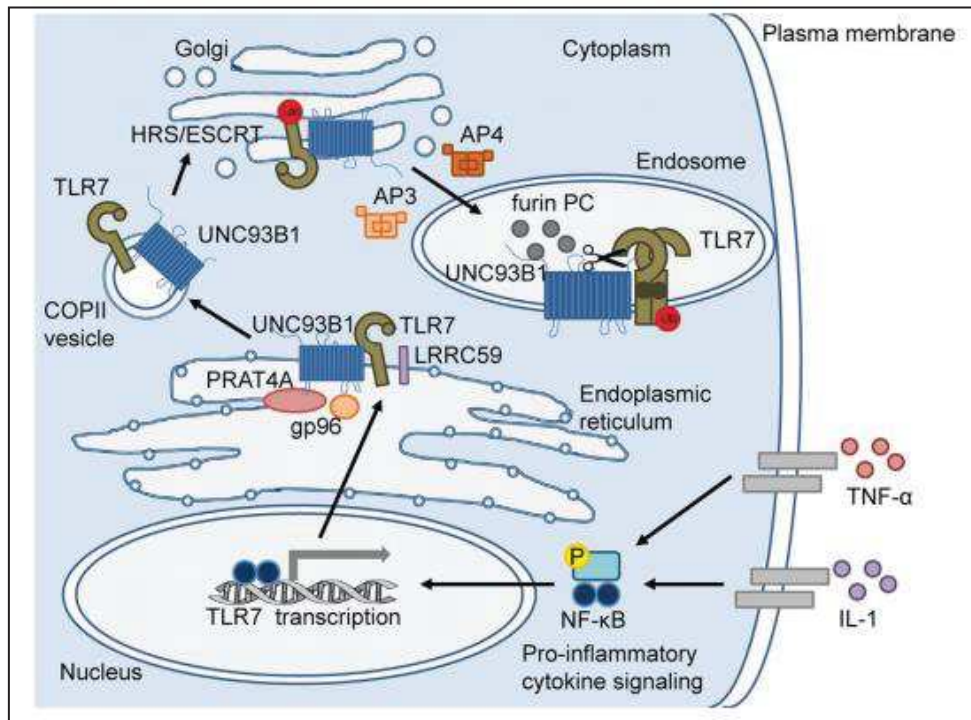


Figure 2 : Le trafic intracellulaire du TLR7 : Depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à leur destination finale l'endosome [62].

Une fois que le TLR7 atteint l'endosome, le pH acide de ce dernier va favoriser le clivage protéolytique par des protéases comme l'Asparagine EndoPeptidase (AEP) et plusieurs cathepsines. Une autre protéase, la furine qui est une Proprotéine Convertase (PC), capable de cliver le TLR7 humain dans l'endosome pour la génération du TLR7 mature. Cette enzyme est impliquée dans la protéolyse du TLR8 dans les macrophages et les monocytes humains primaires.

Lors d'une infection ou d'une stimulation avec l'agoniste, les ligands doivent entrer dans l'endosome pour déclencher l'activation des TLR7. Ces ligands peuvent atteindre l'endosome par endocytose médiée par des récepteurs. De plus, il a été montré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes murines utilisent l'autophagie qui désigne une dégradation d'une partie du cytoplasme des cellules par ses propres lysosomes ce qui va faciliter la délivrance de l'ARN viral au TLR7 endosomal [62].

3.2.2. La délivrance du TLR8 à l'endosome

Moins de données sont disponibles dans la littérature en ce qui concerne les TLR8, mais, comme le TLR7, les protéines chaperonnes du RE, l'UNC93B1 et LRRC59, favorisent la sortie du TLR8 humain du RE jusqu'à l'appareil du Golgi pour atteindre l'endosome précoce ou tardif et non le lysosome. Par contre, les TLR7 et TLR9 murins sont localisés dans l'endolysosome des macrophages et des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Une fois dans l'endosome, le TLR8 va subir le processus de clivage. Ce processus s'effectue d'une manière différente de celui du TLR7. La loupe d'insertion entre LRR14 et LRR15 de l'ectodomaine du TLR8 est indispensable pour le processus de clivage qui se produit dans le fragment N-terminal. De même, la furine, proprotéine convertase, et les cathepsines contribuent au clivage précoce ou tardif du TLR8 dans l'endosome. Une étude récente du complexe ECD h TLR8-ligand chimique a montré que l'ectodomaine du TLR8 est clivé sur la région de la boucle, et les moitiés N et C-terminales restent associées, ce qui contribue à la reconnaissance du ligand et la dimérisation du récepteur.

3.3 Structure du TLR8

Les mécanismes d'activation de TLR7 et 8, par leurs ligands naturels (les ARNs simple brin) ainsi que par leurs petits ligands chimiques, sont restés largement inconnus. En 2013, une équipe japonaise dirigée par le professeur Toshiyuki Shimizu, a élucidé les structures cristallines du TLR8 sans et avec le ligand chimique, puis l'équipe a étudié le mode de détection des ARNs simple brin par les TLR7 et TLR8.

Tanji et ses collaborateurs [63] ont élucidé la structure de l'ectodomaine du TLR8 humain. Ils ont trouvé que le TLR8 est formé d'un ectodomaine contenant 26 répétitions riches en leucine (LRR) avec une boucle Z (Z-loop) entre LRR14 et LRR15 contenant à peu près 40 acides aminés. Un clivage protéolytique au niveau de la boucle Z est indispensable pour la fonction (Figure 3A). Le clivage de la boucle Z des TLR8 humains, fait par la furine proprotéine convertase et par des cathepsines, produit des TLR8 fonctionnels capables de se lier au ligand et d'initier la signalisation. Malgré le clivage de la boucle Z, les extrémités N-terminales (résidus 31 à 432) et C-terminales (résidus 458 à 817) du monomère TLR8 restent associées l'une à l'autre (Figure 3B).

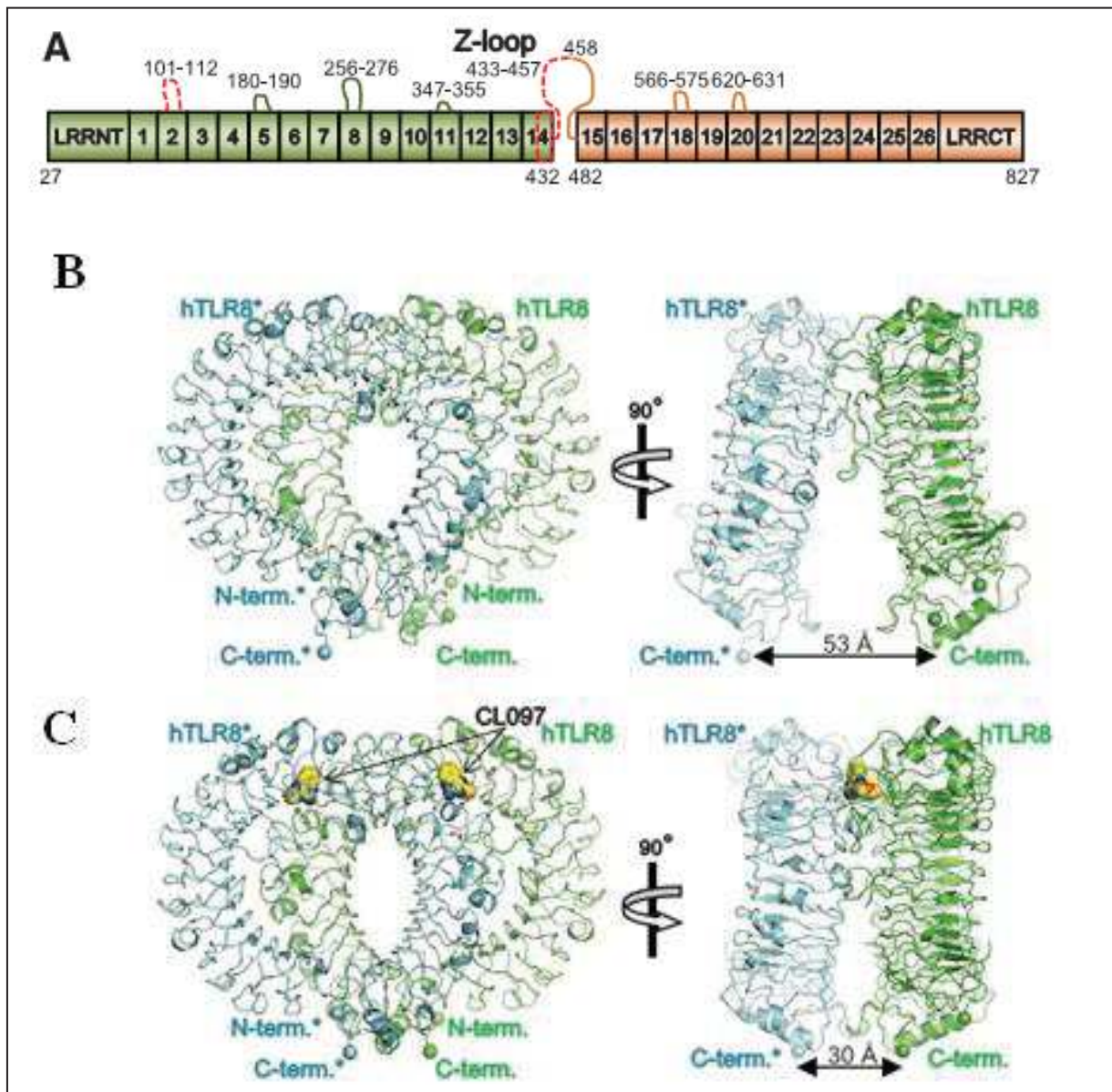


Figure 3 : Structure du TLR8 humain. (A) Représentation schématique de l'ectodomaine du TLR8 (hTLR8) : la région N-terminale est colorée en vert et la région C-terminale en orange. (B) La forme dimérique inactive du hTLR8, le premier monomère est coloré en vert (hTLR8) et son partenaire est coloré en bleu (hTLR8*). (C) La forme active du TLR8 en liaison avec son ligand CL097. Les atomes oxygène O, azote N et soufre S sont colorés en rouge, bleu et orange respectivement [63].

Le TLR 8 est présent sous forme d'un dimère même en absence de ligand d'après les analyses de la chromatographie de filtration sur gel (figure 3C). Dans ce chapitre, le second monomère du TLR8 et ses résidus seront identifiés par une étoile. Les deux monomères du TLR8 sont séparés du 53 Å (figure 3C), au niveau des régions C-terminales, dans la forme inactive du TLR8. Suite à la liaison du ligand, les extrémités C-terminales de chaque monomère se rapprochent pour atteindre une distance à peu près de 30 Å (figure 3D), ce qui va permettre la dimérisation du domaine intracytoplasmique TIR et le déclenchement de la signalisation.

La forme non liée du TLR8 a une interface de dimérisation allant du LRR8 à LRR18 (figure 4). En effet, l'interface de dimérisation est formée par plusieurs liaisons d'hydrogènes (LRR8, LRR14-15 et LRR18) et par des parties hydrophobiques constituées de Tyr348, Ph261, Tyr567* et Ph568*, Ph405, Tyr353, Val378, Ph494*, Ph495* et Ph432*, réparties autour de LRR8, LRR11-15 et LRR18.

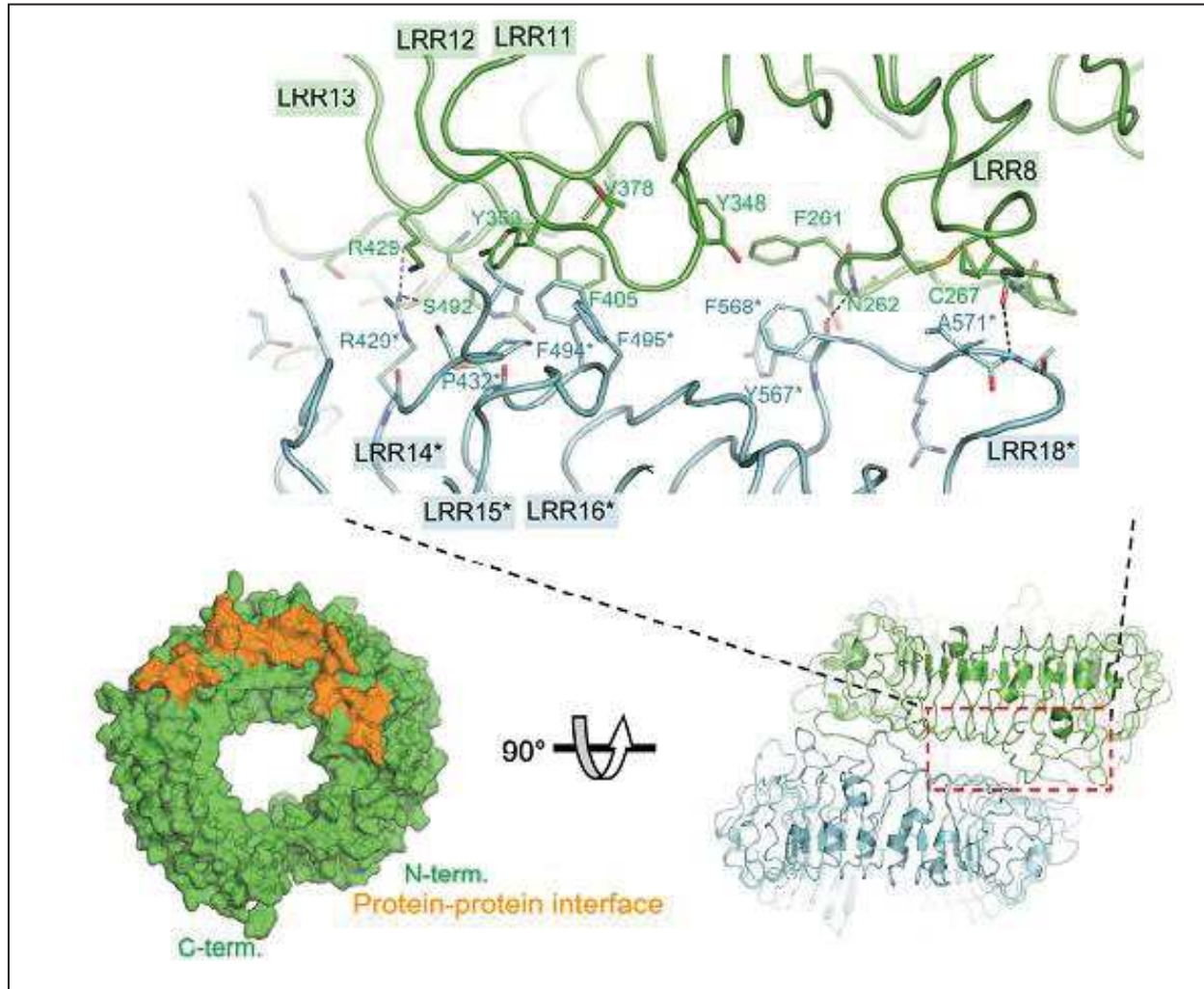


Figure 4 : L'interface protéine-protéine dans la forme inactive du TLR8 (la surface colorée en orange) [63].

La liaison du ligand induit un changement de conformation des structures LRR5, LRR8 et LRR17-20. L'interface de dimérisation pour le dimère actif par le ligand est divisée en deux régions : l'interface protéine-protéine et l'interface induite par le ligand (figure 5). L'interface protéine-protéine implique des liaisons hydrogènes et des interactions de Van Der Waals et elle est répartie autour du LRR5, LRR8 et LRR 14-20. Présence de liaisons d'hydrogènes entre l'Asn491 et l'oxygène de l'Arg541*, l'Ala 514 et l'oxygène de l'Arg541*, le Glu427 et l'His566*, et d'interactions de Van Der Waals entre Phe494-Ph494* et Ser516-Ser516*(figure 5, en haut).

L'interface induite par le ligand est composée des résidus du LRR11-14 et LRR16-18. Deux densités électroniques correspondant au ligand ont été observées dans les cristaux du TLR8 complexé à son ligand. Les ligands chimiques sont localisés dans l'interface de dimérisation du TLR8, ils occupent deux positions : la première est proche du LRR11-14 et LRR16*-18* et la deuxième est proche du LRR11*-14* et LRR16-18 (figure 5, en bas). Ces ligands reconnaissent le récepteur en formant plusieurs interactions avec les acides aminés du TLR8 et TLR8*.

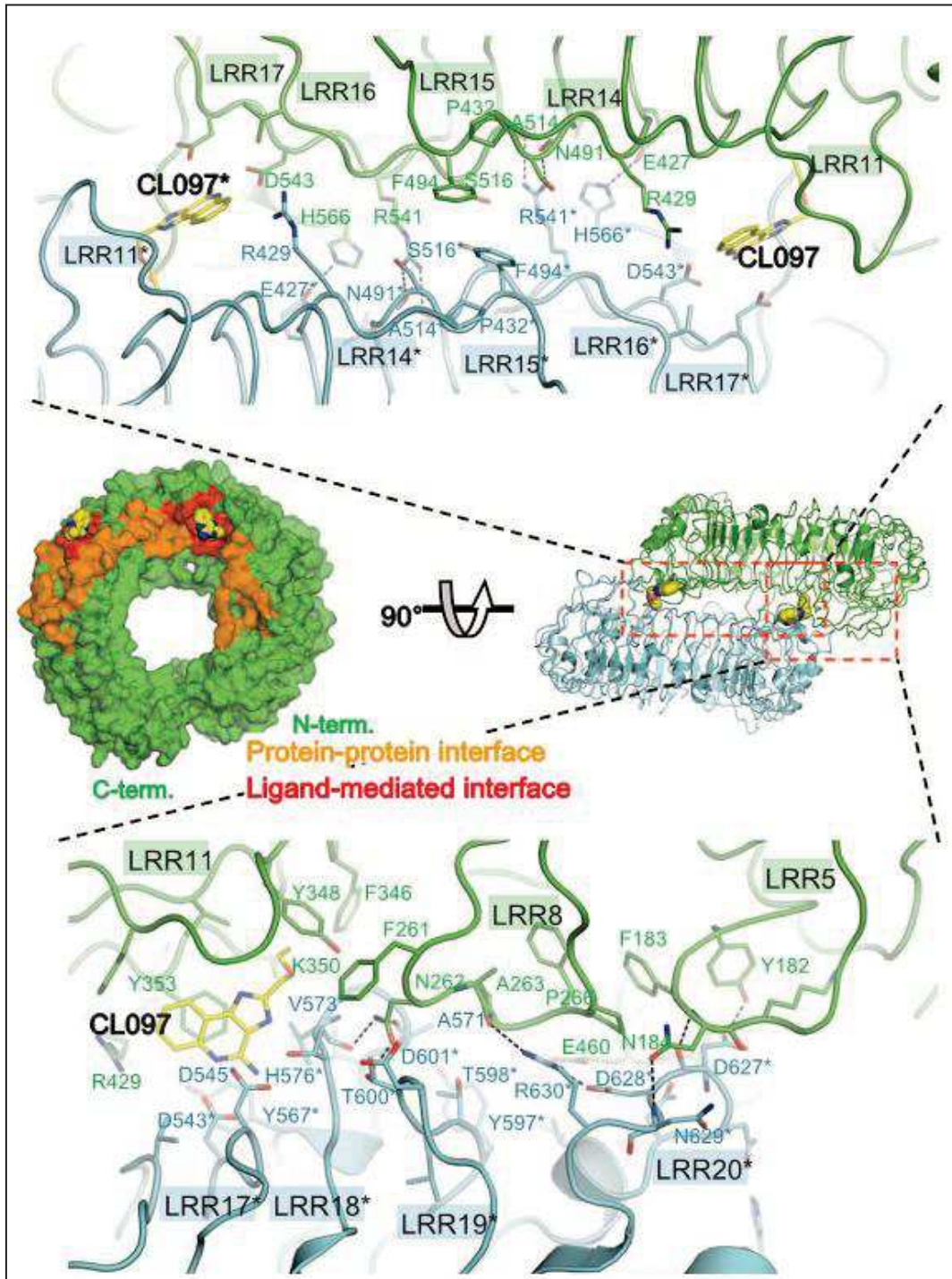


Figure 5 : L'interface de dimérisation dans la forme active du TLR8. L'interface protéine-protéine est représentée en orange et l'interface induite par le ligand est représentée en rouge [63].

La figure 6 (A-C) montre les interactions des ligands connus du TLR8, comme les imidazoquinolines (resiquimod R848 et CL097) et le thiazoloquinoline (CL075), avec l'ectodomaine du TLR8. Une interaction π - π existe entre le cycle benzène de l'imidazoquinoline (R848 et CL097) ou du thiazoloquinolone (CL075) avec la chaîne latérale du Phe405. La fonction amidine de la quinoline forme des liaisons hydrogènes avec la chaîne latérale de l'Asp543, l'azote de l'imidazole ou du thiazole forme des liaisons hydrogènes avec les azotes du Thr574. Le 2-propyl (CL075) et le 2-éthoxyméthyl (CL097 et R848) sont impliqués dans des interactions de Van Der Waals avec la poche formée par le Phe346, Tyr348, Gly376, Val378, Ile403, Phe405, Gly572* et Val*573. Ces interactions sont importantes pour l'activité agoniste des ligands chimiques ciblant le TLR8. CL097 présente un contact médié par une molécule d'eau avec l'oxygène du groupement carbonyle du Ser352.

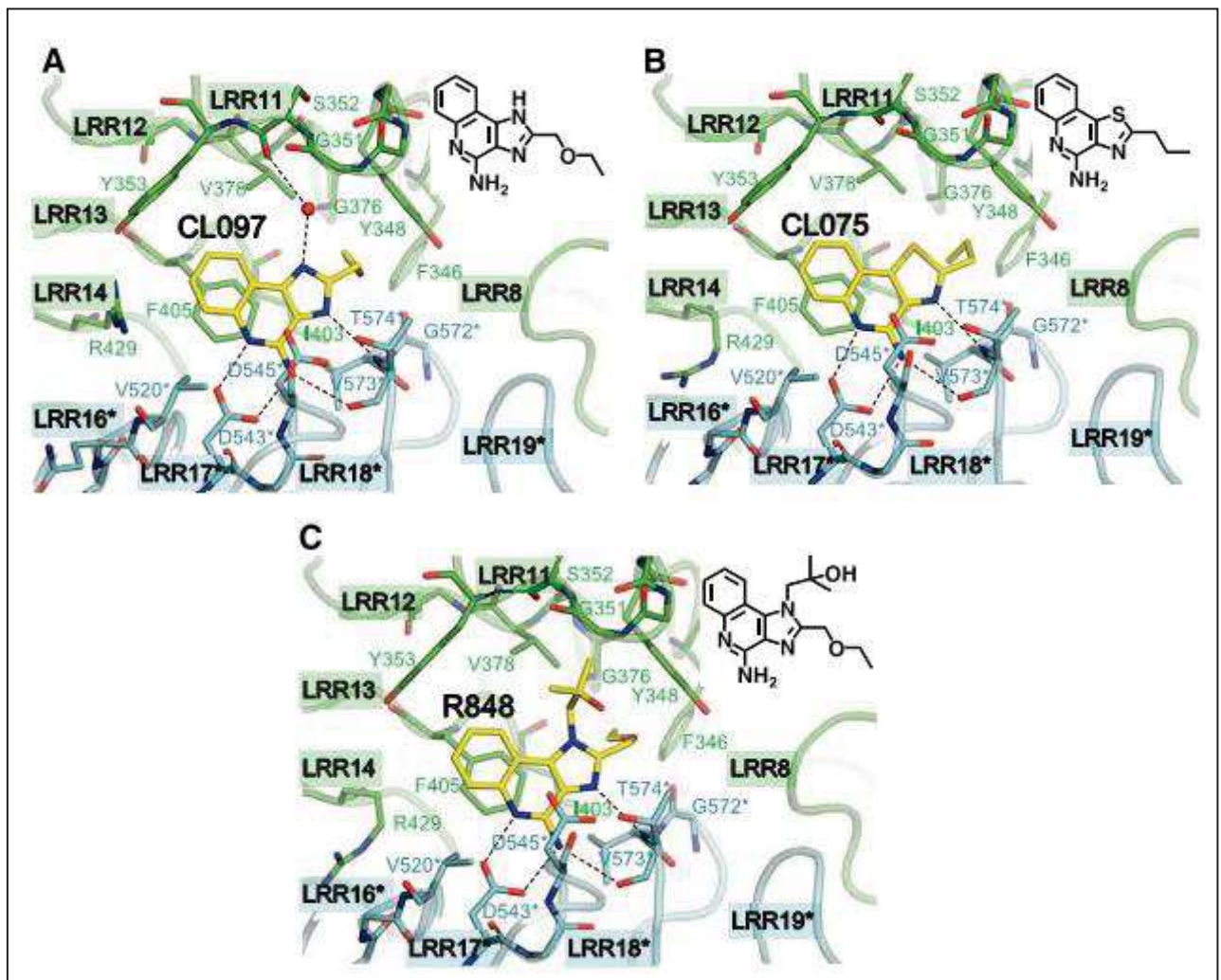


Figure 6 : Les résidus d'acides aminés du TLR8 impliqués dans la liaison avec les agonistes : CL097 (A), CL075 (B) et R848 (C). Les atomes de carbone C du ligand sont colorés en jaune, les atomes d'azote N en bleu. Les molécules d'eau sont représentées par des cercles rouges et les liaisons d'hydrogènes par des lignes pointillées [63].

Pour déterminer l'importance de ces acides aminés dans la reconnaissance du ligand, les auteurs (Tanji et ses coll.) ont muté les résidus par de l'alanine et ils ont étudié la capacité de la protéine mutée

d'activer NF- κ B. Les acides aminés Phe405, Asp543, Tyr348, Val520 et Thr574 impliqués dans l'interaction avec le récepteur ont été mutés par l'alanine. Cette mutation a causé soit l'inhibition complète de la signalisation du NF- κ B soit une diminution significative de cette signalisation. Par contre, les mutations de l'Arg429, Asp545 et Tyr353, diminuent légèrement l'activité du NF- κ B, ce qui indique que ces résidus ne sont pas essentiels pour la liaison avec les ligands chimiques [63].

La liaison du ligand élargit la structure de 15 Å de la face latérale supérieure (figure 7), ce qui permet aux résidus d'acides aminés de reconnaître le ligand. Dans la forme inactive, les interactions entre LRR8 et LRR18*, LRR11-13 et LRR14*-15*, contribuent à la formation de l'interface de dimérisation.

Une fois le ligand lié, un réarrangement au niveau de l'interface de dimérisation aura lieu (figure 7). Ce réarrangement d'interfaces inclue les interfaces protéine-protéine et les interfaces induites par le ligand. Ce qui va permettre aux extrémités C-terminales des deux monomères de se rapprocher de 53 Å à 30Å. Alors, l'agoniste active le dimère du TLR8 en induisant un changement de conformation dans l'ectodomaine du TLR8, ce qui va conduire au rapprochement et à l'activation des domaines intracytoplasmiques TIR. Cette recherche de Tanji et de ses collaborateurs a beaucoup contribué à la compréhension des mécanismes d'activation des TLR8.

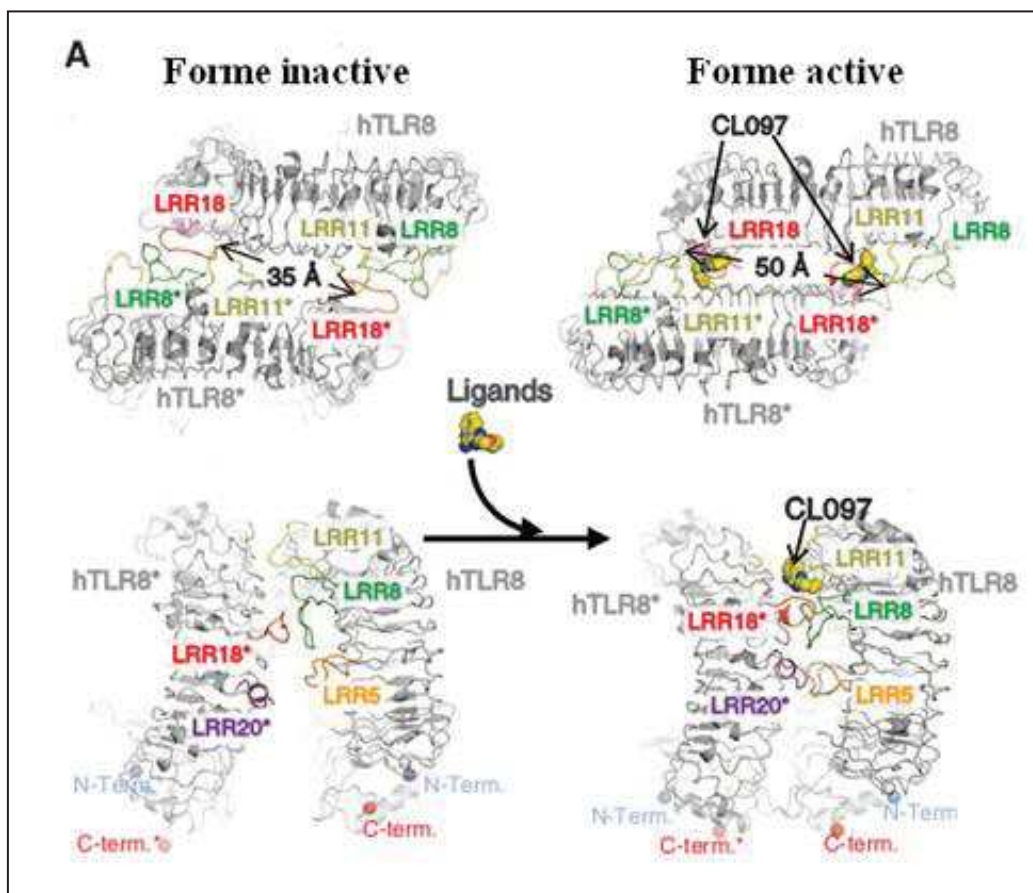


Figure 7 : Le changement de conformation du TLR8 induit par la liaison à l'agoniste [63].

Bien que l'ARN simple brin est le ligand naturel du TLR8, les mécanismes structuraux ainsi que les bases moléculaires pour la reconnaissance de l'ARNsb a été largement inconnu jusqu'à 2015 où Tanji et ses collaborateurs [64] ont élucidé le mécanisme de reconnaissance de l'ARNsb par le TLR8. Dans leurs études, ils ont été les premiers à déterminer la structure cristalline du TLR8 avec l'ARNsb, Ils ont montré que le TLR8 reconnaît deux produits de dégradation de l'ARNsb à deux sites différents : l'uridine et un court oligonucléotide. Le premier site est localisé dans la même position où les ligands chimiques (résiquimod R848, CL075 et CL097) se lient, par contre le second site se situe dans la surface concave du TLR8 à une position non identifiée auparavant dans la liaison du ligand. A partir des analyses de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), faites sur des cristaux du TLR8-ARNsb, ils ont trouvé que le TLR8 reconnaît les produits de dégradation de l'ARNsb qui sont : l'uridine et de courts oligonucléotides comme l'UG et l'UUG (figure 8).

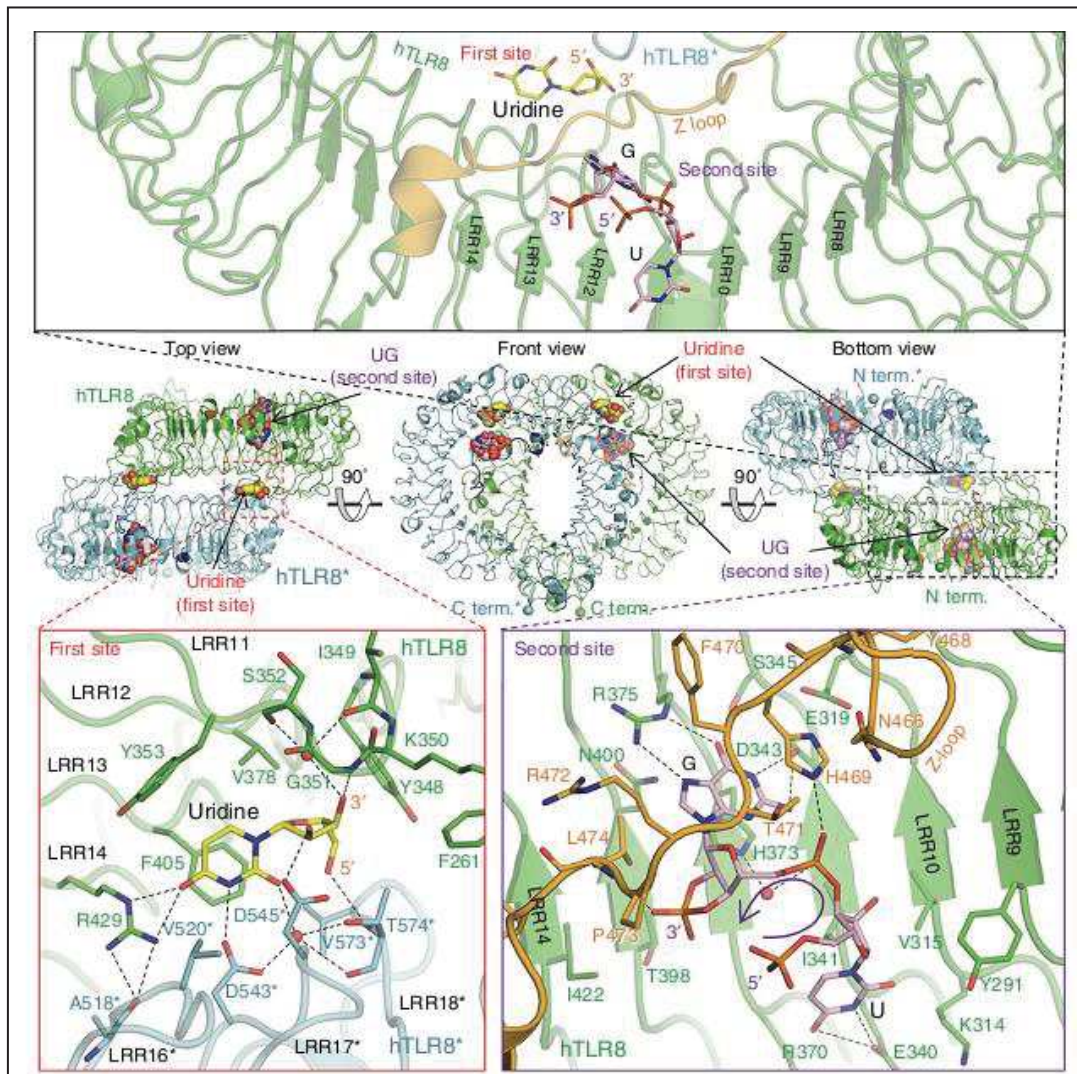


Figure 8 : La structure du TLR8 en liaison avec les produits de dégradation de l'ARNsb sur le premier et sur le second site. L'uridine sur le premier site et l'UG sur le second site sont représentés en jaune et violet respectivement. Les atomes C, O, N et P du ligand sont colorés en jaune (uridine) ou violet (UG), rouge, bleu et orange respectivement. Les molécules d'eau sont représentées par des cercles rouges et les liaisons d'hydrogènes par des lignes pointillées [64].

L'uridine se lie au premier site alors que l'oligonucléotide se lie au second site. Le premier site correspond au LRR11-14 et LRR16*-18* (et LRR11*-14* et LRR16-18), les figures 8 et 9 montrent les interactions entre les acides aminés constituant le premier site et l'uridine. Ce dernier forme plusieurs liaisons hydrogènes avec le TLR8 : l'azote N3 avec la chaîne latérale de l'Asp543*, l'oxygène O4 avec l'Arg429. L'oxygène O2 interagit indirectement avec l'Asp573* et l'azote du Thr574*. Tous les groupements OH du ribose de l'uridine sont impliqués dans des liaisons hydrogènes avec le TLR8 : 2'OH avec la chaîne latérale d'Asp545*, 3'OH avec l'oxygène du Gly351* et le 5'OH avec l'azote du Thr574*. Le 3'OH forme aussi des liaisons hydrogènes avec les oxygènes de l'Ile349 et de la Ser352 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Le cycle uracile fait des interactions de Van Der Waals avec le Phe405 comme cela est déjà vu dans le cas des ligands chimiques.

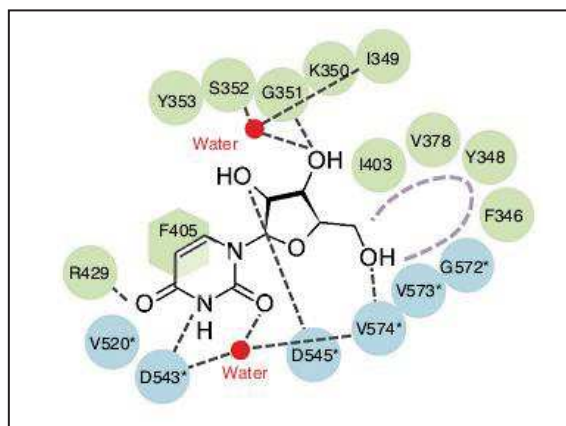


Figure 9 : Représentation schématique des interactions entre TLR8 et l'uridine [64].

Le second site correspond à la surface concave du LRR10-13 et la région ordonnée de la boucle Z (résidus 469-474) (figure 8). L'oligonucléotide au second site est localisé à l'extérieur de l'interface de dimérisation, ceci indique que le second site ne contribue pas directement à la dimérisation.

La figure 8 montre les interactions entre l'oligonucléotide UG et le TLR8. Le groupement phosphate du guanosine interagit avec la chaîne latérale de l'His469. Le cycle guanosine est piégé entre la chaîne latérale de l'His373 (LRR12) et His469 (boucle Z) et il fait quatre liaisons hydrogènes avec TLR8 : l'azote N1 et N2 avec l'Asp343, l'oxygène O6 et l'azote N7 avec l'Arg375.

Pour confirmer l'importance du premier et du second site du TLR8 dans la reconnaissance de l'ARNsb, les auteurs ont muté les acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'ARNsb du premier et du second site, et ils ont examiné la capacité de ces mutants à activer NF-κB. La mutation des acides aminés sur le premier site inhibe la réponse à l'ARNsb ainsi qu'aux ligands chimiques. Par contre, la mutation des acides aminés au second site diminue, d'une manière significative, la réponse au NF-κB par l'ARNsb, mais non par les ligands chimiques où la réponse n'a pas été altérée. Ceci indique que le premier site est essentiel pour la reconnaissance de l'ARNsb, alors que le second site n'entre pas dans l'interaction avec les ligands chimiques. De plus, Tanji et ses collaborateurs ont montré que l'uridine et l'oligonucléotide activent TLR8 d'une manière synergique, et la liaison de

l'oligonucléotide au second site augmente l'affinité de l'uridine au premier site. Un rôle important de la boucle Z a été aussi démontré : la dernière moitié de la boucle Z contribue à la stabilisation et à la reconnaissance du ligand en établissant un contact avec la face concave de la structure LRR. De plus une étude récente a montré que le TLR8 avec une boucle Z non clivée [65] est en forme monomérique, qu'il y est ou non présence de ligand comme l'ARNsb ou un ligand chimique. La boucle Z non clivée est localisée sur la surface où TLR8 va se dimériser. Par conséquent, la boucle Z non clivée empêche stériquement le partenaire de dimérisation d'entrer dans la position appropriée pour la dimérisation (figure 10). En accord avec cette observation structurale, l'ARNsb se lie toujours au TLR8, par contre, le ligand chimique n'arrive plus à se lier au TLR8 avec une boucle Z non clivée car la liaison du ligand au premier site est couplée à la dimérisation du TLR8.

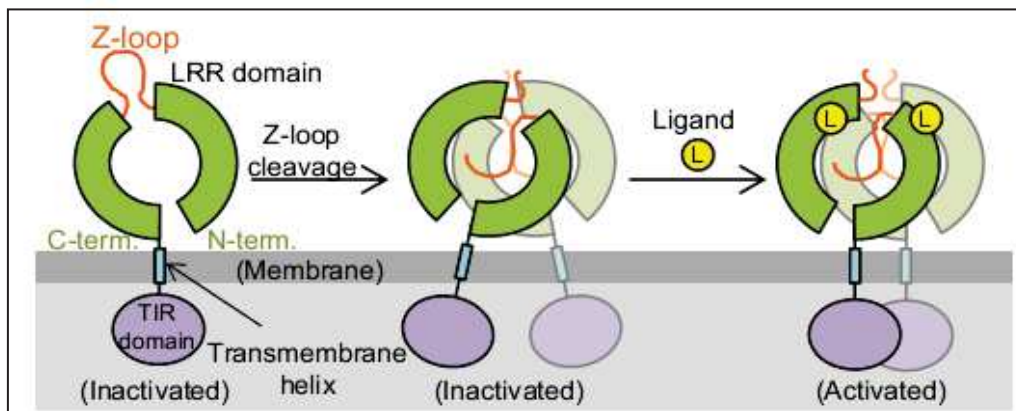


Figure 10 : Le mécanisme d'activation probable des TLR8 par clivage de la boucle Z. TLR8 avec une boucle Z non clivée est en forme monomérique. Une fois la boucle Z est clivée, le récepteur forme un dimère non lié. Après liaison à l'agoniste, le dimère sera active [65] .

3.4 Structure du TLR7

Les études structurales avancées sur le TLR8 ont beaucoup aidé les chercheurs à déterminer la structure du TLR7 qui a été élucidée pour la première fois en 2016.

Zhang et coll. [66] ont décrit la structure cristalline du TLR7 provenant du singe (*Macaca mulatta* *Mm*) complexée avec de multiples ligands, fournissant ainsi un nouveau concept au niveau des mécanismes par lesquels le TLR7 reconnaît son ligand naturel l'ARNsb et ses ligands chimiques. Ils ont montré les structures cristallines du TLR7 en complexe avec la guanosine et l'ARNsb (polyU), loxoribine et le polyU, et l'agoniste TLR7/8 le résiquimod (R848).

Ils ont trouvé que le TLR7, à l'inverse du TLR8, est un monomère en absence du ligand (figure 12). Il contient 26 unités LRR avec une boucle Z (résidus 445-493) insérée entre LRR14 et LRR15. Le TLR7 monomérique forme un anneau de type « donut » (donut-like ring) avec les extrémités N- et C-terminales interagissant d'une manière directe l'une avec l'autre. La liaison du TLR7 avec son ligand conduit à la dimérisation du récepteur qui va former un homodimère symétrique en forme de « m » dans lequel les deux extrémités C-terminales du chaque monomère sont positionnées au centre (figure 11).

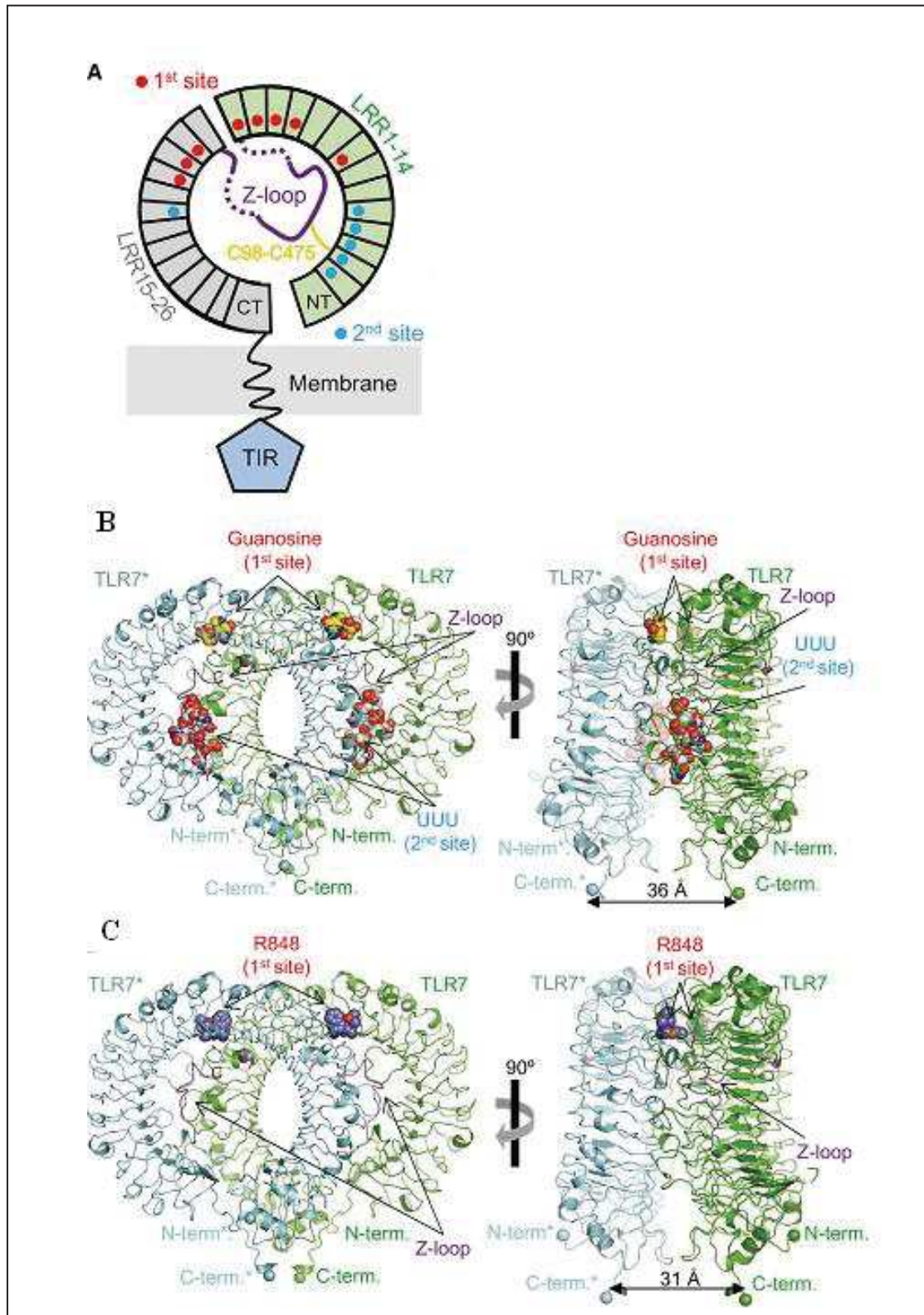


Figure 11 : (A) Représentation schématique du TLR7 du singe (*MmTLR7*). La partie N-terminale, la boucle Z et la partie C-terminale sont représentées par vert, violet et gris respectivement. Les LRRs qui forment le premier site et le second site sont représentés par des cercles rouges et bleus respectivement. La ligne jaune indique la liaison disulfure entre C98 et C475. (B) Le dimère du *MmTLR7*-G-polyU. Le premier monomère est coloré en vert alors que son partenaire est coloré en gris. Les atomes C, O, N et P du ligand sont colorés en jaune (guanine) ou gris (UUU), rouge, bleu et orange respectivement. (C) Le dimère du *MmTLR7* avec le resiquimod R848. Les atomes C du R848 sont colorés en violet [66].

Puisque le TLR7 répond au guanosine appliqué en combinaison avec l'ARNsb polyuridine (polyU) (ref), ces chercheurs ont utilisé la guanosine et le polyU comme ligands et ils ont trouvé que le TLR7 interagit avec la guanosine et le polyU sur deux sites différents. D'après les analyses du LC-MS, les auteurs ont conclu que le TLR7 utilise deux sites de liaison différents pour détecter l'ARNsb polyU présent sous forme de produits dégradés. Comme dans le cas du TLR8, le premier site reconnaît les petits ligands : la guanosine dans le cas du TLR7 et l'uridine dans le cas du TLR8. Le deuxième site reconnaît l'oligonucléotide : dans le cas du TLR7, le récepteur reconnaît l'uridine de l'ARNsb, dans le cas du TLR8, ce site reconnaît l'oligonucléotide GU (figure 11). Le premier site est conservé entre TLR7 et 8 par contre le deuxième site est structurellement et spatialement différent de celui de TLR8 : polyU dans le second site du TLR7 se situe à côté de l'interface de dimérisation, par contre l'UG dans le second site du TLR8 est complètement à l'extérieur de l'interface de dimérisation.

En plus, Zhang et coll. ont montré que le premier site du TLR7 est important dans la reconnaissance de petits ligands : le résiquimod R848, en se liant au premier site du TLR7, est capable, à lui seul, d'induire la dimérisation du récepteur et son activation, en absence du ligand sur le deuxième site. Par contre, la guanosine seule ou le polyU seul est incapable d'induire la dimérisation du récepteur, ces deux ligands (guanosine et polyU) activent d'une manière synergique le TLR7. En fait, la liaison de l'ARNsb sur le deuxième site augmente l'affinité de la guanosine au premier site.

Un rôle important a été signalé pour la boucle Z : après son clivage, les régions ordonnées de la boucle Z semblaient se chevaucher dans la surface concave du fragment N-terminal entre les deux monomères, et ces régions sont impliquées dans la reconnaissance de l'ARNsb. De même des liaisons disulfures sont structurellement importantes pour former le second site. Le Cys475 de la dernière moitié de la boucle Z forme une liaison disulfure avec Cys98 du LRR2 (figure 11) et ainsi il attache la longue boucle Z flexible à la surface concave en reliant d'une manière covalente les extrémités N- et C-terminales clivées. Cette liaison disulfure C98-C475 est une caractéristique du TLR7 et elle est essentielle pour sa fonction. En plus, la région structurellement ordonnée de la boucle Z interagit d'une manière hydrophobe avec LRR8 et LRR11 qui faisaient partie du premier site.

Des interactions multiples ont été observées entre le TLR7 et ses ligands définissant ainsi la spécificité du ligand du TLR7 au premier site. De même, des interactions protéine-protéine ont été observées au niveau du premier site jouant un rôle très important dans la dimérisation. La figure 12 montre la liaison du résiquimod au TLR7 : le groupement quinoline du R848 interagit avec le Phe408, la Tyr356 et Leu557*, et le groupement amidine (les atomes d'azote N1 et N2) forme une liaison hydrogène avec la chaîne latérale d'Asp555*. De plus, l'atome d'azote N2 du groupement amidine ainsi que l'azote du cycle imidazole forment des liaisons hydrogènes avec l'oxygène du Thr586* et l'azote du Thr586* respectivement, puis le groupement éthoxyméthyl du R848 fait des interactions de Van Der Waals avec la poche hydrophobe formée par les chaînes latérales des résidus Phe149, Phe351, Val381 et Phe408. L'atome oxygène du groupement éthoxyméthyl interagit avec l'oxygène du Gly584* par l'intermédiaire d'une molécule d'eau.

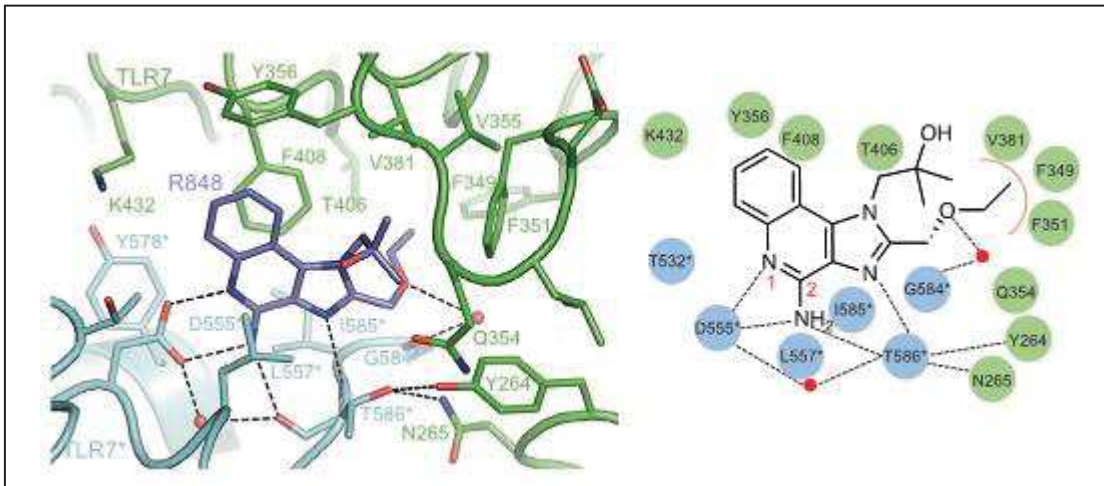


Figure 12 : Interaction du *Mm*TLR7 avec le resiquimod R848 au niveau du premier site [66].

La figure 13 montre l'interaction de la guanosine avec le TLR7, la guanosine se lie au premier site et fait plusieurs interactions : le cycle guanine est piégé entre les chaînes latérales des Phe408 et Leu557*, formant des interactions π - π avec le Phe408. Des liaisons d'hydrogènes se produisent entre l'azote N1 et N2 de la guanine et la chaîne latérale d'Asp555*, et entre le groupement carbonyle de la guanine et la chaîne latérale du Lys432. Le groupement ribose est moins reconnu par le TLR7 et fait une seule liaison hydrogène entre le 5'OH et l'azote du Thr586*.

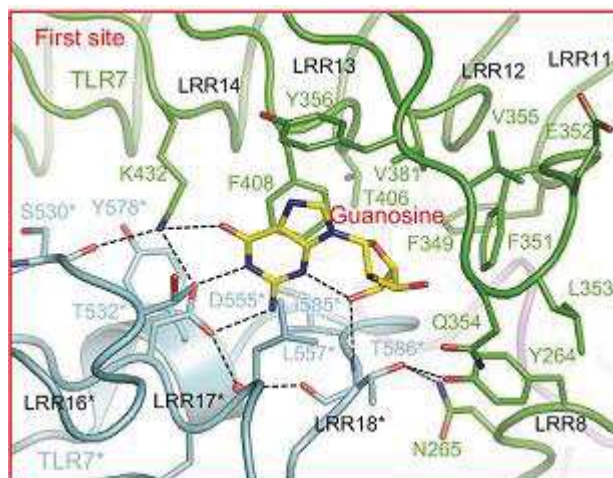


Figure 13 : Interaction du *Mm*TLR7 avec la guanosine au niveau du premier site [66].

La figure 14 montre l'interaction du polyU, UUU, avec le TLR7 : l'uracile du U₂ est plongé dans la poche formée entre la surface concave du fragment N-terminal et la boucle Z, et il est engagé dans plusieurs liaisons hydrogènes : le groupement carbonyle C4 avec les chaînes latérales d'Arg97 et Arg473, l'azote N3 avec la chaîne latérale Glu156, et le groupement carbonyle C2 avec la chaîne latérale Gln181. Le groupement 2'OH du ribose forme des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du Gln181 et l'oxygène d'Arg473. Les groupements phosphates 3' et 5' de l'uridine U₂ forment des liaisons hydrogènes avec le TLR7, le groupement 3' phosphate avec les chaînes latérales du Tyr184 et

Arg186 et le groupement 5' phosphate avec l'azote du Cys475. Par contre, les uridines U₁ et U₃ sont partiellement exposées au solvant et font seulement deux liaisons d'hydrogènes : le groupement carbonyle C4 de l'U₁ avec la chaîne latérale de l'Hys76, le groupement carbonyle C2 de l'U₃ avec la chaîne latérale de l'Arg467.

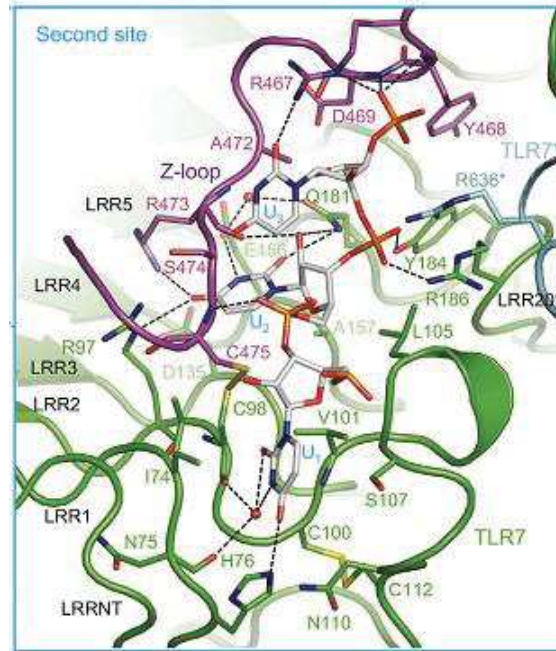


Figure 14 : Interaction du *Mm*TLR7 avec le polyU (UUU) au niveau du second site [66].

L'importance biologique de deux sites du TLR7 a été examinée par mutation des acides aminés formant les sites de liaison en alanine et par la mesure de l'activation du NF-κB. Les mutations des résidus formant le premier site du TLR7 inhibe complètement la signalisation médiée par le TLR7 en réponse au resiquimod ainsi qu'au guanosine et le polyU. Ceci indique que le premier site du TLR7 est important pour son activation par des ligands chimiques ainsi que par l'ARNsb. Au contraire, les mutations des résidus formant le deuxième site inhibent fortement l'activation du TLR7 en réponse à l'ARNsb sans affecter sa réponse aux petits ligands comme le resiquimod. Ceci indique que le premier site est essentiel pour l'activation du TLR7 par tous les ligands (R848, ARNs...), par contre, le second site est essentiel uniquement pour l'activation du TLR7 induite par l'ARNsb.

Ces résultats permettent de comprendre les mécanismes d'activation du TLR7 par leurs ligands et montrent que le TLR7 est un récepteur double pour la guanosine et l'ARNsb contenant l'uridine : le premier site reconnaît la guanosine et le deuxième se lie au groupement uridine de l'ARNsb. Par contre, les ligands chimiques comme le R848 sont capables, à eux seuls, d'induire le dimérisation du récepteur en se liant uniquement au premier site.

3.5 Signalisation des TLR7 et TLR8

Comme tous les TLRs, les TLR7 et 8 possèdent un domaine cytoplasmique comprenant une séquence Toll/IL-1 receptor (TIR) qui est responsable de la transduction du signal. En 2002, Hemmi et coll. ont montré que les imidazoquinolines (imiquimod et son dérivé le résiquimod (R848)), activent le système immunitaire par l'intermédiaire du TLR7 et 8, ce qui va déclencher une signalisation dépendante du Myd88 [48] [46]. Cette dernière va activer les voies de signalisation conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la voie des MAPKs [67] [68]. Dans leurs travaux, ils ont montré que les macrophages dérivés des souris déficientes en Myd88 ou en TLR7 ne sont pas capables de produire des cytokines pro-inflammatoires et d'activer la voie des MAPKs et le facteur de transcription NF- κ B. Par contre, les macrophages dérivés des souris de type sauvage sont capables d'induire la voie de signalisation conduisant à l'activation du NF- κ B, et à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale TNF α ainsi que l'interleukine 12.

Suite à l'activation du TLR7/8, Myd88 interagit, par son domaine de mort, avec les domaines de mort des membres de la famille des protéines kinases IRAK (IL-1 receptor-associated kinase), y compris IRAK1, IRAK2, IRAK4 et IRAK-M [69] [70]. IRAK4 est initialement activée et à son tour phosphoryle et active IRAK1. Après phosphorylation d'IRAK4 et d'IRAK1, ces deux kinases se dissocient du Myd88 et interagissent avec TRAF6 qui possède une activité ubiquitine ligase E3. TRAF6 et l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 (UBC13 et UEV1A), favorisent la polyubiquitination liée à la lysine k63 du TRAF6 lui-même et du complexe des protéines kinases TAK1 [71]. Ce dernier est un membre de la famille des MAPKKK et forme un complexe avec les sous-unités régulatrices TAB1, TAB2 et TAB3 qui vont interagir avec les chaînes de polyubiquitines générées par TRAF6 pour permettre l'activation du TAK1 [71]. TAK1 active alors deux voies de signalisation qui vont conduire à l'activation du NF- κ B et de la voie des MAPKs. Le complexe IKK est composé de deux sous-unités catalytiques : IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice NEMO (ou IKK γ). TAK1 se lie au complexe IKK par l'intermédiaire des chaînes d'ubiquitine, ce qui lui permet de phosphoryler et d'activer IKK β . Le complexe IKK phosphoryle la protéine inhibitrice du NF- κ B : I κ B α , qui va subir une dégradation dans le cytoplasme, permettant ainsi au NF- κ B de se diriger vers le noyau pour induire l'expression des gènes pro-inflammatoires. En plus, TAK1 entraîne également l'activation des membres de la famille des MAPKs tels que ERK1/2, p38 et JNK, qui interviennent dans l'activation du facteur de transcription AP-1, ce qui va entraîner la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et de l'IFN β (figure 15) [72] [73].

En 2002, Ito et coll. ont montré que le TLR7 est exprimé au niveau des cellules dendritiques myéloïdes (DC m) et plasmacytoïdes (DC p). De plus, ils ont étudié la production d'IL12 et d'IFN α par les cellules dendritiques lors d'une stimulation par l'agoniste du TLR7. Ils ont trouvé que le profil d'induction des cytokines diffère de celui des cellules dendritiques myéloïdes (DC m) et plasmacytoïdes (DC p). Les DC p produisent l'IFN- α alors que les DC m produisent l'IL12 [74]. Vu les

grandes quantités d'IFN α produites par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (DCp) exprimant le TLR7 et 9, beaucoup de travaux ont été effectués, dans la littérature, en vue d'élucider la voie de signalisation amenant à l'activation et à la sécrétion d'IFN α surtout par les cellules dendritiques. TLR7, TLR8 et TLR9 induisent des réponses antivirales par la production d'IFN α ainsi que par des cytokines pro-inflammatoires. Ces trois récepteurs utilisent la protéine adaptatrice Myd88 pour initier les voies de signalisation. Le facteur de transcription IRF7 (Interferon regulatory factor 7) est responsable de l'expression et de la production d'IFN α . Myd88 interagit directement avec IRF7 au niveau de l'endosome [75]. IRF7 interagit également avec TRAF6, une autre molécule adaptatrice qui fonctionne en aval du Myd88, et après l'activation du récepteur (TLR7, 8 ou 9), IRF7 est activé de manière dépendante de Myd88 et du TRAF6. Les DCp spléniques provenant des souris déficientes en IRF7 présentent une diminution significative dans l'induction d'IFN α suite à une infection virale ou à l'exposition aux ligands synthétiques du TLR7 ou 9 [76]. Par contre, cette induction est normale dans les DCp déficientes en IRF1, IRF3 ou IRF5, ce qui montre que l'induction d'IFN α dans les DCp nécessite l'IRF7 [76]. De plus, des études de mutation au niveau de Myd88 ont montré que cette protéine interagit avec l'IRF7 par l'intermédiaire de son domaine de mort. Ce domaine de mort interagit également avec la famille des sérine/thréonine kinases (IRAK), qui vont transduire le signal entre Myd88 et TRAF6, ce qui indique que les IRAKs sont impliqués dans la signalisation de l'IRF7 [77]. Des DCp provenant des souris déficientes en IRAK1 ou IRAK4 sont incapables de produire d'IFN α lors d'une activation des TLR7, 8 ou 9 [76]. De plus, une étude a montré que IKK α est aussi essentielle pour l'activation de l'IRF7 [78], ce qui indique que l'activation de l'IRF7 nécessite une cascade des protéines kinases IRAK4-IRAK1-IKK α . Des études ont montré également que TRAF3 joue un rôle important dans cette signalisation dépendante d'IRF7 (figure 15) [76].

En plus d'IRF7, IRF5 interagit, également, avec Myd88 et TRAF6. Contrairement à l'IRF7 qui se lie au domaine de mort du Myd88, IRF5 interagit avec la région centrale (connue comme domaine intermédiaire) et une partie du domaine TIR du Myd88 [79]. L'activation de la voie de signalisation dépendante de Myd88 par les ligands du TLR7 ou TLR9 conduit à la translocation de l'IRF5 au noyau où il va activer l'expression des cytokines pro-inflammatoires [80]. En 2005, Schoenemeyer et coll. ont montré que la liaison du TLR7 et TLR8 à leur ligand, le résiquimod R848, induit l'activation de l'IRF5 ainsi que l'IRF7, et ils ont trouvé aussi que l'IRF5 est un médiateur central dans la signalisation des TLR7 et TLR8. IRF5 contribue à l'induction d'IFN type I dans les cellules humaines. De plus, l'IRF5 est important non seulement dans l'induction d'IFN- α mais aussi dans l'induction d'IFN- β [80].

En 2009, une étude a montré que les DCm, et non les DCp ou les macrophages, sont capables d'induire une grande quantité d'IFN β après la dégradation bactérienne dans les phagolysosomes et qu'une telle réponse nécessite l'intervention du TLR7, Myd88 et IRF1(figure 15) [81].

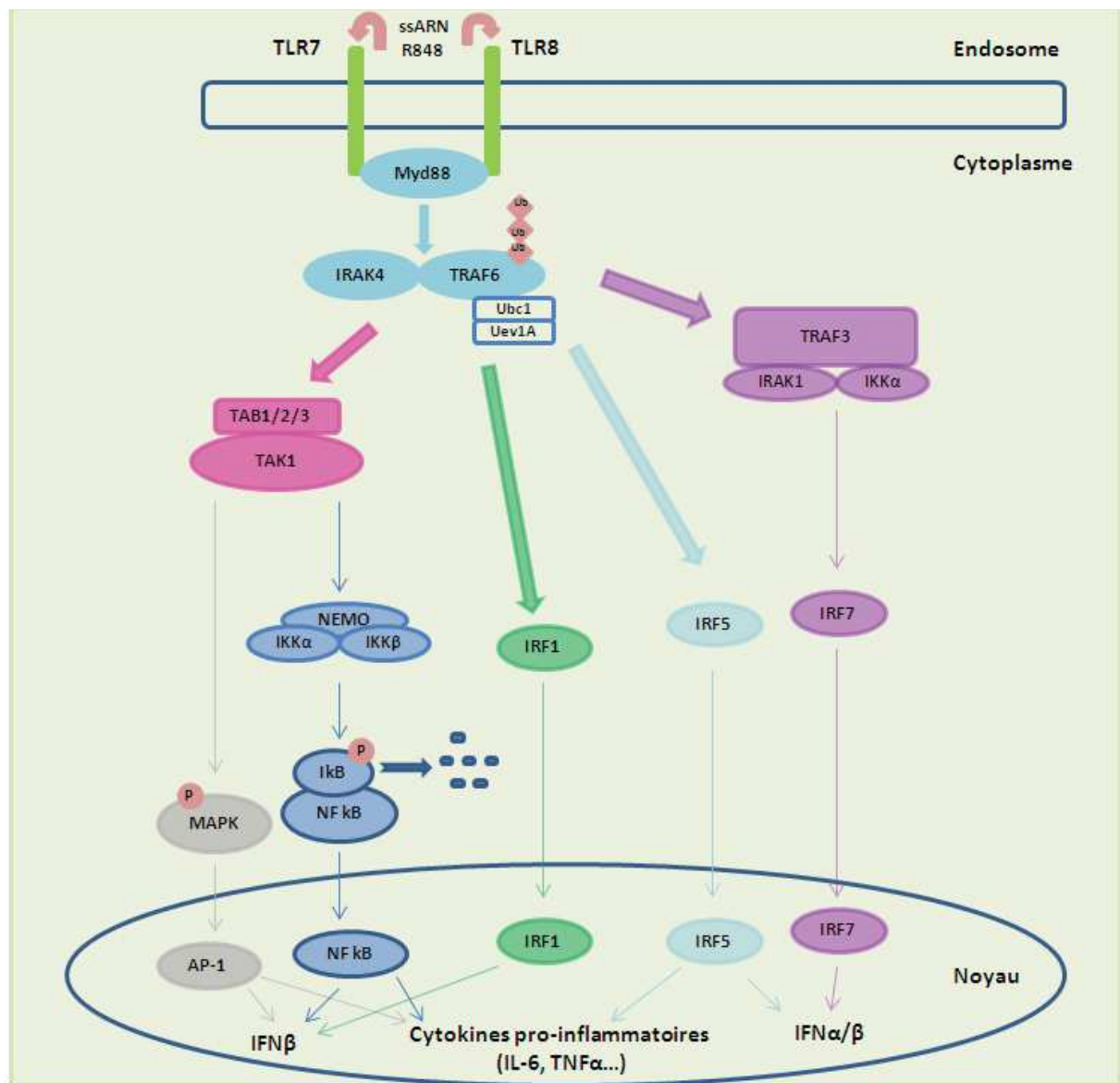


Figure 15 : Les différentes voies de signalisation lors de l'activation des TLR7/8 par leurs ligands naturels (ssARN) ou synthétiques (Résiquimod, R848).

4. TLR et immunité adaptative

Les cellules dendritiques (DC) sont les cellules clés qui lient l'immunité innée médiée par les TLRs à l'immunité adaptative qui se traduit par l'activation des lymphocytes T et B. Les DC jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et leur différenciation en cellules T auxiliaires type 1 (Th1), type 2 (Th2) et en lymphocytes T cytotoxiques [82]. Une fois les DC activées par les antigènes, elles migrent vers les tissus lymphoïdes locaux pour présenter les peptides antigéniques aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce processus implique la phagocytose, la régulation des molécules CMH ainsi que la régulation des signaux de co-stimulation, le changement

dans l'expression des récepteurs de chimiokines, la sécrétion des cytokines et de chimiokines et la présentation d'antigène par les cellules dendritiques [82]. Tous ces événements sont régulés par la reconnaissance des pathogènes via les PRRs exprimés sur les cellules dendritiques. Parmi ces PRRs, nous citons les TLRs dont leur signalisation conduit à la génération des réponses effectrices comprenant les réponses Th1 [83] et les réponses cytotoxiques CD8+ [84]. Le déclenchement de l'immunité adaptative commence avec les DC qui reconnaissent l'antigène dans les tissus périphériques. Par la suite, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques drainants pour présenter les peptides aux lymphocytes T naïfs par l'intermédiaire des molécules du CMH. Au cours de cette migration, les DC subissent une maturation qui leur permet de stimuler les lymphocytes T naïfs. Une fois à l'intérieur des ganglions lymphatiques, les DC présentent l'antigène aux cellules T et induisent leur activation et leur différenciation en cellules effectrices. Ces DC fournissent à la cellule T naïve deux signaux nécessaires à son activation. Le premier signal est le signal spécifique de l'antigène reçu à la suite de la liaison du récepteur des cellules T (TCR) au peptide présenté par la molécule du CMH. Le second signal est fourni par des molécules costimulatrices B7, qui sont exprimées par les DC et qui vont déclencher l'expression du CD28 sur les cellules T naïves. En fonction du type de molécules costimulatrices exprimées et de cytokines sécrétées par les DC, les cellules T CD4+ naïves se différencient soit en cellules Th1 soit en cellules Th2 [85]. L'activation primaire des LT CD8+ nécessite des signaux similaires de ceux des DC, tandis que les réponses des cellules T CD8+ mémoires nécessitent l'aide des lymphocytes T CD4+ [86]. La voie principale par laquelle les DC deviennent actives et matures pour fournir le deuxième signal aux cellules T naïves, se produit via la reconnaissance des PAMPs par les TLRs [87]. L'expression des molécules de co-stimulation B7 sur la surface des DC joue un rôle important dans l'initiation de l'immunité adaptative. Une fois, les cellules T CD4+ activées, leur différenciation en cellules effectrices est contrôlée par divers facteurs, y compris les cytokines produites par les DC. Les cytokines induites par les TLRs, telles que l'IL-12, sont généralement spécialisées dans l'induction des réponses Th1 [88]. L'immunisation des souris avec des adjuvants contenant divers ligands des TLRs, y compris le LPS, l'ADN CpG et l'adjuvant complet de Freund, conduit à des réponses Th1. En revanche, des souris déficientes en Myd88 ont montré une absence de différenciation des Th1 mais la réponse Th2 n'a pas été affectée [89]. Ces données sont cohérentes avec l'idée que les TLRs contrôlent l'induction des réponses Th1 mais pas Th2. Cependant, quelques travaux ont montré que certains TLRs, comme le TLR2 et le TLR4, peuvent induire une réponse Th2 [90] [91].

De plus, les interférons type I jouent un rôle important dans le développement de l'immunité innée. Ces cytokines favorisent la prolifération des lymphocytes T mémoires et préviennent l'apoptose des cellules T [92], ils peuvent aussi induire la sécrétion de l'IFN γ par les lymphocytes T CD8+ murins et les lymphocytes T CD4+ humains [93]. L'IFN α/β permet également aux cellules B de subir une différenciation en cellules plasmiques via l'activation des DC [94]. Enfin, l'IFN α/β induit la maturation des DC après stimulation par des agonistes des TLRs ou par infection virale [95] [96].

CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT DES LIGANDS CIBLANT LES TLR7 ET TLR8

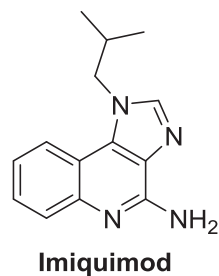
1. Introduction

De nombreux travaux publiés concernent le développement de ligands des TLR7 et TLR8 en tant qu'agonistes et qu'antagonistes. Dans le premier chapitre, nous avons exposé les données concernant l'expression, le trafic intracellulaire, la structure et la signalisation du TLR7 et TLR8 en citant quelques ligands connus de ces deux récepteurs comme l'ARN simple brin viral, qui constitue l'agoniste naturel du TLR7 et 8. Nous avons ensuite cité des composés tricycliques comme l'imiquimod (agoniste TLR7) et le résiquimod R848 (agoniste TLR7/8) qui sont les premiers ligands synthétiques identifiés. Plusieurs agonistes ont été développés dans la littérature partageant une similarité structurale avec l'imiquimod et le résiquimod, dans la perspective d'être utilisés en traitement thérapeutique de diverses pathologies dont les plus importantes sont les cancers. Des travaux plus récents portent sur la synthèse de nouveaux agonistes TLR7/8 dans le but d'être utilisés comme adjuvants vaccinaux, vu le rôle des TLR7/8 dans la stimulation d'une réponse Th1 et l'activation par la suite des lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Bien que les agonistes TLR7/8 aient été très développés dans la littérature, peu de données sont disponibles concernant les antagonistes TLR7 et TLR8. La seule classe connue comme antagonistes TLR7/8 est celle des oligonucléotides synthétiques. Seulement quelques molécules bi- et tricycliques ont été reportées comme antagonistes des TLR7 et TLR8. Ces antagonistes peuvent intervenir dans le traitement des maladies auto-immunes, de cancers ou de l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH).

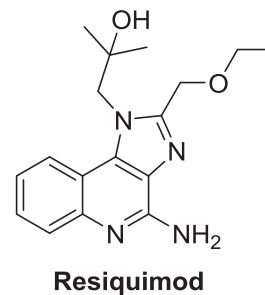
2. Les agonistes des TLR7 et TLR8

2.1 Premières molécules synthétisées décrites comme agonistes du TLR7 et TLR8

L'imiquimod et son dérivé le résiquimod (figure 16), appartenant à la série des imidazo[4,5-*c*]quinolines, sont les premières molécules décrites dans la littérature comme agonistes du TLR7 et TLR8 [48] [46].



$$EC_{50} \text{ (TLR7)} = 10.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$$



$$EC_{50} \text{ (TLR7)} = 1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$$

$$EC_{50} \text{ (TLR8)} = 4.5 \pm 3.2 \mu\text{M}$$

Figure 16 : Structures chimiques de l'imiquimod et de son dérivé le résiquimod.

2.1.1 L'imiquimod

L'imiquimod est une molécule tricyclique azotée appartenant à la série des imidazo[4,5-*c*]quinolines, développée par les laboratoires 3M pharmaceuticals (Saint Paul, MN, Etats-Unis). Elle a tout d'abord été décrite pour son activité antivirale contre certains virus tels que l'herpès simplex II [97], le sendaï virus [98] et le papilloma virus [99]. Cette molécule n'inhibe pas directement la réplication virale, c'est un immunomodulateur dont l'activité virale est liée au pouvoir inducteur d'interféron alpha (IFN- α) et d'autres cytokines. Il a été approuvé, en 1997, par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des verrues génitales et périanales externes. En 2004, son utilisation a été étendue au traitement de la kératose actinique et du carcinome basocellulaire superficiel [100] [101]. La forme commerciale de l'imiquimod, Aldara[®] 5%, se présente sous la forme d'une crème.

2.1.1.1 Mécanisme d'action de l'imiquimod

En 2002, Hemmi et *coll.* ont montré que l'imiquimod et son dérivé le résiquimod exercent leurs propriétés antivirales et antitumorales par l'intermédiaire du TLR7 [48]. Dans leur étude, ils ont montré que les souris déficientes en TLR7 ne sont pas capables de produire des cytokines proinflammatoires suite à une stimulation par l'imiquimod et le résiquimod. Une fois lié à son récepteur TLR7, l'imiquimod déclenche une voie de signalisation dépendante du Myd88 qui entraîne l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Une fois activé, NF- κ B migre dans le noyau et induit la transcription des cytokines proinflammatoires : TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 et IL-12 ainsi que l'interféron alpha (IFN- α). La conséquence de cet effet est une stimulation marquée de la réponse immunitaire contre les cellules infectées et tumorales [102].

L'effet de l'imiquimod a été, aussi, démontré par le recrutement cutané et l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (DCp). Ces dernières exprimant le TLR7 au niveau de l'endosome, après traitement avec l'imiquimod, sont activées conduisant ainsi à l'induction de l'IFN α ce qui va stimuler

des réponses immunitaires antitumorales [103]. De plus, l'imiquimod administré par voie topique induit la maturation des cellules de Langerhans épidermiques *in vivo* et stimule la migration de ces cellules présentatrices d'antigènes vers les ganglions lymphatiques où elles induisent une réponse spécifique des cellules T [104].

L'activité proinflammatoire de l'imiquimod a été aussi attribuée à des voies indépendantes du TLR, principalement les voies de signalisation du récepteur de l'adénosine (AR). L'imiquimod a montré une importante affinité au récepteur A2A, où il agit comme antagoniste partiel. Une inhibition indépendante du récepteur qui porte uniquement sur l'activité adényl-cyclase a été observée [105].

En plus de l'induction de l'IFN- α et des autres cytokines, l'imiquimod peut également renforcer l'immunité acquise en stimulant indirectement la production de l'IFN- γ , une cytokine impliquée dans une réponse de type Th1. La libération d'IFN- α , en réponse à une stimulation par l'imiquimod, induit la sous-unité $\beta 2$ du récepteur d'IL-12 sur les cellules Th1. Ces dernières répondent ensuite à l'IL-12 en produisant l'IFN- γ [106] [107]. En outre, l'imiquimod, à des concentrations élevées, induit l'apoptose des cellules tumorales par l'intermédiaire de l'activation des protéines Bcl-2 et la famille des caspases [105]. Une grande attention est également accordée à l'utilisation de l'imiquimod topique comme adjuvant pour la vaccination [108] [109].

2.1.2 Le résiquimod

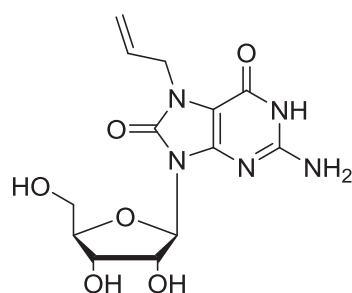
Le résiquimod est un composé de type imidazo[4,5-*c*]quinoline, qui stimule aussi le système immunitaire en activant le TLR7 et le TLR8. Il a été développé par les laboratoires 3M pharmaceuticals au début des années 1980 dans des tentatives d'identifier des structures analogues aux nucléosides inhibant l'infection par le virus de l'herpès simplex II (HSV-2) [110]. En 2001, le résiquimod devait être développé en vue de traitement anti-HSV-2 mais les essais cliniques n'ont pas donné des résultats positifs dans cette indication, son développement a été arrêté [111] [112].

Bien que l'imiquimod et son dérivé le résiquimod sont très similaires au niveau structural, leur interaction avec le TLR8 est différente : le résiquimod peut activer à la fois le TLR7 et le TLR8, par contre l'imiquimod est seulement agoniste du TLR7 [48] [46]. Ces différences dans la liaison aux TLRs expliquent probablement l'induction importante des cytokines suite à l'activation des TLRs par le résiquimod. Le profil des cytokines observé suite à l'exposition des PBMCs humaines au résiquimod est similaire à celui de l'imiquimod, mais le niveau d'expression des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) ainsi que l'IFN- α est environ 100 fois plus élevé lors de l'utilisation du 1 μ g/ml du résiquimod par rapport à 1.2 μ g/ml d'imiquimod [113] [114]. En réponse au résiquimod, les cellules dendritiques secrètent l'IL-6, l'IL-12, le TNF- α et l'IFN- α [115], les monocytes secrètent l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF- α et l'IFN- α [116].

Bien que le développement du résiquimod topique pour le traitement de l'herpès génital chez l'homme ait été arrêté en raison des résultats incohérents dans les essais cliniques, de nombreux travaux ont

montré l'intérêt du résiquimod dans le traitement des tumeurs cutanées. Ce composé s'est avéré efficace dans le traitement des kératoses actiniques : au niveau de la peau, les cellules cibles du résiquimod sont principalement les monocytes et les cellules dendritiques, comme c'est déjà mentionné dans le premier chapitre, les cellules dendritique plasmacytoides (DCp) expriment le TLR7 et le TLR9, alors que les cellules dendritiques myéloïdes expriment les TLR 2, 3, 4, 5 et 8, en conséquence, le résiquimod en stimulant à la fois le TLR 7 et le TLR 8, peut induire une forte réponse des cytokines incluant l'IFN type I et des cytokines proinflammatoires, ce qui peut expliquer l'effet antitumoral du résiquimod dans les cancers du peau. Les monocytes sont activés suite à la stimulation principalement du TLR8 par le résiquimod [117]. Dans le cas des carcinomes basocellulaires, l'imiquimod a montré une activité pro-apoptotique directe sur les cellules tumorales, et cette activité était indépendante de la liaison aux récepteurs membranaires de mort (Death Receptor). Cette activité a également été observée avec le résiquimod, cependant, dans une mesure beaucoup plus faible par rapport à l'imiquimod [118]. En plus, une induction de l'apoptose dans les cellules tumorales peut s'effectuer indirectement par le résiquimod, en induisant l'expression du TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) sur les cellules dendritiques et en augmentant leur pouvoir cytotoxique [119] [120]. En 2015, Rook et *coll.* ont montré que le résiquimod topique peut également améliorer les fonctions des lymphocytes T effectrices dans le lymphome T cutané et par conséquent induire la régression de la maladie [121]. En plus, le résiquimod s'est avérée être un adjuvant efficace contre plusieurs maladies et surtout le cancer, vu sa capacité à induire une activation locale des cellules immunitaires, à stimuler la production des cytokines proinflammatoires et à améliorer la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques conduisant à l'activation des réponses de l'immunité cellulaires et surtout des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ [122] [112] [123].

En 2003, Lee et *coll.* ont montré que des analogues de la guanosine activent les cellules immunitaires par l'intermédiaire du TLR7. Parmi ces analogues, on cite la loxoribine (figure 17), agoniste du TLR7 qui a une activité anti-tumorale et des effets immunostimulants [124]



Loxoribine

Figure 17 : Structure chimique de la Loxoribine, agoniste TLR7 [133]

2.2 ARN simple brin agoniste physiologique du TLR7 et 8

Jusqu'au 2004, le ligand naturel du TLR7 et 8 n'était pas encore défini. Les seuls agonistes qui ont été décrits sont les composés de type imidazoquinoline et les analogues du guanosine. Vu la similarité structurale de ces composés avec les acides nucléiques, Heil et *coll.* ont étudié l'effet de l'ARNsb sur l'activation des cellules présentatrices d'antigène par l'intermédiaire du TLR7 et TLR8 [45]. Ils ont trouvé qu'un mélange de guanosine et d'uridine induit la production du TNF α par les PBMCs humaines, alors qu'une combinaison des autres nucléosides n'a aucun effet stimulateur. Ils ont synthétisé alors des oligonucléotides (ARNsb) riches en guanosine et en uridine dérivant du virus d'immunodéficience humaine (VIH), et ils ont montré que ces oligonucléotides sont capables de stimuler les cellules dendritiques ainsi que les macrophages à sécréter l'IFN α et les cytokines proinflammatoires. En utilisant des souris déficientes en TLRs ainsi que des cellules humaines exprimant les TLRs, ils ont montré qu'il existe des différences entre la souris et l'homme dans la reconnaissance de l'ARNsb riche en guanosine et en uridine, et que les ARNsb sont les ligands naturels du TLR7 et TLR8. La même année, Diebold et *coll.* ont montré que l'ARNsb du virus d'influenza est un agoniste du TLR7, et que ce dernier a une préférence pour un motif d'ARN particulier qui est l'uridine [125]. De plus, des études ont montré que des oligoribonucléotides (ORN) riches en adénosine et en uridines sont capables d'activer seulement le TLR8, sans aucun effet sur le TLR7, par contre les ORNs riche en GU activent la signalisation dépendante du TLR7 et TLR8 [125]. En 2005, plusieurs articles ont été publiés montrant le rôle du petit ARN interférent (siRNA) dans la stimulation du système immunitaire. Cette stimulation se fait grâce à la reconnaissance du siRNA par le TLR7 et le TLR8 de manière dépendante de la séquence. Dans un modèle murin, il a été montré que le TLR7 est absolument nécessaire pour l'induction des cytokines dans les cellules immunitaires en réponse aux siRNA [126] [127].

Après identification de l'ARNsb comme agoniste du TLR7 et 8, des équipes de recherche ont été intéressées par la synthèse des oligoribonucléotides, agonistes du TLR7 et 8, en introduisant une gamme de modifications chimiques en vue d'augmenter la stabilité de ces oligoribonucléotides ORN contre les nucléases et obtenir une sélectivité vis-à-vis du TLR7 ou TLR8 [128] [129] [130] [131]. Plus récemment, des études ont révélé que les microARNs sécrétés (miRNA) peuvent être transférés des cellules du donneur aux cellules receveuses, dans lesquelles ils fonctionnent en tant qu'agonistes pour les TLR7 et 8 [132].

En 2015, Tanji et *coll.* ont montré, pour la première fois, que le TLR8 reconnaît les produits de dégradation de l'ARNsb à deux sites différents : le premier site reconnaît l'uridine alors que le deuxième reconnaît des oligoribonucléotides courts comme UG et UUG. Contrairement aux ligands chimiques qui sont capables de stimuler le TLR8 en se liant uniquement au premier site, l'uridine seule n'était pas capable d'activer le TLR8 en absence de l'oligoribonucléotide au deuxième site. Alors la liaison de l'oligoribonucléotide au deuxième site augmente l'affinité de l'uridine au premier

site et par conséquent conduit à l'activation du TLR8 [64]. Les figures montrant l'interaction de l'uridine et de l'oligoribonucléotide avec le premier et le deuxième site respectivement ainsi que la structure du TLR8, sont bien détaillés dans le premier chapitre (figures 3-9).

En se basant sur les résultats ci-dessus, Shibata et *coll.* ont montré que le TLR7 répond aux analogues du guanosine : guanosine, 2'-désoxyguanosine (dG), 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG), en présence des oligoribonucléotides [47]. Comme dans le cas du TLR8, la guanosine seule ou l'ARNsb seule (polyU) ne sont pas capables d'activer le TLR7, par contre une combinaison des deux conduit à une activation du récepteur. De même, l'ARNsb améliore l'affinité du guanosine, dG, 8-OH et du 8-OHdG au TLR7. Considérant que ces nucléotides sont des métabolites présents à l'état physiologique ou pathologique, ils peuvent être considérés comme des ligands endogènes du TLR7. Ces résultats ont été confirmés en 2016 par Zhang et *coll.* qui ont montré que le TLR7 aussi reconnaît la forme dégradée de l'ARNsb : la guanosine se lie au premier site alors que l'oligoribonucléotides (polyU) se lie au deuxième site, et la combinaison de ces deux produits active, d'une manière synergique, la dimérisation du TLR7. Les figures montrant les interactions avec le TLR7 ainsi que la structure du récepteur, sont détaillés dans le premier chapitre (figures 11-14).

2.3 Agonistes synthétiques du TLR7 et TLR8

Vu la capacité des agonistes TLR7 et 8 de produire des cytokines proinflammatoires ainsi que d'IFN α conduisant à promouvoir l'immunité adaptative, des agonistes ont été développés appartenant à différentes séries chimiques dans la perspective d'être utilisés comme adjuvants vaccinaux ainsi que dans la thérapie de plusieurs maladies y compris le cancer.

2.3.1 Les agonistes appartenant à la série des imidazo[4,5-*c*]quinolines

En 2005, Gerster et *coll.* du laboratoire 3M pharmaceuticals ont publié un article montrant les différentes stratégies de synthèse des composés de type imidazo[4,5-*c*]quinoline ainsi que des études de relation structure-activité qui influencent sur l'induction d'IFN [133]. La présence d'une chaîne alkyle ou hydroxyalkyles au niveau de la position R1 (figure 18), sans aucune substitution en R2, donne une bonne induction d'IFN dans les PBMCs humaines (figure 18). Cependant, l'activité n'est pas améliorée par rapport au composé non substitué possédant un hydrogène en R1. Lorsque des chaînes alkyles plus longues ou des substituants alkyle plus volumineux (c'est-à-dire tert-butyle) sont substitués en R1, l'activité est perdue. C'est également le cas lorsqu'un groupe phényle est directement lié à la position R1. La substitution d'alkyle à la position R2 améliore l'induction de l'IFN pour les petites chaînes, le butyle étant le plus actif. Lorsque la longueur de la chaîne atteint l'heptyle, l'activité commence à diminuer. Les groupes phénoxy-méthyle et benzyle en R2 augmentent également l'activité. L'amine en position C4 est indispensable pour l'activité. Toutes les autres modifications sur cette position éliminent la production d'IFN. En général, une simple substitution sur le noyau benzène

semble être défavorable car la plupart des composés préparés sont incapables d'induire l'IFN. Une exception est la substitution en position C7, les composés conservant l'activité de la molécule non substituée.

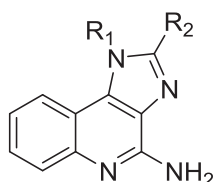


Figure 18 : Structure générale des imidazo[4,5-*c*]quinolines.

En 2005, Gorden et *coll.* ont étudié la sélectivité, vis-à-vis des TLR7 et TLR8, de trois composés appartenant à la série des imidazo[4,5-*c*]quinolines (3M-001 et 3M-003) et à la série des thiazolo[4,5-*c*]quinolines (3M-002) [134]. Les composés 3M-001 et 3M-002 (ou CL075) sont des agonistes sélectifs pour le TLR7 et le TLR8 respectivement. Le composé 3M-003 est un agoniste à la fois du TLR7 et du TLR8 (Figure 19). Malgré les similarités phylogénétiques et structurales entre TLR7 et TLR8, ces TLRs se différencient fonctionnellement en ce qui concerne les profils des cytokines induits par les PBMCs humaines ainsi que par les populations de cellules isolées du PBMC. Le TLR7 est fonctionnellement associé à la production d'IFN- α . Le TLR8 est impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL12.

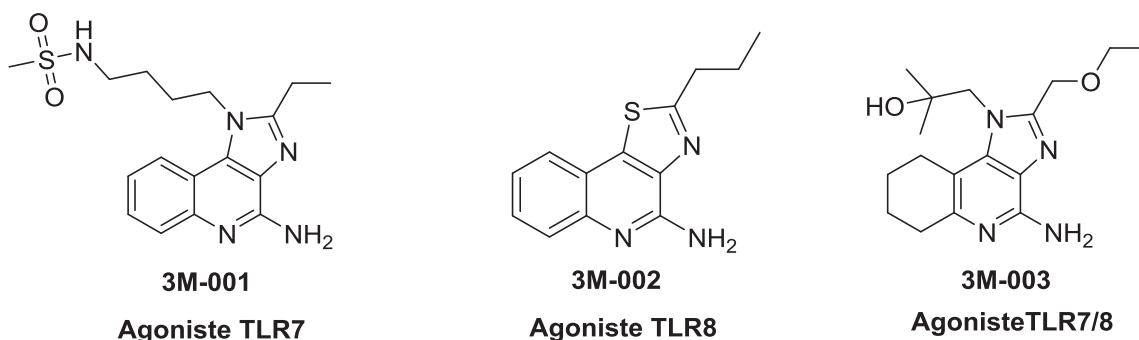


Figure 19 : Structure des agonistes TLR7 et TLR8 : **3M-001**, **3M-002** et **3M-003** [134].

En plus de leurs effets antiviraux via l'induction de l'IFN type I, les imidazo[4,5-*c*]quinolines ont été reconnus comme des adjuvants puissants dans les années 90 [135]. Une stimulation par des agonistes de TLR7, permet une sur-régulation de l'expression des molécules co-stimulatrices telles que CD40, CD80 et CD86 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (DCp) et myéloïdes (DCm) [136]. De plus une étude de Hood et *coll.* a montré que les agonistes sélectifs du TLR7, contrairement aux autres ligands des TLRs, sont des immunostimulateurs puissants sans induire des réponses des cytokines pro-inflammatoires dominantes [137]. De même, des études ont révélé que les imidazo[4,5-*c*]quinolines, agonistes du TLR7, sont des adjuvants puissants dans la conception de vaccins [138] [139]. Cependant, la voie d'administration joue un rôle très important, par exemple l'administration

intradermique du vaccin contenant comme adjuvant le gardiquimod, est immunogène et protectrice, par contre l'administration du même vaccin mais par voie sous-cutanée ne donne pas une réponse protectrice [140]. Citons que le gardiquimod (figure 20) est un agoniste du TLR7 plus actif que l'imiquimod. En se basant sur ces données, Shukla et *coll.* ont émis l'hypothèse que le substituant éthylaminométhylène en position C2 du gardiquimod rend la molécule suffisamment polaire pour empêcher sa pénétration transcutanée pour accéder efficacement et stimuler les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ils ont alors synthétisé des analogues hydrophobes du gardiquimod et ils ont étudié leur activité agoniste TLR7 et TLR8, en utilisant des cellules HEK293 exprimant soit le TLR7 soit le TLR8, dans la perspective d'être utilisés comme adjuvants pour les vaccins transcutanés [141]. Les modifications de l'amine secondaire de la chaîne secondaire de l'éthylaminométhylène en C2 ne sont pas tolérées. Le groupement 4-amino doit être conservé pour obtenir une activité maximale. Le remplacement du cycle imidazole par un cycle triazole conduit à une perte totale d'activité. Dans le but d'obtenir des analogues plus lipophiles, des composés avec un groupement benzyl en position N1 et une chaîne alkyle en C2 ont été synthétisés, et une relation très étroite entre la longueur de la chaîne alkyle et l'activité agoniste TLR7 a été observée avec une activité optimale pour le composé **2.1** portant une chaîne butyle en C2 (figure 20), comme déjà suggéré par Gerster et *coll.* [133]. La transposition des substituants en N1 et C2 du gardiquimod et du composé **2.1** conduit à l'identification du composé **2.2**, agoniste TLR7 extrêmement actif avec une EC₅₀ de 8,6 nM (figure 20). Ces composés sont sélectifs du TLR7 sans aucune activité agonistique au niveau du TLR8.

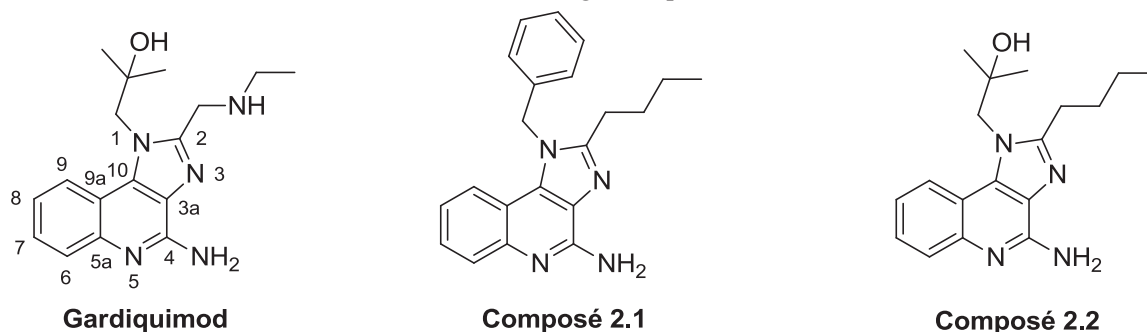


Figure 20 : Structure du gardiquimod et des agonistes du TLR7 [141].

En 2012, Shi et *coll.* ont synthétisé des imidazo[4,5-*c*]quinolines, analogues de l'imiquimod et du résiquimod, en substituant l'hydrogène sur le carbone en C7 par un groupement méthoxycarbonyle (figure 21) [142]. Ils ont montré que l'élimination de la chaîne éthoxyméthyle en position C2 du résiquimod aboutit à une diminution très significative de l'activité agonistique TLR7, et une perte de l'activité agoniste TLR8. L'activité est restaurée, même améliorée, par l'addition d'une chaîne butyle en C2. Le composé, non substitué en C2 et portant un groupement méthoxycarbonyle en C7 (figure 21), était dépourvu d'une activité agoniste TLR7/8, cependant il était capable d'induire une forte production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-12, IL-1 β). Ceci suggère la présence d'un autre mécanisme d'action alternatif par lequel les imidazoquinolines peuvent stimuler la production

des cytokines. L'ajout de la chaîne alkyle (butyle) en C2 a permis la restauration de l'activité agoniste TLR7 et TLR8. Ceci indique que la substitution en C7 peut être importante pour la production des cytokines, par contre, l'activité agoniste TLR7/8 nécessite une substitution en C2. En se basant sur ces données, Schiaffo et *coll.* ont synthétisé des imidazo[4,5-*c*]quinolines en introduisant des substituants en position R₂ (figure 21). Les résultats montrent que l'activité agoniste TLR7/8 est corrélée à la longueur de la chaîne alkyle en C2, avec une activité maximale pour les dérivés avec un butyle (TLR7) et pentyle (TLR8). Une étude structure-activité similaire a été, aussi, identifiée dans la production de l'IL-1 β , IL-12 et IFN- γ , qui dépend à la fois de la longueur de la chaîne alkyle en C2 et de la substitution en position N1. Les composés stimulent également la production d'IFN- α et d'IL-10, mais avec des corrélations structurales moins prononcées [143].

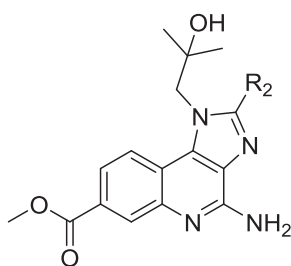


Figure 21 : Structure générale du cycle imidazo[4,5-*c*]quinoline[142].

Très récemment, Larson et *coll.* ont introduit des substituants en N1 (figure 22), leurs résultats montrent que l'activation du TLR7 et TLR8 est fortement liée à la substitution en N1, avec une sélectivité au TLR8 obtenue par l'introduction d'un groupement éthyle, propyle ou butylamino sur cette position [144]. Alors que l'analyse de la relation structure-activité indique que l'activité du TLR7 est moins sensible à la modification en N1, l'extension de la longueur de la chaîne aminoalkyle jusqu'aux groupements pentyle et *p*-méthylbenzyle induit une importante affinité au TLR7. De plus, une production de cytokines était aussi rapportée et l'agoniste sélectif du TLR8 était capable d'induire des niveaux plus élevés d'IL-1 β , IL-12 et d'IFN- γ comparativement aux agonistes sélectifs du TLR7 ainsi que des agonistes mixtes TLR7 et TLR8.

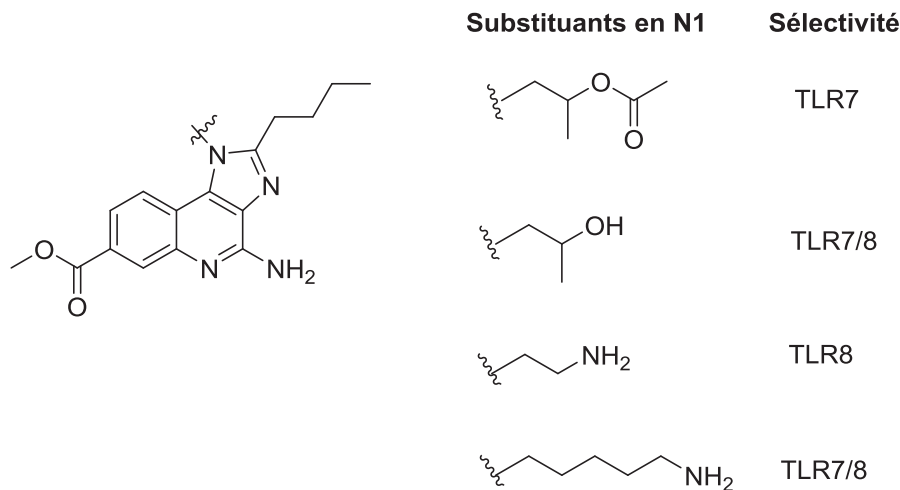
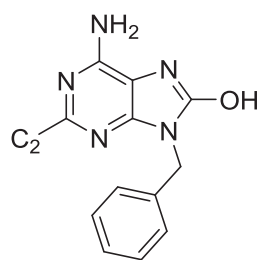


Figure 22 : Structure générale du cycle imidazoquinoline avec les différentes substituants en position N1 [144].

2.3.2 Les agonistes appartenant à la série des 8-hydroxyadénines

Un intérêt important a été aussi attribué à la série des 8-hydroxyadénines. En 2002, Hirota et *coll.* ont synthétisé une grande variété de ces composés (figure 23), en introduisant différents substituants en position C2, N9 et C8 dans le but de tester leur faculté à sécréter l'interféron pour le traitement des infections du virus de l'hépatite C [145]. D'après des études de relation structure-activité, ils ont trouvé que la présence d'un benzyle en position N9 ainsi qu'un groupement hydroxyle en C8 est indispensable pour l'induction d'interféron (composé **2.3a**). L'introduction d'un substituant en C2 tel que les groupements alkyles, alkylthio, alkylamino et alkoxy, a entraîné une augmentation remarquable de l'activité. Les analogues 2-alkylthio (**2.3b-2.3d**), 2-butylamino (**2.3e**) et 2-butoxy (**2.3f**) ont montré des activités importantes lors de l'administration orale chez la souris. Une autre étude a montré que le composé **2.3g**, avec un butyle en C2, présente l'activité inductrice d'IFN la plus puissante *in vitro*, avec une forte induction de l'IFN lors de son administration orale chez la souris. Cette puissance était 10 fois plus forte que celle de l'imiquimod. De plus, **2.3g** ne provoque pas de vomissements chez les furets, alors que 80% des animaux étaient émétiques lors de l'administration par voie orale avec la même dose d'imiquimod. Ces résultats indiquent que le composé **2.3g** est supérieur à l'imiquimod en ce qui concerne l'efficacité et la sécurité. En se basant sur ces données, Kurimoto et *coll.* [146] ont synthétisé une série de 8-hydroxyadénines, ayant divers groupements alkoxy ou alkylthio en position C2. Ces composés ont été évalués pour leur capacité à induire l'IFN à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ils ont trouvé que le composé **2.3h** (SM-360320) est un inducteur puissant d'IFN et présente une bonne biodisponibilité orale. Ce même composé, agoniste du TLR7, a été capable d'activer des réponses immunitaires contre le virus de l'hépatite C, comme déjà montré par Lee et *coll.* [147]



2.3a: C₂ = H

2.3b: C₂ = SCH₃

2.3c: C₂ = SC₂H₅

2.3d: C₂ = SC₃H₇

2.3e: C₂ = NHC₄H₉

2.3f: C₂ = OC₄H₉

2.3g: C₂ = C₄H₉

2.3h: C₂ = O(CH₂)₂OCH₃

Figure 23 : Structure générale du 9-benzyl-8-hydroxyadénine avec les différentes substituants en position C₂ [145][146].

Plus récemment, Zhu et *coll.* ont synthétisé un nouvel agoniste du TLR7 appelé SZU-101, appartenant à la série des 8-hydroxyadénines (figure 24), et ont étudié son effet antitumoral sur un modèle murin de lymphome à cellules T *in vivo*. L'administration intratumorale de SZU-101 a augmenté l'efficacité du doxorubicine (DOX), un agent chimiothérapeutique et de même a amélioré la clairance tumorale dans un modèle murin de lymphome à cellules T. La nouvelle combinaison de SZU-101 et DOX administrée par voie intratumorale a produit une forte production de cytokines et amélioré la réponse des lymphocytes T cytotoxiques, menant à l'éradication des tumeurs locales et distales chez les souris porteuses de tumeurs [148]. De plus, SZU-101 est un candidat prometteur en tant qu'adjuvant pour les vaccins antigrippaux inactivés contre la grippe H1N1. Il induit, en effet, chez la souris, une forte réponse Th1, représentée par des titres d'IgG2a élevés [149]. Un composé similaire au SZU-101, le CL264 est un dérivé de la 9-benzyl-8-hydroxyadénine contenant une glycine sur le groupement benzyle (en para) (figure 24). De manière similaire au SZU-101, le CL264 induit l'activation de NF-κB et la sécrétion d'IFNα dans les cellules exprimant le TLR7. CL264 est un agoniste spécifique du TLR7, il ne stimule pas le TLR8 même à des concentrations élevées [145].

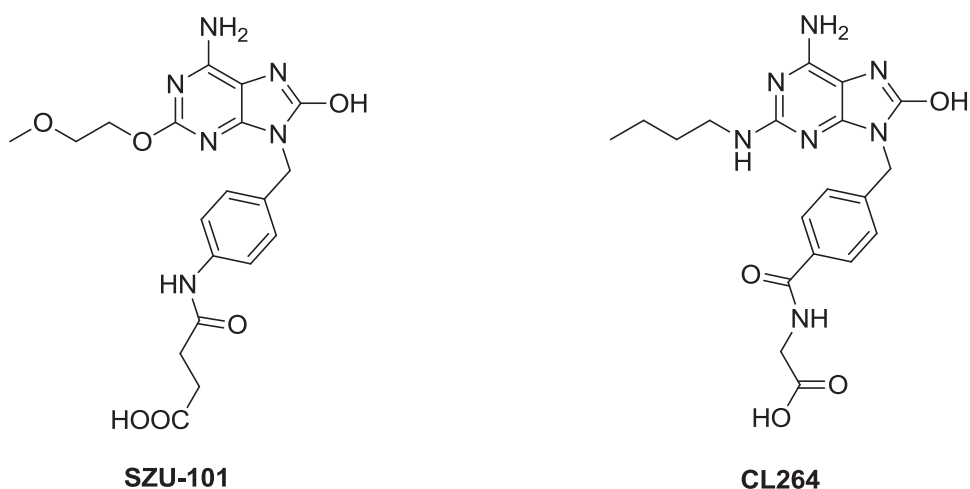


Figure 24 : Structure des agonistes du TLR7 appartenant à la série des 9-benzyl-8-hydroxyadénines, SZU-101[148] et CL264 [145].

2.3.3 Les agonistes appartenant à d'autres séries chimiques

Après le développement des imidazo[4,5-*c*]quinolines ainsi que des 8-hydroxyadénines, l'intérêt pour des petites molécules agonistes du TLR7 et TLR8 s'est traduit ces cinq dernières années par des publications mettant l'accent sur le développement de nouvelles molécules appartenant à des séries chimiques différentes. En 2013, Yoo et *coll.* ont synthétisé de nouveaux composés appartenant à la série des imidazo[4,5-*c*]pyridines, et étudié leurs effets sur la production d'interféron alpha (IFN- α) ainsi que sur l'expression du CD69 dans des sous-ensembles lymphocytaires [150]. En incorporant des substituants qui ont été précédemment déterminés comme étant optimaux dans les imidazoquinolines (N1-benzyle et C2-butyle, composé **2.1**, figure 20), Yoo et *coll.* ont synthétisé la 1-benzyl-2-butyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin-4-amine (composé **2.4**, figure 25) qui a montré une activité agonistique TLR7 (EC₅₀ : 1.57 μ M) avec une activité négligeable sur le TLR8. Une augmentation de la puissance a été observée dans des analogues substitués en N6 (figure 25), en particulier avec les composés présentant des substituants riches en électrons. Les liaisons aryle-aryle directes en position R₁ éliminait toute activité, mais l'effet agoniste TLR7 a été rétabli avec des analogues présentant un groupement benzyle ou phénéthyle en R₁. En accord avec l'activité agoniste TLR7 de ces composés, une induction d'IFN- α dans les PBMC humaines a été observée avec une très faible induction de cytokine pro-inflammatoire. Vu que ces composés sont des inducteurs puissants de l'IFN type I, avec un profil proinflammatoire atténué, ils peuvent être utilisés comme adjuvants sans induire d'inflammation locale ou systémique.

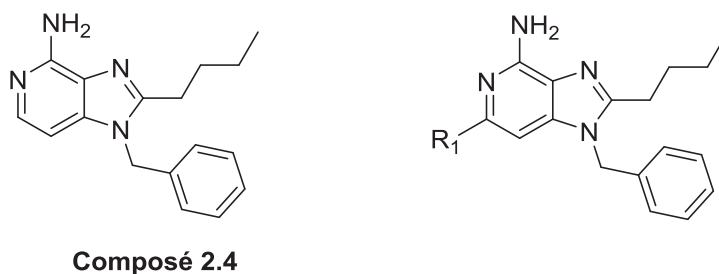


Figure 25 : Structure chimique du composé **2.4** avec la structure générale des composés substitués en position R₁ [150]

Toujours dans la perspective de développer de nouveaux adjuvants vaccinaux, Kokatla et *coll.* ont synthétisé des thiazolo[4,5-*c*]quinolines [151], analogues au 2-propylthiazolo[4,5-*c*]quinolin-4-amine CL075 (3M-002, figure 19) qui est un agoniste du TLR8 développé par les laboratoires 3M Pharmaceuticals. Les alkylthiazoloquinolines avec des groupements méthyle, éthyle, propyle (CL075 ou 3M-002) et butyle en position R₁ (figure 26) possèdent des activités agonistes TLR8 comparables, cependant l'activité diminue modérément avec le composé portant un groupement pentyle en R₁ et les composés possédant une chaîne alkyle plus longue sont inactifs. Le composé avec un butyle en R₁ (composé **2.5**) était doué également d'activité agoniste TLR7. Pratiquement, toutes les modifications

en position R₂ ont conduit à la perte de l'activité agoniste. L'alkylation de l'amine en position R₃ n'est pas tolérée. L'immunisation chez les lapins avec un antigène adjuvé avec le composé **2.5** a montré des améliorations significatives des titres d'anticorps spécifiques de l'antigène. Vu l'engagement des agonistes du TLR8 dans la production des cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF- α et l'IL12 et l'activation d'une réponse Th1 dans les cellules présentatrices d'antigènes néonatales, de nombreux travaux se sont axés vers la synthèse d'agonistes sélectifs TLR8 en vue d'être utilisés comme adjuvants vaccinaux notamment pour améliorer les réponses immunitaires chez les nouveau-nés [151].

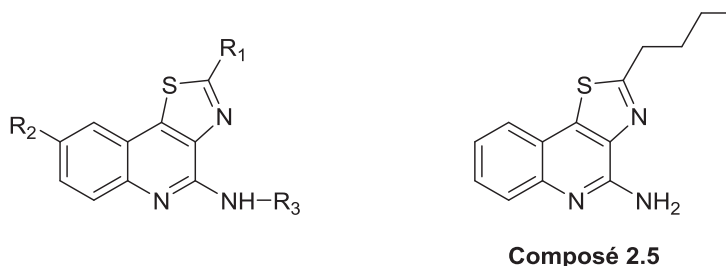


Figure 26 : Structure générale des thiazoloquinolines avec la structure chimique du composé **2.5** [151].

Des furo[2,3-*c*]quinolines ainsi que des aminoquinolines alkylées ont été synthétisés en vue d'évaluer leurs activités agonistes TLR8 (Figure 27) [152] [153]. Le 2-butylfuro[2,3-*c*]quinoline (composé **2.6**) ainsi que le 3-pentyl-quinoline-2-amine (composé **2.7**) ont montré une sélectivité vis-à-vis du TLR8 avec des EC₅₀ de 1.6 et 0.2 μ M respectivement.

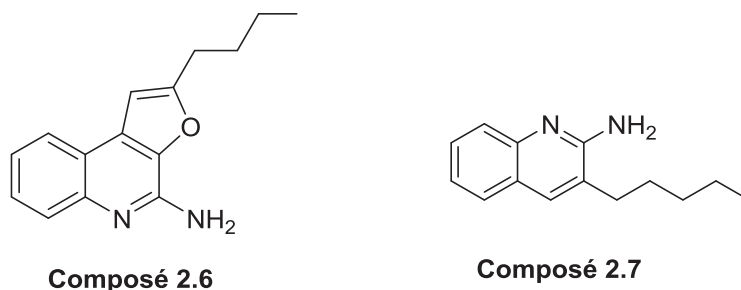


Figure 27 : Structures chimiques des composés **2.6** et **2.7** [152][153].

La figure 28 montre les interactions du composé **2.6** avec l'ectodomaine du TLR8 humain : des liaisons hydrogènes ioniques (salt bridge) ont été observées entre l'amine en C4 et le carboxylate de la chaîne latérale d'Asp543 de TLR8, une liaison hydrogène a lieu entre l'oxygène du furanyle et la thréonine T574 ainsi que des interactions π - π entre la quinoline et la poche formée par le Phe405 et la Tyr353. Des interactions de Van Der Waals entre la chaîne alkyle en C2 et la poche formée par le Phe346, l'Ile403 et la Tyr348 ont été également observées.

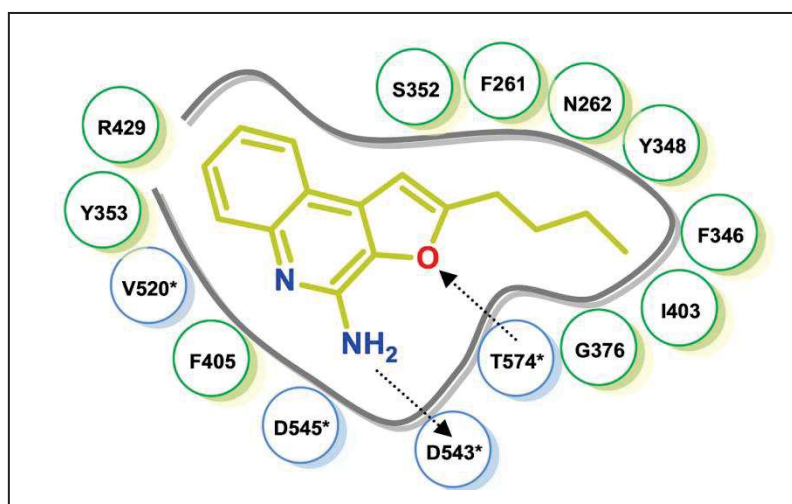


Figure 28 : Les interactions du composé **2.6** avec l'ectodomaine du TLR8 humain [153]

Vu que la plupart des composés actifs possèdent un groupement butyle en position C2, Yoo et *coll.* ont examiné les effets électroniques des modifications hétérocycliques tout en maintenant le butyle en position C2 [154]. Ils ont synthétisé 13 différentes structures tricycliques incluant des thiazolo/oxazolo[4,5-*c*]quinolin-2-amines, thiazolo/oxazolo[5,4-*c*]quinolines, imidazo[1,2-*c*]quinazolines, [1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines, imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]quinoxalines, [1,2,4]-triazolo-[4,3-*a*]quinoxalines, et pyrazolo[3,4-*c*]quinolines. Parmi tous ces composés, l'oxazolo[4,5-*c*]quinolin-2-amine (composé **2.8**), le thiazolo[4,5-*c*]quinoline (composé **2.9**) et le pyrazolo[3,4-*c*]quinoline (composé **2.10**) ont montré une activité agoniste TLR7 avec des EC_{50} de 0.55, 0.73 et 0.19 μ M respectivement, ainsi qu'une activité agoniste TLR8 avec des EC_{50} respectives de 0.18, 3.94 et 0.056 μ M (figure 29). Cependant l'imidazo[1,2-*a*]quinoxaline (composé **2.11**) a montré une sélectivité vis à vis du TLR8 avec une EC_{50} de 7.99 μ M. Cette activité a été confirmée par une étude de la sécrétion des cytokines par des PBMCs humaines. Les composés **2.8**, **2.9** et **2.10** ont montré une faculté à produire de l'IFN alpha, alors que le composé **2.11**, agoniste du TLR8, n'était pas capable d'en produire. De plus ces composés ont été capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β ...), de l'interféron type II (IFN- γ) ainsi que des chémokines.

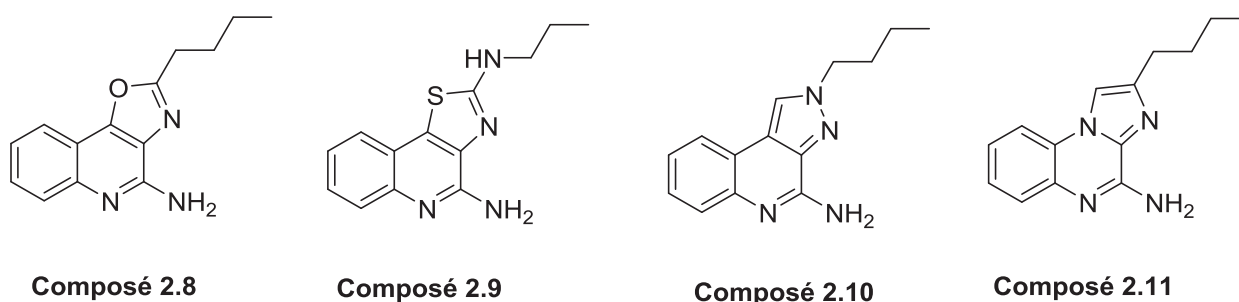


Figure 29 : Structures chimiques des composés **2.8**, **2.9**, **2.10** et **2.11** [154].

La figure 30 montre les interactions entre le composé **2.10** le plus actif et l'ectodomaine du TLR8 humain : Les principales interactions comprennent la liaison d'hydrogène du groupement amidine avec l'Asp543, l'interaction de l'atome d'azote du cycle pyrazole avec le Thr574, des interactions π - π du cycle quinoline avec le Phe405, et des interactions de Van Der Waals de la chaîne alkyle dans la poche formée par la Tyr348, la Val378 et la Phe405.

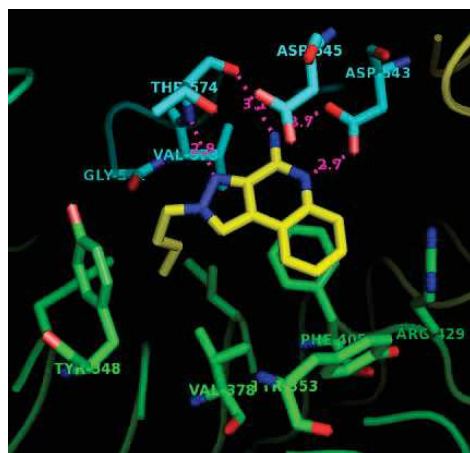
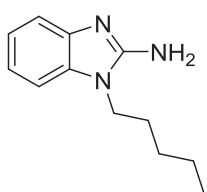
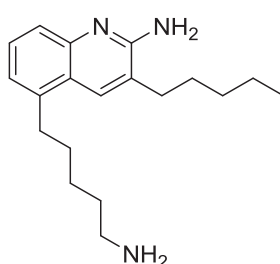


Figure 30 : La structure cristalline de l'ectodomaine de TLR8 humain complexé avec le composé **2.10**, montrant les interactions clés dans la poche de liaison [154].

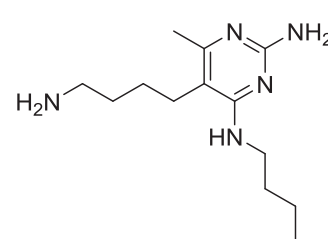
Dans le but d'identifier de nouveaux adjuvants vaccinaux, Beesu et *coll.* ont synthétisé une grande variété de composés hétérocycliques qui ont montré une sélectivité vis-à-vis du TLR8 [155] [156] [157]. La figure 31 montre la structure chimique des composés les plus actifs, appartenant à trois séries chimiques : la série des benzimidazol-2-amines (composé **2.12**, EC_{50} (TLR8) = 1.13 μ M), des quinolines (composé **2.13**, EC_{50} (TLR8) = 9nM) et des pyrimidine-2,4-diamines (composé **2.14**, EC_{50} (TLR8) = 0,3 μ M).



Composé 2.12



Composé 2.13



Composé 2.14

Figure 31 : Structures chimiques des composés **13**[165], **14**[166] et **15**[167].

Dans le but d'identifier de nouveaux composés actifs TLR7 / TLR8, Beesu et *coll.* ont repris les études de relation structure-activité dans la série des pyrimidine-2,4-diamines, en se concentrant sur les substituants en C5 [158]. Le composé **2.15** (*N*⁴-butyl-6-méthyl-5-(3-morpholinopropyl)pyrimidine-2,4-diamine) présente une importante activité agoniste simultanée TLR7 et TLR8, avec une activation remarquable de plusieurs sous-ensembles de cellules dendritiques (figure 32).

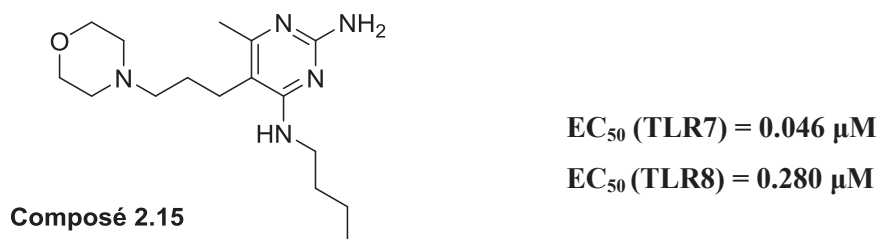


Figure 32 : Structure chimique du composé **2.15** [168].

L'ensemble de ces données atteste de l'importance des structures hétérocycliques dans l'activation des TLR7 et 8, l'introduction des chaînes alkyles crée des interactions importantes avec les ectodomains des TLR7 et 8. De même la présence d'un groupement NH_2 est indispensable pour l'activité agoniste. En conséquence, le développement des agonistes du TLR7 et du TLR8 constitue un axe important dans le traitement des cancers, de l'asthme, et dans l'exploration de nouveaux adjuvants vaccinaux. Par exemple, les formulations d'adjuvants agonistes des récepteurs Toll-like (TLR) ont montré leur capacité à élargir les réponses au vaccin H5N1 dans des modèles précliniques. Cependant, plusieurs de ces molécules agonistes se sont avérées difficiles à développer cliniquement. En 2017, Hoeven et *coll.* ont décrit le développement d'une formulation adjuvante de l'agoniste du TLR7/8, 3M-052, appartenant à la série des imidazoquinolines (figure 33), en combinaison avec des antigènes à base d'hémagglutinine H5N1 [159]. Ils ont trouvé que plusieurs formulations du 3M-052 protégeaient à la fois les souris et les furets d'infections provoquées par le virus homologue H5N1 létal. En outre, ils ont démontré l'aptitude de formulations adjuvantes de 3M-052 à élargir les réponses aux antigènes à base d'hémagglutinine H5N1.

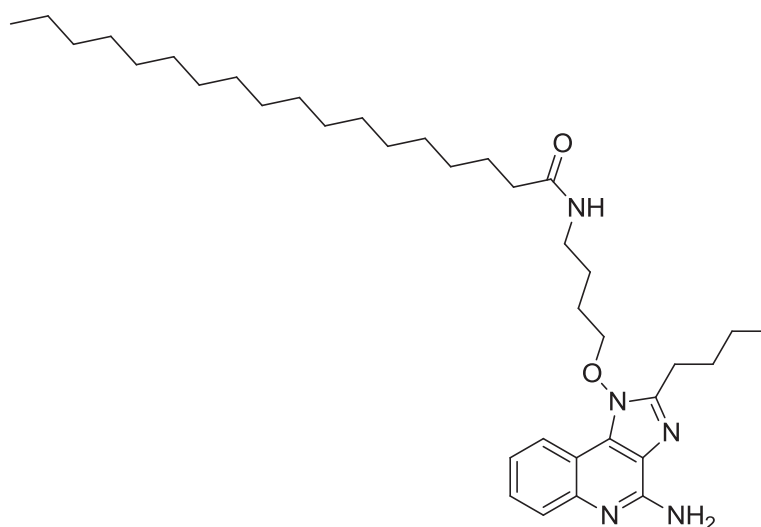


Figure 33 : Structure chimique du composé **3M-052**.

De plus, des nanoparticules d'un agoniste du TLR8 (3M-002, figure 19) imitaient les effets immunomodulateurs du vaccin BCG vivant et amélioreraient les réponses immunitaires innée et adaptative néonatales [160].

Les TLR7 et 8 peuvent de plus intervenir dans le cadre de traitements de l'asthme ou d'allergies : la principale caractéristique d'une réponse allergique est généralement une forte réponse Th2 qui peut être contrebalancée par l'induction de la signalisation des TLRs ; ces derniers permettent une réponse des cytokines et activent les cellules présentatrices d'antigène, conduisant à une réponse Th1. Les agonistes qui activent les TLRs, en particulier TLR7 et TLR8, peuvent induire une forte réponse Th1 et servir comme de nouvelles thérapies dans ces domaines pathologiques. Le motolimod ou VTX-2337 est un agoniste du TLR8 en cours de développement pour son potentiel dans le traitement du cancer et de l'allergie. L'agoniste du TLR7 AZD8848 (DSP-3025) est évalué pour sa capacité à induire une rémission de la maladie à long terme dans les troubles allergiques tels que l'asthme bronchique et la rhinite allergique [161].

3. Les Antagonistes du TLR7 et TLR8

En plus de leur pouvoir d'activer le système immunitaire, d'intervenir dans la thérapie de plusieurs maladies et d'être des candidats adjuvants vaccinaux, les TLRs 7 et 8 ont été fortement impliqués dans le développement des maladies autoimmunes, de certains cancers ainsi que dans la progression du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), suite à une activation chronique du système immunitaire.

✓ Engagement du TLR7 et TLR8 dans les maladies autoimmunes :

Plusieurs données dans la littérature ont montré que les TLRs 7, 8 et 9 reconnaissent des complexes immuns endogènes (CI), contenant des acides nucléiques, dans certaines maladies auto-immunes, telles que le lupus et le psoriasis, et induisent des cytokines pro-inflammatoires contribuant à la progression de la maladie [161] [162]. L'activation des TLRs 7, 8 et 9 par les complexes immuns conduit à l'expression de l'interleukine 12 (IL-12), de l'IL6, du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), de l'IL-1 β et de l'interféron IFN- α , et est associée à la présence d'auto-anticorps anti-ADN et anti-ARN chez les patients atteints de Lupus Erythémateux Disséminé (LED) [163] [164]. Dans cette dernière pathologie, ces auto-anticorps provoquent des dommages aux organes en se liant directement aux tissus de l'hôte ou en formant des complexes immuns qui se déposent dans les tissus vasculaires, induisant ainsi une inflammation destructive [165]. Plusieurs études utilisant des souris déficientes en TLRs ont étudié le rôle des TLRs 7, 8 et 9 dans le développement du LED chez des souris sujettes au lupus. La délétion du TLR7 chez des souris sujettes au lupus a conduit à un échec dans la production d'anticorps, à une diminution de l'activation lymphocytaire, diminution des taux sériques d'IgG et une atténuation de la maladie [166].

Le rôle du TLR8 dans les maladies auto-immunes n'a pas été étudié d'une manière approfondie, peut-être à cause d'un manque de réponse aux ligands de TLR8 dans les modèles murins. Le profil des effets immunitaires stimulés par les ligands TLR7 et TLR8 est différent [46]. Les réponses TLR7 sont caractérisées par une forte production d'IFN de type I tels que l'IFN- α , qui semblent jouer un rôle majeur dans les maladies auto-immunes, alors que le TLR8 stimule des niveaux très faibles d'IFN- α mais induit une forte production d'autres cytokines pro-inflammatoires [167] [134] [168]. Cependant, le TNF α qui est produit lors de l'activation du TLR8 peut exercer des effets pro-inflammatoires dans les maladies auto-immunes [169] [170]. Le TLR8 est stimulé par des ribonucléoprotéines ou des séquences d'auto-ARN [171], et l'ARNm du TLR8 est sur-régulé chez les patients atteints du syndrome de Sjögren [172], indiquant un rôle possible du TLR8 dans les processus auto-immuns. Dans le psoriasis, une maladie inflammatoire auto-immune chronique de la peau, l'auto-ARN extracellulaire forme des complexes avec le peptide antimicrobien cationique LL37. Ces complexes sont hautement protégés contre la dégradation de la RNase et ont accès aux compartiments endosomaux des cellules dendritiques plasmacytoides (DCp) et myéloïdes (DCm). Les complexes auto-ARN-LL37 induisent l'activation du TLR7 dans les DCp et déclenchent la sécrétion d'IFN- α . Les complexes auto-ARN-LL37 déclenchent également l'activation directe des DCm pour sécréter TNF- α et l'IL-6 et se différencier en cellules dendritiques matures. Cette maturation de DCm est déclenchée par le TLR8 endosomal et est renforcée par l'activation concomitante des DCp pour produire l'IFN- α . Ces données identifient les complexes auto-ARN-LL37 comme déclencheurs endogènes des TLR7 et TLR8 dans les cellules dendritiques humaines conduisant ainsi au développement du psoriasis [173].

✓ Engagement du TLR7 et TLR8 dans le cancer :

Contrairement aux avantages thérapeutiques des agonistes du TLR7 et TLR8 sur les cellules immunitaires, plusieurs études ont montré que la stimulation du TLR7/8 favorise la progression tumorale. En 2010, Cherfils-Vicini et *coll.* ont montré que le TLR7 et TLR8 sont fortement exprimés sur les cellules tumorales primaires des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC : Non-Small-Cell lung carcinoma). En outre, la stimulation par les agonistes du TLR7 induit un important effet protumorigène *in vitro* et une résistance aux médicaments chimiothérapeutiques actuellement utilisés pour traiter les patients atteints du NSCLC [174]. Ces auteurs ont également vérifié ces effets chez des modèles murins immunodéficients (NOD/SCID) et immunocompétents (C57BL/6), en utilisant des cellules du carcinome pulmonaire greffées par voie sous-cutanée [175]. Dans les deux modèles, les auteurs ont montré que l'administration répétée des agonistes du TLR7, tels que CL264, loxoribine ou imiquimod entraînait une augmentation du volume tumoral. Cet effet protumorigène pourrait être médié par une stimulation directe des cellules tumorales exprimant le TLR7 ou par un recrutement et une différenciation accrue des cellules immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral. De plus, d'autres équipes de recherche ont montré des résultats similaires dans d'autres modèles tumoraux. Par exemple, dans un modèle de cancer du pancréas

composé des cellules tumorales exprimant le TLR7, la stimulation de ce dernier induit une accélération dans la croissance tumorale et une réduction dans l'expression de plusieurs molécules antitumorales [176] [177]. De même, dans une étude portant sur le carcinome hépatocellulaire, les cellules tumorales ont montré une expression du TLR7, dont la stimulation induisait une prolifération accrue des cellules malignes [178].

✓ Engagement du TLR7 dans le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)

L'activation immunitaire chronique est une cause principale d'immunodéficience progressive de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH). L'ARN simple brin du VIH est un activateur immunitaire puissant, qui déclenche la signalisation médiée par les récepteurs TLR7. Le virus VIH, lui-même, peut contribuer directement à l'activation du système immunitaire et à son dysfonctionnement en stimulant le TLR7 [179]. Des études récentes ont montré que l'activation du TLR7 dans les lymphocytes T CD4⁺ humains déclenche un état anergique qui peut contribuer à l'hyporéactivité des cellules T CD4⁺ après infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et peut également augmenter la propagation de ce virus. Ce rôle inattendu du TLR7, dont l'activation facilite l'infection des cellules T CD4⁺ par le VIH-1, a été bloqué en utilisant un inhibiteur du TLR7. La présence de cet inhibiteur a conduit à une atténuation de l'infection. Les auteurs ont conclu que le VIH-1 utilise l'état anergique induit par l'activation du TLR7 pour soutenir sa propre propagation [180].

L'inhibition de l'activation des TLRs 7 et 8 par des composés synthétiques constitue donc un domaine de recherche prometteur pour le traitement des maladies auto-immunes, des cancers et du SIDA. Les antagonistes TLR7/8 sont des composés développés en tant qu'analogues structuraux aux agonistes et qui se lient au récepteur en inhibant son activation, supprimant ainsi la réponse immunitaire. Comme dans le cas des agonistes du TLR7 et TLR8, les antagonistes actuellement connus sont divisés en deux groupes : les oligonucléotides et les composés hétérocycliques, bi- et tricycliques.

3.1 Les oligonucléotides

En 2006, Judge et *coll.* ont montré que l'incorporation de résidus 2'-O-méthyl (2'OMe) -uridine ou 2'OMe-guanosine dans des petits ARN interférents (siRNA) ou dans l'ARN simple brin élimine leur activité immunostimulatrice à la fois *in vitro* et *in vivo* [181]. Il a également été rapporté que la modification chimique des nucléotides dans l'ARN des mammifères, y compris les modifications 2'OMe, les empêche d'activer les cellules dendritiques [182]. En 2007, Robbins et *coll.* ont testé la capacité de l'ARN 2'OMe à antagoniser la stimulation immunitaire par le TLR7 [183]. Ils ont rapporté que l'ARN 2'OMe inhibe directement l'induction des cytokines par l'ARN immunostimulant et par un agoniste de TLR7, la loxoribine dans les systèmes murin et humain. Cette activité inhibitrice de l'ARN 2'OMe a également été montrée *in vivo*. Ces résultats indiquent que l'ARN 2'OMe agit comme un

antagoniste du TLR7. Les oligodésoxynucléotides (ODN) contenant des dinucléotides CpG non méthylés agissent comme des agonistes du TLR9 et induisent des réponses immunitaires de type Th1[184]. En revanche, la substitution de la cytosine dans le motif CpG par le 2'-O-méthyl-Cytosine, le 2'-O-méthyl-5-méthyl-Cytosine ou le 5-méthyl-déoxycytosine ou la substitution du guanosine par le 2'-O-méthyl-Guanosine conduit à la perte de l'activité immuno-stimulatrice; ces oligonucléotides semblent donc être des antagonistes TLR7 et TLR9 [185]. En se basant sur ces travaux, plusieurs études récentes se sont intéressées à la synthèse d'oligonucléotides en utilisant les modifications chimiques mentionnées ci-dessus [186] [187] [188]. Parmi ces nucléotides, IMO-8400 est un oligonucléotide antagoniste du TLR7, TLR8 et TLR9, actuellement en développement clinique phase 2a pour le traitement du psoriasis [189]. De plus, plusieurs oligonucléotides antagonistes du TLR 7 et 8 ont été développés. Par exemple l'IRS 954 (immunoregulatory sequences 954) a montré sa capacité à réduire les taux sériques d'anticorps spécifiques à l'acide nucléique et à réduire les dommages aux organes cibles dans un modèle murin atteint de lupus [190]. Le traitement des PBMCs induites par le VIH, avec ce composé, réduit également la production d'IFN α , ce qui suggère une possibilité thérapeutique pour l'infection par le VIH [191].

3.2 Les antagonistes appartenant à la série des imidazo[4,5-*c*]quinolines, des pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines et des quinolines.

Les données disponibles sur de petites molécules antagonistes des deux récepteurs TLR7 ou 8 sont relativement réduites. En 2009, Shukla et *coll.* ont synthétisé le gardiquimod (agoniste TLR7) et son régioisomère 3*H* dans le but d'explorer des relations structure-activité des substituants sur le cycle imidazoline (figure 34), le régioisomère 3*H* (composé **2.16**) s'est révélé complètement inactif en tant qu'agoniste du TLR7, étant en fait, faiblement antagoniste. Un précurseur *des-amino* du régioisomère 3*H* (composé **2.17**) était plus puissant comme antagoniste du TLR7, avec une valeur d'IC₅₀ de 7,5 μ M. Ce composé, première petite molécule ayant une activité antagoniste TLR7, a servi comme point de départ pour le développement des autres antagonistes TR7 [192].

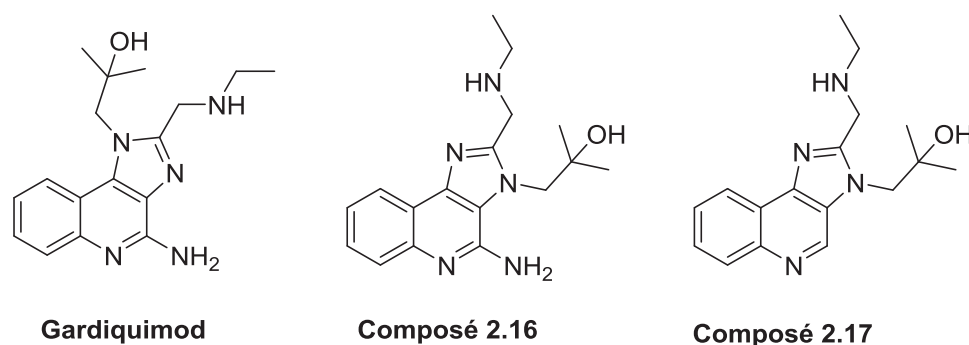


Figure 34 : Structure chimique du gardiquimod, des composés **3.16** et **3.17** [202].

A partir de ces premiers résultats encourageants, Shukla et *coll.* ont développé la synthèse d'imidazo[4,5-*c*]quinolines dans le but d'accéder à de nouvelles molécules antagonistes TLR7 ou TLR8 en se basant sur la structure du composé **2.17** (figure 34) [193]. Parmi les composés synthétisés, le composé quinolinium **2.18** portant des substituants *p*-méthoxybenzyle sur les positions N3 et N5 a été identifié comme étant le produit le plus actif en tant qu'antagoniste des TLR7 et TLR8 avec des IC₅₀ respectifs de 2.79 et 4.55 μM. Les composés **2.19** et **2.20** portant le groupement propargyle sur N3, ont également montré une bonne activité antagoniste TLR7/8 de l'ordre de 10 μM et ils peuvent s'avérer être des supports intéressants pour une alkylation supplémentaire en position N5 avec des substituants riches en électrons comme dans le cas du composé **2.18** (figure 35). L'activité antagoniste optimale du composé **2.18** était inattendue puisque le composé quinolinium avec sa charge fixe ne devrait pouvoir traverser la membrane cellulaire, les TLR7 et 8 étant localisés dans la membrane endosomale.

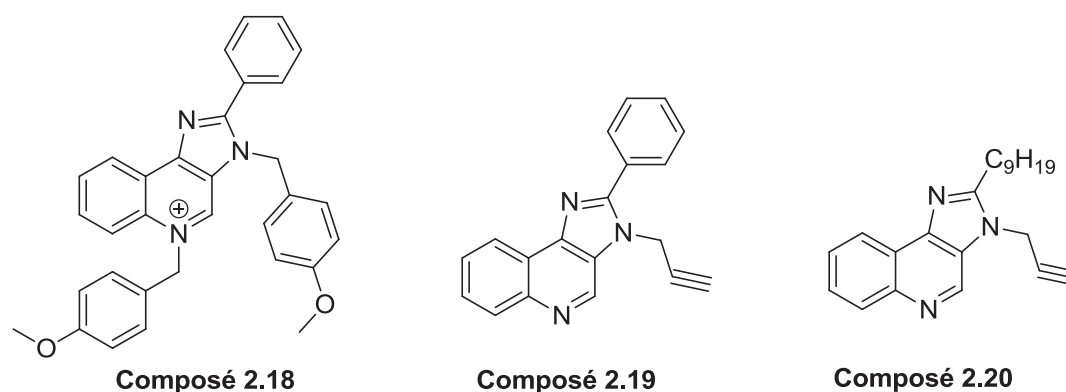


Figure 35 : Structures chimiques des composés **2.18**, **2.19**, **2.20** [193].

En 2012, la même équipe a synthétisé et évalué l'activité agonistique et antagonistique TLR7/8 des dimères d'imidazoquinolines liés aux positions C2, C4, C8 et N1-aryle [194]. Les dimères liés aux positions C4, C8 et N1-aryle étaient des agonistes du TLR7 ; seul le dimère N1-aryle avec un espaceur de 12 atomes de carbone était un agoniste double du TLR7 et du TLR8. Les dimères liés en position C2 ont montré des activités antagonistes TLR7 et TLR8 (figure 36) ; le dimère C2 avec un espaceur de propylène était un antagoniste maximal à la fois du TLR7 et du TLR8 avec des IC₅₀ de 3.1 et 3.2 μM respectivement. Ce composé a également montré une inhibition de production des cytokines proinflammatoires dans les PBMCs humaines.

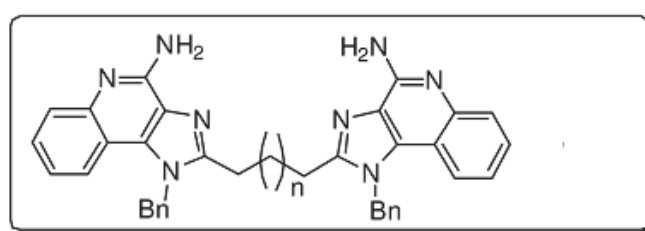


Figure 36 : Structure générale des dimères d'imidazoquinolines liés en position C2 [204].

Très récemment, Zhang et *coll.* ont identifié, pour la première fois, de petites molécules antagonistes spécifiques du TLR8 humain via un nouveau mécanisme d'inhibition [195]. Une étude de structure activité sur la série des pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines a conduit à l'identification du composé : **CU-CPT8m** qui s'est révélé être le plus actif avec une IC₅₀ de 67 nM et une forte capacité à inhiber la production des cytokines proinflammatoires (figure 37).

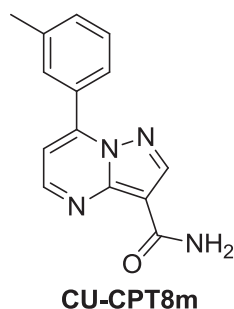


Figure 37 : Structure chimique du **CU-CPT8m** [205].

Les auteurs ont déterminé la structure cristalline du complexe TLR8-**CU-CPT8m** (figure 38a). **CU-CPT8m** est pris en sandwich entre les deux monomères du TLR8 (TLR8 et TLR8*, l'étoile est utilisé pour indiquer le second monomère du TLR8 et ses résidus) et est logé dans une poche hydrophobe à l'interface protéine-protéine des deux monomères TLR8. Cette poche est seulement formée dans le dimère en état de repos (figure 38b). **CU-CPT8m** forme plusieurs interactions avec le TLR8 : interactions de Van Der Waals avec des résidus hydrophobes (F261, F346, V378, I403, F405, F494*, A518*, V520* et Y567*), interactions π - π avec Y348 et F495* et des liaisons d'hydrogène avec G351 et V520* (figure 38b, c). Lors de la liaison du **CU-CPT8m**, des changements conformationnels importants au niveau des répétitions riches en leucine LRR8 (F261 et N262) et LRR18 (Y567*) permettent l'interaction avec le composé **CU-CPT8m** (figure 38b), tandis que les autres régions ne sont pas modifiées de façon significative. Notamment, TLR8 utilise LRR11-13 pour la liaison agoniste et antagoniste d'un côté de l'interface, tandis que de l'autre côté, LRR17*-18* et LRR15*-16* sont respectivement utilisés pour les liaisons agoniste et antagoniste. Par conséquent, ce nouveau site de liaison est proche, mais distinct du site 1 précédemment identifié pour l'agoniste (*cf.* chapitre 1), ce qui implique un nouveau mécanisme inhibiteur par le **CU-CPT8m**. En outre, la superposition des sites de liaison antagonistes des TLR7 et TLR8 révèle des différences structurelles, ce qui peut expliquer l'activité inhibitrice du **CU-CPT8m** spécifiquement contre le TLR8, et non contre le TLR7. Lors de l'activation induite par le ligand, les ectodomaines du TLR8 subissent des changements conformationnels, et leurs extrémités C-terminales sont alors plus proches. Les distances entre les extrémités C-terminales des deux monomères du dimère TLR8 sont de 49 Å dans le complexe TLR8-**CU-CPT8m** et de 51 Å dans le dimère TLR8 sans ligand. Ces valeurs sont évidemment plus grandes que celle (34 Å) du dimère activé par l'agoniste (figures 38a et 39), dans lesquelles les deux extrémités

C-terminales se rapprochent pour permettre la dimérisation des domaines intracellulaires et initier la cascade de signalisation.

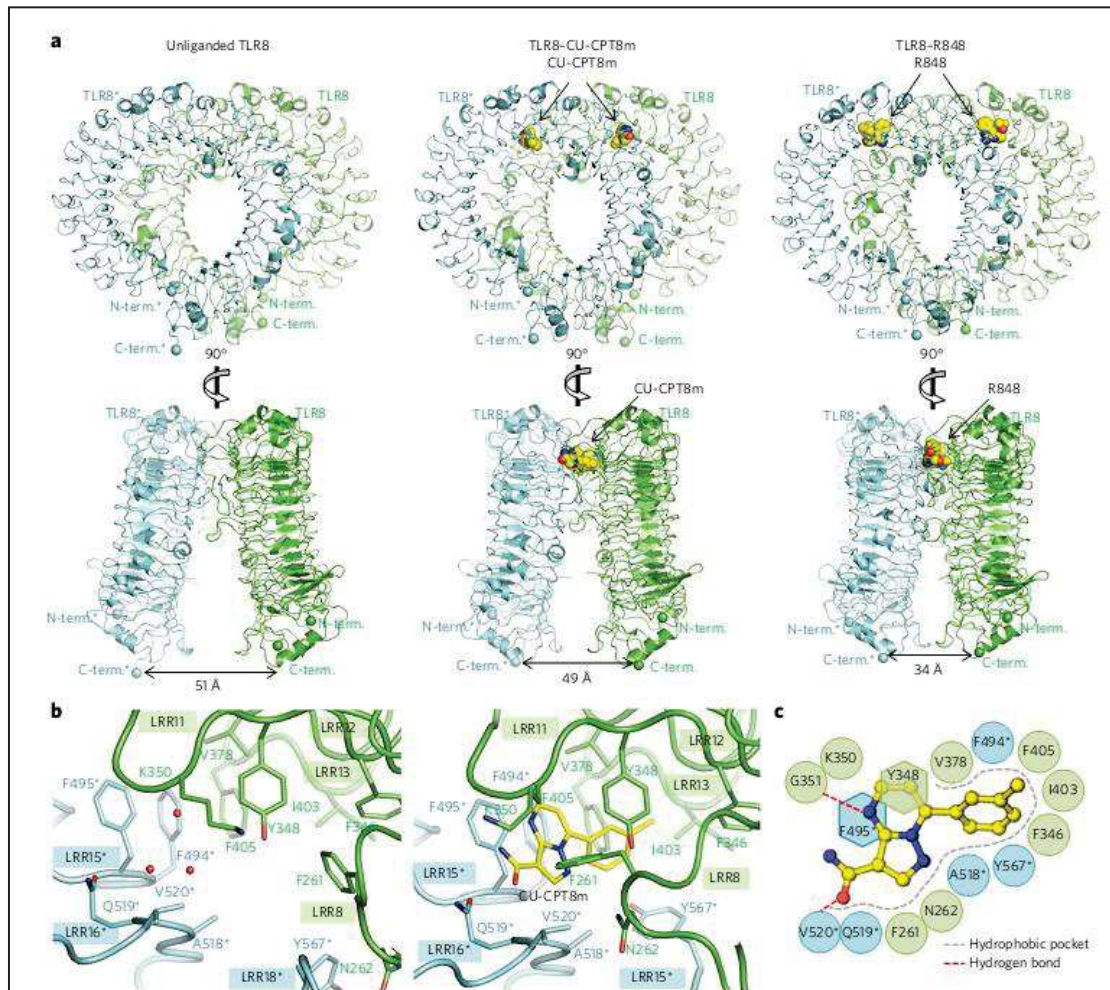


Figure 38 : Structure cristalline du complexe TLR8-CU-CPT8m. (a) Vue de face (en haut) et vue latérale (en bas) des complexes sans ligand (gauche), TLR8-cu-cpt 8m (milieu) et TLR8-R848 (droite). TLR8 et son partenaire de dimérisation, TLR8 *, sont respectivement de couleur verte et cyan. Les distances entre les extrémités C-terminales de deux monomères du dimère tlr8 (TLR8-CU-CPT8m) sont similaires à celles du dimère sans ligand (à droite). Les atomes c, o et n des ligands sont colorés en jaune, rouge et bleu, respectivement. (b) vue rapprochée du site de liaison de l'antagoniste du TLR8 sans ligande (à gauche) et du TLR8-CU-CPT8m (à droite). Les molécules d'eau sont indiquées par des cercles rouges. (c) Représentation schématique des interactions entre CU-CPT8m et le TLR8. La poche hydrophobe et les liaisons hydrogène sont représentées par des arcs gris pointillés et des lignes rouges pointillées, respectivement [205].

Ces résultats indiquent que **CU-CPT8m** reconnaît un nouveau site de liaison à l'interface TLR8-TLR8* qui est distinct du site 1 (figure 39), et dont l'occupation empêche l'activation du TLR8.

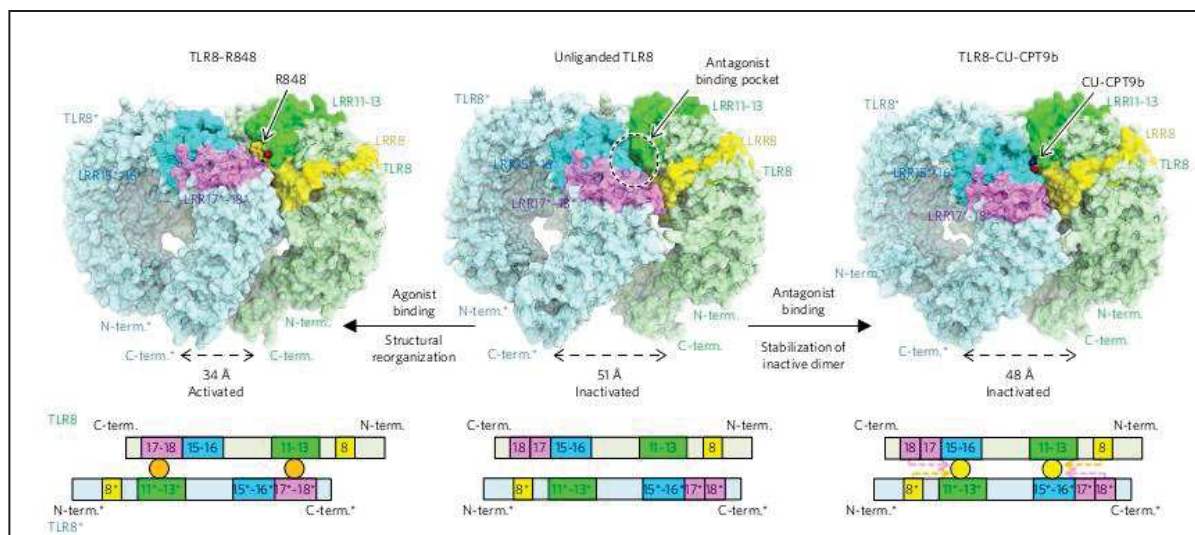


Figure 39 : Mécanisme antagoniste proposé des composés CU-CPT (en haut) et représentation schématique de l'arrangement des domaines dans chaque forme du TLR8 (en bas). LRR8, LRR11-13, LRR15-16 et LRR17-18 sont respectivement colorés en jaune, vert, bleu et violet. Dans le schéma du bas, l'antagoniste et l'agoniste sont illustrés par des cercles jaunes et orange [195].

Après ces résultats encourageants, les auteurs ont réalisé une optimisation structurale qui a conduit à l'obtention de deux nouveaux inhibiteurs du TLR8 qui sont structurellement similaires au **CU-CPT8m** et appartenant à la série des quinolines : **CU-CPT9a** ($IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$) et **CU-CPT9b** ($IC_{50} = 0.7 \text{ nM}$) (figure 40).

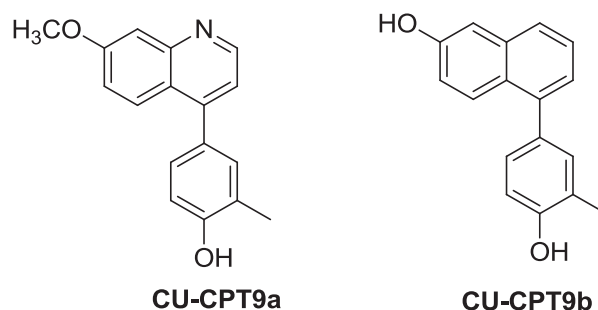


Figure 40 : Structures chimiques du CU-CPT9a et CU-CPT9b [205].

La structure cristalline du complexe **CU-CPT9b**-TLR8 montre que ce composé se lie au dimère TLR8 inactif d'une manière similaire au **CU-CPT8m**. Ces inhibiteurs peuvent, alors stabiliser l'état inactif du TLR8 en reconnaissant une poche distincte du site 1. En bloquant le site nouvellement identifié, ces inhibiteurs du TLR8 semblent aussi antagoniser la liaison des agonistes TLR8 comme R848 et l'uridine. De plus, cette stabilisation de l'état de repos du dimère de TLR empêche ensuite le TLR8 de subir un changement conformationnel nécessaire à son activation. De plus, les auteurs ont exploré les effets du **CU-CPT8m** et du **CU-CPT9a** dans des échantillons humains extraits de divers patients souffrant de maladies inflammatoires et maladies auto-immunes. Les résultats de cette étude ont

montré que le traitement avec le **CU-CPT9a** exerce de puissants effets anti-inflammatoires dans les échantillons des patients atteints d'arthrose, de polyarthrite rhumatoïde (RA) et maladie de Still de l'adulte (AOSD), confirmant ainsi les travaux publiés précédemment qui ont montré que le TLR8 pourrait jouer un rôle dans les troubles inflammatoires et les maladies auto-immunes.

En conclusion, le ciblage des récepteurs Toll-like 7 et 8 joue un rôle remarquable dans la vaccination, la prévention et le traitement du cancer, les maladies auto-immunes ainsi que dans l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH). Plusieurs équipes de recherche ont développé des ligands du TLR7 et 8 en vue de trouver des traitements efficaces contre ces maladies. Parmi ces ligands, certains ont fait l'objet d'une évaluation préclinique et clinique, avec un intérêt particulier pour les agonistes qui pourront servir comme adjuvants dans les infections virales et le cancer, et les antagonistes pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes.

CHAPITRE III : LES HETEROCYCLES : IMIDAZO[1,5-*a*]QUINOXALINES, IMIDAZO[1,2-*a*]QUINOXALINES, PYRAZOLO[1,5-*a*]QUINOXALINES ET IMIDAZO[1,2-*a*]PYRAZINES

Les hétérocycles jouent un rôle très important dans le domaine de la chimie médicinale en raison de leur large variété d'applications pharmaceutiques, ils servent comme pharmacophore dans la synthèse de plusieurs médicaments. Notre laboratoire travaille, depuis plusieurs années, sur le développement des structures azotées bi et tricycliques à potentiel thérapeutique. Notre équipe a débuté par la synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines qui ont montré une activité bronchodilatatrice ainsi qu'une activité inhibitrice des phosphodiésterases des nucléotides cycliques [196]. Puis l'équipe a développé des structures tricycliques de type imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline qui ont montré des activités anti-cancéreuses et anti-inflammatoires importantes [197] [198] [199] [200]. Dans ce chapitre, nous exposons les différentes stratégies de synthèse conduisant à la construction des structures hétérocycliques mentionnées ci-dessus, ainsi que leurs différentes applications biologiques.

1. Synthèse des composés de type imidazo[1,5-*a*]quinoxaline

Il existe plusieurs stratégies publiées concernant la synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, ces dernières peuvent être synthétisées soit à partir du cycle quinoxaline soit à partir du cycle imidazole.

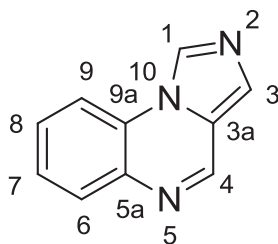


Figure 41 : Structure générale des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines

1.1 Synthèse à partir du cycle quinoxaline

La synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines à partir du cycle quinoxaline peut se faire par cyclisation intramoléculaire ou au travers de différentes condensations intermoléculaires.

Une des méthodes les plus simples pour construire le cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline est la formation de la liaison N(10)-C(1), les stratégies de synthèse correspondant à cette méthode sont simples du point de vue préparation, et les réactions se déroulent avec des rendements élevés. Dans le schéma 1, le composé **3.1** réagit avec des chlorures d'acyles afin de donner des dérivés acylés **3.2**. Ces derniers sont chauffés pendant 4 heures dans des solutions alcooliques en présence d'hydroxyde de potassium,

afin de subir une cyclisation intramoléculaire pour donner les imidazo[1,5-*a*]quinoxalines **3.3** (schéma 1A). Le principal inconvénient de cette méthode est que le composé de départ **3.1** est obtenu en plusieurs étapes (schéma 1B). La première étape consiste en une condensation d'éthynedicarboxylate de diméthyle avec de l'*o*-phénylènediamine pour donner le composé **3.4**, la réaction de ce dernier avec le nitrite d'amyle ainsi que la réduction de l'oxime résultant **3.5** conduisent au composé **3.1** [201].

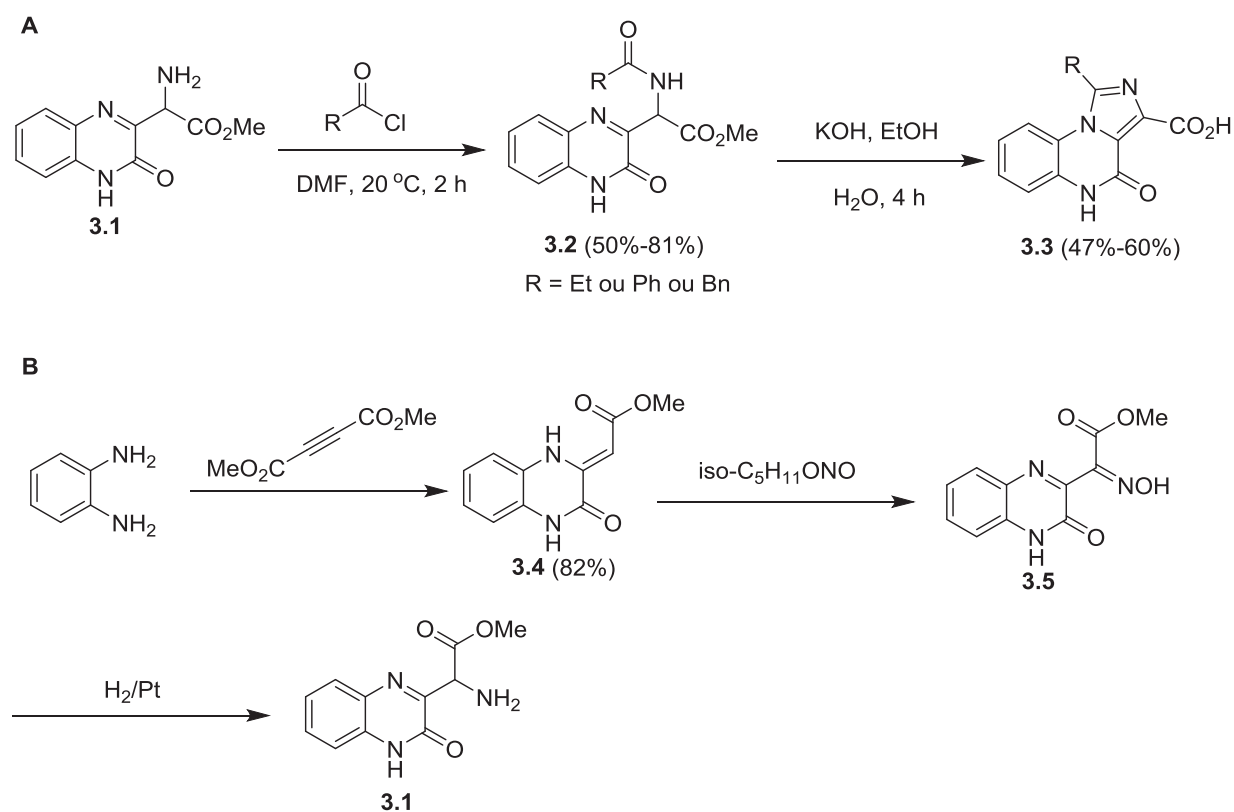


Schéma 1 : Synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines

En 2004, Mamedov et *coll.* ont développé une nouvelle procédure pour la construction de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-one (schéma 2) [202]. Le composé **3.6** réagit avec la benzylamine dans du DMSO à température ambiante pour donner le composé **3.7** qui subit une cyclocondensation intramoléculaire par chauffage dans du DMSO pendant 2 h ou dans des conditions de thermolyse à 225 ± 3 ° C (10 min) pour donner le composé **3.8** (schéma 2A). L'annulation du cycle imidazole du composé **3.7** se produit évidemment par l'oxydation de ce dernier en imine **A** qui peut également exister sous la forme de tautomères **B** et **C** (schéma 2B). Une attaque nucléophile de l'atome N(4) sur l'atome de carbone de la fonction imine dans la structure **B** conduit à la fermeture du cycle imidazole pour former le système dihydroimidazoquinoxaline **D**, et une oxydation supplémentaire de ce dernier dans les conditions réactionnelles conduit au composé tricyclique **3.8** (schéma 2B). L'oxygène de l'air ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) peuvent agir comme oxydant dans ce cas. Le composé **3.6** est synthétisé par condensation du chlorophénylpyruvate de méthyle **3.9**, synthétisé par la réaction de

Darzan à partir du dichloroacétate de méthyle et du benzaldéhyde, avec l'*o*-phénylènediamine (schéma 2C).

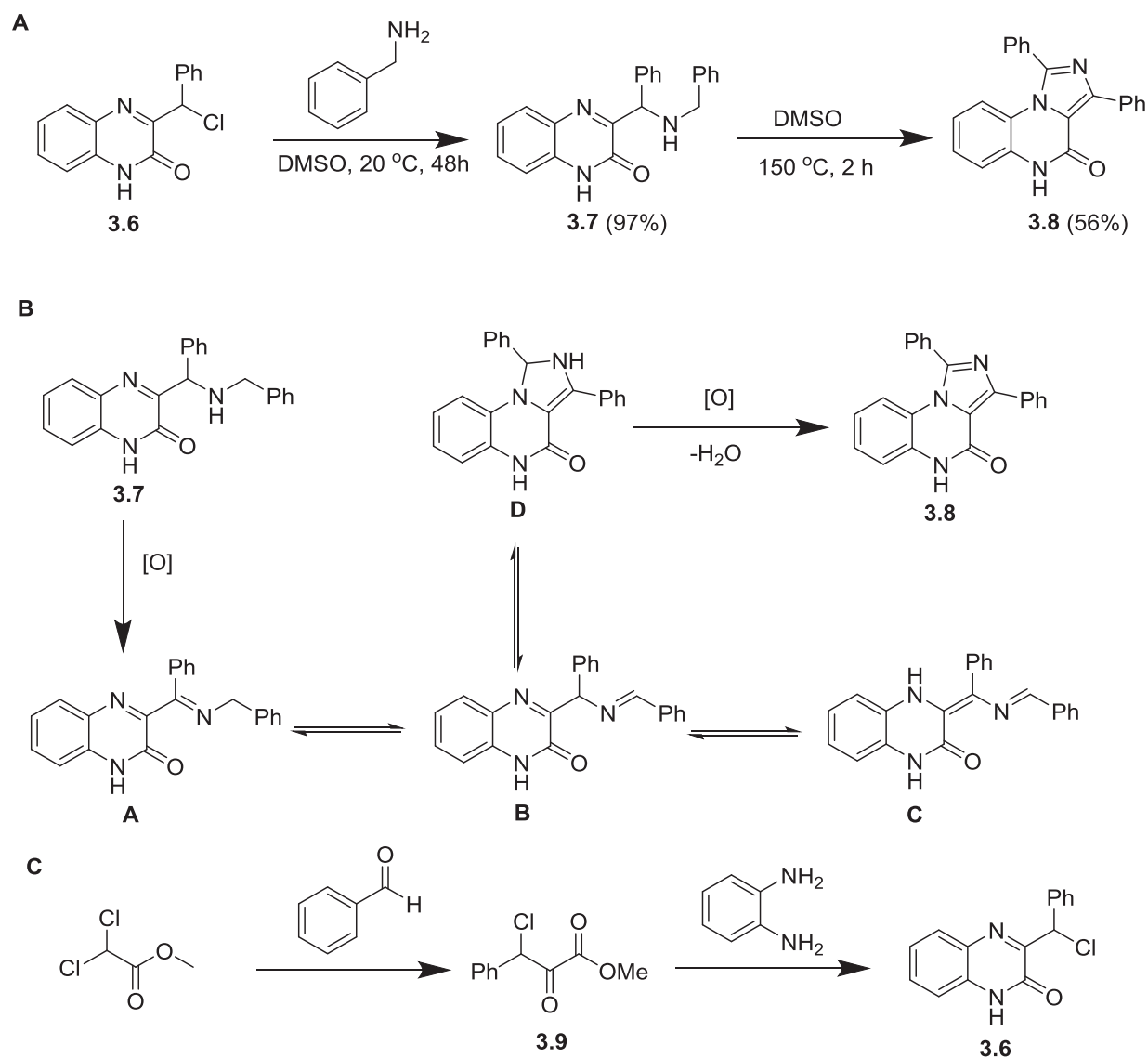


Schéma 2 : Construction de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-one.

Le composé **3.8** peut aussi être synthétisé par la réaction de la cétone hétérocyclique **3.10** avec la benzylamine en chauffant dans du DMSO (schéma 3A). Au cours de cette réaction, il y a formation de l'imine **A**, et le composé **3.8** est obtenu avec le même mécanisme mentionné dans le schéma 2B.

Le composé **3.10** se forme facilement lors de la thermolyse de l'azide **3.11**, synthétisé suite à la réaction du composé **3.6** avec l'azoture de sodium (NaN_3), dans l'acide acétique bouillant (schéma 3B) [203] [204] [205].

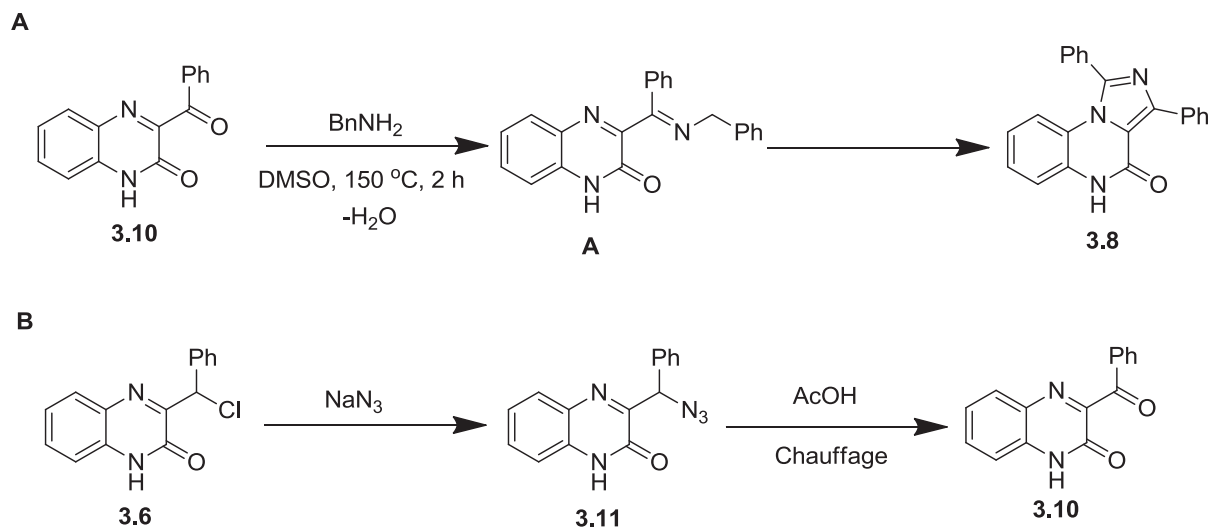


Schéma 3 : Construction de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-one.

Malamas et *coll.* ont utilisé le composé **3.1** pour la synthèse de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-one **3.12** (Schéma 4) via la formation des liaisons N(10)-C(1) et C(1)-N(2). La condensation du composé **3.1** avec l'orthoformiate d'éthyle, l'orthoacétate de triéthyle ou le 2-chloro-1,1,1-triméthoxyéthane en présence d'acide *p*-toluènesulfonique (TsOH) pendant 2-3 h au reflux conduit aux imidazoquinoxalines **3.12** [206].

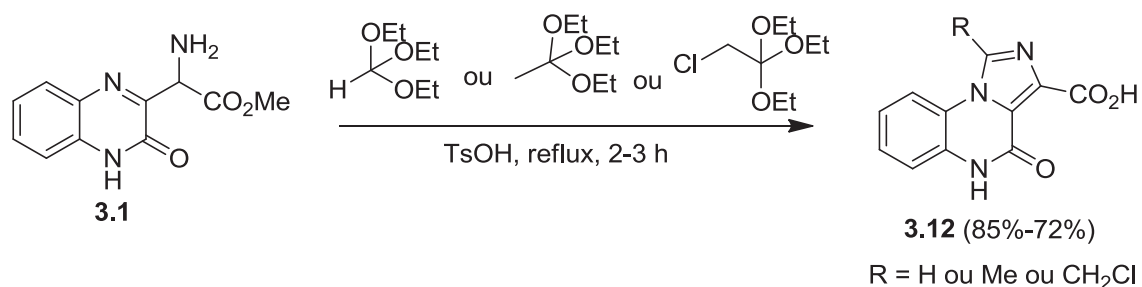


Schéma 4 : Construction de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-one.

En 2012, Wang et *coll.* ont utilisé une nouvelle méthode pour la synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, qui consiste en une cyclisation décarboxylative médiée par l'iode à partir d'un acide α -aminé et d'un aldéhyde hétérocyclique [207]. Ils ont utilisé le quinoxaline-2-carbaldéhyde **3.14** et le 2-phénylglycine **3.13** comme produits de départ, l'iode comme catalyseur, le KHCO₃ comme base et le DMA comme solvant, et le mélange est agité à 35 °C pendant 3 heures (schéma 5).

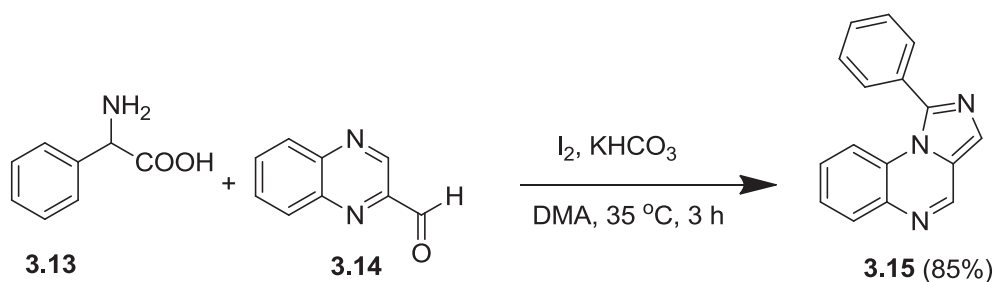


Schéma 5 : Synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines.

Par l'intermédiaire de cette méthode, ils ont pu synthétiser une variété d'hétérocycles comme des imidazo[1,5-*a*]quinolines, des imidazo[1,5-*a*]pyridines ainsi que des imidazo[5,1-*a*]isoquinolines dans des conditions douces. En se basant sur les résultats expérimentaux obtenus ainsi que sur les données bibliographiques, les auteurs ont proposé un mécanisme plausible pour la réaction ci-dessus : La réaction commence à partir de la condensation de la phénylglycine **3.13** avec le quinoxaline-2-carbaldéhyde **3.14** pour former l'imine **I**, suivie par une *N*-iodation pour donner l'intermédiaire **II**. Ce dernier subit une voie décarboxylative favorisée par KHCO_3 pour générer l'intermédiaire **IIIa**. **IIIa** peut se transformer en **IIIb** par tautomérisation. Et **IIIb** peut être facilement cyclisé à travers une addition nucléophile intramoléculaire pour donner **IV**. Finalement, **IV** perd un acide iodhydrique pour donner le produit final **3.15** (schéma 6).

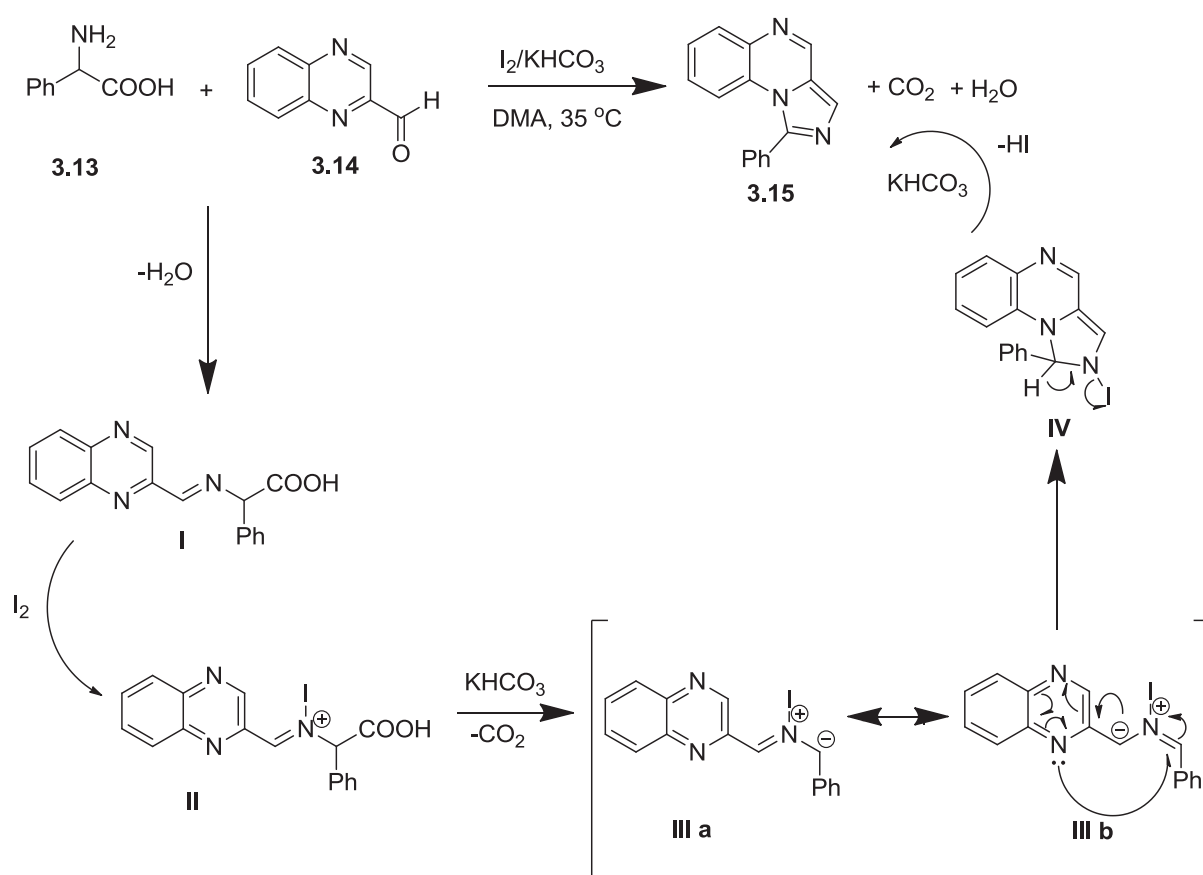


Schéma 6 : Mécanisme général de la cyclisation décarboxylative

Très récemment, Justyna et *coll.* ont utilisé la thermolyse éclair sous vide (Flash Vacuum Thermolysis FVT) pour la synthèse d'une grande variété d'hétérocycles y compris les imidazo[1,5-*a*]pyrimidines, les imidazo[1,5-*a*]pyrazines, les imidazo[1,5-*a*]quinoline, les imidazo[5,1-*a*]isoquinolines et les imidazo[1,5-*a*]quinoxalines [208]. La synthèse se fait par thermolyse éclair sous vide des imines hétérocycliques à 800 °C et 850 °C pour les bicycles et à 760 °C pour les tricycles sous une pression de 10^{-4} hPa. Le schéma 7A montre la synthèse de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxaline **3.17** par thermolyse éclair

sous vide de l'imine **3.16**. Cette dernière est synthétisée à partir de l'aldéhyde **3.18** et de *tert*-butylamine (schéma 7B). Le mécanisme de formation du **3.17** est élucidé dans le schéma 7C : le mécanisme débute par une élimination initiale d'un radical méthyle du groupe *tert*-butyle, ce qui va donner un radical azaallyle stabilisé par résonance. L'ensemble du processus nécessite l'élimination séquentielle de deux radicaux méthyles. Cette réaction est complètement régiosélective, c'est-à-dire que seulement la cyclisation sur l'atome d'azote cyclique adjacent à la fonction imine a lieu. Le produit **3.17** est obtenu avec un rendement élevé de 75.2%, de plus il y a eu formation de faibles quantités des produits secondaires comme la cyano-quinoxaline (3.3%), la quinoxaline (19.8%) avec la présence de 1.7% de l'imine **3.16** (produit de départ).

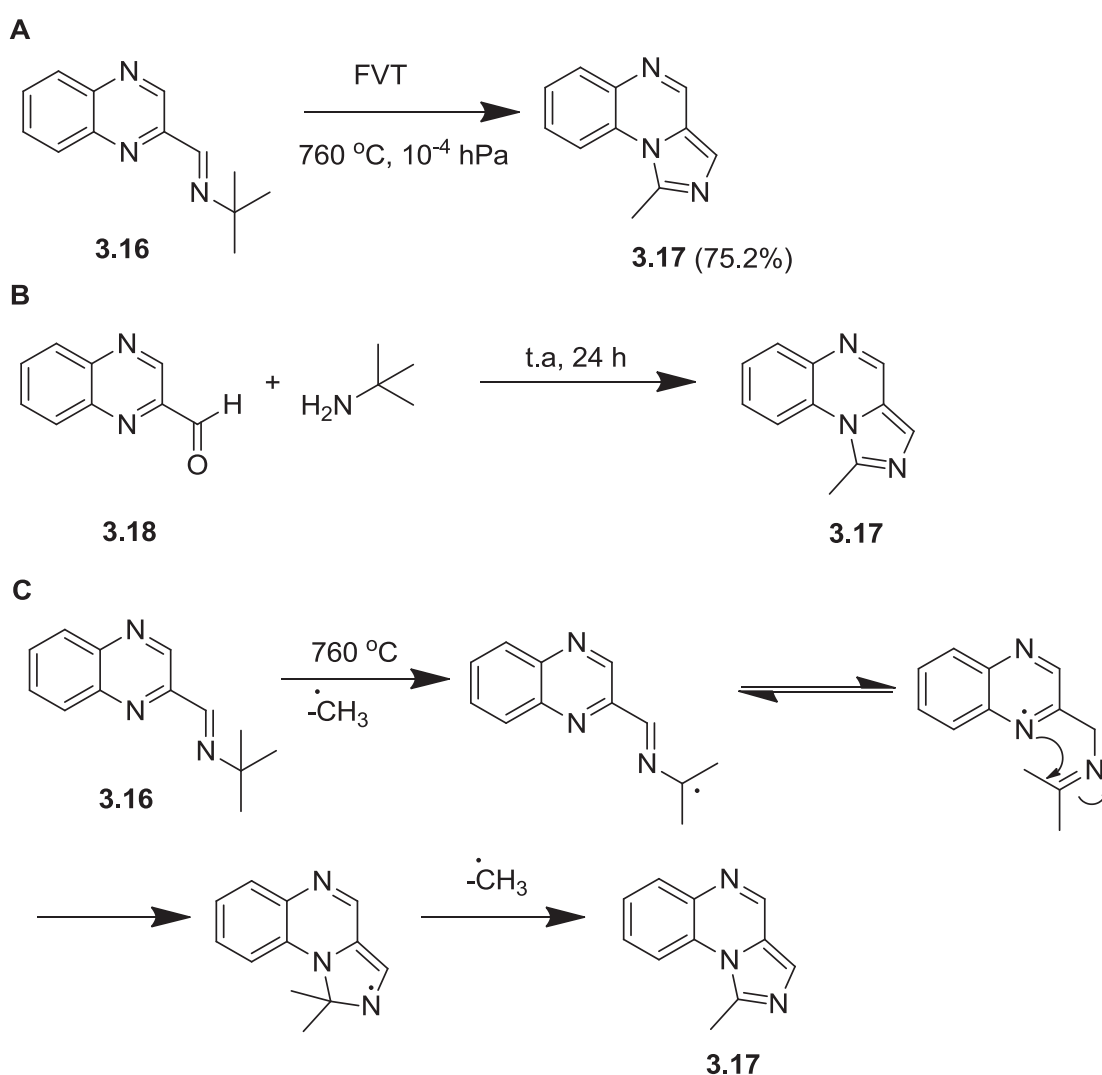


Schéma 7 : La thermolyse éclair sous vide pour la synthèse d'une grande variété d'hétérocycles.

1.2 Synthèse à partir du cycle imidazole

Une des méthodes qui nous permet d'accéder à la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines à partir du cycle imidazole est la formation d'une liaison C(3a)-C(4). Par exemple, la réaction de l'acétamide **3.19**

avec l'oxychlorure de phosphore (POCl_3) et le pentoxyde de phosphore (P_2O_5) à 115 °C conduit à la construction du cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline **3.20** par l'intermédiaire de la cyclisation du Bischler-Napieralski (schéma 8A). Le composé **3.19** est synthétisé en cinq étapes à partir du 2-fluoro-4-(trifluorométhyl)aniline **3.21** (schéma 8B) : après chloration du composé **3.21**, une oxydation de la fonction amine avec le perborate du sodium ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a lieu. Le composé obtenu **3.23** va se coupler avec le 4-méthylimidazole en présence de K_2CO_3 pour donner le composé **3.24**. Après réduction du groupement nitro, le composé **3.25** subit une acétylation afin de donner le composé **3.19**.

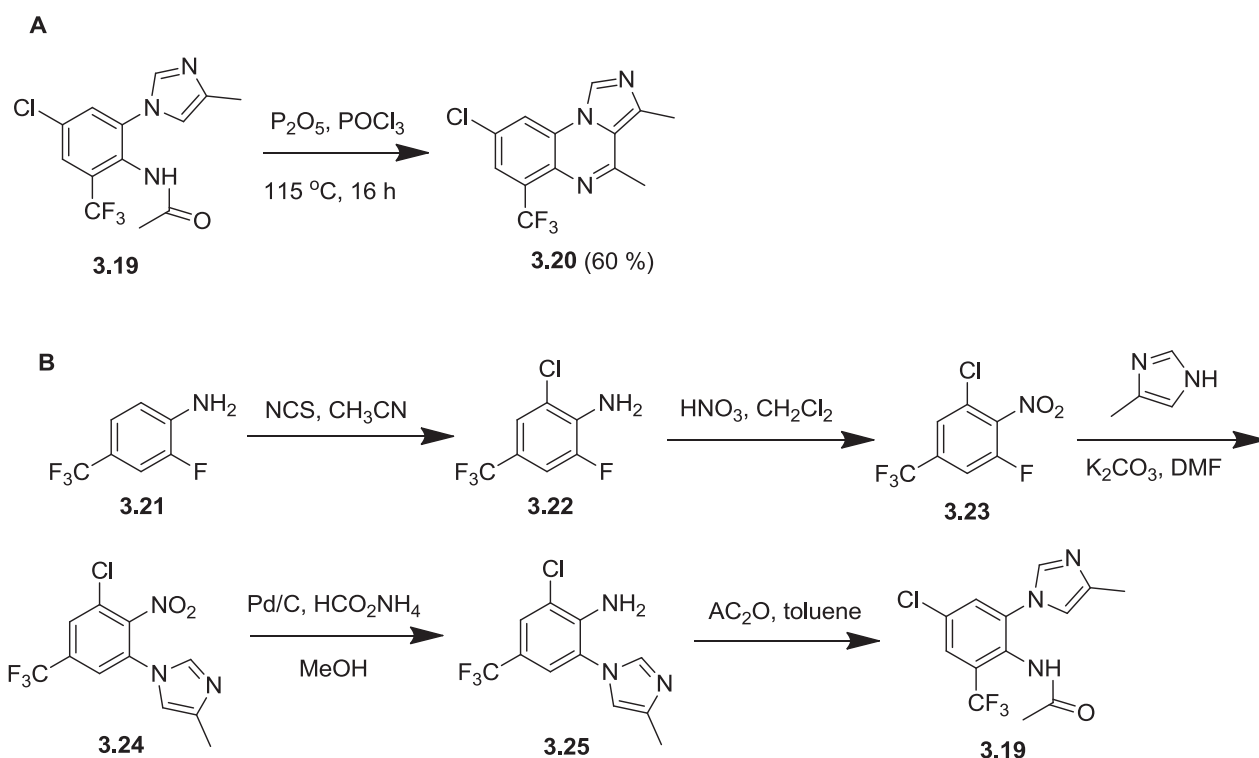


Schéma 8 : Synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines à partir du cycle imidazole.

La cyclisation réductrice est une méthode largement utilisée dans la littérature pour construire le cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline. Le composé **3.26** est synthétisé par couplage de l'*o*-fluoronitrobenzène avec le 4,5-diéthoxycarbonylimidazole en présence du K_2CO_3 dans du DMF. La cyclisation réductrice du composé **3.26** conduit à la synthèse du composé **3.27** (schéma 9) [209].

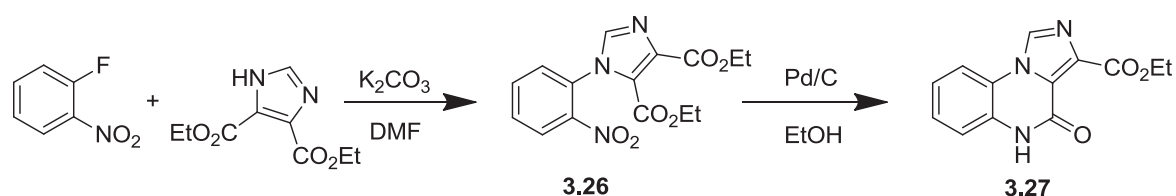
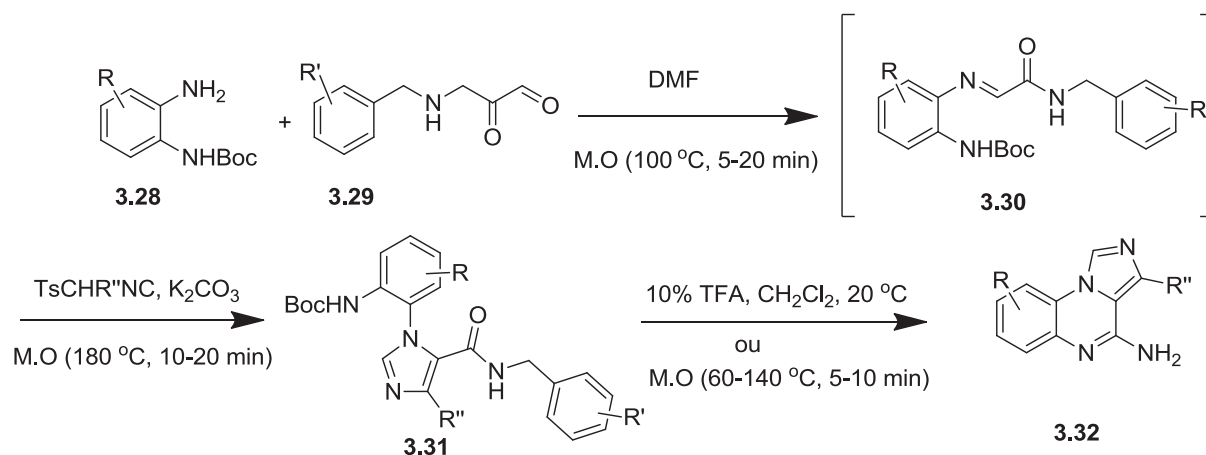


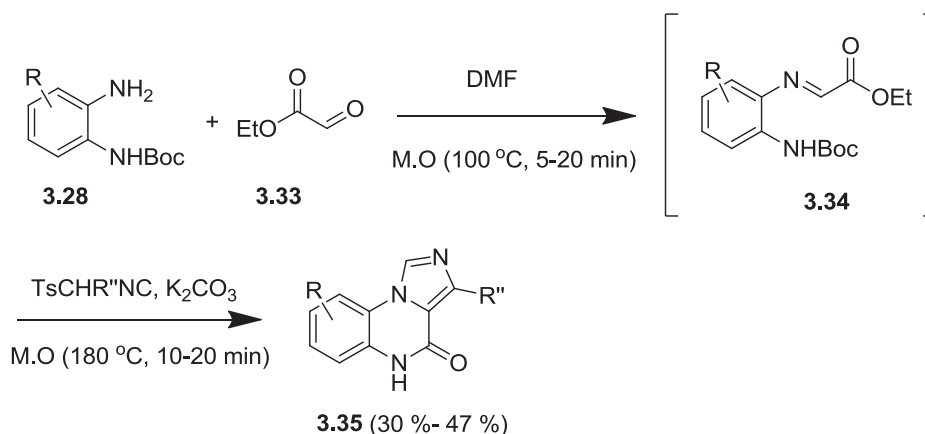
Schéma 9 : Cyclisation réductrice

Une méthode très pratique pour la synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines a été développée par De Moliner et *coll.*[220]. Cette méthode implique une réaction multicomposants (cyclisation de Van

Leusen) du *N*-Boc-*o*-phénylènediamines **3.28** avec les dérivés de l'acide glyoxylique, comme le benzylglyoxylamide **3.29**, et avec la participation de tosylméthylisocyanures (TsCHR''NC). La réaction se fait sous irradiations micro-ondes. La condensation de l'aldéhyde sur le groupe amine libre du composé **3.28** conduit à l'imine **3.30**, qui va être cyclisé pour donner l'imidazole **3.31**. La déprotection de ce dernier conduit à une autre cyclisation qui se produit spontanément avec la formation de l'hétérocycle **3.32** ou sous irradiation micro-ondes dans des conditions acides (schéma 10).



D'autres réactions sont effectuées en utilisant le glyoxylate d'éthyle **3.33** (schéma 11) ou des phénylglyoxaldéhydes **3.36** (schéma 12) au lieu du benzylglyoxylamide **3.29**. Ces réactions se font en one-pot mais en deux étapes, la cyclisation de l'intermédiaire **3.34** conduit aux imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-ones **3.35**. La synthèse du cycle imidazoquinoxaline par cette méthode est très efficace et elle se produit rapidement. Le schéma 13 montre le mécanisme de la réaction multicomposants de Van Leusen qui conduit à la formation du cycle imidazole : Il s'agit de la formation d'une base de Schiff dans la réaction de l'amine avec l'aldéhyde suivie d'une cyclisation initiée par le tosylméthylisocyanure (TosMIC) [210] [211].



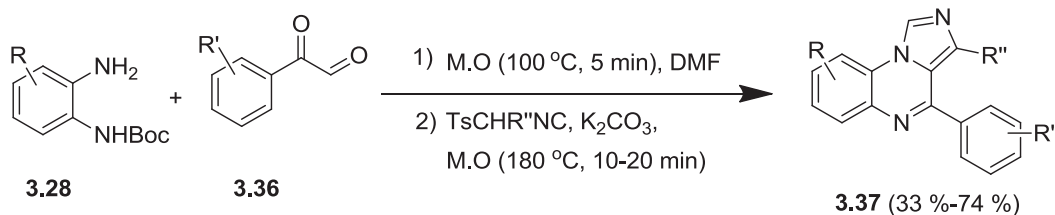


Schéma 12 : Synthèse du cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline en one-pot.

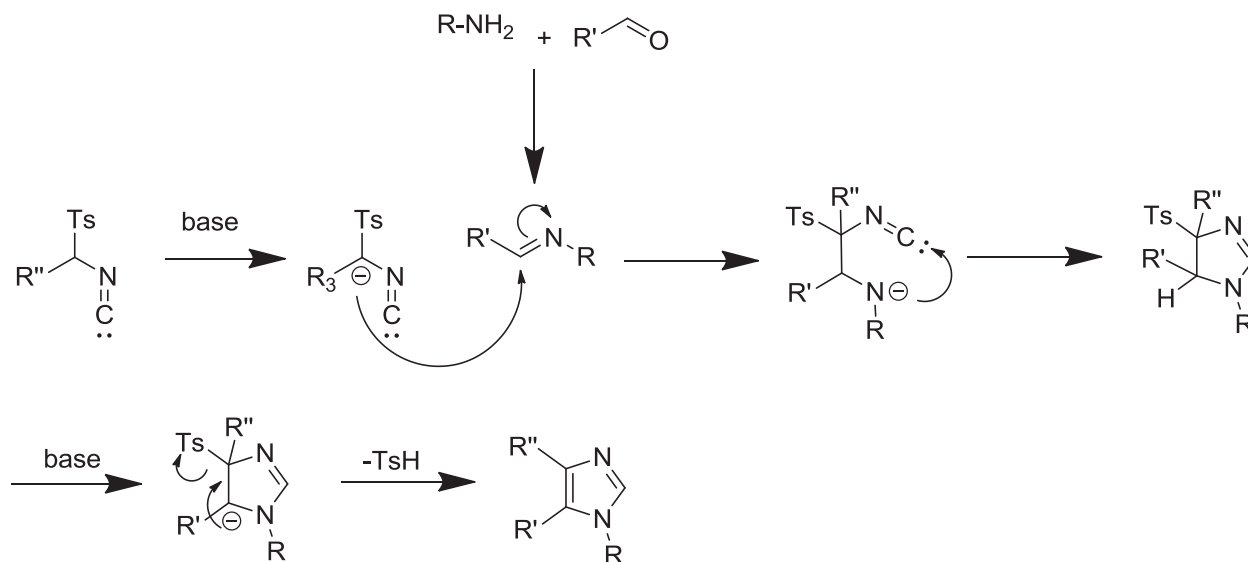


Schéma 13 : Mécanisme général de la réaction multicomposants de Van Leusen.

Deux autres méthodes pour la synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines ont été développées dans notre laboratoire en 2008 [199]. La première débute par le traitement de l'ortho-fluorobenzène avec l'imidazole en présence d'excès du carbonate de potassium pour donner le composé **3.38**. En vue de substituer l'imidazole en position 2, une étape de bromation est nécessaire afin d'introduire par l'intermédiaire du couplage croisé de Suzuki-Miyaura des substituants en position 2 (composé **3.40**). Après réduction du groupement nitro, la structure tricyclique imidazoquinoxalinique **3.42** est obtenue après insertion du carbonyldiimidazole en utilisant le 1,2-dichlorobenzène comme solvant à reflux pendant 4 h (schéma 14).

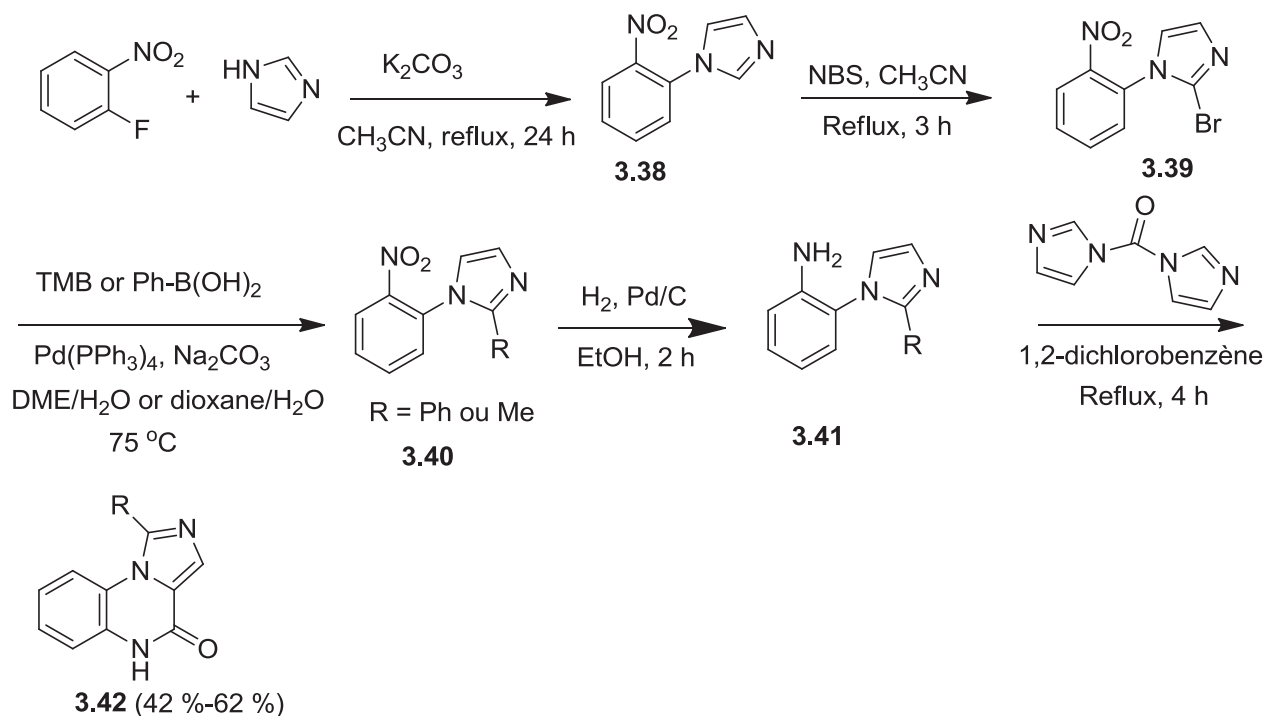


Schéma 14 : Première stratégie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines développée dans notre laboratoire.

La deuxième méthode consiste en une condensation bimoléculaire de l'acide imidazocarboxylique en présence de chlorure de thionyle pour donner le composé **3.43**. Celui-ci est couplé avec l'ortho-fluoroaniline pour donner l'intermédiaire **3.44** en présence du bis(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS). La formation du composé tricyclique **3.45** se fait par une substitution nucléophile intramoléculaire du fluor du composé **3.44** par le NH de l'imidazole en présence d'hydruure de sodium (NaH) et de diméthylacétamide (DMA) comme solvant (schéma 15).

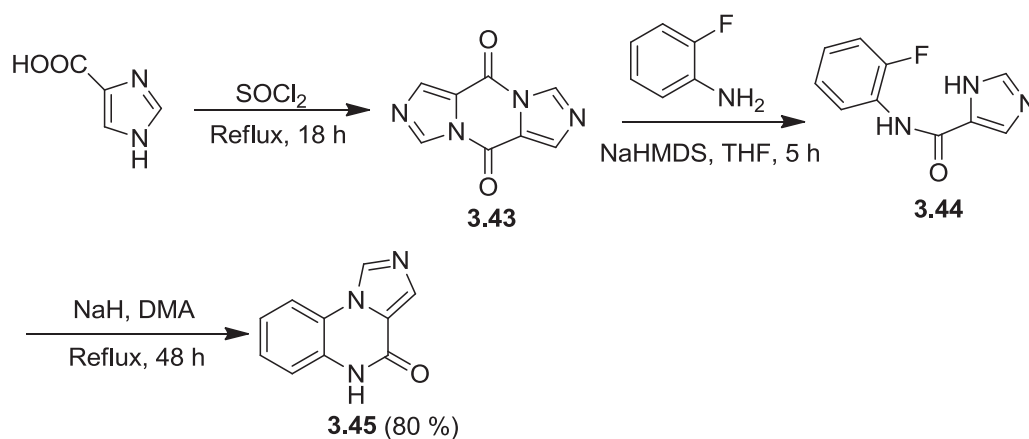


Schéma 15 : Deuxième stratégie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines développée dans notre laboratoire

En 2007, Spatz et *coll.* ont synthétisé des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines substitués en position N(5) par un groupement aminocarbonylméthyle (schéma 16A). Le composé **3.47** est obtenu aussi par substitution nucléophile intramoléculaire du fluor du composé **3.46** par le NH de l'imidazole en présence du carbonate de potassium (K_2CO_3) et du diméthylformamide (DMF) comme solvant, sous

irradiation micro-ondes à 150 °C pour 20 min. Le composé **3.46** est synthétisé par l'intermédiaire de la réaction multicomposants d'Ugi (schéma 16B) [212].

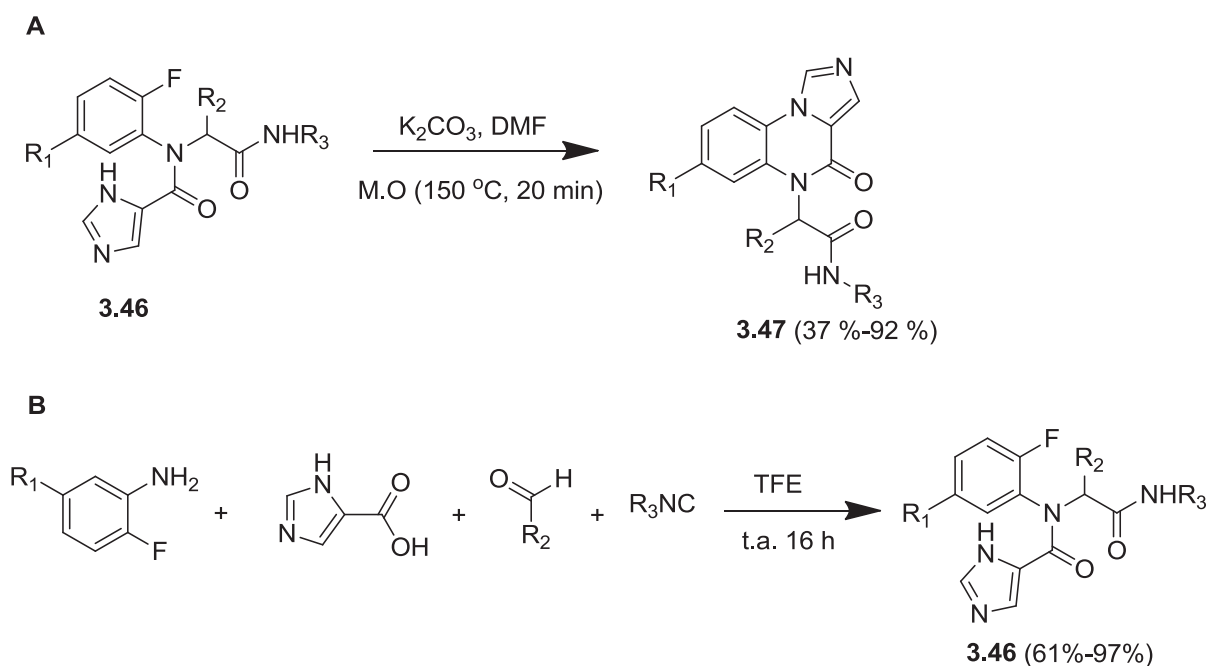


Schéma 16 : Construction du cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-one en utilisant la réaction multicomposant d'Ugi

En 2013, Verma et *coll.* ont développé une méthode efficace pour la synthèse sélective de la forme réduite **3.49** et oxydée **3.50** des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines via la réaction modifiée de Pictet-Spengler de la 2-imidazolylaniline **3.48** avec des arylaldéhydes en présence du benzotriazole (BtH) comme activateur (schéma 17A) [213]. La réaction se déroule dans des conditions douces et donne les produits avec des rendements élevés. La réaction a lieu quand le cycle imidazole contient des substituants donneurs d'électrons en positions 2 et 4. La présence de ces groupements va faciliter la substitution aromatique électrophile de la position 5 de l'imidazole. La forme réduite de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxalines **3.49** est obtenue après deux heures de réaction, par contre la forme oxydée **3.50** est obtenue en laissant les réactifs réagir pendant 12 h. Le composé **3.48** est obtenu par couplage de l'imidazole avec l'*o*-fluoronitrobenzène suivi d'une réduction de groupement nitro (schéma 17B). Le mécanisme suggéré pour cette réaction implique la formation d'un intermédiaire transitoire **X** en présence du *p*-TsOH et du benzotriazole, qui forme l'ion iminium **Y** par l'élimination facile du benzotriazole. L'intermédiaire **Y** subit une cyclisation intramoléculaire et génère un carbocation **Z** qui s'aromatise pour fournir la dihydroimidazoquinoxaline **3.49**. Cette dernière est auto-oxydée en présence d'air après 8-10 h et fournit la forme oxydée des imidazoquinoxalines **3.50** (schéma 17C).

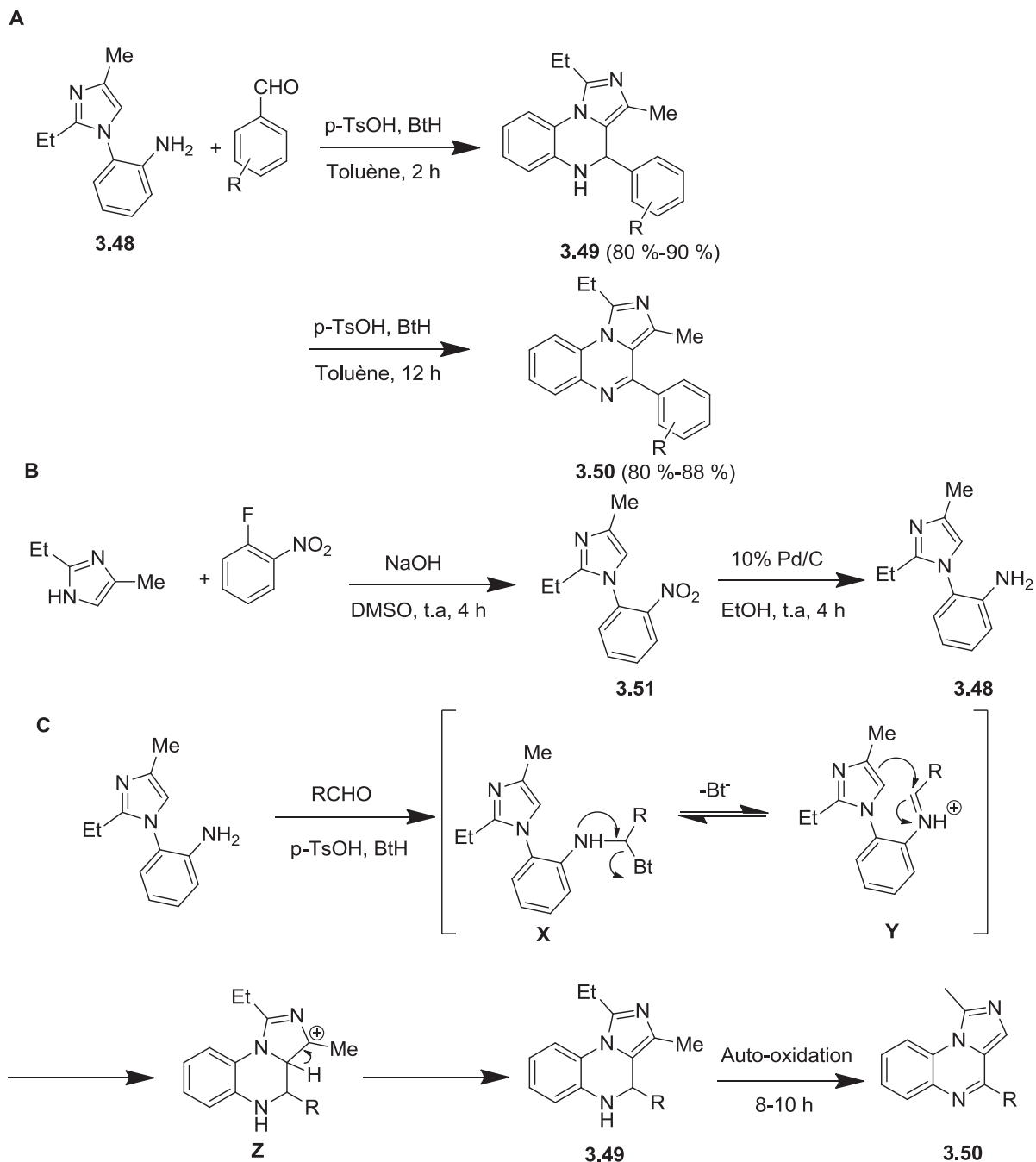


Schéma 17 : La synthèse sélective de la forme réduite et oxydée des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines via la réaction modifiée de Pictet-Spengler

Plus récemment, Zhang et *coll.* ont synthétisé des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines par l'intermédiaire du couplage croisé déhydrogénéatif catalysé par l'iode (I_2) en utilisant le DMSO comme solvant et oxydant en one-pot [214]. Les deux substrats de cette réaction sont le 2-(1H-imidazol-1-yl)aniline **3.52** et la cétone **3.53**. Le schéma 18 montre le mécanisme de cette réaction : la réaction de la cétone **3.53** avec I_2 donne l' α -iodocétone **3.53'** et l'acide iodhydrique HI. Ensuite, l'oxydation de l' α -iodocétone **3.53'** avec du DMSO donne le phénylglyoxal **3.53''**, libérant ainsi les produits secondaires comme l'iodure d'hydrogène HI et le diméthylsulfure. Ensuite, la cyclisation catalysée par I_2 du phénylglyoxal **3.53''** avec le composé **3.52** donne le composé désiré **3.54**. Enfin, l'oxydation du produit secondaire

HI avec du DMSO donne l'I₂, libérant ainsi l'H₂O et le diméthylsulfure en complétant ainsi le cycle catalytique (schéma 18).

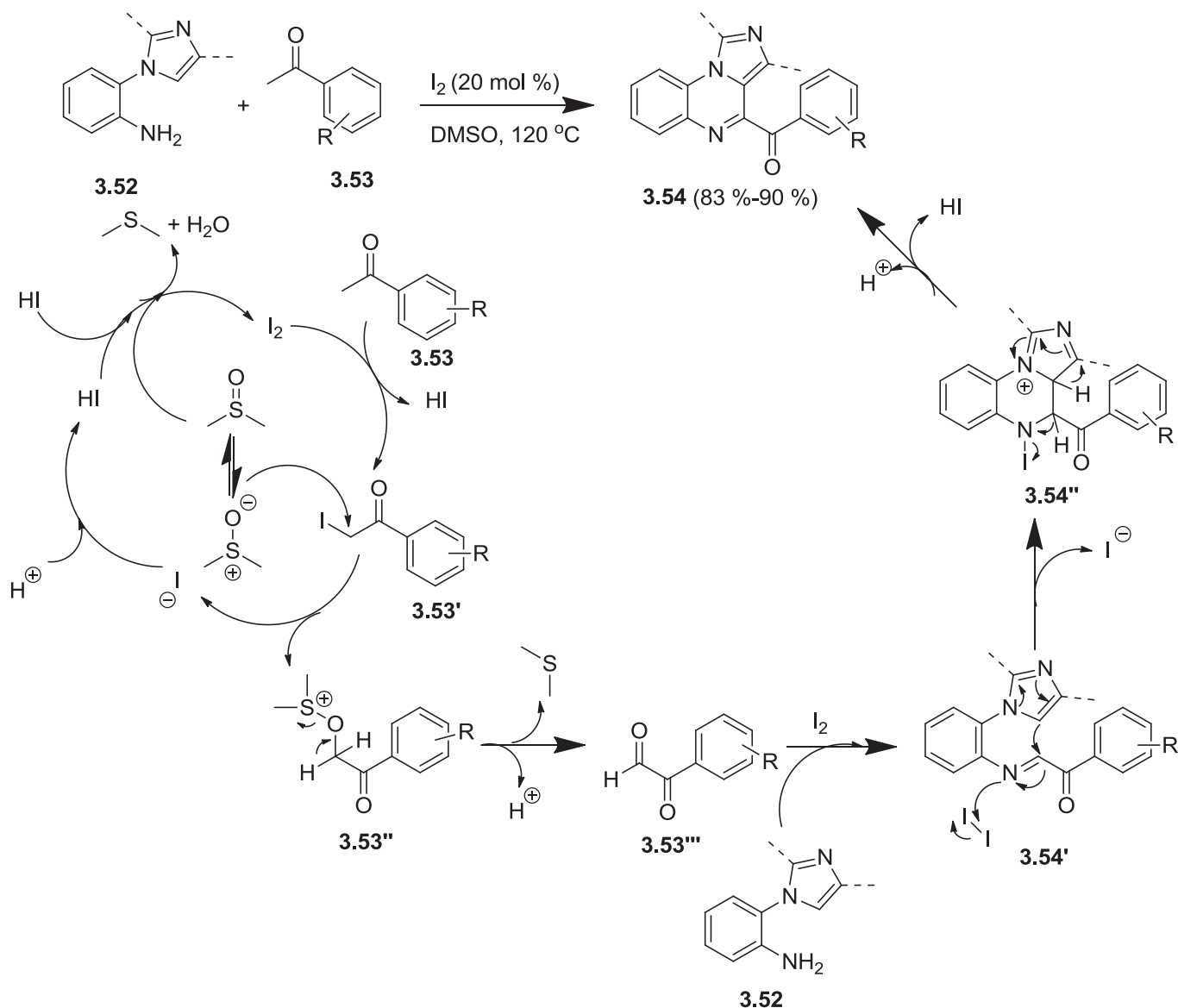


Schéma 18 : Synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines par l'intermédiaire du couplage croisé déhydrogénatif catalysé par l'iode (I₂)

En 2017, la même équipe a développé une nouvelle méthode pour la synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines en utilisant le DMSO comme réactif et solvant en même temps [215]. En faisant réagir la 2-(1H-imidazol-1-yl)aniline **3.52** avec le DMSO en présence d'acide acétique à 130°C, des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines **3.55** sont obtenues avec de bons rendements (schéma 19).

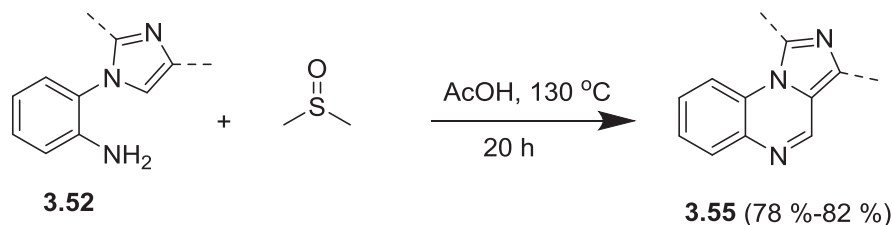


Schéma 19 : Synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines en utilisant le DMSO.

2. Synthèse des composés de type imidazo[1,2-*a*]quinoxaline

Comme dans le cas des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, il existe plusieurs stratégies de synthèse pour la construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, soit à partir du cycle quinoxaline soit à partir de l'imidazole.

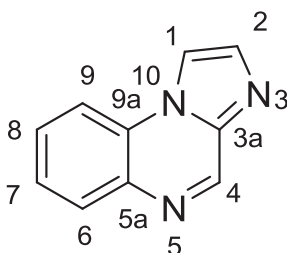


Figure 42 : Structure générale des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines

2.1 Synthèse à partir du cycle quinoxaline

Une grande variété de composés de type imidazo[1,2-*a*]quinoxaline a été synthétisée au sein de notre équipe. Cette série a montré des activités anti-cancéreuses et anti-inflammatoires très intéressantes [198] [199] [200]. Notre laboratoire a utilisé deux stratégies de synthèse pour la construction du cycle imidazoquinoxaline à partir du cycle quinoxaline : en 2001, Parra et *coll.* ont utilisé la 2,3-dichloroquinoxaline **3.56** comme produit de départ pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines substituées en position 4 (schéma 20A) [197]. La synthèse débute par substitution nucléophile du chlore par l'ammoniaque pour obtenir le composé **3.57**. La condensation de ce dernier avec l' α -halogéno carbonyle donne la 4-chloroimidazoquinoxaline **3.58**. Suite à une substitution nucléophile du chlore avec des alkylamines (RNH₂), des imidazoquinoxalines aminées ont été obtenues. La substitution du chlore par une alkylamine peut se faire aussi au niveau de la première étape (schéma 20B), le composé **3.60** obtenu réagit avec le bromopyruvate d'éthyle afin de donner l'imidazoquinoxaline **3.61**. Une autre stratégie de synthèse a été adoptée par notre équipe et qui consiste en une condensation du composé **3.56** avec un aminoalcool (1-aminopropan-2-ol) suivi d'une oxydation de l'hydroxyle du composé **3.62** en utilisant le triméthylamine trioxyde de sulfure Me₃NSO₃ comme oxydant. Le composé **3.63** subit une cyclisation intramoléculaire en présence de l'anhydride trifluoroacétique et de l'acide trifluoroacétique en vue d'obtenir le composé tricyclique **3.64** (schéma 20C) [197] [198].

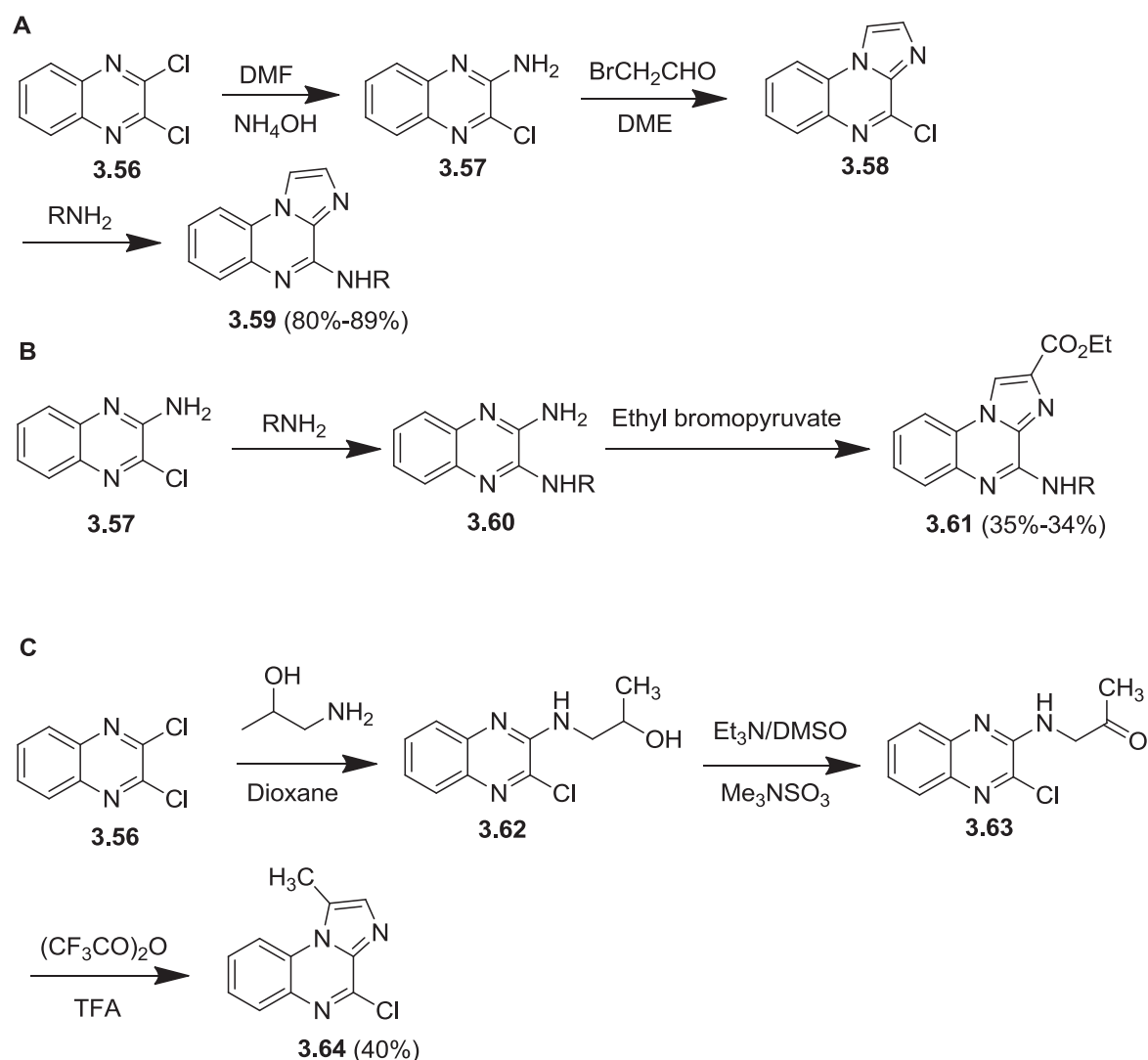


Schéma 20 : Construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline.

En 2004, Liu et *coll.* ont utilisé la même stratégie de synthèse mentionnée ci-dessus pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines. La cyclisation intramoléculaire du composé **3.65** en présence de l'anhydride trifluoroacétique et de l'acide trifluoroacétique conduit au composé **3.66**. Ce dernier donne des imidazoquinoxalines aminés **3.67** en présence d'hexaméthylsilazane (HMDS) (schéma 21) [216].

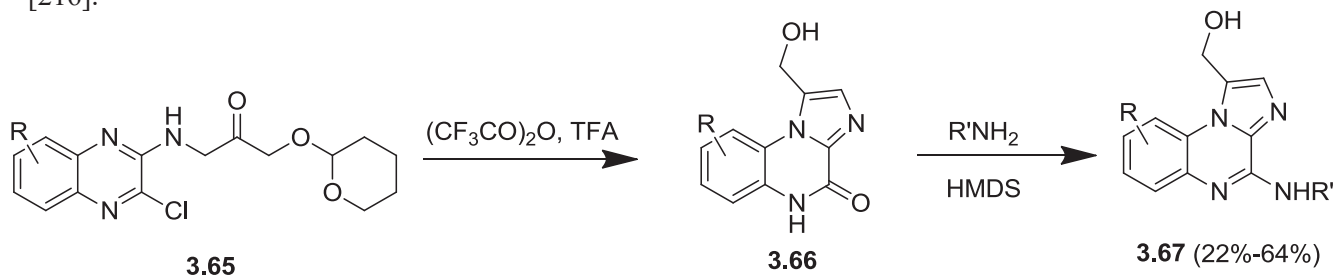


Schéma 21 : Synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine.

En 2012, Bakherad et *coll.* ont utilisé le couplage croisé de Sonogashira en vue de synthétiser des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines substituées en position 1 et 4 [217]. La réaction du composé **3.68** avec les halogénures d'aryle (ArX) et le carbonate de potassium (K₂CO₃) dans l'eau en présence du chlorure de palladium (PdCl₂), de triphénylphosphine (PPh₃) et d'iodure de cuivre (CuI) à 70°C, conduit à la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines **3.69** (schéma 22A). Le composé **3.68** est synthétisé par le traitement de la 2,3-dichloroquinoxaline **3.56** avec la propargylamine dans le dioxane à reflux (schéma 22B). Le mécanisme de cette réaction suggéré par les auteurs se fait en deux étapes ; la première étape est le couplage croisé de Sonogashira suivi par une cyclisation intramoléculaire, catalysée par le palladium, de l'azote nucléophile sur la triple liaison, et finalement une aromatisation induite par la base se produit pour donner le produit désiré **3.69** (schéma 22C).

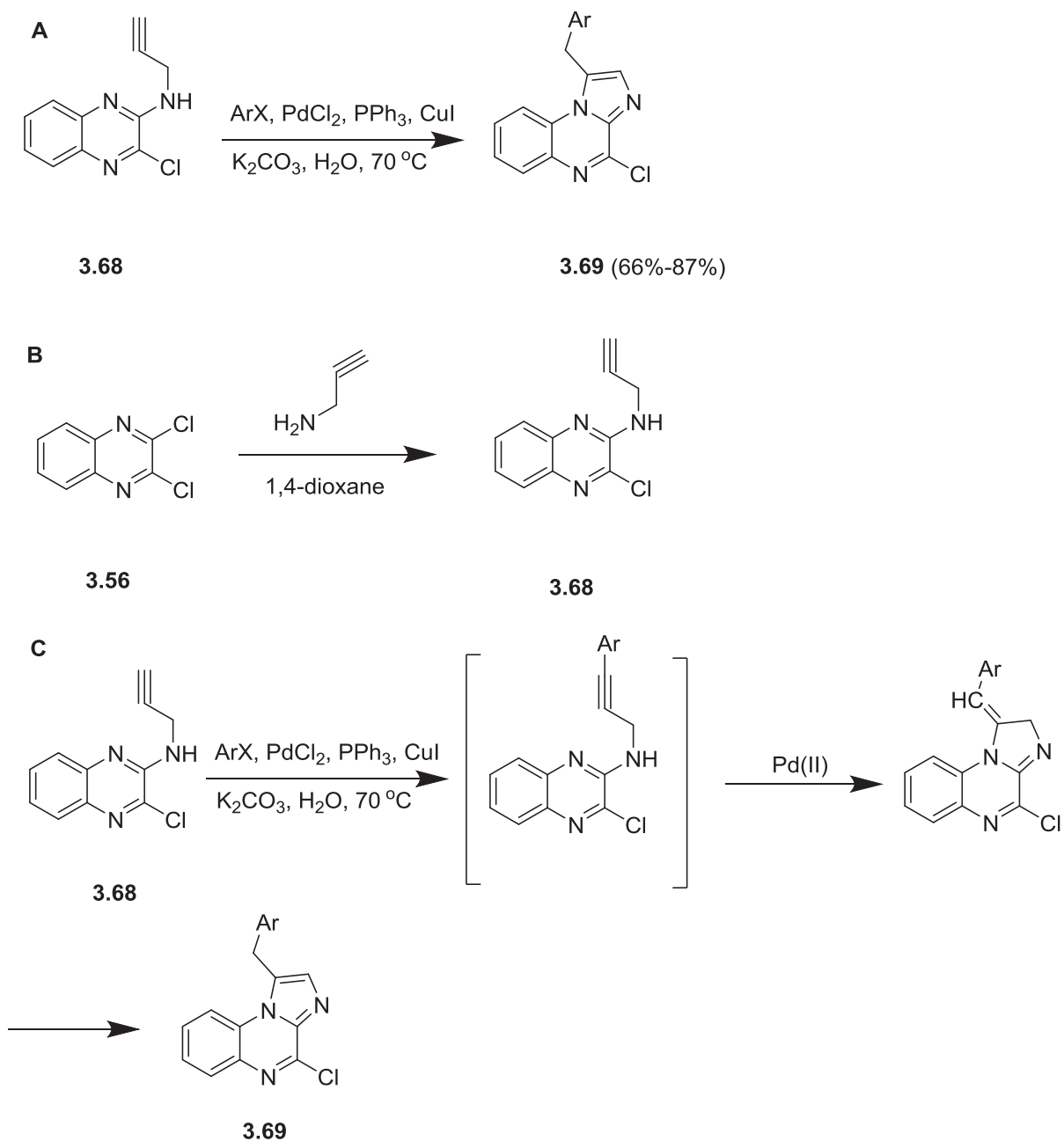


Schéma 22 : Construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline en utilisant le couplage croisé de Sonogashira.

En 2008, Krasavin et *coll.* ont décrit une nouvelle procédure pour la synthèse du cycle quinoxaline via la réaction multicomposants (réaction de Groebke-Blackburn) impliquant des 1,2-diamines aromatiques, des aldéhydes et des isocyanures. La réaction de ces substrats a conduit à des 1,4-dihydroquinoxalines instables **3.70** (schéma 23). Ces derniers ont été rapidement oxydés avec du DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) en quinoxalines stables **3.71** (schéma 23). Cette méthode en deux étapes représente une nouvelle méthode pour la synthèse des quinoxalines substituées [218].

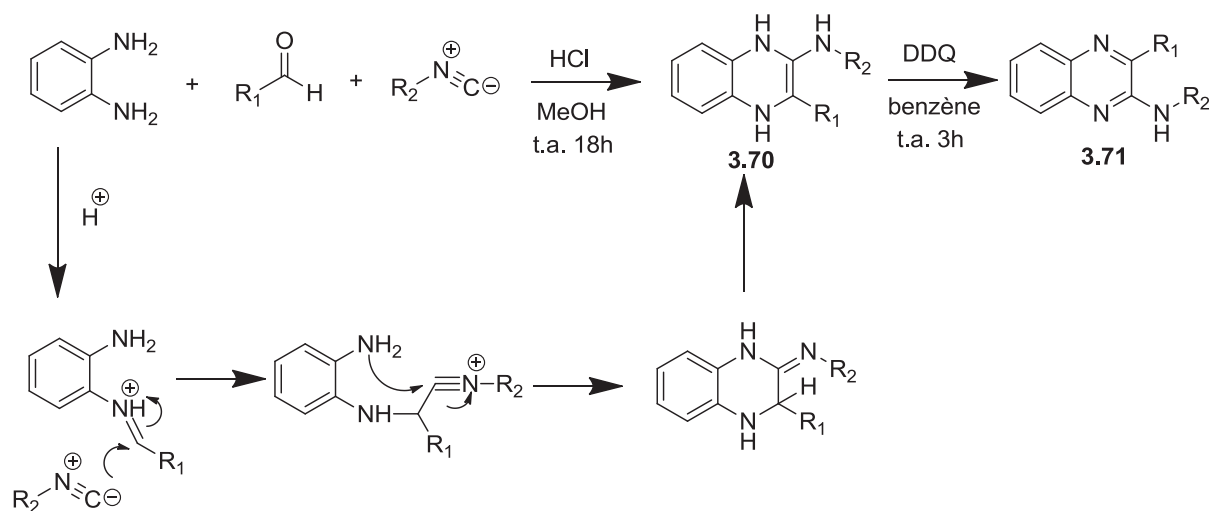


Schéma 23 : Synthèse du cycle quinoxaline via la réaction multicomposants de Groebke-Blackburn.

La même équipe a utilisé cette méthode pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines via deux réactions multicomposants séquentielles [219]. Ils ont utilisé un isocyanure tel que le 1,1,3,4-tétraméthylbutylisocyanure (reactif de Walborsky), pour construire les quinoxalines **3.71** avec la même méthode citée ci-dessus. Le groupement convertible peut être éliminé et alors les 2-aminoquinoxalines résultantes **3.72** ont pu servir comme substrats pour une deuxième réaction de Groebke-Blackburn (schéma 24). Cette dernière conduit à la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines substituées **3.73** avec de bons rendements (schéma 24). En 2016, Chen et *coll.* ont utilisé la même méthode pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines en vue d'étudier leurs effets inhibiteurs sur les radicaux et l'oxydation de l'ADN [220].

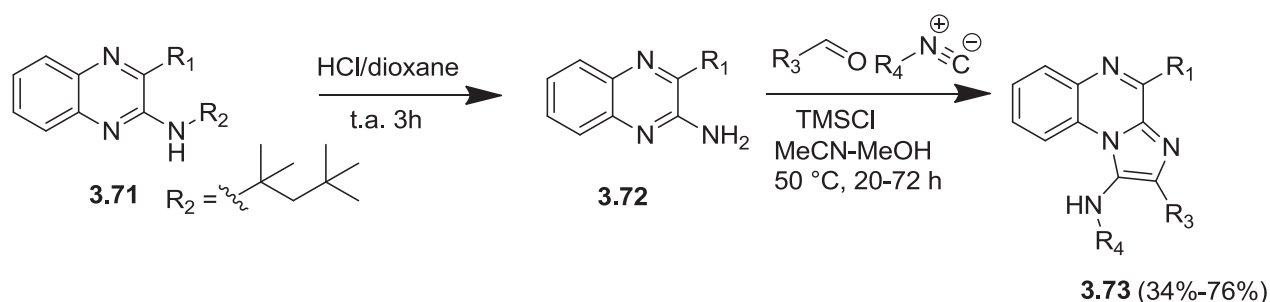


Schéma 24 : Synthèse du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline via deux réactions multicomposants séquentielles

2.2 Synthèse à partir du cycle imidazole

Une des méthodes les plus utilisées pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, à partir du cycle imidazole, est la formation de la liaison C(3a)-C(4). Par exemple, le composé **3.75**, obtenu par réaction du composé **3.74** avec le chlorure d'acétyle, réagit avec l'oxychlorure de phosphore (POCl₃) pour donner des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines **3.76** substitués en position 4 par l'intermédiaire de la cyclisation du Bischler-Napieralski (schéma 25) [231].

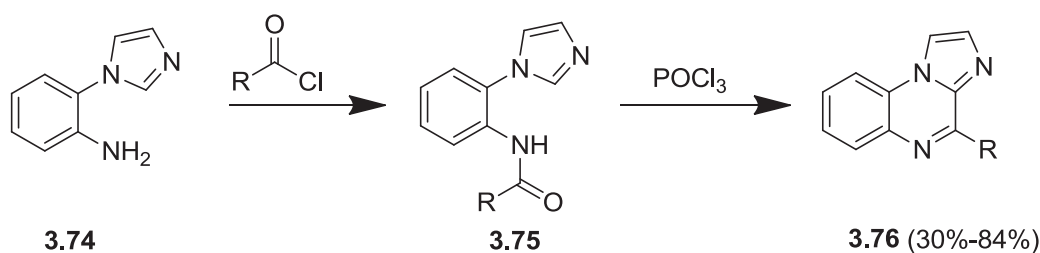


Schéma 25 : Synthèse du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline via la formation de la liaison C(3a)-C(4).

Une autre méthode pour la synthèse de cette série est la formation d'une liaison C(4)-N(5) : la réduction de 1-(2-nitrophenyl)-2-formylimidazoles **3.77** par l'hydrosulfite de sodium (NaHSO₃) dans une solution aqueuse d'ammoniaque, conduit aux produits désirés de type imidazo[1,2-*a*]quinoxaline **3.78**. Ces derniers sont obtenus par cyclisation intramoléculaire des dérivés aminés obtenus suite à la réduction du groupement nitro (schéma 26A). En 2013, Li et *coll.* ont utilisé la même méthode pour la construction du cycle imidazoquinoxaline, mais ils ont utilisé le fer comme agent de réduction du groupement nitro dans une solution aqueuse d'éthanol et d'acide acétique pendant 4 h (schéma 26B) [221] [222].

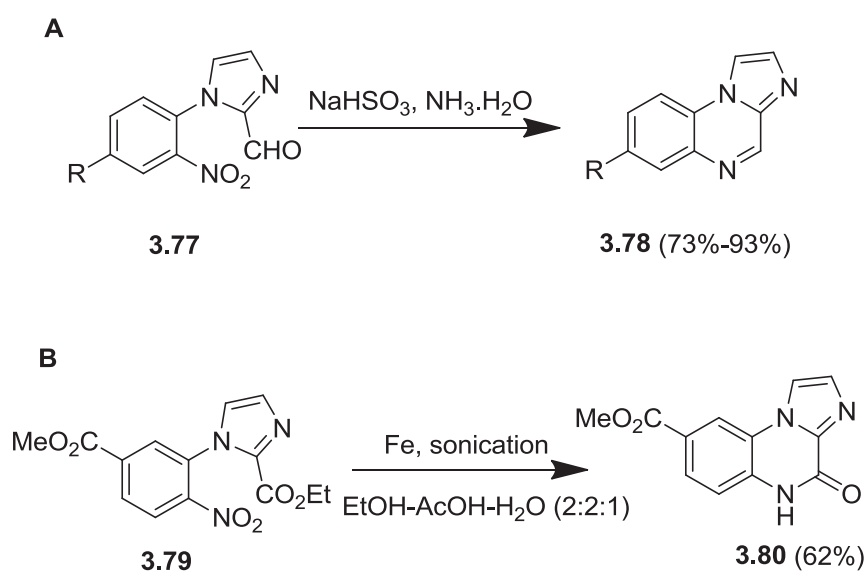


Schéma 26 : Synthèse du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline via la formation de la liaison C(3a)-C(4).

La présence d'un groupement éthoxycarbonylvinyle en position 2 du cycle imidazole, proche du groupement nitro, facilite la cyclisation intramoléculaire. Cette dernière se fait par l'addition nucléophile de Michael de la fonction amine, générée par la réduction du groupe nitro. Cette réaction conduit à l'annulation du cycle pyrazine pour donner le tricycle **3.84**. L'élimination de l'acétate d'éthyle du cation **3.85** contribue à la formation de l'imidazo[1,2-*a*]quinoxaline non substituée **3.86** (schéma 27A). Le composé **3.81** est obtenu par la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons en utilisant le phosphonoacétate de triéthyle en présence du NaH (schéma 27B) [223].

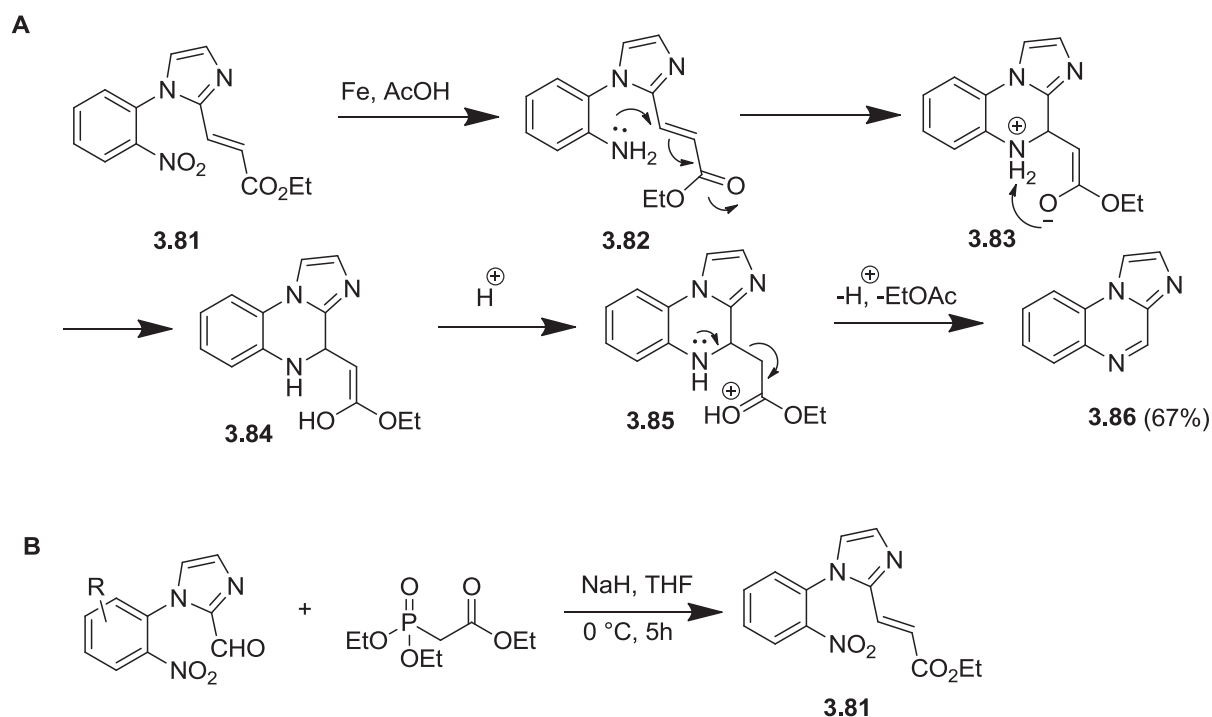


Schéma 27 : Construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline par cyclisation intramoléculaire.

Comme dans le cas des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, la construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxalines peut se faire également par réaction du composé **3.74** avec le carbonyldiimidazole (CDI) dans le 1,2-dichlorobenzène (DCB), à condition que la position 2 de l'imidazole ne soit pas substituée (schéma 28) [224].

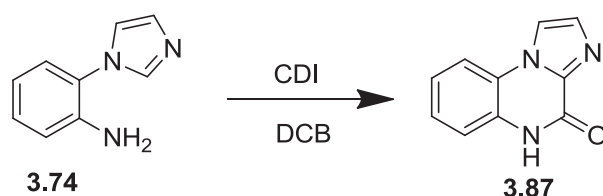


Schéma 28 : Construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline en utilisant le CDI.

En 2010, Reeves et *coll.* ont utilisé la réaction d'Ullman pour synthétiser des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines. La condensation de l'*o*-iodoaniline avec le 2-formylimidazole en présence d'iodure de cuivre (I) comme catalyseur conduit à la construction du cycle imidazo[1,2-*a*]quinoxaline **3.88**

(schéma 29). Cette même méthode a été utilisée récemment par Li et *coll.* afin d'augmenter la diversité structurale des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines [225].

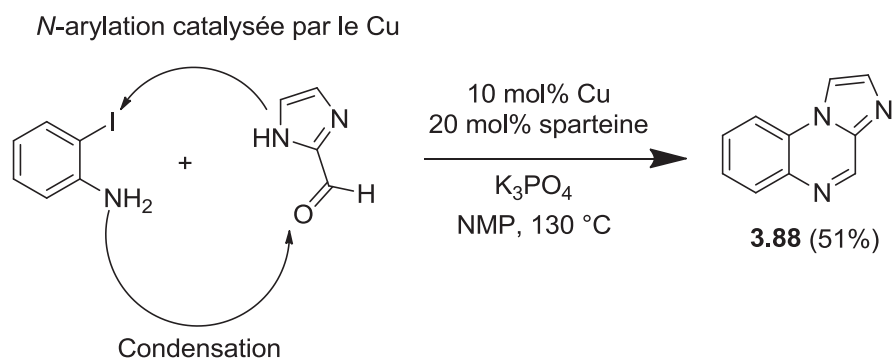


Schéma 29 : Synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines par la réaction d'Ullman.

Une autre méthode de synthèse a été développée dans notre laboratoire et qui consiste à synthétiser des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines à partir du cycle imidazole : la condensation bimoléculaire de l'acide imidazocarboxylique en présence de chlorure de thionyle donne le composé **3.89**. Celui-ci est couplé avec l'ortho-fluoroaniline pour donner l'intermédiaire **3.90** en présence du bis(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS). La formation du composé tricyclique **3.91** se fait par une substitution nucléophile intramoléculaire du fluor du composé **3.90** par le NH de l'imidazole en présence d'hydrure de sodium (NaH) et de diméthylacétamide (DMA) comme solvant (schéma 30) [200].

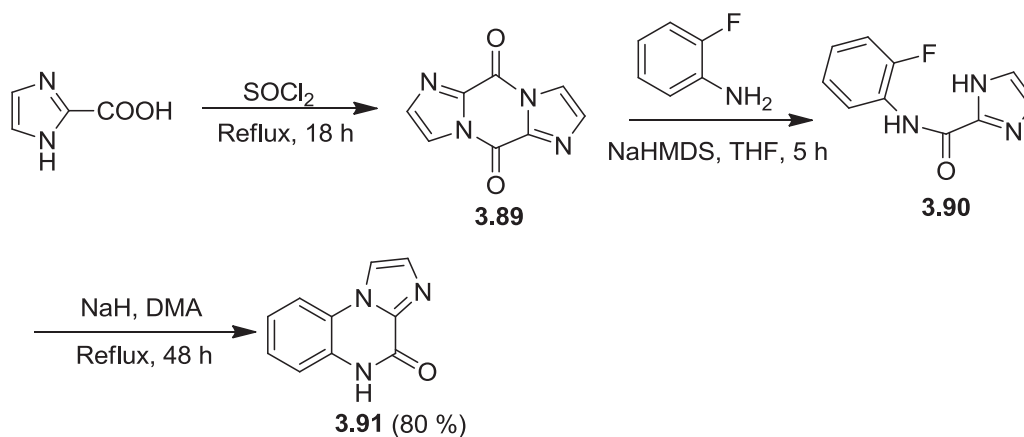


Schéma 30 : Stratégie de synthèse des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines développée au sein de notre laboratoire.

3. Synthèse des composés de type imidazo[1,2-*a*]pyrazine

De nombreux travaux publiés ont rapporté la synthèse et les activités biologiques de la série des imidazo[1,2-*a*]pyrazines. Ces dernières peuvent être synthétisées par condensation de la 2-aminopyrazine avec des composés α -halocarbonyles, ou par des réactions multicomposants de 2-

aminopyrazine, d'aldéhydes et d'isocyanures impliquant la formation d'une imine intermédiaire suivie d'une cyclisation. Ci-dessous, nous avons exposé des exemples concernant chaque type de condensation.

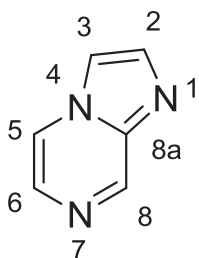


Figure 43 : Structure générale des imidazo[1,2-*a*]pyrazines

3.1 Condensation de la 2-aminopyrazine avec des composés α -halocarbonyles

Cette méthode de synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines est la méthode la plus utilisée dans la littérature. Par exemple, en 2012, Pastor et *coll.* ont rapporté la synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines par la bromation du 2-aminopyrazine **3.92** pour obtenir la 2-amino-3,5-dibromopyrazine **3.93**, suivie de l'introduction de la morpholine pour obtenir une pyrazine substituée **3.94**. Ensuite, le composé **3.94** est condensé avec la 1,3-dichloroacétone et le bromopyruvate d'éthyle pour donner les imidazo[1,2-*a*]pyrazines **3.95** et **3.96** respectivement (schéma 31)[226] [227].

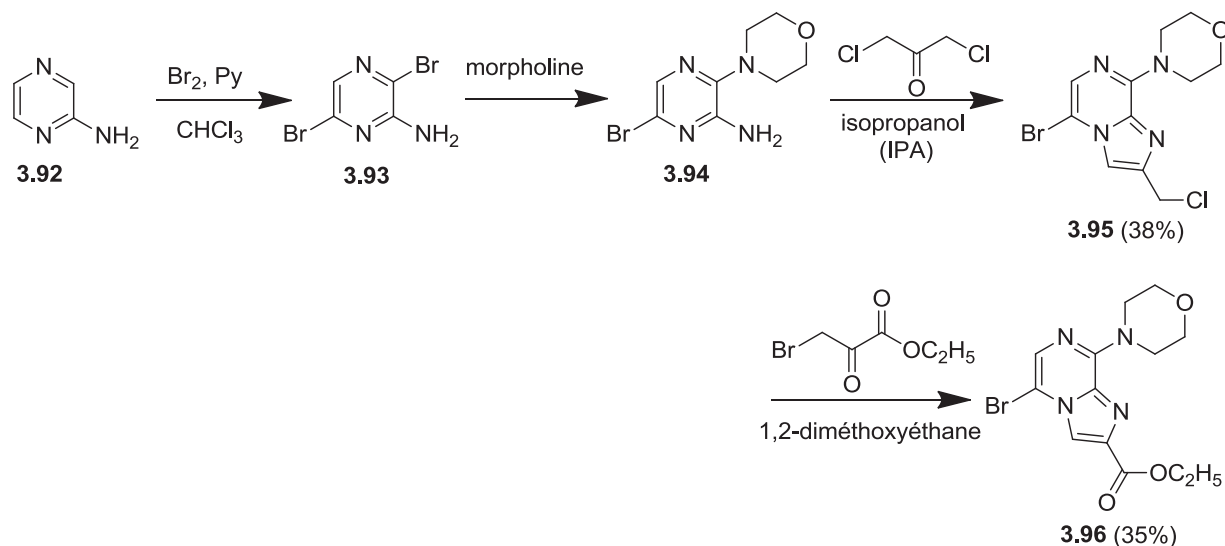


Schéma 31 : Construction du cycle imidazo[1,2-*a*]pyrazine par condensation de la pyrazine avec la 1,3-dichloroacétone et le bromopyruvate d'éthyle.

L'iodation de la 2-amino-3-chloropyrazine **3.97** avec le *N*-iodosuccinimide et l'acide trifluoroacétique a produit le composé **3.98**, qui va réagir avec le bromopyruvate d'éthyle dans l'isopropanol (IPA) pour donner l'imidazo[1,2-*a*]pyrazine désirée **3.99** (schéma 32) [228].

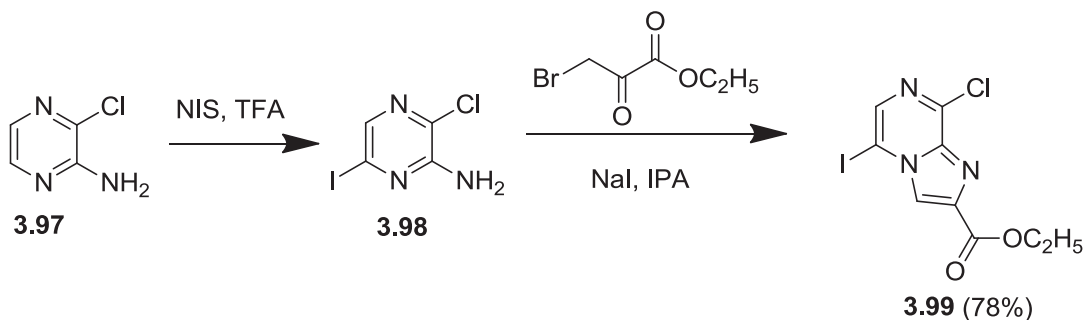


Schéma 32 : Synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines par condensation de la pyrazine avec le bromopyruvate d'éthyle.

Par la suite, la même équipe a utilisé des benzotriazoles substitués pour obtenir une substitution en position 3 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazine. La 3-morpholinyl pyrazine **3.100** (obtenu par couplage croisé de Suzuki-Miyaura du composé **3.94**) et le composé **3.101** (formée par la condensation du glyoxal, du benzotriazole et de l'amine dans l'éthanol) ont été cyclisés en utilisant le dichloroéthane (DCE) en vue de donner le composé **3.102** (schéma 33) [229].

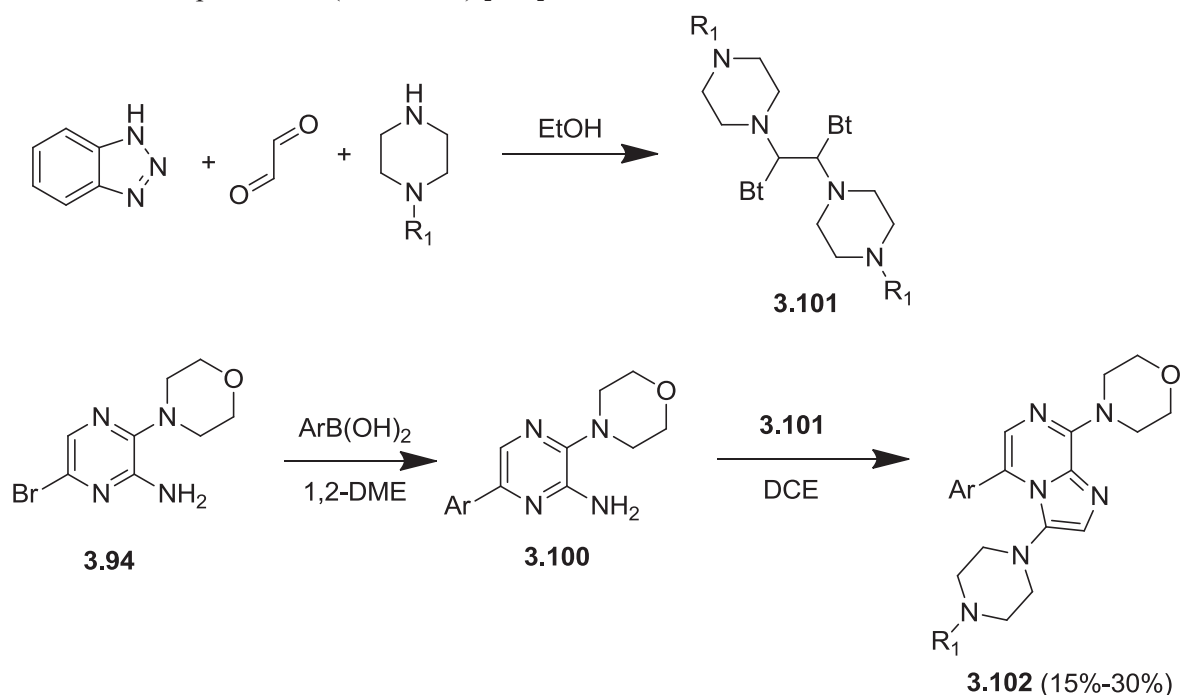


Schéma 33 : Synthèse du cycle imidazo[1,2-*a*]pyrazine substitué.

En 2012, Andrews et *coll.* ont synthétisé la 5,8-dibromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine **3.109** par estérification de l'acide 3-aminopyrazine-2-carboxylique avec le méthanol dans l'acide sulfurique pour obtenir l'ester **3.104**. Ce dernier va subir une bromation en position 6 en utilisant l'acide bromhydrique (HBr) et l'acide acétique pour donner le composé **3.105**. La bromation en position 3 se fait par l'intermédiaire de la réaction de Sandmeyer pour donner le composé **3.106**. Celui-ci est hydrolysé en présence d'hydroxyde de lithium (LiOH) dans du méthanol pour obtenir le composé **3.107**, suivi d'un réarrangement de Curtius pour donner le composé **3.108**. La condensation de ce dernier avec le bromoacétaldehyde donne le produit bicyclique désiré **3.109** (schéma 34) [230].

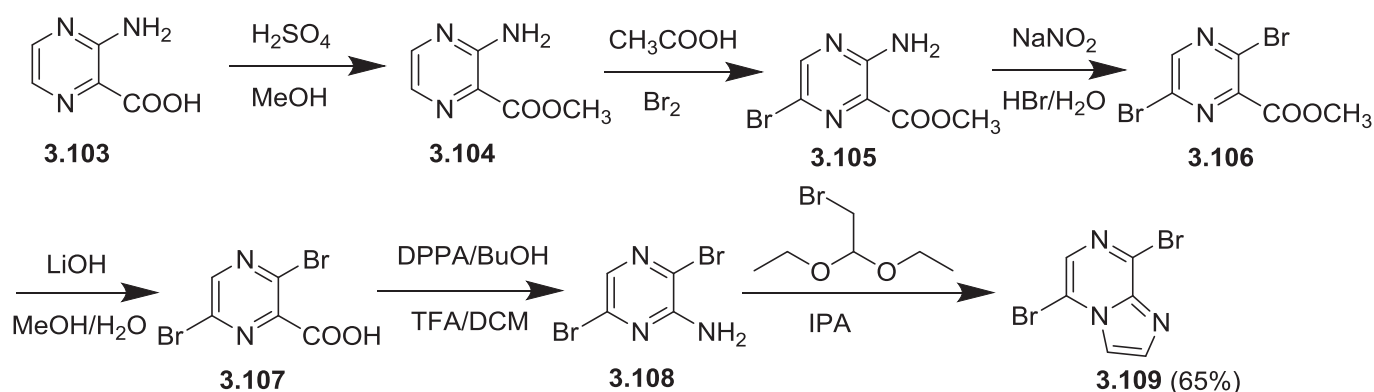


Schéma 34 : Stratégie de synthèse du 5,8-dibromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine.

Le synthèse de la 6,8-dibromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine **3.111** est largement décrite dans la littérature. Elle est synthétisée par cyclisation de la 2-amino-3,5-dibromopyrazine **3.110** avec le bromoacétaldéhyde diéthyl acétal en présence d' HBr dans l'isopropanol ou en présence de chloroacétaldéhyde dans l'isopropanol (schéma 35) [231].

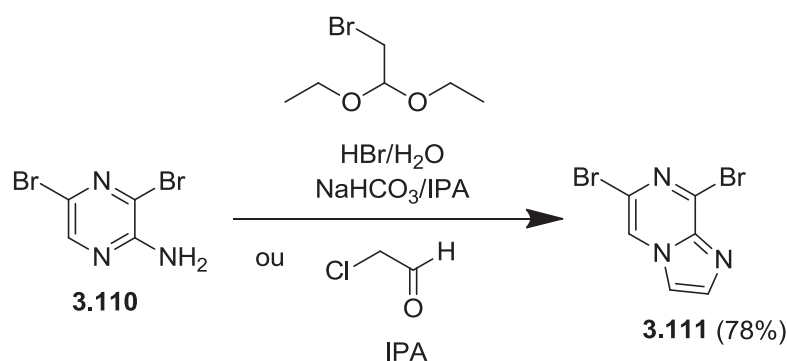


Schéma 35 : Stratégie de synthèse du 5,8-dibromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine.

La même stratégie de synthèse citée ci-dessus a été utilisée par Goodacre et *coll.* pour obtenir la 8-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrazine **3.113** par cyclisation de la 2-amino-3-chloropyrazine **3.112** avec le 2-bromo-1,1-diéthoxyéthane en présence d' HBr dans l'isopropanol avec un rendement de 65%. Par contre, un rendement plus élevé du composé **3.113** est obtenu en utilisant le chloroacétaldéhyde (schéma 36A)[232]. En vue d'obtenir des substituants en position 2, Du et *coll.* ont reporté que la cyclisation du composé **3.112** avec la 1-bromobutan-2-one dans le butanol, conduit à l'obtention de la 8-chloro-2-ethyl imidazo[1,2-*a*]pyrazine **3.113** (schéma 36B) [233]. De plus, Meng et *coll.* ont synthétisé aussi des imidazo[1,2-*a*]pyrazines substituées en position 2 par des groupements aryles : la cyclisation du composé **3.112** avec différentes α -bromométhylphényl cétones dans le diméthoxyéthane (DME) à reflux, conduit aux imidazo[1,2-*a*]pyrazines **3.115** (schéma 36C) [234].

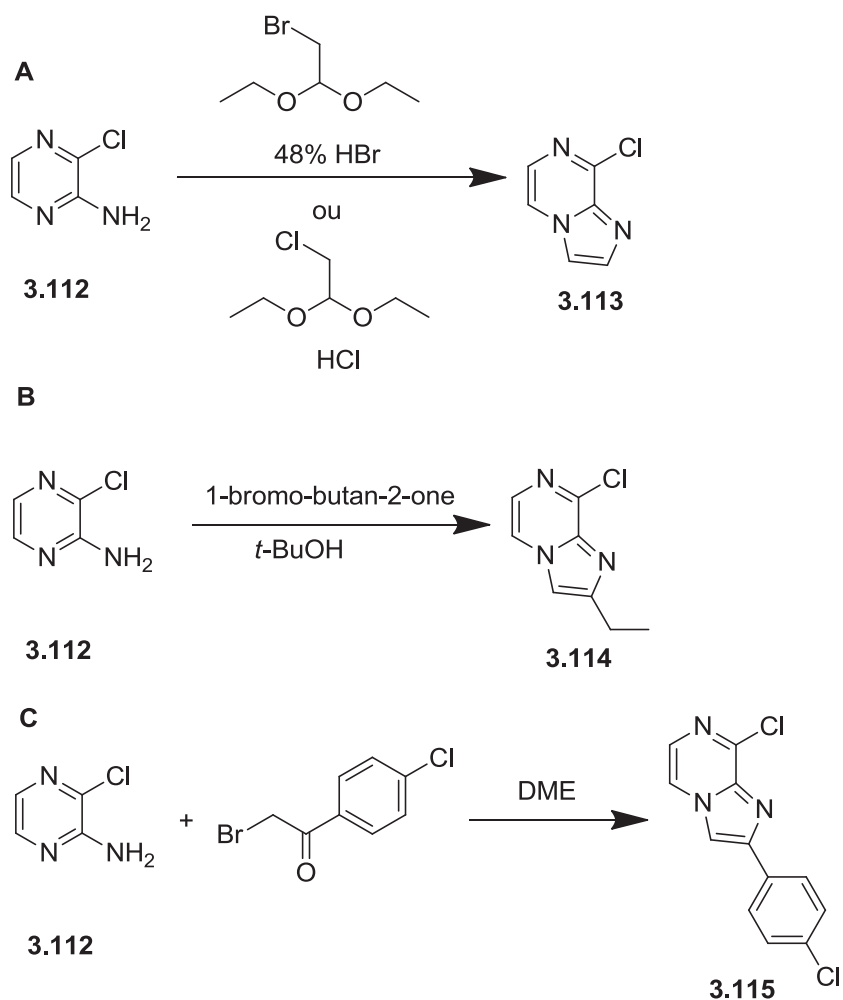


Schéma 36 : Stratégie de synthèse du 5,8-dibromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine.

En 2014, Bartolomé-Nebreda et *coll.* ont synthétisé une grande variété d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines substituées, à partir du composé **3.112**, qui va subir une condensation avec différents composés α -halocarbonyles, comme le bromoacétaldéhyde diéthylacétal, la chloroacétone, la 1-bromo-2-butanone, la 2-bromo-1-cyclopropyléthanone, l'éthylbromopyruvate et la 1-chloro-3,3,3-trifluoroacétone, pour obtenir les composés **3.113**, **3.116**, **3.114**, **3.117**, **3.118** et **3.119** respectivement, avec des rendements de 35% à 100%. Après réaction du composé **3.112** avec la morpholine, une condensation avec l'acide bromoacétique a eu lieu pour donner la 2-méthoxyimidazo[1, 2-*a*]pyrazine **3.121** avec un rendement de 77% (schema 37)[232].

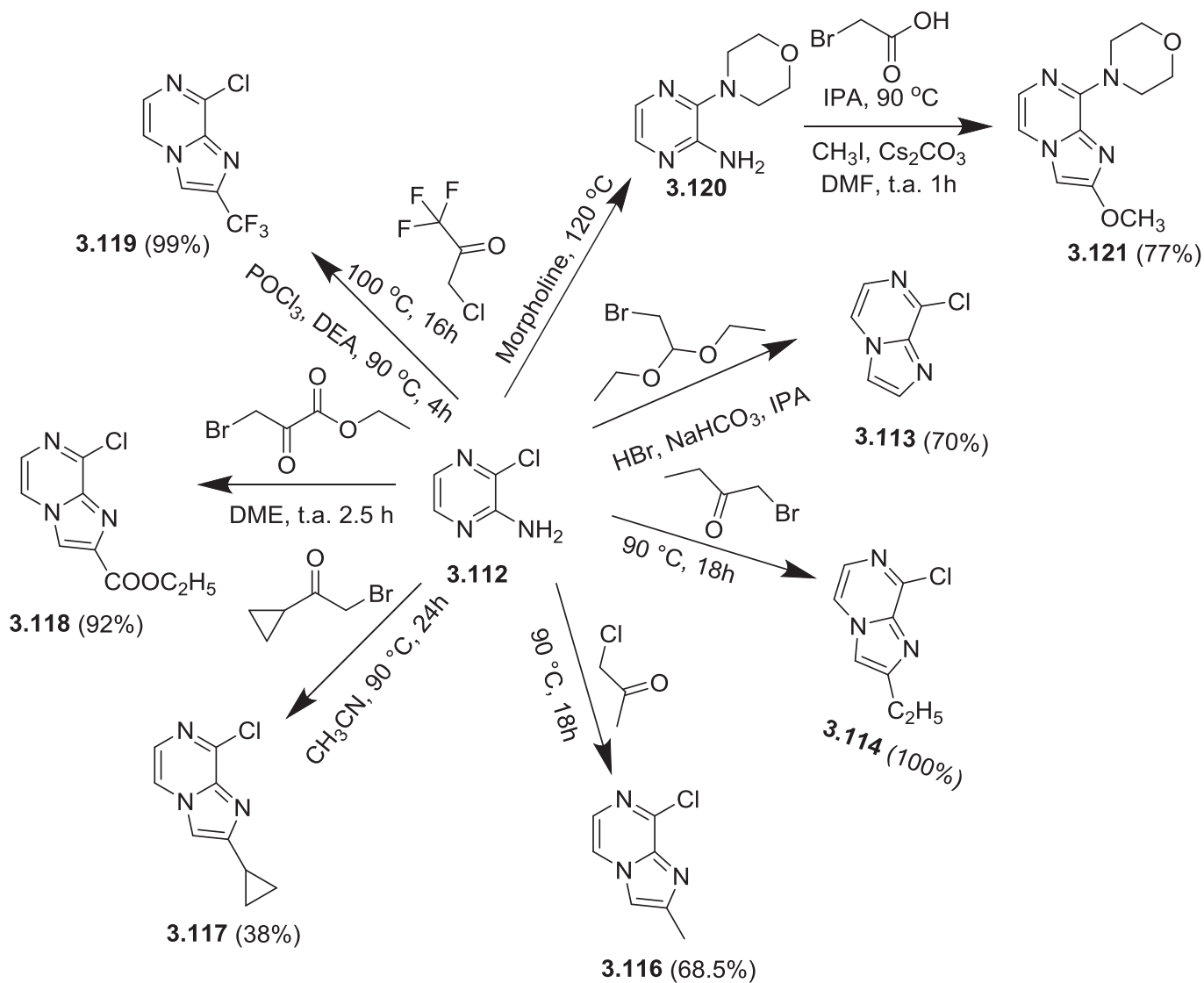


Schéma 37 : Synthèse d'une grande variété des imidazo[1,2-*a*]pyrazines substitués.

3.2 Synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines par réaction multicomposants : Réaction d'Ugi

De nombreux travaux publiés rapportent la synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines par l'intermédiaire de réactions multi-composants. Ces dernières offrent la possibilité d'introduire, en une seule étape, une grande variété de substituants chimiques.

En 2009, Guchhait et *coll.* ont rapporté une nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines en utilisant la réaction multicomposants d'Ugi [235]. La réaction multicomposants du 2-aminopyrazine, avec le *p*-chlorobenzaldéhyde et le *tert*-butylisocyanure catalysée par le chlorure de zirconium(IV) (10 mol%) dans du PEG-400 à 50 °C a donné le composé **3.122** avec un rendement de 90%. Cette méthode a été modifiée en utilisant le chauffage micro-onde et le composé **3.122** est obtenu dans un temps de réaction très court avec un rendement de 94% (schéma 38).

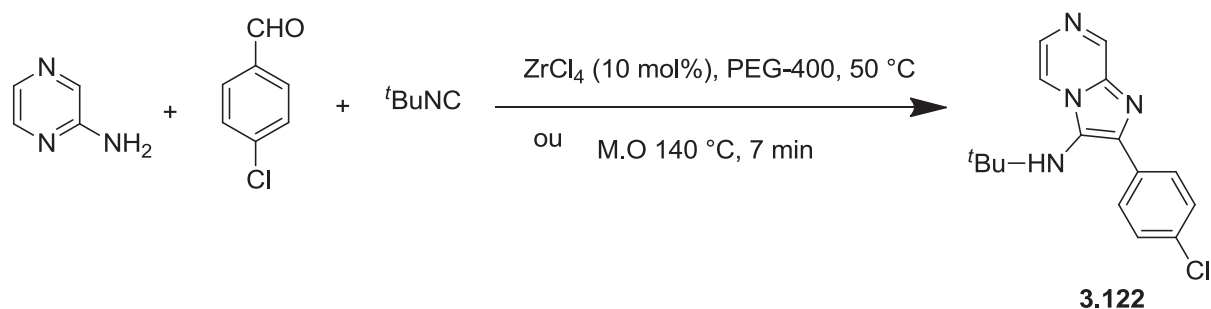


Schéma 38 : Une nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines en utilisant la réaction multicomposants d'Ugi.

En 2010, la même équipe a développé une synthèse assistée par micro-ondes d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines en utilisant les mêmes réactifs ci-dessus dans du *n*-butanol (*n*-BuOH). L'élimination du *tert*-butylisocyanure peut se faire par l'utilisation d'un acide comme l'acide tétrafluoroborique (HBF₄) en vue d'obtenir des imidazo[1,2-*a*]pyrazines avec un groupement amine primaire (NH₂) en position 3 (composé **3.123**, schéma 39) [236].

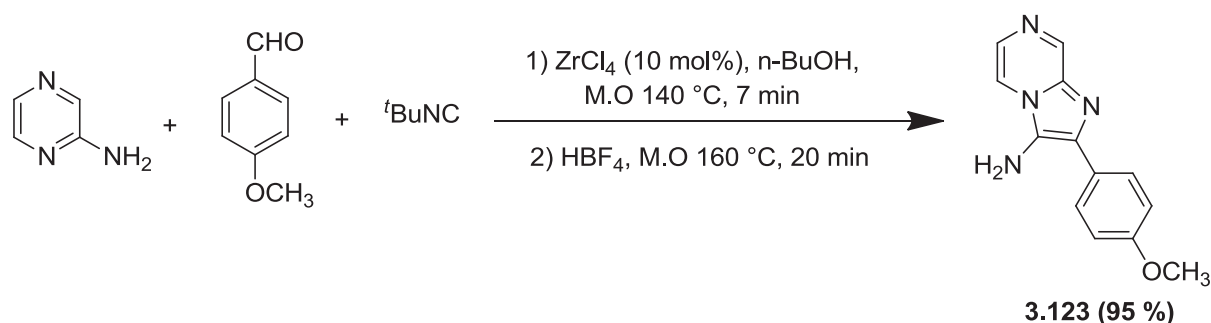


Schéma 39 : Synthèse assistée par micro-ondes d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines.

Vu le succès de la synthèse des 2-aryl-3-amino-imidazo[1,2-*a*]pyrazines en présence de ZrCl₄, diverses imidazo[1,2-*a*]pyrazines **3.124** ont été synthétisées, en faisant réagir la 2-aminopyrazine avec divers aldéhydes et isocyanures en présence de ZrCl₄ (10 mol%) dans du PEG-400 à 50 °C (méthode A) ou à 140 °C en utilisant le chauffage micro-ondes (méthode B) ou en utilisant les conditions décrites dans la méthode C (schéma 40) [237].

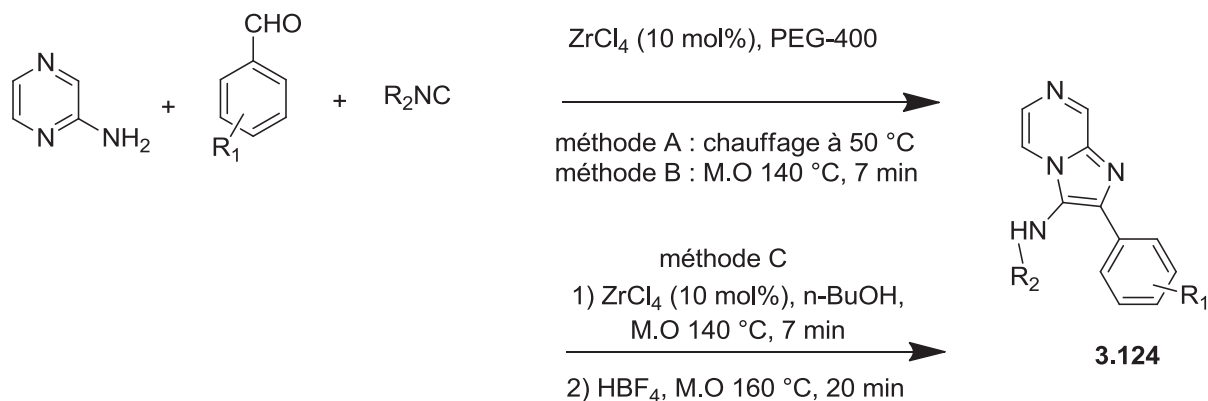


Schéma 40 : Différentes stratégies de synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines substitués sur le cycle d'imidazole.

La réaction multicomposants d'Ugi de la 2-aminopyrazine avec différents aldéhydes dans l'éthanol a permis la formation d'un intermédiaire imine **3.125**, qui va agir ensuite avec le triméthylsilylisocyanure (TMSCN) dans l'eau en présence d'un activateur du TMSCN pour donner le composé **3.126**. Les conditions de réaction ont été optimisées en utilisant différents activateurs de TMSCN, comme le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), le fluorure de potassium (KF) et le triflate de scandium (Sc(OTf)₃). L'utilisation de l'activateur KF dans l'eau a favorisé la formation du produit désiré. L'avantage d'utilisation du TMSCN est l'obtention directe des composés substitués en position 3 avec un groupement NH₂ sans utilisation d'un acide [238].

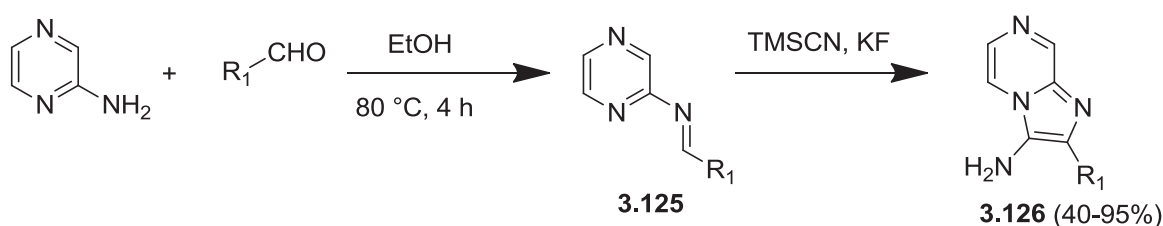


Schéma 41 : Construction du cycle imidazo[1,2-a]pyrazine via la réaction multicomposants d'Ugi.

En 2013, Guchhait et *coll.* ont synthétisé des isocyanures en vue de les utiliser comme substrats pour les réactions multicomposants. La phényléthylamine a subi une formylation en utilisant l'acide formique à 80 °C pour obtenir le formamide **3.127** puis une déshydratation in situ en utilisant du *p*-TsCl et du DABCO permet d'obtenir l'isocyanure **3.128**. La réaction multi-composants de Groebke-Blackburn de **3.128** avec la 2-aminopyrazine et différents aldéhydes a donné des imidazo[1,2-*a*]pyrazines **3.129** disubstituées avec des rendements de 60% à 70% (schéma 42) [239].

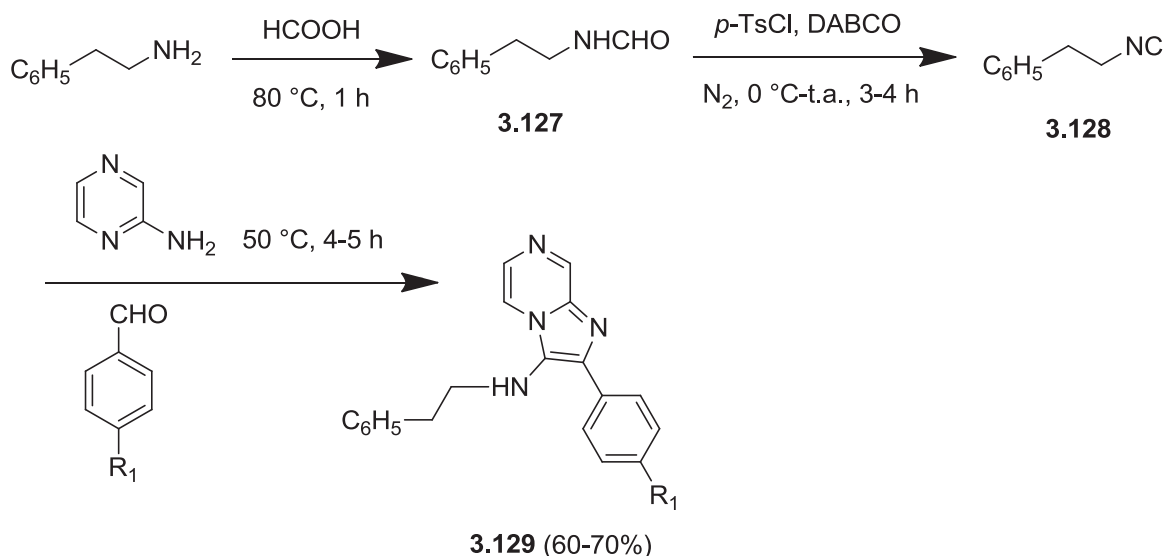


Schéma 42 : Synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines via la réaction multi-composants de Groebke-Blackburn.

La synthèse des 3-amino-8-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrazines substituées **3.130-a** et des 3-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazines substituées **3.130-b** a été également rapportée par Guasconi et *coll.* Ces deux composés sont synthétisés par une réaction multicomposants de Groebke-Blackburn en utilisant la 2-amino-3-chloropyrazine et la 2-aminopyrazine avec des aldéhydes et du *tert*-butylisocyanure, respectivement, dans l'acétonitrile à reflux en présence du chlorure de triméthylsilyle TMSCl (schéma 43) [240].

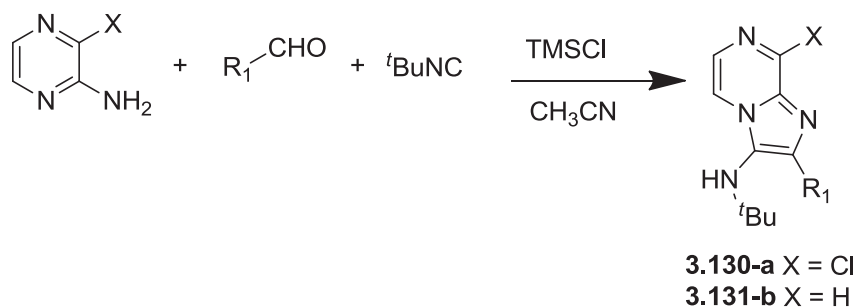


Schéma 43 : Synthèse des 3-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazines via la réaction multicomposants de Groebke-Blackburn

D'autres stratégies de synthèse sont également utilisées pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines. Par exemple, en 2005, Demirayak et *coll.* ont synthétisé une série d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines substituées en position 6 et 8. L'aryloyle imidazole **3.131** réagit avec la 2-bromoacétophénone **3.132** dans l'acétone en présence de K_2CO_3 afin d'obtenir le composé **3.133**. La cyclisation de ce dernier en présence d'acétate d'ammonium et d'acide acétique donne l'imidazo[1,2-*a*]pyrazine **3.134** (schéma 44) [241].

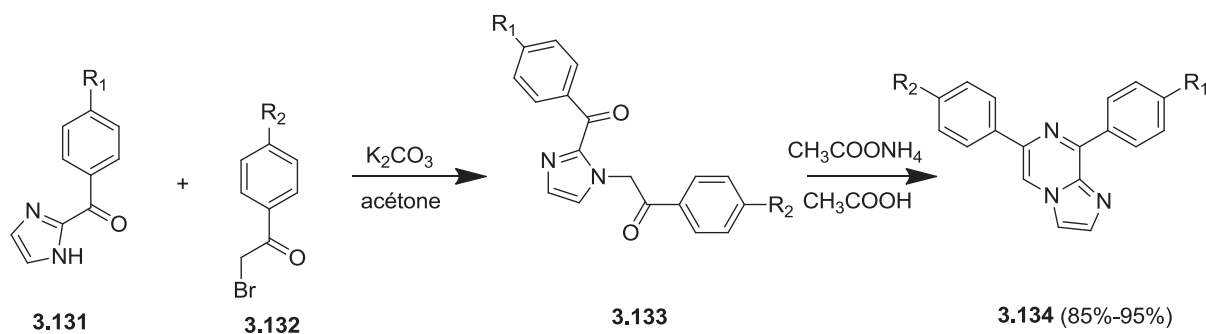


Schéma 44 : Synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines substitués en position 6 et 8.

En 2013, Gao et *coll.* ont développé une synthèse très efficace de 2-haloimidazo[1,2-*a*]pyrazine **3.135** par cyclisation oxydante catalysée par le cuivre de 2-aminopyrazine avec de l'hexyl bromoalcyne en utilisant l'oxygène moléculaire et le triflate de cuivre (II) $Cu(OTf)_2$ (20 mol%) dans l'acétonitrile (schéma 45) [242].

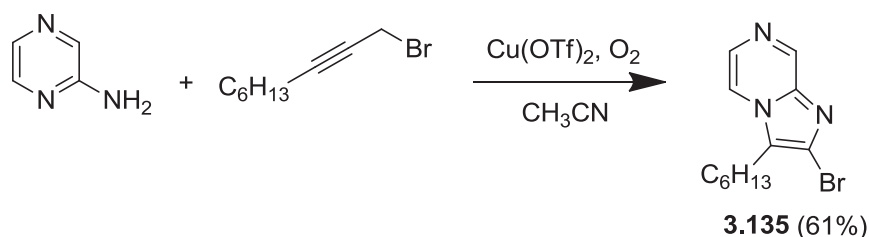


Schéma 45 : Synthèse de 2-haloimidazo[1,2-*a*]pyrazine par cyclisation oxydante catalysée par le cuivre.

4. Synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

Peu des travaux publiés concernent le développement des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines. En 2007, Spatz et *coll.* ont utilisé la réaction multicomposants d'Ugi suivie d'une substitution nucléophile aromatique en vue d'obtenir ce type des composés (schéma 46). La réaction d'Ugi est initiée par condensation de l'amine **3.136** avec l'aldéhyde **3.137** conduisant à un intermédiaire imine, qui va réagir avec l'acide carboxylique **3.138** et l'isocyanure **3.139** pour donner le produit **3.140** en utilisant le trifluoroéthanol (TFE) comme solvant. Le composé **3.140** subit une cyclisation intramoléculaire en présence d'une base (K_2CO_3) dans du DMF [212].

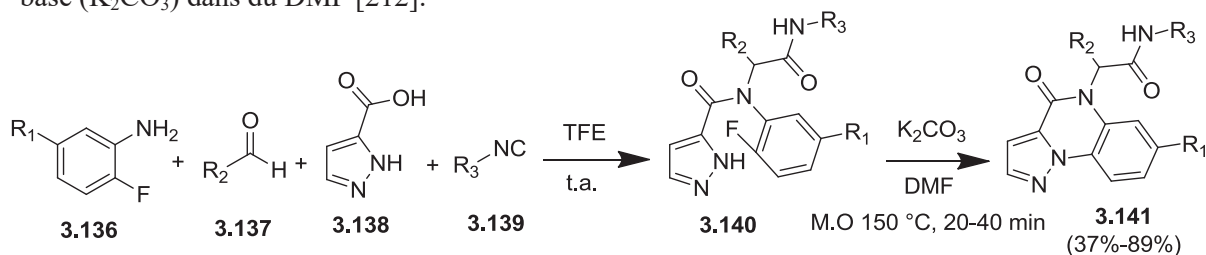
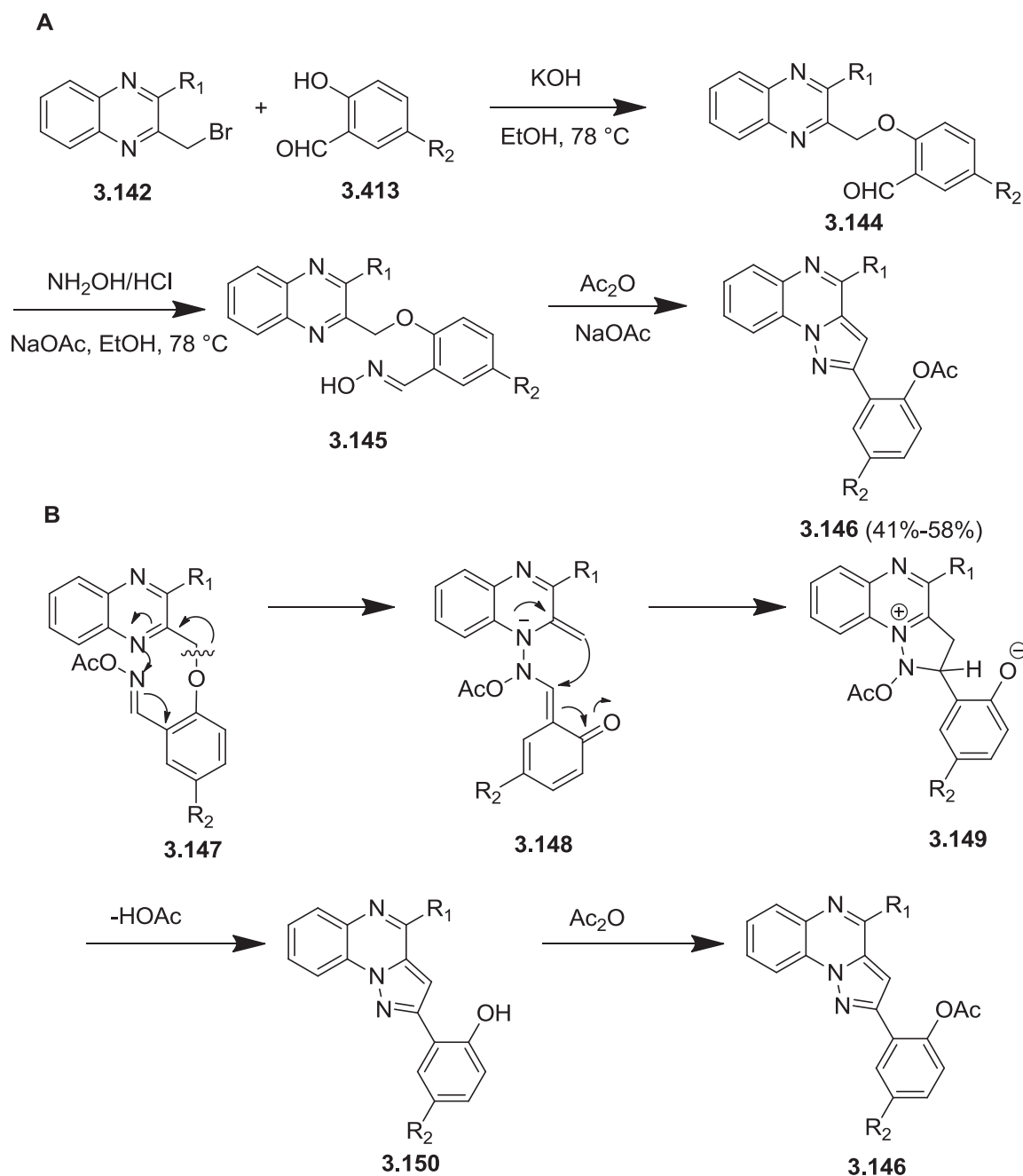


Schéma 46 : Synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines par la réaction d'Ugi.

En 2009, Sarodnick et *coll.* ont utilisé une nouvelle stratégie de synthèse pour le développement des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines : la synthèse débute par une substitution nucléophile du brome du composé **3.142** par l'oxygène du groupement hydroxyle du composé **3.143** afin d'obtenir le composé **3.144**. Ce dernier réagit avec l'hydroxylamine pour donner les oximes **3.145**. Le traitement des oximes **3.145** avec un excès d'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium à haute température a donné directement les pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines **3.146** avec des rendements modérés (schéma 47A). Le mécanisme de formation du composé **3.146** est décrit dans le schéma 47B : la première étape consiste en une acétylation en O-acétyloximes **3.147** en présence d'anhydride acétique. Puis une attaque nucléophile de l'azote de la quinoxaline avec clivage de la liaison C-O a lieu, cette transformation est un réarrangement [3,5]-sigmatropique, rarement décrit dans la littérature. Les énamines résultantes **3.148** subissent des additions de Michael vinyliques intramoléculaires sur l'énone activée, régénérant le phénolate aromatique **3.149**. Enfin, la tautomérisation et l'élimination de l'acide acétique donnent les phénols **3.150** [243].



En 2010, Reeves et *coll.* ont utilisé la réaction d'Ullman pour synthétiser des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines. La condensation de l'*o*-iodoaniline avec le 2-formylpyrazole en présence de l'iodure de cuivre (I) comme catalyseur conduit à la construction du cycle pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline **3.151** (schéma 48) [225].

N-arylation catalysée par le Cu

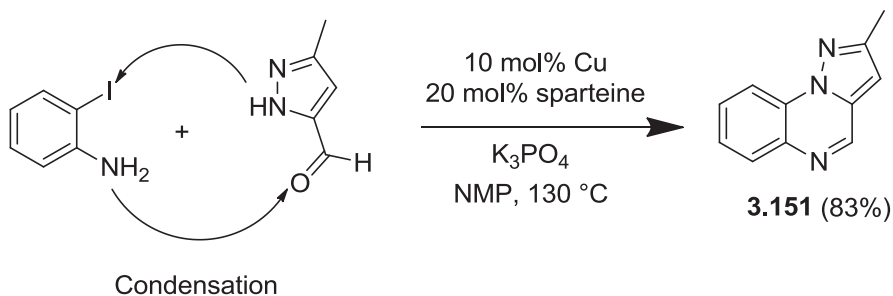


Schéma 48 : Réaction d'Ullman pour la synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines.

Très récemment, Wiethan *et coll.* ont utilisé la méthode décrite dans le schéma 49 pour la synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines en one-pot: Le composé **3.153** est préparé par cyclocondensation de la 1,1,1-trichloro-4-méthoxy-alcén-2-one **3.152** et de (2-chlorophényl)hydrazines. La bromation du composé **3.153** avec le NBS conduit au 4-bromopyrazoles **3.154**. La réaction des composés **3.153** ou **3.154** avec une amine primaire (R₂-NH₂) conduit au produit désiré **3.155** (schéma 49A). Le mécanisme de cette réaction se fait en deux étapes : la première étape consiste en une formation d'un intermédiaire amide, suivie d'une substitution nucléophile aromatique intramoléculaire (schéma 49B) [244].

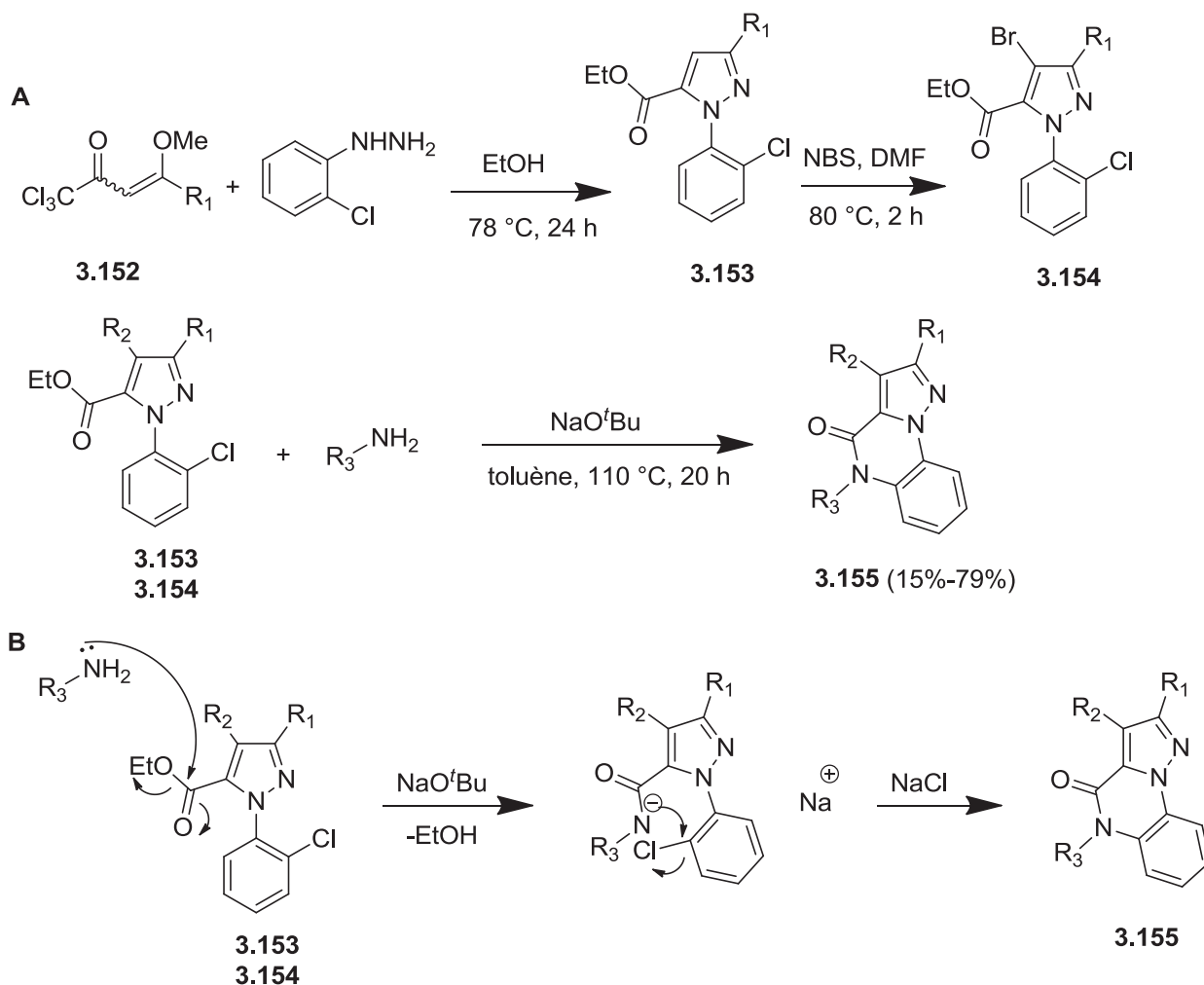


Schéma 49 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines en one-pot.

Une nouvelle méthode de synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines a été développée dans notre laboratoire: la condensation bimoléculaire de l'acide pyrazolocarboxylique (substitué par un isobutyle en position 3) en présence de chlorure de thionyle donne le composé **3.156**. Celui-ci est couplé avec l'ortho-fluoroaniline pour donner l'intermédiaire **3.157** en présence du bis(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS). La formation du composé tricyclique **3.158** se fait par une substitution nucléophile intramoléculaire de l'atome de fluor du composé **3.157** par le NH de l'imidazole en présence d'hydrure de sodium (NaH) et de diméthylacétamide (DMA) comme solvant (schéma 50) [199].

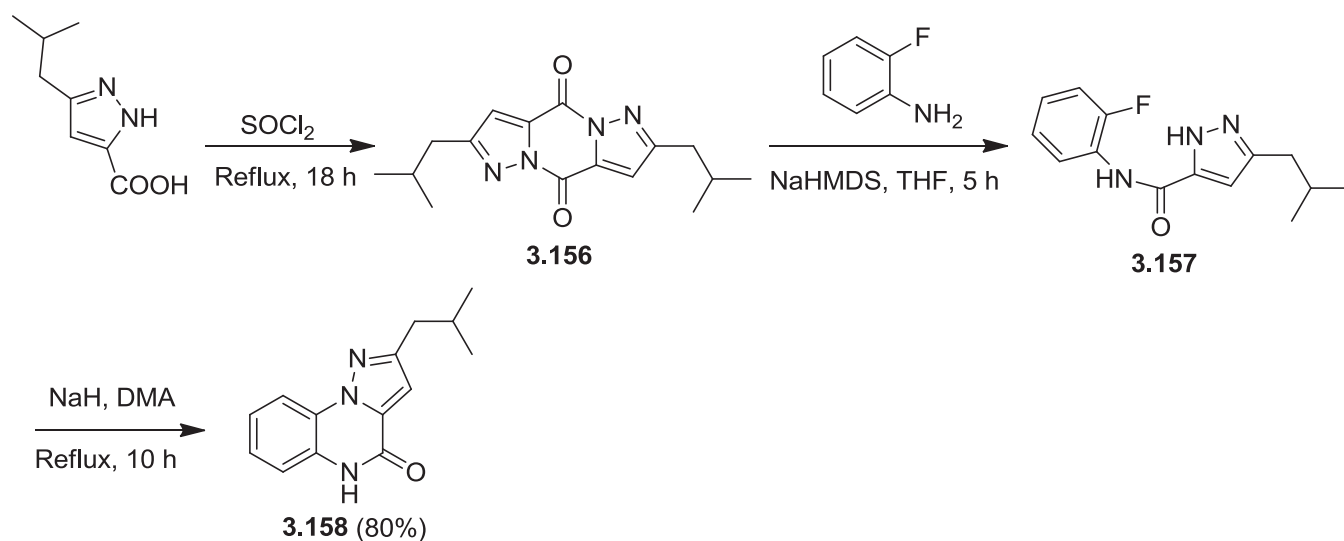


Schéma 50 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines en one-pot.

5. Activités biologiques

Les imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, les imidazo[1,2-*a*]quinoxalines ainsi que les imidazo[1,2-*a*]pyrazines possèdent de nombreuses activités biologiques comme des activités anti-cancéreuses, des activités inhibitrices de kinases et de phosphodiésterases ainsi que des activités anti-microbiennes et anti-fongiques. De plus, la série des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines a montré, récemment, une activité agoniste du TLR8. Par contre, la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines a montré une activité inhibitrice de l'intégrase du VIH [245], une activité sur le récepteur des benzodiazépines [246] ainsi qu'une activité anti-tumorale [199]. Dans cette partie, nous avons exposé les activités biologiques, pour ces quatre séries chimiques, obtenues au sein de notre laboratoire.

✓ Activité inhibitrice des phosphodiésterases (PDE)

Une série d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines synthétisées au sein de notre laboratoire a montré une activité inhibitrice de la phosphodiésterase type IV, le plus puissant était le composé **3.159** avec un groupement méthoxyméthyle en position 3. L'activité inhibitrice contre la phosphodiésterase type III

dépend fortement de la nature de la substitution en position 2 ou 3. Seuls les composés **3.160** et **SCA40**, avec un groupement cyano en position 2 ont montré une activité inhibitrice contre la phosphodiésterase type III (figure 44) [196].

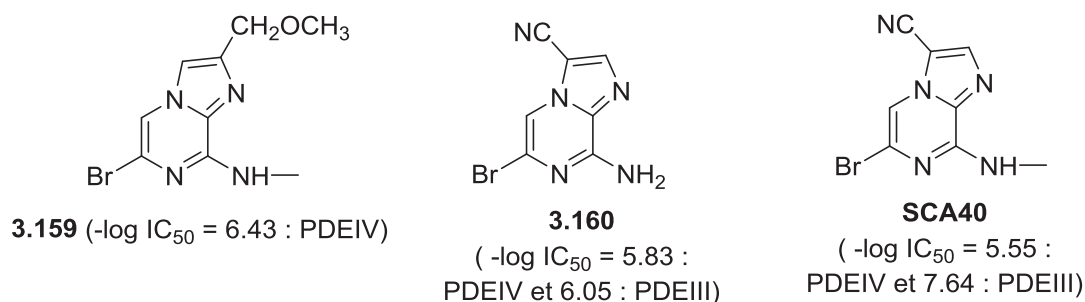


Figure 44 : Imidazo[1,2-*a*]pyrazines et leur activité inhibitrice PDEIV.

De même, des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines ont été testées pour leur activité inhibitrice PDEIII et PDEIV et ont montré des IC₅₀ de l'ordre des micromolaires (composés **3.161**, **3.162**, **3.163**, figure 45) [198] [197].

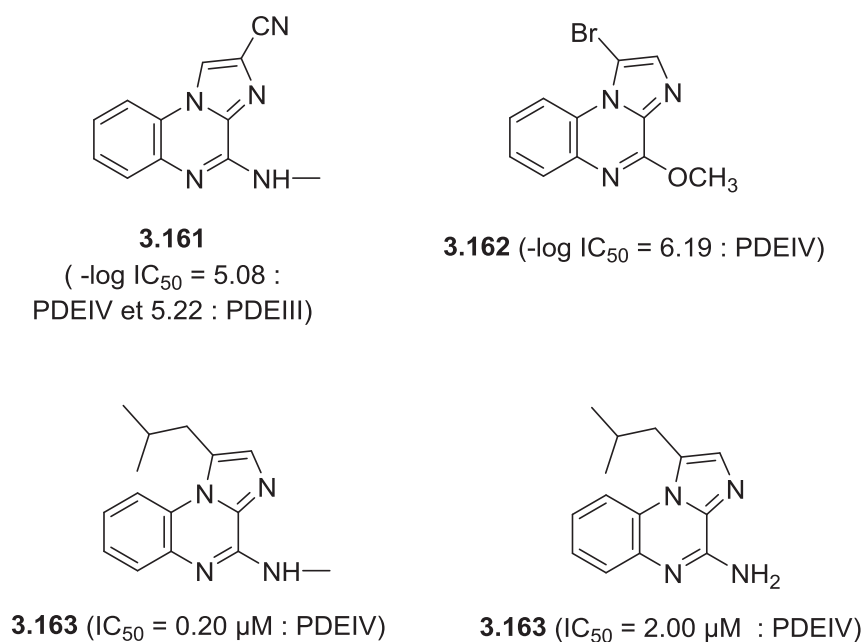


Figure 45 : Imidazo[1,2-*a*]quinoxalines et leur activité inhibitrice PDEIV et PDEIII.

✓ Activités anti-cancéreuses

En 2008, une grande diversité d'imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines a été synthétisée et évaluée contre des lignées cellulaires cancéreuses humaines du mélanome (A375, M4Be, RPMI-7591), du côlon (LS174T), du sein (MCF7) et du lymphome (Raji). Les composés **EAPB0103**, **EAPB0201**, **EAPB0202** et **EAPB0203** ont montré des activités significatives in vitro contre la lignée A375 par rapport à la fotémustine et à l'imiquimod utilisés comme références (figure 46). Ces composés étaient 6 à 110 plus actifs que la fotémustine et 2

à 45 fois plus actifs que l'imiquimod. **EAPB0203** portant un groupement phénéthyle en position 1 et une méthylamine en position 4 était le composé le plus actif. **EAPB0203** a également montré une activité cytotoxique plus puissante que l'imiquimod et la fotémustine dans les lignées cellulaires M4Be et RPMI-7591 et une activité cytotoxique intéressante dans d'autres lignées cellulaires tumorales testées. La pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline **3.164** a montré une activité similaire à celle de l'imiquimod (figure 46) [199].

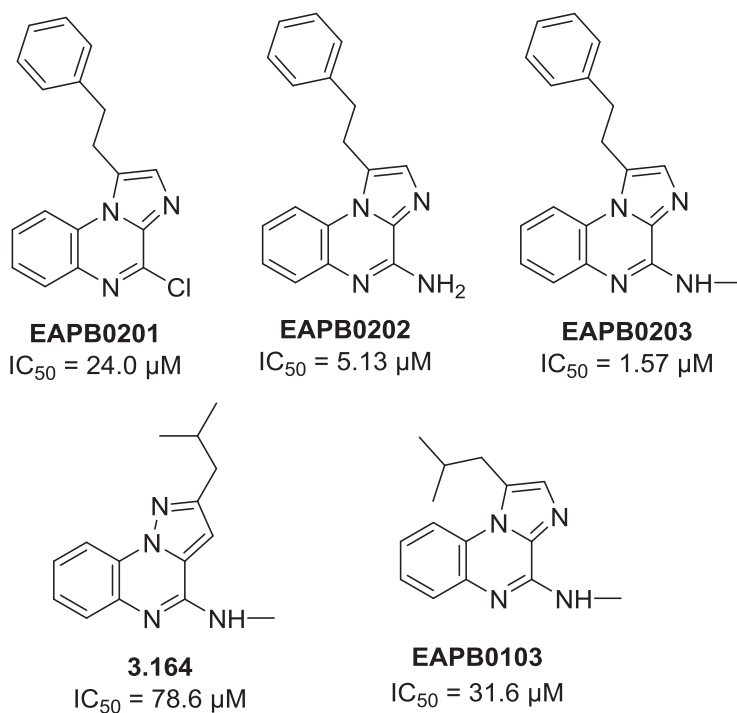


Figure 46 : L'activité anticancéreuse de la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline.

L'**EAPB0503** est encore plus actif contre le mélanome : son activité est 7 à 9 fois plus importante que celle de l'**EAPB0203**. Le métabolisme et la pharmacocinétique de ces produits ont été étudiés. Pour le composé **EAPB0503** et son métabolite **EAPB0603**, des protocoles pour leur quantification dans le plasma humain et chez le rat ont été développés (figure 47). Récemment, **EAPB0503** a montré sa capacité d'inhiber la croissance et induire l'apoptose dans les cellules leucémiques myéloïdes chroniques et aiguë [200] [247] [248] [249].

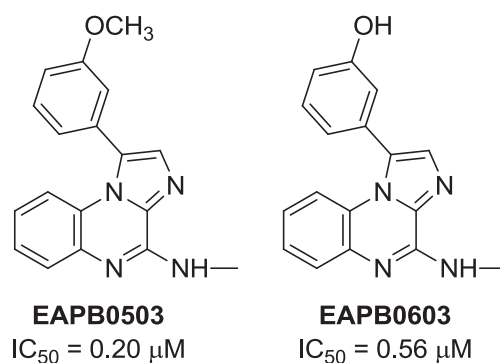


Figure 427 : Structure chimique des deux composés les plus actifs : **EAPB0203** et **EAPB0503**.

✓ **Activités inhibitrices des IKKs (IκB kinases)**

Récemment une série d'imidazo[1,2-*a*]quinoxalines a été synthétisée et testée pour son activité inhibitrice des kinases IKK1 et IKK2. Tous les composés synthétisés ont présenté une activité inhibitrice sélective de l'IKK2. La bromoimidazoquinoxaline **3.165** est le produit le plus actif avec une IC₅₀ (324±48 nM) deux fois plus puissante que la référence **BMS-345541** (IC₅₀ = 644±97 nM) (figure 48) [250].

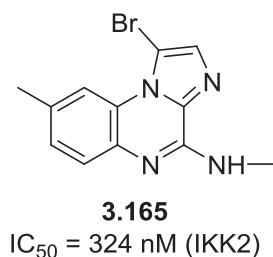


Figure 48 : Structure chimique de la bromoimidazoquinoxaline **3.165**.

En conclusion, l'importance de ces quatre séries chimiques est traduite par leurs diverses activités biologiques. Le développement et l'introduction de nouveaux substituants sur le cycle à cinq sommets ou sur les cycles quinoxaline ou pyrazine permettent l'exploration de nouvelles activités biologiques.

CHAPITRE IV : LES REACTIONS DE COUPLAGE CROISEE PALLADO-CATALYSEES

1. Introduction

Au cours de la seconde moitié du 20^{ème} siècle, les métaux de transition ont joué un rôle important dans la chimie organique, ce qui a conduit au développement d'un grand nombre de réactions catalysées par des métaux de transition pour créer des molécules organiques. Les métaux de transition ont une capacité d'activer divers composés organiques et, grâce à cette activation, ils peuvent catalyser la formation de nouvelles liaisons. Un métal largement utilisé pour les transformations organiques catalytiques est le palladium, découvert en 1805 par Wollaston [251]. L'importance du palladium dans la synthèse organique a été mise en évidence suite à l'observation fructueuse de Walter Hafner en 1959 qui consiste en une oxydation de l'éthylène en acétaldéhyde en présence d'air et du palladium sur charbon (schéma 51) [252]. Par la suite, cette réaction est connue par le procédé Wacker industriellement important.

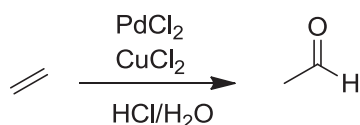


Schéma 51 : Procédé Wacker

Au cours de ces efforts, Hafner était le premier à isoler et à caractériser un complexe π -allyle palladium, et sa recherche était l'une des plus importantes découvertes du 20^{ème} siècle dans le domaine de la chimie organique. Ensuite la chimie de ces complexes a été bien développée, débutant par les observations de Tsuji en 1965 selon lesquelles des nucléophiles réagissent avec des complexes π -allyle palladium [253] [254]. Cette réaction de Tsuji-Trost consiste en une réaction de substitution catalysée par le palladium impliquant un substrat contenant un groupement partant en position allylique. Le catalyseur de palladium se coordonne d'abord avec le groupement allyle, puis subit une addition oxydante, formant le complexe π -allyle. Ce complexe allylique peut alors être attaqué par un nucléophile, aboutissant au produit substitué (schéma 52).

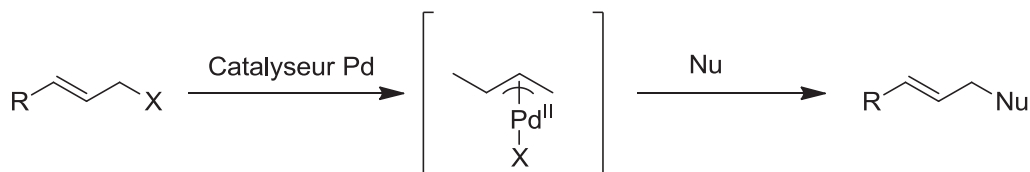


Schéma 52 : Réaction de Tsuji-Trost

Par la suite, de nombreux développements intéressants sont mis en évidence dans le domaine de couplage croisé pallado-catalysé.

En 1968, Heck a rapporté dans une série d'articles que des halogénures de méthyl et de phénylpalladium générés in situ (RPdX; R = Me ou Ph; X = halogène) sont ajoutés aux alcènes à température ambiante [255] [256]. L'addition de chlorure de phénylpalladium (PhPdCl) à l'éthylène suivie de l'élimination du palladium a donné le styrène (schéma 53). Cette réaction est devenue l'une des réactions les plus importantes pour l'établissement d'une liaison simple carbone-carbone. Le composé organopalladium, RPdX (R = aryle ou alkyle), est obtenu à partir d'un composé organomercurique, RHgX, et d'un sel de palladium (II).

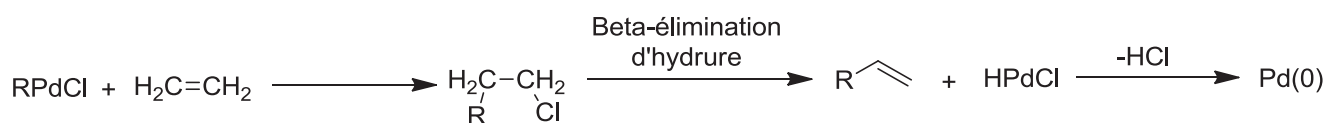
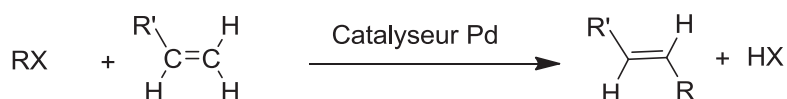


Schéma 53 : Réaction de Heck en 1965

En 1972, Heck a fait une modification importante de sa réaction en augmentant son utilité synthétique. Dans cette nouvelle version, le complexe organopalladium RPdX est généré à partir d'un organohalogénure (RX) et du palladium Pd(0) par l'intermédiaire d'une addition oxydante [257]. Cette dernière a été rapportée par Fitton qui, en 1968, a trouvé que les halogénures d'aryle réagissent avec le Pd(0) pour donner des halogénures d'arylpalladium [258] [259]. Ainsi, avec cette nouvelle modification, une arylation d'alcène est obtenue à partir de la réaction d'un halogénure d'aryle et d'un alcène en présence du palladium. Le mécanisme de la réaction de Heck est montré dans le schéma 54. La réaction commence par une addition oxydante de l'organohalogénure RX sur le palladium au degré d'oxydation 0. Dans cette réaction, l'état d'oxydation du palladium change du Pd(0) en Pd(II) avec la formation d'un composé organopalladium RPdX. Dans ce processus, une nouvelle liaison palladium-carbone est formée. Dans l'étape suivante, l'alcène se coordonne au palladium, et l'alcène et le groupement R sont assemblés sur le métal et peuvent réagir l'un avec l'autre. Dans l'étape suivante, le groupement R sur le palladium migre vers l'un des carbones de l'alcène coordonné et le palladium se déplace vers l'autre carbone de l'alcène. Ce processus est appelé une insertion migratoire et génère la liaison carbone-carbone. Enfin, la libération du groupement organique se produit par une β -élimination d'hydrure pour former l'alcène correspondant suivie d'une élimination réductrice en présence d'une base, pour régénérer le palladium initial au degré d'oxydation 0.



R = aryle, vinyle, alkyle
X = halogénure, triflate...

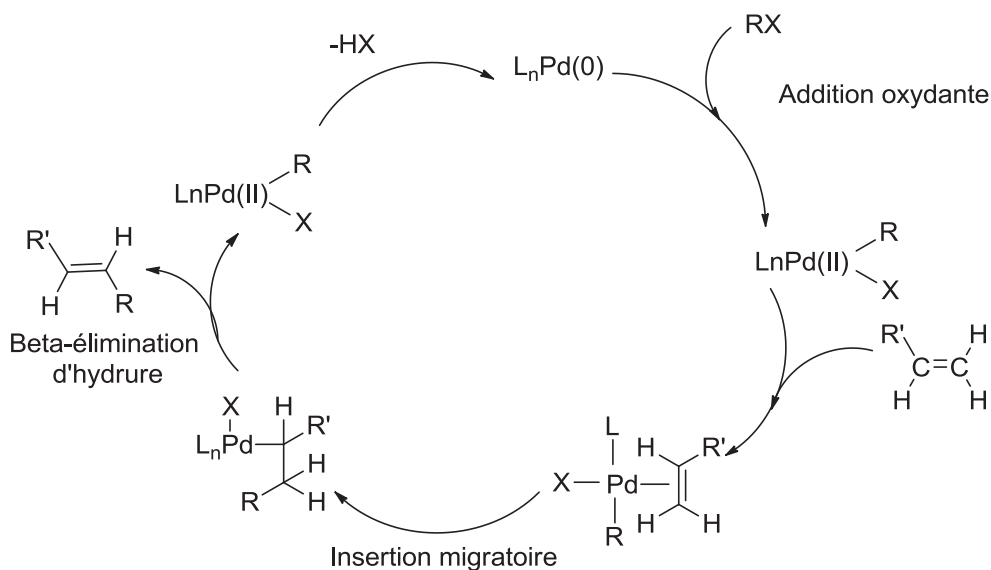


Schéma 54 : Le mécanisme de la réaction de Heck

Après la réaction de Heck, plusieurs réactions de couplage croisé ont été développées en utilisant comme espèce électrophile, un halogénure ou un pseudohalogénure (triflate, mésylate, tosylate) $\text{R}_1\text{-X}$ et un réactif organométallique $\text{R}_2\text{-M}$, le métal M peut être le magnésium Mg, l'aluminium Al, le zirconium Zr, le zinc Zn, l'étain Sn, le bore B et le silicium Si. Ces réactions sont catalysées le plus souvent par le palladium Pd ou le nickel Ni.

En 1972, Kumada et *coll.* ont décrit la réaction d'un réactif de Grignard, le bromure de phénylmagnésium, avec un chlorure d'aryle ou de vinyle, catalysée par le chlorure de nickel avec deux ligands 1,2-bis(diphénylphosphino)éthane dppe ($\text{NiCl}_2(\text{dppe})_2$), conduisant à la formation du styrène (schéma 55) [260].

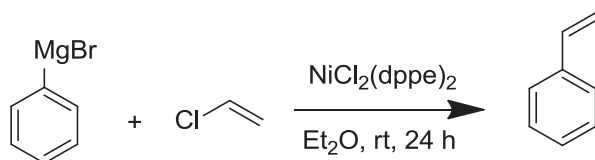


Schéma 55 : Réaction de Kumada

Dans la même année, Corriu et *coll.* en faisant réagir le β -bromostyrène avec le bromure de phénylmagnésium dans le diéthyléther avec l'acétylacétonate de nickel (II) comme catalyseur, ils ont obtenu le trans-stilbène avec un rendement de 70% (schéma 56) [261].

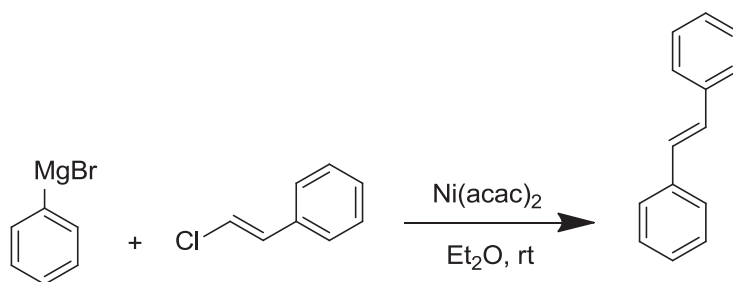


Schéma 56 : Réaction de Corriu

Le palladium est introduit dans ce type de couplage en 1975 par Murahashi lorsque le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) est décrit comme catalyseur de la réaction du Z-bromostyrène avec l'iodure de méthylmagnésium pour donner le Z-propenylbenzène (schéma 57) [262].

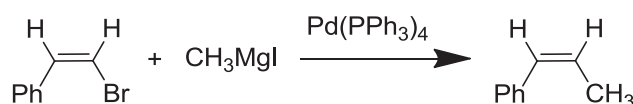
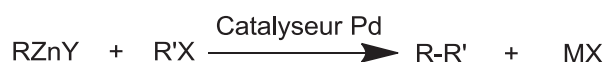


Schéma 57 : Réaction de Murahashi

Les réactifs de Grignard, RMgX qui sont utilisés dans la réaction de Kumada-Corriu sont très réactives et par conséquent, ne tolèrent pas certains groupes fonctionnels. L'utilisation alors de ces réactifs dans les réactions de couplage croisé est peu souhaitable. En 1976, Negishi a lancé une série d'études pour explorer d'autres espèces organométalliques qui peuvent être utilisées dans les couplages croisés catalysés par le palladium avec des organohalogénures. Dans les premières études, Negishi a utilisé des composés d'organozirconium ou d'organoaluminium comme partenaires de couplage. Les résultats positifs obtenus grâce à ces études l'ont incité à essayer des espèces organométalliques encore moins réactives [263]. En 1977, Negishi a introduit des composés organozinciques comme partenaires de couplage nucléophiles dans le couplage croisé catalysé par le palladium (schéma 58) [264] [265]. Les composés organozinciques ont donné des rendements supérieurs à ceux d'autres composés organométalliques et leur utilisation a permis la présence d'une grande variété de groupements fonctionnels. Cette nouvelle réaction de couplage est devenue une méthode très importante pour l'établissement d'une liaison carbone-carbone.



R, R' = aryle, vinyle, alkyle
X = halogène, triflates...

Schéma 58 : Réaction de Negishi

Dans la même année, Stille et *coll.* ont décrit la réaction des organostannanes R-Sn(Alkyl)_3 avec une grande variété des électrophiles via un couplage croisé catalysé par le palladium (schéma 59) [266].

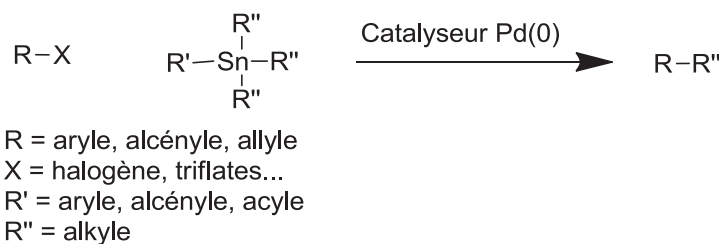


Schéma 59 : Réaction de Stille

Dix ans après, Hiyama et *coll.* ont étudié le couplage croisé des organosilanes avec des halogénures ou des pseudohalogénures en utilisant le palladium comme catalyseur et une base ou un ion fluorure comme agent activateur (schéma 60) [275].

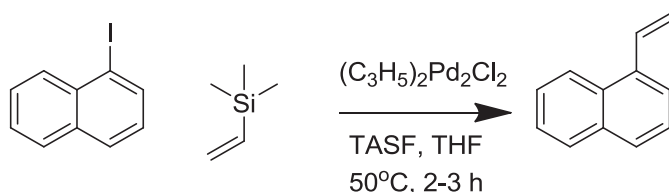


Schéma 60 : Réaction de Hiyama

Plus récemment, Buckwald et Hartwig ont réussi à établir une liaison carbone-azote par l'intermédiaire d'un couplage croisé catalysé par le palladium en présence d'une base (schéma 61)[267].

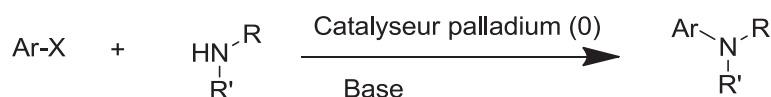


Schéma 61 : Réaction de Backwald et Hartwig

Les couplages croisés de Kumada, Stille, Negishi, Suzuki et Hiyama impliquent un cycle catalytique en trois étapes (schéma 62) :

1. Une addition oxydante de l'organohalogénure RX sur le palladium au degré d'oxydation 0. Dans cette réaction, l'état d'oxydation du palladium change du Pd(0) en Pd(II) avec la formation d'un composé organopalladium R-Pd-X.
2. Une transmétallation durant laquelle le composé organométallique R'M (M = Mg, Zr, Zn, B, Al, Sn, Si...) réagit avec le complexe R-Pd-X formé lors de l'addition oxydante et le groupement organique R' est transféré au palladium par échange avec l'halogène X.
3. Une élimination réductrice se produit, libérant ainsi le produit de couplage R-R' en établissant une liaison carbone-carbone. Durant ce processus, le palladium Pd(II) est réduit en Pd(0), prêt à entrer dans un autre cycle catalytique.



R, R' = aryle, vinyle, alkyle
 X = halogénure, triflate...
 M = Métal (Mg, Zn, Sn, B, Si)

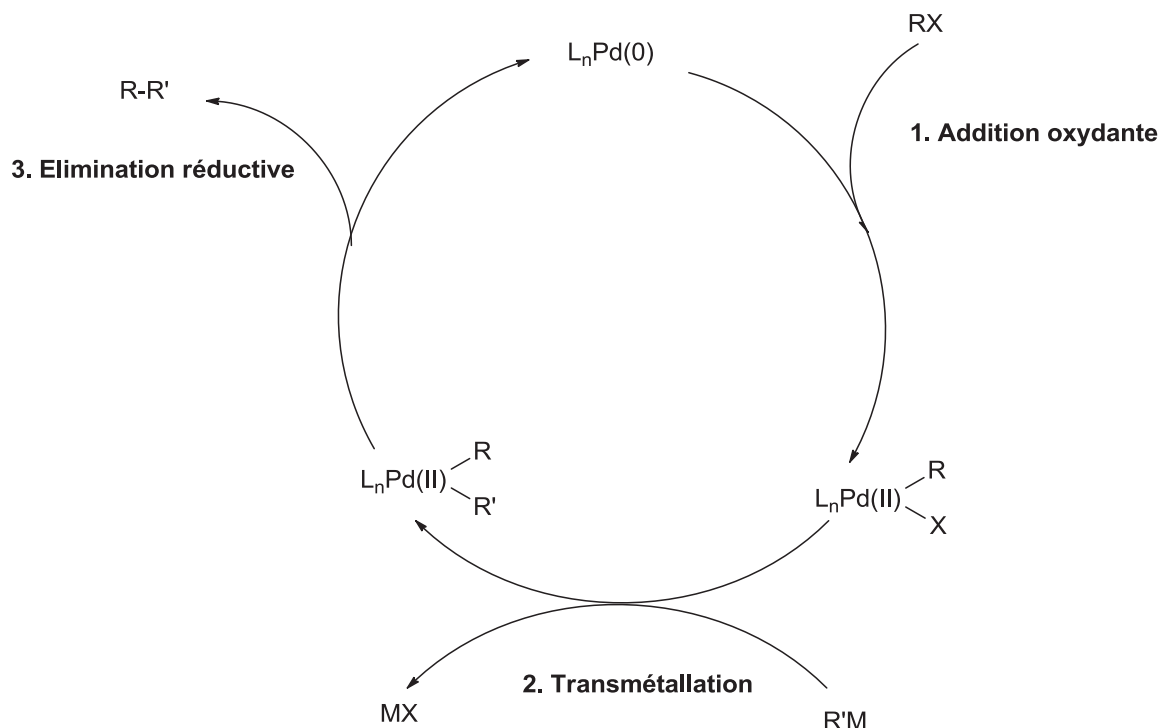


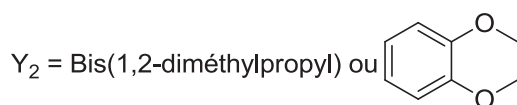
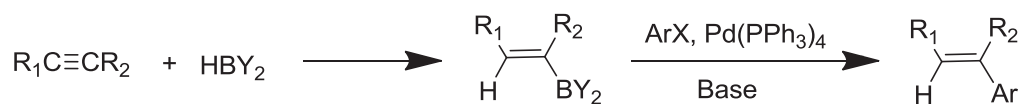
Schéma 62 : Cycle catalytique général classique d'une réaction de couplage organométallique catalysée par du palladium

De nombreux travaux sont publiés récemment concernant le développement et l'optimisation de ces couplages croisés. Dans notre travail, nous sommes intéressés aux couplages croisés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira. Ces derniers nous ont permis d'introduire une grande variété de substituants aryles et alkyles indispensables pour l'activité biologique.

2. Couplage croisé de Suzuki-Miyaura

2.1 Généralités

En 1979, Suzuki et *coll.* ont rapporté dans deux articles que des composés organoborés peuvent être utilisés, en présence d'une base, dans le couplage croisé catalysé par le palladium avec des halogénures de vinyle et d'aryle (schéma 63)[268] [269]. L'activation des réactifs organoborés par la base conduit à des intermédiaires « boronates » plus nucléophiles facilitant ainsi le transfert du bore au palladium pendant l'étape de transmétallation. Par la suite, cette réaction est optimisée afin d'inclure des couplages avec des groupements alkyles. Un autre développement significatif concernant la réaction de Suzuki est la possibilité d'utiliser des acides arylboroniques comme réactifs, dans ce cas, la réaction était plus efficace et des bases plus faibles pouvaient être utilisées [270] [271].



X = Br ou I

Schéma 63 : Réaction de Suzuki-Miyaura

Le couplage croisé de Suzuki possède plusieurs avantages par rapport à d'autres réactions de couplage croisé catalysées par le palladium :

1. Des conditions réactionnelles douces.
2. Disponibilité immédiate des réactifs organoborés, qui sont également inertes vis-à-vis de l'eau, des solvants organiques et de l'oxygène, et qui sont thermiquement stables.
3. Les réactifs organoborés sont tolérants vis-à-vis de divers groupements fonctionnels.
4. Faible toxicité des réactifs de départ et des sous-produits.

2.2 Mécanisme

Comme nous avons déjà mentionnés pour les autres couplages croisés pallado-catalysés, le mécanisme catalytique de la réaction de Suzuki-Miyaura comporte également trois étapes : une addition oxydante, une transmétallation et une élimination réductrice (schéma 64).

- Addition oxydante

Après formation de l'espèce catalytique in situ, l'addition oxydante des dérivés halogénés aryles ou vinyles conduit généralement au complexe palladium au degré d'oxydation II. La présence d'un groupement électro-attracteur à proximité du groupement halogéné peut permettre dans le cas des dérivés aryles et vinyles d'augmenter la vitesse de l'addition oxydante. Dans le cas des dérivés alkyles possédant un hydrogène en position β , l'addition oxydante est très lente, et elle peut être suivie d'une β -H élimination.

Entre l'étape de l'addition oxydante et l'étape de transmétallation, un phénomène de métathèse a lieu et qui consiste en un échange de l'anion lié au palladium (X^-) avec l'anion de la base (OR^-) conduisant au produit R_1 -Pd(II)-OR.

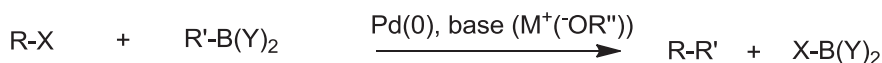
- Transmétallation

Cette étape consiste en un transfert du groupement R_2 de l'acide boronique sur le complexe R_1 -Pd(II)-OR. La présence d'une base est nécessaire à l'étape de transmétallation, dont le mécanisme est moins

bien connu. En effet, la différence d'électronégativité entre l'atome de bore et l'atome de carbone étant assez faible, le groupement R₂ est assez peu nucléophile et la transmétallation difficile. L'utilisation d'une base transforme l'espèce organoborée en borate ce qui augmente la nucléophilie du R₂ et permet son transfert au palladium et donc une transmétallation plus facile.

- Elimination réductrice

Après l'étape de transmétallation, l'élimination réductrice entre les deux groupements organiques permet d'obtenir le produit de couplage R₁-R₂ et de régénérer le catalyseur Pd au degré d'oxydation 0.



R = aryle, vinyle, alkyle
 R' = aryle, vinyle, alcyne, alkyle
 X = halogénure, triflate...
 Y = OH, alkyle, O-alkyle

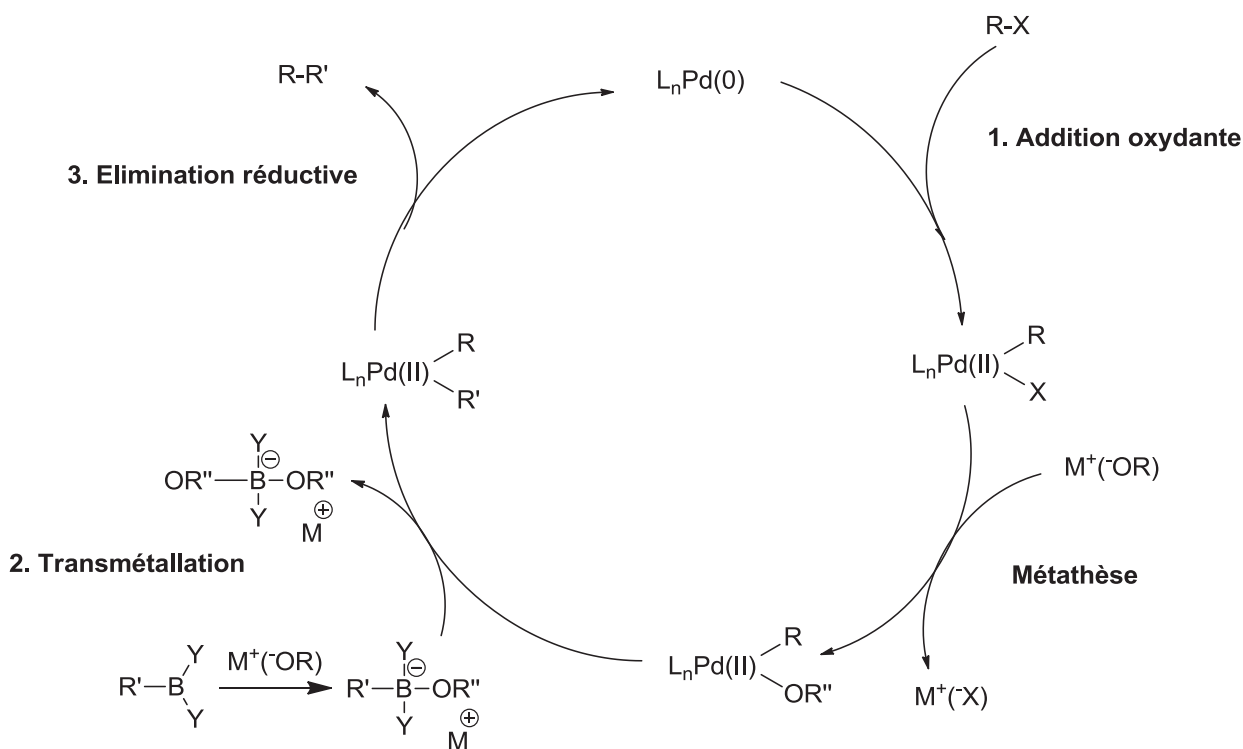


Schéma 64 : Mécanisme réactionnel du couplage croisé de Suzuki-Miyaura

2.3 Les différents partenaires de la réaction

- La base

L'utilisation d'une base est nécessaire, puisqu'elle permet la formation d'un complexe « ate » accélérant ainsi l'étape de transmétallation. Les bases les plus utilisées sont Na_2CO_3 , Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , CsF , Ba(OH)_2 ou NaOH . Des bases dérivées du thallium telles que TlOH ou Tl_2CO_3

sont très efficaces mais elles sont très toxiques. En fait, les effets de la base peuvent être estimés par sa force et l'affinité des contre-ions pour les ions halogénures [272]. Une base plus forte augmentera la vitesse de l'étape de transmétallation et de plus la vitesse globale de la réaction augmentera avec la taille du cation. Plus les dimensions du cation de la base sont grandes, plus elles sont solvatées. Les taux de conversion et les rendements augmentent souvent dans cet ordre dans la littérature : $\text{Li}_2\text{CO}_3 < \text{Na}_2\text{CO}_3 < \text{K}_2\text{CO}_3 < \text{Cs}_2\text{CO}_3$. De plus, quelques travaux ont rapporté que l'oxyde d'argent en combinaison avec une base inorganique induit le couplage croisé de Suzuki-Miyaura des acides *n*-alkyl/arylboroniques, probablement en accélérant le transfert du groupement alkyle du B-à-Pd du cycle catalytique. Puisque la transmétallation implique un déplacement nucléophile, la réaction peut être rapide pour les contre-ions avec une constante de stabilité élevée pour les ions halogénures ($\text{Ag}^+ > \text{Tl}^+ \gg \text{Ba}_2^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+$) [273] [274]. Ces bases peuvent être utilisées en solution aqueuse ou en suspension dans divers solvants organiques (toluène, dioxane, DME ou DMF).

- Les électrophiles

La réactivité des halogénures d'aryles est en fonction de l'électronégativité de l'atome d'halogène. Par conséquent, la nature de l'halogène a une influence importante sur la vitesse de l'addition oxydante. Les dérivés électrophiles utilisés dans la réaction de Suzuki-Miyaura peuvent être de toute nature : aryles, vinyles, alkyles et hétéroaryle. Les dérivés iodés et bromés, ainsi que les triflates, sont les plus utilisés. L'ordre de réactivité de ces dérivés est le suivant : $\text{I} \geq \text{OTf} > \text{Br} \gg \text{Cl}$. Néanmoins, bien qu'ils soient les moins réactifs, les dérivés chlorés restent très attractifs par la grande diversité des dérivés disponibles. De nombreux systèmes catalytiques sont développés afin de faciliter leur utilisation dans la réaction de Suzuki. Les dérivés halogénés sont activés par la présence d'un groupement électro-attracteur et sont donc plus réactifs lors de l'addition oxydante que ceux possédant un groupement électro-donneur [275].

- Le catalyseur

Le choix du catalyseur dépend essentiellement des substrats utilisés et il existe une variété importante de catalyseurs utilisés pour la réaction de Suzuki-Miyaura. Le tetrakis $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ est le catalyseur communément utilisé lors de la réaction du Suzuki-Miyaura. Toutefois, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ seul ou avec un ligand de phosphine, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ et $\text{Pd}(\text{Cl})_2/\text{phosphine}$ sont également utilisés afin de générer un catalyseur palladium (0) étant donné qu'ils sont facilement réduits in situ. Plusieurs ligands de phosphine sont efficaces afin de stabiliser le Pd(0) mais la stœchiométrie, la grosseur ou la capacité à donner des électrons peut changer l'activité des catalyseurs envers l'addition oxydante et la transmétallation. De très nombreuses publications sont apparues sur le développement de nouveaux catalyseurs pour la réaction de Suzuki-Miyaura, permettant notamment de coupler des dérivés chlorés, bien moins onéreux que les dérivés bromés, iodés ou triflates à température ambiante dans des temps

très courts. Il existe également des catalyseurs de nickel permettant d'obtenir de très bons résultats ainsi que des catalyseurs du cuivre sont apparus dans la littérature [270] [276].

- Les dérivés borés

Ces dérivés comprennent des acides boroniques, des esters boroniques, des trifluoroborates de potassium, des dioxazaborocanes et d'autres. Les acides aryl- et alcénylboroniques donnent généralement de bons rendements du produit désiré avec une large gamme d'électrophiles, entre autres, des chlorures, des bromures, des triflates, sels de sulfonium, hétéroaryles et des groupes aryles stériquement encombrés. Par contre, les acides alkylboroniques sont souvent réfractaires, ce qui entraîne de faibles rendements. Pour améliorer leur réactivité, les acides boroniques sont soit transformés en trifluoroborates de potassium, soit estérifiés et élaborés en complexes «ate» soit complexés avec des sels de thallium hautement toxiques. Suzuki et *coll.* ont examiné le couplage croisé d'alkylboranes avec des halogénures organiques en utilisant le tétrakis Pd(PPh₃)₄ comme catalyseur. Mais ils n'ont pas pu obtenir les produits de couplage. La difficulté était considérée d'être l'étape de l'élimination réductrice. Hayashi et *coll.* ont rapporté un catalyseur efficace à l'étape d'élimination réductrice pour le couplage croisé des réactifs de Grignard et des alkylzincs avec des halogénures organiques, qui est le dichloro[1,1-bis(diphénylphosphino)ferrocène]-palladium (II) (PdCl₂(dppf)). Par la suite, Suzuki et *coll.* ont utilisé ce catalyseur pour la réaction des alkylboranes avec des halogénures organiques, la réaction s'est produite facilement pour donner les produits de couplage désirés avec de bons rendements. Récemment, plusieurs nouveaux catalyseurs tels que le palladium associé à des ligands de phosphane riches en électrons (fortement électrodonneurs) ou des ligands polydentés ou stériquement encombrés sont utilisés dans ce type de couplage et ils ont donné les produits désirés avec des rendements élevés [270] [276].

Les avantages du couplage croisé de Suzuki-Miyaura ont permis aux chercheurs d'utiliser ce type de réaction dans une grande variété d'applications, de la synthèse des produits naturels au développement des matériaux polymères. Cette réaction est sans doute devenue l'un des outils les plus utilisés pour la construction d'une liaison C-C. En raison de son impact dans des domaines aussi variés, Akira Suzuki, avec Richard F. Heck et Ei-Ichi Negishi, ont reçu en septembre 2010 le prix Nobel de chimie "pour les couplages croisés catalysés par le palladium en synthèse organique".

3. Couplage croisé de Sonogashira

3.1 Généralités

Parmi les couplages croisés pallado-catalysés, nous citons le couplage sp^2 - sp entre les halogénures d'aryles ou d'alcényles (ou triflates) et les alcynes terminaux, en présence ou pas d'un co-catalyseur au cuivre (I). Les deux premières études sur ce type de couplage ont été rapportées indépendamment par Heck et Cassar en 1975. Le travail de Heck est basé sur la réaction connue de Mizoroki-Heck pour l'arylation ou l'alcénylation catalysée par le palladium des alcènes, et qui consiste à réaliser le couplage en utilisant un complexe phosphane-palladium comme catalyseur et la triéthylamine ou pipéridine comme base et solvant (schéma 65) [277].

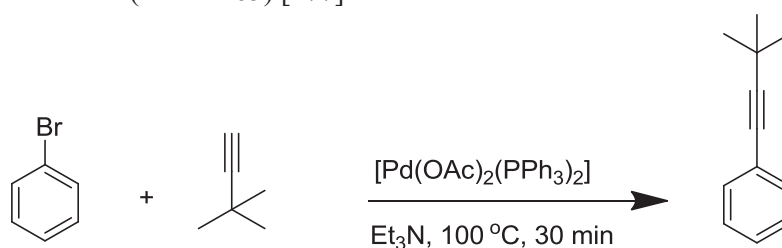


Schéma 65 : Réaction de Heck avec l'alcyne en 1975

La réaction de Cassar implique l'utilisation d'un catalyseur phosphane-palladium en combinaison avec du méthoxyde de sodium comme base et du DMF comme solvant (schéma 66)[278].

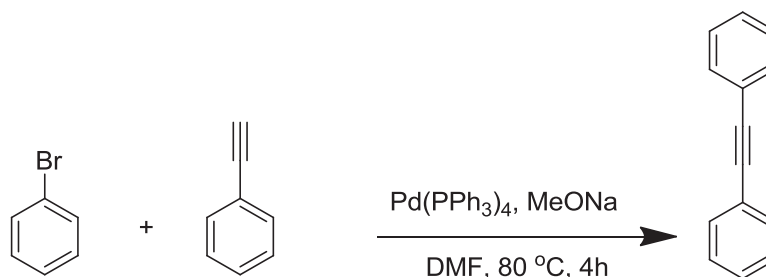


Schéma 66 : Réaction de Cassar

Les deux méthodes de Heck et de Cassar nécessitent généralement une température élevée. La même année, Sonogashira et Hagihara ont rapporté que l'addition d'une quantité catalytique d'iodure de cuivre (I) accélère considérablement la réaction, permettant ainsi la réalisation du couplage à température ambiante. Ils ont décrit la synthèse d'alcynes en faisant réagir des alcynes terminaux avec des iodures d'aryle ou des bromures de vinyle, en présence de palladium $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ comme catalyseur et l'iodure de cuivre (CuI) comme co-catalyseur (schéma 67) [279].

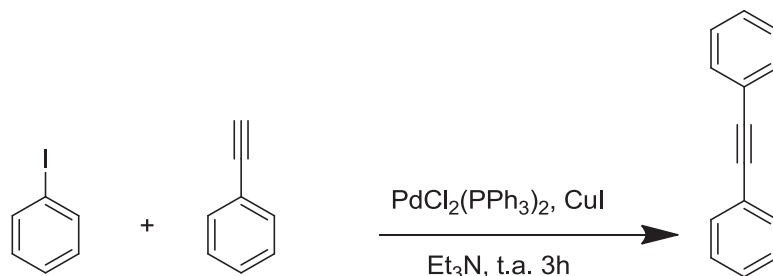


Schéma 67 : Réaction de Cassar

L'ajout du cuivre était lié au couplage croisé déjà connu de Stephens-Castro, en 1963, entre un dérivé acétylénique et un halogénure d'aryle aboutissant à la synthèse d'alcynes disubstitués (schéma 68)[280]. L'inconvénient de cette réaction était l'utilisation d'acétylure de cuivre très explosif. Par conséquent, le couplage croisé de Sonogashira est devenu le procédé le plus populaire pour l'alcynylation des halogénures d'aryle ou d'alcényle.

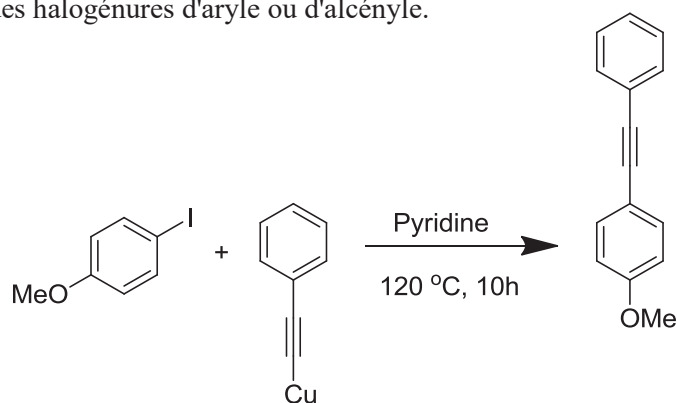


Schéma 68 : Réaction de Stephens-Castro

3.2 Mécanisme

La réaction de Sonogashira co-catalysée par le cuivre se déroule à travers deux cycles catalytiques indépendants comme le montre le schéma 69.

Le cycle catalytique pour le palladium (cycle Pd) est basé sur une addition oxydante habituellement rapide de R_1-X (R_1 = aryle, hétéryle, vinyle ; X = I, Br, Cl, OTf) au catalyseur généré in situ à partir du complexe de palladium initial. Dans l'étape d'addition oxydante, les caractéristiques du substrat R_1-X sont importantes, cette étape se produit facilement si X = I ou OTf et si la densité électronique est faible sur la liaison C-X par la présence de groupements électro-attracteurs.

L'étape suivante dans le cycle Pd est liée au cycle du co-catalyseur de cuivre (le cycle Cu). Ainsi, une transmétallation du groupement R_2 de l'acétylure de cuivre, formé dans le cycle de cuivre, sur le complexe $R_1-Pd(II)-X$ conduisant à une espèce $R_1Pd(-C\equiv CR_2)L_2$.

L'alcyne final est obtenu après une élimination réductrice avec régénération du catalyseur au palladium Pd(0).

Le deuxième cycle catalytique est le cycle de cuivre Cu (cycle Cu). Dans ce cycle Cu, la base (généralement une amine) peut arracher le proton de l'alcyne terminal, formant ainsi un acétylure de cuivre en présence du sel de cuivre (I). Par contre les amines utilisées ne sont pas, en général, suffisamment basiques pour déprotoner l'alcyne afin de générer le nucléophile anionique qui devrait former l'acétylure de cuivre. Par conséquent, un complexe π -alcyne-Cu comme le montre le schéma pourrait être impliqué dans le cycle, rendant ainsi le proton d'alcyne plus acide pour une meilleure abstraction. L'acétylure de cuivre formé rejoint le cycle catalytique du palladium au niveau de l'étape de transmétallation.

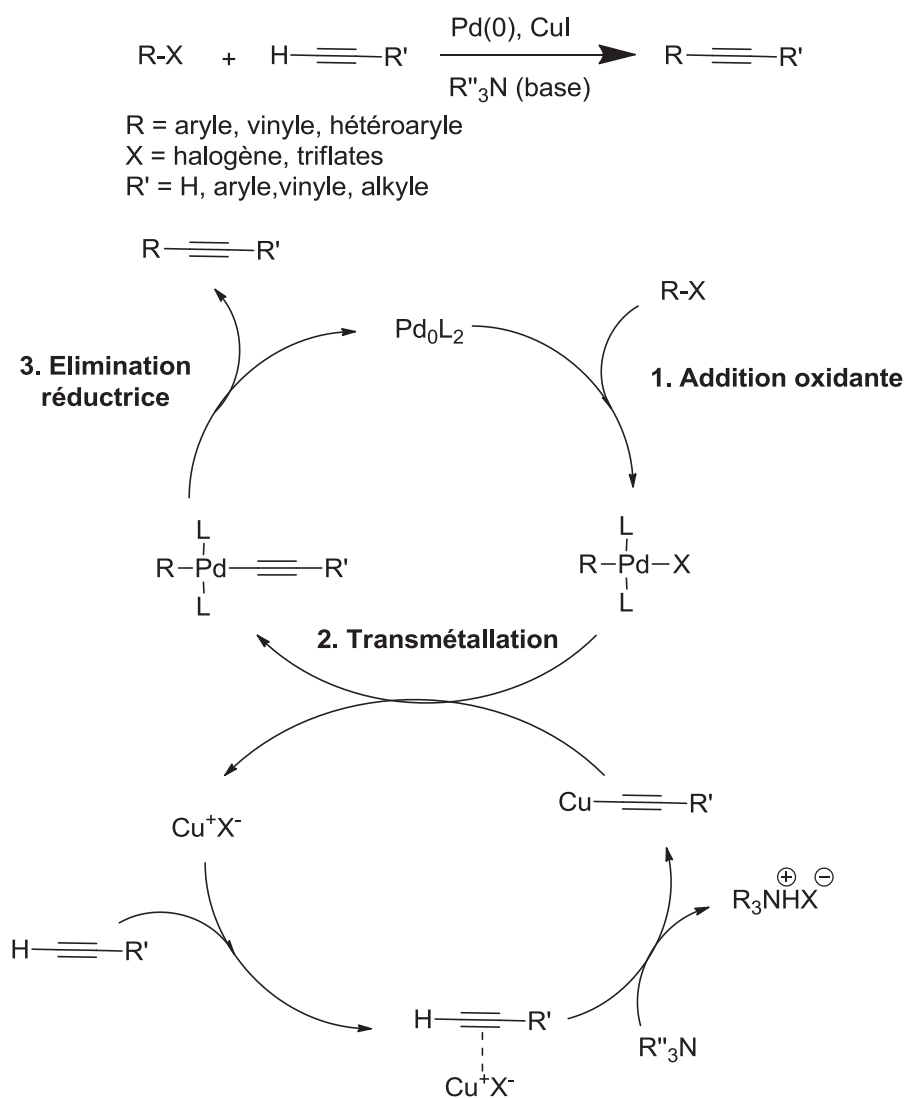


Schéma 69 : Mécanisme réactionnel du couplage croisé de Sonogashira

3.3 Conditions de la réaction

La réaction originale de Sonogashira est habituellement effectuée en utilisant un complexe de palladium-phosphine comme catalyseur ($Pd(PPh_3)_4$, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, $Pd(dppe)Cl_2$, $Pd(dppp)Cl_2$, $Pd(dppf)Cl_2$) en présence d'une quantité catalytique d'un sel de cuivre (I) comme co-catalyseur et une

amine (la triéthylamine) dans des conditions homogènes. Le plus souvent, des charges plutôt élevées de palladium (habituellement jusqu'à 5 moles%) et de grandes quantités de sel de cuivre (I) sont nécessaires lorsque ces espèces de palladium sont utilisées, stimulant ainsi la recherche d'un nouveau catalyseur plus actif en utilisant des conditions plus simples, plus douces et plus efficaces [281] [282].

L'ajout de cuivre, bien que bénéfique en termes d'augmentation de la réactivité du système, possède quelques inconvénients, le principal étant la nécessité d'éviter la présence d'oxygène afin de bloquer la formation indésirable de l'homo-couplage de l'alcyne selon la réaction de Hay/Glaser (schéma 70) [283].

Pour résoudre un tel problème, de nombreux travaux ont éliminé le cuivre dans ce type de couplage en utilisant uniquement le palladium comme catalyseur, et ils ont réussi à obtenir le produit désiré avec de bons rendements [284] [285].

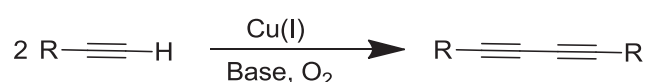


Schéma 70 : Réaction de Hay/Glaser

De nombreux travaux ont utilisé l'eau comme solvant dans ce genre de couplage catalysé par le palladium, vu que l'eau est plus sûre, peu coûteuse et les produits peuvent être facilement isolés par extraction, ce qui facilite le fonctionnement. Ainsi, l'utilisation de l'eau dans les réactions catalysées par le palladium représente l'une des options les plus viables économiquement et écologiquement pour de nombreuses transformations organiques [285].

4. Applications du couplage croisé de Suzuki-Miyaura et Sonogashira en série imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,2-*a*]quinoxaline et imidazo[1,5-*a*]quinoxaline

Notre laboratoire a utilisé le couplage croisé de Suzuki-Miyaura en vue d'introduire une large variété de groupements aryles en position 1 de la série des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines. Par l'intermédiaire de ce type de couplage, une trentaine des composés ont été synthétisés au sein du laboratoire avec de bons rendements (30%-98%) et ils ont été testés pour leur activité anti-cancéreuse sur le mélanome humain (schéma 71) [200] [286].

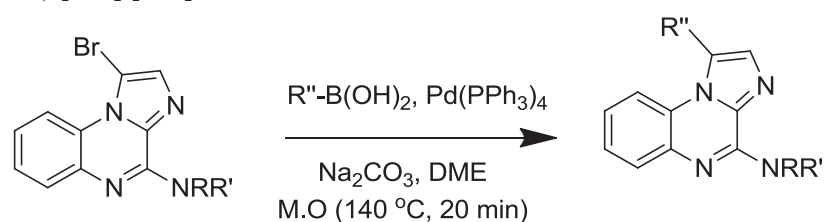


Schéma 71 : Couplage de Suzuki-Miyaura en série des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines

De même, par l'intermédiaire de la réaction de Suzuki-Miyaura, notre équipe a pu synthétiser des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines substitués par un méthyle ou un phényle en position 1. L'introduction de ces groupements se fait avant l'étape de cyclisation par le carbonyldiimidazole (schéma 72) [199].

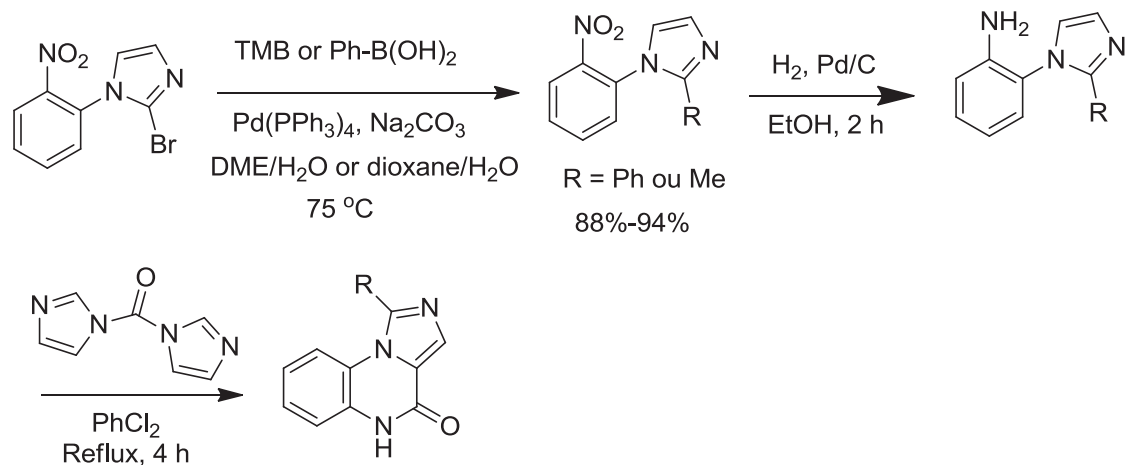


Schéma 72 : Couplage de Suzuki-Miyaura en série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines.

De plus, le couplage croisé de Suzuki-Miyaura a été largement utilisé dans la série des imidazo[1,2-*a*]pyrazines [295]. Par exemple, la réaction de Suzuki-Miyaura du 6-bromo-3-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine **4.1** et du 6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine **4.3** avec différents acides boroniques a donné les composés **4.2** et **4.4** respectivement. La bromation du composé **4.4** avec le NBS dans du DMF a donné le produit **4.5**, ce dernier subit un autre couplage croisé de Suzuki-Miyaura pour donner le produit disubstitué **4.6**. La chloration du 6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine **4.3** en position 3 avec le *N*-cholosuccinimide (NCS) dans le dichlorométhane a donné le composé **4.7**, ce dernier subit deux couplages croisés de Suzuki-Miyaura en position 6 et 3 afin d'obtenir le produit disubstitué **4.9** (schéma 73). Les composés **4.2** et **4.9** ont été évalués en tant qu'inhibiteurs compétitifs de l'ATP de CHK1 (Checkpoint kinase 1) [287].

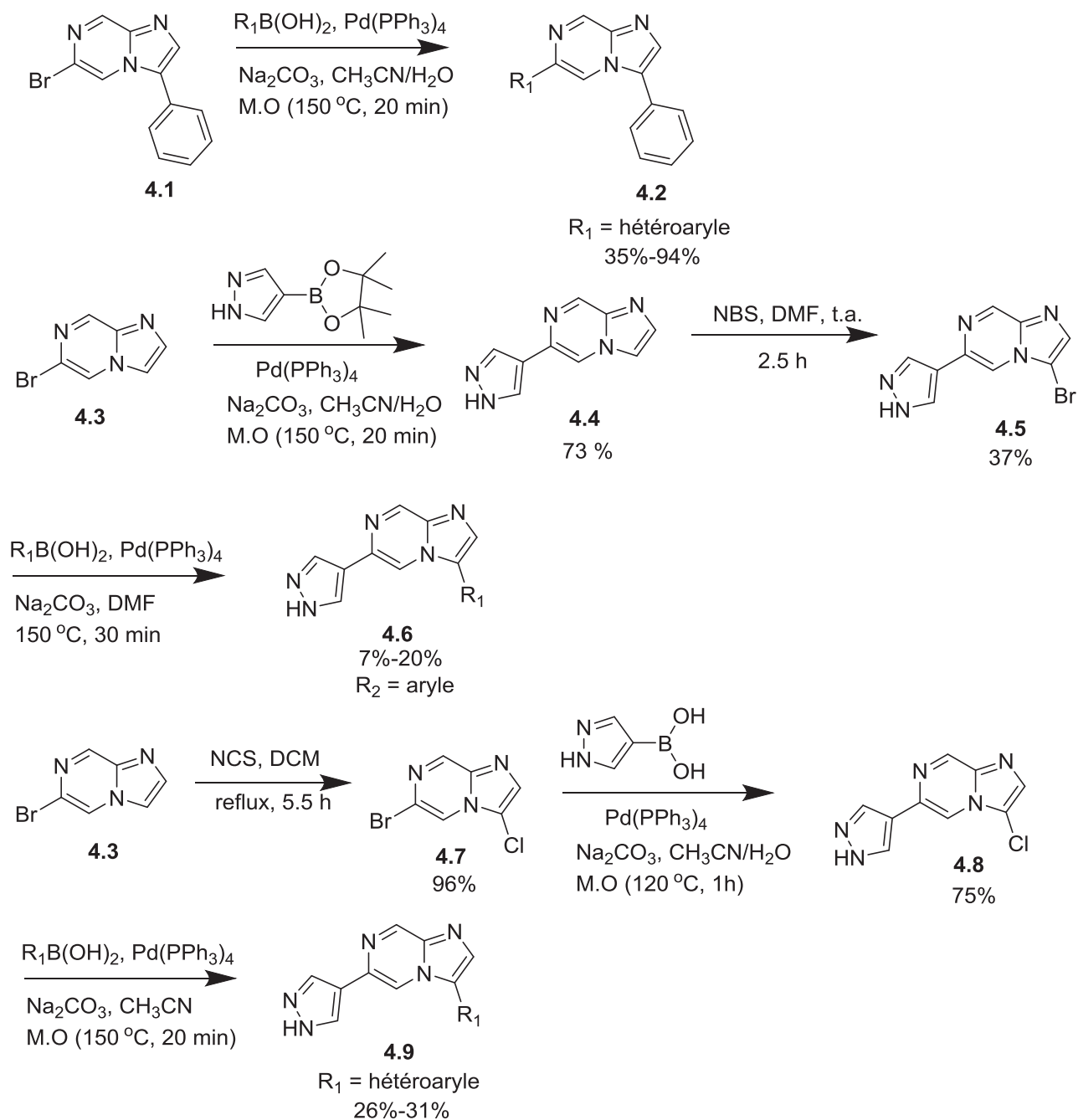


Schéma 73 : Couplage de Suzuki-Miyaura en série des imidazo[1,2-*a*]pyrazines

Belema et *coll.* ont rapporté la synthèse de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazine 3,5,6,8-tétrasubstitué par l'amination du composé **4.10** en position 8 avec de l'éthylènediamine protégée par Boc en présence de triéthylamine dans du THF pour obtenir le composé **4.11**. Le couplage croisé de Sonogashira à la position 6 avec l'éthynyltriméthylsilane (TMS) introduit un groupement alcyne conduisant au composé **4.12**. Ce dernier subit une chloration en position 5 avec le NCS dans du THF pour fournir le composé final **4.13** (schéma 74) [288].

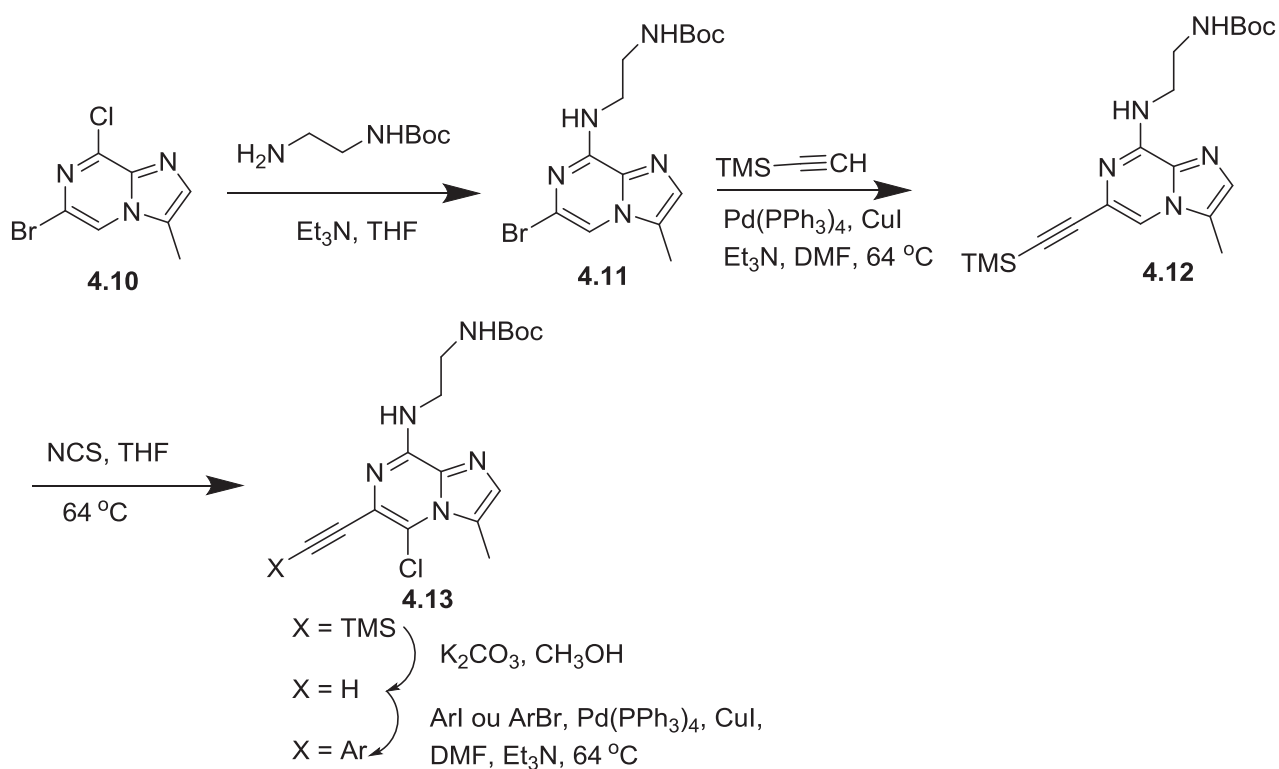


Schéma 74 : Couplage de Sonogashira en serie des imidazo[1,2-*a*]pyrazines.

En conclusion, les couplages croisés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira sont largement utilisés dans le domaine de la chimie médicinale et pharmaceutique. Les conditions réactionnelles douces et efficaces, la capacité d'introduire un nombre important de groupements fonctionnels et la faible toxicité des réactifs en font un des couplages pallado-catalysés les plus utilisés pour la création d'une liaison C-C.

CHAPITRE V : TRAVAUX REALISES

1. Premières synthèses réalisées

1.1 Synthèse des composés de type imidazo[1,5-*a*]quinoxaline

Nous avons débuté les travaux de synthèse chimique par la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines afin de tester leurs activités agoniste ou antagoniste sur les TLR7 et 8. D'après la littérature, aucun dérivé de cette série n'a été testé pour une telle activité, par contre des analogues structuraux (les imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, les imidazoquinolines, les pyrazoloquinolines et autres) [154] ont montré des résultats importants sur ce type de récepteurs.

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre III, il existe plusieurs stratégies de synthèse conduisant au développement des dérivés de type imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, nous avons choisi une voie de synthèse déjà développée au sein de notre laboratoire à partir du cycle imidazole, afin d'obtenir des dérivés substitués en position 1 (schéma 75) [199]. Vu l'importance du groupement alkyle dans l'obtention d'un effet agoniste TLR7/8, nous avons essayé d'introduire une chaîne alkyle en position 1 du cycle imidazole (schéma 75).

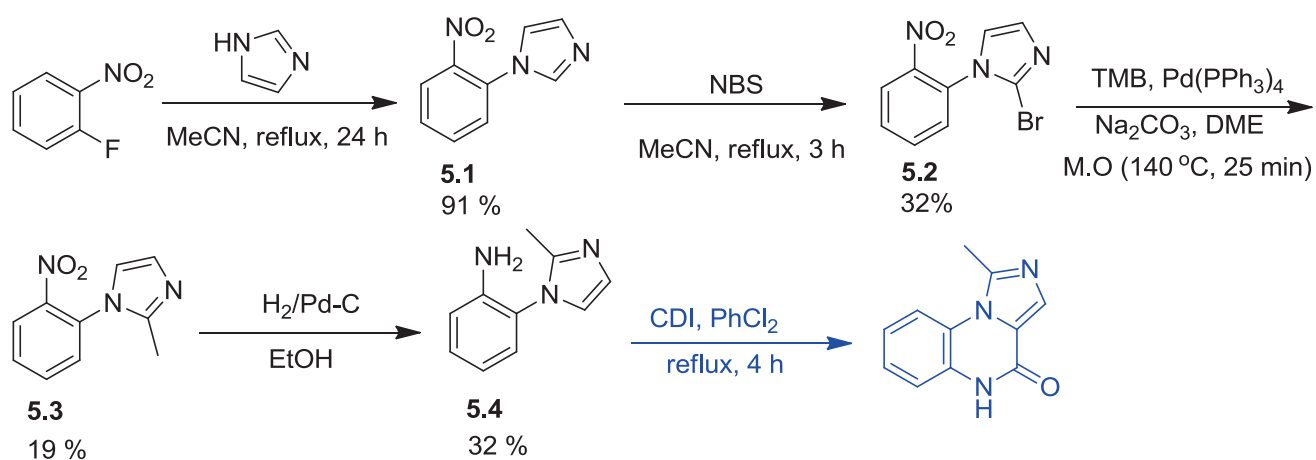


Schéma 75 : Premier essai de synthèse de la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines

La synthèse débute par le traitement de l'ortho-fluorobenzène avec l'imidazole en présence d'excès du carbonate de potassium conduisant au composé **5.1** avec un rendement de 91 %. L'introduction de substituants en position 1 de l'imidazole se fait par couplage croisé de Suzuki-Miyaura. Ce type de couplage a été utilisé au sein de notre laboratoire en vue d'introduire de groupements aryles au niveau de la série des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines. Nous avons premièrement essayé d'introduire un méthyle en utilisant le triméthylboroxine comme agent de méthylation en vue d'optimiser les conditions réactionnelles de la réaction de Suzuki-Miyaura sur ce type de composés. Après bromation du composé **5.1**, le composé méthylé **5.3** est obtenu, en faible rendement, par couplage croisé de Suzuki-

Miyaura en utilisant le tétrakis $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ comme catalyseur et le carbonate de sodium (Na_2CO_3) comme base. La réduction du groupement nitro par hydrogénation aboutit au composé **5.4** avec un rendement de 32%. Les faibles rendements obtenus ainsi que les étapes de purification difficiles nous ont empêchés d'obtenir le produit tricyclique.

Nous avons alors procédé de débiter la synthèse par l'imidazole méthylé en position 1 afin d'éviter la réaction de Suzuki-Miyaura au début de la synthèse ainsi que les faibles rendements. De plus, pour améliorer le rendement de l'étape de réduction du groupement nitro, nous avons effectué une réduction par l'hydrazine hydratée selon le protocole de Hoz et *coll.*[289] et nous avons obtenu un très bon rendement de 94%. Le schéma 76 montre la voie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines méthylés : le traitement de l'ortho-fluorobenzène avec le 2-méthylimidazole en présence d'excès du carbonate de potassium donne le composé **5.5** avec un rendement de 92 %. Après réduction du groupement nitro, le composé **5.7** est obtenu par cyclisation intramoléculaire conduisant à la structure tricyclique imidazoquinoxalinique avec un rendement de 93 %. Une étape de chloration est nécessaire pour obtenir, par substitution nucléophile, l'imidazo[1,5-*a*]quinoxaline aminé **5.9** avec un rendement de 79 %. Une fois que nous avons obtenu le produit méthylé en position 1, nous avons pensé effectuer la réaction de Suzuki-Miyaura en vue d'introduire d'autres substituants en position 3. Le problème auquel nous avons alors été confrontés était l'étape de bromation avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) qui nous a donné un mélange de deux produits : un produit monobromé et un autre produit dibromé. Nous avons essayé de purifier ces deux produits bromés par chromatographie colonne et par recristallisation à partir d'éthanol, mais dans les deux cas nous n'avons pas réussi à les séparer.

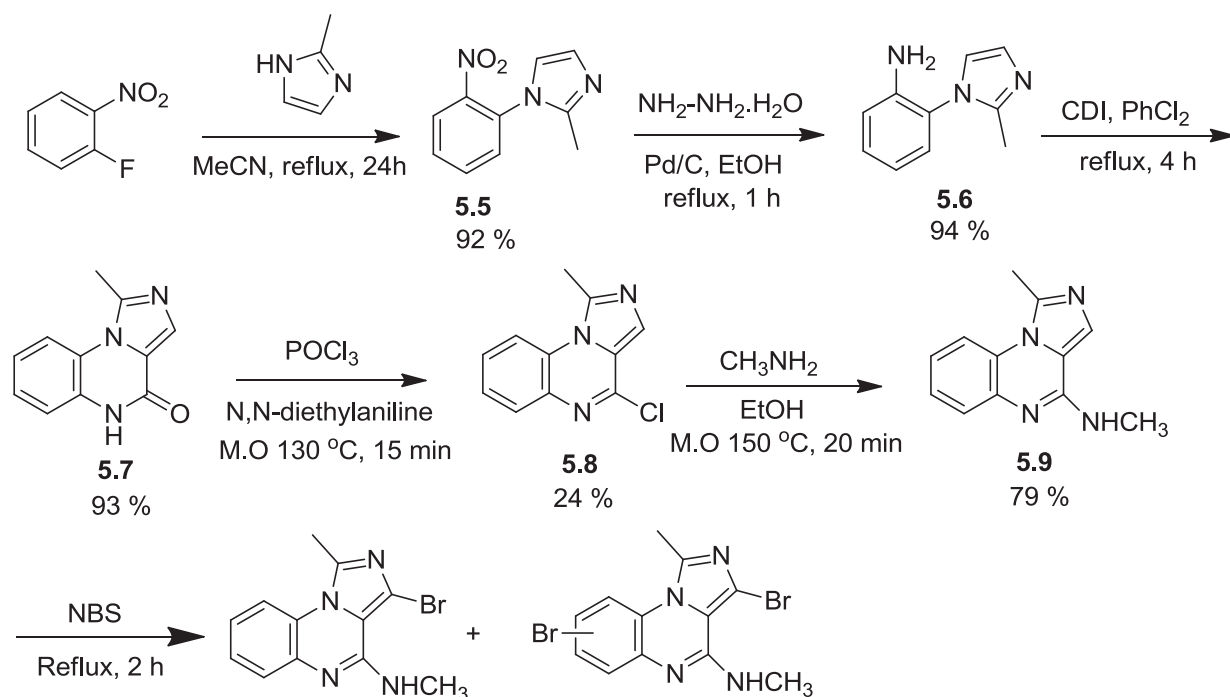


Schéma 76 : La voie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines méthylés

Vu que les deux stratégies citées ci-dessus ne nous permettent pas d'obtenir une grande variabilité structurale, nous avons utilisé une autre stratégie de synthèse, déjà décrite dans le laboratoire, qui nous conduit à la synthèse de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxaline non substitué [199]. Une fois ce composé obtenu, nous pouvons introduire une large variété de substituants chimiques par l'intermédiaire des couplages pallado-catalysés. Cette stratégie est illustrée dans le schéma 77 et elle débute par une condensation bimoléculaire de l'acide carboxylique en présence de chlorure de thionyle afin de donner le dimère **5.10** avec un rendement de 95%. Celui-ci est couplé avec l'orthofluoroaniline pour donner l'intermédiaire **5.11** avec un rendement de 40%. La formation du composé tricyclique **5.12** se fait par cyclisation intramoléculaire du composé **5.11** en présence d'hydrure de sodium et de diméthylacétamide comme solvant avec un rendement de 81 %. Le traitement du dérivé **5.12** avec l'oxychlorure de phosphore permet l'obtention du composé **5.13** qui est ensuite couplé à une amine en présence d'éthanol pour former le composé **5.14** avec un rendement de 75%. Une étape de bromation avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) permet l'obtention de deux isomères monobromés **5.15** et **5.16** avec un rendement de 13 % et 17%, et un produit dibromé **5.17** avec un rendement de 5 %.

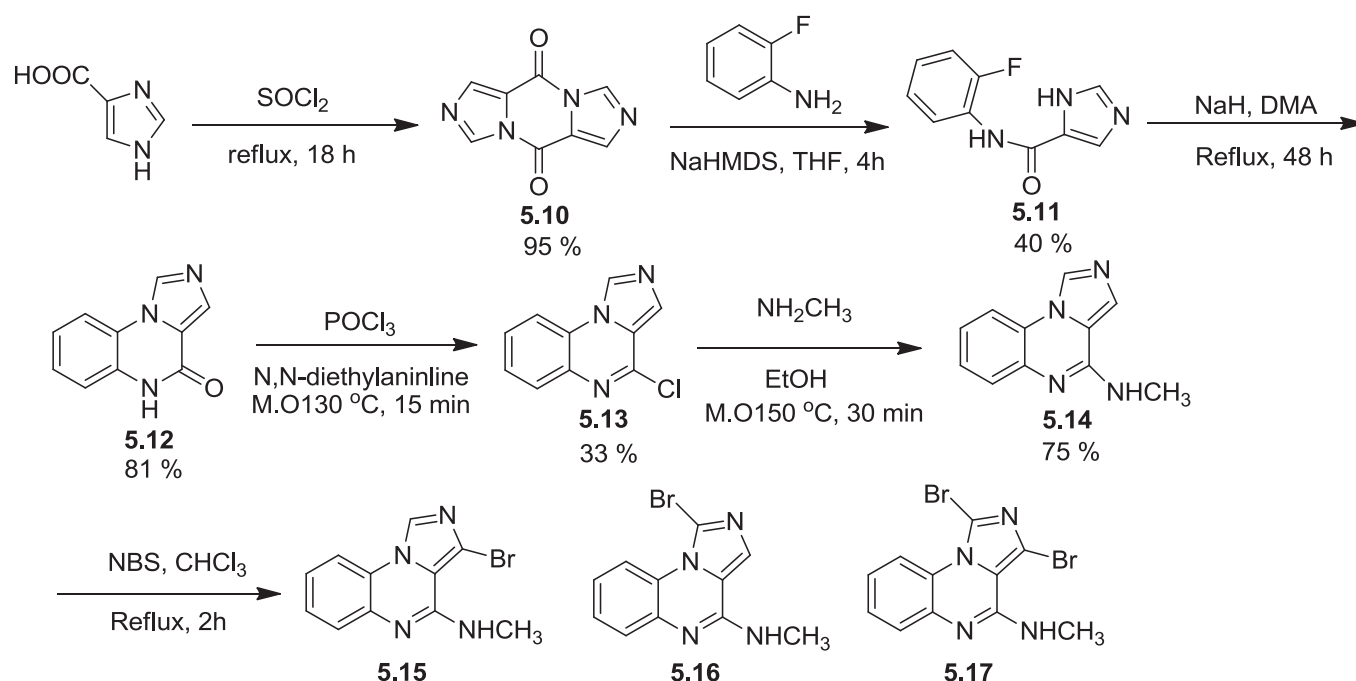


Schéma 77 : Nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines

Ces trois produits bromés sont séparés par flash chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant le cyclohexane/acétate d'éthyle. La position du brome pour les composés **5.15** et **5.16** est démontrée par étude RMN NOE (Nuclear Overhauser Effect) (figure 49). Dans le spectre A du composé **5.15**, nous trouvons une corrélation entre le proton H1 et le proton H9, par contre cette corrélation est absente dans le cas du composé **5.16** (spectre B).

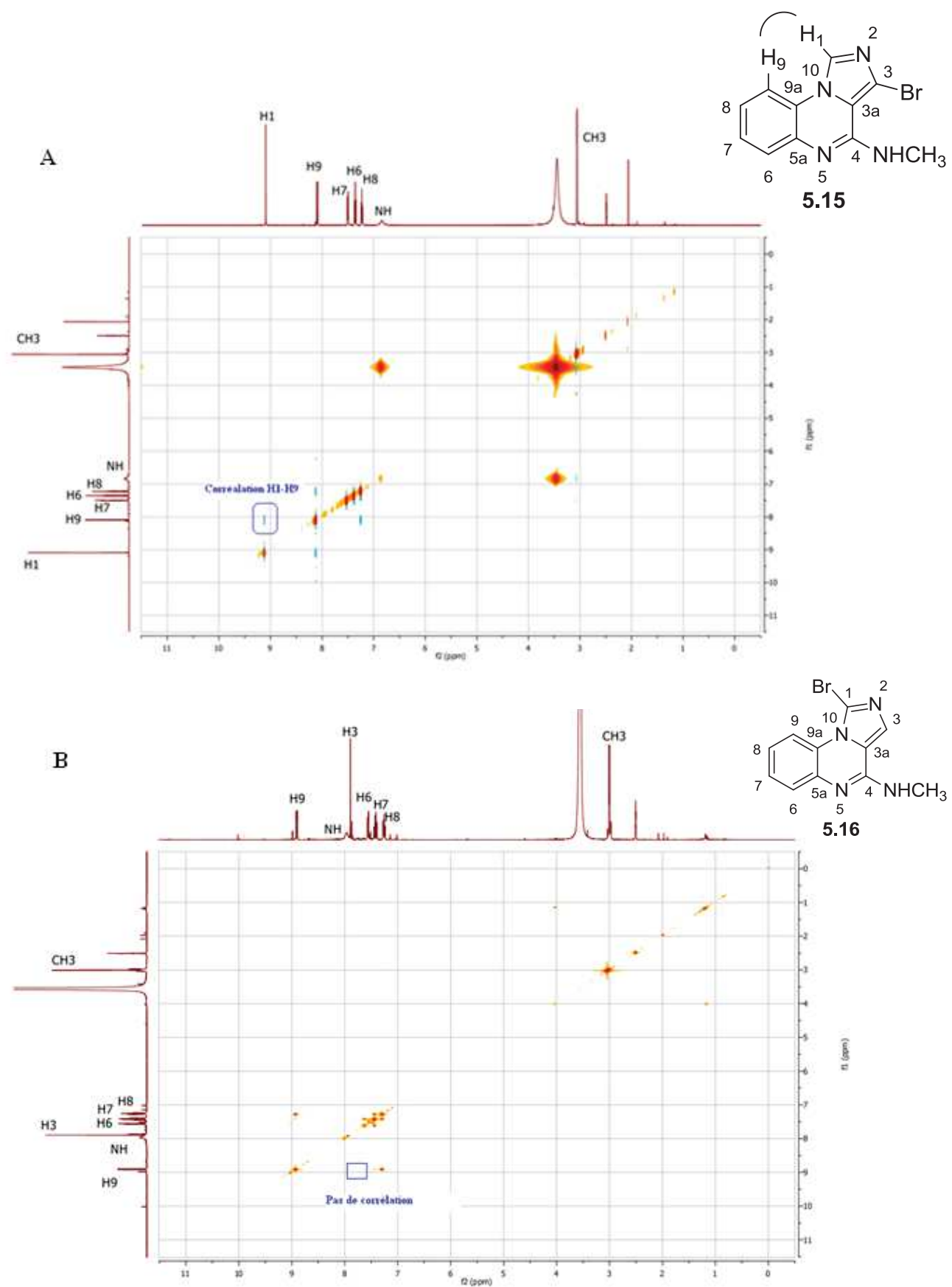


Figure 49 : Spectres RMN NOE des deux isomères bromés **5.15** et **5.16**

1.2 Synthèse des composés de type pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline

Parallèlement à la synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, nous avons effectué la synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre III, cette série n'est pas très développée dans la littérature, pour cela nous avons essayé de trouver une nouvelle stratégie de synthèse qui nous permet d'introduire une variété de substituants. Premièrement, comme dans le cas des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, nous avons essayé la même stratégie de synthèse décrite dans le schéma 75, mais la réaction de Suzuki-Miyaura entre le TMB et le produit bromé n'a pu être obtenue et nous avons récupéré le produit de départ (schéma 78).

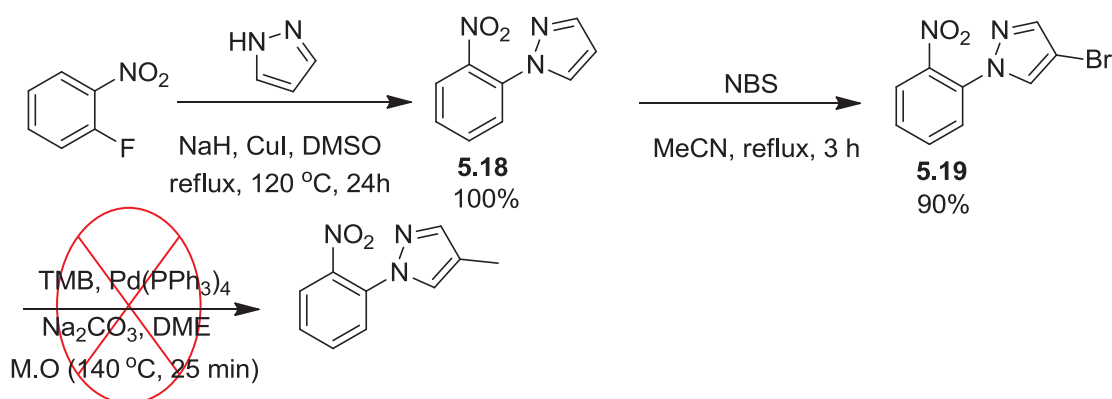


Schéma 78 : Premier essai de synthèse de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

Nous avons alors débuté la synthèse avec le pyrazole méthylé en position 4 en vue d'éviter la réaction de Suzuki-Miyaura et d'accéder directement à la structure tricyclique pyrazoloquinoxalinique. Par contre, l'étape de cyclisation par le carbonyldiimidazole (CDI) n'a pas abouti au produit désiré (schéma 79). D'après une recherche bibliographique, nous n'avons trouvé aucune référence qui nous permette d'obtenir le composé tricyclique à partir du composé 5.21 qu'il soit méthylé ou pas.

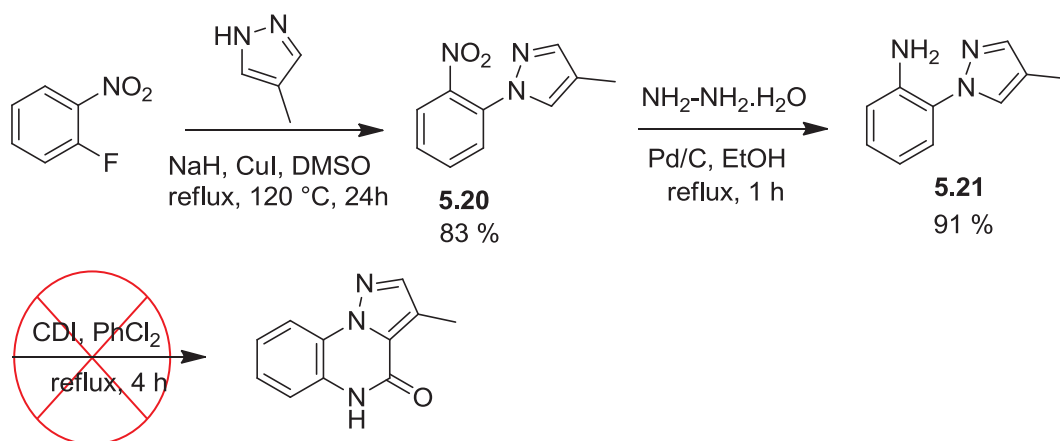


Schéma 79 : Deuxième essai de synthèse de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

En 2008, notre équipe a appliqué la même stratégie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines, décrite dans le schéma 77, pour obtenir des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines [209]. Ces derniers sont synthétisés à partir de l'acide pyrazolocarboxylique substitué par un isobutyle en position 3 afin d'obtenir des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines isobutylés. Dans notre cas, nous avons utilisé cette stratégie pour la synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines non substitués afin d'introduire une variété de substituants en fin de synthèse (schéma 80).

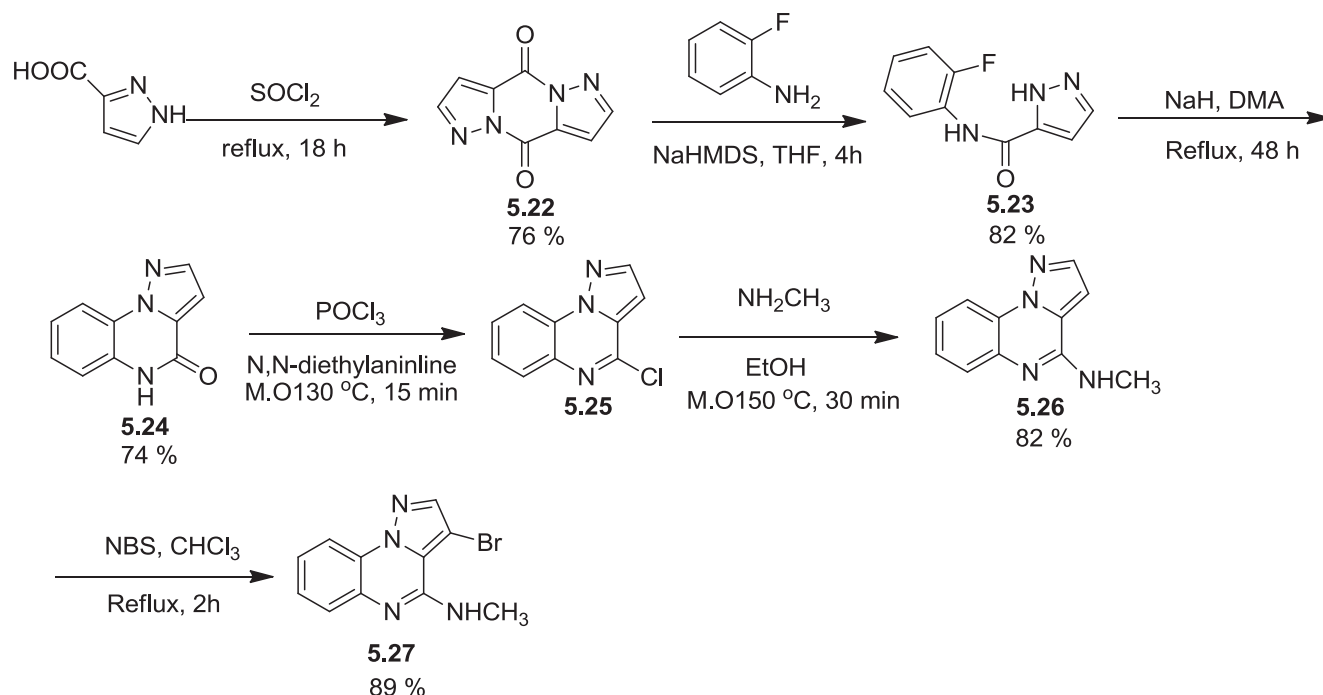


Schéma 80 : Nouvelle stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

Le dimère **5.22** résulte de la condensation bimoléculaire de l'acide carboxylique en présence de chlorure de thionyle avec un rendement de 76 %. Celui-ci est couplé avec l'ortho-fluoroaniline pour donner l'intermédiaire **5.23**. La formation du composé tricyclique **5.24** se fait par cyclisation intramoléculaire du composé **5.23** en présence d'hydrure de sodium et de diméthylacétamide comme solvant. Le traitement du dérivé **5.24** avec l'oxychlorure de phosphore permet l'obtention du composé **5.25** qui est ensuite couplé à une amine en présence d'éthanol pour former le composé **5.26**. Une étape de bromation avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) permet l'obtention d'un seul produit bromé **5.27**. La présence du brome en position 4 a été démontrée par étude RMN 2D (HMQC et HMBC).

Vu l'obtention d'un seul produit bromé, nous avons décidé d'optimiser la réaction de Suzuki-Miyaura en utilisant le composé **5.27** comme substrat. Une fois les conditions réactionnelles mises en point, nous pouvons les appliquer sur les produits bromés de la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines.

A ce jour, aucun couplage croisé n'a été réalisé sur la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines, nous avons alors pensé à effectuer la réaction de Suzuki-Miyaura en utilisant premièrement des acides arylboroniques qui donnent, d'après la littérature, de bons rendements. L'introduction du groupement

phényle C₆H₅- a permis l'obtention du composé **5.28a** avec un bon rendement de 55% en utilisant les conditions classiques : le tétrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (Pd(PPh₃)₄) comme catalyseur et le carbonate de sodium comme base. En revanche, l'introduction de groupements furanyle, 3,4-diméthoxyphényle et méthyle a donné de très faibles rendements de 5%, 3% et 1% respectivement (schéma 81, tableau 2). Quand nous avons effectué le couplage avec l'acide isobutylboronique, le produit débromé a été obtenu avec le produit de départ.

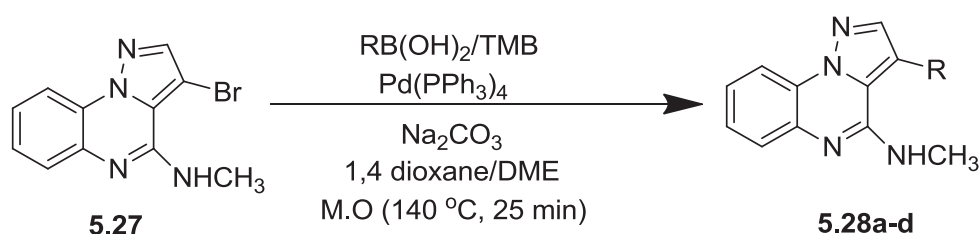


Schéma 81 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura sur la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

Tableau 2 : Les dérivés pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines obtenus après la réaction de Suzuki-Miyaura

Composés	R	Formule brute	Rendement
5.28a		C ₁₇ H ₁₄ N ₄	55 %
5.28b		C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₂	5 %
5.28c		C ₁₅ H ₁₂ N ₄ O	3 %
5.28d	CH ₃ -	C ₁₂ H ₁₂ N ₄	1%

Nous avons donc cherché à optimiser ces conditions afin d'améliorer le rendement. Suite à une recherche bibliographique, nous avons trouvé que l'utilisation du catalyseur Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ avec le carbonate de césium ou de potassium comme base permet l'amélioration du rendement[290]. Nous avons donc appliqué ces conditions en faisant réagir le composé **5.27** avec le triméthylboroxine en présence du Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ et du Cs₂CO₃ dans le 1,4-dioxane comme solvant et nous avons obtenu une nette amélioration du rendement de 1% à 27% (schéma 82).

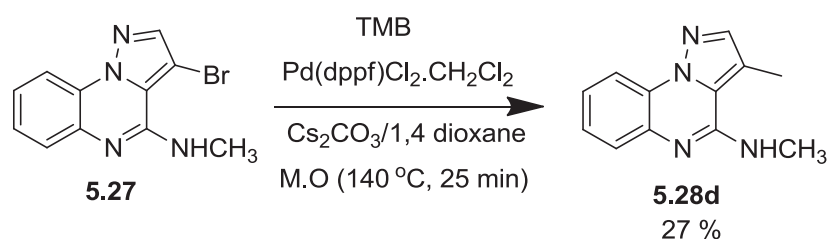


Schéma 82 : Méthylation par couplage croisé de Suzuki-Miyaura en présence du Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ comme catalyseur et Cs₂CO₃ comme base

En 2001, Zou et *coll.* ont observé que les sels d'Ag (I) augmentent de manière significative les couplages croisés de Suzuki-Miyaura avec les acides *n*-alkylboroniques en présence de Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ et du carbonate de potassium dans le tétrahydrofurane à 80 °C [282]. L'addition de l'oxyde d'argent à notre réaction, décrite dans le schéma 82, en utilisant les mêmes conditions décrites par Zou et *coll.* conduit à une augmentation significative du rendement du 27 % à 74 % (schéma 83).

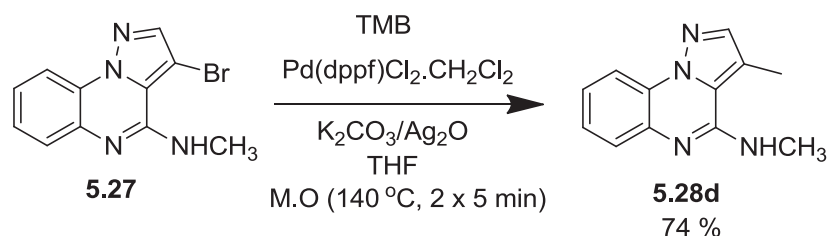


Schéma 83 : Couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant l'oxyde d'argent

Ces conditions expérimentales sont aussi appliquées pour la méthylation d'autres séries chimiques comme les imidazo[1,2-*a*]pyrazines et les imidazo[1,2-*a*]quinoxalines.

Des essais de méthylation ont été également effectués en utilisant le THF comme solvant et le tétrakis Pd(PPh₃)₄ comme catalyseur. Dans ce cas, un arrêt d'urgence du chauffage par micro-ondes (M.O.) a eu lieu et le produit de départ a été récupéré. Cela peut être dû à la faible solubilité du tétrakis dans le THF conduisant à une diminution dans l'absorption M.O. Par contre l'utilisation d'un catalyseur plus soluble dans le THF comme le Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ nous a permis d'obtenir le produit désiré avec un bon rendement sans aucune coupure M.O. L'ajout d'oxyde d'argent aboutit à une diminution de la solubilité du catalyseur Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ ainsi qu'une diminution dans l'absorption M.O, cela se traduit par une coupure de la M.O. après 5 min de réaction en raison de la haute puissance délivrée (augmentation jusqu'à 300 W). Néanmoins, en utilisant ce système catalytique, le produit méthylé est obtenu avec un très bon rendement.

Ces résultats prometteurs obtenus ont donné lieu à une publication intitulée « Methylation of imidazopyrazine, imidazoquinoxaline, and pyrazoloquinoxaline through Suzuki-Miyaura cross coupling » dans le journal de Chemistry of Heterocyclic Compounds.

Par contre, l'application de ces conditions avec d'autres acides *n*-alkylboroniques comme l'acide *n*-butylboronique ou l'acide *n*-pentylboronique n'a pas abouti aux produits désirés et nous avons obtenu le produit de départ avec le produit débromé.

Methylation of imidazopyrazine, imidazoquinoxaline, and pyrazoloquinoxaline through Suzuki–Miyaura cross coupling

Nour Bou Karroum^{1,2**}, Cindy Patinote^{1,3**}, Carine Deleuze-Masquéfa¹, Georges Moarbess², Mona Diab-Assaf², Pierre Cuq¹, Issam Kassab², Pierre-Antoine Bonnet^{1*}

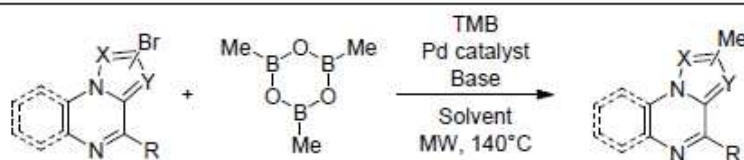
¹ IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France; e-mail: pierre-antoine.bonnet@umontpellier.fr

² Tumorigenèse et Pharmacologie Antitumorale, Lebanese University, EDST, BP 90656, Fanar Jdeideh, Lebanon; e-mail: gmoarbess@hotmail.com

³ Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT AxLR), CSU, 950 rue Saint Priest, 34090 Montpellier, France; e-mail: cindy.patinote@gmail.com

Published in Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii, 2018, 54(2), 183–187

Submitted September 9, 2017
Accepted after revision December 21, 2017



X = CH, Y = N or X = N, Y = CH; R = NH₂, NHMe

The Suzuki–Miyaura cross coupling is a versatile and powerful reaction for carbon–carbon bond formation which nevertheless requires optimization of conditions. While the coupling of arylboron derivatives with aryl or alkenyl halides has been widely explored, alkylation has attracted less attention. We describe herein the methylation of bromo derivatives of imidazopyrazine, imidazoquinoxaline, and pyrazoloquinoxaline having biologically interesting structures. As the challenging Suzuki–Miyaura reaction is highly substrate-dependent, the choices of the base, solvent, and additive are also discussed.

Keywords: imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline, methylation, Suzuki–Miyaura cross coupling.

Imidazopyrazines, imidazoquinoxalines, and pyrazoloquinoxalines exhibit high potential as pharmacologically active compounds.¹ In the course of our studies concerning the total synthesis of imidazopyrazines, imidazoquinoxalines, and pyrazoloquinoxalines as potential anticancer and anti-inflammatory agents,² especially for IKK inhibition,³ we decided to substitute the imidazole or the pyrazole cycle with a methyl group. There are many possibilities to build alkyl–aryl bonds. Some of the most common methods involve the use of transition metal-mediated reactions. Among them, the easier and milder method involves the Suzuki–Miyaura cross coupling.⁴ While the coupling between arylboronic acids and aryl or alkenyl halides has been widely described,⁵ alkylation using alkylboronic acids has been far less studied.⁶ *N*-alkylboronic acids are often alkylating agents of low reactivity even under forcing conditions and deliver poor reaction yields.

To the best of our knowledge, the first example of cross-coupling reaction between an alkylboron derivative and two of the three above-mentioned fused heterocycles has

been described only very recently.³ We present herein the results of our research toward the optimization of the conditions for the methylation of imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline.

Trimethylboroxine (TMB) was used as methylating reagent, since it has been particularly useful for the methylation of a variety of aryl halides.⁷ We further explore the modification of some reaction parameters, such as catalyst, base, solvent, and reaction time. All the reactions were assisted by microwave irradiation.

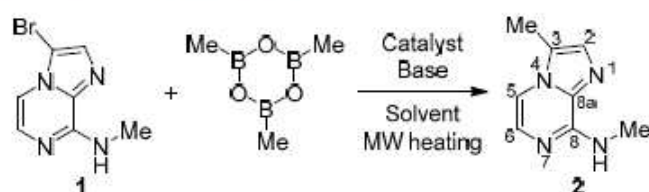
Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (Pd(PPh₃)₄) (0.1 equiv) and sodium carbonate (2.0 equiv) are usually employed as catalytic system in dimethoxyethane–water, 2:1, for the Suzuki–Miyaura cross coupling between imidazopyrazine or imidazoquinoxaline derivatives and an arylboronic acid (1.1 equiv) in our laboratory. The reactions were carried out under microwave irradiation during 20 min at 140°C. Under these conditions, the reactions proceeded readily, cleanly, and with good yields.⁸

Methylation of imidazo[1,2-*a*]pyrazine. For the methylation reaction of 3-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**1**) at position 3, we first used the classical

**These authors contribute equally to this work.

Table 1. Screening of reaction parameters for the methylation of 3-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**1**)*

Entry	Catalyst	Base (2 equiv)	Solvent	Time, min	Power, W	Yield of compound 2 , %
1	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	Na ₂ CO ₃	DME–H ₂ O, 2:1	20	50	49
2	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	K ₂ CO ₃	1,4-Dioxane–H ₂ O, 2:1	20	50	32
3	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	K ₂ CO ₃	THF	–	–	0
4	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	Cs ₂ CO ₃	THF–H ₂ O, 2:1	20	50	58
5	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	Cs ₂ CO ₃	1,4-Dioxane–H ₂ O, 2:1	20	50	<10
6	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃	THF	20	50	55
7	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃	THF	10	50	42
8	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃ + Ag ₂ O (2 equiv)	THF	2 × 5	300	58

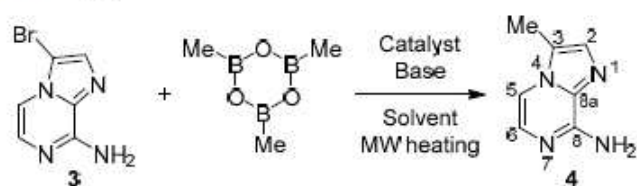
* Molar ratio compound **1** – TMB, 1:1:1. Temperature setting 140°C.**Scheme 1.** Methylation of 3-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**1**)

catalytic system for the Suzuki–Miyaura cross coupling, i.e., Pd(PPh₃)₄, sodium carbonate in dimethoxyethane–water, 2:1, under conditions described above (Scheme 1). The microwave system automatically adjusts the irradiation power to 50 W (Table 1, entry 1). The moderate yield of methylation product **2** which was obtained by this method prompted us to try another base and other ethers as solvents to improve this result. Using potassium carbonate in 1,4-dioxane–water, 2:1, gave lower yields (Table 1, entry 2). When potassium carbonate in tetrahydrofuran without water was used the microwave system automatically turned off, since the set temperature could not be reached due to the high media permeability to MW radiation, and no coupling reaction was observed (Table 1, entry 3). The use of cesium carbonate in tetrahydrofuran–water, 2:1, gave a promising result (Table 1, entry 4).

We then tried another well described catalyst,⁹ [1,1'-bis-(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) complex with dichloromethane (Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂), in association with cesium carbonate in 1,4-dioxane–water, 2:1. The result was largely non-convincing (Table 1, entry 5). Potassium carbonate in tetrahydrofuran allowed us to obtain compound **2** with an encouraging yield (Table 1, entry 6). Reducing the reaction time did not allow us to obtain a similar yield (Table 1, entry 7). Interestingly, with the use

of a more soluble catalyst, no turning off of the microwave system was observed, even in the absence of water, contrary to the result obtained with Pd(PPh₃)₄. Silver salts have been observed to significantly enhance the cross coupling of *n*-alkylboronic acids and simple aryl or alkenyl halides.¹⁰ For example, Zou et al. observed that Ag(I) salts significantly enhance Suzuki–Miyaura cross couplings of *n*-alkylboronic acids in combination with Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ and potassium carbonate in tetrahydrofuran at 80°C.¹¹ The addition of silver oxide to our reaction, leading to lower solubility of the catalyst and decreased MW absorption, caused the microwave system to turn off after 5 min because of the high delivered power (up to 300 W) (Table 1, entry 8). Nevertheless, as could be expected considering the literature data, such catalytic system led to increased yield of compound **2**.

The worst and the best conditions leading to compound **2** (Table 1, entries 5 and 8) were then used on imidazopyrazine derivative **3** to obtain methylated compound **4** (Scheme 2), and the results confirmed the high efficiency of the catalytic systems Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃ in DME–H₂O, 2:1, and Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, K₂CO₃, Ag₂O in THF (Table 2). The benefit of the addition of silver oxide is clearly confirmed in this latter case.

Scheme 2. Methylation of 3-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**3**)**Table 2.** Screening of reaction parameters for the methylation of 3-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**3**)*

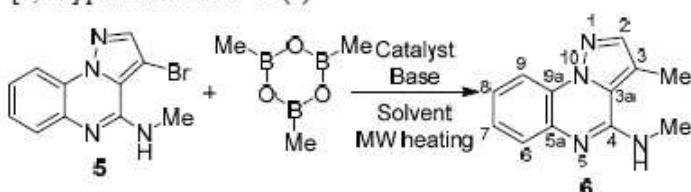
Entry	Catalyst	Base (2 equiv)	Solvent	Time, min	Power, W	Yield of compound 4 , %
1	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	Na ₂ CO ₃	DME–H ₂ O, 2:1	20	50	57
2	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	Cs ₂ CO ₃	1,4-Dioxane–H ₂ O, 2:1	20	50	<10
3	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃	THF	20	50	10
4	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃	THF	10	50	7
5	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃ + Ag ₂ O (2 equiv)	THF	2 × 5	300	60

* Molar ratio: compound **3** – TMB, 1:1:1. Temperature setting 140°C.

Table 3. Screening of reaction parameters for the methylation of 3-bromo-*N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (5)*

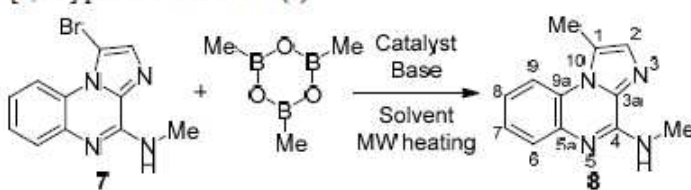
Entry	Catalyst	Base (2 equiv)	Solvent	Time, min	Power, W	Yield of compound 6, %
1	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	Na ₂ CO ₃	DME–H ₂ O, 2:1	20	50	1
2	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	Cs ₂ CO ₃	1,4-Dioxane–H ₂ O, 2:1	20	50	27
3	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃	1,4-Dioxane–H ₂ O, 2:1	20	50	26
4	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃ + Ag ₂ O (2 equiv)	THF	2 × 5	300	74

* Molar ratio: compound 5 – TMB, 1:1.1. Temperature setting 140°C.

Scheme 3. Methylation of 3-bromo-*N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (5)

Methylation of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. The methylation of 3-bromo-*N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (5) was also studied with TMB to afford methylated compound 6 (Scheme 3). We first tried the classical conditions. The very low yield clearly prompted us to optimize the cross-coupling conditions (Table 3, entry 1). Such as previously, we turned our attention to Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ as catalyst. By reacting pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline 5 with TMB in the presence of Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ and cesium or potassium carbonate in 1,4-dioxane–H₂O, 2:1, a significant improvement of the yield from 1 to 27 and 26%, respectively, was observed (Table 3, entries 2 and 3). Addition of silver oxide to the mixture containing pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline 5, TMB, Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ as catalyst, and potassium carbonate in THF led to a better result (Table 3, entry 4). This addition led again to switching off the reactor after 5 min due to the high delivered power. However, the best yield was obtained with this catalytic system.

Methylation of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline. By analogy with the imidazo[1,2-*a*]pyrazine structure, the methylation

Scheme 4. Methylation of 1-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (7)**Table 4.** Screening of reaction parameters for the methylation of 1-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (7)*

Entry	Catalyst	Base (2 equiv)	Solvent	Time, min	Power, W	Yield of compound 8, %
1	Pd(PPh ₃) ₄ (5 mol %)	Na ₂ CO ₃	DME–H ₂ O, 2:1	20	50	24
2	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂ (10 mol %)	K ₂ CO ₃ + Ag ₂ O (2 equiv)	THF	2 × 5	300	59

* Molar ratio compound 7 – TMB, 1:1.1. Temperature setting 140°C.

at position 1 of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline 7 (Scheme 4) was also performed with the best catalytic systems (Table 4). The obtained results confirmed the interest in both of these two systems, contrary to the case of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline for which the use of Pd(PPh₃)₄ exhibits a detrimental effect on the coupling.

For all experiments, TLC analyses indicated complete consumption of the starting material with the presence of the dehalogenated compound as the only by-product, except for in one case (Table 3, entry 1), where some amount of the starting material was also recovered. The low yield obtained when our systems, imidazopyrazine (Table 1, entries 2 and 3) or pyrazoloquinoxaline (Table 3, entry 1), were coupled with TMB under classical conditions could be explained by their weak reactivity during the oxidative addition step. The use of Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ as catalyst and cesium carbonate or potassium carbonate as base significantly improved the yields (Table 1, entry 6; Table 3, entries 2 and 3). Such good results can be explained, firstly, by the electron-rich phosphine of Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ which promotes the oxidative addition and facilitates transmetalation and reductive elimination processes.¹² Moreover, we have observed that Ag(I) salts significantly enhance Suzuki–Miyaura cross coupling yields (Table 1, entry 8; Table 2, entry 5; Table 3, entry 4; Table 4, entry 2) by improving the reactivity of trimethylboroxine during the transmetalation step and activating the precatalyst Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ via trapping of Cl[−]. As already stated, a combination of silver(I) salt and an inorganic base accelerates the B-to-Pd alkyl transfer step of the catalytic cycle and thus accelerates the overall reaction rate.¹³

In conclusion, the methylation study of imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline allows us to highlight the high value of a good general catalytic system to be used under microwave irradiation: trimethylboroxine, Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, K₂CO₃, and Ag₂O in THF. This system leads to good yields, and the reaction is clean and proceeds quickly.

Experimental

^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained on Bruker AC-400 (400 and 100 MHz, respectively) and AC-600 (^{13}C NMR spectrum of compound **6** only, 150 MHz) spectrometers; the residual dimethylsulfoxide (2.46 ppm for ^1H nuclei and 40.0 ppm for ^{13}C nuclei) or chloroform (7.28 ppm for ^1H nuclei and 77.01 ppm for ^{13}C nuclei) signal was used as reference. ^{13}C signals were assigned using ^1H - ^{13}C HMBC and ^1H - ^{13}C HMQC methods. Mass spectra were obtained on a Waters Micromass Q-ToF spectrometer equipped with ESI source operating in positive mode at 50–1500 Da; capillary and cone tension were 3000 and 20 V, respectively. High-resolution mass spectra were obtained by direct introduction of the sample on a Waters Synapt G2-S mass spectrometer equipped with ESI source operating in positive mode at 100–1500 Da; the capillary and cone tension were 1000 and 30 V, respectively; the source and desolvation temperatures were 120 and 250°C, respectively. Microwave-assisted organic syntheses were performed on a Biotage Initiator 2.0 microwave synthesizer; reaction time and temperature were set and power was automatically adjusted; the pressure was a dependent parameter of the reaction and was merely registered. The reaction products were purified on a Biotage HPFC system. All purchased chemicals were used without further purification. The synthesis of compounds **1**, **3**, **5**, and **7** have been described previously.^{3,14}

Methylation of 3-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (1), 3-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (3), 3-bromo-*N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (5), and 1-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (7) (General procedure). Method I (Pd(PPh₃)₄ catalyst). Bromine derivative **1**, **3**, **5**, or **7** (100 mg), TMB (1.1 equiv), the selected base (2.0 equiv), and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.05 equiv) were charged into a microwave flask. An appropriate solvent or solvent mixture (7 ml) was added. The flask was sealed and submitted to microwave irradiation, the synthesizer being set to keep constant temperature at 140°C for 20 min with magnetic stirring. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and then filtered on a Celite pad and washed with ethanol. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography to obtain the desired compound (elution with cyclohexane–AcOEt, 3:7 to 1:9).

Method II (Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ catalyst). Bromine derivative **1**, **3**, or **5** (100 mg), TMB (1.1 equiv), the selected base (2.0 equiv), and [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) dichloromethane complex (0.1 equiv) were charged into a microwave flask. An appropriate solvent or solvent mixture (7 ml) was added. The reaction was carried out and worked up as in method I.

Method III (Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂–Ag₂O catalyst). Bromine derivative **1**, **3**, **5**, or **7** (100 mg), TMB (1.1 equiv), potassium carbonate (2.0 equiv), silver oxide (2.0 equiv), and [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) dichloromethane complex (0.1 equiv) were

charged into a microwave flask. Tetrahydrofuran was added (7 ml). The flask was sealed and submitted to microwave irradiation to reach temperature of 140°C for 5 min with magnetic stirring (single mode Biotage). As the delivered power reached 300 W, the microwave synthesizer automatically turned off. A second run set to temperature 140°C for 5 min was done. The workup was carried out as in method I.

***N*,3-Dimethylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (2).**^{3b} Beige solid, mp 165–166°C. ^1H NMR spectrum (DMSO-*d*₆), δ , ppm (*J*, Hz): 2.39 (3H, s, CH₃); 2.92 (3H, d, *J* = 6.0, NHCH₃); 7.25 (1H, s, H-2); 7.30 (1H, d, *J* = 8.0, H-6); 7.33–7.34 (1H, m, NH); 7.51 (1H, d, *J* = 8.0, H-5). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-*d*₆), δ , ppm: 8.9 (CH₃); 27.6 (NHCH₃); 107.7 (C-5); 123.0 (C-3); 128.3 (C-6); 129.7 (C-2); 132.9 (C-8a); 149.9 (C-8). Mass spectrum, *m/z*: 162.9 [M+H]⁺. Found, *m/z*: 163.0986 [M+H]⁺. C₈H₁₁N₄. Calculated, *m/z*: 163.0978.

3-Methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (4).¹⁵ Beige solid, mp 238–239°C. ^1H NMR spectrum (DMSO-*d*₆), δ , ppm (*J*, Hz): 2.39 (3H, s, CH₃); 6.78 (2H, s, NH₂); 7.22 (1H, d, *J* = 8.0, H-6); 7.28 (1H, s, H-2); 7.55 (1H, d, *J* = 8.0, H-5). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-*d*₆), δ , ppm: 8.9 (CH₃); 108.4 (C-5); 123.0 (C-3); 128.3 (C-6); 130.2 (C-2); 132.1 (C-8a); 150.7 (C-8). Mass spectrum, *m/z*: 149.2 [M+H]⁺. Found, *m/z*: 149.0828 [M+H]⁺. C₇H₉N₄. Calculated, *m/z*: 149.0822.

***N*,3-Dimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (6).** White solid, mp 171–173°C. ^1H NMR spectrum (CDCl₃), δ , ppm (*J*, Hz): 2.55 (3H, s, CH₃); 3.24 (3H, d, *J* = 4.0, NHCH₃); 5.18 (1H, s, NH); 7.28–7.33 (1H, m, H-8); 7.37–7.40 (1H, m, H-7); 7.70 (1H, d, *J* = 8.0, H-9); 7.75 (1H, s, H-2); 8.25 (1H, d, *J* = 8.0, H-6). ^{13}C NMR spectrum (CDCl₃), δ , ppm: 10.5 (CH₃); 28.1 (NHCH₃); 109.7 (C-3); 114.2 (C-9); 123.8 (C-7); 125.1 (C-6); 126.1 (C-5a); 126.3 (C-8); 126.8 (C-3a); 136.7 (C-9a); 141.6 (C-2); 150.4 (C-4). Mass spectrum, *m/z*: 213.1 [M+H]⁺. Found, *m/z*: 213.1141 [M+H]⁺. C₁₂H₁₃N₄. Calculated, *m/z*: 213.1135.

***N*,1-Dimethylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (8).**^{3c} White solid, mp 186–187°C. ^1H NMR spectrum (DMSO-*d*₆), δ , ppm (*J*, Hz): 2.87 (3H, s, CH₃); 3.15 (3H, d, *J* = 4.0, NHCH₃); 7.42–7.46 (1H, m, H-8); 7.51–7.55 (2H, m, H-7); 7.83 (1H, d, *J* = 8.0, H-6); 8.22 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 8.0, H-9); 9.43 (1H, s, NH). ^{13}C NMR spectrum (DMSO-*d*₆), δ , ppm: 13.9 (CH₃); 27.6 (NHCH₃); 115.8 (C-9); 122.6 (C-8); 126.3 (C-7); 126.6 (C-9a); 126.8 (C-6); 127.2 (C-3a); 131.3 (C-2); 133.5 (C-1); 138.1 (C-5a); 148.4 (C-4). Mass spectrum, *m/z*: 212.9 [M+H]⁺. Found, *m/z*: 213.1064. C₁₂H₁₃N₄. Calculated, *m/z*: 213.1135.

We would like to thank the Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT AxLR) for financial support to C.P. and the Lebanese University for financial support to N.B.K. We also thank the French department of Biotage for lending us a HPFC system.

References

- (a) Saliba, J.; Deleuze-Masquéfa, C.; Iskandarani, A.; El Eit, R.; Hmadi, R.; Mahon, F. X.; Bazarbachi, A.; Bonnet, P.-A.; Nasr, R. *Anticancer Drugs* 2014, 25, 624. (b) Granda, T. G.;

- Cebrián, D.; Martínez, S.; Villanueva Anguita, P.; Casas López, E.; Link, W.; Merino, T.; Pastor, J.; Serelde, B. G.; Peregrina, S.; Palacios, I.; Albarran, M. I.; Cebriá, A.; Lorenzo, M.; Alonso, P.; Fominaya, J.; Rodríguez López, A.; Bischoff, J. R. *Invest. New Drugs* 2013, 31, 66. (c) Ortega, M. A.; Montoya, M. E.; Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Monge, A. *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 2177.
2. Moarbess, G.; Deleuze-Masquefa, C.; Bonnard, V.; Gayraud-Paniagua, S.; Vidal, J.-R.; Bressolle, F.; Pinguet, F.; Bonnet, P.-A. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 6601.
3. (a) Moarbess, G.; Guichou, J.-F.; Paniagua-Gayraud, S.; Chouchou, A.; Marcadet, O.; Leroy, F.; Ruédas, R.; Cuq, P.; Deleuze-Masquefa, C.; Bonnet, P.-A. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 115, 268. (b) Patinote, C.; Bou Karroum, N.; Moarbess, G.; Deleuze-Masquefa, C.; Hadj-Kaddour, K.; Cuq, P.; Diab-Assaf, M.; Kassab, I.; Bonnet, P.-A. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 138, 909. (c) Parra, S.; Laurent, F.; Subra, G.; Deleuze-Masquefa, C.; Benezech, V.; Fabreguettes, J. R.; Vidal, J. P.; Pocock, T.; Elliott, K.; Small, R.; Escale, R.; Michel, A.; Chapat, J. P.; Bonnet, P. A. *Eur. J. Med. Chem.* 2001, 36, 255.
4. Valente, C.; Organ M. G. In *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials*; Hall, D. G., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2011, p. 213.
5. Maluenda, I.; Navarro, O. *Molecules* 2015, 20, 7528.
6. Doucet, H. *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 2013.
7. Gray, M.; Andrews, I. P.; Hook, D. F.; Kitteringham, J.; Voyle, M. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 6237.
8. Deleuze-Masquefa, C.; Moarbess, G.; Khier, S.; David, N.; Gayraud-Paniagua, S.; Bressolle, F.; Pinguet, F.; Bonnet, P.-A. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 3406.
9. Botella, L.; Nájera, C. *J. Organomet. Chem.* 2002, 663, 46.
10. (a) Mu, Y.; Gibbs, R. A. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 5669. (b) Chen, H.; Deng, M.-Z. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 4444. (c) Chaumeil, H.; Signorella, S.; Le Drian, C. *Tetrahedron* 2000, 56, 9655.
11. Zou, G.; Reddy, K.; Falck, J. R. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 7213.
12. Littke, A. F.; Dai, C.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4020.
13. Chen, J.; Cammers-Goodwin, A. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 1503.
14. Cuq, P.; Deleuze-Masquefa, C.; Bonnet, P. A.; Patinotte, C. WO Patent 2016107895.
15. Basso, A. D. WO Patent 2009017701.

1.3 Résultats complémentaires sur la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline

En vue d'augmenter la diversité structurale de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines, nous avons également introduit des groupements méthyles en position 7 et 8 en utilisant des fluoroanilines substituées ce qui nous permet, par la suite, d'élargir le champ des études de structure-activité.

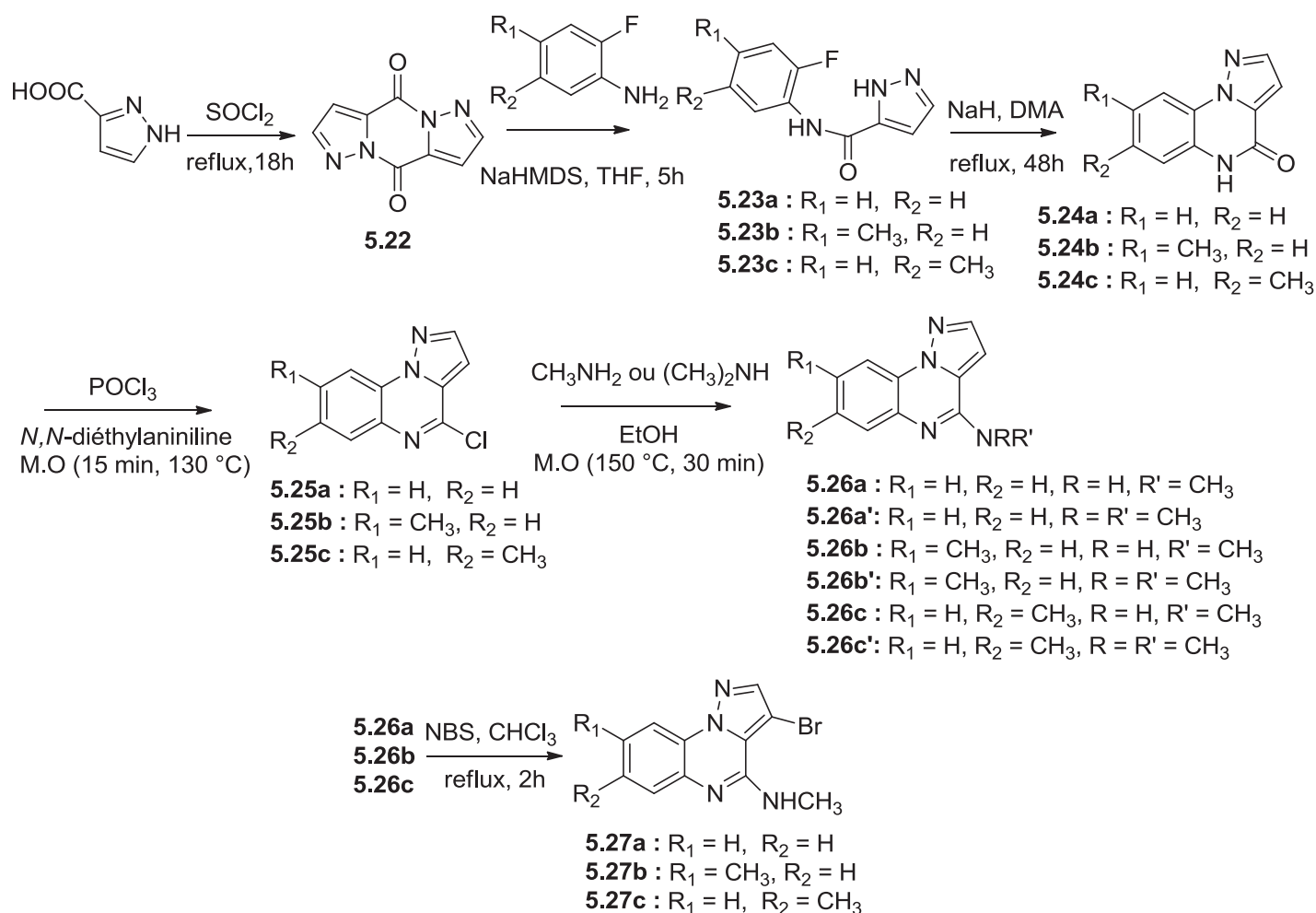


Schéma 84 : Synthèse des dérivés de pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline

2. Evaluation de l'effet immunomodulateur des premières molécules synthétisées

Les premières molécules synthétisées ont été évaluées pour leur effet agoniste et/ou antagoniste TLR7 et TLR8 au sein de l'équipe d'Immunologie de la Faculté de Santé Publique II, Fanar, de l'Université Libanaise. Leur activité immunomodulatrice est mesurée sur une lignée de cellules HEK293 (human embryonic kidney, Invivogen®) exprimant le TLR7 ou le TLR8 et cette activité est comparée à celle

de trois molécules de référence : l'imiquimod (agoniste TLR7), le CL264 (agoniste TLR7) et le résiquimod (agoniste TLR7/8).

2.1 Le modèle expérimental

Nous avons utilisé des cellules HEK-Blue™ hTLR7/hTLR8 exprimant soit le TLR7 soit le TLR8. Ces cellules sont fournies par Invivogen® et elles sont obtenues suite à une co-transfection des cellules HEK293 par un gène codant pour le TLR7 ou le TLR8 humain et par un plasmide pNiFty3-AN-SEAP codant pour la phosphatase alcaline embryonnaire SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase). Le gène rapporteur SEAP est sous le contrôle du promoteur minimal IFN-β fusionné à cinq sites de liaison NF-κB et AP-1. La stimulation du TLR7 ou TLR8 par leurs ligands (agoniste ou antagoniste) conduit à l'activation/inhibition du facteur de transcription NF-κB qui va migrer vers le noyau pour induire l'expression et la sécrétion de la phosphatase alcaline embryonnaire. Cette dernière sera sécrétée dans le surnageant des cellules traitées (figure 50).

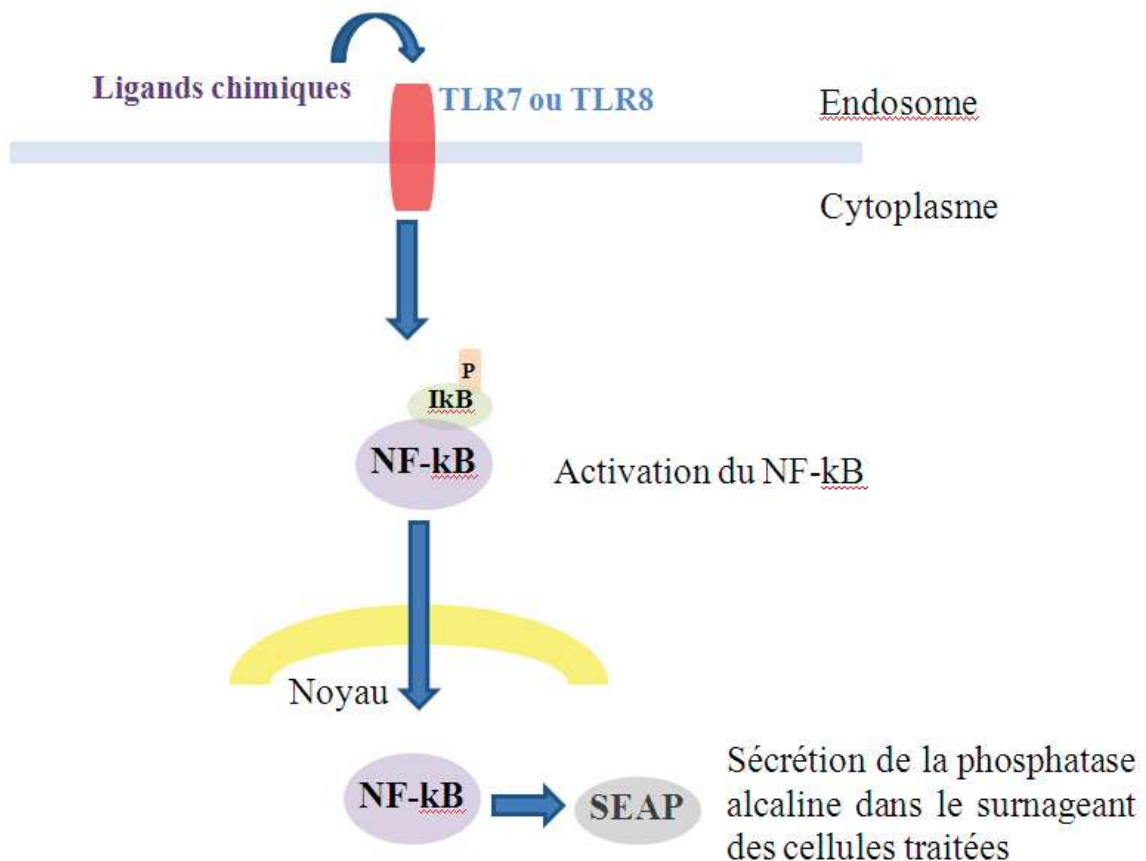


Figure 50 : Sécrétion de la phosphatase alcaline embryonnaire (SEAP) suite à la stimulation du TLR7 ou TLR8 par des ligands chimiques dans les cellules HEK-Blue™ hTLR7/hTLR8.

2.2 Evaluation in vitro de l'activité agoniste TLR7 et TLR8

Nous avons adopté le protocole expérimental déjà décrit dans la littérature et par les fournisseurs pour quantifier l'induction du NF- κ B dans les cellules HEK-Blue™ hTLR7/hTLR8 [137]. Ce protocole consiste à faire incuber les cellules à une concentration de 10^5 cellules/ml, dans un volume de 180 μ l/puit en utilisant une plaque de 96 puits, dans un milieu de culture DMEM contenant des antibiotiques sélectifs (blastidicine et zéocine). Ces cellules sont ensuite stimulées avec de différentes concentrations des produits à tester allant de 10^{-5} à 10^{-8} M pour 24h. Après, 20 μ l du surnageant de chaque puit est incubé en présence du substrat de la phosphatase alcaline (solution Quanti-blue) à 37 °C pendant 1 h et l'absorbance est lue à 620 nm. Cette dernière est proportionnelle à l'intensité de la coloration, c'est-à-dire à la quantité de la phosphatase alcaline sécrétée. L' EC_{50} (concentration d'un composé où 50 % de l'effet maximal est observé) est déterminée graphiquement (par graphpad prism) à partir de la courbe donnant l'induction relative de NF- κ B spécifique du TLR7 ou TLR8 humain en fonction de la concentration du produit testé. Le CL264 est utilisé comme contrôle positif dans les tests d'agonistes TLR7, par contre le résiquimod est utilisé comme contrôle positif dans les tests agonistes TLR8.

2.2.1 Résultats des études de l'effet agoniste sur les cellules HEK-Blue™ hTLR7 et hTLR8

Les premières voies de synthèse décrites précédemment dans les séries imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines nous ont fourni une première librairie de molécules à tester. Au préalable, des essais de cytotoxicité en utilisant le test MTT ont été réalisés sur le model in vitro utilisé. Aucun effet cytotoxique n'a été démontré pour la gamme de concentrations testée. Un criblage est réalisé sur les lignées cellulaires HEK-Blue™ hTLR7 et hTLR8 afin de sélectionner les produits présentant un effet agoniste TLR7 et/ou TLR8.

Le CL264, molécule de référence, est testé sur la lignée cellulaire HEK-Blue™ hTLR7. La courbe représentant l'induction relative du NF- κ B en fonction de la concentration nous a permis de calculer une EC_{50} de 1.12 ± 0.53 μ M pour le CL264 (figure 51).

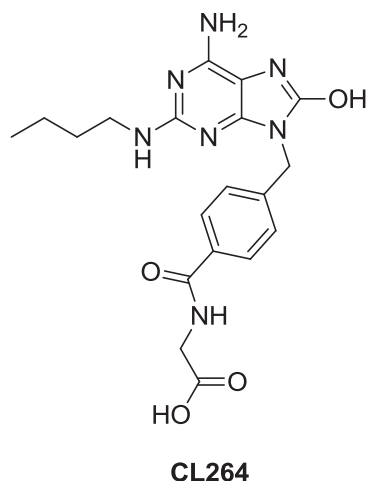


Figure 431 : Structure chimique du **CL264**

Par contre le resiquimod est testé sur la lignée cellulaire HEK-Blue™ hTLR8, puisque comme nous l'avons mentionné précédemment, c'est un agoniste TLR7 et TLR8. A partir de la courbe illustrant l'induction relative du NF-κB en fonction de la concentration en resiquimod, nous avons calculé une EC₅₀ de 5.92 ± 0.31 μM (figure 52).

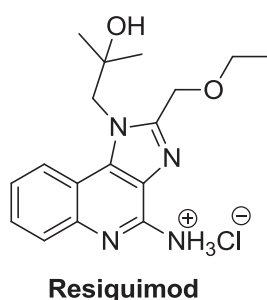


Figure 442 : Structure chimique du résiquimod

Aucun des composés cibles de la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines, n'a présenté d'activité agoniste sur les lignées cellulaires HEK-Blue™ hTLR7 et hTLR8, dans l'intervalle des concentrations testées (10⁻⁵ à 10⁻⁸ M).

2.3 Evaluation in vitro de l'activité antagoniste sur les cellules HEK-Blue™ hTLR7

Comme nous l'avons déjà abordé dans le chapitre II, les données disponibles sur de petites molécules antagonistes de TLR7 et TLR8 sont relativement réduites. Jusqu'en 2016, les seules molécules possédant une activité antagoniste TLR7 ou TLR7/8 sont celles décrites par Shukla et *coll.* (figure 34-35). Parmi la première librairie de molécules, nous avons choisi de tester l'activité antagoniste TLR7 des composés possédant uniquement une similarité structurale avec ceux publiés par Shukla et *coll.*

Les composés **5.28a-d** avec un substituant en position 3 de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines ont été sélectionnés pour le test antagoniste TLR7 (figure 53).

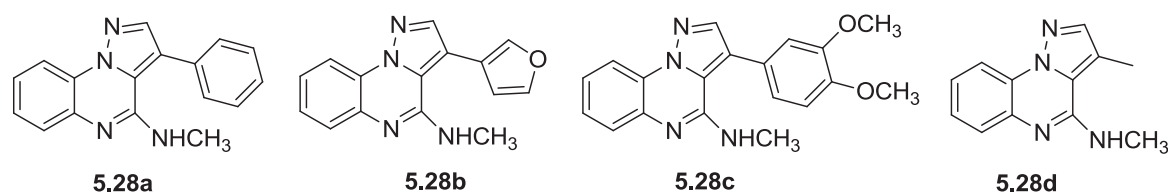


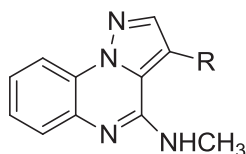
Figure 453 : Les composés de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines testés pour leur activité antagoniste TLR7.

Nous avons appliqué le même protocole expérimental décrit par Shukla et *coll.* [193]. Ce protocole consiste à faire incuber les cellules à une concentration de 1.2×10^5 cellules/ml, dans un volume de 100 μ l/puit en utilisant une plaque de 96 puits, dans un milieu de culture DMEM contenant des antibiotiques sélectifs (blastidicine et zéocine). Ces cellules sont ensuite stimulées avec une concentration de 1 μ g/ml du CL264. Parallèlement à la stimulation, différentes concentrations des produits à tester ont été ajoutées au milieu cellulaire. Après 24 h, 20 μ l du surnageant de chaque puit est incubé en présence du substrat de la phosphatase alcaline (solution Quanti-blue) à 37 °C pendant 1 h et l'absorbance est lue à 620 nm. Cette dernière est proportionnelle à l'intensité de la coloration, c'est-à-dire à la quantité de la phosphatase alcaline sécrétée. Le IC₅₀ (concentration inhibitrice d'un composé où 50 % de l'effet maximal est inhibé) est déterminée graphiquement à partir de la courbe donnant l'induction relative de NF- κ B spécifique du TLR7 humain en fonction de la concentration du produit testé.

2.3.1 Résultats des études de l'effet antagoniste sur les cellules HEK-Blue™ hTLR7

Les produits testés ont montré une faible activité antagoniste TLR7. Les IC₅₀ moyennes et les écarts types correspondants de chaque produit testé in vitro sur la lignée HEK-Blue™ hTLR7 sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Tableau montrant l'activité antagoniste TLR7 de la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines.



Composé	R	Formule brute	IC ₅₀ (μM)* TLR7
5.28a		C ₁₇ H ₁₄ N ₄	32 ± 9.89
5.28b		C ₁₅ H ₁₂ N ₄ O	37 ± 4.24
5.28c		C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₂	98 ± 2.82
5.28d	CH ₃ -	C ₁₂ H ₁₂ N ₄	81 ± 22.62

*Les valeurs des IC₅₀ sont les moyennes de 3 expériences indépendantes avec les écarts types

3. Activité inhibitrice IκB kinase (IKKs)

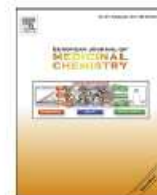
Une des thématiques de recherche de notre laboratoire est la synthèse des inhibiteurs des IKKs (IκB kinases). Le complexe enzymatique IκB kinase (IKK) fait partie de la signalisation du NF-κB. La protéine IκBα (inhibiteur de kappa B) inactive le facteur de transcription NF-κB en masquant les signaux de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signals) des protéines NF-κB et en les maintenant séquestrés dans un état inactif dans le cytoplasme. Les IKKs phosphorylent la protéine IκBα inhibitrice. Cette phosphorylation conduit à la dissociation d'IκBα du facteur de transcription NF-κB. Ce dernier, qui est maintenant libre, migre dans le noyau et active l'expression des gènes anti-apoptotiques, inflammatoires ainsi que d'autres gènes.

En 2016, notre équipe a synthétisé des imidazo[1,2-*a*]quinoxalines qui ont montré une activité inhibitrice importante des IKKs et surtout de la sous-unité IKK2 [250]. Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre I, les IKKs interviennent, également, dans la signalisation des TLR7 et 8 (figure 15). La stimulation de ces derniers, par un agoniste, conduit à l'activation des IKKs. Ces kinases vont activer le facteur de transcription NF-κB qui va migrer dans le noyau pour induire l'expression et la sécrétion des cytokines proinflammatoires. Cette intervention des IKKs dans la signalisation des TLRs nous a permis d'élaborer l'hypothèse suivante : la diminution de l'induction relative du NF-κB obtenue dans le cas des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines (tableau 4) peut être due à une inhibition des IKKs et non à un effet antagoniste TLR7, vu la similarité structurale entre les

pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines et les imidazo[1,2-*a*]quinoxalines. Nous avons alors testé tous les produits synthétisés pour leur activité inhibitrice IKKs. Le BMS-345541 inhibiteur sélectif de l'IKK2, est utilisé comme référence.

Aucun des produits testés n'a montré d'activité inhibitrice IKKs significative à une concentration de 10 μ M. Ce manque d'activité peut être dû à l'absence d'un groupement méthyle en position 7 ou 8 de l'imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, qui est impliqué dans des interactions avec la poche de liaison d'ATP des IKKs. Pour les dérivés pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline, l'absence d'activité pourrait être due à l'absence de substitution en position 2. La substitution en position 3 n'est pas engagée dans des interactions avec le site de liaison d'ATP. La présence d'un groupement méthyle en position 7 ou 8, sans substitution en position 2, n'est pas suffisante pour permettre l'inhibition des IKKs. Des modifications supplémentaires pour ces séries semblent nécessaires pour améliorer les activités inhibitrices IKKs.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication intitulée « Imidazo[1,2-*a*]pyrazine, Imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives as IKK1 and IKK2 inhibitors » dans European Journal of Medicinal Chemistry.



Research paper

Imidazo[1,2-*a*]pyrazine, Imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives as IKK1 and IKK2 inhibitors

Cindy Patinote ^{a,b,1}, Nour Bou Karroum ^{a,c,1}, Georges Moarbess ^c,
Carine Deleuze-Masquefa ^a, Kamel Hadj-Kaddour ^a, Pierre Cuq ^a, Mona Diab-Assaf ^c,
Issam Kassab ^c, Pierre-Antoine Bonnet ^{a,*}

^a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, ENSCM, Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^b Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT AxLR), CSU, 950 rue Saint Priest, 34090 Montpellier, France

^c Tumorigénèse Moléculaire et Pharmacologie Antitumorale, Lebanese University, EDST, BP 90656, Fanar Jdeideh, Lebanon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2016

Received in revised form

2 February 2017

Accepted 13 July 2017

Available online 19 July 2017

Keywords:

Imidazopyrazine

Imidazoquinoxaline

Pyrazoloquinoxaline

IKK

NF- κ B

ABSTRACT

The transcription nuclear factor NF- κ B plays a pivotal role in chronic and acute inflammatory diseases. Among the several and diverse strategies for inhibiting NF- κ B, one of the most effective approach considered by the pharmaceutical industry seems to be offered by the development of IKK inhibitors. In a former study, two potential IKK2 inhibitors have been highlighted among a series of imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives. In order to enhance this activity, we present herein the synthesis of twenty-one new compounds based on the imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline or pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline structures. Their potential to inhibit IKK1 and IKK2 activities is also tested.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The transcription nuclear factor NF- κ B plays a key role in many physiological processes, such as chronic and acute inflammation, through its ability to induce transcription of pro-inflammatory genes [1,2]. It regulates inter- and intra-signalling, cellular stress responses, as well as cell growth, survival and apoptosis. In fact, NF- κ B activation increases expression of the E-selectin adhesion molecules, VCAM-1 and ICAM-1 [3]. NF- κ B inhibition reduces leukocyte adhesion and transmigration. Moreover, synthesis of cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and the expression of COX-2 [4] are also mediated by NF- κ B [5,6].

It is now well-known that the activation of NF- κ B by extracellular agents depends on the phosphorylation and degradation of the inhibitory I κ B proteins (I κ B α). Their phosphorylation is ensured by IKK (I κ B kinase) which contains two catalytic subunits IKK α

(IKK1) and IKK β (IKK2). The degradation of I κ B α by IKK releases NF- κ B from the I κ B α /NF- κ B complex into the cell, where it translocates to the nucleus and activates a number of specific genes [7,8].

NF- κ B is highly activated at sites of inflammation in diverse diseases, e.g. rheumatoid arthritis [9], multiple sclerosis [10], asthma [11], inflammatory bowel disease [12] and cancers [13,14]. One of the therapeutic strategies aimed at blocking NF- κ B activity consists in modulating the IKK expression [15,16]. Even if IKK1 activity inhibition does not have the same pathophysiological outcomes as the IKK2 activity inhibition, IKK resides at a key convergence site for multiple signalling pathways that lead to NF- κ B activation [17]. That is why IKK represents a potential target for the treatment of a variety of inflammatory disorders. Many selective or non-selective IKK inhibitors have already been described and developed based, for example, on quinazoline [18,19], indolecarboxamide [20], arylpyridine [21,22], benzoimidazole [23,24], pyrazoloquinoline [25,26] (cf. Fig. 1). Small molecules including sulfasalazine, its salicylate moiety [27,28] and aspirin [29,30], could be cited as nonsteroidal anti-inflammatory drugs with IKK inhibiting properties.

In a former study, we highlighted two potent IKK2 inhibitors

* Corresponding author.

E-mail address: pierre-antoine.bonnet@umontpellier.fr (P.-A. Bonnet).

¹ These authors contribute equally to this work.

based on the imidazo[1,2-*a*]quinoxaline heterocycle which were compared to BMS-345541 (cf. Fig. 2) [31]. Here, we present the synthesis of new imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives and their biological evaluation as potential IKK1 and IKK2 inhibitors.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives

Several synthetic pathways to obtain imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives have been described in the literature [32–34]. We chose to focus on the following one (cf. Scheme 1), because of the diverse substituents we wanted to graft on positions 1 and 4 [35]. Starting material 3-bromo-8-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrazine is commercially available and cheap. Methylamine or ammoniac is first introduced in position 4 under microwave assistance without shifting the bromine to obtain compound **1a** or **1b**, respectively. A methyl or aryl group is then introduced by the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction with the trimethylboroxine or the appropriate aryl boronic acid in presence of carbonate salt and palladium catalyst under microwave irradiations to furnish compounds **2a**, **2b** or **2c**. A deprotecting step is engaged if necessary with boron tribromide in dichloromethane to regenerate the hydroxyl groups on the aryl moiety to afford **3a** and **3b**.

2.2. Synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives

Imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives were prepared according to two synthesis strategies previously described [36]. The first strategy is depicted in Scheme 2. The treatment of *ortho*-fluoronitrobenzene with 2-methylimidazole with an excess of potassium carbonate gave compound **4** in 92% yield. Attempted reduction of the nitro group resulted in the formation of compound **5** with 94% yield. The formation of the tricyclic compound **6** was obtained after addition of carbonyldiimidazole by intramolecular cyclization of **5**. The chlorination of **6** by phosphorus oxychloride and substitution by methylamine afforded compound **8** with 79% yield.

The second strategy for the synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives is illustrated in Scheme 3. Carbonylimidazole dimer **9** resulted from the bimolecular condensation of the commercially available 4-imidazole carboxylic acid in presence of thionyl chloride. Compound **9** was coupled with *ortho*-fluoroaniline to give the intermediate **10**. The tricyclic compound **11** was obtained via an intramolecular cyclization of **10** under strong basic conditions. Treatment of compound **11** with phosphorus oxychloride and *N,N*-diethylaniline gave compound **12**. Displacement of the chlorine of **12** with methylamine to afford compound **13** was effected under microwave assistance. The bromination of compound **13** by *N*-bromosuccinimide led to compounds **14a**, **14b** and **14c**.

2.3. Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives

1*H*-Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives were prepared according to the procedure presented in Scheme 4. Carbonylpyrazole dimer **15** resulted from the bimolecular condensation of the commercially available 3-pyrazole carboxylic acid in presence of thionyl chloride. Product **15** was coupled with either *ortho*-fluoroaniline or 2-fluoro-4-methylaniline or 2-fluoro-5-methylaniline to give the intermediates **16a**, **16b** and **16c**, respectively. The tricyclic compounds **17a**, **17b** and **17c** were obtained via an intramolecular cyclization of **16a**, **16b** and **16c**, respectively, under strong basic conditions. Treatment of compounds **17a**, **17b** and **17c** with phosphorus oxychloride and *N,N*-diethylaniline gave

compounds **18a**, **18b** and **18c**, respectively. Displacement of the chlorine of **18a**, **18b** and **18c** with methylamine or dimethylamine to give compounds **19a**, **19b/b'** and **19c/c'** was effected under microwave assistance. The bromination of compounds **19a**, **19b** and **19c** by *N*-bromosuccinimide led to compounds **20a**, **20b** and **20c**, respectively.

2.4. IKK1 and IKK2 activities inhibition of imidazopyrazine, imidazoquinoxalines and pyrazoloquinoxaline derivatives

The imidazoquinoxaline derivative EAPB03103-8d was tested for its *in vitro* antiproliferative activity on the human melanoma cell line A375. Its IC₅₀, measured according to reference [37], was determined to be in the micromolar range with a value of 5.39 μM and a maximum of inhibition of 66%. Furthermore, the human monocytic leukemia THP1 cell-line is highly sensitive to the inhibition of production of the pro-inflammatory cytokine TNF alpha [38]. We took advantage of this cell property to assess the effect of the newly synthesized imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, the inhibitory effects on TNF-α production of both EAPB03103-8d and EAPB0303-8d at 10 μM were determined on this cell line, after LPS and interferony activation, with values of 40% ± 1.6 and 45% ± 3.1, respectively.

The IKK1 and IKK2 activities inhibition by the newly synthesized compounds was tested according to the Z0-LYTE[®] Screening Protocol performed by the SelectScreen[®] Biochemical Kinase Profiling Service of Invitrogen[™]. The protocol conditions and assays are detailed as described in the previous publication [31]. The ability of our imidazopyrazine, imidazoquinoxaline and pyrazoloquinoxaline derivatives at 10 μM to inhibit IKKs is depicted in Table 1. BMS-345541 was selected as a reference standard because it had been previously demonstrated as a selective IKK2 inhibitor [39].

We first designed a series of imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives. When we suppress the methylaryl moiety of EAPB 03103-8d and EAPB 0303-d compounds, the IKK1 inhibition of compounds **1a** and **2c** remains low (entries 1 and 2, Table 1). Nevertheless, we observe a loss of IKK2 activity compared to our best former compounds. If we replace the methylamine group by an amino group, the results are similar for compound **1b** (entry 3, Table 1).

By replacing the methyl group in position 1 by a steric hindered aryl moiety, such as a dimethoxyaryl or dihydroxyaryl groups, any IKK1 or IKK2 inhibition is observed for compounds **2a** and **3a** (entries 4 and 5, Table 1). Results are the same with a methylamine or an amine in position 4, as shown with **2b** and **3b** (entries 6 and 7, Table 1).

As we noticed that the suppression of the methylaryl group of the quinoxaline did not led to good results, we then prepared a series of five new imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives. The intranuclear nitrogen atom was switched from position 3 to 2. If we suppress the methyl on position 8 but keep the methyl or bromine on position 1 (compounds **8** and **14b**), we lose the IKK1 as well as IKK2 inhibition activities. If the bromine is on position 3, results for **14a** are not modified. With a bromine atom on position 1 and another one on position 3, inhibitions remain the same for compound **14c**. Without substituent except the methylamine group on position 4, compound **13** does not exhibit different results.

Taking into account those low percentages of inhibition, we then turned our attention to the synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives. The nitrogen atom is placed on position 1, so no substituent could be added on it. Without a methyl group on the quinoxaline ring, compounds **18a** and **18a'** show loss of IKK1 and IKK2 inhibitions, even if we graft a dimethylamino group instead of the methylamino group. When a methyl group is introduced on position 7 or 8, we do not obtain better results for compounds **18b**, **18b'**, **18c**, **18c'**. The introduction of a bromine or a methyl group on

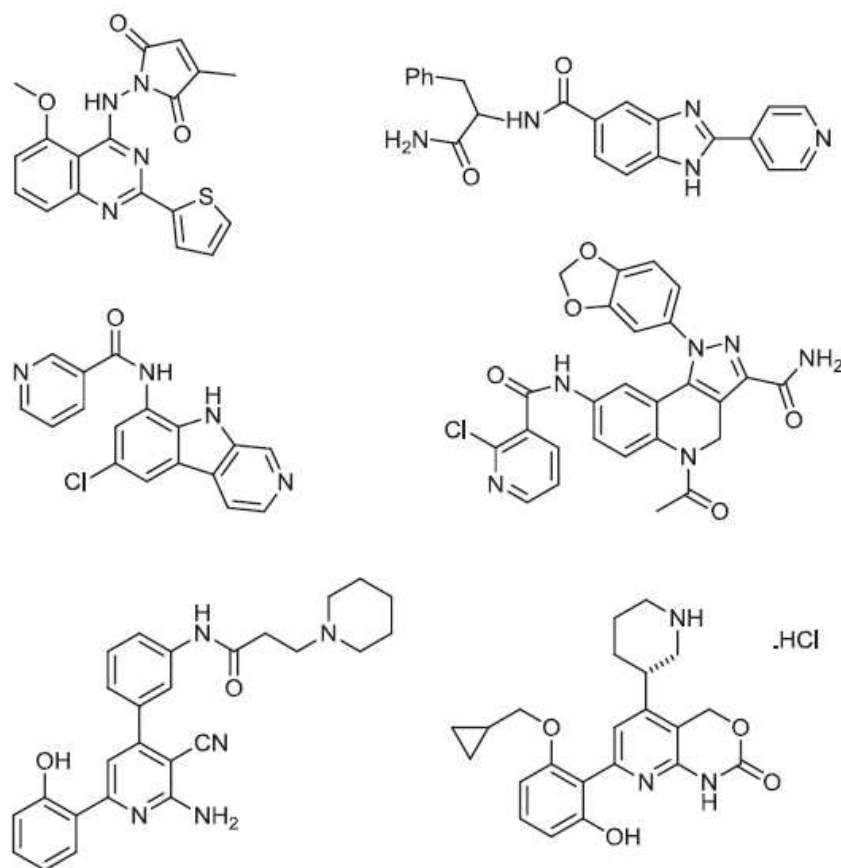


Fig. 1. Structures of some selective IKK inhibitors.



BMS-345541

EAPB03103-8d

EAPB0303-8d

Compounds	% of IKK1 inhibition	% of IKK2 inhibition
BMS-345541	8 ± 2.8	64 ± 1.4
EAPB03103-8d	13 ± 0.7	72 ± 0.7
EAPB0303-8d	1 ± 4.9	65 ± 1.4

Fig. 2. Structures and biological activities of BMS-345541 and our previous described compounds tested at 10 μ M.

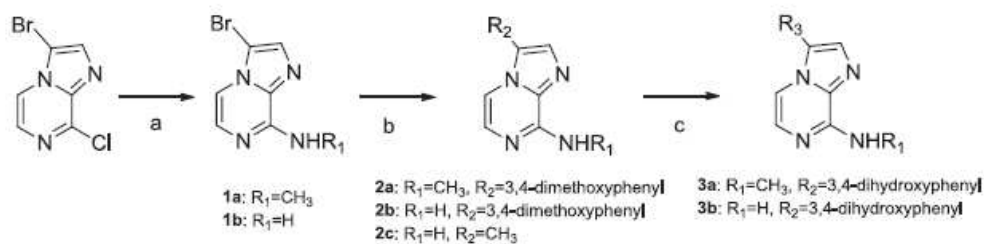
position 3, with or without a methyl on position 7 or 8, gives any interesting modification with compounds **19a**, **19b**, **19c**.

Despite that our structures have structural similarities with imidazo[1,2-*a*]quinoxalines previously described [31] and BMS-345541, they do not exhibit any inhibitory activity on IKK1 and IKK2. This lack of activity may be due to the absence of a methyl group on position 6 or 7 of the imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives or on position 7 or 8 of the imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, which is involved in binding with the ATP binding pocket of IKK [31]. For the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives, the absence of activity could be due to the absence of substitution at position 2, which is

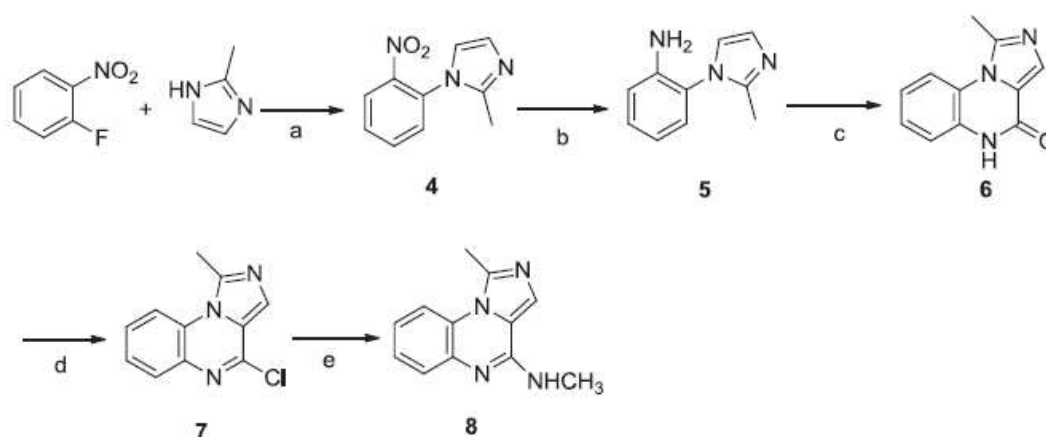
recognized to be important for IKK inhibition by BMS-345541. Actually, for our pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives, we hypothesized that substitution at position 3 is not involved in the IKK inhibition activity at the ATP binding site. The presence of a methyl group at position 7 or 8, without C2 substitution could not be sufficient for IKKs inhibition.

3. Conclusion

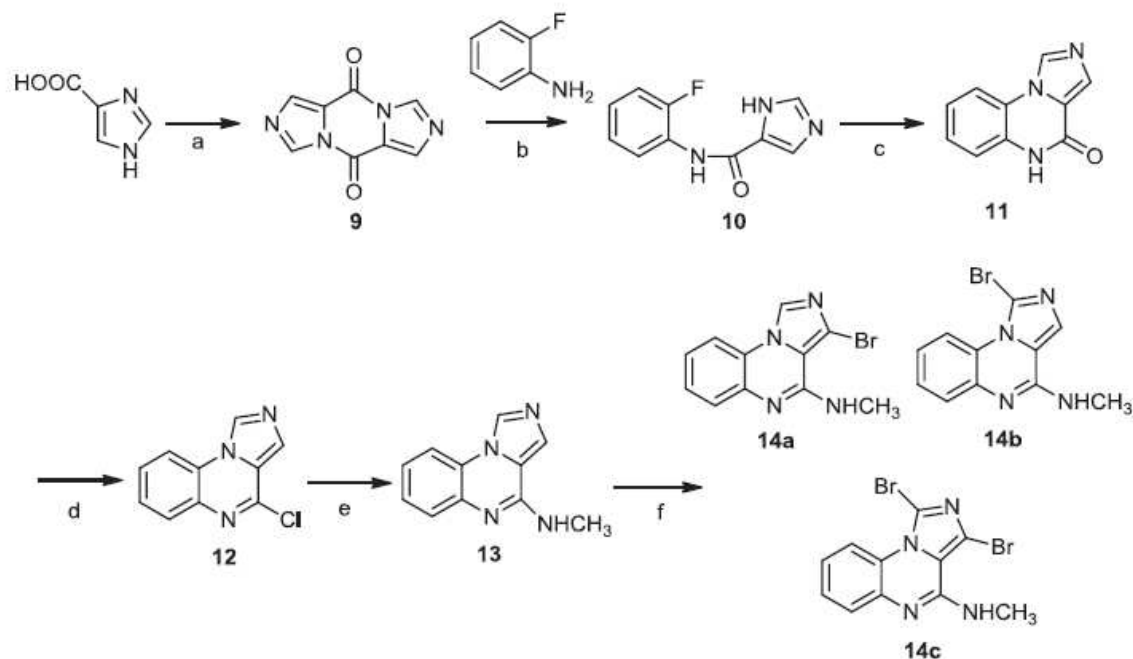
The synthesis of twenty-five new imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives



Scheme 1. Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives: (a) R₁ = H: NH₄OH, CH₃CN, MW (130 °C, 2 h); R₁ = CH₃NH₂, EtOH, MW (140 °C, 20 min); (b) Trimethylboroxine (R₂ = CH₃), K₂CO₃, PdCl₂(dppf), CH₂Cl₂, THF, MW (140 °C, 20 min) or 3,4-dimethoxyphenylB(OH)₂ (R₂ = 3,4-dimethoxyphenyl), Na₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, DME/H₂O (1/1), MW (140 °C, 20 min); (c) BBr₃, CH₂Cl₂, 0 °C to RT, 2 h.



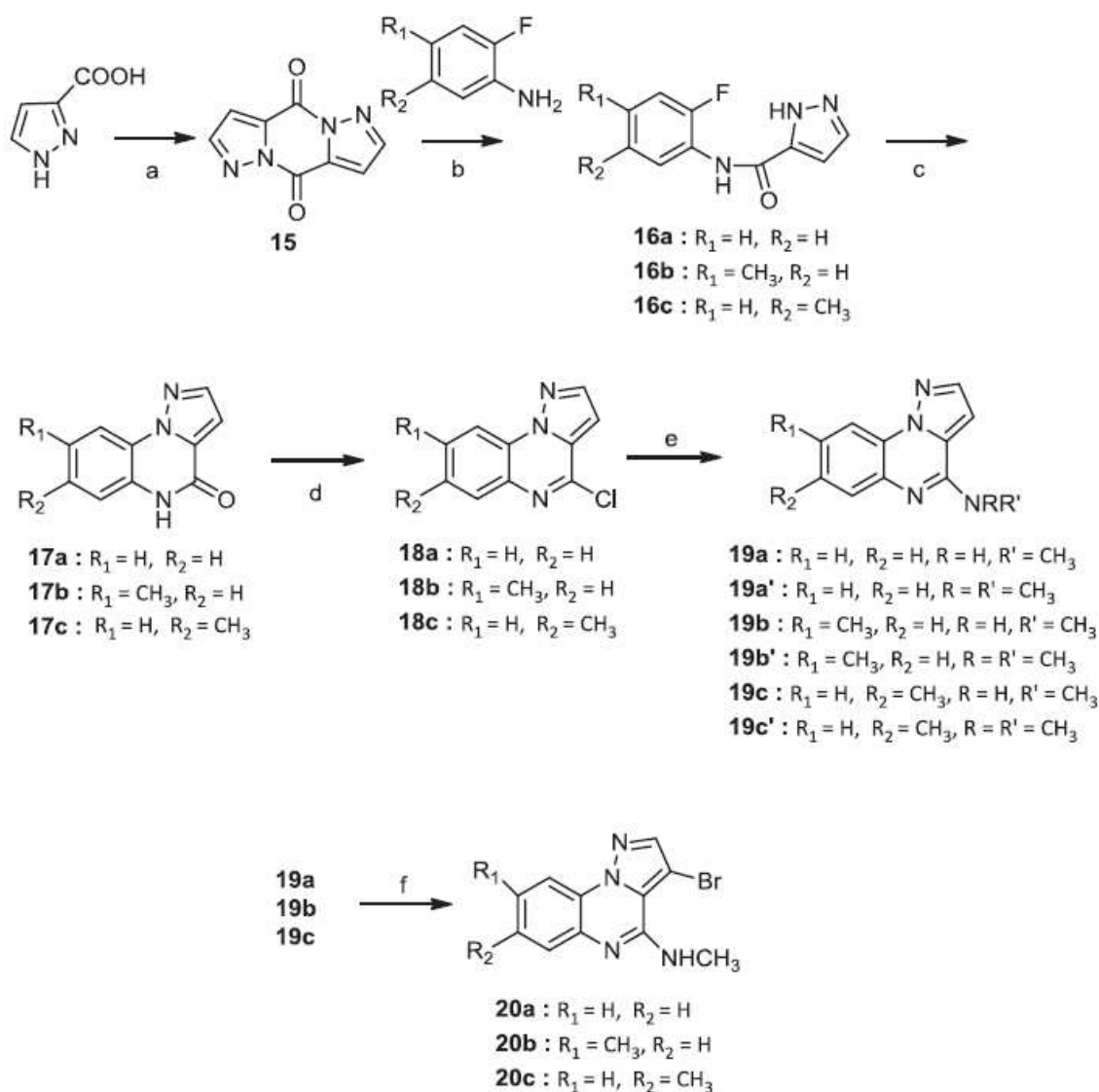
Scheme 2. Synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives: (a) MeCN, reflux, 24 h; (b) NH₂-NH₂, H₂O, Pd/C, EtOH, reflux, 1 h; (c) CDI, PhCl₂, reflux, 4 h; (d) POCl₃, DEA, MW (130 °C, 15 min); (e) CH₃NH₂, EtOH, MW (150 °C, 30 min).



Scheme 3. Synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives: (a) SOCl₂, reflux, 18 h; (b) NaHMDS, THF, 5 h; (c) NaH, DMA, reflux, 48 h; (d) POCl₃, DEA, MW (130 °C, 15 min); (e) CH₃NH₂, EtOH, MW (150 °C, 30 min); (f) NBS, CHCl₃, reflux, 2 h.

are first described by using microwave assistance. Their biological evaluations as potential IKK1 and IKK2 inhibitors are then presented. Variations of the substituents and their placements, suppression of a part of the quinoxaline and the placement of the

nitrogen atom in the imidazole ring are most of the considered modifications. In spite of the diverse changes, the new compounds do not show similar or better results than our previous best molecules EAPB03103-8d and EAPB0303-8d. Additional modifications,



Scheme 4. Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives: (a) $SOCl_2$, reflux, 18 h; (b) NaHMDS, THF, 5 h; (c) NaH, DMA, reflux, 48 h; (d) $POCl_3$, DEA, MW (130 °C, 15 min); (e) CH_3NH_2 or $(CH_3)_2NH$, EtOH, MW (150 °C, 30 min); (f) NBS, $CHCl_3$, reflux, 2 h.

for these three series, appear to be required in order to maintain or enhance IKK inhibition activities.

4. Experimental part

4.1. General

All purchased chemicals were used without further purification. Chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co., Alfa Aesar Co, VWR and FluoroChem UK. Silica gel chromatography was conducted with 230–400 mesh 60 Å silica gel (Sigma Aldrich Chemical Co.). Thin layer chromatography plates (Kieselgel 60 F254) were purchased from Merck. The progress of reaction was monitored by TLC exposure to UV light (254 nm and 366 nm). Microwave assisted organic syntheses were performed on the Biotage Initiator 2.0 Microwave. 1H and ^{13}C NMR spectra were obtained on Brüker AC-300 and AC-400 spectrometers. Chemical shifts are given as parts per million (ppm) using residual dimethylsulfoxide signal for protons ($\delta_{DMSO} = 2.46$ ppm) and carbons ($\delta_{DMSO} = 40.00$ ppm). Abbreviations used for signal patterns are the

following: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet. Mass spectral data were obtained on a Micromass Q-ToF (Waters) spectrometer equipped with ESI source (Laboratoires de Mesures Physiques, Plateau technique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier, Montpellier, France). Mass spectra were recorded in positive mode between 50 and 1500 Da, capillary and cone tension were 3000 and 20 V, respectively.

4.2. 3-bromo-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**1a**)

A 33% (w/v) ethanol solution of methylamine (5.4 mL, 130.55 mmol) was added to a solution of 3-bromo-8-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrazine (500 mg, 2.15 mmol) in ethanol in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 20 min at 140 °C. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate and successively washed with saturated aqueous chloride ammonium, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulphate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound is obtained as a white solid (92% yield).

Table 1
LogP, IKK1 and IKK2 inhibitions of our imidazopyrazine, imidazoquinoxaline and pyrazoloquinoxaline derivatives.

Entry	Compound reference	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LogP ^b	% of IKK1 Inhibition ^a	% of IKK2 Inhibition ^a
BMS-345541							8	64
<i>Imidazo[1,2-a]pyrazines (I)</i>								
1	1a	Br-	-	-	CH ₃ -NH-	0.53	5	6
2	2c	CH ₃ -	-	-	CH ₃ -NH-	0.68	-1	-4
3	1b	Br-	-	-	NH ₂ -	-0.26	7	10
4	2a	3,4-(OCH ₃)-C ₆ H ₃ -	-	-	CH ₃ -NH-	1.26	-9	-1
5	3a	3,4-(OH)-C ₆ H ₃ -	-	-	CH ₃ -NH-	1.00	5	18
6	2b	3,4-(OCH ₃)-C ₆ H ₃ -	-	-	NH ₂ -	0.47	-2	-4
7	3b	3,4-(OH)-C ₆ H ₃ -	-	-	NH ₂ -	0.21	20	-8
<i>Imidazo[1,5-a]quinoxalines (II)</i>								
8	14b	Br-	H	-	CH ₃ -NH-	3.22	0	16
9	8	CH ₃ -	H	-	CH ₃ -NH-	2.56	-3	5
10	14a	H	Br-	-	CH ₃ -NH-	2.40	-5	10
11	14c	Br-	Br-	-	CH ₃ -NH-	3.97	-1	-11
12	13	H	H	-	CH ₃ -NH-	1.64	3	1
<i>Pyrazolo[1,5-a]quinoxalines (III)</i>								
13	18a	H	H	H	CH ₃ -NH-	2.11	5	-2
14	18a'	H	H	H	(CH ₃) ₂ -N-	2.07	-10	17
15	18b	CH ₃ -	H	H	CH ₃ -NH-	2.41	-9	19
16	18b'	CH ₃ -	H	H	(CH ₃) ₂ -N-	2.37	-15	1
17	18c	H	CH ₃ -	H	CH ₃ -NH-	2.80	-4	4
18	18c'	H	CH ₃ -	H	(CH ₃) ₂ -N-	2.76	-7	4
19	19a	H	H	Br-	CH ₃ -NH-	2.79	0	1
20	19b	CH ₃ -	H	Br-	CH ₃ -NH-	3.06	-10	-3
21	19c	CH ₃ -	H	Br-	CH ₃ -NH-	3.48	-6	7

^a The compounds are tested at 10 μM. Given values correspond to the mean of two independent experiments.

^b LogP values are calculated using ACD/Labs software.

C₇H₇BrN₄. M_w: 227.06 g/mol. Mp 145–146 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 2.94 (d, 3H, NHCH₃, *J* = 6 Hz), 7.42 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.52 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz), 7.65 (m, 2H, NH, CH 2). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 22.77 (NHCH₃), 97.83 (Cq 1), 107.34 (CH 7), 130.04 (CH 6), 132.10 (CH 2), 133.81 (Cq 3'), 150.72 (Cq 4). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 227.1 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₇H₇BrN₄ 226.9932, found 226.9935.

4.3. 3-bromoimidazo [1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**1b**)

Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (2.3 mL, 57.37 mmol) was added to a solution of 3-bromo-8-chloroimidazo [1,2-*a*]pyrazine (500 mg, 2.15 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in ethyl acetate and successively washed with saturated aqueous chloride ammonium, distilled water and finally brine. The organic phase was dried on sodium sulphate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound is obtained as a white solid (87% yield). C₆H₅BrN₄. M_w: 213.03 g/mol. Mp 242–243 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 7.10 (s, 2H, NH), 7.36 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.56 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz), 7.65 (s, 1H, CH 2). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 97.81 (Cq 1), 108.03 (CH 7), 130.19 (CH 6), 132.45 (CH 2), 133.46 (Cq 3'), 150.72 (Cq 4). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 213.1 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₆H₅BrN₄ 212.9776, found 212.9785.

4.4. 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**2a**)

To a mixture of **1a** (350 mg, 1.54 mmol) in DME/H₂O (1/1, 10 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (337 mg, 1.85 mmol), tetrakis(triphenylphosphine) palladium (89 mg, 0.077 mmol) and sodium carbonate (326 mg, 3.08 mmol) in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 20 min at 150 °C and then filtered on a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and

purified on a flash chromatography system eluted with cyclohexane/ethyl acetate 50/50 to 10/90. The compound is obtained as a white solid (60% yield). C₁₅H₁₆N₄O₂. M_w: 284.31 g/mol. Mp 182–183 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 2.98 (d, 3H, NHCH₃, *J* = 8 Hz), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 7.10 (m, 3H, CH 2', CH 5', CH 6'), 7.32 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.50 (m, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, CH 2), 7.70 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 27.79 (NHCH₃), 56.08 (2 x OCH₃), 107.67 (CH 7), 111.92 (CH 5'), 112.76 (CH 2'), 120.61 (CH 6'), 121.35 (Cq 1), 127.94 (Cq 1'), 129.31 (CH 6), 130.49 (CH 2), 133.47 (Cq 3' imidazole), 149.40 and 149.66 (Cq 3', Cq 4'), 150.36 (Cq 4). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 285.4 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₁₅H₁₇N₄O₂ 285.1352, found 285.1351.

4.5. 3-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**2b**)

To a mixture of **1b** (326 mg, 1.53 mmol) in DME/H₂O (1/1, 10 mL) were added 3,4-dimethoxyphenylboronic acid (334 mg, 1.84 mmol), tetrakis(triphenylphosphine) palladium (89 mg, 0.077 mmol) and sodium carbonate (2 eq., 324 mg, 3.06 mmol) in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 20 min at 150 °C and then filtered on a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified on a flash chromatography system eluted with ethyl acetate/methanol 10/0 to 90/10. The compound is obtained as a white solid (63% yield). C₁₄H₁₄N₄O₂. M_w: 270.29 g/mol. Mp 216–217 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.95 (s, 2H, NH₂), 7.15 (m, 3H, CH 2', CH 5', CH 6'), 7.26 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.67 (s, 1H, CH 2), 7.75 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 56.09 (2 x OCH₃), 108.34 (CH 7), 111.91 (CH 5'), 112.77 (CH 2'), 120.61 (CH 6'), 121.37 (Cq 1), 127.93 (Cq 1'), 129.16 (CH 6), 130.89 (CH 2), 132.00 (Cq 3' imidazole), 149.41 and 149.67 (Cq 3', Cq 4'), 151.22 (Cq 4). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 271.4 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₁₄H₁₅N₄O₂ 271.1195, found 271.1197.

4.6. *N*,3-dimethylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**2c**)

To a mixture of **1a** (100 mg, 0.40 mmol) in THF (10 mL) were added trimethylboroxine (68 μ L, 0.48 mmol), PdCl₂(dppf), CH₂Cl₂ (38 mg, 0.04 mmol) and potassium carbonate (168 mg, 3.06 mmol) in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 20 min at 140 °C and then filtered on a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified on a flash chromatography system eluted with cyclohexane/ethyl acetate 30/70 to 10/90. The compound is obtained as a white solid (55% yield). C₈H₁₀N₄. M_w: 162.19 g/mol. Mp 238–239 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.92 (d, 3H, NHCH₃, *J* = 6 Hz), 7.25 (s, 1H, CH 2), 7.30 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.34 (m, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 8.92 (CH 3), 27.67 (NHCH₃), 107.78 (CH 7), 123.05 (Cq 1), 128.31 (CH 6), 129.78 (CH 2), 132.90 (Cq 3'), 149.92 (Cq 4). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 162.9 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₈H₁₁N₄ 163.0984, found 163.0986.

4.7. 4-(8-(methylamino)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)benzene-1,2-diol (**3a**)

After solubilisation of compound **2a** (117 mg, 0.411 mmol) in dichloromethane, boron tribromide (1.65 mL, 1.65 mmol) was slowly added at 0 °C. The reaction was allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 h. Methanol was added to quench the reaction which was then concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography system eluted with ethyl acetate/methanol 10/0 to 80/20. The compound is obtained as a white solid (58% yield). C₁₃H₁₂N₄O₂. M_w: 256.26 g/mol. Mp > 300 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 2.95 (d, 3H, NHCH₃, *J* = 6 Hz), 6.88 (m, 2H, CH 5', CH 6'), 6.96 (s, 1H, CH 2'), 7.29 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.45 (m, 1H, NH), 7.50 (s, 1H, CH 2), 7.60 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 27.78 (NHCH₃), 107.53 (CH 7), 115.51 (CH 5'), 116.76 (CH 2'), 119.55 (CH 6'), 120.03 (Cq 1'), 129.14 (CH 6), 129.87 (CH 2) 130.05 (Cq 1), 133.27 (Cq 3'), 146.34 (Cq 4'), 148.78 (Cq 3'), 150.37 (Cq 4). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 257.1 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₁₃H₁₃N₄O₂ 257.1039, found 257.1036.

4.8. 4-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)benzene-1,2-diol (**3b**)

After solubilisation of compound **2b** (350 mg, 1.30 mmol) in dichloromethane (30 mL), boron tribromide (5.2 mL, 5.2 mmol) was slowly added at 0 °C. The reaction was allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 h. Methanol was added to quench the reaction which was then concentrated under reduced pressure. The crude mixture was taking up with hot ethanol. The precipitate was filtered. The compound is obtained as a yellow solid (68% yield). C₁₂H₁₀N₄O₂. M_w: 242.23 g/mol. Mp 298–300 °C. ¹H-RMN δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 3.40 (m, 2H, 2 x OH), 6.91 to 7.01 (m, 3H, CH 2', CH 5', CH 6'), 7.26 (d, 1H, CH 6, *J* = 8 Hz), 7.81 (d, 1H, CH 7, *J* = 8 Hz), 7.89 (s, 1H, CH 2), 9.35 and 9.54 (m, 2H, NH₂). ¹³C-RMN δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 110.17 (CH 7), 115.95 (CH 5'), 116.85 (CH 2'), 116.93 (Cq 1'), 117.80 (CH 6), 120.23 (CH 6'), 131.24 (Cq 3' imidazole), 132.54 (Cq 1), 133.28 (CH 2), 146.51 (Cq 3'), 147.12 (Cq 4), 147.42 (Cq 4'). MS (ESI +, QToF, *m/z*): 242.9 [M+H]⁺. HRMS calculated for C₁₂H₁₁N₄O₂ 243.0882, found 243.0882.

4.9. 2-methyl-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (**4**)

A mixture of 2-nitrofluorobenzene (3.74 mL, 0.035 mol), imidazole (2.62 g, 0.032 mol) and 10 g of K₂CO₃ in 50 mL of acetonitrile was heated to reflux for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 50 mL dichloromethane and

washed twice with distilled water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The compound is obtained as a yellow solid (92% yield). C₁₀H₉N₃O₂. M_w: 203.20 g/mol. Mp 80–83 °C. ¹H NMR δ (ppm, 300 MHz, CDCl₃) 2.16 (s, 3H, CH₃), 6.86 (d, 1H, =CH-N), 7.01 (d, 1H, =CH-N), 7.39 (dd, 1H, =CH-C-N, *J* = 9 Hz), 7.62 (td, 1H, =CH-C, *J* = 9 Hz), 7.72 (td, 1H, CH=C-, *J* = 9 Hz), 7.99 (dd, 1H, =CH-C-NO₂, *J* = 9 Hz). ¹³C NMR δ (ppm, 75 MHz, CDCl₃) 13.03, 120.60, 125.34, 128.46, 130.12, 130.26, 131.00, 133.94, 145.60, 146.27. MS (ESI +, QToF, *m/z*): 203.8 [M+H]⁺.

4.10. 2-(2-methylimidazol-1-yl)phenylamine (**5**)

Palladium-carbon 10% was added portion-wise during 10 min to a hot solution of **4** (4.52 g, 22.2 mmol) in dry ethanol (40 mL) containing hydrazine monohydrate (5.4 mL, 111 mmol). The mixture was heated under reflux for 1 h. The hot solution was filtered on a celite pad and the filtrate was evaporated under vacuum. The compound is obtained as yellow oil (98% yield). C₁₀H₁₁N₃. M_w: 173.21 g/mol. Mp 132–133 °C. ¹H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 2.09 (s, 3H, CH₃), 4.88 (s, 2H, NH₂), 6.62 (td, 1H, =CH-C, *J* = 6 Hz), 6.87 (dd, 1H, =CH-C-NH₂, *J* = 9 Hz), 6.92 (d, 1H, =CH-N, *J* = 3 Hz), 6.98 (dd, 1H, =CH-C-N, *J* = 6 Hz), 7.04 (d, 1H, =CH-N), 7.14 (td, 1H, =CH-C, *J* = 6 Hz). ¹³C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 13.17, 116.20, 116.61, 121.17, 121.90, 127.85, 128.30, 129.96, 144.74, 144.92. MS (ESI +, QToF, *m/z*): 173.8 [M+H]⁺.

4.11. 1-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**6**)

Compound **5** (0.5 g, 2.8 mmol) and carbonyldiimidazole (0.54 g, 3.36 mmol) were dissolved in 30 mL of 1,2-dichlorobenzene and heated to reflux overnight under nitrogen. After cooling to room temperature, the solid was filtered and washed with diethylether. The compound is obtained as a yellow solid (93% yield). C₁₁H₉N₃O. M_w: 199 g/mol. Mp > 300 °C. ¹H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 2.85 (s, 3H, CH₃), 7.19 to 7.35 (m, 3H), 7.71 (s, 1H, CH 3), 8.03 (d, 1H, CH 6, *J* = 6 Hz). ¹³C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 18.00, 117.29, 121.09, 122.46, 123.10, 124.00, 127.03, 129.90, 135.23, 144.65, 154.96. MS (ESI +, QToF, *m/z*): 200.1 [M+H]⁺.

4.12. 4-chloro-1-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxaline (**7**)

Phosphorus oxychloride (6 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.8 mL) were added to **6** (0.5 g, 2.5 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (24% yield). C₁₁H₈ClN₃. M_w: 217.65 g/mol. Mp 252–253 °C. ¹H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 3.02 (s, 3H, CH₃), 7.54 to 7.67 (m, 2H, CH 7, CH 8), 7.81 to 7.83 (m, 2H, CH 3, CH 9), 8.26 (d, 1H, CH 6, *J* = 9 Hz). ¹³C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 18.60, 117.04, 123.61, 126.75, 126.92, 127.33, 129.16, 129.28, 135.75, 143.60, 144.71. MS (ESI +, QToF, *m/z*): 218.1 [M+H]⁺.

4.13. *N*,1-dimethylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**8**)

A mixture of **7** (0.54 g, 2.48 mmol) and methylamine (2.03 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (7.44 mL) in a microwave-adapted vial was irradiated at 150 °C for 20 min. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL). The organic fraction was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄, and

concentrated under reduced pressure. The compound is obtained as a white solid (79% yield). $C_{12}H_{12}N_4$. M_w : 212.25 g/mol. Mp 217–218 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 2.56 (d, 3H, CH₃, $J=3$ Hz), 6.75 (td, 1H, CH 7, $J=9$ Hz), 6.87 to 6.92 (td, 1H, CH 8, $J=9$ Hz), 7.09 (dd, 1H, CH 9, $J=6$ Hz), 7.26 (s, 1H, NH), 7.30 (s, 1H, CH 3), 7.63 (dd, 1H, CH 6, $J=6$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 18.70, 27.49, 116.20, 119.86, 122.59, 122.79, 124.70, 126.37, 126.49, 138.68, 142.31, 149.50. MS (ESI +, QToF, m/z): 212.8 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{12}H_{13}N_4$ 213.1140, found 213.1142.

4.14. Diimidazo[1,2-*a*]piperazine-5,10-dione (**9**)

The imidazole-2-carboxylic acid (5 g, 44.6 mmol) in suspension in thionyl chloride (75 mL) was heated to reflux under agitation for 18 h. The reaction mixture was cooled, then filtered, washed with toluene, and dried under high vacuum. The compound is obtained as a yellow solid (95% yield). $C_8H_4N_4O_2$. M_w : 188.14 g/mol. Mp 265–268 °C. 1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 8.24 (d, 1H, CH=C=O), 8.32 (d, 1H, CH=C=O, $J=3$ Hz), 8.88 (d, 1H, CH=N), 9.28 (d, 1H, CH=N, $J=3$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 123.99, 124.52, 125.62, 137.26, 139.73, 150.39, 159.68. MS (ESI +, QToF, m/z): 189.0 [M+H]⁺.

4.15. (2-fluoroaniline)-1*H*-imidazole-4-carboxamide (**10**)

To 2-fluoroaniline (5.45 mL, 56.5 mmol) in THF (28 mL) cooled in a –10 °C bath, sodium bis(trimethylsilyl) amide (141 mL, 141 mmol, 1.0 M) in THF was added. After stirring for 1 h, a suspension of **9** (4.83 g, 25.6 mmol) in THF (32 mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Acetic acid was added to pH 7. The reaction mixture was concentrated in vacuum, followed by the addition of water and saturated aqueous NaHCO₃ solution. The solid was collected by filtration, washed with distilled water and cyclohexane, and dried under high vacuum. The compound is obtained as a beige solid (40% yield). $C_{10}H_8FN_3O$. M_w : 205.19 g/mol. Mp 186–189 °C. 1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 7.11 to 7.33 (m, 3H), 7.84 (s, 1H, N-CH =), 7.85 (s, 1H, -CH=N), 8.12 (td, 1H, -CH=C, $J=9$ Hz), 9.48 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 115.70, 121.41, 123.19, 124.00, 125.20, 126.65, 136.67, 152.08, 155.31, 160.75. MS (ESI +, QToF, m/z): 205.8 [M+H]⁺.

4.16. Imidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5*H*)-one (**11**)

A mixture of **10** (4 g, 20 mmol) and sodium hydride (1.2 g, 30 mmol) in dimethylacetamide (160 mL) was heated to reflux for 48 h. The sodium hydride was neutralized with saturated aqueous NH₄Cl solution and the reaction mixture was then concentrated in vacuum. The residue was collected by filtration, washed with water, and dried. The compound is obtained as a grey solid (95% yield). $C_{10}H_7N_3O$. M_w : 185.18 g/mol. Mp > 300 °C. 1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 7.23 to 7.41 (m, 3H), 7.86 (s, 1H, CH 1), 8.18 (dd, 1H, CH 6), 9.06 (s, 1H, CH 3). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 116.14, 117.01, 119.00, 120.05, 123.34, 127.67, 129.28, 131.25, 133.76, 154.97. MS (ESI +, QToF, m/z): 186.1 [M+H]⁺.

4.17. 4-chloroimidazo[1,5-*a*]quinoxaline (**12**)

Phosphorus oxychloride (6 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.85 mL) were added to **11** (0.5 g, 2.7 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 × 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl

acetate 80/20 to 50/50. The compound is obtained as a white solid (33% yield). $C_{10}H_6ClN_3$. M_w : 203.63 g/mol. Mp 232–234 °C. 1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 7.58 (t, 1H, $J=6$ Hz, CH 7), 7.69 (t, 1H, CH 8, $J=6$ Hz), 7.85 (d, 1H, CH 9, $J=6$ Hz), 7.94 (s, 1H, CH 1), 8.38 (d, 1H, CH 6, $J=9$ Hz), 9.38 (s, 1H, CH 3). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 116.23, 122.50, 124.96, 127.92, 128.18, 129.15, 129.78, 133.50, 134.86, 143.29. MS (ESI +, QToF, m/z): 204.2 [M+H]⁺.

4.18. *N*-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**13**)

A mixture of **12** (1 g, 4.9 mmol) and methylamine (4 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (14.4 mL) was submitted to microwave-irradiation in a sealed tube at 150 °C for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL). The organic fraction was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The compound is obtained as a white solid (75% yield). $C_{11}H_{10}N_4$. M_w : 198.22 g/mol. Mp 257–258 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 3.02 (d, 3H, CH₃, $J=4$ Hz), 7.24 (t, 1H, CH 7, $J=8$ Hz), 7.37 (t, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.51 (d, 1H, CH 9, $J=8$ Hz), 7.76 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, CH 1), 8.13 (d, 1H, CH 6, $J=8$ Hz), 9.06 (s, 1H, CH 3). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 27.51, 115.38, 118.66, 122.80, 124.51, 126.41, 127.07, 131.56, 137.92, 149.35, 206.94. MS (ESI +, QToF, m/z): 198.8 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{11}H_{11}N_4$ 199.0984, found 199.0985.

4.19. Bromo-*N*-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**14**)

A solution of **13** (0.69 g, 3.5 mmol) and *N*-bromosuccinimide (0.68 g, 3.85 mmol) in chloroform (94 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was dissolved in ethyl acetate, washed twice with a saturated aqueous NH₄Cl solution, saturated aqueous NaHCO₃ solution, distilled water, and saturated aqueous NaCl solution, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 70/30 to 50/50 to give three products **14a**, **14b** and **14c**.

4.20. 3-bromo-*N*-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**14a**)

White solid. $C_{11}H_9BrN_4$. M_w : 277.12 g/mol. Mp 195–197 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 3.05 (d, 3H, CH₃, $J=4$ Hz), 6.66 (s, 1H, NH), 7.24 (td, 1H, CH 7, $J=8$ Hz), 7.35 (td, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.50 (dd, 1H, CH 9, $J=8$ Hz), 8.12 (dd, 1H, CH 6, $J=8$ Hz), 9.11 (s, 1H, CH 3). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 28.36, 109.53, 115.05, 115.15, 122.71, 123.42, 126.50, 127.76, 131.54, 137.48, 148.38. MS (ESI +, QToF, m/z): 277.0 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{11}H_{10}BrN_4$ 277.0089, found 277.0090.

4.21. 1-bromo-*N*-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**14b**)

White solid. $C_{11}H_9BrN_4$. M_w : 277.12 g/mol. Mp 170–173 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 3.00 (d, 3H, CH₃, $J=3$ Hz), 7.26 (td, 1H, CH 7, $J=8$ Hz), 7.41 (td, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.55 (dd, 1H, CH 9, $J=8$ Hz), 7.84 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, CH 1), 8.93 (dd, 1H, CH 6, $J=8$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 27.49, 115.23, 117.77, 122.04, 123.75, 125.31, 126.84, 127.66, 128.53, 130.33, 148.67. MS (ESI +, QToF, m/z): 277.0 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{11}H_{10}BrN_4$ 277.0089, found 277.0090.

4.22. 1,3-dibromo-*N*-methylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**14c**)

White solid. $C_{11}H_8Br_2N_4$. M_w : 356.02 g/mol. Mp 177–178 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 3.04 (d, 3H, CH₃, $J=3$ Hz), 6.69 (s,

1H, NH), 7.27 (td, 1H, CH 7, $J=4$ Hz), 7.43 (td, 1H, CH 8, $J=6$ Hz), 7.54 (d, 1H, =CH 9, $J=8$ Hz), 8.88 (d, 1H, =CH 6, $J=4$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 27.87, 109.45, 113.26, 114.83, 118.28, 122.32, 123.40, 126.49, 127.87, 138.02, 147.47. MS (ESI +, QToF, m/z): 354.9 [M+H] $^+$. HRMS: m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{Br}_2\text{N}_4$ 354.9194, found 354.9195.

4.23. Dipyrazolo[1,5-*a*:1',5'-*d*]pyrazine-4,9-dione (**15**)

The pyrazole-3-carboxylic acid (5 g, 44.6 mmol) in suspension in thionyl chloride (75 mL) was heated to reflux under agitation for 18 h. The reaction mixture was cooled, then filtered, washed with toluene, and dried under high vacuum. The compound is obtained as a white solid (76% yield). $\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$. M_w : 188.14 g/mol. Mp 183–185 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 7.56 (d, 2H, CH=C-O, $J=3$ Hz), 8.21 (d, 2H, CH=N, $J=3$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 108.26, 115.97, 133.39, 141.18, 146.69, 163.07. MS (ESI +, QToF, m/z): 189.1 [M+H] $^+$.

4.24. 2-fluorophenyl-1H-pyrazole-5-carboxamide (**16a**)

To 2-fluoroaniline (4.1 mL, 42.4 mmol) in THF (45 mL) cooled in a -10 °C bath, sodium bis(trimethylsilyl)amide (106 mL, 106 mmol, 1.0 M) in THF was added. After stirring for 1 h, a suspension of **15** (4 g, 21.2 mmol) in THF (45 mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Acetic acid was added to pH 7. The reaction mixture was concentrated in vacuum followed by the addition of water and saturated aqueous NaHCO_3 solution. The solid was collected by filtration, washed with water and cyclohexane, and dried under high vacuum. The compound is obtained as a beige solid (82% yield). $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FN}_3\text{O}$. M_w : 205.19 g/mol. Mp 170–173 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 6.81 (d, 1H, CH=C-O, $J=3$ Hz), 7.19 to 7.33 (m, 3H), 7.82–7.89 (m, 2H), 9.70 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 106.13, 116.00, 124.88, 125.39, 126.00, 126.39, 132.05, 153.34, 156.59, 160.38. MS (ESI +, QToF, m/z): 205.8 [M+H] $^+$.

4.25. *N*-(2-fluoro-4-methylphenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (**16b**)

Same procedure used for the synthesis of **16a**. 2-fluoro-4-methylaniline (4 mL, 35 mmol) in THF (37 mL), sodium bis(trimethylsilyl)amide in THF (44 mL, 44 mmol, 1.0 M), **15** (3.29 g, 17.5 mmol) in THF (70 mL). The compound is obtained as a beige solid (87% yield). $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}$. M_w : 219.22 g/mol. Mp 205–206 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 2.30 (s, 3H, CH_3), 6.80 (d, 1H, CH=C-O, $J=3$ Hz), 7.00 to 7.14 (m, 2H), 7.70 (m, 1H, -CH=C-NH), 7.87 (d, 1H, CH=N, $J=3$ Hz), 9.59 (s, 1H, NH-C=O). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 20.87, 106.04, 116.35, 123.30, 125.30, 132.11, 136.40, 145.38, 153.31, 156.56, 160.27. MS (ESI +, QToF, m/z): 220.2 [M+H] $^+$.

4.26. *N*-(2-fluoro-5-methylphenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (**16c**)

Same procedure used for the synthesis of **16a**. 2-fluoro-5-methylaniline (4.15 mL, 36.8 mmol) in THF (39 mL), sodium bis(trimethylsilyl)amide in THF (46 mL, 46 mmol, 1.0 M), **15** (3.47 g, 18.4 mmol) in THF (73 mL). The compound is obtained as a beige solid (75% yield). $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}$. M_w : 219.22 g/mol. Mp 151–154 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 2.29 (s, 3H, CH_3), 6.80 (d, 1H, CH=C-O, $J=3$ Hz), 7.00 (m, 1H, =CH-C), 7.17 (m, 1H, -CH=C-F), 7.68 (d, 1H, -CH=C-NH, $J=3$ Hz), 7.86 (d, 1H, CH=N, $J=3$ Hz), 9.64 (s, 1H, NH-C=O). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 20.91, 106.05, 115.60, 125.70, 126.40, 132.17, 133.95, 145.33, 151.46, 154.67, 160.25.

MS (ESI +, QToF, m/z): 220.0 [M+H] $^+$.

4.27. Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**17a**)

A mixture of **16a** (7 g, 34.1 mmol) and sodium hydride (2.04 g, 51 mmol) in dimethylacetamide (253 mL) was heated to reflux for 48 h. The sodium hydride was neutralized with saturated aqueous NH_4Cl solution and the reaction mixture was then concentrated in vacuum. The residue was collected by filtration, washed with distilled water, and dried. The compound is obtained as a grey solid (74% yield). $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$. M_w : 185.18 g/mol. Mp 260–263 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 7.15 (d, 1H, CH 3), 7.29 to 7.42 (m, 3H), 8.07 to 8.14 (m, 2H). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 106.13, 116.00, 124.88, 125.39, 126.00, 126.39, 132.05, 153.34, 156.59, 160.38. MS (ESI +, QToF, m/z): 186.1 [M+H] $^+$.

4.28. 8-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**17b**)

Same procedure used for the synthesis of **17a**. **16b** (6.76 g, 31 mmol), sodium hydride (1.86 g, 46.5 mmol) in dimethylacetamide (230 mL). The compound is obtained as a beige solid (84% yield). $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$. M_w : 199.21 g/mol. Mp 275–280 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 2.38 (s, 1H, CH_3), 7.11 (d, 1H, CH 3, $J=3$ Hz), 7.20 to 7.27 (m, 2H, CH 7, CH 9), 7.91 (d, 1H, CH 6), 8.03 (d, 1H, CH 2, $J=3$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 21.07, 106.88, 115.25, 116.82, 123.88, 126.26, 128.17, 133.07, 133.35, 141.84, 154.66. MS (ESI +, QToF, m/z): 200.1 [M+H] $^+$.

4.29. 7-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**17c**)

Same procedure used for the synthesis of **17a**. **16c** (5.97 g, 27 mmol), sodium hydride (1.62 g, 40.5 mmol) in dimethylacetamide (200 mL). The compound is obtained as a beige solid (100% yield). $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$. M_w : 199.21 g/mol. Mp 298–300 °C. ^1H NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 2.35 (s, 1H, CH_3), 7.07 to 7.14 (m, 2H, CH 3, CH 8), 7.17 (d, 1H, CH 9), 7.98 (d, 1H, CH 6, $J=6$ Hz), 8.02 (d, 1H, CH 2, $J=6$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 21.30, 106.72, 115.17, 116.91, 122.13, 124.66, 128.60, 132.75, 137.03, 141.65, 155.00. MS (ESI +, QToF, m/z): 200.0 [M+H] $^+$.

4.30. *N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**19a**)

Phosphorus oxychloride (6 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.85 mL, 5.4 mmol) were added to **17a** (0.5 g, 2.7 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na_2CO_3 solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3×50 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated to dryness under vacuum to give **18a**. A mixture of **18a** (1 g, 4.9 mmol) and methylamine (4 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (14.4 mL) was submitted to microwave irradiation in a sealed tube at 150 °C for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). The organic fraction was washed with saturated aqueous solution NaHCO_3 (20 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The product was purified by column chromatography on silica gel eluted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98:2). The compound is obtained as a white solid (82% yield). $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4$. M_w : 198.22 g/mol. Mp 154–155 °C. ^1H NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 3.04 (s, 3H, CH_3), 7.11 (d, 1H, CH 3, $J=4$ Hz), 7.28 (td, 1H, CH 7, $J=8$ Hz), 7.40 (td, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.60 (dd, 1H, CH 9, $J=8$ Hz), 7.86 (s, 1H, NH), 8.07 (d, 1H, CH 2, $J=4$ Hz), 8.18 (dd, 1H, CH 6, $J=8$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 106.13, 116.00, 124.88, 125.39, 126.00, 126.39, 132.05, 153.34, 156.59, 160.38. MS (ESI +, QToF, m/z): 199.0 [M+H] $^+$. HRMS: m/z calculated

for $C_{11}H_{11}N_4$ 199.0984, found 199.0985.

4.31. *N,N*-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**19a'**)

A mixture of **18a** (1 g, 4.9 mmol) and dimethylamine (6.5 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (14 mL) was submitted to microwave irradiation in a sealed tube at 150 °C for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). The organic fraction was washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (20 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/10 to 80/20. The compound is obtained as a white solid (20% yield). $C_{12}H_{12}N_4$. M_w : 212.25 g/mol. Mp 95–96 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$) 3.37 (s, 6H, 2x CH_3), 7.20 (d, 1H, CH 3, $J=4$ Hz), 7.31 (td, 1H, CH 7, $J=6$ Hz), 7.40 (td, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.58 (dd, 1H, CH 9, $J=8$ Hz), 8.13 (d, 1H, CH 2, $J=4$ Hz), 8.20 (dd, 1H, CH 6, $J=8$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 40.18, 104.79, 114.61, 123.82, 125.90, 126.27, 126.90, 127.28, 136.72, 141.28, 150.67. MS (ESI +, QToF, m/z): 213.2 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{12}H_{13}N_4$ 213.1140, found 213.1140.

4.32. *N*,8-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**19b**)

Same procedure used for the synthesis of **19a**. **17b** (0.5 g, 2.5 mmol), phosphorus oxychloride (6 mL, 55 mmol) and *N,N*-diethylaniline (0.8 mL) give **18b**. **18b** (1 g, 4.6 mmol), methylamine (3.77 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (14 mL) give **19a**. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 60/40. The compound is obtained as a white solid (35% yield). $C_{12}H_{12}N_4$. M_w : 212.25 g/mol. Mp 181–182 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$) 2.43 (s, 3H, CH_3), 3.04 (d, 3H, $NHCH_3$, $J=4$ Hz), 7.10 (d, 1H, CH 3, $J=2$ Hz), 7.20 (dd, 1H, CH 7, $J=8$ Hz), 7.49 (d, 1H, CH 6, $J=9$ Hz), 7.71 (s, 1H, NH), 8.00 (d, 1H, CH 9), 8.05 (d, 1H, CH 2, $J=2$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 21.33, 27.72, 100.70, 114.40, 125.81, 126.20, 127.84, 127.9, 133.02, 135.40, 141.30, 149.00. MS (ESI +, QToF, m/z): 213.2 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{12}H_{13}N_4$ 213.1140, found 213.1141.

4.33. *N,N*,8-trimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**19b'**)

Same procedure used for the synthesis of **19a'**. **18b** (1 g, 4.6 mmol), methylamine (6.1 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (13 mL), purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/10 to 80/20. The compound is obtained as a white solid (33% yield). $C_{13}H_{14}N_4$. M_w : 226.28 g/mol. Mp 124–125 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$) 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.34 (s, 6H, 2x NCH_3), 7.15 (dd, 1H, CH 3, $J=2$ Hz), 7.21 (dd, 1H, CH 7, $J=2$ Hz), 7.46 (d, 1H, CH 6, $J=8$ Hz), 8.02 (d, 1H, CH 9), 8.10 (d, 1H, CH 2, $J=2$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 21.42, 40.06, 104.51, 114.50, 125.70, 126.20, 127.32, 127.9, 133.50, 134.60, 141.20, 150.30. MS (ESI +, QToF, m/z): 227.2 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{13}H_{15}N_4$ 227.1297, found 227.1303.

4.34. *N*,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**19c**)

Same procedure used for the synthesis of **19a**. **17c** (0.5 g, 2.5 mmol), phosphorus oxychloride (6 mL, 55 mmol) and *N,N*-diethylaniline (0.8 mL) give **18c**. **18c** (1 g, 4.6 mmol), methylamine (3.77 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (14 mL) give **19c**. The product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to 60/40. The compound is obtained as a white solid (30% yield). $C_{12}H_{12}N_4$. M_w : 212.25 g/mol. Mp 157–158 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$)

2.41 (s, 3H, CH_3), 3.04 (d, 3H, $NHCH_3$, $J=4$ Hz), 7.10 (d, 1H, CH 3), 7.13 (dd, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.44 (d, 1H, CH 9), 7.81 (s, 1H, NH), 8.04 (d, 1H, CH 2), 8.07 (d, 1H, CH 6, $J=8$ Hz). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 21.31, 27.71, 100.65, 114.23, 124.06, 124.59, 126.32, 127.61, 136.05, 137.49, 141.07, 149.54. MS (ESI +, QToF, m/z): 213.0 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{12}H_{13}N_4$ 213.1140, found 213.1140.

4.35. *N,N*,7-trimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**19c'**)

Same procedure used for the synthesis of **19a'**. **18c** (1 g, 4.6 mmol), methylamine (6.1 mL in 33% of absolute ethanol solution) in dry ethanol (13 mL), purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 90/10 to 80/20, white solid (24% yield). $C_{13}H_{14}N_4$. M_w : 226.28 g/mol. Mp 123–124 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$) 2.40 (s, 3H, CH_3), 3.36 (s, 6H, 2x NCH_3), 7.13 (dd, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.17 (d, 1H, CH 3), 7.39 (d, 1H, CH 9), 8.07 to 8.09 (m, 2H, CH 2, CH 6). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 21.28, 40.06, 104.56, 114.36, 123.89, 124.97, 126.11, 127.03, 136.21, 136.68, 140.94, 150.72. MS (ESI +, QToF, m/z): 226.9 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{13}H_{15}N_4$ 227.1297, found 227.1298.

4.36. 3-bromo-*N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**20a**)

A solution of **19a** (2 g, 10 mmol) and *N*-bromosuccinimide (1.9 g, 11 mmol) in chloroform (267 mL) was heated under reflux for 2 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the residue was dissolved in ethyl acetate, washed twice with a saturated aqueous NH_4Cl solution, saturated aqueous $NaHCO_3$ solution, water, and saturated aqueous $NaCl$ solution, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The compound is obtained as a white solid (89% yield). $C_{11}H_{10}BrN_4$. M_w : 277.12 g/mol. Mp 162–163 °C. 1H NMR δ (ppm, 300 MHz, $DMSO-d_6$) 3.08 (s, 3H, CH_3), 7.76 (s, 1H, NH), 7.34 (td, 1H, CH 7, $J=9$ Hz), 7.42 (td, 1H, CH 8, $J=6$ Hz), 7.60 (dd, 1H, CH 9, $J=6$ Hz), 8.14 (dd, 1H, CH 6, $J=9$ Hz), 8.24 (s, 1H, CH 3). ^{13}C NMR δ (ppm, 75 MHz, $DMSO-d_6$) 28.59, 87.65, 114.22, 124.19, 126.02, 126.51, 127.42, 137.05, 142.40, 148.72. MS (ESI +, QToF, m/z): 277.1 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{11}H_{10}BrN_4$ 277.0089, found 277.0090.

4.37. 3-bromo-*N*,8-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**20b**)

Same procedure used for the synthesis of **20a**. **19b** (2.06 g, 10 mmol), *N*-bromosuccinimide (1.96 g, 11 mmol) in chloroform (267 mL). The compound is obtained as a white solid (60% yield). $C_{12}H_{11}BrN_4$. M_w : 291.15 g/mol. Mp 150–151 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$) 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.07 (d, 3H, $NHCH_3$, $J=4$ Hz), 6.66 (s, 1H, NH), 7.26 (dd, 1H, CH 7, $J=8$ Hz), 7.49 (d, 1H, CH 6, $J=8$ Hz), 7.97 (d, 1H, CH 9), 8.23 (s, 1H, CH 2). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 21.37, 28.59, 87.52, 114.06, 124.32, 125.76, 126.31, 128.61, 133.96, 134.85, 142.34, 148.26. MS (ESI +, QToF, m/z): 291.1 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for $C_{12}H_{12}BrN_4$ 291.0245, found 291.0248.

4.38. 3-bromo-*N*,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**20c**)

Same procedure used for the synthesis of **20a**. **19c** (1.28 g, 6 mmol), *N*-bromosuccinimide (1.17 g, 6.6 mmol) in chloroform (160 mL). The compound is obtained as a white solid (69% yield). $C_{12}H_{11}BrN_4$. M_w : 291.15 g/mol. Mp 157–159 °C. 1H NMR δ (ppm, 400 MHz, $DMSO-d_6$) 2.41 (s, 3H, CH_3), 3.07 (d, 3H, $NHCH_3$, $J=4$ Hz), 6.70 (s, 1H, NH), 7.16 (dd, 1H, CH 8, $J=8$ Hz), 7.42 (d, 1H, CH 9, $J=4$ Hz), 8.02 (d, 1H, CH 6, $J=8$ Hz), 8.21 (s, 1H, CH 2). ^{13}C NMR δ (ppm, 100 MHz, $DMSO-d_6$) 21.29, 28.56, 87.38, 113.98, 124.02,

125.31, 126.40, 128.08, 136.90, 137.03, 142.08, 148.78. MS (ESI +, QToF, m/z): 291.1 [M+H]⁺. HRMS: m/z calculated for C₁₂H₁₂BrN₄ 291.0245, found 291.0247.

Acknowledgements

Authors thank the Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT AxLr) for financial support to Cindy Patinote and the Lebanese University for financial support to Nour Bou Karroum. We would like to thank Stephanie Paniagua for her technical help. We also thank the French department of Biotage for lending us a HPLC system.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.021>.

References

- [1] P.P. Tak, G.S. Firestein, NF- κ B : a key role in inflammatory diseases, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 7–11.
- [2] L. Verstrepen, R. Beyaert, Receptor proximal kinases in NF- κ B signalling as potential therapeutic targets in cancer and inflammation, *Biochem. Pharmacol.* 92 (2014) 519–529.
- [3] C.C. Chen, C.L. Rosenbloom, D.C. Anderson, A.M. Manning, Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation, *J. Immunol.* 155 (1995) 3538–3545.
- [4] T. Murata, M. Shimada, S. Sakakibara, T. Yoshina, H. Kadono, T. Masuda, M. Shimazaki, T. Shintani, K. Fuchikami, K. Sakai, H. Inbe, K. Takeshita, T. Niki, M. Umeda, K.B. Bacon, K.B. Ziegelbauer, T.B. Lowinger, Discovery of novel and selective IKK- β serine-threonine protein kinase inhibitors. Part 1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 913–918.
- [5] N.D. Perkins, Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 49–62.
- [6] C. Bonizzi, M. Karin, The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol.* 6 (2004) 280–288.
- [7] S. Ghosh, M. Karin, Missing pieces in the NF- κ B puzzle, *Cell* 109 (2002) 81–96.
- [8] M. Hinz, C. Scheidereit, The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond, *EMBO Rep.* 15 (2014) 46–61.
- [9] A. Tsuchiya, K. Imai, K. Asamitsu, Y. Waguri-Nagaya, T. Otsuka, T. Okamoto, Inhibition of inflammatory cytokine production from rheumatoid synovial fibroblast by a novel I κ B kinase inhibitor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333 (2010) 236–243.
- [10] T. Collins, M.I. Cybulsky, NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 255–264.
- [11] M.R. Edwards, Targeting the NF- κ B pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Pharmacol. Ther.* 121 (2009) 1–13.
- [12] M.F. Neurath, I. Fuss, G. Schurmann, S. Pettersson, K. Arnold, H. Muller-Lobeck, W. Strober, C. Herfarth, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, Cytokine gene transcription by NF- κ B family members in patients with inflammatory bowel disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 859 (1998) 149–159.
- [13] M. Karin, F.R. Greten, NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2005) 749–759.
- [14] M. Karin, Nuclear Factor kappa B in cancer development and progression, *Nature* 441 (2006) 431–436.
- [15] M. Karin, Y. Yamamoto, Q. May Wang, The IKK NF- κ B System: a treasure trove for drug development, *Nat. Rev.* 3 (2004) 17–26.
- [16] E.R.R. Young, IKK β as a therapeutic intervention point for disease related to inflammation, in: J.I. Levin, S. Laufer (Eds.), *Anti-inflammatory drug discovery*, 2012, pp. 255–296.
- [17] F. Liu, Y. Xia, A.S. Parker, I.M. Verma, IKK biology, *Immunol. Rev.* 246 (2012) 239–253.
- [18] M.S.S. Palanki, M.J. Suto, Signal Pharmaceuticals, Inc. Quinazoline analogs and related compounds and methods for treating inflammatory conditions, WO 1999/01441.
- [19] M.S.S. Palanki, L.M. Gayo-Fung, G.I. Shevlin, P. Erdman, M. Sato, M. Goldman, L.J. Ransone, C. Spooner, Structure–activity relationship studies of ethyl 2-[(3-methyl-2,5-dioxo(3-pyrrolinyl)amino)-4-(trifluoromethyl)pyrimidine-5-carboxylate: an inhibitor of AP-1 and NF- κ B mediated gene expression, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 2573–2577.
- [20] O. Ritzeler, H.U. Stilz, B. Neises, G. Jaehne, J. Habermann, Substituted indoles for modulating NF- κ B activity, WO 2001/030774.
- [21] T. Murata, M. Umeda, S. Sakakibara, T. Yoshina, H. Sato, T. Masuda, Y. Koriyama, M. Shimada, T. Shintani, H. Kadono, T.B. Lowinger, K.B. Ziegelbauer, K. Fuchikami, Pyridine derivatives with I κ B-Kinase (IKK- β) inhibiting activity, WO 2002/024679.
- [22] Preparation of 2,4-diarylpyridines as I κ B kinase β inhibitors useful as antiinflammatories, WO 2002/044153.
- [23] O. Ritzeler, H.U. Stilz, B. Neises, W.J. Bock, Jr.A. Walser, G.A. Flynn, Substituted Benzimidazole, WO 2001/000610.
- [24] S. Dadiboyena, A. Arfaoui, H. Amri, F.J. Piedrafita, A. Nefzi, Diversity oriented synthesis and IKK inhibition of aminobenzimidazole tethered quinazoline-2,4-diones, thioxoquinazolin-4-ones, benzodiazepine-2,3,5-triones, isoxazoles and isoxazolines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 685–689.
- [25] S. Metz, M. Clare, J.Z. Crich, T.J. Hagen, G.J. Hanson, H. Huang, S.J. Houdek, M.A. Stealey, M.L. Vazquez, R.M. Weier, X. Xu, Preparation of pyrazolo [4,3-c] quinolines, chromeno [4,3-c] pyrazoles, and analogs for treatment of inflammation, WO 2003/024936.
- [26] R.W. Hamilton, Preparation of 4,5-dihydro-1H-benzo[g]indazole-3-carboxamides for treatment of inflammation, WO 2003/024935.
- [27] C. Wahl, S. Liptay, G. Adler, R.M. Schmid, Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of NF- κ B, *J. Clin. Invest.* 101 (1997) 1163–1174.
- [28] F. Yan, D.B. Polk, Aminosalicic acid inhibits I κ B kinase- α phosphorylation of I κ B α in mouse intestinal epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36631–36636.
- [29] E. Kopp, S. Ghosh, Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin, *Science* 265 (1994) 956–959.
- [30] M.-J. Yin, Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β , *Nature* 396 (1998) 77–80.
- [31] G. Moarbes, J.F. Guichou, S. Paniagua-Gayraud, A. Chouchou, O. Marcadet, F. Leroy, R. Ruédas, P. Cuq, C. Deleuze-Masquéfa, P.A. Bonnet, New IKK inhibitors: synthesis of new imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives using microwave assistance and biological evaluation as IKK inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 115 (2016) 268–274.
- [32] M. Koppitz, U. Klar, R. Jautelat, D. Kosemund, R. Bohlmann, B. Bader, P. Lienau, G. Siemeister, Substituted 6-imidazopyrazines for use as mps-1 and tkk inhibitors in the treatment of hyperproliferative disorders, WO 2012/080234 A1.
- [33] U. Klar, M. Koppitz, D. Kosemund, R. Bohlmann, B. Bader, P. Lienau, G. Siemeister, S. Precht, D. Nguyen, W. ScottBayer, Imidazopyrazines, WO 2011/113862 A1.
- [34] R. Goel, V. Luxami, K. Paul, Recent advances in development of imidazo-[1,2-a] pyrazines: synthesis, reactivity and their biological applications, *Org. Biomol. Chem.* 13 (2015) 3525–3555.
- [35] A. Macleod, D.R. Mitchell, N.J. Palmer, C.C. Parsy, M.D. Goldsmith, C.J. Harris, Imidazo [1,2-a] pyrazine compounds for treatment of viral infections such as hepatitis, WO 2009/024585 A2.
- [36] G. Moarbes, C. Deleuze-Masquéfa, V. Bonnard, S. Gayraud-Paniagua, J.R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.A. Bonnet, In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 6601–6610.
- [37] Z. Zghaib, J.-F. Guichou, J. Vappiania, N. Bece, K. Hadj-Kaddour, L.-A. Vincent, S. Paniagua-Gayraud, C. Larroque, G. Moarbes, P. Cuq, I. Kassab, C. Deleuze-Masquéfa, M. Diab-Assaf, P.-A. Bonnet, New imidazoquinoxaline derivatives: synthesis, biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure–activity relationships, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 2433–2440.
- [38] H. Rauer-Wunderlich, D. Siegmund, E. Maier, T. Giner, R.C. Bargou, H. Wajant, The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NF κ B transcription factors, *PLoS ONE* 8 (2013) e59292.
- [39] J.R. Burke, M.A. Pattoli, K.R. Gregor, P.J. Brassil, J.F. MacMaster, K.W. McIntyre, X. Yang, V.S. Iotzova, W. Clarke, J. Strnad, Y. Qiu, F.C. Zusi, BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I kappa B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-kappa B-dependent transcription in mice, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1450–1456.

4. Etude de modélisation moléculaire et optimisation de la synthèse chimique

4.1 Modélisation moléculaire « docking virtuel »

Etant donné que la première librairie de molécules n'a pas fourni de composés assez actifs sur les lignées cellulaires HEK-Blue™ hTLR7/8, nous nous sommes dirigés vers la modélisation moléculaire afin d'effectuer un docking virtuel. Ce dernier est une technique très utilisée dans la découverte de médicaments afin d'identifier à partir d'une librairie de petites molécules, celles qui sont capables de se lier à une cible médicamenteuse, généralement un récepteur protéique ou une enzyme.

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre 1, les structures cristallines de deux récepteurs TLR7 et 8, en complexe avec leurs ligands, ont été mis en évidence récemment par une équipe japonaise sous la direction du Dr. Toshiyuki Shimizu [63] [64] [66]. Nous avons utilisé ces structures, accessibles via le PDB (Protein Data Base), pour mettre en place un profil bien précis des molécules à synthétiser. Grâce aux résultats de Shimizu et *coll.* concernant les interactions des ligands avec les TLR7 et 8, nous avons pu concevoir un profil précis de molécules à synthétiser figurant dans le schéma 85 : l'introduction d'une chaîne alkyle, surtout butyle ou pentyle, en position 1 de la série imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, en position 2 de la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline et en position 3 de la série imidazo[1,2-*a*]pyrazine crée des interactions hydrophobes avec les TLR7 et 8. De plus l'introduction d'une amine primaire en position 4 des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines et en position 8 des imidazo[1,2-*a*]pyrazines est nécessaire pour avoir une activité agoniste.

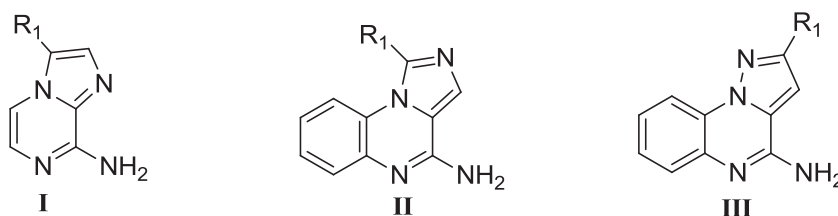


Schéma 85 : Le profil des molécules à synthétiser appartenant à la série des imidazo[1,2-*a*]pyrazines (I), imidazo[1,5-*a*]quinoxalines (II) et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines (III).

Le docking virtuel des molécules envisagées au sein des récepteurs TLR7 et TLR8 a été réalisé en utilisant le serveur e-Drug3D interfacé avec le programme de docking Plant.

Les résultats obtenus montrent des interactions importantes avec l'ectodomaine des TLR7 et 8. La figure 54 montre les interactions du 2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine avec l'ectodomaine du TLR8 : des interactions π - π entre le Phe405 et le groupement aromatique, des interactions de Van Der Waals entre la chaîne butyle et la poche formée par le Phe346/Tyr348 et une liaison ionique (salt-bridge) entre le groupement NH₂ et la chaîne latérale de l'Asp543.

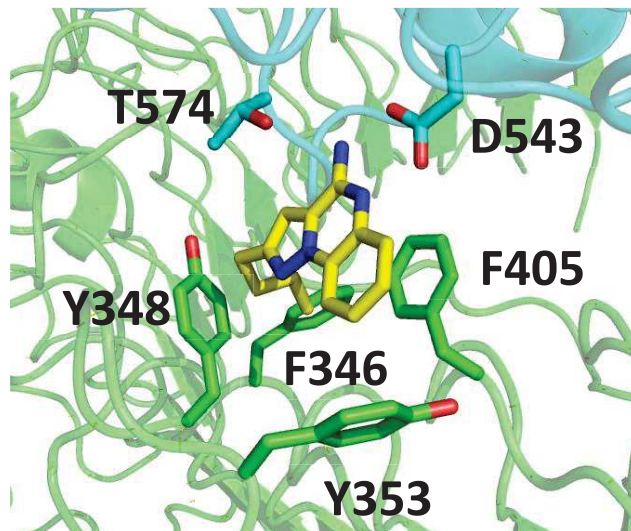


Figure 54 : Interactions entre le 2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine et l'ectodomaine du TLR8.

Comme le montre la figure 55, ces mêmes interactions ont été également observées avec l'ectodomaine du TLR7 : des interactions π - π entre le Phe408/Tyr356 et le groupement aromatique, des interactions hydrophobes entre la chaîne alkyle et la poche formée par le Phe349, Phe351 et la Val381 et des liaisons d'hydrogène entre le groupement NH_2 et la chaîne latérale de l'Asp555 et la Thr586.

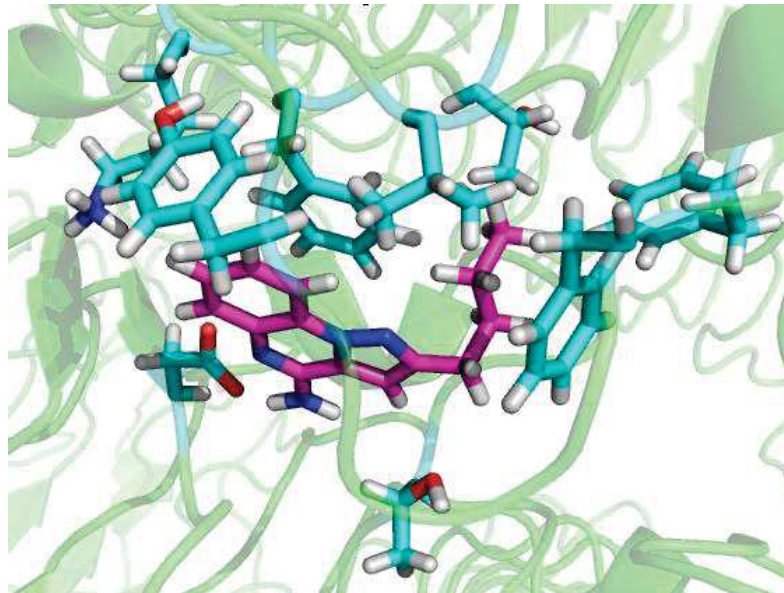


Figure 55 : Interactions entre le 2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine et l'ectodomaine du TLR7.

Après ces résultats prometteurs du docking virtuel, nous avons relancé la synthèse chimique en vue d'obtenir les molécules avec une chaîne alkyle sur le cycle à cinq sommets.

4.2 Difficultés liées à l'alkylation de la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline et imidazo[1,2-*a*]pyrazine

Plusieurs obstacles se sont présentés lors de différents essais d'alkylation de ces trois séries chimiques.

4.2.1 Problèmes liés au couplage croisé de Suzuki-Miyaura

Comme cela a été vu précédemment, le couplage croisé de Suzuki-Miyaura avec les acides *n*-alkylboroniques n'a pas fonctionné en utilisant le Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ comme catalyseur, K₂CO₃ comme base en présence d'oxyde d'argent (Ag₂O) sous irradiations micro-ondes à 140 °C. Un chauffage conventionnel à 80°C a donc été tenté sur une durée d'une semaine afin de suivre quotidiennement l'évolution de la réaction de couplage du composé **5.27a** avec l'acide *n*-pentylboronique (schéma 86). L'analyse CCM (Chromatographie Couche Mince) a indiqué la présence du produit de départ avec le produit débromé. Le même résultat est obtenu en absence d'oxyde d'argent et en utilisant le 1,4-dioxane/eau (2/1) comme solvant à 80 °C pendant une semaine (Tableau 4).

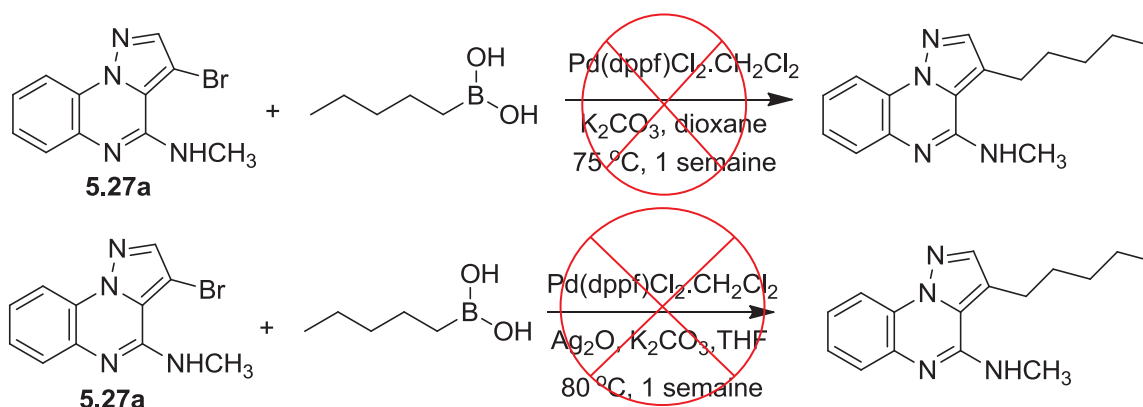


Schéma 86 : Alkylation du composé **5.27a** via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant le chauffage traditionnel

Tableau 4 : Conditions de l'alkylation via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura et rendements.

Essai	Base	Solvant	Température (°C)	Temps de réaction (jours)	Rendements (%)
1	K ₂ CO ₃ /Ag ₂ O	THF	80	7	0
2	K ₂ CO ₃	1,4-Dioxane/H ₂ O (2/1)	80	7	0

Deux essais d'alkylation via le couplage de Suzuki-Miyaura ont été également effectués sur le composé **5.2** avec l'acide *n*-pentylboronique sous irradiations micro-ondes (schéma 87, tableau 5).

Dans le deuxième essai, nous avons utilisé le catalyseur PEPPSI-*i*Pr (Pyridine-Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation) dans lequel le palladium est complexé à un ligand de type carbène *N*-hétérocyclique (NHC) (figure 56). L'effet sigma donneur ainsi que l'encombrement stérique de ce type des ligands facilite l'addition oxydante et l'élimination réductrice respectivement. Par contre, dans les deux essais, le produit de départ est récupéré avec un très petit pourcentage de produit débromé.

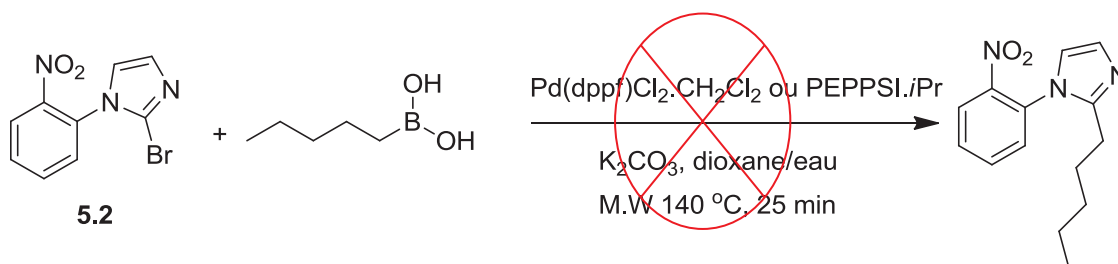


Schéma 87 : Alkylation du composé **5.2** via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura en utilisant le Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ ou Peppsi-*i*Pr comme catalyseur

Tableau 5 : Conditions d'alkylation du composé **5.2** via le couplage croisé de Suzuki-Miyaura.

Essai	Base	Solvant	Température (°C)	Catalyseur	Temps de réaction (minutes)	Rendements (%)
1	K ₂ CO ₃	1,4- Dioxane/H ₂ O (2/1)	140	Pd(dppf)Cl ₂ .CH ₂ Cl ₂	30	0
2	K ₂ CO ₃	1,4- Dioxane/H ₂ O (2/1)	140	PEPPSI- <i>i</i> Pr	30	0

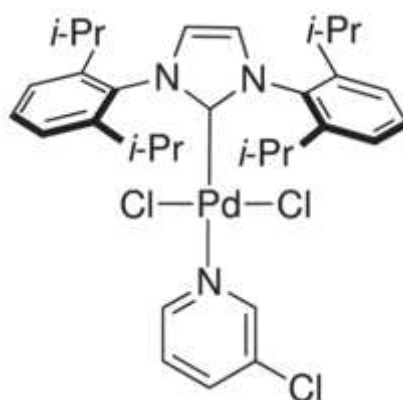
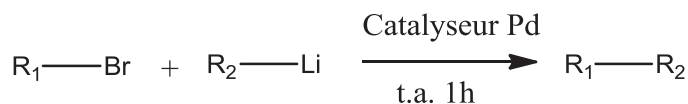


Figure 56 : Structure chimique du catalyseur PEPPSI-*i*Pr

4.2.2 Problèmes liés au couplage croisé avec les organolithiens

En 2013, Giannerini *et coll.*[291] ont décrit un couplage croisé pallado-catalysé entre des halogénures d'aryle et des organolithiens d'aryle ou d'alkyle en utilisant le palladium comme catalyseur à température ambiante pendant une heure (schéma 88).



R₁ = vinyle, aryle, hétéroaryle

R₂ = alkyle, aryle, hétéroaryle

Schéma 88 : Couplage croisé pallado-catalysé en utilisant des organolithiens

Le meilleur résultat est obtenu lorsqu'ils ont utilisé le Pd₂(dba)₃ (Tris(dibenzylideneacéto) dipalladium(0)) comme catalyseur et le P(*t*-Bu)₃ (Tri-*tert*-butylphosphine) comme ligand. De bons rendements sont également obtenus en utilisant d'autres ligands comme XPhos (2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl) ou SPhos (2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diméthoxybiphenyl). Nous avons appliqué ce type de couplage croisé sur le composé **5.15** avec le *n*-butyllithium (*n*-BuLi) (schéma 89, tableau 6, essai 1) en utilisant le Pd(OAc)₂ (acétate de palladium (II)) comme catalyseur et XantPhos (4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène) comme ligand. Le produit débromé a été obtenu en majorité (95%) avec une petite quantité du produit de départ (5%) dû à un échange lithium-halogène.

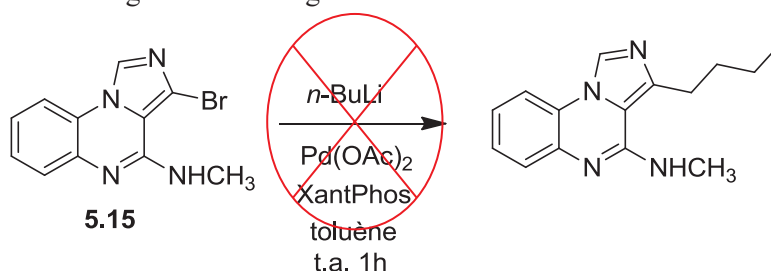


Schéma 89 : Couplage croisé pallado-catalysé du composé **5.15** et le *n*-BuLi

Le même résultat a été obtenu en utilisant le chlorure de fer(III) (FeCl₃), comme catalyseur et le TMEDA (tétraméthyléthylénédiamine) comme ligand dans du THF (schéma 90, tableau 6, essai 2). Ces conditions ont été décrites récemment par Jia *et coll.* pour la formation d'une liaison C-C via un couplage croisé catalysé par le fer [292].

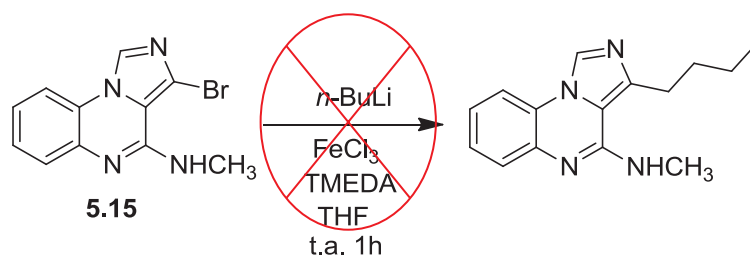


Schéma 90 : Couplage croisé catalysé par le fer du composé **5.15** et le *n*-BuLi

Tableau 6 : Conditions d'alkylation du composé **5.15** via un couplage croisé catalysé par Pd ou Fe.

Essai	Catalyseur	Ligand	Solvant	Température (°C)	Temps de réaction (heures)	Rendements (%)
1	Pd(OAc) ₂	XantPhos	Toluène	25	1	0
2	FeCl ₃	TMEDA	THF	25	1	0

4.2.3 Difficultés liées à l'alkylation de l'imidazole

Deux essais ont été effectués concernant l'introduction d'une chaîne alkyle sur le cycle imidazole afin de synthétiser des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines alkylés en position 1. Le premier consiste en une réaction de bromation du cycle imidazole en position 2 afin d'introduire par la suite des chaînes alkyles via les couplages croisés pallado-catalysés (schéma 91). Dans ce cas, un mélange de produits mono-, di- et tri-bromés a été obtenu en utilisant le NBS comme agent de bromation.

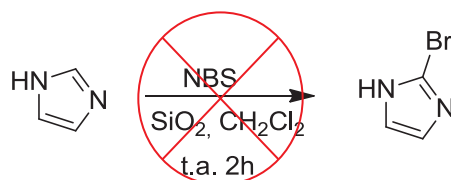


Schéma 91 : Bromation du cycle imidazole

Le deuxième essai consiste en une alkylation du cycle imidazole en utilisant le *n*-BuLi comme base et le 1-bromobutane comme électrophile dans du THF (schéma 92). En appliquant ces conditions réactionnelles, le produit de départ a été récupéré.

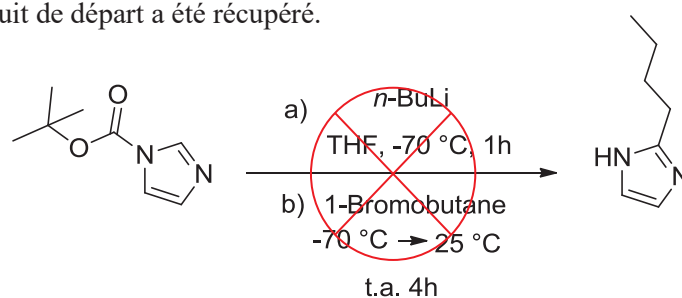


Schéma 92 : Alkylation du cycle imidazole

4.2.4 Alkylation via le couplage croisé de Sonogashira

Des essais de couplage croisé de Sonogashira ont été réalisés sur deux produits bromés : le composé **5.2** et un autre de la série des imidazo[1,2-*a*]pyrazines en utilisant les conditions classiques de la réaction de Sonogashira (schéma 93). Dans les deux cas, nous avons récupéré le produit de départ.

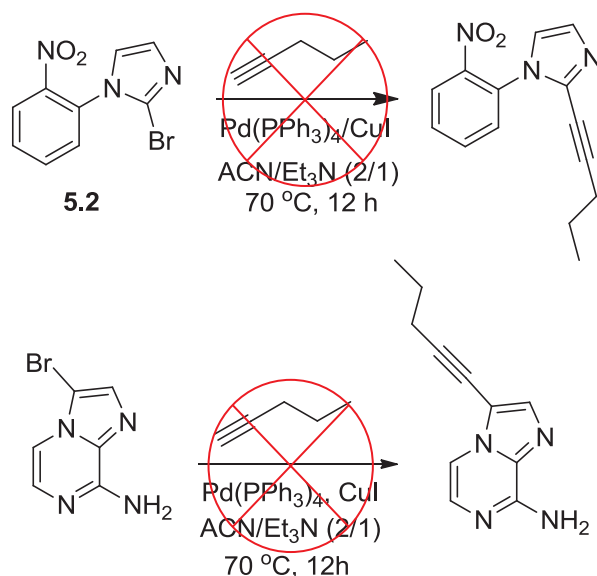


Schéma 93 : Essais d'alkylation via le couplage croisé de Sonogashira.

D'après la littérature, de nombreux couplages de Sonogashira ont été effectués sur des composés iodés permettant l'obtention des produits désirés avec de bons rendements [293]. L'iodation du composé **5.27** avec le NIS (*N*-iodosuccinimide) nous a permis d'obtenir le produit désiré avec un rendement de 42%. Le couplage croisé du composé iodé avec le 1-pentyne en présence du tétrakis Pd(PPh₃)₄ et du CuI nous a permis d'obtenir le produit alkylé (schéma 94).

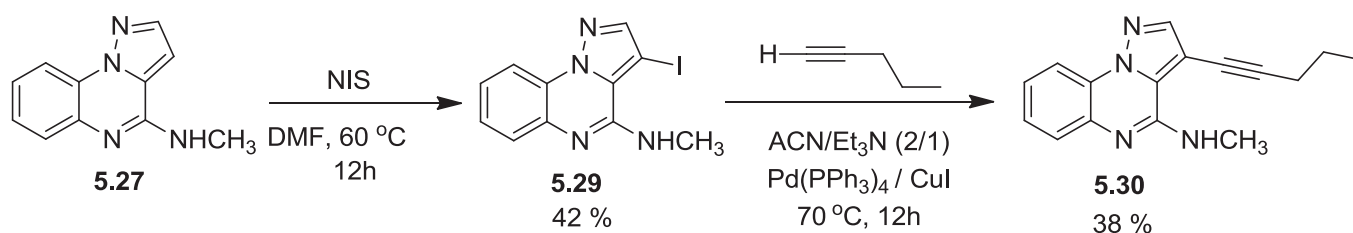


Schéma 94 : Alkylation du composé **5.30** via couplage croisé de Sonogashira

4.3 Synthèse des composés alkylés de type pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline

L'iodation du composé **5.27** s'effectue en position 3 et comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, pour avoir une activité agoniste ou antagoniste TLR7/8, les pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines devront être alkylés en position 2. Nous avons donc recommandé l'acide 5-butyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylique et l'acide 5-isobutyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylique en vue d'obtenir les

composés portant une chaîne butyle et isobutyle en position 2 en utilisant la stratégie de synthèse décrite ci-dessous (schéma 95).

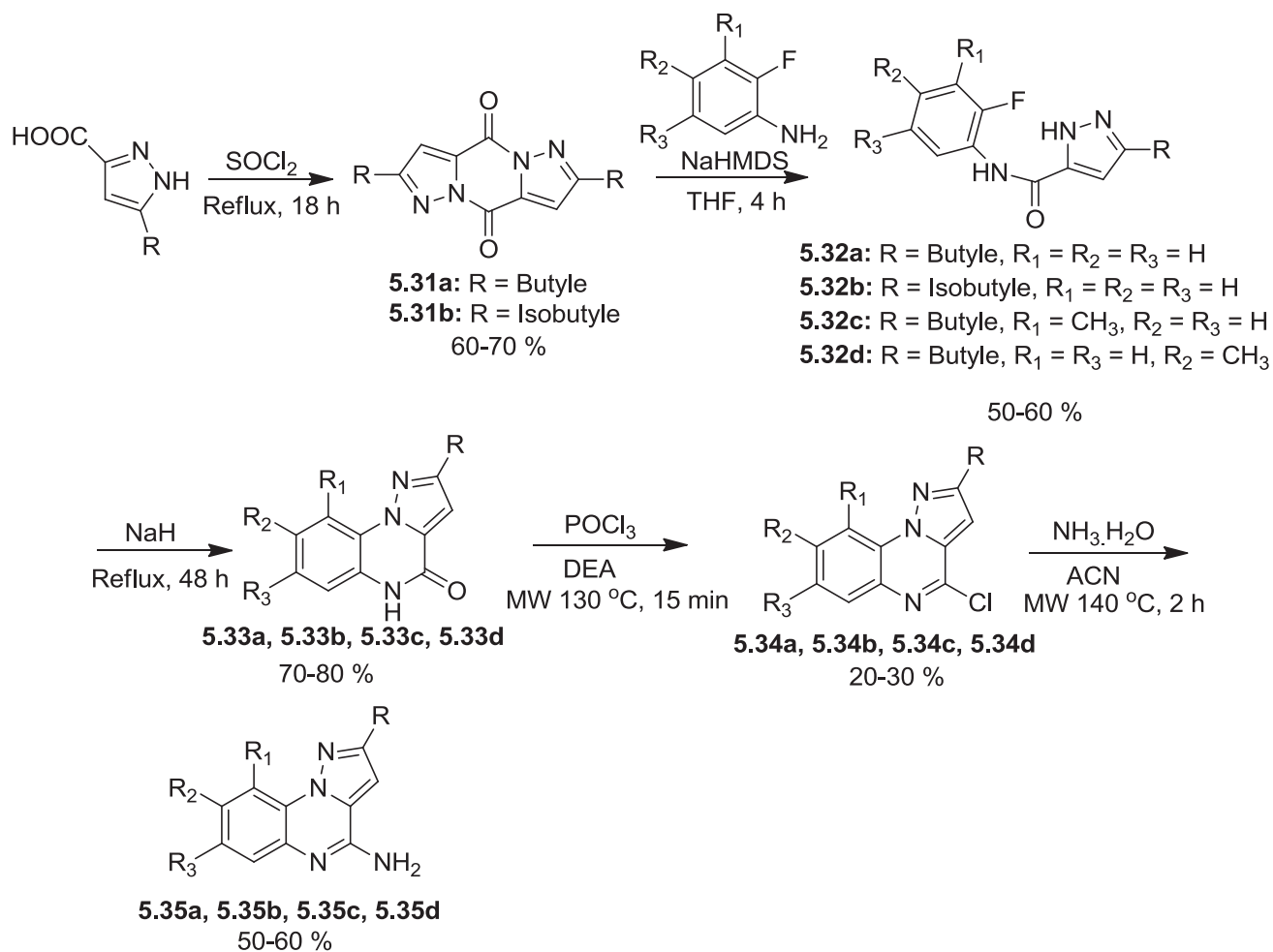


Schéma 95 : Stratégie de synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines alkylés

4.4 Synthèse des composés de type imidazo[1,2-*a*]pyrazine

Vu que nous avons réussi à établir une liaison C-C par l'intermédiaire du couplage croisé de Sonogashira, une large variété de molécules alkylés de la série des imidazo[1,2-*a*]pyrazines a été synthétisée avec de bons rendements (schéma 96).

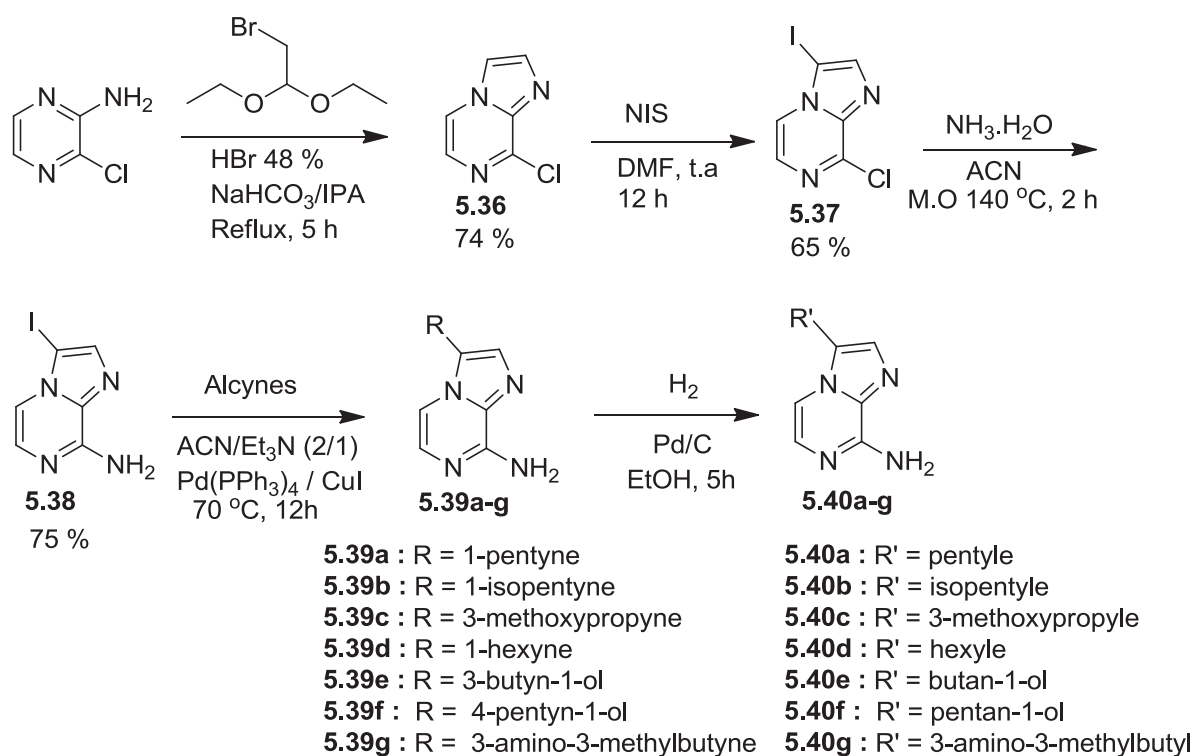


Schéma 96 : Stratégie de synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazines

Le cycle imidazo[1,2-*a*]pyrazine est construit à partir du 2-amino-3-chloropyrazine, le bromoacétaldéhyde généré in situ conduisant à la formation du composé **5.36** avec un rendement de 74% qui va subir une iodation en présence du NIS pour aboutir au composé **5.37** avec un rendement de 62 %. L'amination de ce dernier conduit au composé **5.38** qui, grâce au couplage croisé de Sonogashira, est alkylé en présence d'une grande variété d'alcynes pour donner les composés **5.39a-g**. La réduction de ces derniers par hydrogénation aboutit aux composés finaux **5.40a-g** avec de bons rendements.

4.5 Synthèse de composés alkylés de type imidazo[1,5-*a*]quinoxaline

Plusieurs essais ont été établis afin d'introduire une chaîne alkyle en position 1 de la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines via le couplage croisé de Sonogashira.

4.5.1 Iodation en position 1 du cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline

L'iodation du composé **5.41** a abouti à la synthèse d'un seul produit monoiodé dont la structure est confirmée par RMN 2D. D'après une étude de RMN HMBC et NOE, l'iode est placé en position 3 du cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline (schéma 97).

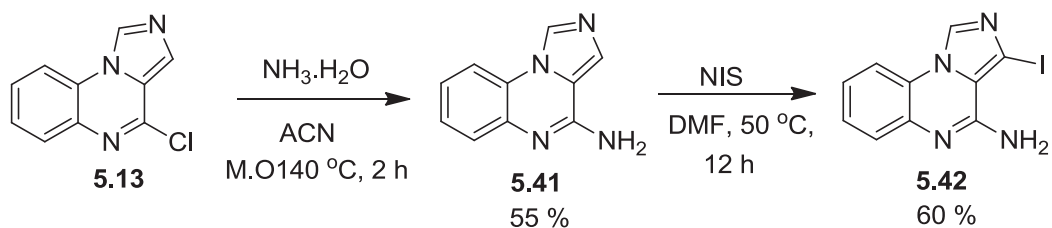


Schéma 97 : Iodation du cycle imidazo[1,5-*a*]quinoxaline

L'alkylation sur cette position ne nous permet pas d'obtenir une activité sur les TLR7 et 8. Pour cela, un transfert d'halogène brome-iode a été réalisé sur le composé **5.16** en vue d'obtenir l'iode en position 1 (schéma 98). Un mélange du produit de départ (37.23%), du produit débromé (40.95%) et du produit désiré (21.83%) est obtenu.

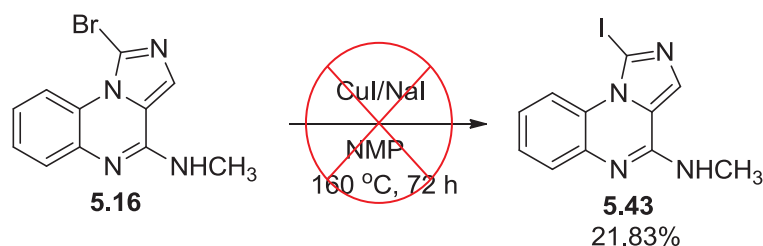


Schéma 98 : Transfert d'halogène brome-iode

4.5.2 Iodation en position 2 du cycle imidazole

En 2005, Sosnowski et *coll.* ont rapporté une iodation oxydante de quelques hétérocycles, dont l'imidazole, en utilisant le diiode (I_2) et l'acide orthopériodique (H_5IO_6) comme oxydant dans l'éthanol à 60 °C pour 45 min [294]. En appliquant ces conditions, un mélange de produits mono-, di- et tri-iodés est obtenu (schéma 99).

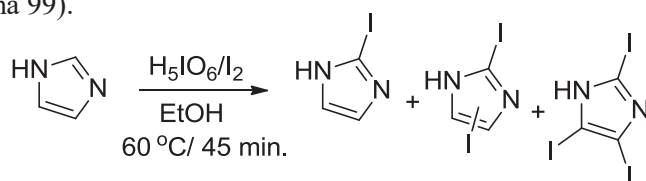


Schéma 99 : Iodation de l'imidazole en utilisant le diiode et l'acide orthopériodique.

Le même résultat est obtenu lors de l'iodation du composé **5.1** en utilisant le NIS comme agent d'iodation (schéma 100).

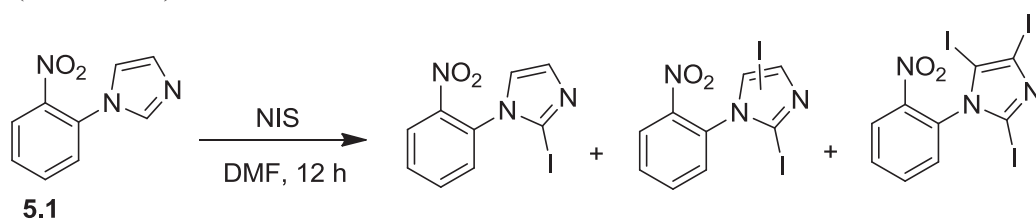


Schéma 100 : Iodation du composé **5.1**.

Pour franchir ces obstacles d'iodation, nous avons recommandé l'imidazole iodé en position 2. Des essais de Sonogashira sur le cycle imidazole iodé en position 4 ont été publiés par Sandtorv et *coll.* en utilisant le tétrakis Pd(PPh₃)₄ et le CuI comme catalyseurs, et le triéthylamine comme base dans du DMF sous irradiations micro-ondes (schéma 101) [293].

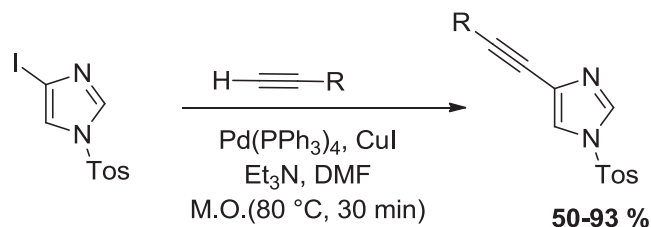


Schéma 101 : Alkylation de l'imidazole via le couplage croisé de Sonogashira

Après protection du groupement amine de l'imidazole iodé en position 2, un couplage croisé de Sonogashira avec le 1-pentyne a été réalisé en utilisant le protocole expérimental décrit par Sandtorv et *coll.* avec une seule différence qui consiste en une utilisation de chauffage traditionnel au lieu des irradiations micro-ondes. Avec ces conditions, nous avons réussi à obtenir l'imidazole alkylé en position 1 avec un rendement de 67%. Deux autres alcynes ont été introduits par couplage croisé de Sonogashira afin d'augmenter la diversité structurale de la série des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines. La nouvelle stratégie de synthèse est décrite dans le schéma 102.

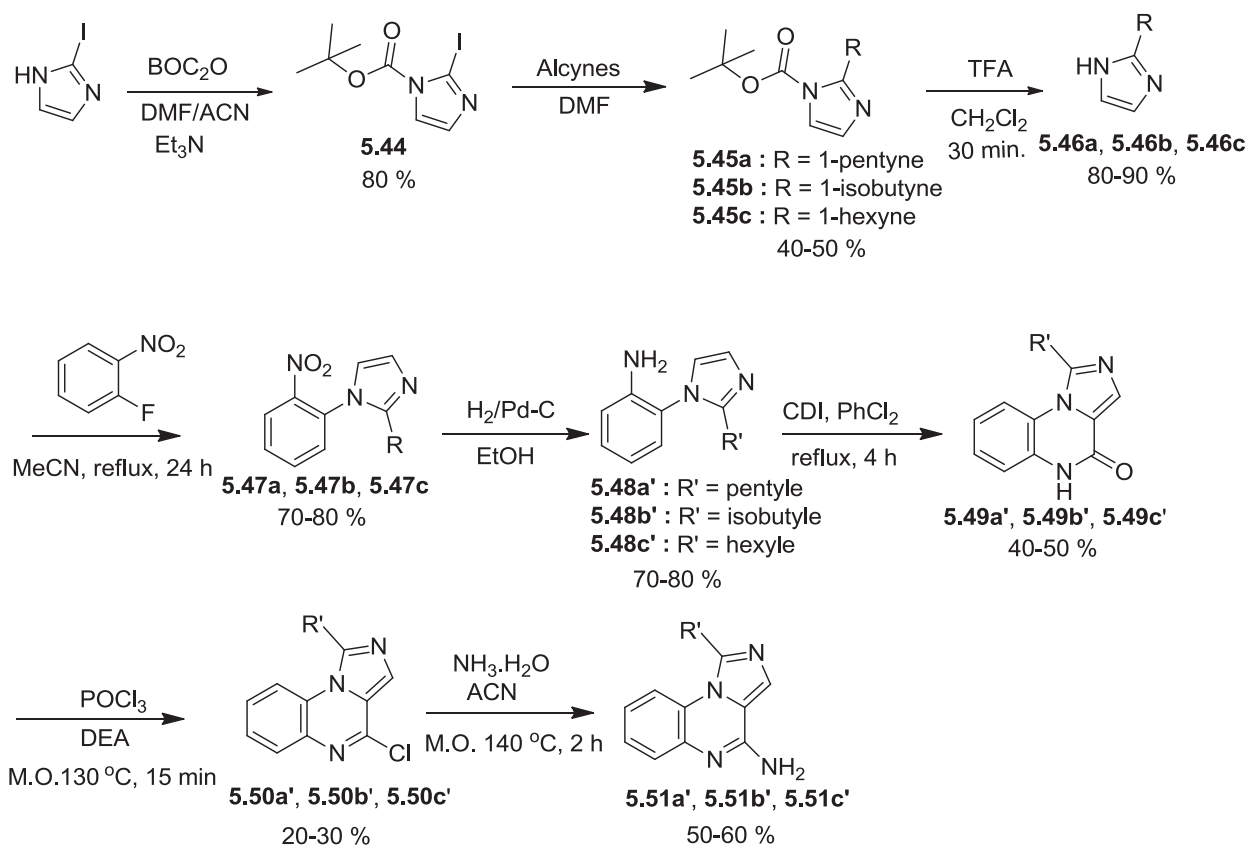


Schéma 102 : Nouvelle stratégie de synthèse des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines alkylés

La synthèse débute par la protection du NH de l'imidazole iodé suivi d'un couplage croisé de Sonogashira qui nous a permis d'obtenir les imidazoles alkylés **3.45a-c**. Après une étape de déprotection, les composés **3.46a-c** sont couplés avec l'ortho-fluorobenzène en présence d'excès du carbonate de potassium. Après réduction du groupement nitro et de l'alcyne, les composés **3.49a'-c'** sont obtenus après insertion du carbonyldiimidazole (CDI) conduisant à la structure tricyclique imidazoquinoxalinique. Une étape de chloration est nécessaire pour obtenir, par substitution nucléophile, des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines aminés **3.51a'-c'**.

L'introduction d'une chaîne butyle par couplage croisé de Sonogashira n'est pas pratique puisque le 1-butynes existe sous forme d'un gaz. Nous avons alors recommandé le 2-butyl-*1H*-imidazole en vue d'obtenir l'imidazo[1,5-*a*]quinoxaline butylé en position 1 en utilisant la même stratégie de synthèse décrite dans le schéma 76. Le traitement de l'ortho-fluorobenzène avec le 2-butyl-*1H*-imidazole en présence d'excès de carbonate de potassium donne le composé **5.52** avec un rendement de 80 %. Après réduction du groupement nitro, le composé **5.54** est obtenu par cyclisation intramoléculaire conduisant à la structure tricyclique imidazoquinoxalinique avec un rendement de 48 %. Une étape de chloration est nécessaire pour obtenir, par substitution nucléophile, l'imidazo[1,5-*a*]quinoxaline aminé **5.56** avec un rendement de 55 % (schéma 103).

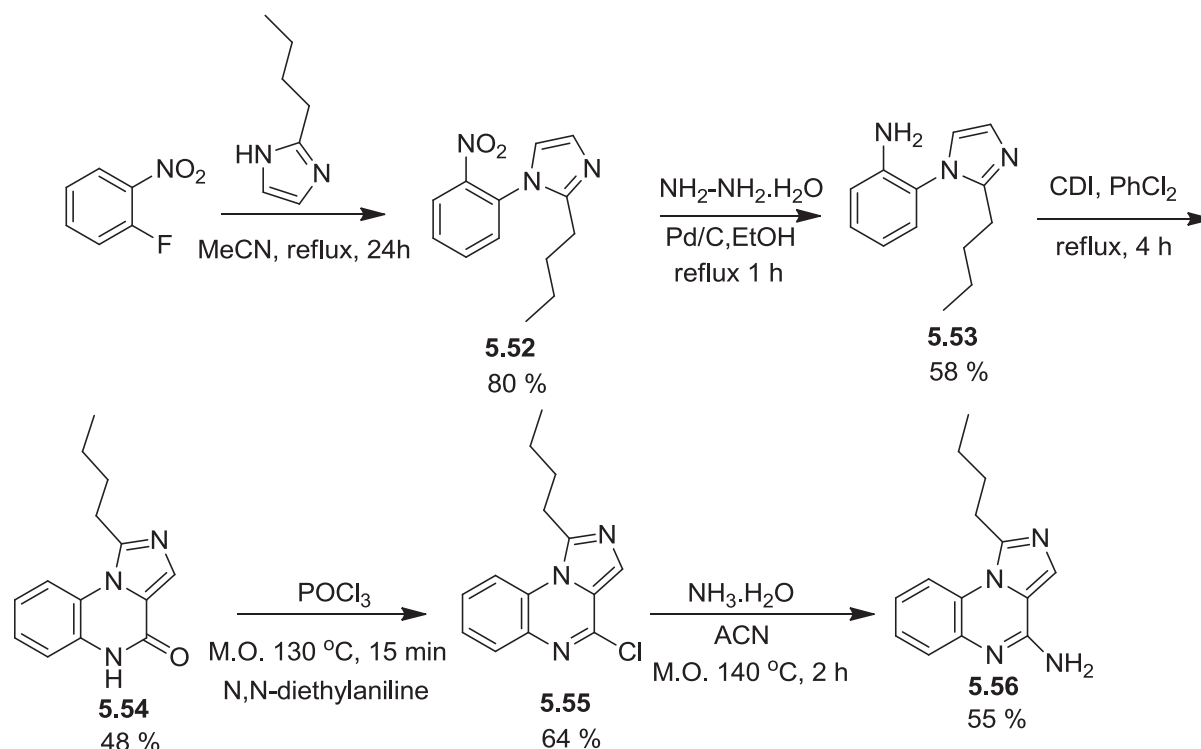


Schéma 103 : Synthèse du 1-butylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine

En conclusion, nous avons synthétisé vingt-cinq produits appartenant à trois séries chimiques : imidazo[1,2-*a*]pyrazines, imidazo[1,5-*a*]quinoxalines et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines avec de différents substituants sur le cycle à cinq sommets. Ces composés nouvellement synthétisés présentent

une grande similarité structurale avec les agonistes des TLR7 et 8, pour cela nous avons attendu à obtenir une activité agoniste TLR7 et/ou TLR8.

5. Détermination de l'effet immunomodulateur de la deuxième librairie de molécules

Nous avons utilisé le même modèle expérimental décrit précédemment afin d'évaluer l'activité agoniste et antagoniste TLR7 et 8. Aucun des composés cibles n'a présenté une activité agoniste TLR7 et TLR8, dans l'intervalle des concentrations testées (10^{-4} à 10^{-8} M).

D'une façon surprenante, tous les composés cibles ont montré une activité antagoniste TLR7 sans aucune activité sur le TLR8 dans la gamme des concentrations testées. Les composés de type imidazo[1,2-*a*]pyrazine ont montré une faible activité antagoniste TLR7. Une augmentation modeste de l'activité est observée pour les imidazo[1,5-*a*]quinoxalines substitués par un butyle, pentyle et isopentyle. Par contre, la série des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines a montré des activités antagonistes TLR7 importantes. Les composés **5.35a** et **5.35b**, portant respectivement une chaîne butyle et isobutyle, se sont avérés les plus actifs avec des IC_{50} de 8.23 et 10 μ M respectivement (figure 57).

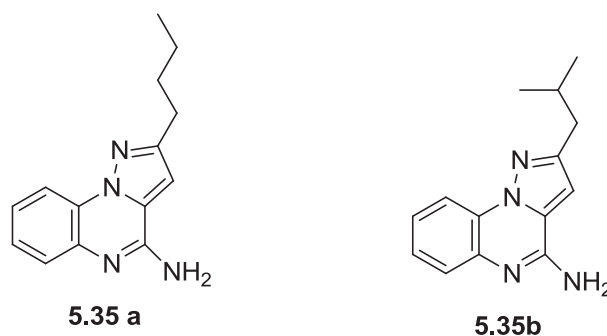


Figure 57 : Structure chimiques de deux antagonistes TLR7.

Ces résultats sont exposés et discutés dans l'article ci-dessous. Ce dernier devrait être soumis prochainement pour publication.

Synthesis and biological evaluation of novel Toll-like receptor 7 selective antagonists: Imidazo[1,2-*a*]pyrazines, Imidazo[1,5-*a*]quinoxalines and Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines

Nour Bou Karroum^{1,2}, Georges Moarbess², Carine Deleuze-Masquefa¹, Jean-François Guichou³, Hasnaa Bouharoun-Tayoun⁴, Soulaïma Chamat⁴, Pierre Cuq¹, Mona Diab-Assaf², Issam Kassab², Pierre-antoine Bonnet¹.

1. Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 F16, CNRS, Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France.

2. Tumorigenèse et Pharmacologie Antitumorale, Lebanese University, EDST, BP 90656, Fanar Jdeideh, Lebanon

3. CNRS, UMR5048, INSERM, U105, Université de Montpellier, Centre de Biochimie Structurale, F-34090 Montpellier, France.

4. Laboratory of Immunology, Lebanese University, Fanar, Lebanon.

Abstract

The toll-like receptor 7 and 8 (TLRs) play an important role in the immune system activation, and their agonists may therefore serve as promising candidate vaccine adjuvants and stimulants for use in immunotherapies. However, the chronic immune activation by excessive TLR activation is a hallmark of several infectious and clinically important autoimmune diseases. Recently, chronic inflammation has been suggested as an important epigenetic factor for tumorigenesis and tumor progression and related to TLR7 stimulation. In this study, we have synthesized and characterized a wide variety of compounds belonging to three heterocyclic chemical series : Imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. These compounds have been tested for their TLR7/8 agonistic and antagonistic activity using HEK-BlueTM-hTLR7/8 cells. The synthesized compounds are completely inactive as TLR7/8 agonists and are selective TLR7 antagonists. A distinct structure-activity relationship was observed with varying substituents on the imidazol and the pyrazol rings. Two compounds of the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series, compound **23a** and **23b**, bearing butyl and isobutyl chain respectively, are potent and selective TLR7 antagonists with low micromolar concentrations IC₅₀. Our findings suggest that the compounds may therefore play an important role in the therapy of several infectious, autoimmune diseases and cancer.

Keywords

Toll-like receptor 7 (TLR7), imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline, pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline, TLR7 antagonist, autoimmune diseases, cancer.

1. Introduction

Innate immunity, also called natural or naive, is the first line of defense, non-specific, against pathogens, recognizing highly conserved pathogenic-associated molecular patterns (PAMPs) found on invading organisms. These PAMPs are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), expressed on the innate immunity cells, which play a role in the detection of the intra- and extracellular environment for pathogens [1] [2]. Several classes of PRRs can be distinguished in mammals including Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), Nod-like receptors (NLRs), AIM2-like receptors (ALRs), C-type lectin receptors (CLRs), and intracellular DNA sensors such as cGAS [3] [4]. Toll-like receptors (TLRs) are a particularly important group of PRRs that exist in humans and mammals and are homologous to the *Drosophila* Toll gene product [5] [6]. Each TLR is composed of an extracellular domain with leucine-rich repeats (LRRs) that are responsible for the recognition of pathogen elements (PAMPs), a transmembrane domain, and a cytoplasmic Toll/IL-1 receptor (TIR) domain that initiates downstream signaling [7] [8]. Upon PAMP recognition, TLRs recruit adaptor proteins such as MyD88 and TRIF which trigger the proinflammatory signaling cascades that result in activation of nuclear factor (NF)- κ B and upregulation of inflammatory cytokines, chemokines and type I IFNs [8]. Ten different TLRs (TLR1 through 10) have been identified in humans and expressed in innate immune cells such as dendritic cells (DCs) and macrophages as well as non-immune cells such as fibroblast cells and epithelial cells [9] [10]. TLRs are divided into two groups based on their localization, cell surface TLRs and intracellular TLRs. Cell surface TLRs include TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, and TLR10 [11] [12], whereas intracellular TLRs are localized in the endosome and include TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 [13]. Cell surface TLRs recognize microbial membrane components such as lipids, lipoproteins, and proteins [14] [15] [3] [16]. Intracellular TLRs recognize viral and endogenous double-stranded RNA (dsRNA; TLR3) [17] [18], single-stranded RNA (ssRNA; TLR7/8) [19] [20], or unmethylated CpG sequences in DNA (TLR9) [21].

Among the endosomal TLRs, TLR7 and TLR8 have a high degree of homology and similarity in both sequence and function [22] [23] [24] [25]. Both receptors recognize viral ssRNA, as well as synthetic tricyclic imidazoquinoline derivatives such as imiquimod (TLR7 agonist) and resiquimod (TLR7/8 agonist) [24]. Many reports in the literature have been focused on the development of new TLR7/8 agonists belonging to different chemical series [26] [27] [28] [29] [30] [31]. These agonists strongly induce the production of T helper 1-polarizing cytokines and may therefore serve as promising candidate vaccine adjuvants, especially for the very young and the elderly [32]. Despite the essential roles of TLR7 and TLR8 in the immune system stimulation, the chronic immune activation may be responsible for several infectious and autoimmune diseases. TLR7 and TLR8 can detect also endogenous ssRNA derived from apoptotic cells, which will induce the production of autoantibodies responsible for the development of autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) [33] [34] [35]. In addition, the engagement of toll-like receptor-7 (TLR7) by single-stranded viral RNA (ssRNA) has been reported to play a central role in immune activation-driven HIV

replication [36]. Several studies have shown that TLR7 has protumorigenic effects, and it is highly expressed in pancreas, liver and lung cancer, the stimulation of this receptor was shown to induce tumor progression and carcinogenesis and then reduce the expression of several antitumor molecules implicated in the apoptosis. In addition, high TLR 7 expression in primary tumor confers resistance to chemotherapy in cancer patients [37] [38]. Consequently, the development of TLR7 inhibitors may play an important role in the therapy of these diseases. The only known class of TLR7 antagonists is synthetic oligonucleotides [39] [40], however, very little progress have been made toward the development of drug-like small inhibitors targeting TLR7 and only few small-molecule inhibitors of TLR7 have been reported in the literature [41] [42].

In the present study, we have synthesized a wide variety of compounds belonging to three chemical series : Imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline that share structural similarity with known TLR7/8 agonists and antagonists. These compounds have been tested for their TLR7/8 agonistic and antagonistic activity using HEK-Blue™-hTLR7/8 cells. The synthesized compounds are completely inactive as TLR7/8 agonists and are TLR7 antagonists. Two compounds of the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series, compound **23a** and **23b** are potent and selective TLR7 antagonists with an IC₅₀ value of 8.23 and 10 μM respectively.

2. Results

Our goal was to design and synthesize TLR7 and TLR8 ligands that share structural similarity with known ligands. In the literature, several TLR7/8 ligands have a NH₂ group and an alkyl chain, preferably a butyl or pentyl chain, which are essential for agonistic or antagonistic activity [29] [32] [41] [42]. So, we have synthesized a variety of compounds belonging to three chemical series: Imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline, with NH₂ group in position 8 for the Imidazo[1,2-*a*]pyrazine (**I**) and in position 4 for the imidazo[1,5-*a*]quinoxaline (**II**) and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline (**III**), and alkyl chain R₁ on the imidazole or pyrazole ring.

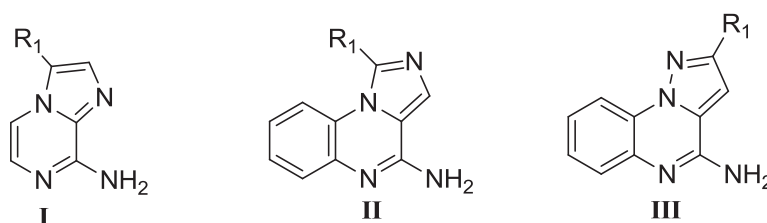
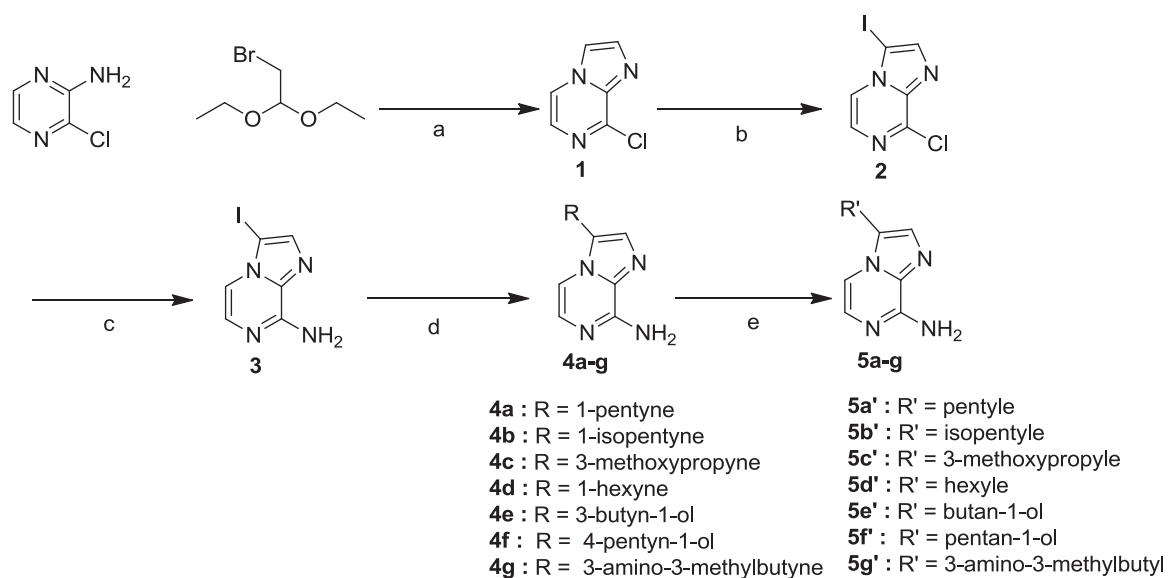


Figure 1: Design and chemical structure of the synthesized compounds.

2.1 Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives

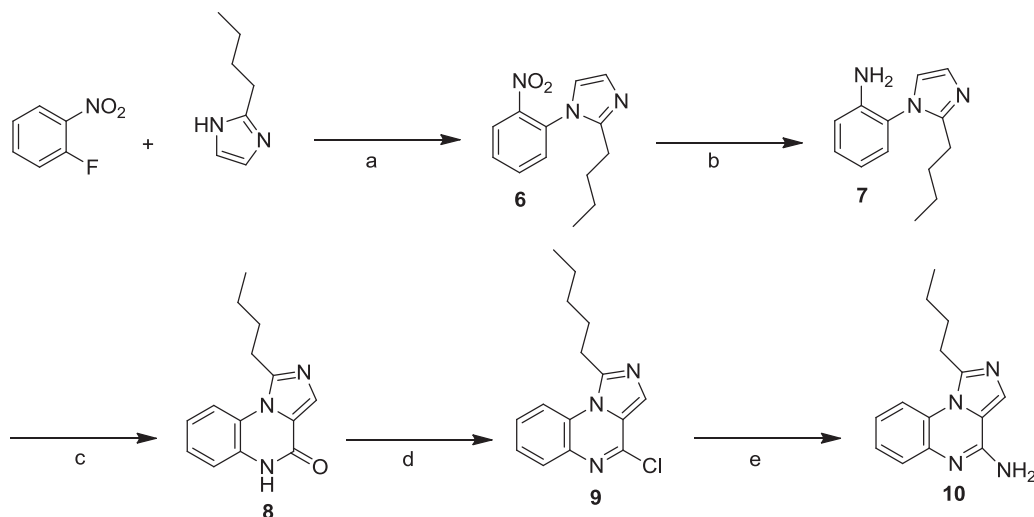
Several synthetic pathways have been described in the literature in order to obtain imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives [43] [44] [45] [46]. We used the synthetic route described in scheme 1. The imidazo[1,2-*a*]pyrazine scaffold was built up from 2-amino-3-chloropyrazine and in situ generated bromoacetaldehyde affording the formation of 8-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrazine **1**, according to reference 46. Compound **1** was iodinated with *N*-iodosuccinimide (NIS) to give 8-chloro-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyrazine **2**. After amination of compound **2** under microwave assistance, we used the Sonogashira cross-coupling reaction in order to introduce a variety of alkyl chains in position 3 of the imidazole ring in the presence of copper and palladium catalyst. The reduction of the alkyne function gives the final compounds **5a'-g'**.



Scheme 1. Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazine: (a) Bromoacetaldehyde diethyl acetal, 48% aq. HBr solution, reflux, 1.5 h, NaHCO₃/IPA, then 2-amino-3-chloropyrazine, reflux, 3 h, 74%; (b) NIS, DMF, rt, 12 h, 65%; (c) 30% aq. NH₄OH solution, ACN, MW (140 °C, 2h), 62%; (d) Alkynes, CH₃CN/Et₃N (2/1), Pd(PPh₃)₄, CuI, 70 °C, 12h, 25-75%; (e) H₂, Pd/C, EtOH, 50 psi, 24h, 25-60%.

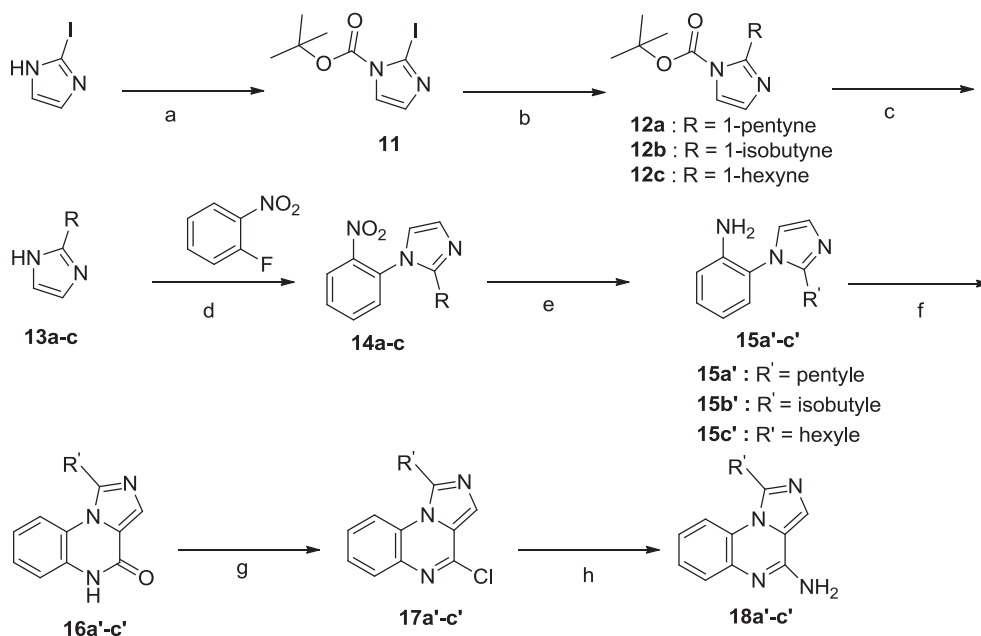
2.2 Synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives

The imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives were prepared using two synthetic pathways. The first one is previously described [47] [48] and it is depicted in scheme 2. The treatment of ortho fluoronitrobenzene with 2-butylimidazole with an excess of potassium carbonate gave compound **6** in 80% yield. Reduction of the nitro group resulted in the formation of compound **7** with 58% yield. The formation of the tricyclic compound **8** was obtained after addition of carbonyldiimidazole by intramolecular cyclization of **7**. The chlorination of **8** by phosphorus oxychloride and substitution by ammoniac afforded compound **10** with 55% yield.



Scheme 2. Synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives: (a) MeCN, reflux, 24 h, 80%; (b) NH₂-NH₂, H₂O, Pd/C, EtOH, reflux, 1 h, 58%; (c) CDI, PhCl₂, reflux, 24 h, 48%; (d) POCl₃, DEA, MW (130 °C, 15 min); (e) 30% aq. NH₄OH solution, ACN, MW (140 °C, 2h), 55%.

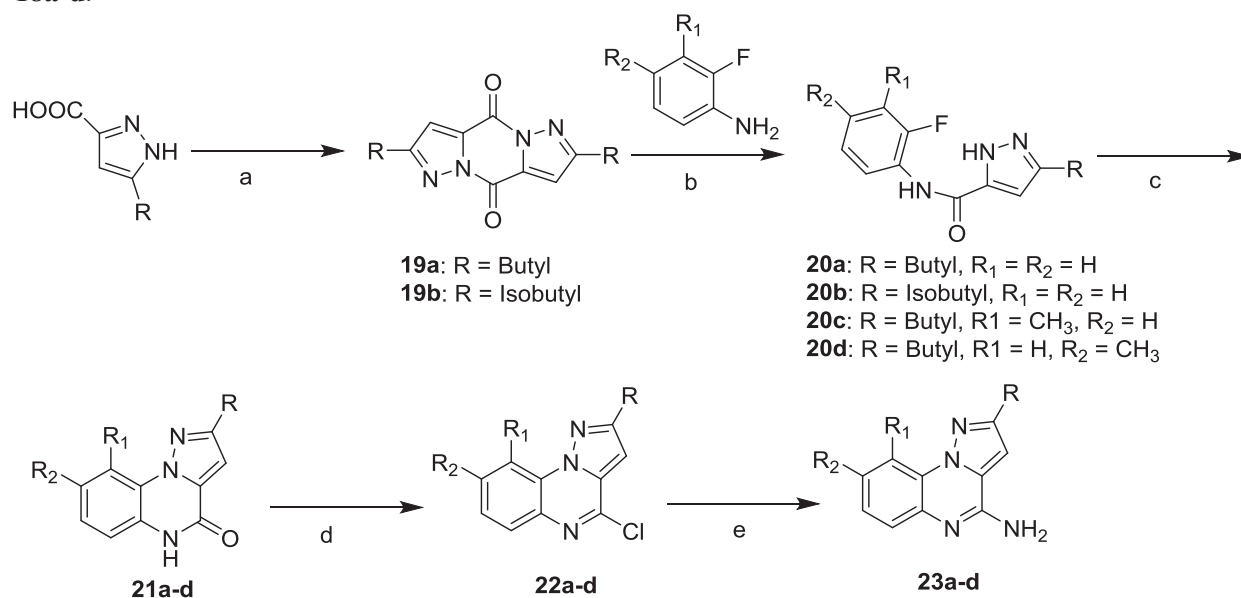
In order to increase the structural diversity of the imidazo[1,5-*a*]quinoxaline series, we have used a new synthetic pathway described in scheme 3, which allowed us to introduce a variety of alkyl chains in position 1 of the imidazole ring. The synthesis begins with the protection of the NH group of the 2-iodo-1*H*-imidazole followed by the Sonogashira cross coupling, which allowed us to obtain the alkylated imidazoles **12a-c**. After a deprotection step, imidazoles **13a-c** were coupled with orthofluorobenzene with an excess of potassium carbonate. After reduction of the nitro group and the alkyne function, compounds **16a'-c'** were obtained after addition of carbonyldiimidazole by intramolecular cyclization of **15a'-c'**. The chlorination of **16a'-c'** by phosphorus oxychloride and substitution by ammoniac afforded compounds **18a'-c'**.



Scheme 3. Synthesis of imidazo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives: (a) BOC₂O, DMF/CH₃CN, Et₃N, rt, 24h, 80%; (b) Alkynes, DMF, Pd(PPh₃)₄, CuI, 70 °C, 12h, 33-67%; (c) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 1h; (d) MeCN, reflux, 24 h, 28-33%; (e) H₂, Pd/C, EtOH, 50 psi, 24h, 81-87%; (f) CDI, PhCl₂, reflux, 24 h, 62-84%; (g) POCl₃, DEA, MW (130 °C, 15 min); (h) 30% aq. NH₄OH solution, ACN, MW (140 °C, 2h), 38-98%.

2.3 Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives

Pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives were prepared according to the procedure presented in scheme 4. Dimers **14a**, **14b** resulted from the bimolecular condensation of the commercially available 5-butyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid and 5-isobutyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid respectively, in presence of thionyl chloride. Product **14a** was coupled with either *ortho*-fluoroaniline or 2-fluoro-3-methylaniline or 2-fluoro-4-methylaniline to give the intermediates **15a**, **15c** and **15d**, respectively, whereas product **14b** was coupled with *ortho*-fluoroaniline to give the intermediate **15b**. The tricyclic compounds **16a-d** were obtained via an intramolecular cyclization of **15a-d**, under strong basic conditions. Treatment of compounds **16a-d** with phosphorus oxychloride and *N,N*-diethylaniline gave compounds **17a-d**. Displacement of the chlorine of **17a-d** with ammoniac gives the final compounds **18a-d**.



Scheme 4. Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives: (a) SOCl₂, reflux, 18 h, 25%, 43%; (b) NaHMDS, THF, 5 h, 60-82%; (c) NaH, DMA, reflux, 48 h; (d) POCl₃, DEA, MW (130 °C, 15 min); (e) 30% aq. NH₄OH solution, ACN, MW (140 °C, 2h), 25-100%.

2.4 Biological activity

All the derivatives were counter-screened for TLR7 or TLR8 agonistic and antagonist activity in vitro using HEK293 cells stably co-transfected with either the human TLR7 or TLR8 gene along with NF-κB inducible SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) reporter gene. The stable expression/inhibition of SEAP under control of NF-κB promoters is induced by TLR agonists/antagonists, and extracellular SEAP in the supernatant is spectrophotometrically measured and proportional to NF-κB induction [49]. Resiquimod (TLR7/8 agonist) and CL264 (TLR7 agonist) are used as positive controls. None of the target compounds displayed any TLR7 and TLR8 agonistic

activity, in the range of tested concentrations (10^{-4} to 10^{-8} M). All the compounds have demonstrated negligible cytotoxicity at the concentration tested by using MTT assay (Data not shown).

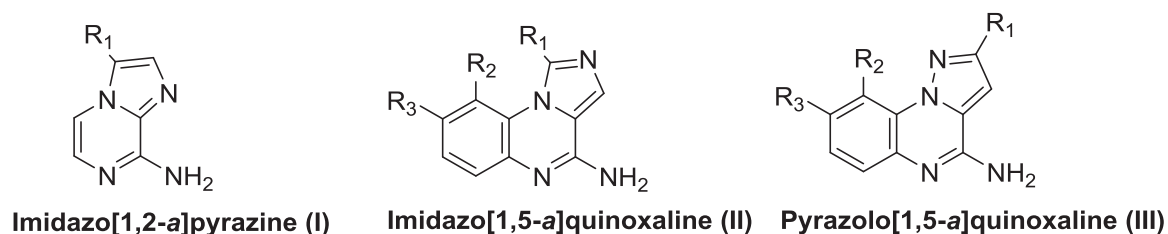
Antagonistic activities were examined by incubating HEK-Blue-hTLR7 or HEK-Blue-hTLR8 cells with graded concentrations of test compounds in the presence of 1 $\mu\text{g/mL}$ of CL264 or resiquimod respectively. All the target compounds showed a TLR7 antagonistic activity, but failed to show TLR8 antagonistic activity in the range of tested concentrations. Concentrations of the compounds which produced 50% TLR7 inhibition (IC_{50} values) are summarized in Table 1 for the imidazo[1,2-*a*]pyrazine (**I**), imidazo[1,5-*a*]quinoxaline (**II**) and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline (**III**).

A SAR analysis for the IC_{50} values showed general trends in TLR7 selective activity. The Compounds **4a-c** and **5a'-c'** belonging to the imidazo[1,2-*a*]pyrazine series, showed a weak TLR7 antagonistic activity. Then, the introduction of an alkyl chains with a heteroatom in position 3 of the imidazole ring (compounds **4d-g** and **5d'-g'**) showed weak TLR7 antagonists.

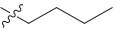

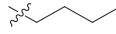
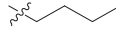
A modest increase in activity is noted for imidazo[1,5-*a*]quinoxaline series when the alkyl chain length reaches butyl, pentyl and isopentyl. Compounds **10**, **18a'** and **18b'**, displayed modest TLR7 antagonistic activity, with an IC_{50} value of 17.33, 22 and 17.67 μM respectively. However, a decrease in the antagonistic activity was apparent when the alkyl chain is lengthened beyond 5 carbons atoms to hexyl, compound **18c'**. The greatest TLR7 antagonistic potencies are showed to the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series. Compounds **23a** and **23b**, bearing butyl and isobutyl chain respectively, exhibited low micromolar TLR7-inhibitory activity with an IC_{50} value of 8.23 and 10 μM respectively (Figure 1). The introduction of methyl group in position 8 or 9 did not affect the activity.

Although these three chemical series sharing structural similarity, significant differences in the antagonistic activity have been detected. In fact, the position of the nitrogen atom on the five-membered ring as well as the position of the alkyl chain, lead to differences in activity. According to our results, the vicinal position of the two nitrogen atoms in the five-membered ring, like pyrazole ring, is the best position leading to an important antagonistic activity.

Table 1. TLR7-antagonistic activities of Imidazo[1,2-*a*]pyrazine (**I**), imidazo[1,5-*a*]quinoxaline (**II**) and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline (**III**)^a.



Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	Formula	IC ₅₀ ^a (μM)
Imidazo[1,5-<i>a</i>]pyrazines (I)					
4a		-	-	C ₁₁ H ₁₂ N ₄	23.67 ± 5.85
4b		-	-	C ₁₁ H ₁₂ N ₄	39 ± 2.82
4c		-	-	C ₁₂ H ₁₄ N ₄	23.5 ± 0.7
4d		-	-	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	42.5 ± 21.9
4e		-	-	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	49.5 ± 3.53
4f		-	-	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O	42.5 ± 6.36
4g		-	-	C ₁₁ H ₁₃ N ₅	57 ± 4.24
5a'		-	-	C ₁₁ H ₁₆ N ₄	40 ± 7
5b'		-	-	C ₁₁ H ₁₆ N ₄	26 ± 9.54
5c'		-	-	C ₁₂ H ₁₈ N ₄	32.5 ± 3.53
5d'		-	-	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O	84 ± 15.55
5e'		-	-	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O	50 ± 21.21
5f'		-	-	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O	48.5 ± 13.43
5g'		-	-	C ₁₁ H ₁₇ N ₅	46 ± 7.07
Imidazo[1,5-<i>a</i>]quinoxaline (II)					
10		H	H	C ₁₄ H ₁₆ N ₄	17.33 ± 5.03
18a'		H	H	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	22 ± 11
18b'		H	H	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	17.67 ± 6.02
18c'		H	H	C ₁₆ H ₂₀ N ₄	45 ± 18.38
Pyrazolo[1,5-<i>a</i>]quinoxaline (III)					

23a		H	H	C ₁₄ H ₁₆ N ₄	8.23 ± 1.62
23b		H	H	C ₁₄ H ₁₆ N ₄	10 ± 1.73
23c		CH ₃	H	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	30.67 ± 17.55
23d		H	CH ₃	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	16.33 ± 6.80

^a IC₅₀, concentration of the compound (μM) producing 50% TLR7 inhibition after 24 h of compound exposure. Each experiment was run at least three times, and the results are presented as average values ± standard deviation

3. Discussion

In the recent years, much of the research works have been focused on the development of new TLR7 and TLR8 agonists belonging to different chemical series, such as imidazo[4,5-*c*]pyridines (TLR7 agonist) [26], thiazolo[4,5-*c*]quinolines (TLR7/8 agonist) [27], benziimidazol-2-amines (TLR8 agonist) [32], pyrimidine-2,4-diamines (TLR7/8 agonist) [31] in order to identifying effective vaccine adjuvants with minimal reactogenicity. Despite the importance of TLR7 and TLR8 in the immune system activation, and especially in the development of Type 1 helper T cells and CD8 + cytotoxic T lymphocytes, the chronic immune activation is a hallmark of several infectious and autoimmune diseases; hence, the development of TLR7/8 inhibitors may play an important role in the therapy of these diseases. The known class of TLR7/8 antagonists was synthetic oligonucleotides [39] [40], many reports have been developed oligonucleotide-based antagonists of TLR7, 8 and 9. The antagonist compounds inhibited signaling pathways and production of a broad range of cytokines, including tumour necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin (IL)-12, IL-6, interferon (IFNα), and IL-1β mediated by TLR7, 8 and 9. In addition, several antagonist compounds effectively inhibit inflammatory pathways involved in the development of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and constitute a potential therapeutic approach for the treatment of SLE and other autoimmune diseases [39]. However, only few small-molecule inhibitors of TLR7 and TLR8 have been reported in the literature. In 2009, Shukla et *al.* synthesized the Guardiquimod (TLR7 agonist) and its 3*H* regioisomer which was found to be completely inactive as a TLR7 agonist and was, in fact, weakly antagonistic. A des-amino precursor of the 3*H* regioisomer was more potent as a TLR7 antagonist, with an IC₅₀ value of 7.5 μM. This compound is the first small molecule with TLR7-antagonistic activity [41]. In 2011, the same team developed a variety of 3*H* imidazoquinolines with TLR7/8-antagonistic activity [42]. More recently, Zhang et *al.* have developed selective TLR8 antagonists belonging to the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine and quinolines series. In their study, they showed the existence of a new antagonist binding site different than that described for the agonist. Upon binding to this new site, the small-molecule ligands stabilize the preformed TLR8 dimer in its resting state, preventing activation [50]. In addition, the superimposition of the antagonistic binding sites of TLR7

and TLR8 reveals structural distinctions [50], which may explain the inhibitory activity of our target compounds specifically against TLR7, but not against TLR8. In our study, the most active compounds belong to the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series. This series is not very well described and little biological activity has been reported in the literature. In 1993, Colotta *et al.* have synthesized pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives, one of the tested compounds showed some benzodiazepine receptor activity [51]. Then in 2008, the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline derivatives were synthesized by our laboratory, and tested for their anti-tumoral activity; they showed direct anti-tumoral activity similar to that of imiquimod [47]. Last year, we synthesized and tested pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline compounds for their IKK inhibitory activity, none of these compounds exhibit any inhibitory activity on IKK1 and IKK2 [48]. In the present work, we have discovered an important activity for the pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline series as selective TLR7 antagonists, and may therefore play an important role in the therapy of several infectious and autoimmune diseases.

4. Conclusion

In summary, we have synthesized a variety of alkylated compounds belonging to three chemical series : Imidazo[1,2-*a*]pyrazines, imidazo[1,5-*a*]quinoxalines and pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines. All these compounds have shown a weak TLR7-antagonistic activity. The pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline compounds **23a** and **23b**, bearing butyl and isobutyl chain, exhibited an important TLR7-antagonistic activity, with an IC₅₀ value of 8.23 and 10 μM respectively. These preliminary results may therefore be useful as a lead for the synthesis of more potent small-molecule receptor antagonists of TLR7 belonging to the chemicals series described in this paper.

5. Experimental part

5.1 Chemistry

All purchased chemicals were used without further purification. Chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co., Alfa Aesar Co, VWR and FluoroChem UK. Silica gel chromatography was conducted with 230-400 mesh 60 Å silica gel (Sigma Aldrich Chemical Co.). Thin layer chromatography plates (Kieselgel 60 F254) were purchased from Merck. The progress of reaction was monitored by TLC exposure to UV light (254 nm and 366 nm). Microwave assisted organic syntheses were performed on the Biotage Initiator 2.0 Microwave. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained on Brüker AC-300, AC-400 and AC-600 spectrometers. Chemical shifts are given as parts per million (ppm) using residual dimethylsulfoxide signal for protons ($\delta_{\text{DMSO}} = 2.46$ ppm) and carbons ($\delta_{\text{DMSO}} = 40.00$ ppm). Abbreviations used for signal patterns are the following: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet. Mass spectral data were obtained on a Micromass Q-ToF (Waters) spectrometer equipped with ESI source (Laboratoires de Mesures Physiques, Plateau technique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier, Montpellier, France). Mass spectra were recorded in positive mode between 50 and 1500 Da, capillary and cone tension were 3000 and 20 V, respectively. The High Resolution Mass Spectrometry (HR MS) analyses are carried out by direct introduction on a Synapt G2-S mass spectrometer (Waters, SN: UEB205) equipped with ESI source. The mass spectra were recorded in positive mode, between 100 and 1500 Da. The capillary tension is

1000 V and the cone tension is 30 V. The source and desolvation temperatures are 120 ° C and 250 ° C, respectively.

8-chloroimidazo[1,2-*a*]pyrazine (1)

A mixture of bromoacetaldehyde diethyl acetal (20 ml, 131.24 mmol) and 48% aqueous hydrogen bromide solution (5 ml) was stirred at reflux temperature for 1.5 h. After cooling back to room temperature it was poured onto a suspension of sodium hydrogen carbonate (10.0 g, 116.0 mmol) and 2-propanol (155 ml) and stirred until the gas evolution ceased. The formed precipitate was filtered, then 2-amino-3-chloropyrazine (8) (5.0 g, 38.6 mmol) was added to the filtrate and stirred at reflux temperature for 3 h. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature, the resulting solid was collected by filtration and washed with 2-propanol. The solid was partitioned between chloroform and 10% aqueous sodium hydrogen carbonate solution. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with chloroform (2x). The combined organic layers were dried over sodium sulphate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated with diethylether and filtered to give 6.48 g of compound **1** (74%).

C₆H₄ClN₃. Mw: 153.57 g/mol. Mp 170.2-171.3 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 7.72 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.86 (d, 1H), 8.27 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 8.65 (d, 1H, *J* = 3 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 117.72, 121.21, 127.71, 128.41, 135.74, 135.84.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 154.2 [M+H]⁺.

8-chloro-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyrazine (2)

To a solution of compound **1** (2.0 g, 13 mmol) in anhydrous DMF (65 ml) was added NIS (3.22 g, 14.30 mmol), and the reaction mixture was heated at 45 °C for 12 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with ethylacetate (3 x 300 ml). The combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was triturated with diethylether and filtered to give 2.22 g of compound **2** (65%).

C₆H₃ClIN₃. Mw: 279.47 g/mol. Mp 263.5-264.3 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 7.83 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 8.01 (s, 1H), 8.44 (d, 1H, *J* = 6 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 120.80, 128.86, 129.59, 139.99, 141.94, 142.16.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 279.9 [M+H]⁺.

3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (3)

Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (12 ml, 90 mmol) was added to a solution of **2** (0.5 g, 1.8 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and filtered to give 0.75 g of compound **3** as a beige solid (62% yield).

C₆H₅IN₄. Mw: 260.04 g/mol. Mp 226.3-227.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 7.00 (s, 2H, NH₂), 7.32 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.51 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.64 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 68.49, 110.17, 130.02, 135.42, 138.48, 150.72.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 261.0 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₆H₆IN₄ 260.9637, found 260.9636.

3-(pent-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (4a)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 1-pentyne (0.4 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 120 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethylacetate 50/50 to 30/70 to give 0.18 g of the compound **4a** as a white solid (45% yield).

C₁₁H₁₂N₄. Mw: 200.24 g/mol. Mp 160.6-161.8 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 1.03 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.60-1.67 (m, 2H), 2.55 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.05 (s, 2H, NH₂), 7.37 (br s, 1H), 7.62 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.72 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 13.85, 21.38, 21.92, 67.94, 100.87, 108.93, 110.89, 130.08, 132.30, 135.49, 150.78.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 201.2 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₃N₄ 201.1140, found 201.1142

3-(3-methylbut-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (4b)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 3-methyl-1-butyne (0.4 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 120 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethylacetate 50/50 to 30/70 to give 0.2 g of the compound **4b** as a beige solid (50% yield).

C₁₁H₁₂N₄. Mw: 200.24 g/mol. Mp 174.8-175.4 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 1.30 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 2.94-2.98 (m, 1H), 6.67 (s, 2H, NH₂), 7.38 (br s, 1H), 7.60 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.65 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 21.28, 23.05, 31.17, 67.06, 106.05, 108.94, 110.73, 130.02, 135.41, 150.79, 206.98.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 200.9 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₃N₄ 201.1140, found 201.1140

3-(3-methoxyprop-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (4c)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then methyl propargyl ether (0.33 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethylacetate 50/50 to 10/90 to give 0.15 g of the compound **4c** as a beige solid (0.15 g, 37%).

C₁₀H₁₀N₄O. Mw: 202.21 g/mol. Mp 173.9-174.8 °C

¹H-NMR δ (ppm, 600 MHz, CDCl₃) 3.50 (s, 3H, CH₃), 4.46 (s, 2H, CH₂), 5.82 (s, 2H, NH₂), 7.35 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.57 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.65 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 150 MHz, CDCl₃) 30.94, 57.92, 60.43, 95.39, 110.36, 129.17, 132.48, 137.02, 149.58, 270.00.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 202.9 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₀H₁₁N₄O 203.0933, found 203.0933

3-(hex-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (4d)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 1-hexyne (0.46 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethylacetate 60/40 to 40/60 to obtain the compound **4d** as a yellow solid (0.21 g, 53%).

C₁₂H₁₄N₄. Mw: 214.27 g/mol. Mp 143.7-144.4 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 0.90 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.41-1.50 (m, 2H), 1.55-1.62 (m, 2H), 2.55 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.04 (s, 2H, NH₂), 7.65 (br s, 2H), 7.70 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 13.92, 19.13, 21.93, 30.48, 67.80, 100.98, 110.93, 135.55.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 215.0 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₂H₁₅N₄ 215.1297, found 215.1293

4-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)but-3-yn-1-ol (4e)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 3-butyn-1-ol (0.30 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography eluted with ethylacetate/methanol 100/0 to 95/5 to give the compound **4e** as a yellow solid (0.3 g, 75%).

C₁₀H₁₀N₄O. Mw: 202.21 g/mol. Mp 171.9-172.8 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 2.69 (t, 2H, *J* = 4 Hz), 3.63 (t, 2H, *J* = 4 Hz), 7.03 (s, 2H, NH₂), 7.36 (br s, 1H), 7.66 (br s, 1H), 7.70 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 24.11, 59.96, 68.35, 99.16, 110.92, 129.92, 135.47, 150.76.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 202.9 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₀H₁₁N₄O 203.0933, found 203.0935

5-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)pent-4-yn-1-ol (4f)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 4-pentyn-1-ol (0.40 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was triturated with dichloromethane to give 0.18 g of the compound **4f** as a beige solid (43% yield).

C₁₁H₁₂N₄O. Mw: 216.24 g/mol. Mp 155.8-156.9 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 1.59-1.65 (m, 2H), 2.48 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 3.43 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 4.47 (s, 1H, OH), 6.97 (s, 2H, NH₂), 7.00-7.90 (m, 3H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 16.21, 31.75, 59.87, 67.68, 100.96, 110.98, 129.42, 132.10, 135.58, 150.58.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 217.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₃N₄O 217.1089, found 217.1090

3-(3-amino-3-methylbut-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (4g)

To a solution of compound **3** (0.5 mg, 2 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (24 mL) and Et₃N (12 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.2 mmol) and CuI (76 mg, 0.4 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 2-methylbut-3-yn-2-amine (0.42 mL, 4 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by reverse phase chromatography eluted with acetonitrile/water 100/0 to 50/50 to give 0.10 g of the compound **4g** as a beige solid (25% yield).

C₁₁H₁₃N₅. Mw: 215,25 g/mol. Mp 168.3-169.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 1.44 (s, 6H), 7.03 (s, 2H, NH₂), 7.37 (s, 1H), 7.67-7.69 (m, 2H).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 31.92, 46.27, 66.67, 109.01, 110.63, 130.04, 132.37, 135.18, 150.74.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 216.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₄N₅ 216.1249, found 216.1250

3-pentylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**5a**)

To a solution of compound **4a** (0.15 g, 0.75 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (35 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.09 g of compound **5a** as a beige solid (60 % yield).

C₁₁H₁₆N₄. Mw: 204.27 g/mol. Mp 170.3-171.4 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 0.85 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.30-1.35 (m, 4H), 1.62-1.67 (m, 2H), 2.77 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 6.77 (s, 2H, NH₂), 7.19 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.30 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, *J* = 4 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 14.33, 22.28, 23.28, 27.21, 31.33, 108.54, 127.53, 128.41, 129.69, 132.62, 150.86.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 205.2 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₇N₄ 205.1453, found 205.1456

3-isopentylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**5b**)

To a solution of compound **4b** (0.17 g, 0.85 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (40 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.05 g of compound **5b** as a beige solid (29 % yield).

C₁₁H₁₆N₄. Mw: 204,27 g/mol. Mp 198.2-199.3 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 0.92 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 1.53-1.60 (m, 3H), 2.77 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 6.77 (s, 2H, NH₂), 7.19 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.29 (s, 1H), 7.56 (d, 1H, *J* = 4 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 21.37, 22.72, 27.67, 36.34, 108.51, 127.62, 128.42, 129.52, 132.62, 150.87.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 205.3 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₇N₄ 205.1453, found 205.1453

3-(3-methoxypropyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (**5c**)

To a solution of compound **4c** (0.132 g, 0.65 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (40 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.05 g of compound **5c** as a beige solid (42% yield).

C₁₀H₁₄N₄O. Mw: 206.24 g/mol. Mp 165.0-166.0 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 1.84 (m, 2H), 2.82 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 3.24 (s, 3H), 3.35 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.04 (s, 2H, NH₂), 7.20 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.34 (s, 1H), 7.60 (d, 1H, *J* = 4 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 20.11, 27.64, 58.37, 71.33, 108.68, 127.16, 127.63, 130.12, 132.45, 150.42.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 207.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₀H₁₅N₄O 207.1246, found 207.1248

3-hexylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (5d)

To a solution of compound **4d** (0.17 g, 0.8 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (40 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.086 g of compound **5d** as a beige solid (54% yield).

C₁₂H₁₈N₄. Mw: 218.30 g/mol. Mp 149.9-148.8 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 0.83 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.22-1.30 (m, 6H), 1.60 (m, 2H), 2.78 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.21 (m, 3H, NH₂, CH), 7.35 (s, 1H), 7.63 (d, 1H, *J* = 4 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 14.39, 22.50, 23.29, 27.50, 28.20, 31.41, 108.87, 126.28, 128.49, 130.26, 132.22, 150.15.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 218.9 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₂H₁₉N₄ 219.1610, found 219.1609

4-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)butan-1-ol (5e)

To a solution of compound **4e** (0.28 g, 1.4 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (60 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.084 g of compound **5e** as a white solid (30% yield).

C₁₀H₁₄N₄O. Mw: 206.24 g/mol. Mp 168.4-169.3 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 1.46-1.53 (m, 2H), 1.65-1.73 (m, 2H), 2.79 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 3.41-3.46 (m, 2H), 4.40 (t, 1H, OH), 6.77 (s, 2H, NH₂), 7.20 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.30 (s, 1H), 7.58 (d, 1H, *J* = 4 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 23.15, 24.15, 32.46, 60.77, 108.55, 127.56, 128.39, 129.69, 132.61, 150.85.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 207.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₀H₁₅N₄O 207.1246, found 207.1247

5-(8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)pentan-1-ol (5f)

To a solution of compound **4f** (0.16 g, 0.74 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (50 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.084 g of compound **5f** as a white solid (53% yield).

C₁₁H₁₆N₄O. Mw: 220.27 g/mol. Mp 179.7-180.2 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 1.38-1.41 (m, 2H), 1.45-1.49 (m, 2H), 1.65-1.98 (m, 2H), 2.79 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 3.35-3.40 (m, 2H), 4.38 (s, 1H, OH), 6.79 (s, 2H, NH₂), 7.20 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.31 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, *J* = 4 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 23.39, 25.71, 27.45, 32.66, 61.06, 108.54, 127.51, 128.41, 129.70, 132.59, 150.86.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 221.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₇N₄O 221.1402, found 221.1400

3-(3-amino-3-methylbutyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amine (5g)

To a solution of compound **4g** (0.08 g, 0.4 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (30 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for

24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.02 g of compound **5g** as a white solid (25% yield).

C₁₁H₁₇N₅. Mw: 219,29 g/mol. Mp 231.4-232.1 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 1.34 (s, 6H), 1.94 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 2.95 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 7.62 (s, 1H), 7.81 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 8.03 (s, 2H, NH₂), 8.92 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 18.03, 25.31, 31.17, 37.57, 53.80, 109.86, 118.93, 130.78, 131.27, 132.17, 147.89.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 220.2 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₁H₁₈N₅ 220.1562, found 220.1563

2-butyl-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (6)

A mixture of 2-nitrofluorobenzene (1 mL, 8.85 mmol), imidazole (1 g, 8.05 mmol) and 2.26 g of K₂CO₃ in 12 mL of acetonitrile was heated to reflux for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 12 mL dichloromethane and washed twice with distilled water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum to give 1.57 g of compound **6** as a yellow oily product (80 %).

C₁₃H₁₅N₃O₂. Mw: 245.28 g/mol.

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.76 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.19 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 2.39 (t, 2H, *J* = 9 Hz), 6.93 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.20 (d, 1H), 7.70 (dd, 1H, *J* = 9 Hz), 7.79 (td, 1H, *J* = 9 Hz), 7.90 (td, 1H, *J* = 4 Hz), 8.18 (dd, 1H, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 13.91, 21.90, 26.08, 29.53, 121.48, 125.68, 128.12, 130.62, 130.86, 131.02, 134.85, 146.32, 148.45.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 246.1 [M+H]⁺.

2-(2-butyl-1H-imidazol-1-yl)aniline (7)

Palladium-carbon 10% was added portion-wise during 10 min to a hot solution of **6** (1.55 g, 6.3 mmol) in dry ethanol (11 mL) containing hydrazine monohydrate (1.55 mL, 31.5 mmol). The mixture was heated under reflux for 1 h. The hot solution was filtered on a celite pad and the filtrate was evaporated under vacuum to give 1.35 g of compound **7** as a brown oily product (58 % yield).

C₁₃H₁₇N₃. Mw: 215.29 g/mol.

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.77 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.19 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 2.38 (t, 2H, *J* = 9 Hz), 4.78 (s, 2H, NH₂), 6.62 (td, 1H, *J* = 6 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 9 Hz), 7.98 (m, 3H), 7.17 (td, 1H, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 13.98, 22.07, 26.13, 29.79, 116.08, 116.54, 120.88, 122.46, 127.88, 128.37, 129.93, 144.73, 148.51.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 216.1 [M+H]⁺.

1-butylimidazo[1,5-a]quinoxalin-4(5H)-one (8)

Compound **7** (0.78 g, 3.6 mmol) and carbonyldiimidazole (0.7 g, 4.32 mmol) were dissolved in 38 mL of 1,2-dichlorobenzene and heated to reflux overnight under nitrogen. After cooling to room temperature, the solid was filtered and washed with diethylether to give 0.414 g of compound **8** as a beige product (48 % yield).

C₁₄H₁₅N₃O. Mw: 241.29 g/mol. Mp 217.7-218.9 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.94 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.45 (m, 2H), 1.82 (m, 2H), 3.24 (t, 2H, *J* = 9 Hz), 7.32 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 8.00 (d, 1H, *J* = 9 Hz)

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 14.16, 22.13, 28.90, 30.65, 117.21, 117.39, 122.30, 123.09, 123.98, 126.91, 129.78, 129.89, 148.25, 154.95.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 242.9 [M+H]⁺.

1-butylimidazo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (10)

Phosphorus oxychloride (4 mL) and N,N-diethylaniline (0.5 mL, 3.4 mmol) were added to **8** (0.414 g, 1.7 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness under vacuum to give **9**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (5 mL, 37 mmol) was added to a solution of **9** (0.24 g, 0.92 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water, filtered, and then purified by flash chromatography eluted with dichloromethane/methanol 97/3 to 95/5. The compound **10** is obtained as a yellow solid (55 % yield).

C₁₄H₁₆N₄. Mw: 240.30 g/mol. Mp 154.3-155.3 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 0.96 (t, 3H, *J* = 8 Hz), 1.47 (m, 2H), 1.85 (m, 2H), 3.30 (t, 2H, *J* = 8 Hz), 7.09 (s, 2H, NH₂), 7.22 (td, 1H, *J* = 8 Hz), 7.33 (td, 1H, *J* = 8 Hz), 7.44 (dd, 1H, *J* = 8 Hz), 7.81 (s, 1H), 8.01 (dd, 1H, *J* = 8 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 14.30, 22.27, 29.16, 30.87, 116.42, 119.54, 122.62, 123.67, 124.74, 126.08, 126.46, 139.21, 146.20, 150.64.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 241.2 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₄H₁₇N₄ 241.1453, found 241.1453.

tert-butyl 2-iodo-1H-imidazole-1-carboxylate (11)

To a 50 ml round bottom flask containing 2-iodo-1H-imidazole (1 g, 5.2 mmol), BOC-anhydride (1.2 g, 5.5 mmol) in DMF (11 ml) and acetonitrile (11 ml) was added Et₃N (0.9 ml, 6.76 mmol) and stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in ethyl acetate EtOAc, washed with saturated aqueous chloride ammonium NH₄Cl (1 x 15 mL), sodium hydrogen carbonate NaHCO₃ (1 x 15 mL), and brine (1 x 15 mL) to give 1.25 g of compound **11** as a yellow solid (84 % yield).

C₈H₁₁IN₂O₂. Mw: 294.09 g/mol. Mp 80.3-81.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 1.58 (s, 9H), 7.00 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 3 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 27.80, 86.58, 89.90, 122.80, 132.81, 146.93.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 195.0 [M+H]⁺.

tert-butyl 2-(pent-1-yn-1-yl)-1H-imidazole-1-carboxylate (12a)

To a 250 ml round bottom flask compound **11** (1.2 g, 4.1 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.474 g, 0.41 mmol) and CuI (0.156 g, 0.82 mmol) were added. The round bottom flask was sealed and flushed with nitrogen with a syringe inserted into the septum of the round bottom flask. DMF (dry, 49 mL) was added and the mixture was stirred until all the solids had dissolved. Et₃N (10 mL) and 1-pentyne (0.8 ml, 8.2 mmol) were added by syringe and the mixture was heated at 70 °C for overnight. The resulting mixture was diluted with Et₂O (300 mL) and washed with water (3 x 100 mL). The ether phase was dried with Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 95/5 to 80/20 to give 0.64 g of compound **12a** as a yellow solid (67 % yield).

C₁₃H₁₈N₂O₂. Mw: 234.29 g/mol. Mp 65.0-66.0 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.99 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.57 (m, 11H), 2.45 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.55 (d, 1H, *J* = 3 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 13.72, 20.98, 21.53, 27.74, 72.18, 86.05, 94.71, 119.72, 129.72, 130.99, 146.75.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 134.7 [M+H]⁺.

tert-butyl 2-(3-methylbut-1-yn-1-yl)-1H-imidazole-1-carboxylate (12b)

To a 250 ml round bottom flask compound **11** (1.3 g, 4.42 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.511 g, 0.442 mmol) and CuI (0.170 g, 0.884 mmol) were added. The round bottom flask was sealed and flushed with nitrogen with a syringe inserted into the septum of the round bottom flask. DMF (dry, 53 mL) was

added and the mixture was stirred until all the solids had dissolved. Et₃N (11 mL) and 3-methyl-1-butyne (0.9 ml, 8.84 mmol) were added by syringe and the mixture was heated at 70 °C for overnight. The resulting mixture was diluted with Et₂O (300 mL) and washed with water (3 x 100 mL). The ether phase was dried with Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 95/5 to 80/20 to give 0.39 g of compound **12b** as a yellow oily product (43 % yield).

C₁₃H₁₈N₂O₂. Mw: 234.29 g/mol.

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 1.21 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 1.58 (s, 9H), 2.85 (m, 1H), 7.00 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.55 (d, 1H, *J* = 3 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 20.76, 20.88, 22.52, 22.76, 27.82, 71.43, 86.27, 99.54, 119.97, 129.80, 146.81.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 134.7 [M+H]⁺.

tert-butyl 2-(hex-1-yn-1-yl)-1H-imidazole-1-carboxylate (12c)

To a 250 ml round bottom flask compound **11** (2.51 g, 8.53 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.985 g, 0.853 mmol) and CuI (0.325 g, 1.7 mmol) were added. The round bottom flask was sealed and flushed with nitrogen with a syringe inserted into the septum of the round bottom flask. DMF (dry, 100 mL) was added and the mixture was stirred until all the solids had dissolved. Et₃N (20 mL) and 1-hexyne (2 ml, 17.06 mmol) were added by syringe and the mixture was heated at 70 °C for overnight. The resulting mixture was diluted with Et₂O (300 mL) and washed with water (3 x 100 mL). The ether phase was dried with Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 95/5 to 90/10 to give 0.7 g of compound **12c** as a yellow oily product (33 % yield).

C₁₄H₂₀N₂O₂. Mw: 248.32 g/mol.

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.90 (t, 3H, *J* = 9 Hz), 1.42 (m, 4H), 1.57 (s, 9H), 2.47 (t, 2H, *J* = 9 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.55 (d, 1H, *J* = 3 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 13.87, 18.79, 21.87, 27.81, 30.11, 72.10, 86.11, 94.88, 119.70, 129.77, 132.00, 146.81.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 148.9 [M+H]⁺.

1-(2-nitrophenyl)-2-(pent-1-yn-1-yl)-1H-imidazole (14a)

To a stirred solution of compound **12a** (0.62 g, 2.65 mmol) in CH₂Cl₂ (6 ml) was added slowly TFA (2.7 ml) at 0 °C and stirred for 1 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give **13a**. A mixture of 2-nitrofluorobenzene (1.1 mL, 10.2 mmol), compound **13a** (1.24 g, 9.2 mmol) and 2.9 g of K₂CO₃ in 20 mL of acetonitrile was heated to reflux for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 20 mL dichloromethane and washed twice with distilled water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 70/30 to 50/50 to give 0.75 g of compound **14a** as a brown oily product (32 % yield).

C₁₄H₁₃N₃O₂. Mw: 255.27 g/mol.

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.68 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.29-1.36 (m, 2H), 2.20-2.25 (m, 2H), 7.12 (d, 1H), 7.56(d, 1H), 7.70 (dd, 1H, *J* = 9 Hz), 7.77-7.82 (m, 1H), 7.90-7.95 (m, 1H), 8.22 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 13.28, 20.54, 21.23, 70.40, 94.66, 122.64, 125.99, 129.89, 130.37, 131.00, 131.68, 135.15, 145.44.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 255.9 [M+H]⁺.

2-(3-methylbut-1-yn-1-yl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (14b)

To a stirred solution of compound **12b** (0.38 g, 1.6 mmol) in CH₂Cl₂ (4 ml) was added slowly TFA (2 ml) at 0 °C and stirred for 1 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give **13b**. A mixture of 2-nitrofluorobenzene (0.4 mL, 3.63 mmol), compound **13b** (0.44 g, 3.3 mmol) and 1.02 g of K₂CO₃ in 20 mL of acetonitrile was heated to reflux for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 20 mL dichloromethane and washed twice with distilled water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 80/20 to give 0.22 g of compound **14b** as a beige solid (28 % yield).

C₁₄H₁₃N₃O₂. Mw: 255.27 g/mol. Mp 81.2-82.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.96 (d, 6H, *J* = 9 Hz), 2.55-2.65 (m, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.57 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.69 (dd, 1H, *J* = 9 Hz), 7.77-7.83 (m, 1H), 7.90-7.96 (m, 1H), 8.22 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 20.50, 22.22, 69.47, 99.75, 122.66, 125.97, 129.97, 130.33, 130.99, 131.60, 135.19, 145.49.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 255.9 [M+H]⁺.

2-(hex-1-yn-1-yl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (14c)

To a stirred solution of compound **12c** (0.66 g, 2.66 mmol) in CH₂Cl₂ (6 ml) was added slowly TFA (3 ml) at 0 °C and stirred for 1 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was dried under vacuum to give **13c**. A mixture of 2-nitrofluorobenzene (0.72 mL, 6.8 mmol), compound **13c** (0.91 g, 6.14 mmol) and 1.92 g of K₂CO₃ in 20 mL of acetonitrile was heated to reflux for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 20 mL dichloromethane and washed twice with distilled water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethyl acetate 70/30 to 50/50 to give 0.54 g of compound **14c** as a yellow solid (33 % yield).

C₁₅H₁₅N₃O₂. Mw: 269.30 g/mol. Mp 83.7-84.6 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.75 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.05-1.12 (m, 2H), 2.22(t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.11 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 7.55 (d, 1H), 7.69 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz), 7.77-7.83 (m, 1H), 7.90-7.95 (m, 1H), 8.22 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 13.67, 18.23, 21.31, 29.62, 70.28, 94.71, 122.60, 125.90, 129.82, 130.28, 130.36, 130.94, 131.70, 135.07, 145.45.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 270.2 [M+H]⁺.

2-(2-pentyl-1H-imidazol-1-yl)aniline (15a')

To a solution of compound **14a** (0.75 g, 3 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (41 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.55 g of compound **15a'** as a yellow oily product (81% yield).

C₁₄H₁₉N₃. Mw: 229.32 g/mol.

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.78 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.17-1.30 (m, 4H), 1.52-1.62 (m, 2H), 2.37 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 4.79 (s, 2H, NH₂), 6.60 (t, 1H, *J* = 9 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 6 Hz), 6.95-7.02 (m, 3H), 7.13 (t, 1H, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 14.19, 22.14, 26.45, 27.31, 31.19, 116.09, 116.53, 120.95, 122.47, 127.93, 128.40, 129.96, 144.80, 148.55.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 230.0 [M+H]⁺.

2-(2-isopentyl-1H-imidazol-1-yl)aniline (15b')

To a solution of compound **14b** (0.71 g, 2.8 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (38 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for

24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.56 g of compound **15b'** as a yellow product (87% yield).

C₁₄H₁₉N₃, Mw: 229.32 g/mol. Mp 62.9-63.7 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.73 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 1.36-1.46 (m, 3H), 2.36-2.44 (m, 2H), 4.81 (s, 2H, NH₂), 6.60 (t, 1H, *J* = 9 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 6 Hz), 6.94-7.02 (m, 3H), 7.12 (t, 1H, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 22.59, 24.46, 27.29, 36.81, 116.09, 116.50, 120.97, 122.46, 127.91, 128.42, 129.98, 144.81, 148.61.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 230.1 [M+H]⁺.

2-(2-hexyl-1H-imidazol-1-yl)aniline (**15c'**)

To a solution of compound **14c** (0.51 g, 1.9 mmol) in anhydrous ethanol EtOH (26 mL) was added a catalytic amount of Pd/C 10%, and the reaction mixture was subjected to hydrogenation at 50 psi for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give 0.38 g of compound **15c'** as a white solid (83% yield).

C₁₅H₂₁N₃, Mw: 243.35 g/mol. Mp 62.7-63.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.77 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.05-1.23 (m, 6H), 1.49-1.53 (m, 2H), 2.34-2.39 (m, 2H), 4.78 (s, 1H, NH₂), 6.60-6.65 (m, 1H), 6.82 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz), 6.94-7.02 (m, 3H), 7.12-7.18 (m, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 14.37, 22.36, 26.51, 27.63, 28.68, 31.30, 116.09, 116.52, 120.94, 122.50, 127.94, 128.42, 129.96, 144.80, 148.80.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 244.2 [M+H]⁺.

1-pentylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**16a'**)

Compound **15a'** (0.52 g, 2.27 mmol) and carbonyldiimidazole (0.44 g, 2.7 mmol) were dissolved in 25 mL of 1,2-dichlorobenzene and heated to reflux overnight under nitrogen. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the solid was triturated with diethylether and filtered to give 0.362 g of compound **16a'** as a beige solid (62 % yield).

C₁₅H₁₇N₃O, Mw: 255.31 g/mol. Mp 238.6-240.1 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.87 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.35-1.47 (m, 4H), 1.83-1.88 (m, 2H), 3.23 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.23-7.40 (m, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.99 (d, 1H, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 14.35, 22.38, 26.52, 30.97, 31.27, 117.27, 117.53, 122.36, 123.21, 124.03, 127.03, 129.29, 129.94, 148.37, 155.03.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 256.2 [M+H]⁺.

1-isopentylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**16b'**)

Compound **15b'** (0.53 g, 2.31 mmol) and carbonyldiimidazole (0.49 g, 3 mmol) were dissolved in 25 mL of 1,2-dichlorobenzene and heated to reflux overnight under nitrogen. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the solid was triturated with diethylether and filtered to give 0.36 g of compound **16b'** as a beige solid (62% yield).

C₁₅H₁₇N₃O, Mw: 255.31 g/mol. Mp 217.2-218.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.95 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 1.72-1.76 (m, 3H), 3.23 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.01 (s, 1H, NH), 7.23-7.39 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.99 (d, 1H, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 22.76, 27.50, 29.01, 35.77, 39.07, 117.25, 117.46, 122.31, 123.14, 124.03, 126.98, 129.81, 135.51, 148.43, 154.98.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 256.2 [M+H]⁺.

1-hexylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (**16c'**)

Compound **15c'** (0.35 g, 1.44 mmol) and carbonyldiimidazole (0.3 g, 1.8 mmol) were dissolved in 15 mL of 1,2-dichlorobenzene and heated to reflux overnight under nitrogen. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the solid was triturated with diethylether and filtered to give 0.32 g of compound **16c'** as a grey solid (84 % yield).

$C_{16}H_{19}N_3O$. Mw: 269.34 g/mol. Mp 192.5-193.7 °C

1H -NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 0.84 (t, 3H, $J = 6$ Hz), 1.29-1.36 (m, 4H), 1.40-1.47 (m, 2H), 1.79-1.89 (m, 2H), 3.21 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 7.22-7.27 (m, 1H), 7.30-7.39 (m, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.98 (d, 1H, $J = 9$ Hz).

^{13}C -NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 14.34, 22.46, 26.76, 28.72, 31.00, 31.47, 117.25, 117.48, 122.34, 123.15, 124.01, 126.98, 129.83, 129.93, 148.32, 155.00.

MS (ESI +, QToF, m/z): 270.2 [M+H] $^+$.

1-pentylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**18a'**)

Phosphorus oxychloride (3 mL) and N,N-diethylaniline (0.43 mL, 2.6 mmol) were added to **16a'** (0.331 g, 1.3 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na_2CO_3 solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness under vacuum to give **17a'**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (7 mL, 40 mmol) was added to a solution of **17a'** (0.21 g, 0.77 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.16 g of the compound **18a'** as a yellow solid (84% yield).

$C_{15}H_{18}N_4$. Mw: 254.33 g/mol. Mp 209.4-210.5 °C

1H -NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 0.86 (t, 3H, $J = 7$ Hz), 1.32-1.45 (m, 4H), 1.81-1.89 (m, 2H), 3.26 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 7.07 (s, 2H, NH_2), 7.18-7.23 (m, 1H), 7.30-7.34 (m, 1H), 7.42 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz), 7.79 (s, 1H), 7.99 (dd, 1H, $J = 1$ Hz, $J = 8$ Hz).

^{13}C -NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 14.36, 22.40, 26.69, 31.12, 31.35, 116.40, 119.55, 122.61, 123.67, 124.74, 126.09, 126.45, 139.22, 146.22, 150.64.

MS (ESI +, QToF, m/z): 255.2 [M+H] $^+$.

HRMS: m/z calculated for $C_{15}H_{19}N_4$ 255.1610, found 255.1606

1-isopentylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**18b'**)

Phosphorus oxychloride (3 mL) and N,N-diethylaniline (0.41 mL, 2.6 mmol) were added to **16b'** (0.33 g, 1.3 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na_2CO_3 solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness under vacuum to give **17b'**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (7 mL, 40 mmol) was added to a solution of **17b'** (0.22 g, 0.80 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.2 g of the compound **18b'** as a white solid (98% yield).

$C_{15}H_{18}N_4$. Mw: 254.33 g/mol. Mp 192.7-194.1 °C

1H -NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6) 0.96 (d, 6H, $J = 6$ Hz), 1.70-1.77 (m, 3H), 3.28 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 7.09 (s, 2H, NH_2), 7.20-7.24 (m, 1H), 7.31-7.35 (m, 1H), 7.43 (dd, 1H, $J = 2$ Hz, $J = 8$ Hz), 7.80 (s, 1H), 8.00 (dd, 1H, $J = 1$ Hz, $J = 8$ Hz).

^{13}C -NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6) 22.83, 27.63, 29.18, 36.01, 39.40, 116.39, 119.57, 122.61, 123.70, 124.72, 126.07, 126.46, 139.17, 146.33, 150.63.

MS (ESI +, QToF, m/z): 255.1 [M+H] $^+$.

HRMS: m/z calculated for $C_{15}H_{19}N_4$ 255.1610, found 255.1612

1-hexylimidazo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (**18c'**)

Phosphorus oxychloride (3 mL) and N,N-diethylaniline (0.35 mL, 2.22 mmol) were added to **16c'** (0.3 g, 1.11 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness under vacuum to give **17c'**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (2 mL, 15 mmol) was added to a solution of **17c'** (0.08 g, 0.3 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.03 g of the compound **18c'** as a white solid (38% yield).

C₁₆H₂₀N₄. Mw: 268.36 g/mol. Mp 191.3-192.1 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 0.91 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.28-1.38 (m, 4H), 1.48-1.53 (m, 2H), 1.87-1.94 (m, 2H), 3.33 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.15 (s, 2H, NH₂), 7.25-7.29 (m, 1H), 7.37-7.41 (m, 1H), 7.49 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 8 Hz), 7.86 (s, 1H), 8.06 (d, 1H, *J* = 7 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 14.37, 22.50, 26.96, 28.79, 31.16, 31.51, 116.42, 119.52, 122.65, 123.77, 124.72, 126.02, 126.48, 139.08, 146.28, 150.61.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 269.3 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₆H₂₁N₄ 269.1766, found 269.1767

2,7-dibutyldipyrzolo[1,5-*a*:1',5'-*d*]pyrazine-4,9-dione (**19a**)

The 5-butyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (3 g, 18 mmol) in suspension in thionyl chloride (24 mL) was heated to reflux under agitation for 18 h. The reaction mixture was cooled, then filtered, washed with toluene, and dried under high vacuum to give 1.36 g of compound **19a** as a white solid (25 %).

C₁₆H₂₀N₄O₂. Mw: 300.36 g/mol. Mp 153.7-154.9 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.89 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 1.31-1.39 (m, 4H), 1.61-1.71 (m, 4H), 2.68 (t, 4H, *J* = 6 Hz), 7.43 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 14.03, 22.06, 27.65, 30.34, 115.30, 137.20, 148.78, 160.19.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 301.1 [M+H]⁺.

2,7-diisobutyldipyrzolo[1,5-*a*:1',5'-*d*]pyrazine-4,9-dione (**19b**)

The 5-isobutyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (0.5 g, 3 mmol) in suspension in thionyl chloride (10 mL) was heated to reflux under agitation for 18 h. The reaction mixture was cooled, then filtered, washed with toluene, and dried under high vacuum to give 0.77 g of compound **19b** as a white solid (43 %).

C₁₆H₂₀N₄O₂. Mw: 300.36 g/mol. Mp 162.8-163.9 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.81 (d, 12H, *J* = 6 Hz), 1.98-2.05 (m, 2H), 2.57 (d, 4H, *J* = 6 Hz), 7.42 (s, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-d₆) 22.47, 22.56, 27.69, 29.07, 28.57, 29.41, 34.95, 36.98, 106.91, 115.74, 137.19, 148.83, 159.32.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 301.2 [M+H]⁺.

3-butyl-N-(2-fluorophenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (**20a**)

To 2-fluoroaniline (0.44 mL, 4 mmol) in THF (5 mL) cooled in a -10°C bath, sodium bis(trimethylsilyl) amide (10 mL, 10 mmol, 1.0 M) in THF was added. After stirring for 1 h, a suspension of **19a** (0.6 g, 2 mmol) in THF (8 mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Acetic acid was added to pH 7. The reaction mixture was concentrated in vacuum, followed by the addition of water and saturated aqueous NaHCO₃ solution. The solid was collected by filtration, washed with distilled water and cyclohexane, and dried under high vacuum to give 0.74 g of compound **20a** as a beige solid (71% yield).

C₁₄H₁₆FN₃O. Mw: 261.29 g/mol. Mp 150.4-151.7 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-d₆) 0.88 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.26-1.38 (m, 2H), 1.55-1.65 (m, 2H), 2.62 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 6.56 (s, 1H), 7.17-7.32 (m, 3H), 7.88-7.94 (m, 1H), 9.49 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 14.00, 22.01, 25.03, 31.20, 104.13, 115.75, 116.01, 124.81, 125.91, 126.30, 146.35, 152.99, 156.23, 160.48.

MS (ESI +, QToF, m/z): 262.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(2-fluorophenyl)-3-isobutyl-1H-pyrazole-5-carboxamide (20b)

To 2-fluoroaniline (0.5 mL, 5.06 mmol) in THF (6 mL) cooled in a -10°C bath, sodium bis(trimethylsilyl) amide (13 mL, 13 mmol, 1.0 M) in THF was added. After stirring for 1 h, a suspension of **19b** (0.76 g, 2.53 mmol) in THF (10 mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Acetic acid was added to pH 7. The reaction mixture was concentrated in vacuum, followed by the addition of water and saturated aqueous NaHCO_3 solution. The solid was collected by filtration, washed with distilled water and cyclohexane, and dried under high vacuum to give 0.73g of compound **20b** as a beige solid (55% yield).

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}$. Mw: 261.29 g/mol. Mp 155.2-156.1 $^\circ\text{C}$

^1H -NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 0.88 (d, 6H, $J = 6$ Hz), 1.87-1.96 (m, 1H), 2.54 (t, 2H), 6.55 (s, 1H), 7.17-7.32 (m, 3H), 7.86-7.91 (m, 1H), 9.55 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 22.43, 28.59, 34.48, 104.78, 115.75, 116.01, 124.84, 125.94, 126.27, 145.18, 153.05, 156.29, 160.45.

MS (ESI +, QToF, m/z): 262.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-butyl-N-(2-fluoro-3-methylphenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (20c)

To 2-fluoro-3-methylaniline (0.51 mL, 4.6 mmol) in THF (5 mL) cooled in a -10°C bath, sodium bis(trimethylsilyl) amide (12 mL, 12 mmol, 1.0 M) in THF was added. After stirring for 1 h, a suspension of **19a** (0.68 g, 2.3 mmol) in THF (10 mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Acetic acid was added to pH 7. The reaction mixture was concentrated in vacuum, followed by the addition of water and saturated aqueous NaHCO_3 solution. The solid was collected by filtration, washed with distilled water and cyclohexane, and dried under high vacuum to give 1.01 of compound **20c** as a beige solid (80% yield).

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$. Mw: 275.32 g/mol. Mp > 300 $^\circ\text{C}$

^1H -NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 0.87 (t, 3H, $J = 7$ Hz), 1.25-1.37 (m, 2H), 1.54-1.64 (m, 2H), 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.61 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 6.54 (s, 1H), 7.05-7.10 (m, 2H), 7.72-7.77 (m, 1H), 9.49 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 13.99, 14.52, 21.99, 25.03, 31.18, 104.06, 121.89, 124.09, 124.68, 125.99, 127.15, 146.47, 151.32, 154.55, 160.38.

MS (ESI +, QToF, m/z): 276.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-butyl-N-(2-fluoro-4-methylphenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (20d)

To 2-fluoro-4-methylaniline (0.5 mL, 4.4 mmol) in THF (5 mL) cooled in a -10°C bath, sodium bis(trimethylsilyl) amide (11 mL, 11 mmol, 1.0 M) in THF was added. After stirring for 1 h, a suspension of **19a** (0.65 g, 2.2 mmol) in THF (9 mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 2 h. Acetic acid was added to pH 7. The reaction mixture was concentrated in vacuum, followed by the addition of water and saturated aqueous NaHCO_3 solution. The solid was collected by filtration, washed with distilled water and cyclohexane, and dried under high vacuum to give 0.95 g of compound **20d** as a beige solid (78% yield).

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}$. Mw: 275.32 g/mol. Mp > 300 $^\circ\text{C}$

^1H -NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO- d_6) 0.87 (t, 3H, $J = 6$ Hz), 1.27-1.35 (m, 2H), 1.54-1.62 (m, 2H), 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.61 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 6.54 (s, 1H), 6.98 (dd, 1H, $J = 3$ Hz, $J = 9$ Hz), 7.08 (dd, 1H, $J = 3$ Hz, $J = 9$ Hz), 7.69 (t, 1H, $J = 9$ Hz), 9.48 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO- d_6) 13.99, 20.79, 21.99, 25.07, 31.20, 104.05, 116.08, 123.34, 124.86, 135.96, 145.72, 146.43, 152.98, 156.22, 160.39.

MS (ESI +, QToF, m/z): 276.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (21a)

A mixture of **20a** (0.7 g, 2.7 mmol) and sodium hydride (0.2 g, 4.0 mmol) in dimethylacetamide (21 mL) was heated to reflux for 48 h. The sodium hydride was neutralized with saturated aqueous NH₄Cl solution and the reaction mixture was then concentrated in vacuum. The residue was collected by filtration, washed with water, and dried to give 0.52 g of compound **21a** as a beige solid (80% yield).

C₁₄H₁₅N₃O. Mw: 241.29 g/mol. Mp 160.0-161.8 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 0.88 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.29-1.39 (m, 2H), 1.62-1.72 (m, 2H), 2.72 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 6.94 (s, 1H), 7.24-7.40 (m, 3H), 8.02 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 14.10, 22.20, 27.79, 31.41, 105.30, 115.02, 116.87, 123.66, 123.95, 126.76, 128.24, 133.49, 154.60, 155.66.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 242.1 [M+H]⁺.

2-isobutylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (21b)

A mixture of **20b** (0.72 g, 2.8 mmol) and sodium hydride (0.17 g, 4.2 mmol) in dimethylacetamide (21 mL) was heated to reflux for 48 h. The sodium hydride was neutralized with saturated aqueous NH₄Cl solution and the reaction mixture was then concentrated in vacuum. The residue was collected by filtration, washed with water, and dried to give 0.49 g of compound **21b** as a brown solid (82% yield).

C₁₄H₁₅N₃O. Mw: 241.29 g/mol. Mp 181.9-182.8 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 0.92 (d, 6H, *J* = 6 Hz), 1.95-2.06 (m, 1H), 2.63 (d, 2H, *J* = 6 Hz), 6.94 (s, 1H), 7.25-7.43 (m, 3H), 8.04 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 22.65, 28.70, 37.26, 105.92, 115.05, 116.91, 123.68, 123.95, 126.79, 128.26, 133.47, 154.62, 154.69.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 242.1 [M+H]⁺.

2-butyl-9-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (21c)

A mixture of **20c** (0.98 g, 3.6 mmol) and sodium hydride (0.217 g, 5.4 mmol) in dimethylacetamide (27 mL) was heated to reflux for 48 h. The sodium hydride was neutralized with saturated aqueous NH₄Cl solution and the reaction mixture was then concentrated in vacuum. The residue was collected by filtration, washed with water, and dried to give 0.55 g of compound **21c** as a beige solid (60% yield).

C₁₅H₁₇N₃O. Mw: 255.31 g/mol. Mp 162.4-163.7 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 0.89 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.31-1.43 (m, 2H), 1.63-1.73 (m, 2H), 2.72 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 2.87 (s, 3H, CH₃), 6.93 (s, 1H), 7.05-7.21 (m, 3H).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 14.09, 22.15, 23.26, 27.75, 31.15, 104.57, 115.01, 122.96, 125.97, 127.05, 127.60, 129.24, 134.57, 154.33, 154.56.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 256.2 [M+H]⁺.

2-butyl-8-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4(5H)-one (21d)

A mixture of **20d** (0.92 g, 3.34 mmol) and sodium hydride (0.2 g, 5.01 mmol) in dimethylacetamide (25 mL) was heated to reflux for 48 h. The sodium hydride was neutralized with saturated aqueous NH₄Cl solution and the reaction mixture was then concentrated in vacuum. The residue was collected by filtration, washed with water, and dried to give 0.52 g of compound **21d** (61% yield).

C₁₅H₁₇N₃O. Mw: 255.31 g/mol. Mp 165.2-166.1 °C

¹H-NMR δ (ppm, 300 MHz, DMSO-*d*₆) 0.87 (t, 3H, *J* = 6 Hz), 1.32-1.40 (m, 2H), 1.63-1.70 (m, 2H), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.73 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 6.93 (s, 1H), 7.16 (dd, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.33 (br s, 1H), 7.88 (d, 1H).

¹³C-NMR δ (ppm, 75 MHz, DMSO-*d*₆) 14.11, 21.00, 22.20, 27.80, 31.44, 105.19, 114.94, 116.78, 123.75, 125.98, 127.55, 133.21, 133.52, 154.45, 155.53.

MS (ESI +, QTof, *m/z*): 256.2 [M+H]⁺.

2-butylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (23a)

Phosphorus oxychloride (4.3 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.66 mL, 4.2 mmol) were added to **21a** (0.5 g, 2.1 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness under vacuum to give **22a**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (11 mL, 85 mmol) was added to a solution of **22a** (0.44 g, 1.7 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.10 g of the compound **23a** as a white solid (25% yield).

C₁₄H₁₆N₄. Mw: 240.30 g/mol. Mp 155.5-156.4 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 0.91 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.36-1.42 (m, 2H), 1.65-1.71 (m, 2H), 2.79 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.05 (s, 1H), 7.29-7.34 (m, 1H), 7.36-7.40 (m, 1H), 7.53 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 8 Hz), 7.65 (s, 2H, NH₂), 8.11 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 8 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 14.22, 22.27, 28.01, 31.68, 101.03, 114.44, 124.08, 124.61, 125.88, 126.47, 127.95, 135.24, 149.75, 155.41.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 240.9 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₄H₁₇N₄ 247.1453, found 241.1454

2-isobutylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (23b)

Phosphorus oxychloride (5 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.6 mL, 4.2 mmol) were added to **21a** (0.5 g, 2.1 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness under vacuum to give **22b**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (10 mL, 70 mmol) was added to a solution of **22b** (0.35 g, 1.35 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.32 g of the compound **23b** as a white solid (100% yield).

C₁₄H₁₆N₄. Mw: 240.30 g/mol. Mp 178.7-179.6 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 0.95 (d, 6H, *J* = 7 Hz), 2.00-2.03 (m, 1H), 2.68 (d, 2H, *J* = 7 Hz), 6.93 (s, 1H), 7.24 (s, 2H, NH₂), 7.26-7.30 (m, 1H), 7.33-7.37 (m, 1H), 7.50 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 8 Hz), 8.11 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 8 Hz).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-*d*₆) 22.80, 29.00, 37.62, 100.44, 114.27, 123.49, 125.86, 126.08, 126.21, 128.09, 137.28, 150.11, 154.10.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 241.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₄H₁₇N₄ 241.1453, found 241.1454

2-butyl-9-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (23c)

Phosphorus oxychloride (5 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.6 mL, 4.2 mmol) were added to **21c** (0.5 g, 2.1 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness under vacuum to give **22c**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (12 mL, 95 mmol) was added to a solution of **22c** (0.52 g, 1.9 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.13 g of the compound **23c** as a white solid (0.13 g, 28 % yield).

C₁₅H₁₈N₄. Mw: 254.33 g/mol. Mp 169.4-170.5 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-*d*₆) 0.91 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.66-1.74 (m, 2H), 2.78 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 2.94 (s, 3H, CH₃), 7.01 (s, 1H), 7.09 (d, 1H, *J* = 7 Hz), 7.21 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7.37-7.39 (m, 3H, NH, CH).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 14.21, 22.24, 23.55, 28.01, 31.45, 99.72, 123.33, 125.16, 125.65, 126.83, 127.13, 128.97, 149.54, 154.26.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 255.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₅H₁₉N₄ 255.1610, found 255.1611

2-butyl-8-methylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (23d)

Phosphorus oxychloride (5 mL) and *N,N*-diethylaniline (0.64 mL, 4 mmol) were added to **21d** (0.5 g, 2 mmol) in a microwave-adapted vial and sealed. The reaction was irradiated at 130 °C for 15 min. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ solution (50 mL). The solution was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness under vacuum to give **22d**. Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (6 mL, 40 mmol) was added to a solution of **22c** (0.22 g, 0.8 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and then filtered to give 0.20 g of the compound **23d** as a white solid (0.20 g, 100 % yield).

C₁₅H₁₈N₄. Mw: 254.33 g/mol. Mp 193.3-193.9 °C

¹H-NMR δ (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆) 0.92 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.35-1.44 (m, 2H), 1.66-1.73 (m, 2H), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.80 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 7.17 (s, 1H), 7.23 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 8 Hz), 7.48 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7.97 (d, 1H, *J* = 1 Hz), 8.07 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR δ (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆) 14.20, 21.30, 22.23, 27.94, 31.63, 102.40, 114.54, 122.83, 125.38, 127.71, 127.86, 134.63, 148.78, 155.67.

MS (ESI +, QToF, *m/z*): 255.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₅H₁₉N₄ 255.1610, found 255.1607

5.2 Human TLR7/8 Reporter Gene Assays (NF-κB Induction)

Human embryonic kidney (HEK) cells stably transfected with human TLR7 or TLR8 and an NF-κB responsive secreted *embryonic alkaline phosphatase* (SEAP) gene (HEK-Blue-hTLR7/8) were purchased from InvivoGen. The procedure used to measure TLR7 or TLR8 agonist activity was conducted as described by Hood et al. HEK293 cells stably co-transfected with human TLR7 or human TLR8 and secreted alkaline phosphatase (sAP) were maintained in DMEM containing zeocin and normocin. Stable expression of secreted alkaline phosphatase (sAP) under control of NF-κB promoters is inducible by appropriate TLR agonists, and extracellular sAP in the supernatant is proportional to NF-κB induction. HEK-Blue cells were incubated at a density of ~ 10⁵ cells/mL in a volume of 180 μL/well, in 96-well, flat-bottomed, cell culture-treated microtiter plates for 24 h and subsequently stimulated with graded concentrations of stimuli. CL264 and resiquimod were used as positive controls. Following treatment, 20 μL of the supernatant from each well was incubated with Quanti-blue substrate solution (InvivoGen) at 37 °C for 1 h and absorbance was read at 650 nm using a Synergy plate reader. Data analysis was performed using GraphPad Prism.

5.3 TLR-7/8 antagonism assay

Human embryonic kidney (HEK) cells stably transfected with human TLR7 or TLR8 and an NF-κB responsive secreted *embryonic alkaline phosphatase* (SEAP) gene (HEK-Blue-hTLR7/8) were purchased from InvivoGen. The inhibition of induction of NF-κB, a key transcriptional activator of the innate immune system, was quantified using human embryonic kidney 293 cells stably transfected with plasmids encoding TLR7 or TLR8 as well as an NF-κB reporter gene coupled to secreted embryonic alkaline phosphatase (sAP), and were maintained in HEK-Blue in DMEM containing zeocin and normocin. Stable expression of secreted alkaline phosphatase (sAP) under control of NF-κB promoter is inducible by the CL264 (TLR7 agonist) or resiquimod R848 (TLR7/8 agonist) and extracellular sAP in the supernatant is proportional to NF-κB induction. HEK-Blue-7 (or HEK-Blue-8) cells were incubated at a density of ~1.2.10⁵ cells/mL in a volume of 100 μL/well, in 96-well, flat-bottomed, cell culture-treated microtiter plates for 24 h and subsequently stimulated with 1 μg/mL of

CL264 or resiquimod R848. Concurrent to stimulation, serially diluted concentrations of test compounds were added to the cell medium. Following treatment, 20 μ L of the supernatant from each well was incubated with Quanti-blue substrate solution (InvivoGen) at 37 °C for 1 h and absorbance was read at 650 nm using a Synergy plate reader Data analysis was performed using GraphPad Prism .

References

- [1] C.A. Janeway, Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1 (1989) 1–13.
- [2] S.E. Turvey, D.H. Broide, Innate immunity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S24–32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016.
- [3] S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell.* 124 (2006) 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [4] X. Cai, Y.-H. Chiu, Z.J. Chen, The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling, *Mol. Cell.* 54 (2014) 289–296. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.040.
- [5] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell.* 86 (1996) 973–983.
- [6] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A. Janeway, A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature.* 388 (1997) 394–397. doi:10.1038/41131.
- [7] I. Botos, D.M. Segal, D.R. Davies, The structural biology of Toll-like receptors, *Struct. Lond. Engl.* 19 (2011) 447–459. doi:10.1016/j.str.2011.02.004.
- [8] T. Kawai, S. Akira, Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 460–469. doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002.
- [9] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 987–995. doi:10.1038/ni1112.
- [10] V. Hornung, S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdörfer, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann, Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 168 (2002) 4531–4537.
- [11] S.W. Brubaker, K.S. Bonham, I. Zanoni, J.C. Kagan, Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective, *Annu. Rev. Immunol.* 33 (2015) 257–290. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240.
- [12] C.A. Leifer, A.E. Medvedev, Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling, *J. Leukoc. Biol.* 100 (2016) 927–941. doi:10.1189/jlb.2MR0316-117RR.
- [13] S.E. Ewald, G.M. Barton, Nucleic acid sensing Toll-like receptors in autoimmunity, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011) 3–9. doi:10.1016/j.coi.2010.11.006.
- [14] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, B. Beutler, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene, *Science.* 282 (1998) 2085–2088.
- [15] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 373–384. doi:10.1038/ni.1863.
- [16] S.M.Y. Lee, K.-H. Kok, M. Jaume, T.K.W. Cheung, T.-F. Yip, J.C.C. Lai, Y. Guan, R.G. Webster, D.-Y. Jin, J.S.M. Peiris, Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 3793–3798. doi:10.1073/pnas.1324266111.
- [17] S.-Y. Zhang, E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chappier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C.-L. Ku, A. Casrouge, X.-X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Héron, L. Vallée, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, J.-L. Casanova, *TLR3* deficiency in patients with herpes simplex encephalitis, *Science.* 317 (2007) 1522–1527. doi:10.1126/science.1139522.
- [18] N. Takemura, T. Kawasaki, J. Kunisawa, S. Sato, A. Lamichhane, K. Kobiyama, T. Aoshi, J. Ito, K. Mizuguchi, T. Karuppuchamy, K. Matsunaga, S. Miyatake, N. Mori, T. Tsujimura, T. Satoh,

- Y. Kumagai, T. Kawai, D.M. Standley, K.J. Ishii, H. Kiyono, S. Akira, S. Uematsu, Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3492. doi:10.1038/ncomms4492.
- [19] G. Mancuso, M. Gambuzza, A. Midiri, C. Biondo, S. Papasergi, S. Akira, G. Teti, C. Beninati, Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 587–594. doi:10.1038/ni.1733.
- [20] C. Guiducci, M. Gong, A.-M. Cepika, Z. Xu, C. Tripodo, L. Bennett, C. Crain, P. Quartier, J.J. Cush, V. Pascual, R.L. Coffman, F.J. Barrat, RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation, *J. Exp. Med.* 210 (2013) 2903–2919. doi:10.1084/jem.20131044.
- [21] C. Coban, Y. Igari, M. Yagi, T. Reimer, S. Koyama, T. Aoshi, K. Ohata, T. Tsukui, F. Takeshita, K. Sakurai, T. Ikegami, A. Nakagawa, T. Horii, G. Nuñez, K.J. Ishii, S. Akira, Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9, *Cell Host Microbe.* 7 (2010) 50–61. doi:10.1016/j.chom.2009.12.003.
- [22] F. Heil, P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, S. Bauer, The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2987–2997. doi:10.1002/eji.200324238.
- [23] F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer, Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8, *Science.* 303 (2004) 1526–1529. doi:10.1126/science.1093620.
- [24] M. Jurk, F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A.M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford, S. Bauer, Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 499. doi:10.1038/ni0602-499.
- [25] T. Shibata, U. Ohto, S. Nomura, K. Kibata, Y. Motoi, Y. Zhang, Y. Murakami, R. Fukui, T. Ishimoto, S. Sano, T. Ito, T. Shimizu, K. Miyake, Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7, *Int. Immunol.* 28 (2016) 211–222. doi:10.1093/intimm/dxv062.
- [26] E. Yoo, B.M. Crall, R. Balakrishna, S.S. Malladi, L.M. Fox, A.R. Hermanson, S.A. David, Structure-activity relationships in Toll-like receptor 7 agonistic 1H-imidazo[4,5-c]pyridines, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 6526–6545. doi:10.1039/c3ob40816g.
- [27] H.P. Kokatla, E. Yoo, D.B. Salunke, D. Sil, C.F. Ng, R. Balakrishna, S.S. Malladi, L.M. Fox, S.A. David, Toll-like receptor-8 agonistic activities in C2, C4, and C8 modified thiazolo[4,5-c]quinolines, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 1179–1198. doi:10.1039/c2ob26705e.
- [28] H.P. Kokatla, D. Sil, S.S. Malladi, R. Balakrishna, A.R. Hermanson, L.M. Fox, X. Wang, A. Dixit, S.A. David, Exquisite selectivity for human toll-like receptor 8 in substituted furo[2,3-c]quinolines, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 6871–6885. doi:10.1021/jm400694d.
- [29] C.E. Schiaffo, C. Shi, Z. Xiong, M. Olin, J.R. Ohlfest, C.C. Aldrich, D.M. Ferguson, Structure-activity relationship analysis of imidazoquinolines with Toll-like receptors 7 and 8 selectivity and enhanced cytokine induction, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 339–347. doi:10.1021/jm4004957.
- [30] M. Beesu, A.C.D. Salyer, K.L. Trautman, J.K. Hill, S.A. David, Human Toll-like Receptor (TLR) 8-Specific Agonistic Activity in Substituted Pyrimidine-2,4-diamines, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8082–8093. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00872.
- [31] M. Beesu, A.C.D. Salyer, M.J.H. Brush, K.L. Trautman, J.K. Hill, S.A. David, Identification of High-Potency Human TLR8 and Dual TLR7/TLR8 Agonists in Pyrimidine-2,4-diamines, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 2084–2098. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01860.
- [32] M. Beesu, S.S. Malladi, L.M. Fox, C.D. Jones, A. Dixit, S.A. David, Human Toll-like receptor 8-selective agonistic activities in 1-alkyl-1H-benzimidazol-2-amines, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 7325–7341. doi:10.1021/jm500701q.
- [33] Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. - PubMed - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nucleic+acids+of+mammalian+origin+can++act+a+s+endogenous+ligands+for+Toll-like++receptors+and+may+promote+systemic++lupus+erythematosus> (accessed January 8, 2018).
- [34] Y. Wu, W. Tang, J. Zuo, Toll-like receptors: potential targets for lupus treatment, *Acta Pharmacol. Sin.* 36 (2015) 1395–1407. doi:10.1038/aps.2015.91.

- [35] D. Ganguly, G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F.J. Barrat, T. Zal, M. Gilliet, Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1983–1994. doi:10.1084/jem.20090480.
- [36] J.N. Mandl, A.P. Barry, T.H. Vanderford, N. Kozyr, R. Chavan, S. Klucking, F.J. Barrat, R.L. Coffman, S.I. Staprans, M.B. Feinberg, Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections, *Nat. Med.* 14 (2008) 1077–1087. doi:10.1038/nm.1871.
- [37] M. Dajon, K. Iribarren, I. Cremer, Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment, *Oncoimmunology*. 4 (2015) e991615. doi:10.4161/2162402X.2014.991615.
- [38] J. Cherfils-Vicini, S. Platonova, M. Gillard, L. Laurans, P. Validire, R. Caliandro, P. Magdeleinat, F. Mami-Chouaib, M.-C. Dieu-Nosjean, W.-H. Fridman, D. Damotte, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1285–1297. doi:10.1172/JCI36551.
- [39] F.-G. Zhu, W. Jiang, L. Bhagat, D. Wang, D. Yu, J.X. Tang, E.R. Kandimalla, N. La Monica, S. Agrawal, A novel antagonist of Toll-like receptors 7, 8 and 9 suppresses lupus disease-associated parameters in NZBW/F1 mice, *Autoimmunity*. 46 (2013) 419–428. doi:10.3109/08916934.2013.798651.
- [40] E.R. Kandimalla, L. Bhagat, D. Wang, D. Yu, T. Sullivan, N. La Monica, S. Agrawal, Design, synthesis and biological evaluation of novel antagonist compounds of Toll-like receptors 7, 8 and 9, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 3947–3961. doi:10.1093/nar/gkt078.
- [41] N.M. Shukla, M.R. Kimbrell, S.S. Malladi, S.A. David, Regioisomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquinoline, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2211–2214. doi:10.1016/j.bmcl.2009.02.100.
- [42] N.M. Shukla, S.S. Malladi, V. Day, S.A. David, Preliminary evaluation of a 3H imidazoquinoline library as dual TLR7/TLR8 antagonists, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 3801–3811. doi:10.1016/j.bmc.2011.04.052.
- [43] M. Koppitz, U. Klar, R. Jautelat, D. Kosemund, R. Bohlmann, B. Bader, P. Lienau, G. Siemeister, B.P. Aktiengesellschaft, 6 substituted imidazopyrazines for use as mps-1 and tkk inhibitors in the treatment of hyperproliferative disorders, 2011. <https://www.google.ch/patents/WO2012080230A1?cl=en> (accessed January 8, 2018).
- [44] U. Klar, M. Koppitz, D. Kosemund, R. Bohlmann, B. Bader, P. Lienau, G. Siemeister, S. Prechtel, D. Nguyen, W. Scott, Imidazopyrazines, WO2011113862 A1, 2011. <http://www.google.fr/patents/WO2011113862A1>.
- [45] R. Goel, V. Luxami, K. Paul, Recent advances in development of imidazo[1,2-a]pyrazines: synthesis, reactivity and their biological applications, *Org. Biomol. Chem.* 13 (2015) 3525–3555. doi:10.1039/c4ob01380h.
- [46] R. Garamvölgyi, J. Dobos, A. Sipos, S. Boros, E. Illyés, F. Baska, L. Kékesi, I. Szabadkai, C. Szántai-Kis, G. Kéri, L. Örfi, Design and synthesis of new imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives with antiproliferative activity against melanoma cells, *Eur. J. Med. Chem.* 108 (2016) 623–643. doi:10.1016/j.ejmech.2015.12.001.
- [47] G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, V. Bonnard, S. Gayraud-Paniagua, J.-R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 6601–6610. doi:10.1016/j.bmc.2008.05.022.
- [48] C. Patinote, N. Bou Karroum, G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, K. Hadj-Kaddour, P. Cuq, M. Diab-Assaf, I. Kassab, P.-A. Bonnet, Imidazo[1,2-a]pyrazine, Imidazo[1,5-a]quinoxaline and Pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives as IKK1 and IKK2 inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 138 (2017) 909–919. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.021.
- [49] J.D. Hood, H.J. Warshakoon, M.R. Kimbrell, N.M. Shukla, S.S. Malladi, X. Wang, S.A. David, Immunoprofiling toll-like receptor ligands: Comparison of immunostimulatory and proinflammatory profiles in ex vivo human blood models, *Hum. Vaccin.* 6 (2010) 322–335.
- [50] S. Zhang, Z. Hu, H. Tanji, S. Jiang, N. Das, J. Li, K. Sakaniwa, J. Jin, Y. Bian, U. Ohto, T. Shimizu, H. Yin, Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state, *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 58–64. doi:10.1038/nchembio.2518.

[51]V. Colotta, L. Cecchi, D. Catarzi, G. Conti, G. Filacchioni, C. Martini, L. Giusti, A. Lucacchini, Tricyclic heteroaromatic systems pyrazolo[1,5-a]quinoxalines: synthesis and benzodiazepine receptor activity, *Farm. Soc. Chim. Ital.* 1989. 48 (1993) 1051–1063.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'imiquimod et son dérivé le résiquimod ont montré des activités anti-cancéreuses et adjuvantes en immunothérapie très importantes en se révélant comme les premières molécules synthétiques de faible poids moléculaire agonistes du TLR7 et TLR8. Récemment, les récepteurs Toll-like 7 et 8 ont fait l'objet de plusieurs travaux visant à développer de nouveaux agonistes ou antagonistes TLR7 et/ou TLR8.

Au sein du Laboratoire d'Oncopharmacochimie et Pharmacotoxicologie Cutanée de l'Université de Montpellier, nous avons développé des analogues structuraux de l'imiquimod présentant des noyaux bi- et tricycliques dans le but d'identifier de nouveaux ligands TLR7 et/ou TLR8. Les molécules synthétisées appartiennent à trois séries chimiques : imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Sur le plan pratique, des couplages croisés pallado-catalysés ont été réalisés sur le cycle à cinq sommets afin de développer ces trois séries chimiques.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé une librairie de molécules appartenant aux séries imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Pour cela, deux stratégies de synthèse ont été mises en œuvre pour parvenir à la structure tricyclique recherchée. La première stratégie s'applique uniquement à la série imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et comporte cinq étapes : couplage de l'imidazole substitué en position 2 avec l'ortho-fluorobenzène, réduction du groupement nitro, cyclisation intramoléculaire, chloration et substitution par une amine appropriée. Cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir un composé imidazo[1,5-*a*]quinoxaline méthylé en position 1.

La deuxième stratégie s'applique aux deux autres séries et comporte sept étapes : condensation bimoléculaire de l'acide imidazo/pyrazolo-carboxylique, couplage avec l'ortho-fluoroaniline, cyclisation intramoléculaire, chloration, substitution par une amine appropriée, bromation et substitution par couplage croisé de Suzuki-Miyaura. Cette dernière étape a été optimisée en utilisant différents types de catalyseurs et bases. Après plusieurs essais, nous avons réussi à mettre en place les conditions optimales pour une méthylation par réaction de Suzuki-Miyaura. En utilisant le Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ comme catalyseur, K₂CO₃ comme base en présence d'oxyde d'argent dans du THF sous irradiation micro-ondes nous avons obtenu le produit méthylé avec un bon rendement de 74%.

Nous avons évalué l'effet immunomodulateur par rapport aux TLR7 et TLR8 de cette première librairie des molécules. Le test utilisé consistait en un criblage sur deux lignées cellulaires HEK-

Blue™ hTLR7 (productrice de hTLR7) et HEK-Blue™ hTLR8 (productrice de hTLR8), au Laboratoire d'Immunologie à la Faculté de Santé Public II, à l'Université Libanaise. Nous avons pris le CL264 comme référence dans les tests agonistes TLR7 et le résiquimod comme référence dans les tests agonistes TLR8.

Les premières molécules synthétisées se sont montrées dépourvues d'activité agoniste TLR7 et TLR8, par contre quatre composés de la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline, avec une chaîne aryle ou un méthyle en position 3, ont montré une faible activité antagoniste TLR7 qui s'est traduit par une diminution de l'induction du NF-κB. L'inhibition de kinases (IKKs) qui interviennent dans la signalisation des TLR7 et 8 pourrait expliquer l'effet de nos molécules. Nous avons vérifié cette hypothèse en mesurant directement leur activité inhibitrice IKKs. Aucune des molécules actives sur les TLR7 et TLR8 n'a montré un effet inhibiteur IKKs à la concentration de 10 μM.

Les études de modélisation moléculaire et de docking virtuel nous ont fourni des informations précieuses sur le profil de molécules à synthétiser, elles ont indiqué notamment que la présence d'une chaîne alkyle sur le cycle à cinq sommets en une position bien précise est indispensable pour avoir une activité agoniste TLR7 et/ou TLR8, ainsi que la présence d'un groupement amine primaire.

Nous avons, alors, repris la synthèse chimique afin d'introduire une large variété de chaînes alkyles. De nombreux essais d'alkylation ont été tentés sur la série imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline via plusieurs couplages croisés pallado-catalysés. Nous avons rencontré plusieurs obstacles au cours des réactions d'alkylation, notamment des problèmes d'halogénéation des hétérocycles et des problèmes de réactivité de nos composés hétérocycliques riches en électrons vis-à-vis des couplages croisés. Une des solutions trouvées fut l'application de la réaction de Sonogashira sur l'hétérocycle iodé, qui nous a permis d'établir une liaison C-C et introduire une chaîne alkyle.

A la suite de cette optimisation, trois stratégies de synthèse ont été suivies et nous ont permis d'obtenir une trentaine de nouveaux composés alkylés. La première stratégie nous a conduit à la synthèse des 3-alkylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-amines en cinq étapes : construction du cycle 8-chloroimida[1,2-*a*]pyrazine, iodation en position 3, substitution du chlore par une amine primaire, substitution de l'iode par un alcyne via le couplage croisé de Sonogashira et réduction de l'alcyne en une chaîne alkyle. Cette stratégie nous a permis d'accéder facilement aux composés diversement substitués avec de bons rendements et avec une seule étape de purification lors de la réaction de Sonogashira.

La deuxième stratégie nous a amené à la synthèse des pyrazolo[1,5-*a*]quinoxalines avec de bons rendements à partir de la condensation bimoléculaire de l'acide pyrazole-3-carboxylique substitué en position 5 par un butyle ou un isobutyle.

En parallèle, une nouvelle stratégie de synthèse a été développée pour l'obtention des composés de type imidazo[1,5-*a*]quinoxaline. Cette voie de synthèse nous a permis de synthétiser en trois étapes l'imidazole alkylé en position 2. Après couplage de ce dernier avec l'ortho-fluorobenzène, une étape de réduction nous a permis d'obtenir le produit tricyclique suite à l'insertion du carbonyldiimidazole (CDI). Une étape de chloration est nécessaire afin d'obtenir par substitution nucléophile des imidazo[1,5-*a*]quinoxalines aminés.

Ces molécules nouvellement synthétisées ont été testées pour leur activité agoniste et antagoniste TLR7 et TLR8. Aucun des composés cibles n'a présenté d'activité agoniste TLR7 et TLR8, dans l'intervalle des concentrations testées (10^{-4} à 10^{-8} M). Par contre, tous les composés ont montré une activité antagoniste sélective du TLR7. Les composés les plus actifs, **5.35a** et **5.35b**, membres de la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline ont montré des IC₅₀ de l'ordre de 10 µM.

A l'issue des résultats obtenus durant ce travail de thèse, de nouvelles perspectives peuvent être envisagées aussi bien au niveau chimique qu'au niveau biologique.

En perspective, et par rapport aux résultats obtenus *in vitro*, nous pensons que des études de production des cytokines pro-inflammatoires sur des PBMCs humaines ou dérivées de patients possédant une maladie auto-immunes sont indispensables pour confirmer l'effet antagoniste des produits les plus actifs. Des études *in vivo* pourront être également effectuées en utilisant des souris immunocompétentes afin de déterminer les taux d'autoanticorps sériques ainsi que les taux de production des cytokines proinflammatoires après administration des antagonistes TLR.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2, la stimulation du TLR7 présente un effet protumorigène dans le cas du cancer pulmonaire et hépatique. Pour confirmer ce rôle, des études *in vitro* des composés **5.35a** et **5.35b** en combinaison avec l'agoniste CL264 pourront être effectuées sur des cellules tumorales primaires provenant des patients atteints de cancer de poumon ou de foie. Jusqu'à présent, aucune utilisation d'antagoniste TLR7 n'a été décrite dans le traitement de cancers. De plus, une activité anti-VIH des composés **5.35a** et **5.35b** pourrait être évaluée en utilisant des cellules T CD4⁺ infectées par le virus VIH, le rationnel de ces études s'appuyant sur des données bibliographiques récentes.

L'étude de l'interaction de nos molécules cibles avec les TLR7 et TLR8 devra être approfondie par des études de cristallographie sur le complexe **TLR7-5.35a** et **TLR7-5.35b** afin d'identifier éventuellement un nouveau site de liaison distinct de celui de l'agoniste, comme dans le cas du TLR8. Ces études de cristallographie pourront être envisagées après expression et purification du récepteur

TLR7 chez les cellules de la drosophile. Une fois le TLR7 purifié, la constante d'affinité K_d des deux composés actifs **5.35a** et **5.35b** pourra être déterminée par la technique de titration calorimétrique isotherme (ITC).

Sur un autre plan, on devrait poursuivre la diversification structurale des trois séries chimiques : imidazo[1,2-*a*]pyrazine, imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Dans le but d'améliorer l'activité antagoniste TLR7, une nouvelle stratégie de synthèse pourra être développée en vue d'obtenir des composés analogues ne présentant pas de groupe amino en position 4 du cycle pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Selon les résultats de Shukla et *coll.*, les composés analogues, sans groupement NH_2 , seraient plus actifs que ceux portant un groupement amine primaire.

De plus, plusieurs substituants pourront être introduits sur le cycle à cinq sommets surtout en position 1 de la série imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et en position 2 de la série pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline. Ces substituants pourront être des chaînes aryles ou alkyles.

La synthèse de la forme saline de ces composés devra être développée afin d'obtenir des composés facilement administrables en solution.

ANNEXES

Dans cette partie, nous exposons les modes opératoires ainsi que les analyses spectrométriques des composés intermédiaires non publiés.

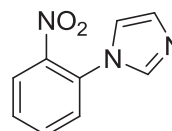
1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (5.1)

Chemical formula: C₉H₇N₃O₂

Exact Mass: 189,0538

Molecular Weight: 189,1708

Yield: 91%



A mixture of 2-nitrofluorobenzene (3.74 ml, 0.035 mol), imidazole (2.18 g, 0.032 mol), and 10 g of K₂CO₃ in 50 ml of acetonitrile CH₃CN was heated to reflux for 24 h. The solvent was removed under vacuum, and the residue was slurred in 50 ml dichloromethane, washed twice with water, dried over Na₂SO₄, and the solvent was removed under vacuum. We obtained 91 % of **5.1** as a yellow solid (5.49 g, 91%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 7.05 (br s, 1H, CH=N); 7.20 (br s, 1H, N-CH=); 7.44-7.47 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N); 7.57-7.63 (m, 2H); 7.69-7.74 (td, 1H, *J* = 9 Hz, -CH=C); 7.97-8.00 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NO₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 120.29, 125.39, 128.69, 129.67, 130.40, 130.63, 133.75, 137.24, 145.35

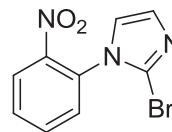
2-Bromo-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (5.2)

Chemical Formula: C₉H₆BrN₃O₂

Exact Mass: 266,9643

Molecular Weight: 268,0668

Yield: 32%



To a solution of **5.1** (5.49g, 0.029 mol) in acetonitrile CH₃CN (270 ml), N-bromosuccinimide (6.23g, 0.035 mol) was added. The reaction mixture was heated to reflux for 3 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 270 ml of dichloromethane CH₂Cl₂, washed twice with a solution of 5% NaHCO₃, dried over Na₂SO₄, and purified by column chromatography (CH₂Cl₂, 100%) to give 31 % of **5.2** (2.48g, 32%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 7.09 (br s, 1H); 7.16 (br s, 1H); 7.44-7.47 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N); 7.67-7.80 (m, 2H); 8.12-8.15 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NO₂).

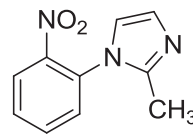
2-methyl-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole (5.3)

Chemical Formula: C₁₀H₉N₃O₂

Exact Mass: 203,0695

Molecular Weight: 203,1974

Yield: 19%



To a mixture of **5.2** (190 mg, 0.7 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (80 mg, 0.07 mmol) in 1,4-dioxane (3.2 mL), 0.13 ml of the trimethylboroxine was added followed by the addition of sodium carbonate (220 mg, 2.1 mmol) in water (0.47 mL). The reaction was irradiated in a sealed tube at 140°C for 25 min using a Biotage Initiator microwave synthesizer. The reaction mixture was poured on water and then extracted with dichloromethane. The combined organic extracts were washed with water, dried and concentrated to dryness under vacuo. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, elution with CH₂Cl₂-MeOH, 97:3, v/v) to give **5.3** (20 mg, 14 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 2.18 (s, 3H, CH₃), 6.87 (d, 1H, *J* = 3 Hz, =CH-N), 7.01 (d, 1H, *J* = 3 Hz, =CH-N); 7.39-7.42 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N); 7.60-7.66 (td, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C); 7.70-7.75 (td, 1H, *J* = 9 Hz, CH=C-); 8.00-8.04 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NO₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 13.02, 120.52, 125.28, 128.50, 130.05, 130.13, 131.12, 133.81, 145.54, 146.22.

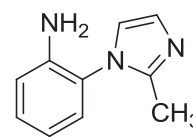
2-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)aniline (5.4)

Chemical Formula: C₁₀H₁₁N₃

Exact Mass: 173,0953

Molecular Weight: 173,2144

Yield: 32%



Compound **5.3** (590 mg, 3 mmol) was dissolved in 40 ml of dry ethanol with catalytic amount of 10% palladium on carbon and hydrogenated for 2h30. The catalyst was removed by filtration, and the residue concentrated under vacuum and purified by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂-MeOH (95 : 5) as eluent to give 32 % of **5.4** (0.161 g, 32 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 2.18 (s, 3H, CH₃), 4.84 (s, 2H, NH₂), 6.60-6.65 (td, 1H, *J* = 9 Hz, CH=C), 6.83-6.86 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NH₂), 6.92 (br s, 1H, =CH-N); 6.96-6.99 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N); 7.04 (br s, 1H, =CH-N); 7.12-7.18 (td, 1H, *J* = 9 Hz, CH=C-).

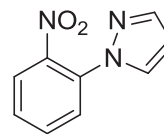
1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole (5.18)

Chemical Formula: C₉H₇N₃O₂

Exact Mass: 189,0538

Molecular Weight: 189,1708

Yield: 100%



NaH (0.292 g, 7.3 mmol), pyrazole (0.5 g, 7.3 mmol) and DMSO (12 mL) were added to a 100 mL round bottom flask. The mixture was stirred for 30 min under room temperature; CuI (0.116 g, 0.61 mmol) and 2-nitrofluorobenzene (0.64 ml, 6.1 mmol) were added. The mixture was heated at 120 °C for 3h. The resulting mixture was cooled to room temperature and diluted by 60 mL water. The product was extracted by ethyl acetate (60 ml×3). The combined extracts were washed by brine (90 ml), dried over MgSO₄, evaporated under reduced pressure to give 100% of **5.18** (4.07g, 83 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 6.49 (t, 1H, *J* = 3 Hz, -CH=CH-N), 7.47-7.58 (m, 2H), 7.64-7.73 (m, 3H); 7.84-7.87 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NO₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 108.46, 125.03, 126.21, 128.40, 130.05, 133.07, 133.41, 142.40, 144.62.

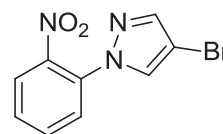
4-bromo-1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole (5.19)

Chemical Formula: C₉H₆BrN₃O₂

Exact Mass: 266,9643

Molecular Weight: 268,0668

Yield: 90%



To a solution of **5.18** (1.08 g, 5.7 mmol) in acetonitrile CH₃CN (53 ml), N-bromosuccinimide (1.217 g, 6.8 mol) was added. The reaction mixture was heated to reflux for 3 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was slurred in 53 ml of dichloromethane CH₂Cl₂, washed twice with a solution of 5% NaHCO₃, dried over Na₂SO₄ to give 90% of **5.19** (1.37 g, 90%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 7.51-7.57 (m, 2H), 7.66-7.73 (m, 3H); 7.87-7.91 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NO₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 125.27, 126.28, 129.04, 132.89, 133.21, 143.03, 144.46.

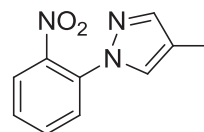
4-methyl-1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole (5.20)

Chemical Formula: C₁₀H₉N₃O₂

Exact Mass: 203,0695

Molecular Weight: 203,1974

Yield: 83%



NaH (0.97 g, 24.3 mmol), 4-methyl-1H-pyrazole (2.1 ml, 24.3 mmol) and DMSO (41 mL) were added to a 500 mL flask. The mixture was stirred for 30 min under ambient temperature; CuI (0.38 g, 2.02 mmol) and 2-nitrofluorobenzene (2.1 ml, 20 mmol) were added. The mixture was heated at 120 °C for 3h. The resulting mixture was cooled to room temperature and diluted by 370 mL water. The product was extracted by ethyl acetate (200 mL×3). The combined extracts were washed by brine (200 mL), dried over MgSO₄, evaporated under reduced pressure to give 83 % of **5.20** (4.07g, 83 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 2.09 (s, 3H, CH₃), 7.55-7.60 (td, 1H, *J* = 9 Hz, -CH=C), 7.57 (s, 1H, N=CH), 7.73-7.82 (m, 2H); 7.94-7.98 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-NO₂); 8.06 (s, 1H, -C=CH-N).

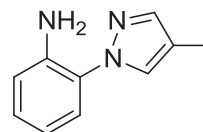
2-(4-methyl-1H-pyrazol-1-yl)aniline (5.21)

Chemical Formula: C₁₀H₁₁N₃

Exact Mass: 173,0953

Molecular Weight: 173,2144

Yield: 91%



Palladium-carbon 10% was added portionwise during 5-10 min to a hot solution of **19** (3.97 g, 19 mmol) in dry ethanol (32 ml) containing hydrazine monohydrate (4.7 ml, 95 mmol). The mixture was heated under reflux for 1h. The hot solution was filtered to remove Pd, and the filtrate was evaporated under vacuum to give 91 % of **20** (3 g, 91 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 2.10 (s, 3H, CH₃), 5.57 (s, 2H, NH₂), 6.60-6.65 (td, 1H, *J* = 9 Hz, -CH=C), 6.83-6.86 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, C=CH-C-N), 7.03-7.09 (td, 1H, *J* = 9 Hz, -CH=C); 7.16-7.19 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N); 7.55 (s, 1H, -CH=N), 7.84 (s, 1H, N-CH=C).

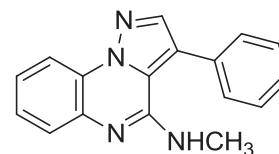
***N*-methyl-3-phenylpyrazolo[1,5-*a*]quinoxalin-4-amine (5.28a)**

Chemical Formula: C₁₇H₁₄N₄

Exact Mass: 274,1218

Molecular Weight: 274,3199

Yield: 55%



To a mixture of **5.27** (300 mg, 1.08 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (63 mg, 0.05 mmol) in DME (15 mL) was added phenyl boronic acid (260 mg, 2.16 mmol) followed by the addition of sodium carbonate (234 mg, 2.2 mmol) in water (5 mL). The reaction was irradiated in a sealed tube at 140 °C for 20 min using a Biotage Initiator microwave synthesizer. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate concentrated under vacuum. The residue was slurred with ethyl acetate, washed with saturated ammonium, water and saturated sodium chloride, dried and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by column chromatography to give 55 % of **5.28a** (160 mg, 55 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 2.97 (d, 3H, CH₃), 5.67 (s, 1H, NH), 7.35-7.57 (m, 7H); 7.64-7.68 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N), 8.17 (s, 1H, CH=N), 8.24-8.28 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N=).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 27.6, 124.8, 125.1, 125.8, 127.5, 127.7, 127.8, 128.7, 128.9, 129.2, 129.3, 130.8, 135.8, 135.9, 136.4, 142.1, 151.0.

MS (ESI+, Qtof, *m/z*): 274.9 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₇H₁₅N₄ 275.1297, found 275.1295.

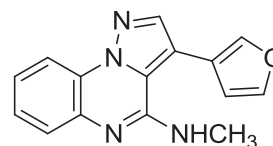
3-(furan-3-yl)-N-methylpyrazolo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (5.28b)

Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₄O

Exact Mass: 264,1011

Molecular Weight: 264,2820

Yield: 5%



To a mixture of **5.27** (300 mg, 1.08 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (63 mg, 0.05 mmol) in DME (15 mL) was added 3-furanboronic acid (242 mg, 2.16 mmol) followed by the addition of sodium carbonate (234 mg, 2.2 mmol) in water (5 mL). The reaction was irradiated in a sealed tube at 140 °C for 20 min using a Biotage Initiator microwave synthesizer. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate concentrated under vacuum. The residue was slurred with ethyl acetate, washed with saturated ammonium, water and saturated sodium chloride, dried and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by column chromatography to give **5.28b**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 3.02 (d, 3H, CH₃), 6.05 (s, 1H, NH), 6.80-6.81 (d, 1H, J = 3 Hz, -CH=C-O); 7.33-7.38 (td, 1H, J = 9 Hz, =CH-C), 7.40-7.46 (td, 1H, J = 9 Hz, =CH-C), 7.63-7.66 (dd, 1H, J = 9 Hz, =CH-C-N-), 7.89 (t, 1H, J = 3 Hz, =CH-O), 8.00 (s, 1H, =CH-O), 8.14 (s, 1H, -CH=N), 8.21-8.24 (dd, 1H, J = 9 Hz, =CH-C-N=).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 27.7, 104.7, 108.8, 124.8, 125.8, 127.7, 128.7, 129.3, 133.4, 135.8, 136.0, 138.5, 142.1, 144.1, 151.0.

MS (ESI+, Qtof, m/z): 265.2 [M+H]⁺.

HRMS: m/z calculated for C₁₅H₁₃N₄O 265.1089, found 265.1088.

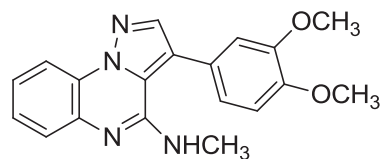
3-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methylpyrazolo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (5.28c)

Chemical Formula: C₁₉H₁₈N₄O₂

Exact Mass: 334,1430

Molecular Weight: 334,3718

Yield: 3%



To a mixture of **5.27** (300 mg, 1.08 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (63 mg, 0.05 mmol) in DME (15 mL) was added 3,4-dimethoxyphenyl boronic acid (400 mg, 2.16 mmol) followed by the addition of sodium carbonate (234 mg, 2.2 mmol) in water (5 mL). The reaction was irradiated in a sealed tube at 140 °C for 20 min using a Biotage Initiator microwave synthesizer. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate concentrated under vacuum. The residue was slurred with ethyl acetate, washed with saturated ammonium, water and saturated sodium chloride, dried and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by column chromatography to give 3 % of **5.28c**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 2.78 (d, 3H, NH-CH₃), 3.83 (s, 6H, O-CH₃), 5.67 (s, 1H, NH), 6.94-7.34 (m, 3H); 7.65-7.75 (n, 3H), 8.16 (dd, 1H, *J* = 9 Hz, =CH-C-N=), 8.73 (s, 1H, -CH=N).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ: 27.6, 56.1, 111.0, 113.6, 122.0, 124.8, 125.1, 125.8, 127.7, 128.7, 130.8, 135.8, 135.9, 136.8, 142.1, 149.8, 150.3, 151.1.

MS (ESI+, Qtof, *m/z*): 335.1 [M+H]⁺.

HRMS: *m/z* calculated for C₁₇H₁₅N₄ 335.1508, found 335.1511.

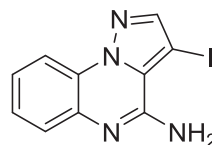
3-iodopyrazolo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (5.29)

Chemical Formula: C₁₀H₇IN₄

Exact Mass: 309,9715

Molecular Weight: 310,0938

Yield: 42%



To a solution of compound **5.27** (0.2 g, 1 mmol) in anhydrous DMF (5 ml) was added NIS (0.25 g, 1.1 mmol), and the reaction mixture was heated at 45 °C for 12 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 x 30 ml). The combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was triturated with diethylether and filtered to give 0.13 g of compound **5.29** (42%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 6.56 (br s, 1H, NH), 7.30-7.36 (m, 1H); 7.40-7.46 (m, 1H), 7.60-7.63 (dd, 1H), 8.14-8.17 (dd, 1H), 8.22 (s, 1H)

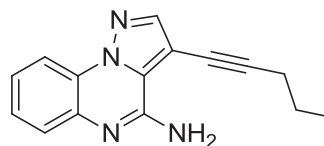
3-(pent-1-yn-1-yl)pyrazolo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (5.30)

Chemical Formula: C₁₅H₁₄N₄

Exact Mass: 250,1218

Molecular Weight: 250,2985

Yield: 38%



To a solution of compound **5.29** (110 mg, 0.34 mmol) in a 2:1 mixture of CH₃CN (4.1 mL) and Et₃N (2.1 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (40 mg, 0.034 mmol) and CuI (13 mg, 0.068 mmol). The reaction mixture was degassed with dry nitrogen for 5 min, and then 1-pentyne (0.078 mL, 0.087 mmol) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography eluted with cyclohexane/ethylacetate 50/50 to 30/70 to give 0.03 g of the compound **5.30** as a white solid (38% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 1.04 (t, 3H), 1.57-1.69 (m, 2H), 2.54 (m, 2H), 3.11 (d, 3H), 6.61 (br s, 1H, NH), 7.32-7.37 (m, 1H); 7.41-7.47 (m, 1H), 7.61-7.64 (dd, 1H), 8.15-8.18 (dd, 1H), 8.23 (s, 1H).

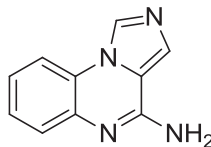
Imidazo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (5.41)

Chemical Formula: C₁₀H₈N₄

Exact Mass: 184,07

Molecular Weight: 184,20

Yield: 55%



Ammonia of a 30% (w/v) aqueous solution (9 ml, 75 mmol) was added to a solution of **5.13** (0.31 g, 1.5 mmol) in acetonitrile in a microwave-adapted vial. The reaction was submitted to microwave irradiations during 2 h at 140 °C. The solvent is removed under reduced pressure. The residue was washed with water and filtered to give 0.12 g of compound **5.41** as a beige solid (55% yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 7.20-7.24 (m, 3H); 7.32-7.36 (m, 1H), 7.43-7.45 (dd, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.13-8.16 (dd, 1H).

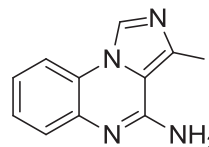
3-iodoimidazo[1,5-a]quinoxalin-4-amine (5.42)

Chemical Formula: C₁₀H₇IN₄

Exact Mass: 309,97

Molecular Weight: 310,10

Yield : 60%



To a solution of compound **5.41** (0.1 g, 0.54 mmol) in anhydrous DMF (4 ml) was added NIS (0.15 g, 0.64 mmol), and the reaction mixture was heated at 45 °C for 12 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 x 30 ml). The combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure, and the crude material was triturated with diethylether and filtered to give 0.05 g of compound **5.42** (60%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ: 7.27 (t, 1H), 7.40 (t, 1H); 7.47 (d, 1H), 8.15 (d, 1H), 9.18 (s, 1H).

Références

- [1] F. Williamson, *Microbes*. 5. Elie Metchnikoff: advocate for phagocytes, *Nurs. Times*. 69 (1973) 1702–1703.
- [2] S.E. Turvey, D.H. Broide, Innate immunity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S24-32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016.
- [3] C.A. Janeway, Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1 (1989) 1–13.
- [4] U. Gazi, L. Martinez-Pomares, Influence of the mannose receptor in host immune responses, *Immunobiology*. 214 (2009) 554–561. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.004.
- [5] P.J. Gough, S. Gordon, The role of scavenger receptors in the innate immune system, *Microbes Infect.* 2 (2000) 305–311.
- [6] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*. 86 (1996) 973–983.
- [7] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A. Janeway, A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature*. 388 (1997) 394–397. doi:10.1038/41131.
- [8] Y. Delneste, C. Beauvillain, P. Jeannin, [Innate immunity: structure and function of TLRs], *Med. Sci. MS*. 23 (2007) 67–73. doi:10.1051/medsci/200723167.
- [9] J. Hoffmann, S. Akira, Innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* 25 (2013) 1–3. doi:10.1016/j.coi.2013.01.008.
- [10] A. Cottalorda, C. Vershelde, A. Marçais, M. Tomkowiak, P. Musette, S. Uematsu, S. Akira, J. Marvel, N. Bonnefoy-Berard, TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 1684–1693. doi:10.1002/eji.200636181.
- [11] K. Kersse, M.J.M. Bertrand, M. Lamkanfi, P. Vandenabeele, NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death, *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 (2011) 257–276. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.09.003.
- [12] T.B. Clarke, J.N. Weiser, Intracellular sensors of extracellular bacteria, *Immunol. Rev.* 243 (2011) 9–25. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01039.x.
- [13] Y.-M. Loo, M. Gale, Immune signaling by RIG-I-like receptors, *Immunity*. 34 (2011) 680–692. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003.
- [14] J.A. Hoffmann, The immune response of *Drosophila*, *Nature*. 426 (2003) 33–38. doi:10.1038/nature02021.
- [15] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, B. Beutler, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene, *Science*. 282 (1998) 2085–2088.

- [16] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 987–995. doi:10.1038/ni1112.
- [17] V. Hornung, S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdörfer, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann, Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 168 (2002) 4531–4537.
- [18] S.W. Brubaker, K.S. Bonham, I. Zanoni, J.C. Kagan, Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective, *Annu. Rev. Immunol.* 33 (2015) 257–290. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240.
- [19] C.A. Leifer, A.E. Medvedev, Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling, *J. Leukoc. Biol.* 100 (2016) 927–941. doi:10.1189/jlb.2MR0316-117RR.
- [20] S.E. Ewald, G.M. Barton, Nucleic acid sensing Toll-like receptors in autoimmunity, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011) 3–9. doi:10.1016/j.coi.2010.11.006.
- [21] F. Yarovinsky, D. Zhang, J.F. Andersen, G.L. Bannenberg, C.N. Serhan, M.S. Hayden, S. Hieny, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, S. Ghosh, A. Sher, TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein, *Science.* 308 (2005) 1626–1629. doi:10.1126/science.1109893.
- [22] A.A. Koblansky, D. Jankovic, H. Oh, S. Hieny, W. Sungnak, R. Mathur, M.S. Hayden, S. Akira, A. Sher, S. Ghosh, Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*, *Immunity.* 38 (2013) 119–130. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.016.
- [23] J. Wang, J. Chai, H. Wang, Structure of the mouse Toll-like receptor 13 ectodomain in complex with a conserved sequence from bacterial 23S ribosomal RNA, *FEBS J.* 283 (2016) 1631–1635. doi:10.1111/febs.13628.
- [24] T. Kawai, S. Akira, Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 460–469. doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002.
- [25] I. Botos, D.M. Segal, D.R. Davies, The structural biology of Toll-like receptors, *Struct. Lond. Engl.* 19 (2011) 447–459. doi:10.1016/j.str.2011.02.004.
- [26] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 373–384. doi:10.1038/ni.1863.
- [27] S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell.* 124 (2006) 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [28] T. Regan, K. Nally, R. Carmody, A. Houston, F. Shanahan, J. Macsharry, E. Brint, Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 191 (2013) 6084–6092. doi:10.4049/jimmunol.1203245.
- [29] S.M.Y. Lee, K.H. Kok, M. Jaume, T.K.W. Cheung, T.F. Yip, J.C.C. Lai, Y. Guan, R.G. Webster, D.Y. Jin, J.S.M. Peiris, Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune

responses to influenza virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 3793–3798. doi:10.1073/pnas.1324266111.

[30] S.Y. Zhang, E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cagnet, H. von Bernuth, C.L. Ku, A. Casrouge, X.-X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Héron, L. Vallée, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, J.L. Casanova, TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis, *Science*. 317 (2007) 1522–1527. doi:10.1126/science.1139522.

[31] N. Takemura, T. Kawasaki, J. Kunisawa, S. Sato, A. Lamichhane, K. Kobiyama, T. Aoshi, J. Ito, K. Mizuguchi, T. Karuppuchamy, K. Matsunaga, S. Miyatake, N. Mori, T. Tsujimura, T. Satoh, Y. Kumagai, T. Kawai, D.M. Standley, K.J. Ishii, H. Kiyono, S. Akira, S. Uematsu, Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3492. doi:10.1038/ncomms4492.

[32] G. Mancuso, M. Gambuzza, A. Midiri, C. Biondo, S. Papasergi, S. Akira, G. Teti, C. Beninati, Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 587–594. doi:10.1038/ni.1733.

[33] C. Guiducci, M. Gong, A.-M. Cepika, Z. Xu, C. Tripodo, L. Bennett, C. Crain, P. Quartier, J.J. Cush, V. Pascual, R.L. Coffman, F.J. Barrat, RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation, *J. Exp. Med.* 210 (2013) 2903–2919. doi:10.1084/jem.20131044.

[34] C. Coban, Y. Igari, M. Yagi, T. Reimer, S. Koyama, T. Aoshi, K. Ohata, T. Tsukui, F. Takeshita, K. Sakurai, T. Ikegami, A. Nakagawa, T. Horii, G. Nuñez, K.J. Ishii, S. Akira, Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9, *Cell Host Microbe*. 7 (2010) 50–61. doi:10.1016/j.chom.2009.12.003.

[35] R. Mathur, H. Oh, D. Zhang, S.-G. Park, J. Seo, A. Koblansky, M.S. Hayden, S. Ghosh, A mouse model of *Salmonella typhi* infection, *Cell*. 151 (2012) 590–602. doi:10.1016/j.cell.2012.08.042.

[36] W.A. Andrade, M. do C. Souza, E. Ramos-Martinez, K. Nagpal, M.S. Dutra, M.B. Melo, D.C. Bartholomeu, S. Ghosh, D.T. Golenbock, R.T. Gazzinelli, Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice, *Cell Host Microbe*. 13 (2013) 42–53. doi:10.1016/j.chom.2012.12.003.

[37] P. Broz, D.M. Monack, Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 551–565. doi:10.1038/nri3479.

[38] A. Hidmark, A. von Saint Paul, A.H. Dalpke, Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 189 (2012) 2717–2721. doi:10.4049/jimmunol.1200898.

[39] X.-D. Li, Z.J. Chen, Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13, *ELife*. 1 (2012) e00102. doi:10.7554/eLife.00102.

[40] M. Oldenburg, A. Krüger, R. Ferstl, A. Kaufmann, G. Nees, A. Sigmund, B. Bathke, H. Lauterbach, M. Suter, S. Dreher, U. Koedel, S. Akira, T. Kawai, J. Buer, H. Wagner, S. Bauer, H.

- Hochrein, C.J. Kirschning, TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification, *Science*. 337 (2012) 1111–1115. doi:10.1126/science.1220363.
- [41] Z. Shi, Z. Cai, A. Sanchez, T. Zhang, S. Wen, J. Wang, J. Yang, S. Fu, D. Zhang, A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 4517–4524. doi:10.1074/jbc.M110.159590.
- [42] A. Banerjee, S. Gerondakis, Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system, *Immunol. Cell Biol.* 85 (2007) 420–424. doi:10.1038/sj.icb.7100098.
- [43] T. Kawai, S. Akira, SnapShot: Pattern-recognition receptors, *Cell*. 129 (2007) 1024. doi:10.1016/j.cell.2007.05.017.
- [44] F. Heil, P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, S. Bauer, The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2987–2997. doi:10.1002/eji.200324238.
- [45] F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer, Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8, *Science*. 303 (2004) 1526–1529. doi:10.1126/science.1093620.
- [46] M. Jurk, F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A.M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford, S. Bauer, Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 499. doi:10.1038/ni0602-499.
- [47] T. Shibata, U. Ohto, S. Nomura, K. Kibata, Y. Motoi, Y. Zhang, Y. Murakami, R. Fukui, T. Ishimoto, S. Sano, T. Ito, T. Shimizu, K. Miyake, Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7, *Int. Immunol.* 28 (2016) 211–222. doi:10.1093/intimm/dxv062.
- [48] H. Hemmi, T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, S. Akira, Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 196–200. doi:10.1038/ni758.
- [49] A.D. Edwards, S.S. Diebold, E.M.C. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, C. Reis e Sousa, Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 827–833. doi:10.1002/eji.200323797.
- [50] T.A. Barr, S. Brown, G. Ryan, J. Zhao, D. Gray, TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 3040–3053. doi:10.1002/eji.200636483.
- [51] J. Lee, C.C.N. Wu, K.J. Lee, T.-H. Chuang, K. Katakura, Y.-T. Liu, M. Chan, R. Tawatao, M. Chung, C. Shen, H.B. Cottam, M.M.C. Lai, E. Raz, D.A. Carson, Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1828–1833. doi:10.1073/pnas.0510801103.

- [52] L. Tengroth, C.R. Millrud, A.M. Kvarnhammar, S. Kumlien Georén, L. Latif, L.-O. Cardell, Functional effects of Toll-like receptor (TLR)3, 7, 9, RIG-I and MDA-5 stimulation in nasal epithelial cells, *PloS One*. 9 (2014) e98239. doi:10.1371/journal.pone.0098239.
- [53] T.M. Schaefer, K. Desouza, J.V. Fahey, K.W. Beagley, C.R. Wira, Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells, *Immunology*. 112 (2004) 428–436. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01898.x.
- [54] Z.J. Li, K.-C. Sohn, D.-K. Choi, G. Shi, D. Hong, H.-E. Lee, K.U. Whang, Y.H. Lee, M. Im, Y. Lee, Y.-J. Seo, C.D. Kim, J.-H. Lee, Roles of TLR7 in activation of NF- κ B signaling of keratinocytes by imiquimod, *PloS One*. 8 (2013) e77159. doi:10.1371/journal.pone.0077159.
- [55] K. Crozat, E. Vivier, M. Dalod, Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies, *Immunol. Rev.* 227 (2009) 129–149. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00736.x.
- [56] R.T. Lester, X.-D. Yao, T.B. Ball, L.R. McKinnon, R. Kaul, C. Wachih, W. Jaoko, F.A. Plummer, K.L. Rosenthal, Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection, *AIDS Lond. Engl.* 22 (2008) 685–694. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f4de35.
- [57] M.F. Roelofs, L. a. B. Joosten, S. Abdollahi-Roodsaz, A.W.T. van Lieshout, T. Sprong, F.H. van den Hoogen, W.B. van den Berg, T.R.D.J. Radstake, The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells, *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 2313–2322. doi:10.1002/art.21278.
- [58] C. Yin, T. Zhang, L. Qiao, J. Du, S. Li, H. Zhao, F. Wang, Q. Huang, W. Meng, H. Zhu, H. Bu, H. Li, H. Xu, X. Mo, TLR7-expressing cells comprise an interfollicular epidermal stem cell population in murine epidermis, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5831. doi:10.1038/srep05831.
- [59] M. Miettinen, T. Sareneva, I. Julkunen, S. Matikainen, IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections, *Genes Immun.* 2 (2001) 349–355. doi:10.1038/sj.gene.6363791.
- [60] I. Sheyhidin, G. Nabi, A. Hasim, R.-P. Zhang, J. Ainiwaer, H. Ma, H. Wang, Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma, *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 3745–3751. doi:10.3748/wjg.v17.i32.3745.
- [61] A. Komatsuda, H. Wakui, K. Iwamoto, M. Ozawa, M. Togashi, R. Masai, N. Maki, T. Hatakeyama, K. Sawada, Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 152 (2008) 482–487. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03646.x.
- [62] C. Petes, N. Odoardi, K. Gee, The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1075. doi:10.3389/fimmu.2017.01075.
- [63] H. Tanji, U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake, T. Shimizu, Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands, *Science*. 339 (2013) 1426–1429. doi:10.1126/science.1229159.

- [64] H. Tanji, U. Ohto, T. Shibata, M. Taoka, Y. Yamauchi, T. Isobe, K. Miyake, T. Shimizu, Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 109–115. doi:10.1038/nsmb.2943.
- [65] H. Tanji, U. Ohto, Y. Motoi, T. Shibata, K. Miyake, T. Shimizu, Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 3012–3017. doi:10.1073/pnas.1516000113.
- [66] Z. Zhang, U. Ohto, T. Shibata, E. Krayukhina, M. Taoka, Y. Yamauchi, H. Tanji, T. Isobe, S. Uchiyama, K. Miyake, T. Shimizu, Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA, *Immunity.* 45 (2016) 737–748. doi:10.1016/j.immuni.2016.09.011.
- [67] K. Megyeri, W.C. Au, I. Rosztoczy, N.B. Raj, R.L. Miller, M.A. Tomai, P.M. Pitha, Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 2207–2218.
- [68] G.A. Bishop, Y. Hsing, B.S. Hostager, S.V. Jalukar, L.M. Ramirez, M.A. Tomai, Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 165 (2000) 5552–5557.
- [69] S. Akira, K. Takeda, Toll-like receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 499–511. doi:10.1038/nri1391.
- [70] A.P. West, A.A. Koblansky, S. Ghosh, Recognition and signaling by toll-like receptors, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22 (2006) 409–437. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.115827.
- [71] A. Adhikari, M. Xu, Z.J. Chen, Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK, *Oncogene.* 26 (2007) 3214–3226. doi:10.1038/sj.onc.1210413.
- [72] C. Wang, L. Deng, M. Hong, G.R. Akkaraju, J. Inoue, Z.J. Chen, TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK, *Nature.* 412 (2001) 346–351. doi:10.1038/35085597.
- [73] T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways, *Front. Immunol.* 5 (2014) 461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- [74] T. Ito, R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, S. Fukuhara, Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 1507–1512.
- [75] T. Kawai, S. Sato, K.J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, S. Akira, Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1061–1068. doi:10.1038/ni1118.
- [76] K. Honda, T. Taniguchi, IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 644–658. doi:10.1038/nri1900.
- [77] S. Uematsu, S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotsu, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K.J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, S. Akira, Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an

essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 915–923. doi:10.1084/jem.20042372.

[78] K. Hoshino, T. Sugiyama, M. Matsumoto, T. Tanaka, M. Saito, H. Hemmi, O. Ohara, S. Akira, T. Kaisho, IkappaB kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9, *Nature*. 440 (2006) 949–953. doi:10.1038/nature04641.

[79] A. Takaoka, H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S.-I. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T.W. Mak, T. Taniguchi, Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors, *Nature*. 434 (2005) 243–249. doi:10.1038/nature03308.

[80] A. Schoenemeyer, B.J. Barnes, M.E. Mancl, E. Latz, N. Goutagny, P.M. Pitha, K.A. Fitzgerald, D.T. Golenbock, The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17005–17012. doi:10.1074/jbc.M412584200.

[81] G. Mancuso, M. Gambuzza, A. Midiri, C. Biondo, S. Papasergi, S. Akira, G. Teti, C. Beninati, Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 587–594. doi:10.1038/ni.1733.

[82] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*. 392 (1998) 245–252. doi:10.1038/32588.

[83] M. Schnare, G.M. Barton, A.C. Holt, K. Takeda, S. Akira, R. Medzhitov, Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 947–950. doi:10.1038/ni712.

[84] D. Palliser, H. Ploegh, M. Boes, Myeloid differentiation factor 88 is required for cross-priming in vivo, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 172 (2004) 3415–3421.

[85] S.L. Constant, K. Bottomly, Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 297–322. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.297.

[86] E.M. Janssen, E.E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M.G. von Herrath, S.P. Schoenberger, CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes, *Nature*. 421 (2003) 852–856. doi:10.1038/nature01441.

[87] R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001) 135–145. doi:10.1038/35100529.

[88] G. Trinchieri, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 133–146. doi:10.1038/nri1001.

[89] T. Kaisho, K. Hoshino, T. Iwabe, O. Takeuchi, T. Yasui, S. Akira, Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation, *Int. Immunol.* 14 (2002) 695–700.

[90] V. Redecke, H. Häcker, S.K. Datta, A. Fermin, P.M. Pitha, D.H. Broide, E. Raz, Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 172 (2004) 2739–2743.

- [91] B. Pulendran, P. Kumar, C.W. Cutler, M. Mohamadzadeh, T. Van Dyke, J. Banchereau, Lipopolysaccharides from Distinct Pathogens Induce Different Classes of Immune Responses In Vivo, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 167 (2001) 5067–5076.
- [92] D.F. Tough, S. Sun, X. Zhang, J. Sprent, Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines, *Immunol. Rev.* 170 (1999) 39–47.
- [93] T. Sareneva, S. Matikainen, M. Kurimoto, I. Julkunen, Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 160 (1998) 6032–6038.
- [94] A. Le Bon, G. Schiavoni, G. D'Agostino, I. Gresser, F. Belardelli, D.F. Tough, Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo, *Immunity.* 14 (2001) 461–470.
- [95] K. Hoshino, T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi, S. Akira, Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation, *Int. Immunol.* 14 (2002) 1225–1231.
- [96] K. Honda, S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, T. Taniguchi, Selective contribution of IFN- α/β signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 10872–10877. doi:10.1073/pnas.1934678100.
- [97] C.J. Harrison, L. Janski, T. Voychekovski, D.I. Bernstein, Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection, *Antiviral Res.* 10 (1988) 209–223.
- [98] K. Megyeri, W.C. Au, I. Rosztoczy, N.B. Raj, R.L. Miller, M.A. Tomai, P.M. Pitha, Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 2207–2218.
- [99] U.R. Hengge, M. Cusini, Topical immunomodulators for the treatment of external genital warts, cutaneous warts and molluscum contagiosum, *Br. J. Dermatol.* 149 Suppl 66 (2003) 15–19.
- [100] R.L. Miller, J.F. Gerster, M.L. Owens, H.B. Slade, M.A. Tomai, Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug, *Int. J. Immunopharmacol.* 21 (1999) 1–14.
- [101] S. Tying, Imiquimod applied topically: A novel immune response modifier, *Skin Ther. Lett.* 6 (2001) 1–4.
- [102] E. Hanna, R. Abadi, O. Abbas, Imiquimod in dermatology: an overview, *Int. J. Dermatol.* 55 (2016) 831–844. doi:10.1111/ijd.13235.
- [103] M. Urosevic, R. Dummer, C. Conrad, M. Beyeler, E. Laine, G. Burg, M. Gilliet, Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment, *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 1143–1153. doi:10.1093/jnci/dji207.
- [104] H. Suzuki, B. Wang, G.M. Shivji, P. Toto, P. Amerio, M.A. Tomai, R.L. Miller, D.N. Sauder, Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 135–141. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00833.x.

- [105] M. Schön, M.P. Schön, The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 681–687.
- [106] L. Rogge, L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D.H. Presky, U. Gubler, F. Sinigaglia, Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 825–831.
- [107] A. Weber, C. Zimmermann, A.K. Mausberg, B.C. Kieseier, H.P. Hartung, H.H. Hofstetter, Induction of pro-inflammatory cytokine production in thymocytes by the immune response modifiers Imiquimod and Gardiquimod™, *Int. Immunopharmacol.* 17 (2013) 427–431. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.023.
- [108] K.R. Suchin, J.M. Junkins-Hopkins, A.H. Rook, Treatment of stage IA cutaneous T-Cell lymphoma with topical application of the immune response modifier imiquimod, *Arch. Dermatol.* 138 (2002) 1137–1139.
- [109] C.M. Fehres, S.C.M. Bruijns, A.J. van Beelen, H. Kalay, M. Ambrosini, E. Hooijberg, W.W.J. Unger, T.D. de Gruijl, Y. van Kooyk, Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8+ T-cell cross-priming, *Eur. J. Immunol.* 44 (2014) 2415–2424. doi:10.1002/eji.201344094.
- [110] D.I. Bernstein, C.J. Harrison, M.A. Tomai, R.L. Miller, Daily or weekly therapy with resiquimod (R-848) reduces genital recurrences in herpes simplex virus-infected guinea pigs during and after treatment, *J. Infect. Dis.* 183 (2001) 844–849. doi:10.1086/319262.
- [111] K.H. Fife, T.-C. Meng, D.G. Ferris, P. Liu, Effect of resiquimod 0.01% gel on lesion healing and viral shedding when applied to genital herpes lesions, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 477–482. doi:10.1128/AAC.01173-07.
- [112] J.J. Wu, D.B. Huang, S.K. Tyring, Resiquimod: a new immune response modifier with potential as a vaccine adjuvant for Th1 immune responses, *Antiviral Res.* 64 (2004) 79–83. doi:10.1016/j.antiviral.2004.07.002.
- [113] M.A. Tomai, S.J. Gibson, L.M. Imbertson, R.L. Miller, P.E. Myhre, M.J. Reiter, T.L. Wagner, C.B. Tamulinas, J.M. Beaurline, J.F. Gerster, Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463, *Antiviral Res.* 28 (1995) 253–264.
- [114] T.L. Testerman, J.F. Gerster, L.M. Imbertson, M.J. Reiter, R.L. Miller, S.J. Gibson, T.L. Wagner, M.A. Tomai, Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609, *J. Leukoc. Biol.* 58 (1995) 365–372.
- [115] C.L. Ahonen, S.J. Gibson, R.M. Smith, L.K. Pederson, J.M. Lindh, M.A. Tomai, J.P. Vasilakos, Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848, *Cell. Immunol.* 197 (1999) 62–72. doi:10.1006/cimm.1999.1555.
- [116] T.L. Wagner, C.L. Ahonen, A.M. Couture, S.J. Gibson, R.L. Miller, R.M. Smith, M.J. Reiter, J.P. Vasilakos, M.A. Tomai, Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune

- response modifiers, R-848 and imiquimod, *Cell. Immunol.* 191 (1999) 10–19. doi:10.1006/cimm.1998.1406.
- [117] T. Meyer, C. Surber, L.E. French, E. Stockfleth, Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer, *Expert Opin. Investig. Drugs.* 22 (2013) 149–159. doi:10.1517/13543784.2013.749236.
- [118] M. Schön, A.B. Bong, C. Drewniok, J. Herz, C.C. Geilen, J. Reifenberger, B. Benninghoff, H.B. Slade, H. Gollnick, M.P. Schön, Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 1138–1149.
- [119] G. Stry, C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp, G. Stingl, Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1441–1451. doi:10.1084/jem.20070021.
- [120] M.L. Kalb, A. Glaser, G. Stry, F. Kozsik, G. Stingl, TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN- α -mediated antitumor reactivity, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 188 (2012) 1583–1591. doi:10.4049/jimmunol.1102437.
- [121] A.H. Rook, J.M. Gelfand, J.C. Gelfand, M. Wysocka, A.B. Troxel, B. Benoit, C. Surber, R. Elenitsas, M.A. Buchanan, D.S. Leahy, R. Watanabe, I.R. Kirsch, E.J. Kim, R.A. Clark, Topical resiquimod can induce disease regression and enhance T-cell effector functions in cutaneous T-cell lymphoma, *Blood.* 126 (2015) 1452–1461. doi:10.1182/blood-2015-02-630335.
- [122] M.A. Tomai, J.P. Vasilakos, TLR-7 and -8 agonists as vaccine adjuvants, *Expert Rev. Vaccines.* 10 (2011) 405–407. doi:10.1586/erv.11.26.
- [123] R.L. Sabado, A. Pavlick, S. Gnjatic, C.M. Cruz, I. Vengco, F. Hasan, M. Spadaccia, F. Darvishian, L. Chiriboga, R.M. Holman, J. Escalon, C. Muren, C. Escano, E. Yepes, D. Sharpe, J.P. Vasilakos, L. Rolnitzky, J. Goldberg, J. Mandeli, S. Adams, A. Jungbluth, L. Pan, R. Venhaus, P.A. Ott, N. Bhardwaj, Resiquimod as an immunologic adjuvant for NY-ESO-1 protein vaccination in patients with high-risk melanoma, *Cancer Immunol. Res.* 3 (2015) 278–287. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0202.
- [124] J. Lee, T.-H. Chuang, V. Redecke, L. She, P.M. Pitha, D.A. Carson, E. Raz, H.B. Cottam, Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6646–6651. doi:10.1073/pnas.0631696100.
- [125] S.S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA, *Science.* 303 (2004) 1529–1531. doi:10.1126/science.1093616.
- [126] V. Hornung, M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres, G. Hartmann, Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7, *Nat. Med.* 11 (2005) 263–270. doi:10.1038/nm1191.

- [127] A.D. Judge, V. Sood, J.R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 457–462. doi:10.1038/nbt1081.
- [128] S.S. Diebold, C. Massacrier, S. Akira, C. Paturel, Y. Morel, C. Reis e Sousa, Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 3256–3267. doi:10.1002/eji.200636617.
- [129] A. Forsbach, J.-G. Nemorin, C. Montino, C. Müller, U. Samulowitz, A.P. Vicari, M. Jurk, G.K. Mutwiri, A.M. Krieg, G.B. Lipford, J. Vollmer, Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 180 (2008) 3729–3738.
- [130] T. Lan, E.R. Kandimalla, D. Yu, L. Bhagat, Y. Li, D. Wang, F. Zhu, J.X. Tang, M.R. Putta, Y. Cong, A.F. Trombino, T. Sullivan, S. Agrawal, Stabilized immune modulatory RNA compounds as agonists of Toll-like receptors 7 and 8, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13750–13755. doi:10.1073/pnas.0706059104.
- [131] T. Lan, M. Dai, D. Wang, F.-G. Zhu, E.R. Kandimalla, S. Agrawal, Toll-like receptor 7 selective synthetic oligoribonucleotide agonists: synthesis and structure-activity relationship studies, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 6871–6879. doi:10.1021/jm901145s.
- [132] M. Fabbri, A. Paone, F. Calore, R. Galli, E. Gaudio, R. Santhanam, F. Lovat, P. Fadda, C. Mao, G.J. Nuovo, N. Zanesi, M. Crawford, G.H. Ozer, D. Wernicke, H. Alder, M.A. Caligiuri, P. Nana-Sinkam, D. Perrotti, C.M. Croce, MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E2110-2116. doi:10.1073/pnas.1209414109.
- [133] J.F. Gerster, K.J. Lindstrom, R.L. Miller, M.A. Tomai, W. Birmachu, S.N. Bomersine, S.J. Gibson, L.M. Imbertson, J.R. Jacobson, R.T. Knafla, P.V. Maye, N. Nikolaidis, F.Y. Oneyemi, G.J. Parkhurst, S.E. Pecore, M.J. Reiter, L.S. Scribner, T.L. Testerman, N.J. Thompson, T.L. Wagner, C.E. Weeks, J.-D. Andre, D. Lagain, Y. Bastard, M. Lupu, Synthesis and structure-activity-relationships of 1H-imidazo[4,5-c]quinolines that induce interferon production, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 3481–3491. doi:10.1021/jm049211v.
- [134] K.B. Gordon, K.S. Gorski, S.J. Gibson, R.M. Kedl, W.C. Kieper, X. Qiu, M.A. Tomai, S.S. Alkan, J.P. Vasilakos, Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 174 (2005) 1259–1268.
- [135] D.I. Bernstein, C.J. Harrison, E.R. Tepe, A. Shahwan, R.L. Miller, Effect of imiquimod as an adjuvant for immunotherapy of genital HSV in guinea-pigs, *Vaccine.* 13 (1995) 72–76.
- [136] T. Ito, R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, S. Fukuhara, Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 1507–1512.

- [137] J.D. Hood, H.J. Warshakoon, M.R. Kimbrell, N.M. Shukla, S.S. Malladi, X. Wang, S.A. David, Immunoprofiling toll-like receptor ligands: Comparison of immunostimulatory and proinflammatory profiles in ex vivo human blood models, *Hum. Vaccin.* 6 (2010) 322–335.
- [138] H.J. Warshakoon, J.D. Hood, M.R. Kimbrell, S. Malladi, W.Y. Wu, N.M. Shukla, G. Agnihotri, D. Sil, S.A. David, Potential adjuvant properties of innate immune stimuli, *Hum. Vaccin.* 5 (2009) 381–394.
- [139] W.-W. Zhang, G. Matlashewski, Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice, *Infect. Immun.* 76 (2008) 3777–3783. doi:10.1128/IAI.01527-07.
- [140] S.L. Baldwin, S. Bertholet, M. Kahn, I. Zharkikh, G.C. Ireton, T.S. Vedvick, S.G. Reed, R.N. Coler, Intradermal immunization improves protective efficacy of a novel TB vaccine candidate, *Vaccine.* 27 (2009) 3063–3071. doi:10.1016/j.vaccine.2009.03.018.
- [141] N.M. Shukla, S.S. Malladi, C.A. Mutz, R. Balakrishna, S.A. David, Structure-activity relationships in human toll-like receptor 7-active imidazoquinoline analogues, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 4450–4465. doi:10.1021/jm100358c.
- [142] C. Shi, Z. Xiong, P. Chittepu, C.C. Aldrich, J.R. Ohlfest, D.M. Ferguson, Discovery of Imidazoquinolines with Toll-Like Receptor 7/8 Independent Cytokine Induction, *ACS Med. Chem. Lett.* 3 (2012) 501–504. doi:10.1021/ml300079e.
- [143] C.E. Schiaffo, C. Shi, Z. Xiong, M. Olin, J.R. Ohlfest, C.C. Aldrich, D.M. Ferguson, Structure-activity relationship analysis of imidazoquinolines with Toll-like receptors 7 and 8 selectivity and enhanced cytokine induction, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 339–347. doi:10.1021/jm4004957.
- [144] P. Larson, T.A. Kucaba, Z. Xiong, M. Olin, T.S. Griffith, D.M. Ferguson, Design and Synthesis of N1-Modified Imidazoquinoline Agonists for Selective Activation of Toll-like Receptors 7 and 8, *ACS Med. Chem. Lett.* 8 (2017) 1148–1152. doi:10.1021/acsmchemlett.7b00256.
- [145] K. Hirota, K. Kazaoka, I. Niimoto, H. Kumihara, H. Sajiki, Y. Isobe, H. Takaku, M. Tobe, H. Ogita, T. Ogino, S. Ichii, A. Kurimoto, H. Kawakami, Discovery of 8-hydroxyadenines as a novel type of interferon inducer, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 5419–5422.
- [146] A. Kurimoto, T. Ogino, S. Ichii, Y. Isobe, M. Tobe, H. Ogita, H. Takaku, H. Sajiki, K. Hirota, H. Kawakami, Synthesis and evaluation of 2-substituted 8-hydroxyadenines as potent interferon inducers with improved oral bioavailabilities, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 1091–1099. doi:10.1016/j.bmc.2003.12.008.
- [147] J. Lee, C.C.N. Wu, K.J. Lee, T.-H. Chuang, K. Katakura, Y.-T. Liu, M. Chan, R. Tawatao, M. Chung, C. Shen, H.B. Cottam, M.M.C. Lai, E. Raz, D.A. Carson, Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1828–1833. doi:10.1073/pnas.0510801103.

- [148] J. Zhu, S. He, J. Du, Z. Wang, W. Li, X. Chen, W. Jiang, D. Zheng, G. Jin, Local administration of a novel Toll-like receptor 7 agonist in combination with doxorubicin induces durable tumouricidal effects in a murine model of T cell lymphoma, *J. Hematol. Oncol.* 8 (2015) 21. doi:10.1186/s13045-015-0121-9.
- [149] T. Chen, Y. Hu, B. Liu, X. Huang, N. Gao, Z. Jin, T. Jia, D. Guo, G. Jin, Synthetic toll-like receptor 7 agonist as a conjugated adjuvant enhances the Th 1 type immunogenicity of influenza virus vaccine, *Int J Clin Exp Pathol.* 9 (2016) 4790-4795.
- [150] E. Yoo, B.M. Crall, R. Balakrishna, S.S. Malladi, L.M. Fox, A.R. Hermanson, S.A. David, Structure-activity relationships in Toll-like receptor 7 agonistic 1H-imidazo[4,5-c]pyridines, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 6526–6545. doi:10.1039/c3ob40816g.
- [151] H.P. Kokatla, E. Yoo, D.B. Salunke, D. Sil, C.F. Ng, R. Balakrishna, S.S. Malladi, L.M. Fox, S.A. David, Toll-like receptor-8 agonistic activities in C2, C4, and C8 modified thiazolo[4,5-c]quinolines, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 1179–1198. doi:10.1039/c2ob26705e.
- [152] H.P. Kokatla, D. Sil, S.S. Malladi, R. Balakrishna, A.R. Hermanson, L.M. Fox, X. Wang, A. Dixit, S.A. David, Exquisite selectivity for human toll-like receptor 8 in substituted furo[2,3-c]quinolines, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 6871–6885. doi:10.1021/jm400694d.
- [153] H.P. Kokatla, D. Sil, H. Tanji, U. Ohto, S.S. Malladi, L.M. Fox, T. Shimizu, S.A. David, Structure-based design of novel human Toll-like receptor 8 agonists, *ChemMedChem.* 9 (2014) 719–723. doi:10.1002/cmdc.201300573.
- [154] E. Yoo, D.B. Salunke, D. Sil, X. Guo, A.C.D. Salyer, A.R. Hermanson, M. Kumar, S.S. Malladi, R. Balakrishna, W.H. Thompson, H. Tanji, U. Ohto, T. Shimizu, S.A. David, Determinants of activity at human Toll-like receptors 7 and 8: quantitative structure-activity relationship (QSAR) of diverse heterocyclic scaffolds, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 7955–7970. doi:10.1021/jm500744f.
- [155] M. Beesu, S.S. Malladi, L.M. Fox, C.D. Jones, A. Dixit, S.A. David, Human Toll-like receptor 8-selective agonistic activities in 1-alkyl-1H-benzimidazol-2-amines, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 7325–7341. doi:10.1021/jm500701q.
- [156] M. Beesu, G. Caruso, A.C.D. Salyer, K.K. Khetani, D. Sil, M. Weerasinghe, H. Tanji, U. Ohto, T. Shimizu, S.A. David, Structure-Based Design of Human TLR8-Specific Agonists with Augmented Potency and Adjuvanticity, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 7833–7849. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01087.
- [157] M. Beesu, A.C.D. Salyer, K.L. Trautman, J.K. Hill, S.A. David, Human Toll-like Receptor (TLR) 8-Specific Agonistic Activity in Substituted Pyrimidine-2,4-diamines, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8082–8093. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00872.
- [158] M. Beesu, A.C.D. Salyer, M.J.H. Brush, K.L. Trautman, J.K. Hill, S.A. David, Identification of High-Potency Human TLR8 and Dual TLR7/TLR8 Agonists in Pyrimidine-2,4-diamines, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 2084–2098. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01860.

- [159] N. Van Hoeven, C.B. Fox, B. Granger, T. Evers, S.W. Joshi, G.I. Nana, S.C. Evans, S. Lin, H. Liang, L. Liang, R. Nakajima, P.L. Felgner, R.A. Bowen, N. Marlenee, A. Hartwig, S.L. Baldwin, R.N. Coler, M. Tomai, J. Elvecrog, S.G. Reed, D. Carter, A Formulated TLR7/8 Agonist is a Flexible, Highly Potent and Effective Adjuvant for Pandemic Influenza Vaccines, *Sci. Rep.* 7 (2017) 46426. doi:10.1038/srep46426.
- [160] D.J. Dowling, E.A. Scott, A. Scheid, I. Bergelson, S. Joshi, C. Pietrasanta, S. Brightman, G. Sanchez-Schmitz, S.D. Van Haren, J. Ninković, D. Kats, C. Guiducci, A. de Titta, D.K. Bonner, S. Hirose, M.A. Swartz, J.A. Hubbell, O. Levy, Toll-like receptor 8 agonist nanoparticles mimic immunomodulating effects of the live BCG vaccine and enhance neonatal innate and adaptive immune responses, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (2017) 1339–1350. doi:10.1016/j.jaci.2016.12.985.
- [161] E.J. Hennessy, A.E. Parker, L.A.J. O’Neill, Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 293–307. doi:10.1038/nrd3203.
- [162] C.-Y. Lai, Y.-W. Su, K.-I. Lin, L.-C. Hsu, T.-H. Chuang, Natural Modulators of Endosomal Toll-Like Receptor-Mediated Psoriatic Skin Inflammation, *J. Immunol. Res.* 2017 (2017) 7807313. doi:10.1155/2017/7807313.
- [163] A. Marshak-Rothstein, Toll-like receptors in systemic autoimmune disease, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 823–835. doi:10.1038/nri1957.
- [164] D. Finke, M.-L. Eloranta, L. Rönnblom, Endogenous type I interferon inducers in autoimmune diseases, *Autoimmunity.* 42 (2009) 349–352.
- [165] G.C. Tsokos, Systemic lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 2110–2121. doi:10.1056/NEJMra1100359.
- [166] S.R. Christensen, J. Shupe, K. Nickerson, M. Kashgarian, R.A. Flavell, M.J. Shlomchik, Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus, *Immunity.* 25 (2006) 417–428. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.013.
- [167] A. Forsbach, J.-G. Nemorin, K. Völp, U. Samulowitz, C. Montino, C. Müller, S. Tluk, S. Hamm, S. Bauer, G.B. Lipford, J. Vollmer, Characterization of conserved viral leader RNA sequences that stimulate innate immunity through TLRs, *Oligonucleotides.* 17 (2007) 405–417. doi:10.1089/oli.2007.0098.
- [168] M. Jurk, A. Kritzler, B. Schulte, S. Tluk, C. Schetter, A.M. Krieg, J. Vollmer, Modulating responsiveness of human TLR7 and 8 to small molecule ligands with T-rich phosphorothiate oligodeoxynucleotides, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 1815–1826. doi:10.1002/eji.200535806.
- [169] V. Vielhauer, T.N. Mayadas, Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation, *Semin. Nephrol.* 27 (2007) 286–308. doi:10.1016/j.semnephrol.2007.02.004.
- [170] M. De Bandt, Lessons for lupus from tumour necrosis factor blockade, *Lupus.* 15 (2006) 762–767. doi:10.1177/0961203306071703.

- [171] J. Vollmer, S. Tluk, C. Schmitz, S. Hamm, M. Jurk, A. Forsbach, S. Akira, K.M. Kelly, W.H. Reeves, S. Bauer, A.M. Krieg, Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1575–1585. doi:10.1084/jem.20051696.
- [172] J.-E. Gottenberg, N. Cagnard, C. Lucchesi, F. Letourneur, S. Mistou, T. Lazure, S. Jacques, N. Ba, M. Ittah, C. Lepajolec, M. Labetoulle, M. Ardizzone, J. Sibilia, C. Fournier, G. Chiocchia, X. Mariette, Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 2770–2775. doi:10.1073/pnas.0510837103.
- [173] D. Ganguly, G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F.J. Barrat, T. Zal, M. Gilliet, Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1983–1994. doi:10.1084/jem.20090480.
- [174] J. Cherfils-Vicini, S. Platonova, M. Gillard, L. Laurans, P. Validire, R. Caliandro, P. Magdeleinat, F. Mami-Chouaib, M.-C. Dieu-Nosjean, W.-H. Fridman, D. Damotte, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1285–1297. doi:10.1172/JCI36551.
- [175] S. Chatterjee, L. Crozet, D. Damotte, K. Iribarren, C. Schramm, M. Alifano, A. Lupo, J. Cherfils-Vicini, J. Goc, S. Katsahian, M. Younes, M.C. Dieu-Nosjean, W.H. Fridman, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* 74 (2014) 5008–5018. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2698.
- [176] A. Ochi, C.S. Graffeo, C.P. Zambirinis, A. Rehman, M. Hackman, N. Fallon, R.M. Barilla, J.R. Henning, M. Jamal, R. Rao, S. Greco, M. Deutsch, M.V. Medina-Zea, U. Bin Saeed, M.O. Ego-Osuala, C. Hajdu, G. Miller, Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 4118–4129. doi:10.1172/JCI63606.
- [177] J. Vaz, R. Andersson, Intervention on toll-like receptors in pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 5808–5817. doi:10.3748/wjg.v20.i19.5808.
- [178] F.E. Mohamed, R.M. Al-Jehani, S.S. Minogue, F. Andreola, A. Winstanley, S.W.M. Olde Damink, A. Habtesion, M. Malagó, N. Davies, T.V. Luong, A.P. Dhillon, R.P. Mookerjee, D.K. Dhar, R. Jalan, Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 35 (2015) 1063–1076. doi:10.1111/liv.12626.
- [179] S. Baenziger, M. Heikenwalder, P. Johansen, E. Schlaepfer, U. Hofer, R.C. Miller, S. Diemand, K. Honda, T.M. Kundig, A. Aguzzi, R.F. Speck, Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology, *Blood.* 113 (2009) 377–388. doi:10.1182/blood-2008-04-151712.

- [180] M.M. Lederman, A surprising role for TLR7, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 8–9. doi:10.1038/ni.3051.
- [181] A.D. Judge, G. Bola, A.C.H. Lee, I. MacLachlan, Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 13 (2006) 494–505. doi:10.1016/j.ymthe.2005.11.002.
- [182] K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman, Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA, *Immunity.* 23 (2005) 165–175. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- [183] M. Robbins, A. Judge, L. Liang, K. McClintock, E. Yaworski, I. MacLachlan, 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15 (2007) 1663–1669. doi:10.1038/sj.mt.6300240.
- [184] H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature.* 408 (2000) 740–745. doi:10.1038/35047123.
- [185] D. Yu, D. Wang, F.-G. Zhu, L. Bhagat, M. Dai, E.R. Kandimalla, S. Agrawal, Modifications incorporated in CpG motifs of oligodeoxynucleotides lead to antagonist activity of toll-like receptors 7 and 9, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5108–5114. doi:10.1021/jm900730r.
- [186] E.R. Kandimalla, L. Bhagat, D. Wang, D. Yu, T. Sullivan, N. La Monica, S. Agrawal, Design, synthesis and biological evaluation of novel antagonist compounds of Toll-like receptors 7, 8 and 9, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 3947–3961. doi:10.1093/nar/gkt078.
- [187] F.-G. Zhu, W. Jiang, L. Bhagat, D. Wang, D. Yu, J.X. Tang, E.R. Kandimalla, N. La Monica, S. Agrawal, A novel antagonist of Toll-like receptors 7, 8 and 9 suppresses lupus disease-associated parameters in NZBW/F1 mice, *Autoimmunity.* 46 (2013) 419–428. doi:10.3109/08916934.2013.798651.
- [188] F.C.F. Schmitt, I. Freund, M.A. Weigand, M. Helm, A.H. Dalpke, T. Eigenbrod, Identification of an optimized 2'-O-methylated trinucleotide RNA motif inhibiting Toll-like receptors 7 and 8, *RNA N. Y. N.* 23 (2017) 1344–1351. doi:10.1261/rna.061952.117.
- [189] D.M.W. Balak, M.B.A. van Doorn, R.D. Arbeit, R. Rijneveld, E. Klaassen, T. Sullivan, J. Brevard, H.B. Thio, E.P. Prens, J. Burggraaf, R. Rissmann, IMO-8400, a toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist, demonstrates clinical activity in a phase 2a, randomized, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis, *Clin. Immunol. Orlando Fla.* 174 (2017) 63–72. doi:10.1016/j.clim.2016.09.015.
- [190] F.J. Barrat, T. Meeker, J.H. Chan, C. Guiducci, R.L. Coffman, Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 3582–3586. doi:10.1002/eji.200737815.

- [191] R.D. Pawar, A. Ramanjaneyulu, O.P. Kulkarni, M. Lech, S. Segerer, H.-J. Anders, Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 18 (2007) 1721–1731. doi:10.1681/ASN.2006101162.
- [192] N.M. Shukla, M.R. Kimbrell, S.S. Malladi, S.A. David, Regioisomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquinoline, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2211–2214. doi:10.1016/j.bmcl.2009.02.100.
- [193] N.M. Shukla, S.S. Malladi, V. Day, S.A. David, Preliminary evaluation of a 3H imidazoquinoline library as dual TLR7/TLR8 antagonists, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 3801–3811. doi:10.1016/j.bmc.2011.04.052.
- [194] N.M. Shukla, C.A. Mutz, S.S. Malladi, H.J. Warshakoon, R. Balakrishna, S.A. David, Toll-like receptor (TLR)-7 and -8 modulatory activities of dimeric imidazoquinolines, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 1106–1116. doi:10.1021/jm2010207.
- [195] S. Zhang, Z. Hu, H. Tanji, S. Jiang, N. Das, J. Li, K. Sakaniwa, J. Jin, Y. Bian, U. Ohto, T. Shimizu, H. Yin, Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state, *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 58–64. doi:10.1038/nchembio.2518.
- [196] O. Vitse, F. Laurent, T.M. Pocock, V. Bénézech, L. Zanik, K.R. Elliott, G. Subra, K. Portet, J. Bompard, J.P. Chapat, R.C. Small, A. Michel, P.A. Bonnet, New imidazo(1,2-a)pyrazine derivatives with bronchodilatory and cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory activities, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (1999) 1059–1065.
- [197] S. Parra, F. Laurent, G. Subra, C. Deleuze-Masquefa, V. Bénézech, J. Fabreguettes, J. Vidal, T. Pocock, K. Elliott, R. Small, R. Escalé, A. Michel, J. Chapat, P. Bonnet, Imidazo[1,2-a]quinoxalines: synthesis and cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory activity, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 255–264.
- [198] C. Deleuze-Masquefa, G. Gerebtzoff, G. Subra, J.-R. Fabreguettes, A. Ovens, M. Carraz, M.-P. Strub, J. Bompard, P. George, P.-A. Bonnet, Design and synthesis of novel imidazo[1,2-a]quinoxalines as PDE4 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 1129–1139. doi:10.1016/j.bmc.2003.11.034.
- [199] G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, V. Bonnard, S. Gayraud-Paniagua, J.-R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 6601–6610. doi:10.1016/j.bmc.2008.05.022.
- [200] C. Deleuze-Masquefa, G. Moarbess, S. Khier, N. David, S. Gayraud-Paniagua, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in vitro activity against human melanoma, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3406–3411. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.007.

- [201] I.R. Ager, A.C. Barnes, G.W. Danswan, P.W. Hairsine, D.P. Kay, P.D. Kennewell, S.S. Matharu, P. Miller, P. Robson, Synthesis and oral antiallergic activity of carboxylic acids derived from imidazo[2,1-c][1,4]benzoxazines, imidazo[1,2-a]quinolines, imidazo[1,2-a]quinoxalines, imidazo[1,2-a]quinoxalinones, pyrrolo[1,2-a]quinoxalinones, pyrrolo[2,3-a]quinoxalinones, and imidazo[2,1-b]benzothiazoles, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 1098–1115. doi:10.1021/jm00401a009.
- [202] V. A. Mamedov, A. A. Kalinin, E. A. Gorbunova, I. Bauer², W. D. Habicher, Fused Polycyclic Nitrogen-Containing Heterocycles: IX.* Oxidative Fusion of Imidazole Ring to 3-Benzoylquinoxalin-2-ones, *Russ. J. Org. Chem.* 40 (2004) 1041-1046.
- [203] V.A. Mamedov, A.A. Kalinin, A.T. Gubaidullin, I.A. Litvinov, Y.A. Levin, The Kornblum Reaction of α -Substituted 3-Benzyl-1,2-dihydro-2-oxoquinoxalines. Synthesis and Structure of 3-Benzoyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoxaline, *Chem. Heterocycl. Compd.* 38 (2002) 1504–1510. doi:10.1023/A:1022601829731.
- [204] V.A. Mamedov, I.A. Nuretdinov, F.G. Sibgatullina, Reaction of 3-phenyl-3-chloro-2-oxopropionic acid derivatives with ortho-phenylenediamine, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* 38 (1989) 1292–1294. doi:10.1007/BF00957177.
- [205] V.A. Mamedov, A.A. Kalinin, N.M. Azancheev, Y.A. Levin, Fused Nitrogen-Containing Heterocycles: III. 4-Oxo-1-phenyl-4,5-dihydroimidazo[1,5-a]quinoxalines. A Retrosynthetic Approach, *Russ. J. Org. Chem.* 39 (2003) 125–130. doi:10.1023/A:1023463117204.
- [206] SUBSTITUTED IMIDAZO[1,5-a]QUINOXALINES AS INHIBITORS OF PHOSPHODIESTERASE 10, 2010. <https://patents.google.com/patent/WO2010138833A1/sv> (accessed February 20, 2018).
- [207] Q. Wang, S. Zhang, F. Guo, B. Zhang, P. Hu, Z. Wang, Natural α -amino acids applied in the synthesis of imidazo[1,5-a]N-heterocycles under mild conditions, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 11161–11166. doi:10.1021/jo302299u.
- [208] K. Justyna, A. Chrostowska, S. Leśniak, C. Darrigan, P. Baylère, S. Khayar, C. Wentrup, New, simple and efficient method for the synthesis of imidazo-azines by flash vacuum thermolysis of tert-butylimines of pyrimidine-2-, pyrazine-2-, quinoline-2-, quinoxaline-2- and isoquinoline-1-carbaldehydes, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 125 (2017) 335–346.
- [209] F. Pierre, C.F. Regan, M.C. Chevreil, A. Siddiqui-Jain, D. Macalino, N. Streiner, D. Drygin, M. Haddach, S.E. O'Brien, W.G. Rice, D.M. Ryckman, Novel potent dual inhibitors of CK2 and Pim kinases with antiproliferative activity against cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3327–3331. doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.099.
- [210] F. De Moliner, C. Hulme, Straightforward Assembly of Phenylimidazoquinoxalines via a One-Pot Two-Step MCR Process, *Org. Lett.* 14 (2012) 1354–1357. doi:10.1021/ol3003282.
- [211] F. De Moliner, C. Hulme, A Van Leusen deprotection-cyclization strategy as a fast entry into two imidazoquinoxaline families, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 5787–5790. doi:10.1016/j.tetlet.2012.08.072.

- [212] J.H. Spatz, M. Umkehrer, C. Kalinski, G. Ross, C. Burdack, J. Kolb, T. Bach, Combinatorial synthesis of 4-oxo-4H-imidazo[1,5-a]quinoxalines and 4-oxo-4H-pyrazolo[1,5-a]quinoxalines, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 8060–8064.
- [213] A.K. Verma, R.R. Jha, V. Kasi Sankar, R.P. Singh, Selective synthesis of 4,5-dihydroimidazo- and imidazo[1,5-a]quinoxalines via modified Pictet–Spengler reaction, *Tetrahedron Lett.* 54 (2013) 5984–5990. doi:10.1016/j.tetlet.2013.08.052.
- [214] Z. Zhang, C. Xie, X. Tan, G. Song, L. Wen, H. Gao, C. Ma, I₂-catalyzed one-pot synthesis of pyrrolo[1,2-a]quinoxaline and imidazo[1,5-a]quinoxaline derivatives via sp³ and sp² C–H cross-dehydrogenative coupling, *Org. Chem. Front.* 2 (2015) 942–946. doi:10.1039/C5QO00124B.
- [215] C. Xie, Z. Zhang, D. Li, J. Gong, X. Han, X. Liu, C. Ma, Dimethyl Sulfoxide Involved One-Pot Synthesis of Quinoxaline Derivatives, *J. Org. Chem.* 82 (2017) 3491–3499. doi:10.1021/acs.joc.6b02977.
- [216] C.-H. Liu, B. Wang, W.-Z. Li, L.-H. Yun, Y. Liu, R.-B. Su, J. Li, H. Liu, Design, synthesis, and biological evaluation of novel 4-alkylamino-1-hydroxymethylimidazo[1,2-a]quinoxalines as adenosine A(1) receptor antagonists, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 4701–4707. doi:10.1016/j.bmc.2004.06.026.
- [217] M. Bakherad, A. Keivanloo, S. Samangoei, Synthesis of 1-aryl-substituted-4-chloroimidazo[1,2-a]quinoxalines catalyzed by PdCl₂ in water, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 1447–1449. doi:10.1016/j.tetlet.2012.01.028.
- [218] M. Krasavin, V. Parchinsky, Expedient Entry into 1,4-Dihydroquinoxalines and Quinoxalines via a Novel Variant of Isocyanide-Based MCR, *Synlett.* 2008 (2008) 645–648. doi:10.1055/s-2008-1032106.
- [219] M. Krasavin, S. Shkavrov, V. Parchinsky, K. Bukhryakov, Imidazo[1,2-a]quinoxalines Accessed via Two Sequential Isocyanide-Based Multicomponent Reactions, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 2627–2629. doi:10.1021/jo900050k.
- [220] J.F. Chen, Z.-Q. Liu, Synthesis of imidazo[1,2-a]quinoxalines by double Groebke reactions and inhibitory effects on radicals and DNA oxidation, *Tetrahedron.* 15 (2016) 1850–1859. doi:10.1016/j.tet.2016.02.042.
- [221] A.M. Simonov, I.G. Uryukina, A.F. Pozharskii, Imidazo[1,2-a]quinoxaline and its transformations. I, *Chem. Heterocycl. Compd.* 8 (1972) 380–382. doi:10.1007/BF00475308.
- [222] B. Li, O.M. Cociorva, T. Nomanbhoy, H. Weissig, Q. Li, K. Nakamura, M. Liyanage, M.C. Zhang, A.Y. Shih, A. Aban, Y. Hu, J. Cajica, L. Pham, J.W. Kozarich, K.R. Shreder, Hit-to-lead optimization and kinase selectivity of imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine derived JNK1 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 5217–5222. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.087.
- [223] A. Mishra, S. Batra, Expedient Synthesis of Imidazole- and Pyrrole-Fused Benzodiazocines, *Eur. J. Org. Chem.* 2010 (2010) 4832–4840. doi:10.1002/ejoc.201000355.

- [224] P. Chen, D. Norris, E.J. Iwanowicz, S.H. Spergel, J. Lin, H.H. Gu, Z. Shen, J. Wityak, T.-A. Lin, S. Pang, H.F. De Fex, S. Pitt, D.R. Shen, A.M. Doweiko, D.A. Bassolino, J.Y. Roberge, M.A. Poss, B.-C. Chen, G.L. Schieven, J.C. Barrish, Discovery and initial SAR of imidazoquinoxalines as inhibitors of the Src-family kinase p56Lck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 1361–1364. doi:10.1016/S0960-894X(02)00191-9.
- [225] J.T. Reeves, D.R. Fandrick, Z. Tan, J.J. Song, H. Lee, N.K. Yee, C.H. Senanayake, Copper-Catalyzed Annulation of 2-Formylazoles with o-Aminoiodoarenes, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 992–994. doi:10.1021/jo9025644.
- [226] S.G. Martínez, A.I. Hernández, C. Varela, S. Rodríguez-Arístegui, R.M. Alvarez, A.B. García, M. Lorenzo, V. Rivero, J. Oyarzabal, O. Rabal, J.R. Bischoff, M. Albarrán, A. Cebrián, P. Alfonso, W. Link, J. Fominaya, J. Pastor, Imidazo[1,2-a]pyrazines as novel PI3K inhibitors., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 1874–1878. doi:10.1016/j.bmcl.2012.01.074.
- [227] S. Martínez González, A.I. Hernández, C. Varela, M. Lorenzo, F. Ramos-Lima, E. Cendón, D. Cebrián, E. Aguirre, E. Gomez-Casero, M.I. Albarrán, P. Alfonso, B. García-Serelde, G. Mateos, J. Oyarzabal, O. Rabal, F. Mulero, T. Gonzalez-Granda, W. Link, J. Fominaya, M. Barbacid, J.R. Bischoff, P. Pizcueta, C. Blanco-Aparicio, J. Pastor, Rapid identification of ETP-46992, orally bioavailable PI3K inhibitor, selective versus mTOR, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 5208–5214. doi:10.1016/j.bmcl.2012.06.093.
- [228] S. Martínez González, A.I. Hernández, C. Varela, S. Rodríguez-Arístegui, M. Lorenzo, A. Rodríguez, V. Rivero, J.I. Martín, C.G. Saluste, F. Ramos-Lima, E. Cendón, D. Cebrián, E. Aguirre, E. Gomez-Casero, M. Albarrán, P. Alfonso, B. García-Serelde, J. Oyarzabal, O. Rabal, F. Mulero, T. Gonzalez-Granda, W. Link, J. Fominaya, M. Barbacid, J.R. Bischoff, P. Pizcueta, J. Pastor, Identification of ETP-46321, a potent and orally bioavailable PI3K α , δ inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3460–3466. doi:10.1016/j.bmcl.2012.03.090.
- [229] J. Pastor, S. Rodríguez-Arístegui, Ana Isabel Hernández, Carmen Varela, Antonio Salgado, Sonia Martínez - New use of bis(benzotriazolyl)-1,2-(dialkylamino)ethanes for the synthesis of 2-H-3-dialkylamino imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 1082–1084.
- [230] M.J.I. Andrews, J.A. Clase, G. Bar, G. Tricarico, P.J. Edwards, R. Brys, M. Chambers, W. Schmidt, A. MacLeod, K. Hirst, V. Allen, V. Birault, J. Le, J. Harris, A. Self, K. Nash, G. Dixon, Discovery of a series of imidazopyrazine small molecule inhibitors of the kinase MAPKAPK5, that show activity using in vitro and in vivo models of rheumatoid arthritis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 2266–2270. doi:10.1016/j.bmcl.2012.01.077.
- [231] N. Bouloc, J.M. Large, M. Kosmopoulou, C. Sun, A. Faisal, M. Matteucci, J. Reynisson, N. Brown, B. Atrash, J. Blagg, E. McDonald, S. Linardopoulos, R. Bayliss, V. Bavetsias, Structure-based design of imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives as selective inhibitors of Aurora-A kinase in cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5988–5993. doi:10.1016/j.bmcl.2010.08.091.

- [232] J.M. Bartolomé-Nebreda, F. Delgado, M.L. Martín-Martín, C.M. Martínez-Vituro, J. Pastor, H.M. Tong, L. Iturrino, G.J. Macdonald, W. Sanderson, A. Megens, X. Langlois, M. Somers, G. Vanhoof, S. Conde-Ceide, Discovery of a potent, selective, and orally active phosphodiesterase 10A inhibitor for the potential treatment of schizophrenia, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4196–4212. doi:10.1021/jm500073h.
- [233] X. Du, D.J. Gustin, X. Chen, J. Duquette, L.R. McGee, Z. Wang, K. Ebsworth, K. Henne, B. Lemon, J. Ma, S. Miao, E. Sabalan, T.J. Sullivan, G. Tonn, T.L. Collins, J.C. Medina, Imidazopyrazine derivatives as potent CXCR3 antagonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5200–5204. doi:10.1016/j.bmcl.2009.07.021.
- [234] Z. Meng, J.P. Ciavarri, A. McRiner, Y. Zhao, L. Zhao, P.A. Reddy, X. Zhang, T.O. Fischmann, C. Whitehurst, M. Arshad Siddiqui, Potency switch between CHK1 and MK2: discovery of imidazo[1,2-a]pyrazine- and imidazo[1,2-c]pyrimidine-based kinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 2863–2867. doi:10.1016/j.bmcl.2013.03.100.
- [235] S.K. Guchhait, C. Madaan, An Efficient, Regioselective, Versatile Synthesis of N-Fused 2- and 3-Aminoimidazoles via Ugi-Type Multicomponent Reaction Mediated by Zirconium(IV) Chloride in Polyethylene Glycol-400, *Synlett.* 2009 (2009) 628–632. doi:10.1055/s-0028-1087915.
- [236] S.K. Guchhait, C. Madaan, Towards molecular diversity: dealkylation of tert-butyl amine in Ugi-type multicomponent reaction product establishes tert-butyl isocyanide as a useful convertible isonitrile, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 3631–3634. doi:10.1039/c0ob00022a.
- [237] A.T. Baviskar, C. Madaan, R. Preet, P. Mohapatra, V. Jain, A. Agarwal, S.K. Guchhait, C.N. Kundu, U.C. Banerjee, P.V. Bharatam, N-fused imidazoles as novel anticancer agents that inhibit catalytic activity of topoisomerase II α and induce apoptosis in G1/S phase, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 5013–5030. doi:10.1021/jm200235u.
- [238] S.K. Guchhait, V. Chaudhary, C. Madaan, A chemoselective Ugi-type reaction in water using TMSCN as a functional isonitrile equivalent: generation of heteroaromatic molecular diversity, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 9271–9277. doi:10.1039/c2ob26733k.
- [239] S.K. Guchhait, G. Priyadarshani, V. Chaudhary, D.R. Seladiya, T.M. Shah, N.P. Bhogayta, One-pot preparation of isocyanides from amines and their multicomponent reactions: crucial role of dehydrating agent and base, *RSC Adv.* 3 (2013) 10867–10874. doi:10.1039/C3RA40347E.
- [240] S. Tsurulnikov, V. Kysil, A. Ivachtchenko, M. Krasavin, Trimethylsilyl Chloride as a Promoter for the Groebke–Blackburn Reaction: Preparation of Imidazo[2,1-b][1,3]Benzothiazoles, *Synth. Commun.* 40 (2009) 111–119. doi:10.1080/00397910902953331.
- [241] S. Demirayak, I. Kayagil, Synthesis of some 6,8-diarylimidazo[1,2-a]pyrazine derivatives by using either reflux or microwave irradiation method and investigation of their anticancer activities, *J. Heterocycl. Chem.* 42 (2005) 319–325. doi:10.1002/jhet.5570420224.
- [242] Y. Gao, M. Yin, W. Wu, H. Huang, H. Jiang, Copper-Catalyzed Intermolecular Oxidative Cyclization of Halo-alkynes: Synthesis of 2-Halo-substituted Imidazo[1,2-a]pyridines, Imidazo[1,2-

a]pyrazines and Imidazo[1,2-a]pyrimidines, *Adv. Synth. Amp Catal.* 355 (2013) 2263–2273. doi:10.1002/adsc.201300157.

[243] G. Sarodnick, T. Linker, M. Heydenreich, A. Koch, I. Starke, S. Fürstenberg, E. Kleinpeter, Quinoxalines XV. Convenient synthesis and structural study of pyrazolo[1,5-a]quinoxalines, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 1282–1287. doi:10.1021/jo802398g.

[244] C. Wiethan, S.Z. Franceschini, H.G. Bonacorso, M. Stradiotto, Synthesis of pyrazolo[1,5-a]quinoxalin-4(5H)-ones via one-pot amidation/N-arylation reactions under transition metal-free conditions, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 8721–8727. doi:10.1039/c6ob01407k.

[245] H.M. Langford, J.S. Wai, P.D. Williams, Hiv integrase inhibitors, WO2005120516A3, 2007. <https://patents.google.com/patent/WO2005120516A3/en>.

[246] V. Colotta, L. Cecchi, D. Catarzi, G. Conti, G. Filacchioni, C. Martini, L. Giusti, A. Lucacchini, Tricyclic heteroaromatic systems pyrazolo[1,5-a]quinoxalines: synthesis and benzodiazepine receptor activity, *Farm. Soc. Chim. Ital.* 1989. 48 (1993) 1051–1063.

[247] S. Khier, F. Gattacceca, S. El Messaoudi, F. Lafaille, C. Deleuze-Masquéfa, J. Bompard, J.-F. Cooper, I. Solassol, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, F.M.M. Bressolle, Metabolism and pharmacokinetics of EAPB0203 and EAPB0503, two imidazoquinoxaline compounds previously shown to have antitumoral activity on melanoma and T-lymphomas, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 38 (2010) 1836–1847. doi:10.1124/dmd.110.034579.

[248] J. Saliba, C. Deleuze-Masquéfa, A. Iskandarani, R. El Eit, R. Hmadi, F.-X. Mahon, A. Bazarbachi, P.-A. Bonnet, R. Nasr, EAPB0503, a novel imidazoquinoxaline derivative, inhibits growth and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells, *Anticancer. Drugs.* 25 (2014) 624–632. doi:10.1097/CAD.000000000000084.

[249] A.I. Nabbouh, R.S. Hleihel, J.L. Saliba, M.M. Karam, M.H. Hamie, H.-C.J.M. Wu, C.P. Berthier, N.M. Tawil, P.-A.A. Bonnet, C. Deleuze-Masquefa, H.A. El Hajj, Imidazoquinoxaline derivative EAPB0503: A promising drug targeting mutant nucleophosmin 1 in acute myeloid leukemia, *Cancer.* 123 (2017) 1662–1673. doi:10.1002/cncr.30515.

[250] G. Moarbess, J.-F. Guichou, S. Paniagua-Gayraud, A. Chouchou, O. Marcadet, F. Leroy, R. Ruédas, P. Cuq, C. Deleuze-Masquéfa, P.-A. Bonnet, New IKK inhibitors: Synthesis of new imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives using microwave assistance and biological evaluation as IKK inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 115 (2016) 268–274. doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.006.

[251] W.H. Wollaston, XXII. On the discovery of palladium; with observations on other substances found with plantina, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 95 (1805) 316–330. doi:10.1098/rstl.1805.0024.

[252] J. Smidt, W. Hafner, R. Jira, R. Sieber, J. Sedlmeier, A. Sabel, The Oxidation of Olefins with Palladium Chloride Catalysts, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1 (1962) 80–88. doi:10.1002/anie.196200801.

- [253] H. Takahashi, J. Tsuji, Organic Syntheses by Means of Noble Metal Compounds. XXXVII. Carbonylation of Allene-Palladium Chloride Complexes, *J. Organomet. Chem.* 10 (1967) 511–517. doi:10.1016/S0022-328X(00)83177-0.
- [254] J. Tsuji, Recollections of organopalladium chemistry, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 1539–1547. doi:10.1351/pac199971081539.
- [255] R.F. Heck, Acylation, methylation, and carboxyalkylation of olefins by Group VIII metal derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 5518–5526. doi:10.1021/ja01022a034.
- [256] R.F. Heck, The arylation of allylic alcohols with organopalladium compounds. A new synthesis of 3-aryl aldehydes and ketones, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 5526–5531. doi:10.1021/ja01022a035.
- [257] R.F. Heck, J.P. Nolley, Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 2320–2322. doi:10.1021/jo00979a024.
- [258] P. Fitton, J.E. McKeon, Reactions of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) with olefins bearing electron-withdrawing substituents, *Chem. Commun. Lond.* 0 (1968) 4–6. doi:10.1039/C19680000004.
- [259] P. Fitton, M.P. Johnson, J.E. McKeon, Oxidative additions to palladium(0), *Chem. Commun. Lond.* 0 (1968) 6–7. doi:10.1039/C19680000006.
- [260] Y. Kiso, K. Yamamoto, K. Tamao, M. Kumada, Asymmetric homogeneous hydrosilylation with chiral phosphine-palladium complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 4373–4374. doi:10.1021/ja00767a074.
- [261] R.J.P. Corriu, J.P. Masse, Activation of Grignard reagents by transition-metal complexes. A new and simple synthesis of trans-stilbenes and polyphenyls, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0 (1972) 144a-144a. doi:10.1039/C3972000144A.
- [262] M. Yamamura, I. Moritani, S.I. Murahashi, The reaction of σ -vinylpalladium complexes with alkyllithiums. Stereospecific syntheses of olefins from vinyl halides and alkyllithiums, *J. Organomet. Chem.* 91 (1975) C39–C42. doi:10.1016/S0022-328X(00)89636-9.
- [263] E. Negishi, S. Baba, Novel stereoselective alkenyl–aryl coupling via nickel-catalysed reaction of alkenylanes with aryl halides, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0 (1976) 596b-597b. doi:10.1039/C3976000596B.
- [264] A.O. King, N. Okukado, E. Negishi, Highly general stereo-, regio-, and chemo-selective synthesis of terminal and internal conjugated enynes by the Pd-catalysed reaction of alkynylzinc reagents with alkenyl halides, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0 (1977) 683–684. doi:10.1039/C39770000683.
- [265] E. Negishi, A.O. King, N. Okukado, Selective carbon-carbon bond formation via transition metal catalysis. 3. A highly selective synthesis of unsymmetrical biaryls and diarylmethanes by the nickel- or palladium-catalyzed reaction of aryl- and benzylzinc derivatives with aryl halides, *J. Org. Chem.* 42 (1977) 1821–1823. doi:10.1021/jo00430a041.

- [266] D. Milstein, J.K. Stille, A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 3636–3638. doi:10.1021/ja00479a077.
- [267] A.S. Guram, R.A. Rennels, S.L. Buchwald, A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1348–1350. doi:10.1002/anie.199513481.
- [268] N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides, *Tetrahedron Lett.* 20 (1979) 3437–3440. doi:10.1016/S0040-4039(01)95429-2.
- [269] N. Miyaura, A. Suzuki, Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0 (1979) 866–867. doi:10.1039/C39790000866.
- [270] A. Suzuki, Cross-coupling reactions via organoboranes, *J. Organomet. Chem.* 653 (2002) 83–90. doi:10.1016/S0022-328X(02)01269-X.
- [271] S. Gujral, S. Khatri, P. Riyal, Suzuki Cross Coupling Reaction-A Review, *Indo Glob. J. Pharm. Sci.* 2 (2012) 351–367.
- [272] H. Zhang, F.Y. Kwong, Y. Tian, K.S. Chan, Base and Cation Effects on the Suzuki Cross-Coupling of Bulky Arylboronic Acid with Halopyridines: Synthesis of Pyridylphenols, *J. Org. Chem.* 63 (1998) 6886–6890.
- [273] J. Chen, A. Cammers, 2-(Fluorophenyl)pyridines by the Suzuki–Miyaura method: Ag₂O accelerates coupling over undesired ipso substitution (S_NAr) of fluorine, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 1503–1506. doi:10.1016/S0040-4039(02)02793-4.
- [274] G. Zou, Y. Krishna Reddy, J. Falck, Ag(I)-Promoted Suzuki–Miyaura Cross-Couplings of n-Alkylboronic Acids, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 7213–7215. doi:10.1016/S0040-4039(01)01536-2.
- [275] H. Doucet, Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions of Alkylboronic Acid Derivatives or Alkyltrifluoroborates with Aryl, Alkenyl or Alkyl Halides and Triflates, *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (2008) 2013–2030. doi:10.1002/ejoc.200700984.
- [276] I. Maluenda, O. Navarro, Recent developments in the Suzuki–Miyaura reaction: 2010–2014, *Mol. Basel Switz.* 20 (2015) 7528–7557. doi:10.3390/molecules20057528.
- [277] H. Dieck, F.R. Heck, Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives, *J. Organomet. Chem.* 93 (1975) 259–263. doi:10.1016/S0022-328X(00)94049-X.
- [278] L.J. Cassar, Synthesis of aryl- and vinyl-substituted acetylene derivatives by the use of nickel and palladium complexes, *J. Organomet. Chem.* 93 (1975) 253–257. doi:10.1016/S0022-328X(00)94048-8.
- [279] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines, *Tetrahedron Lett.* 16 (1975) 4467–4470. doi:10.1016/S0040-4039(00)91094 3.

- [280] R.D. Stephens, C.E. Castro, The Substitution of Aryl Iodides with Cuprous Acetylides. A Synthesis of Tolanes and Heterocyclics¹, *J. Org. Chem.* 28 (1963) 3313–3315. doi:10.1021/jo01047a008.
- [281] R. Chinchilla, C. Nájera, The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry, *Chem. Rev.* 107 (2007) 874–922. doi:10.1021/cr050992x.
- [282] R. Chinchilla, C. Nájera, Recent advances in Sonogashira reactions, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 5084–5121. doi:10.1039/c1cs15071e.
- [283] M.G. Melchor, *A Theoretical Study of Pd-Catalyzed C-C Cross-Coupling Reactions*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [284] B. Liang, M. Dai, J. Chen, Z. Yang, Copper-Free Sonogashira Coupling Reaction with PdCl₂ in Water under Aerobic Conditions, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 391–393. doi:10.1021/jo048599z.
- [285] M. Bakherad, Recent progress and current applications of Sonogashira coupling reaction in water, *Appl. Organomet. Chem.* 27 (2013) 125–140. doi:10.1002/aoc.2931.
- [286] Z. Zghaib, J.-F. Guichou, J. Vappiani, N. Bec, K. Hadj-Kaddour, L.-A. Vincent, S. Paniagua-Gayraud, C. Larroque, G. Moarbess, P. Cuq, I. Kassab, C. Deleuze-Masquéfa, M. Diab-Assaf, P.-A. Bonnet, New imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis, biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure-activity relationships, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 2433–2440. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.004.
- [287] T.P. Matthews, T. McHardy, S. Klair, K. Boxall, M. Fisher, M. Cherry, C.E. Allen, G.J. Addison, J. Ellard, G.W. Aherne, I.M. Westwood, R. van Montfort, M.D. Garrett, J.C. Reader, I. Collins, Design and evaluation of 3,6-di(hetero)aryl imidazo[1,2-a]pyrazines as inhibitors of checkpoint and other kinases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 4045–4049. doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.096.
- [288] M. Belema, A. Bunker, V.N. Nguyen, F. Beaulieu, C. Ouellet, Y. Qiu, Y. Zhang, A. Martel, J.R. Burke, K.W. McIntyre, M.A. Pattoli, C. Dalosio, K.M. Gillooly, W.J. Clarke, P.J. Brassil, F.C. Zusi, D.M. Vyas, Synthesis and structure-activity relationship of imidazo(1,2-a)thieno(3,2-e)pyrazines as IKK-beta inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 4284–4289. doi:10.1016/j.bmcl.2007.05.031.
- [289] A. de la Hoz, A. Díaz-Ortiz, J. Elguero, L.J. Martínez, A. Moreno, A. Sánchez-Migallón, Solvent-free preparation of tris-pyrazolyl-1,3,5-triazines, *Tetrahedron.* 57 (2001) 4397–4403. doi:10.1016/S0040-4020(01)00340-4.
- [290] A. Migliorini, C. Oliviero, T. Gasperi, M.A. Loreto, The Suzuki reaction applied to the synthesis of novel pyrrolyl and thiophenyl indazoles, *Mol. Basel Switz.* 17 (2012) 4508–4521. doi:10.3390/molecules17044508.
- [291] M. Giannerini, M. Fañanás-Mastral, B.L. Feringa, Direct catalytic cross-coupling of organolithium compounds, *Nat. Chem.* 5 (2013) 667–672. doi:10.1038/nchem.1678.

- [292] Z. Jia, Q. Liu, X.-S. Peng, H.N.C. Wong, Iron-catalysed cross-coupling of organolithium compounds with organic halides, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10614. doi:10.1038/ncomms10614.
- [293] A. Sandtorv, H.-R. Bjørsvik, Scope and Mechanistic Limitations of a Sonogashira Coupling Reaction on an Imidazole Backbone, *Eur. J. Org. Chem.* 2015 (2015). doi:10.1002/ejoc.201500520.
- [294] M. Sosnowski, L. Skulski, A comparison of microwave-accelerated and conventionally heated iodination reactions of some arenes and heteroarenes, using ortho-periodic acid as the oxidant, *Mol. Basel Switz.* 10 (2005) 401–406.