



**HAL**  
open science

# Conception, synthèse et évaluation des dérivés d'aminobenzosubérone comme inhibiteurs potentiels des aminopeptidases de la famille M1

Mounir Al-Masri

► **To cite this version:**

Mounir Al-Masri. Conception, synthèse et évaluation des dérivés d'aminobenzosubérone comme inhibiteurs potentiels des aminopeptidases de la famille M1. Chimie thérapeutique. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2017. Français. NNT : 2017MULH2862 . tel-03014743

**HAL Id: tel-03014743**

**<https://theses.hal.science/tel-03014743>**

Submitted on 19 Nov 2020

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

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

Université de Haute-Alsace  
Ecole Doctorale des Sciences Chimiques (ED 222)

**THESE**

Présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Haute-Alsace**

Discipline : Chimie Organique

Par

**Mounir Al-Masri**

**Conception, synthèse et évaluation des dérivés  
d'aminobenzosubérone comme inhibiteurs potentiels des  
aminopeptidases de la famille M1**

Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique (EA 4566)

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse

Soutenue publiquement le **20 octobre 2017** devant la commission d'examen :

<b>Pr. Guillaume PRESTAT</b>	Rapporteur
<b>Dr. Mouad ALAMI</b>	Rapporteur
<b>Dr. Dominique BONNET</b>	Examineur
<b>Dr. Catherine GUILLOU</b>	Examineur
<b>Pr. Céline TARNUS</b>	Directeur de thèse
<b>Dr. Sébastien ALBRECHT</b>	Co-directeur de thèse



*Je dédie ce travail à ceux qui m'ont donné l'énergie, la raison et la volonté :*

*Ma fille Mira*

*... Je t'embrasse tendrement.*

*Mon épouse Marwa*

*... Merci pour tout.*

*A mes parents, je ne pourrais jamais vous remercier assez pour votre aide...*

*A mes frères, ma sœur, mes beaux-parents, mes belles sœurs mon beau-frère et mes amis*

*A mon pays...*

*... J'offre ce titre et cette réussite.*



## Remerciements

La présente étude n'aurait pas été possible sans le bienveillant soutien de certaines personnes que je prie d'accueillir toute ma gratitude d'accepter mes remerciements.

Mes premiers remerciements vont d'abord à mes directeurs de thèse, **Pr. Céline Tarnus** et **Dr. Sébastien Albrecht**. Pr. Tarnus, je vous remercie pour m'accueillir au sein de votre équipe, pour vos conseils avisés et votre aide précieuse tout au long de cette thèse. Sébastien, je vous remercie pour votre encadrement tout au long de ces années, votre disponibilité, votre pédagogie, vos idées, ainsi que vos encouragements qui sont avérés extrêmement précieux et m'ont toujours permis de travailler dans des conditions idéales. J'espère avoir été à la hauteur.

Je remercie les membres du jury **Pr. Guillaume Prestat** (Université Paris-Descartes) et **Dr. Mouad Alami** (Université de Paris Sud), **Dr. Dominique Bonnet** (Université de Strasbourg) et **Dr. Catherine GUILLOU** (Université Paris-Saclay) d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier **Dr. Marjorie Schmitt** pour ses explications claires et précises en biologie et son soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie également **Dr. Germain Revelant** pour ces discussions scientifiques et au travail apporté dans ce projet

J'adresse mes remerciements au **Pr. Jean-Philippe Goddard**, au **Dr. Nicolas Blanchard** et au **Dr. Philippe Bisseret** pour leurs conseils judicieux et leurs critiques constructives.

Je remercie le personnel des centres d'analyse de RMN (**Dr. Didier Le Noen** pour son aide précieuse) de masse (**Dr Cécile Joyeux** pour son analyse de masse).

Je souhaitais également remercier **Philippe** pour son attention, pour ses conseils en chimie et en botanique ainsi que de transformer mon bureau en un beau jardin de plantes grasses.

Je remercie **Aline** pour sa gentillesse, son indulgence vis-à-vis de mes retards de commandes et sa disponibilité.

Je tiens à remercier **Delphine, Hélène** et **Samuel** pour m'avoir accueillie à l'École de Chimie pour les travaux pratiques de première année, pour leurs conseils et leur gentillesse.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire : **Dr. Mary-Lorène Goddard**, pour sa bonne humeur permanente et communicative. **Bérénice** pour son accueil chaleureux au laboratoire et son soutien au début de ma thèse. **Emmanuelle**, pour ses discussions précieuses sur les prodrogues. Aux thésards actuels **Sarah, Ariane, Guillaume, Vincent, Oualid** et **Yvette**, pour leurs sympathies, la bonne ambiance qui a régné au labo et pendant les conférences. Je remercie également les stagiaires qui ont passé dans le laboratoire pendant ces trois ans, **Laura, Florence, Frank, Andréa** et **Kim**.

Encore merci à tous.



## Liste des abréviations

a.a.	Acide aminé
APN	AminoPeptidase-N (neutre)
<i>h</i> APN	AminoPeptidase-Neutre humaine
<i>p</i> APN	AminoPeptidase-Neutre porcine
APaero	AminoPeptidase de l' <i>Aeromonas proteolytica</i>
APB	AminoPeptidase-Basique
APO	AminoPeptidase-O
Bn	Benzyle
BnBr	Bromure de benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
Cyp-450	Cytochrome P450
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMF	<i>N, N</i> -diméthylformamide
DMP	Periodinane de Dess-Martin
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DEAD	Diethylazodicarboxylate
DIPEA	Diisopropyléthylamine
ERAP1	Endoplasmic reticulum aminoPeptidase 1
HBA	Accepteur de liaison d'hydrogène
HBD	Donneur de liaison d'hydrogène
rERAP1	Endoplasmic reticulum aminoPeptidase 1 recombinant
ERAP2	Endoplasmic reticulum aminoPeptidase 2
rERAP2	Endoplasmic reticulum aminoPeptidase 2 recombinant
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
IRAP	Insuline réfulated aminoPeptidase
rIRAP	Insuline réfulated aminoPeptidase recombinant
( <i>n</i> Bu <sub>4</sub> )NI	Iodure de tétrabutylammonium
IC <sub>50</sub>	Concentration en inhibiteur conduisant à 50% d'inhibition de l'activité enzymatique
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition
LAPc	Leucine AminoPeptidase cytosolique
LTA <sub>4</sub> H	Leukotriène A <sub>4</sub> hydrolase humaine
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
<i>Pf</i> A-M1	Plasmodium falciparum AminoPeptidase M1
<i>Pf</i> A-M17	Plasmodium falciparum AminoPeptidase M17
<i>rPf</i> A-M1	Plasmodium falciparum AminoPeptidase M1 recombinant
PBS	Phosphate Buffer Solution
PDB	Protein Data Bank
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNPL1	Arginyl aminoPeptidase Like 1
SAR	Structure-Activity Relationship
SPR	Structure-Property Relationship
TBDMSOTf	Trifluorométhanesulfonate de <i>tert</i> iobutyldiméthylsilyle
t.a.	Température ambiante



## Table des matières

Introduction.....	12
Chapitre 1: Introduction générale.....	15
Les enzymes protéolytiques.....	15
Les aminopeptidases.....	20
Les métallo-aminopeptidases.....	20
Famille M17 : aminopeptidase bimétallique à 2 ions zinc.....	20
Famille M1 : à 1 ion zinc.....	24
Structure et spécificité de substrat des aminopeptidases de la famille M1.....	29
Rôles métaboliques et pathologies.....	32
Chapitre 2 : Les inhibiteurs des aminopeptidases la famille M1.....	46
Mimes partiels de l'intermédiaires tétraédriques.....	46
Chélatant des métaux.....	53
Autres types d'inhibiteurs.....	57
Chapitre 3 : Travaux antérieurs du laboratoire et objectifs.....	62
Modification des fonctions en position 2 et 3 du 3-amino-2-tétralone (1).....	62
Modification de la taille du cycle.....	63
Modification apporté sur le scaffold 3-amino-2-benzosubérone (8)''.....	65
Objectifs.....	66
Chapitre 4 : Exploration du sous-site S1.....	70
Condensation de Dieckmann.....	70
Métathèse cyclisante.....	87
Amination réductrice.....	95
Chapitre 5 : Exploration du sous-site S1'.....	105
Synthèse des dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4.....	105
Préparation de l'intermédiaire clé 4- bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one (76).....	106
Diversification structurale à partir du 4-bromo-7-amino-benzocycloheptèn-6-one.....	111
Préparation des sels d'amine des dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4.....	123
Chapitre 6 : Evaluation biologique.....	126
Evaluation biologique des dérivés du 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazépin-4-one.....	126
Evaluation biologique des dérivés 7-aminobenzocycloheptèn-6-one.....	126
Conclusion Générale et perspectives.....	155
Chapitre 7 : Partie expérimentale.....	161

Solvant.....	161
Matériels et méthodes.....	161
Exploitation du sous-site S1.....	162
Exploitation du sous-site S1'.....	192
Tests biologiques.....	233
Chapitre 8 : Résumé de la thèse.....	242
Annexes.....	251

# Introduction



## Introduction

Les aminopeptidases constituent un groupe d'enzymes avec des activités étroitement apparentées. Parmi eux, les métallo-aminopeptidases catalysent le clivage de l'acide aminé en position N-terminale<sup>1</sup>. Alors que certaines de ces métallo-aminopeptidases ne contiennent qu'un seul ion métallique dans leur site actif ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Ni^{2+}$ ), d'autres possèdent un centre métallique bi-nucléaire, généralement appelé unité co-catalytique<sup>2</sup>.

Ce travail s'intéresse aux métallo-aminopeptidases de la famille M1. Les enzymes de cette famille contiennent un ion zinc dans leur site actif qui est essentiel à la catalyse. Ces protéases sont largement distribuées dans le règne animal et végétal. On connaît aujourd'hui 12 membres de cette famille chez l'Homme, 11 chez les souris et les rats et 3 ou moins chez d'autres espèces. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (angiogenèse, inflammation et système immunitaire), mais également dans des désordres métaboliques, tels que la progression tumorale, des maladies auto-immunes, ainsi que dans des infections virales, bactériennes et parasitaires d'où leurs importance comme cibles thérapeutiques potentielles.

Une des difficultés majeures lors de la conception d'inhibiteurs est d'obtenir des composés puissants mais également sélectifs de l'enzyme d'intérêt.

Les travaux précédemment menés au laboratoire ont permis de mettre en évidence la série de composé dérivé du 7-amino-benzocycloheptan-6-one comme inhibiteur puissant et sélectif de l'APN (membres de la famille des métallo-aminopeptidases M1, impliquée dans le processus d'angiogenèse lors de la croissance tumorale).

Etant donné que les aminopeptidases de la famille M1 présentent des éléments structuraux communs au niveau de l'organisation de leur site actif et du mécanisme catalytique, le châssis moléculaire de type 7-amino-benzocycloheptan-6-one a constitué un point de départ à la conception d'inhibiteurs pour cette famille d'enzyme. L'objectif de mes travaux de thèse a consisté en la conception, la synthèse et l'évaluation d'analogues du 7-amino-benzocycloheptan-6-one comme inhibiteurs sélectifs des aminopeptidases de la famille M1 selon deux stratégies (Schéma 1) :

- **Exploitation du sous-site S1** : les enzymes de la famille M1 ont une spécificité de substrat dictée par des interactions avec ce sous-site. Pour cela, nous cherchons à développer des interactions entre le sous-site S1 et notre châssis moléculaire en remplaçant le carbone en position 9 par un azote substitué par divers groupes R. L'effet de ces divers substituants R sur l'activité inhibitrice vis-à-vis des différents enzymes de la famille M1 permettrait de mettre au point une plateforme moléculaire ultra-modulable en fonction de l'enzyme ciblée.

---

<sup>1</sup> M. Flippo *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1322-1334

- **Exploitation du sous-site S1'** : par des dérivés 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitué en position 4. Le choix des différents substituants, divers groupes aryles ou hétéroaryles, est basé sur un cahier de charges bien précises pour élaborer des composés avec des propriétés physico-chimique et pharmacocinétique acceptables.

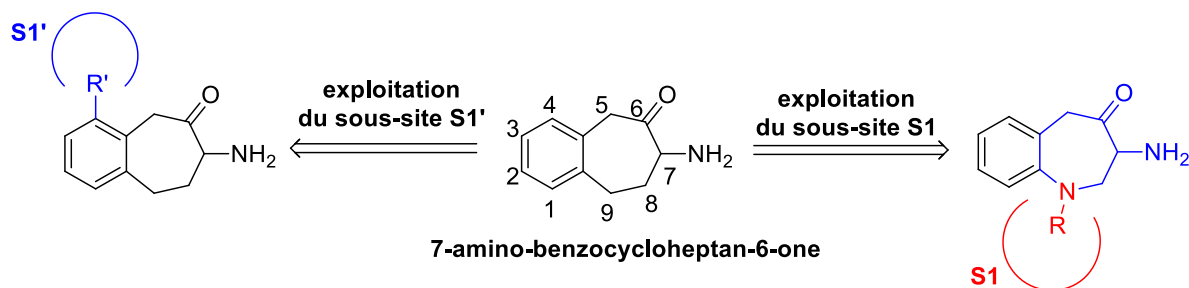


Schéma 1 : Objectifs de thèse

Ce travail s'est porté sur cinq enzymes de la famille M1: *PfA-M1*, APN, IRAP, ERAP1 et ERAP2. Des travaux ultérieurs ont été portés dans le cas de *PfA-M1*.

Six chapitres constituent le manuscrit de la thèse :

- Introduction générale
- Les inhibiteurs de la famille M1 décrits dans la littérature
- Les travaux antérieurs du laboratoire et les objectifs de la thèse
- Exploitation du sous-site S1
- Exploitation du sous-site S1'
- Evaluation biologique

# **Chapitre 1 :**

## **Introduction générale**

# Chapitre 1: Introduction générale

## Les enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques (protéases, protéinases ou peptidases) catalysent les réactions d'hydrolyse des liaisons amides des peptides et/ou des protéines<sup>3</sup>. Il s'agit de la réaction irréversible la plus importante dans le monde du vivant (Figure 1).

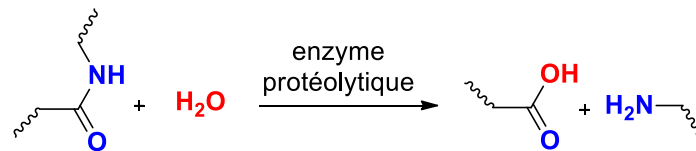


Figure 1 : Hydrolyse d'une liaison amide catalysée par une enzyme protéolytique

Ces enzymes sont classées en 5 familles<sup>4</sup> : aspartate-, cystéine-, métallo-, sérine- et thréonine-protéases. Elles constituent l'une des plus vastes familles d'enzymes et on estime que 2% des gènes du génome humain codent des protéases (soit environ 580 gènes) :

- 191 gènes : métalloprotéases
- 178 gènes : protéases à sérine
- 161 gènes : protéases à cystéine
- 27 gènes : protéases à thréonine
- 21 gènes : protéases à acide aspartique

Les protéases sont naturellement très abondantes et interviennent dans la régulation de nombreux processus biologiques : digestion et recyclage des protéines<sup>5</sup>, développement embryonnaire, cicatrisation,<sup>6</sup> coagulation<sup>7</sup>, défense immunitaire<sup>8</sup>, contrôle du cycle cellulaire, différenciation, migration, et apoptose<sup>9</sup>.

## Nomenclature du site catalytique des protéases

La surface de la protéase est constituée de sous-sites S1, S2, ..., Sn spécifiques à la reconnaissance d'un substrat peptidique (P1, P2, ...) (Figure 2).

Les sous-sites sont numérotés à partir du point de clivage: de S1 à Sn vers l'extrémité N-terminale et de S1' à Sn' en direction de l'extrémité C-terminale de la protéase. Ils ont la même numérotation que les chaînes latérales P1-Pn et P1'-Pn' qui occupent ces sous-sites, respectivement<sup>10</sup>.

<sup>3</sup> Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edn, vol. 2, N. D. Rawlings, G. Salvesen, Elsevier Academic Press 2004, 1-2448.

<sup>4</sup> Kohei et al., *J. Biochem.* 2012, 151, 13-25

<sup>5</sup> M. H. Glickman et al., *Physiol. Rev.* 2002, 82, 373-428

<sup>6</sup> B. Turk, *Nat. Rev.* 2006, 5, 785-799

<sup>7</sup> E. W. Davie et al., *Biochemistry* 1991, 30, 10363-10370

<sup>8</sup> S. Donnelly et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011, 712, 192-207

<sup>9</sup> D. W. Nicholson; *Cell Death Differ.* 1999, 6, 1028-1042

<sup>10</sup> I. Schechter et al., *Bioch. Biophys. Res. Com.* 1967, 27, 157-16



Figure 2 : Représentation schématique d'un substrat peptidique lié au site actif de protéase selon la nomenclature de Schechter et Berger<sup>8</sup>

### Mécanisme général de l'hydrolyse d'une liaison amide

Le mécanisme général d'hydrolyse d'une liaison amide catalysée par les protéases est une addition nucléophile suivie d'une élimination (analogue à la substitution nucléophile d'acyle) (Figure 3). La fonction carbonyle de la liaison amide du substrat est activée par un environnement électrophile au sein du site actif, puis le nucléophile (molécule d'eau activée ou acide aminé nucléophile du site actif) attaque ce carbonyle, formant ainsi un intermédiaire tétraédrique  $sp^3$ , stabilisé au sein du site catalytique. La protonation de l'amine conduit à la rupture de la liaison peptidique pour libérer les produits de la réaction<sup>11</sup>.

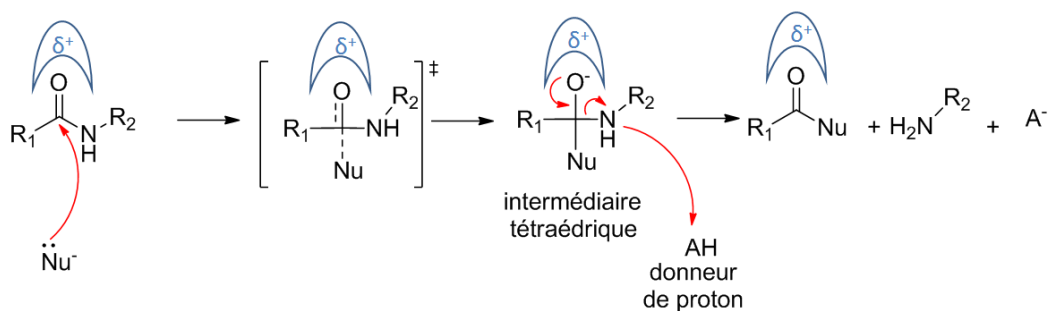


Figure 3 : mécanisme général d'hydrolyse d'une liaison amide catalysée par une protéase

### Les classifications des protéases

Selon la position de la liaison amide à hydrolyser dans la chaîne peptidique, il existe deux familles de protéases : les endopeptidases et les exopeptidases, qui sont classées selon la position de la coupure dans la chaîne peptidique (Figure 4).

<sup>11</sup> A. J. Bareztt et al., *Methods in enzymology*, 1994, 244, 1-15

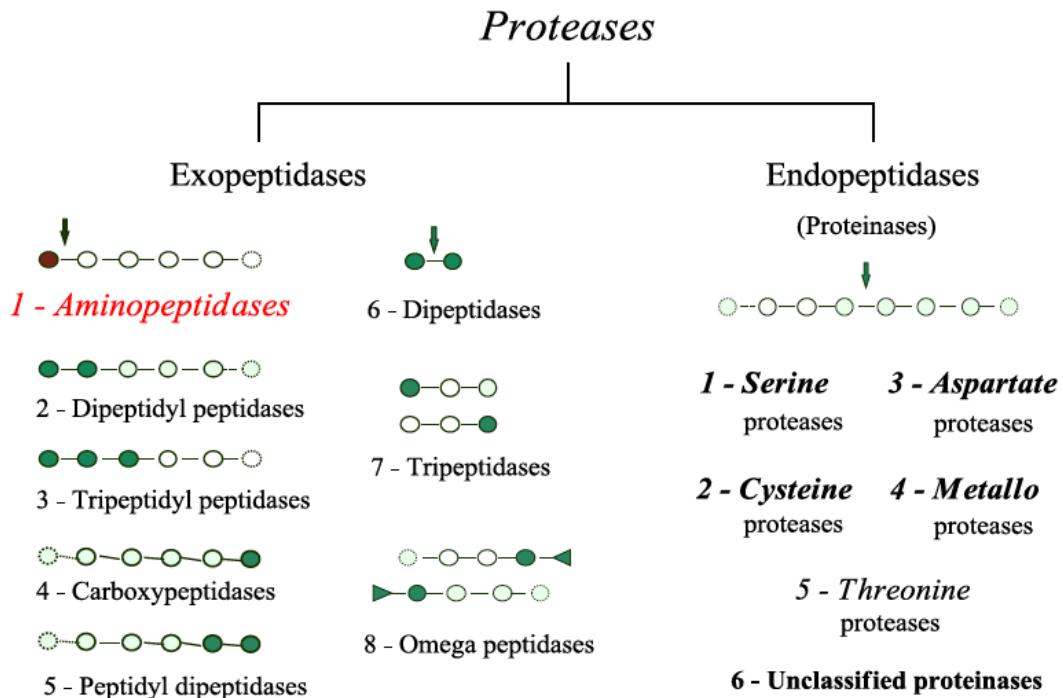


Figure 4 : Les différentes familles de protéases

#### Les exopeptidases :

Les exopeptidases catalysent l'hydrolyse d'un acide aminé de l'extrémité d'une chaîne peptidique. Elles sont classées en fonction de leur spécificité de substrat, par exemple:

Les aminopeptidases qui coupent entre le premier acide aminé et le second acide aminé de la chaîne, libérant l'acide aminé N-terminal.

Les carboxypeptidases qui coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé de la chaîne, libérant l'acide aminé C-terminal.

#### Les endopeptidases :

Les endopeptidases catalysent l'hydrolyse d'une liaison amide à l'intérieur de la chaîne peptidique. Elles sont classées en cinq groupes répertoriés en fonction de leur mécanisme catalytique et plus précisément de la nature des acides aminés essentiels impliqués dans la catalyse : les protéases à cystéine, sérine et thréonine (catalyse covalente), les protéases à aspartate et les métalloprotéases (catalyse non-covalente par une molécule d'eau)<sup>4</sup>.

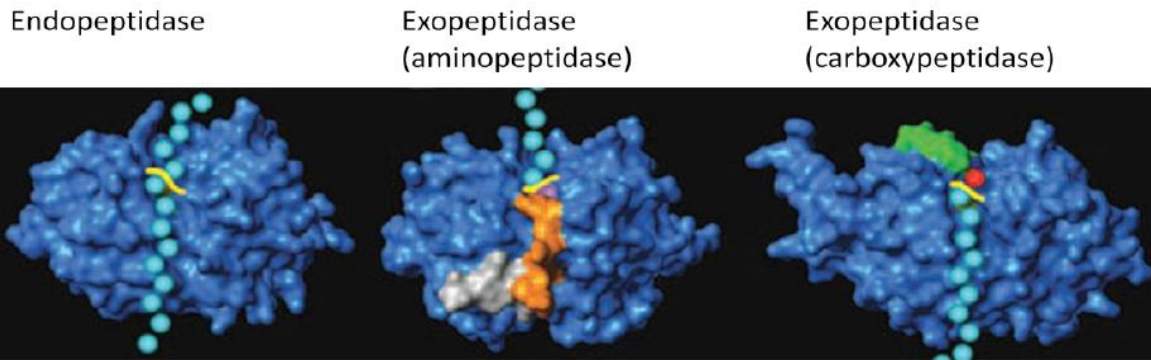


Figure 5 : Modes de clivage du substrat par les endopeptidases et les exopeptidases. Dans le cas des endopeptidases, le substrat peptidique traverse toute la longueur du site actif pour être clivé à son intérieur. Dans le cas des exopeptidases, la liaison substrat-Enzyme est structurellement limitée qu'elle soit du côté C-terminal ou N-terminal.

Le mode de clivage des protéases (endopeptidases et exopeptidases) est présenté selon la (Figure 5).

Parmi les différents groupes de protéases, nous nous sommes intéressés à la classe des métalloprotéases.

#### *Les métallopeptidases et leurs groupes<sup>12,13,14</sup>*

Les métallopeptidases contiennent un ou plusieurs ions métalliques divalents dans leurs sites actifs, ion(s) essentiel(s) à la catalyse. Elles ont été divisées en douze groupes, listées avec leurs familles dans le (Tableau 1).

Les peptidases des groupes MA, MC, MD, ME, MJ, ML, et MM ont un seul ion métallique, qui est en général l'ion zinc (ou ion nickel dans le groupe ML). En revanche, les peptidases des groupes MF, MG, MH et MN ont deux ions métalliques co-catalytiques, qui sont soit l'ion zinc ou l'ion manganèse dans le groupe MF et l'ion cobalt ou ion manganèse dans le groupe MG. Tous les métallopeptidases à deux ions métalliques sont des exopeptidases.

Chaque groupe est subdivisé en plusieurs sous-familles selon leur homologie au niveau du repliement tridimensionnel, les ligands des ions métalliques dans le site actif ainsi que leur spécificité de substrat (aminopeptidases ou carboxypeptidases)<sup>1</sup>.

<sup>12</sup> T. O. Botelho *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 7369-7377

<sup>13</sup> M. N. G James *et al.*, *Portland Press* **1993**, pp : 1-8

<sup>14</sup> B. L. Vall *et al.*, *Biochemistry* **1990**, 29, 5647-5659

Clan	Family	Type example	
MA(E)	M1	Aminopeptidase N ( <i>Homo sapiens</i> )	
	M2	Peptidyl-dipeptidase A peptidase unit 2 ( <i>Homo sapiens</i> )	
	M3	Thimet oligopeptidase ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
	M4	Thermolysin ( <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> )	
	M5	Mycolysin ( <i>Streptomyces cacaoi</i> )	
	M9	Microbial collagenase ( <i>Vibrio alginolyticus</i> )	
	M13	Neprilysin ( <i>Homo sapiens</i> )	
	M26	IgA1-specific metalloendopeptidase ( <i>Streptococcus sanguis</i> )	
	M27	Tentoxilysin ( <i>Clostridium tetani</i> )	
	M30	Hycolysin ( <i>Staphylococcus hyicus</i> )	
	M32	Carboxypeptidase Taq ( <i>Thermus aquaticus</i> )	
	M34	Anthrax lethal factor ( <i>Bacillus anthracis</i> )	
	M36	Fungalysin ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )	
	M41	FtsH endopeptidase ( <i>Escherichia coli</i> )	
	M47	PRSM1 putative metallopeptidase ( <i>Homo sapiens</i> )	
	M60	Enhancin ( <i>Lymantria dispar</i> nucleopolyhedrovirus)	
	M61	Glycyl aminopeptidase ( <i>Sphingomonas capsulata</i> )	
	MA(M)	M6	Immune inhibitor A ( <i>Bacillus thuringiensis</i> )
		M7	Snalysin ( <i>Streptomyces lividans</i> )
		M8	Leishmanolysin ( <i>Leishmania major</i> )
		M10	Collagenase 1 ( <i>Homo sapiens</i> )
M11		Gametolysin ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	
M12		Astacin ( <i>Astacus astacus</i> )	
M35		Deuterolysin ( <i>Aspergillus flavus</i> )	
M43		Cytophagalysin ( <i>Cytophaga</i> sp.)	
M46		Pappalysin-1 ( <i>Homo sapiens</i> )	
M57		prtB gene product ( <i>Myxococcus xanthus</i> )	
M64		IgA protease ( <i>Clostridium ramosum</i> )	
M72		peptidyl-Asp metalloendopeptidase ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	
MC		M14	Carboxypeptidase A1 ( <i>Homo sapiens</i> )
MD		M15	Zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase ( <i>Streptomyces albus</i> )
ME		M16	Pitrylysin ( <i>Escherichia coli</i> )
	M44	Vaccinia virus-type metalloendopeptidase (vaccinia virus)	
MF	M17	Leucyl aminopeptidase ( <i>Bos taurus</i> )	
MG	M24	Methionyl aminopeptidase type 1 ( <i>Escherichia coli</i> )	
MH	M18	Aminopeptidase I ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	
	M20	Glutamate carboxypeptidase ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	
	M28	aminopeptidase ( <i>Streptomyces griseus</i> )	
	M42	Glutamyl aminopeptidase ( <i>Lactococcus lactis</i> )	
MJ	M38	$\beta$ -Aspartyl dipeptidase ( <i>Escherichia coli</i> )	
MK	M22	O-sialoglycoprotein endopeptidase ( <i>Pasteurella haemolytica</i> )	
ML	M52	HydD endopeptidase ( <i>Escherichia coli</i> )	
	M63	GPR protease ( <i>Bacillus megaterium</i> )	
MM	M50	S2P protease ( <i>Homo sapiens</i> )	
MN	M55	D-Aminopeptidase DppA ( <i>Bacillus subtilis</i> )	
M-	M19	Membrane dipeptidase ( <i>Homo sapiens</i> )	
	M23	$\beta$ -Lytic metalloendopeptidase ( <i>Achromobacter lyticus</i> )	
	M29	Aminopeptidase T ( <i>Thermus aquaticus</i> )	
	M48	Ste24 endopeptidase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	
	M49	Dipeptidyl-peptidase III ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
	M56	BlaR1 peptidase ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	

Tableau 1 : Les groupes et familles de métallopeptidases

En général, les métalloprotéases « monométalliques » possèdent un ion métallique maintenu dans le site actif grâce à des complexations à trois acides aminés. En revanche les métalloprotéases « bimétalliques » comportent deux ions métalliques dans leurs sites actifs qui sont liés à cinq ligands acides aminés. Ces ligands acides aminés sont en général His, Glu, Asp ou Lys. Ces métalloprotéases nécessitent également des résidus essentiels à la catalyse tels que Glu, Lys, Arg, Tyr afin d'activer le nucléophile, le substrat ou stabiliser l'intermédiaire tétraédrique issu de la catalyse enzymatique.

Parmi les différentes métalloprotéases nous nous sommes intéressées plus particulièrement à la classe des métallo-aminopeptidases.



## Les aminopeptidases

Les aminopeptidases (AP) [EC.3.4.11.-] catalysent l'hydrolyse de la liaison amide de l'acide aminé en position N-terminale d'un peptide ou d'une protéine. Il existe une grande variété d'aminopeptidases spécifiques du type d'acide aminé à hydrolyser, c'est à dire du groupement P1 (Figure 6). La fonction amine libre est essentielle pour la reconnaissance d'un substrat par cette famille d'enzymes protéolytiques<sup>1</sup>.

AP (aminopeptidase)	spécificité
AP-A	Acides aminés acides
AP-B	Acides aminés basiques
AP-N	Acides aminés neutres
AP-O	Arginine et acide aspartique
AP-P	Proline
AP-W	Tryptophane
LAPc (Leucine aminopeptidase cytosolique)	Leucine
MetAP2 (Méthionine Aminopeptidase de type 2)	Méthionine

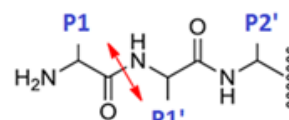


Figure 6 : Exemples de différentes aminopeptidases selon le type d'acide aminé hydrolysé

## Les métallo-aminopeptidases

Dans le cas de ces enzymes, l'attaque nucléophile de la liaison amide est assurée par une molécule d'eau activée par un carboxylate de Glu ou Asp et un cation métallique, en général l'ion zinc (bien que parfois l'ion Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> est présent comme cation *in vitro*) qui polarise le carbonyle et stabilise l'oxyanion formé au cours de la catalyse.

Les métalloenzymes contenant du zinc sont les plus abondantes pour les raisons suivantes<sup>15</sup> :

- l'ion zinc (Zn<sup>2+</sup>) contient une orbitale *d* remplie (d<sup>10</sup>) et donc ne peut pas intervenir lors de processus oxydo-réducteurs mais fonctionne comme un acide de Lewis.
- la géométrie de coordination flexible (existence de complexe tétra-, penta- et hexacoordonné).
- la faible différence d'énergie entre les complexes de zinc tétracoordonné et hexacoordonné (seulement 0.4 kcal/mol).<sup>16</sup>

Par ailleurs parmi les autres ions métalliques, l'ion Co<sup>2+</sup> est l'ion métallique le plus apte à remplacer efficacement l'ion zinc<sup>17</sup>.

Parmi les différents métallo-aminopeptidases, deux familles particulièrement ont été le sujet des travaux de notre laboratoire, la famille **M1** (un ion zinc catalytique) et la famille **M17** (deux ions zinc organisés en « unité co-catalytique »).

### Famille M17 : aminopeptidase bimétallique à 2 ions zinc

La famille M17 est l'unique famille du clan MF qui possède deux ions métalliques dans leur site actif sous-forme d'une unité co-catalytique<sup>1</sup>. Elle regroupe des leucyl aminopeptidases, qui hydrolysent préférentiellement le résidu leucine en position N-terminale d'une protéine ou d'un peptide. Elles reconnaissent également des acides aminés hydrophobes tels que la phénylalanine, l'alanine et la méthionine.

<sup>15</sup> W. N. Lipscomb *et al.*, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375-2433

<sup>16</sup> U. Lendeckel *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, 477, 1-24

<sup>17</sup> P. Munih *et al.*, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101, 1099–1107

## Homologie de séquence

La Figure 7 présente l'alignement des séquences primaires de quelques membres de la famille M17. Les résidus en vert sont les ligands des ions métalliques et les résidus en bleu sont les résidus participant à la catalyse.

P00727	AMPL_BOVIN	239	WIEEQEMGSFLSVAKGSEPPVFLIHYKGSNPASEPPLVFKBITFDGGISINAAA-	297
Q8IL11	Q8IL11_PLAF7	332	ELEELKMGAYLSVGKGSHPNKFHILTYKSKGD-VKKKIALVCKBITFDGGYNIKAAPG	390
P68767	AMPA_ECOLI	227	QMKELGMHSYLAVGQGSQNESLMSVIEYKGNASEDARPIVLVCKBLTFDGGISINPSE-	285
			::* * : : : * : : * : : : : * : : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
P00727	AMPL_BOVIN	298	-NMDLMRADHGGAATICS AIVSAAKLDL-PINIVGLAPL CENMPSGKANKPGDVVRARNG	355
Q8IL11	Q8IL11_PLAF7	391	SMIDLKMFDSGCAAVLGCAYCVGTLKPENVEIHFLSAVCENMVSKNSYRPGDIITASNG	450
P68767	AMPA_ECOLI	286	-GMDEMKYDTCGAAAVYGVMMVAELQL-PINIVIGLAGCENMPGGRAYRPGDVLTTMSG	343
			::* * : : * : : : : * : : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
P00727	AMPL_BOVIN	356	KTIQVNDTDEERITLADALCYAHTFNPKVIINAATLTGAMDIALGSGATGVFTNSSWLW	415
Q8IL11	Q8IL11_PLAF7	451	KTIEVGNITDEERITLADALVYAEKLGVDYIVDIATLTGAMLYSLGTSYAGVFGNNEELI	510
P68767	AMPA_ECOLI	344	QTVEVLNITDEERIVLCDVLTYYVERFEPEAVIDVATLTGACVIALGHHITGLMANHNPLA	403
			::* * : : * : : * : : * : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	

Figure 7 : alignement des séquences primaires de la région catalytique d'une sélection d'aminopeptidases de la famille M17 ; LAP bovine (AMPL\_BOVIN, UniProtKB/Swiss-Prot P00727), Pfa-M17 (Q8IL11\_PLAF7, Q8IL11), LAP *E. coli* (AMPA\_ECOLI, P68767) ; outil d'alignement de séquences du serveur Uniprot, programme ClustalOmega

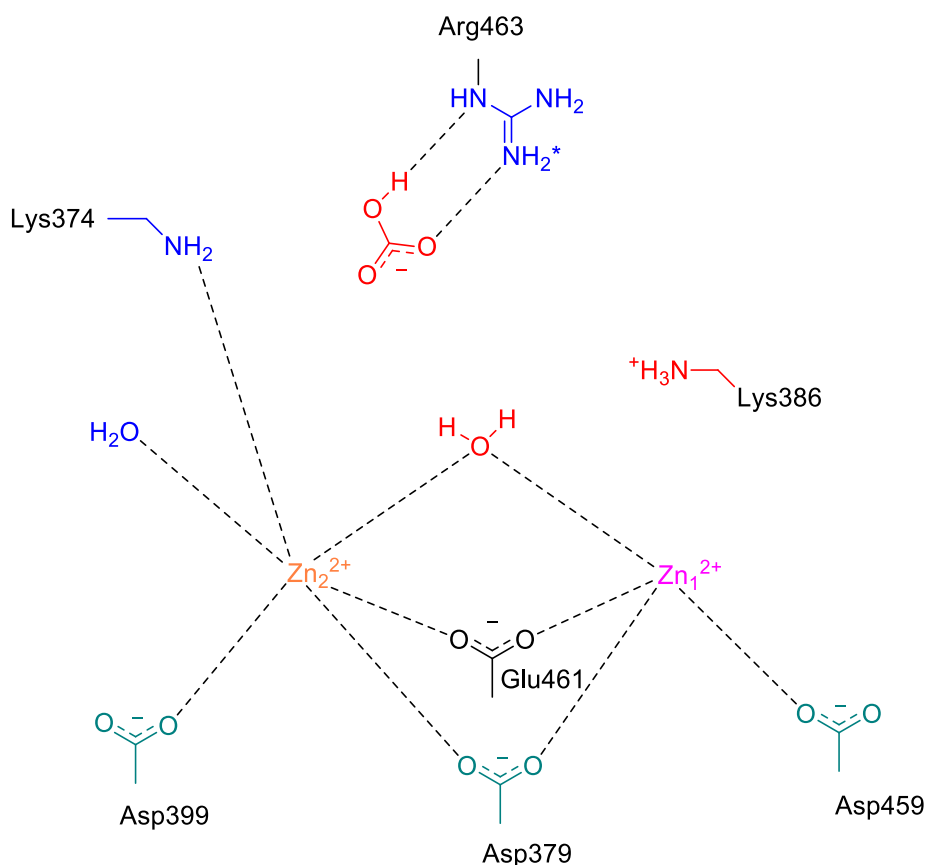


Figure 8 : Reconnaissance spécifique du substrat : Les acides aminés conservés dans la famille M17 ; la numérotation est celle utilisée pour Pfa-M17 (PDB : 3KQZ)

Le site actif est conservé dans cette famille (Figure 8). Elle contient deux ions métalliques : un ion Zn<sub>1</sub><sup>2+</sup> (rose), qui est un site de faible liaison, et un ion Zn<sub>2</sub><sup>2+</sup> (orange) qui est fortement lié au site actif. L'ion Zn<sub>1</sub><sup>2+</sup> est tétracoordonné aux résidus Asp379, Asp459, Glu461, et à une molécule d'eau (en rouge) qui jouera par la suite le rôle de nucléophile. Tandis que, l'ion Zn<sub>2</sub><sup>2+</sup> est hexacoordonné aux résidus Asp379, Lys374, Asp399, Glu461 et à deux molécules d'eau, dont la molécule d'eau

nucléophile. La Lys386 intervient dans la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique, Arg463 stabilise l'ion bicarbonate qui joue le rôle de navette de proton.

### Homologie de repliement

Les leucyl aminopeptidases de la famille M17 sont également présentes chez les eucaryotes et les bactéries<sup>18</sup>. Les membres de cette famille ont une grande similarité de repliement comme le montre l'alignement effectué par HHpred (tient compte de la séquence primaire et de la structure secondaire des protéines pour prédire les similarités de repliements tridimensionnels)<sup>19</sup> (Figure 9).

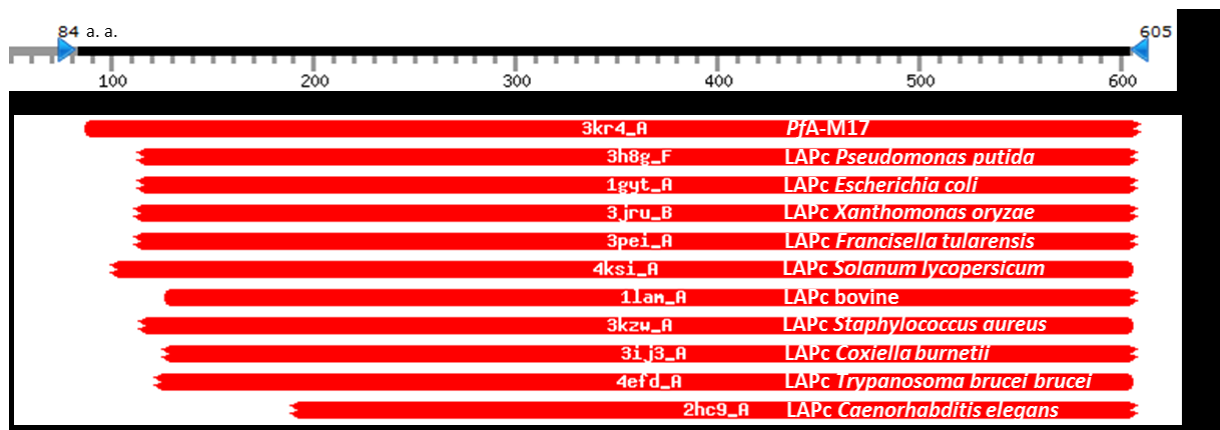


Figure 9 : alignement HHpred des monomères de quelques membres de la famille M17 par rapport au monomère de Pfa-M17 (605 acides aminés) ; le code PDB ainsi que le nom de chaque protéine sont indiqués ; logiciel HHpred

La Figure 10 montre le repliement de trois aminopeptidases de cette famille, la leucyl aminopeptidase cytosolique bovine (LAP bovine), la leucyl aminopeptidase de *P. falciparum* (Pfa-M17) et la leucyl aminopeptidase d'*E. coli* (LAP *E. coli*). Ce sont des homo-hexamères, chaque monomère contenant un domaine N-terminal et un domaine C-terminal catalytique (Figure 10). Ce dernier est le domaine le mieux conservé au sein de la famille M17.

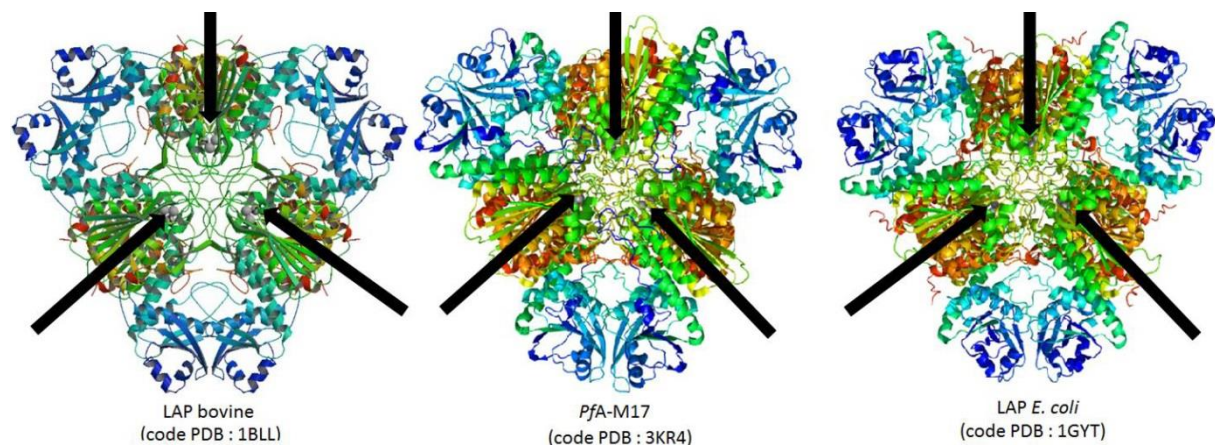


Figure 10 : structure tridimensionnelle, à partir des cristaux, d'une sélection de leucyl aminopeptidases de la famille M17 ; ions zinc indiqués par les flèches noires; logiciel Pymol<sup>20,21,22</sup>

<sup>18</sup> M. Matsui *et al.*, *Biol. Chem.* **2006**, 387, 1535-1544

<sup>19</sup> <http://www.uniprot.org/> consulté le 27/07/2016

<sup>20</sup> N. Steäter *et al.*, *EMBO. J.* **1999**, 18, 4513-4522

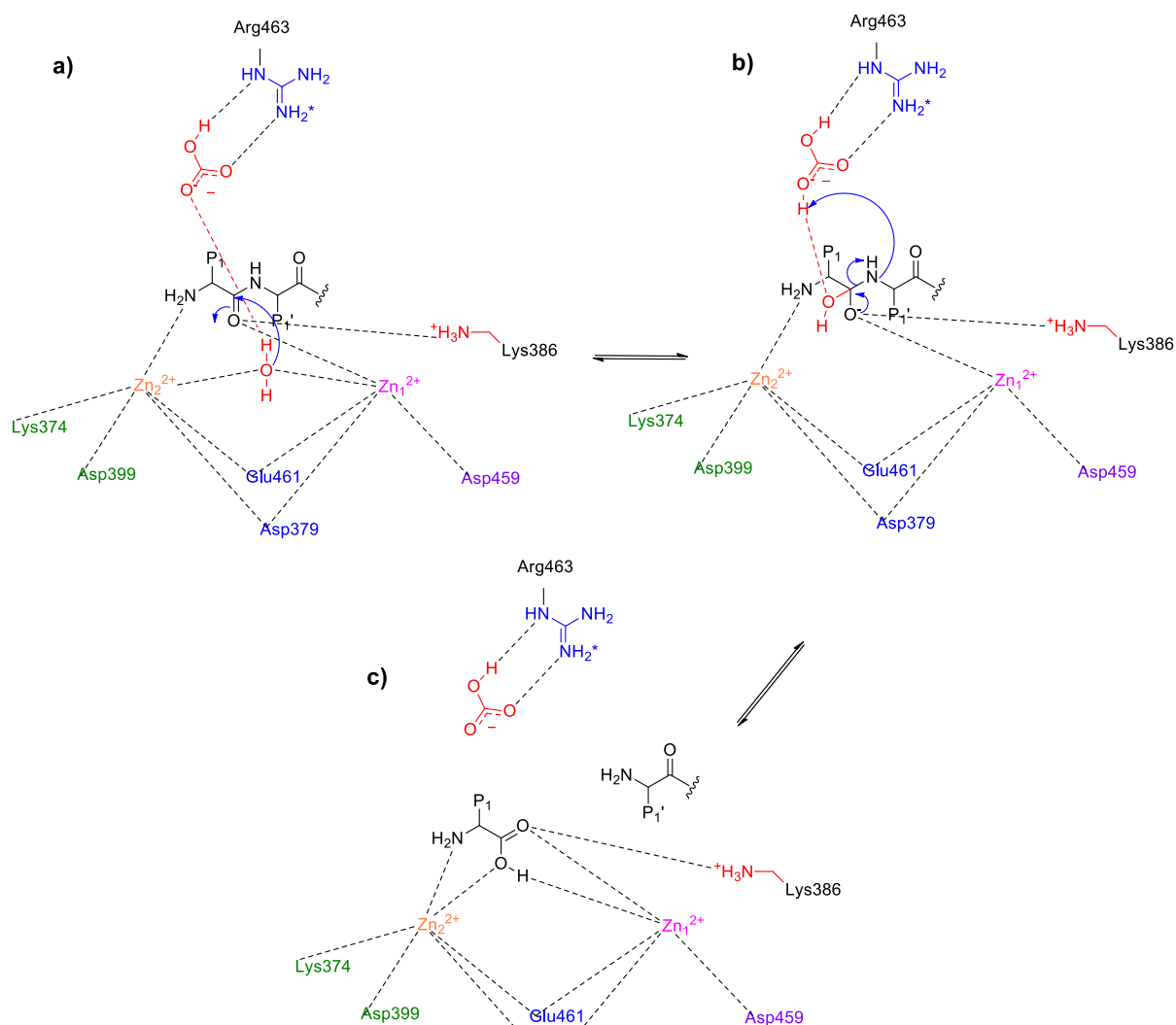


Figure 11 : mécanisme catalytique proposé pour les métallo-aminopeptidases de la famille M17. La numérotation est celle utilisée pour *PfA-M17* (PDB : 3KQZ)

En générale, c'est une catalyse acide-base dans laquelle un ion bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  joue le rôle de « navette de proton » (Figure 11). Ce dernier est maintenu en place grâce à un pont salin (liaisons hydrogène et interaction électrostatique) avec le groupe guanidinium d'Arg463. Le substrat interagit avec le site actif par les interactions de l'amine primaire avec l'ion  $\text{Zn}_2^{2+}$ , du carbonyle de la liaison scissile du substrat avec  $\text{Zn}_1^{2+}$  (qui joue le rôle d'acide de Lewis) et avec une lysine (qui joue le rôle d'acide de Brønsted). Ensuite, a) l'activation de la molécule d'eau par l'ion bicarbonate et les deux ions zinc lui permet de jouer le rôle du catalyseur basique. b) L'addition nucléophile de l'ion hydroxyde ainsi formé sur la fonction carbonyle de la liaison amide du substrat conduit à un intermédiaire tétraédrique, stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène. c) L'acide carbonique joue

<sup>21</sup> S. McGowan *et al.*, *Natl. Acad. Sci.* **2010**, 9, 2449-2454

<sup>22</sup> H. Kim *et al.*, *Biochemistry* **1993**, 24, 8465-8478

<sup>23</sup> H. Kim *et al.*, *Biochemistry* **1993**, 32, 8465-8478

<sup>24</sup> H. Kim *et al.*, *Adv. Enzymol. RAMB* **1994**, 68, 153-213



Malgré une homologie de séquence faible ( $\approx 30\%$ ), ces enzymes ont une homologie de site actif de l'ordre de  $80\%$ .<sup>28, 29</sup>

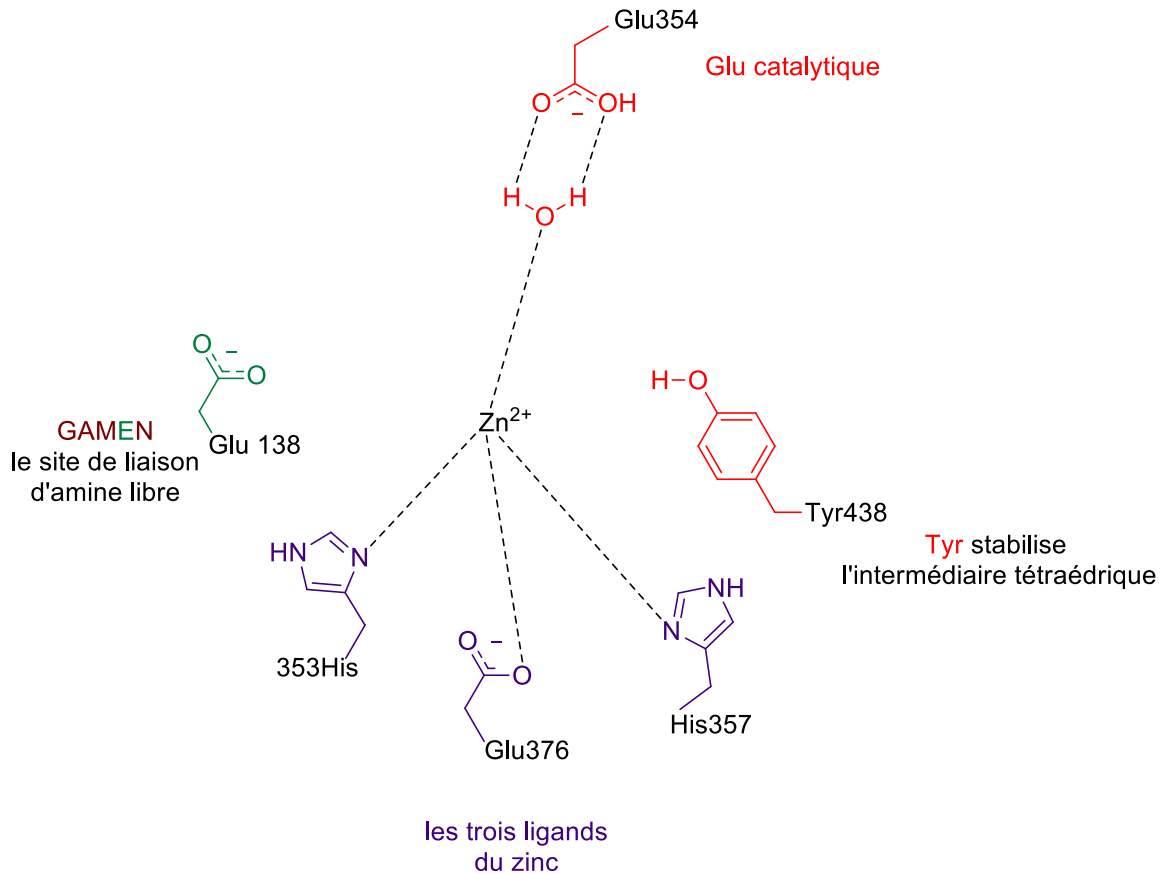


Figure 13 : Reconnaissance spécifique du substrat : Les acides aminés conservés dans la famille M1 ; la numérotation est celle utilisée pour ERAP1 (PDB : 2YD0)

### Homologie de repliements

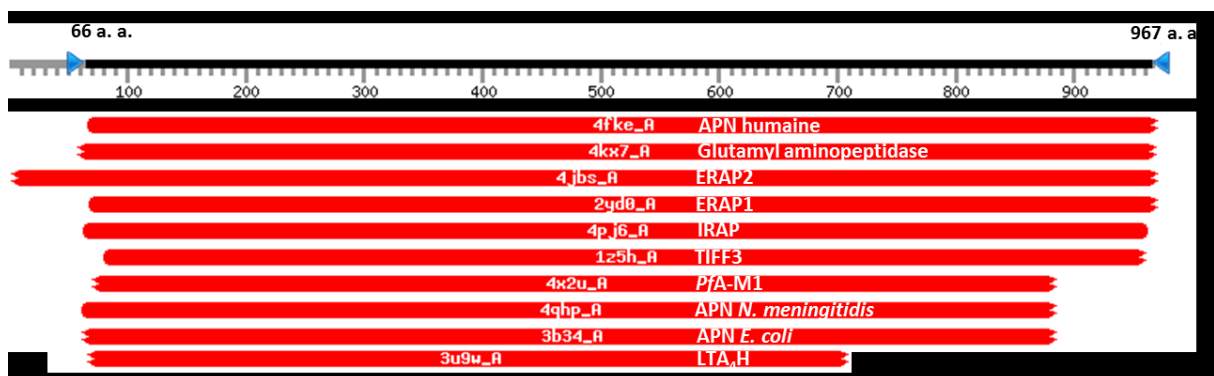


Figure 14 : alignement HHpred de quelques membres de la famille M1 par rapport à la structure de l'APN humaine (967 acides aminés) ; le code PDB et le nom de chaque protéine sont indiqués

<sup>28</sup> B.W. Matthews *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 8030-8044

<sup>29</sup> M. A. Holmes *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 623-639

Les membres de cette famille ont un repliement tridimensionnel similaire comme le prouve l'alignement HHpred (Figure 14)<sup>17</sup>.

Toutes les enzymes de la famille M1 s'organisent en trois ou quatre domaines, qui ont la forme d'un hippocampe<sup>1</sup> (Figure 15). Le domaine I correspond au domaine N-terminal. Le domaine II est le domaine catalytique qui contient le site actif dont l'ion zinc. Le repliement de ce domaine est conservé au sein de cette famille (80% d'homologie de repliement) et est très proche de l'endopeptidase Thermolysine ([EC.3.4.24.27]) qui est considéré comme leur ancêtre commun (Figure 16).

Le site actif forme une cavité au cœur d'un réseau d'hélices  $\alpha$  enfouie dans la protéine. Le domaine III est absent chez certaines métalloprotéases de cette famille (notamment LTA<sub>4</sub>H, APB, APO et RNPL1). Le domaine IV correspondant au domaine C-terminal, est le moins conservé au sein des différentes espèces.

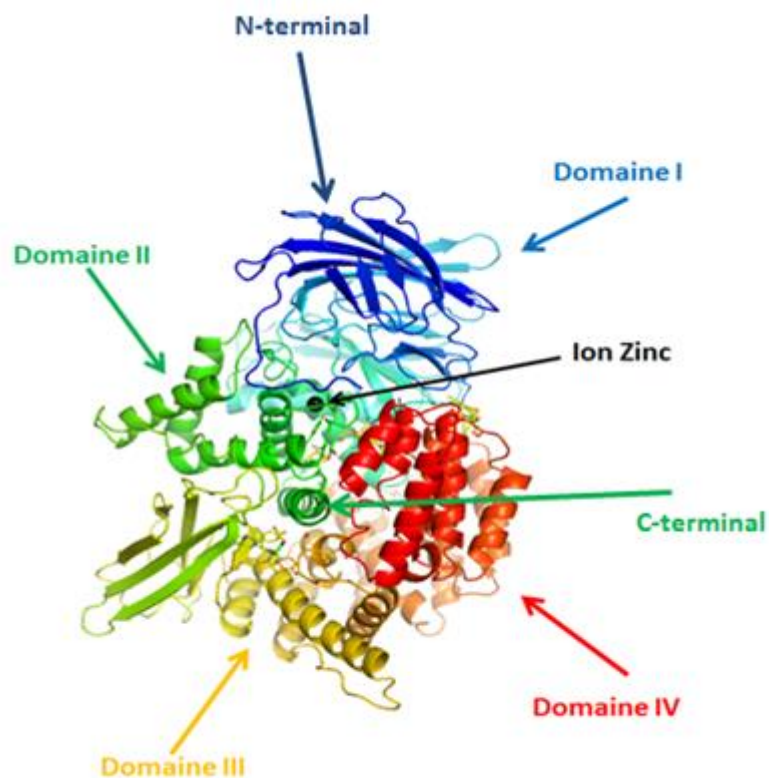


Figure 15 : les 4 domaines des aminopeptidases de la famille M1 (ici PfA-M1, PDB : 3EBG) ; visualisation de la protéine via PyMOL Molecular Graphics System.



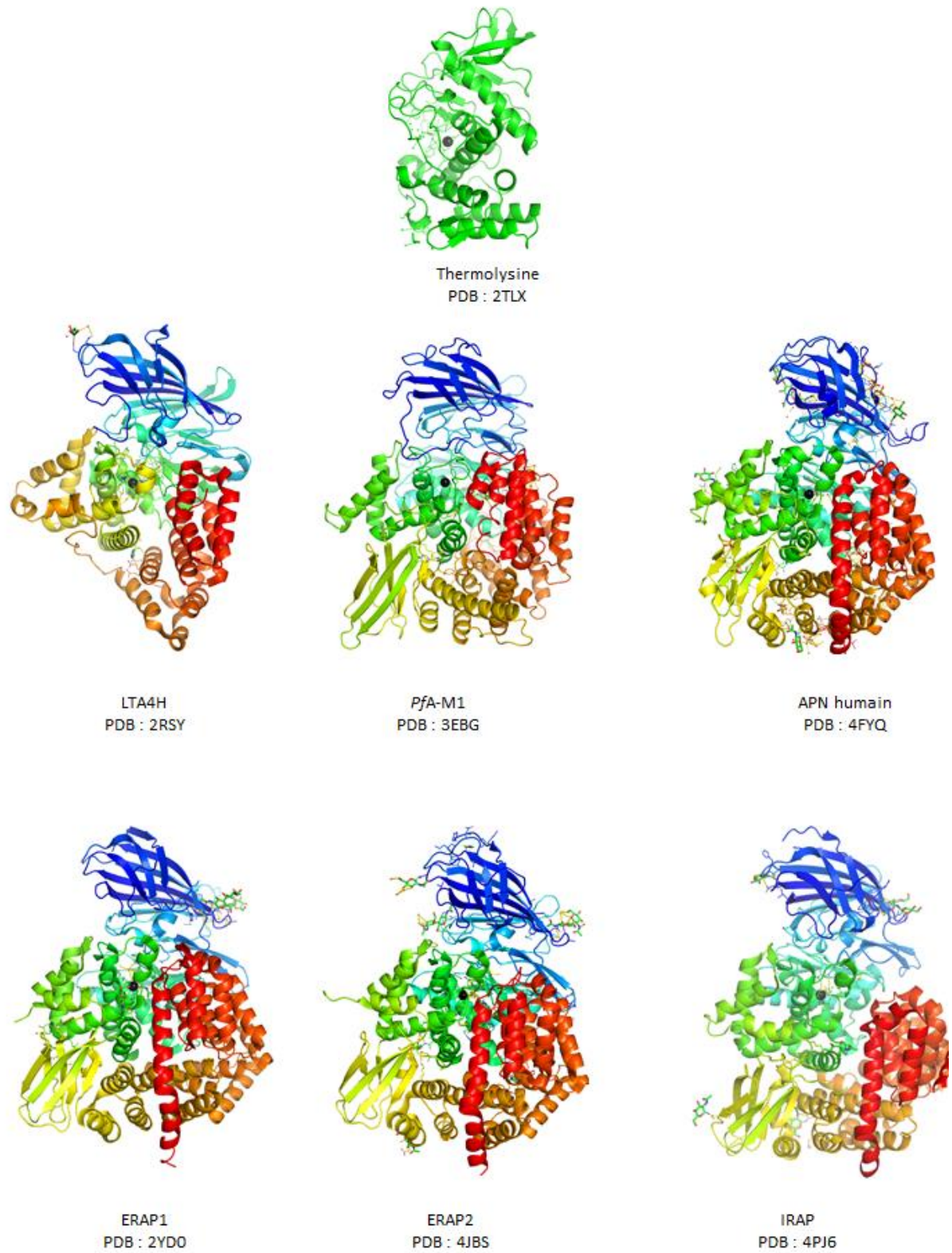


Figure 16 : structure tridimensionnelle de quelques aminopeptidases de la famille M1 et de la Thermolysine ; avec l'ion zinc en noir ; logiciel PyMOL



## Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des aminopeptidases M1 est illustré en Figure 17.

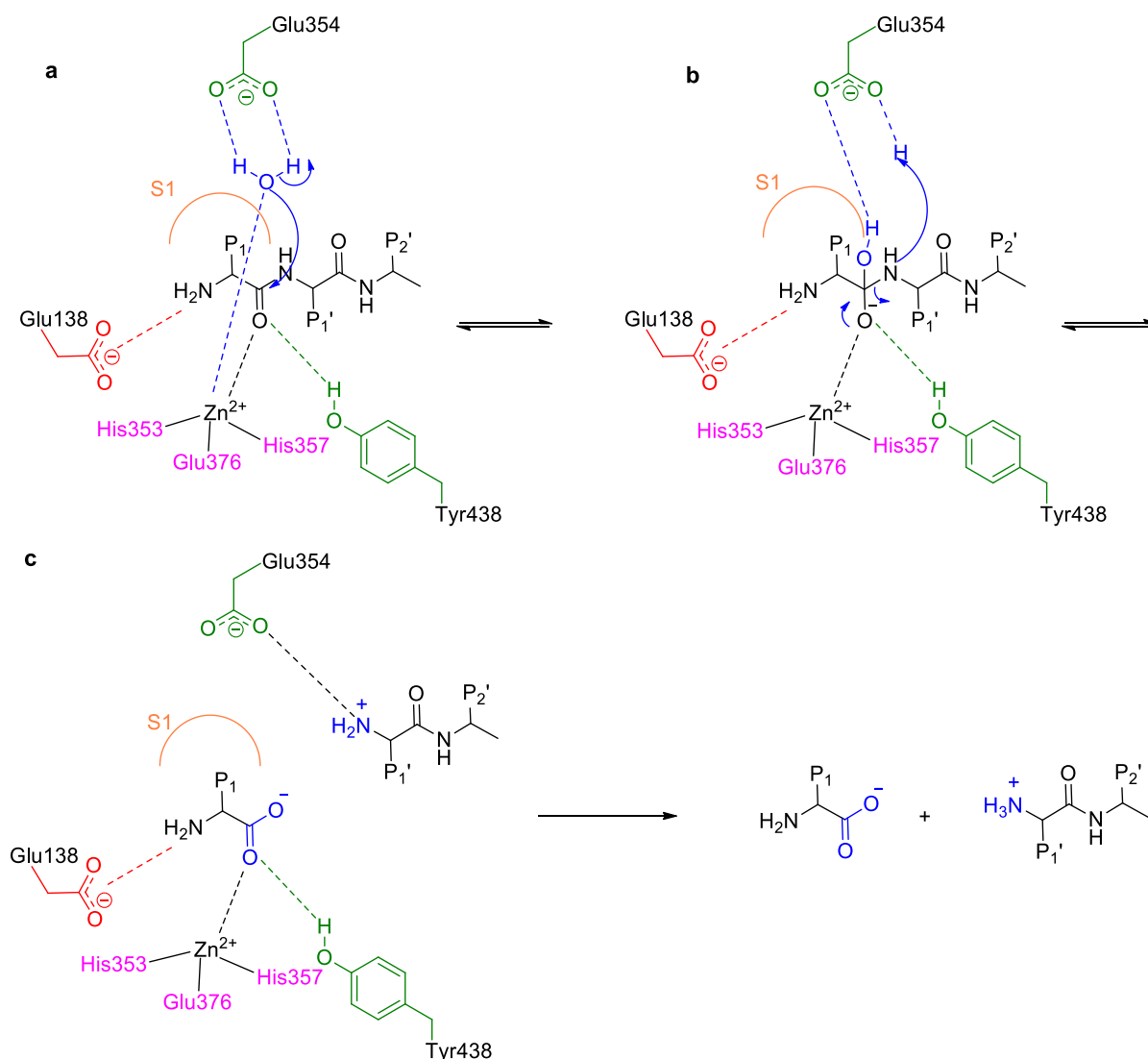


Figure 17 : mécanisme catalytique proposé pour les métallo-aminopeptidases de la famille M1, La numérotation est celle utilisée pour ERAP1 (PDB : 2YD0)

Il implique une catalyse générale acide/base dans laquelle le premier acide glutamique du motif HEXXH<sub>18</sub>E joue le rôle de « navette de proton » (acide aminé catalytique). Le substrat est correctement positionné dans le site actif grâce à l'acide glutamique du motif GAMEN et interaction P<sub>n</sub>-S<sub>n</sub>, P<sub>n'</sub>-S<sub>n'</sub>. Le substrat déplace la molécule d'eau liée à l'ion zinc vers l'acide glutamique catalytique. L'ion zinc devient pentacoordonné (a). La molécule d'eau est activée à la fois par l'ion zinc et par l'acide glutamique catalytique, résultant en une diminution du pK<sub>a</sub> de la molécule d'eau aux environs de 6. Ce phénomène engendre la formation *in situ* d'un ion hydroxyde HO<sup>-</sup>. Le carbonyle de la liaison amide du substrat est activé par l'ion zinc (jouant le rôle d'un acide de Lewis) et par une liaison hydrogène avec la tyrosine. L'addition nucléophile de l'ion hydroxyle sur cette fonction carbonyle conduit à un intermédiaire tétraédrique (b) stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène dont notamment avec Tyr438. L'acide glutamique catalytique joue alors le rôle d'acide et protonne l'atome d'azote de l'intermédiaire tétraédrique, conduisant à la rupture de la liaison C-N (c).

La famille **M1** des aminopeptidases sera considérée en détail dans les travaux présentés. Notre travail s'est porté sur cinq enzymes de cette famille: **PfA-M1, APN, IRAP, ERAP1 et ERAP2**.

### Structure et spécificité de substrat des aminopeptidases de la famille M1

Les aminopeptidases de la famille M1 possèdent une large spécificité pour l'acide aminé en position N-terminale (P1) de leurs substrats peptidiques. Cette spécificité de substrat est conférée par la cavité interne S1 qui entoure le site catalytique<sup>30</sup>.

En effet, le sous-site S1 est décrit comme un cylindre flexible et hydrophobe. Plusieurs facteurs peuvent influencer la spécificité de cette cavité :

- 1- Le potentiel électrostatique local du sous-site S1 avec notamment la présence de résidus polaires coiffant S1.
- 2- La présence d'un résidu en extension du domaine GAMEN (XGAMEN) (selon le Tableau 2) très variable en taille et en polarité et situé à l'entrée de cette poche<sup>31</sup>.
- 3- Egalement à prendre en compte la dynamique conformationnelle au sein du site catalytique<sup>32,33,34,35</sup>.

	XGAMEN
APN	AGAMEN
PfA-M1	VGAMEN
ERAP1	SGAMEN
ERAP2	PGAMEN
IRAP	AGAMEN

Tableau 2 : résidu variable à l'entrée de la cavité S1<sup>33</sup>.

La présence du résidu Glu572, coiffant la cavité S1 de PfA-M1 et appartenant à une boucle flexible,<sup>36,37</sup> confère une préférence d'hydrolyse pour les acides aminés terminaux chargés positivement (Lys, Arg) ainsi que (Leu et Ala) et les autres acides aminés<sup>38</sup> (Figure 18, Tableau 3).

<sup>30</sup> A. Adlagatta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13339-13344

<sup>31</sup> C. Schalk *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 311, 42-46

<sup>32</sup> T. Nguyen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 2537-2542

<sup>33</sup> G. Kochan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 7745-7750

<sup>34</sup> L. Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 17966-17971

<sup>35</sup> H. M. Wong *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 36801-36813

<sup>36</sup> G. Velmourougane *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1655-1666

<sup>37</sup> M. B. Harbut *et al.*, *PNAS* **2011**, 108, 526-534

<sup>38</sup> S. Dalal *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 26004-26012

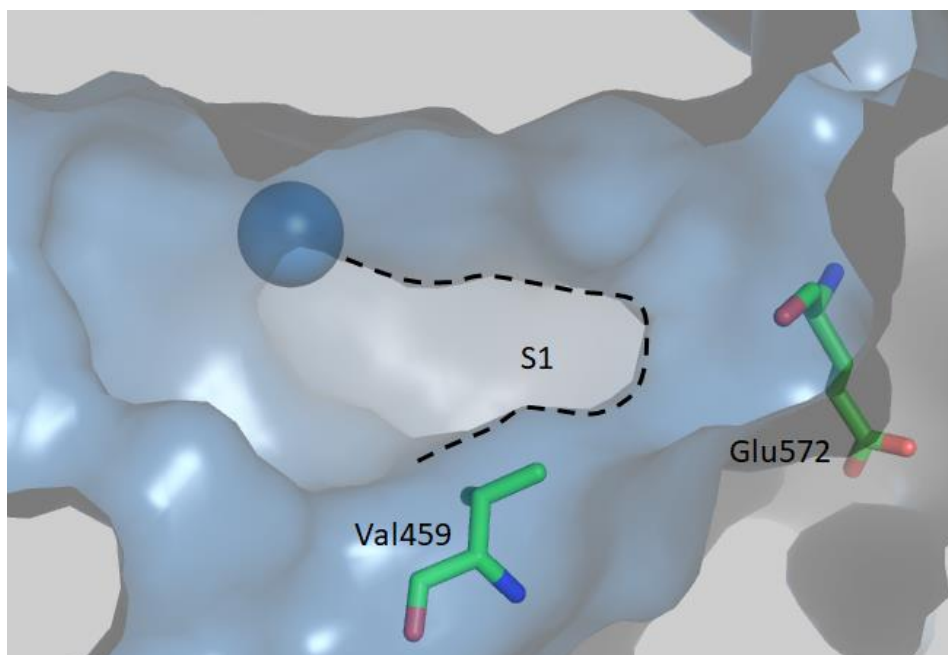


Figure 18 : Sous-site S1 du PfA-M1 (PDB : 3EBH) coiffé par Glu572 et contenant Val459 en extension du domaine GAMEN à l'entrée de S1

aminopeptidase M1	Spécificité de substrat favorisé en fonction de sous-site S1
PfA-M1	<u>Lys</u> , <u>Arg</u> , Leu, Ala et la plus part des acides aminés
APN	<u>Ala</u> , Phe, Tyr, Leu, et la plus part des acides aminés inclue Pro (slow)
ERAP1	<u>Leu</u> , et la plus part des acides aminés inclue Met, Cys, Phe
ERAP2	<u>Arg</u> , <u>Lys</u>
IRAP	<u>Cys</u> , Leu et la plus part des acides aminés

Tableau 3 : spécificité de substrat en fonction des acides aminés en position N-terminal chez APN, ERAP1, ERAP2, IRAP et PfA-M1.

En revanche, la sous-famille des oxytocinase<sup>39</sup> (ERAP1, ERAP2 et IRAP) ne tolèrent l'hydrolyse ni des chaînes latérales P1 encombrées (Val, Ile, Thr), ni des chaînes latérales P1 chargées négativement, dû à un potentiel électrostatique local de S1 plutôt chargé négativement<sup>40</sup>.

Ainsi, la forte charge négative de S1 chez ERAP2 (Glu177 et Asp198 dans la cavité S1 d'ERAP2) et l'encombrement stérique de l'entrée de cette cavité (Pro333) lui confèrent une préférence pour les acides aminés linéaires et positifs (Lys et Arg) (Figure 19, A). Par contre, la cavité S1 chez ERAP1 est plus large (due à la présence du Ser316) avec une charge négative (provenant de la présence de Glu865) ce qui lui attribue une préférence pour les résidus hydrophobes et aromatiques (Figure 19, B). IRAP montre la même spécificité de substrat qu'ERAP1 et ERAP2 en plus des acides aminés cycliques sauf Trp<sup>41</sup>. Cette spécificité d'IRAP est dû à la flexibilité du domaine GAMEN de ce dernier qui varie selon la conformation ouverte (inactive) et fermé (active) en créant une large cavité S1 quand l'enzyme est sous sa forme ouverte<sup>38</sup> (Figure 19, C et D). (Tableau 3, Tableau 2)

<sup>39</sup> Tonioka, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 32275-32283

<sup>40</sup> E. Zervoudi *et al.*, *J. Biochem.* **2011**, 435, 411-420

<sup>41</sup> S.J. Hermans *et al.*, *Protein. Science* **2015**, 24, 190-199

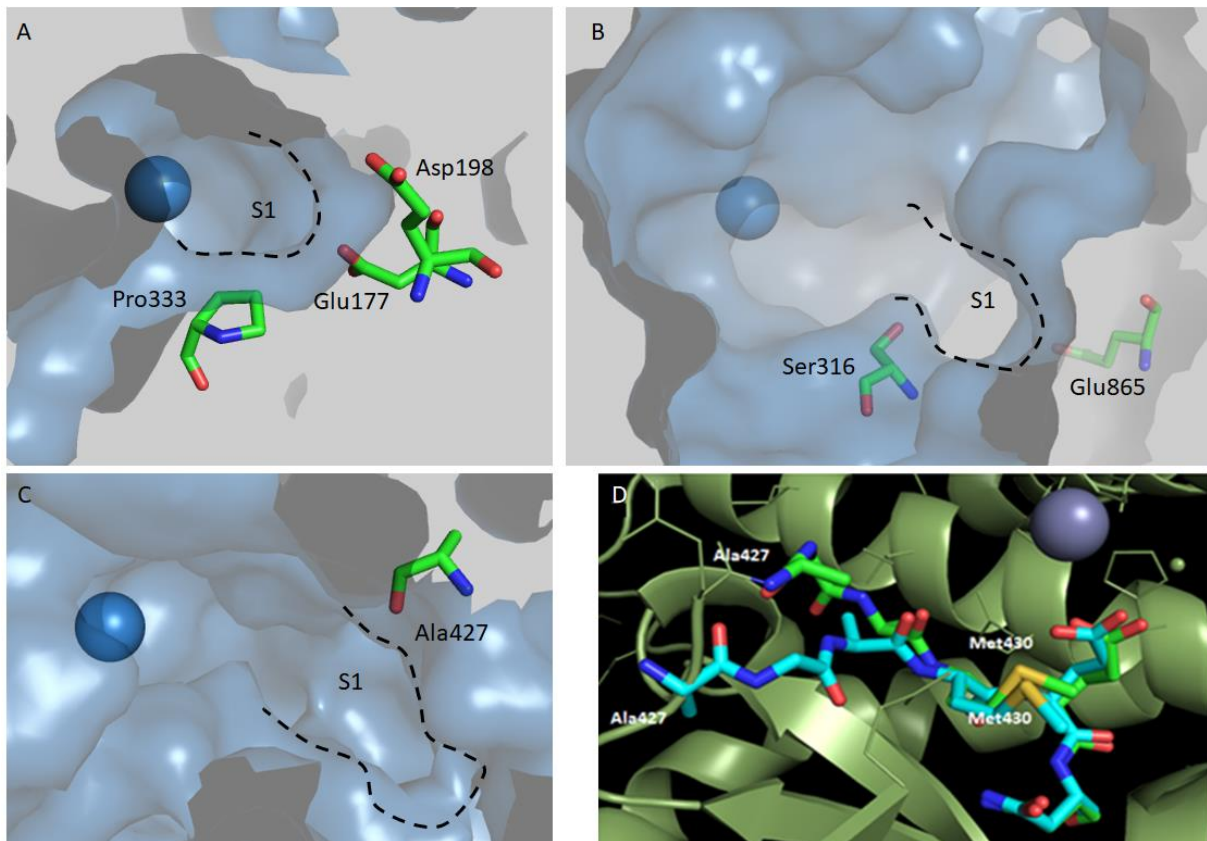


Figure 19 : A) sous-site S1 d'ERAP2 (PDB : 5AB0) coiffé par Glu177, Asp198 et contenant Pro333 en extension du domaine GAMEN à l'entrée de S1. B) sous-site S1 d'ERAP1 (PDB : 2XDT) coiffé par Glu865 et contenant Ser316 en extension du domaine GAMEN à l'entrée de S1. C) sous-site S1 d'IRAP (PDB : 4Z7I) contenant Val427 en extension du domaine GAMEN à l'entrée de S1. D) superposition du domaine AGAMEN avec l'extension Alanine AGAMEN, en bleu IRAP sous forme ouvert (PDB : 4Z7I) et en vert IRAP sous forme fermé (PDB : 5MJ6), dans le site actif d'IRAP (PDB : 5MJ6) montrant la flexibilité du domaine GAMEN chez cette enzyme

Le sous-site S1 de l'APN humaine dévoile une plasticité particulière due à la présence d'un résidu Phe896, appartenant à une boucle flexible de 8 résidus (<sup>891</sup>YGGGSFSF<sup>898</sup>) dans le domaine IV, qui restreint l'accès à cette cavité dans sa conformation « fermée ». Dans ce cas S1 peut être considéré comme un sous-site petit et peu profond<sup>42</sup>. En revanche, sous sa forme « ouverte » le Phe896 est éloigné du domaine catalytique. Lors de la liaison du ligand, cette poche S1 pourrait subir un changement conformationnel majeur via le mouvement de la boucle flexible 891-898 et révéler ainsi un sous-site S1 hydrophobe plus volumineux. L'APN a montré ainsi une préférence d'hydrolyse pour les acides aminés hydrophobe et aussi l'arginine et la lysine<sup>43</sup>. (Figure 20)

<sup>42</sup> C. Santiago *et al.*, *Sci. Rep.* **2017**, 10, 46045-46059

<sup>43</sup> J.K. McDonal *et al.*, *Mammalian Proteases* **1986**, 2, 59 -71

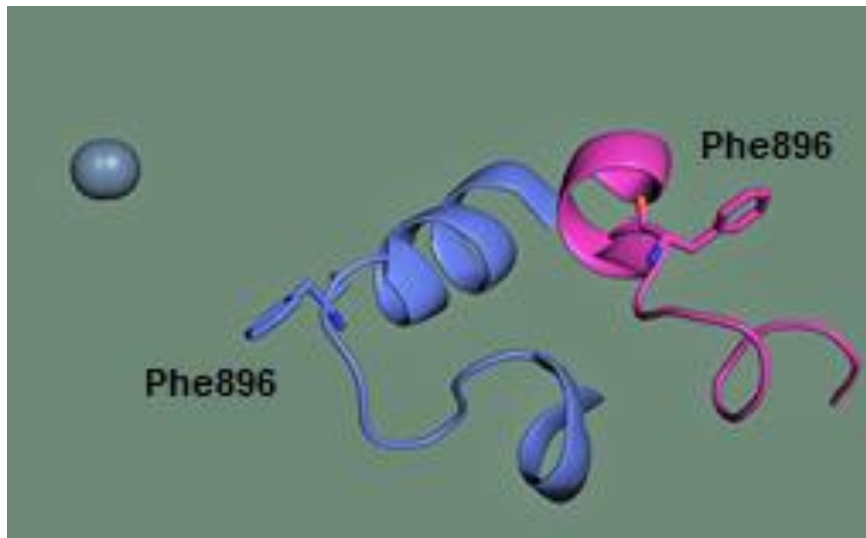


Figure 20 : flexibilité de la boucle (<sup>891</sup>YGGGSFSF<sup>898</sup>) par superposition de la forme fermée en bleu (PDB : 4FYT) et de la forme ouverte en rose (PDB : 4HOM) dans le site active d'APN.

La similarité du mécanisme d'hydrolyse et de la spécificité de substrat pour la famille **M1** et **M17** rend la recherche d'inhibiteurs sélectifs d'une de ces deux familles un défi complexe et difficile.

Toutes ces aminopeptidases jouent des rôles biologiques importants, tant lors de processus normaux que dans des désordres métaboliques ou infections bactériennes/virales/parasitaires. Leurs implications dans ces différentes pathologies rendent ces enzymes d'excellentes candidates pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques ou comme marqueur de diagnostique ou de pronostique.

### Rôles métaboliques et pathologies

Ces enzymes jouent des rôles biologiques importants dans le système de l'angiotensine, celui du système immunitaire, et enfin lors du processus de l'inflammation comme l'indique le Tableau 4<sup>1</sup>.

<b>M1 aminopeptidases</b>	<b>Rôles biologiques</b>	<b>Pathologies associés</b>
<b>APN</b>	Métabolisme des peptides régulateurs de divers types cellulaires. Dégradation des peptides hormonaux (angiotensine III et IV, des neuropeptides et des chimiokines). Régulation de l'angiogénèse, de la motilité cellulaire et de l'adhérence cellulaire. Récepteur virale.	douleurs, maladies inflammatoires, cancer et infection des voies respiratoires supérieures.
<b>IRAP</b>	Dégradation des hormones peptidiques (ocytocine, vasopressine, l'angiotensine III). Maintien de l'homéostasie pendant la grossesse. Inactivation des peptides neuronaux (encéphaline et la dynorphine).	AVC ischémique, démence, maladie d'Alzheimer et troubles cognitifs
<b>ERAP1/2</b>	Présentation des antigènes aux molécules du CMH classe I	Maladies auto-immunes (spondylarthrite ankylosante, psoriasis, maladie de Crohn ...)
<b>PfA-M1</b>	Catabolisme de l'hémoglobine de l'hôte du Plasmodium	Paludisme

Tableau 4 : fonctions biologiques des enzymes d'intérêt de la famille M1

## L'APN

### Caractéristiques de l'APN

C'est une ectoenzyme fortement glycosylée (20% de sa masse), avec un poids moléculaire de 280 KDa<sup>44</sup>. Elle se compose de 967 acides aminés.

Elle peut être exprimée à la surface de différentes cellules telles que les monocytes, les cellules épithéliales de l'intestin et du rein, les membranes synaptiques dans le système nerveux central, les fibroblastes<sup>45</sup>. L'APN est sous forme d'homodimère. Le domaine structural correspondant au site actif se situe dans la partie C-terminale de la chaîne peptidique, exposé au milieu extracellulaire. L'enzyme est ancrée dans la membrane plasmique des cellules par une hélice hydrophobe constituée d'environ 30 acides aminés N-terminaux<sup>46</sup> (Figure 21).

<sup>44</sup> V.M. Watt *et al.*, *Hum. Genet.* **1990**, 85, 651-654

<sup>45</sup> X. Zhang, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5981-5987

<sup>46</sup> P. Mina-Osorio *et al.*, *Trends. mol. Med.* **2008**, 14, 8, 361-371

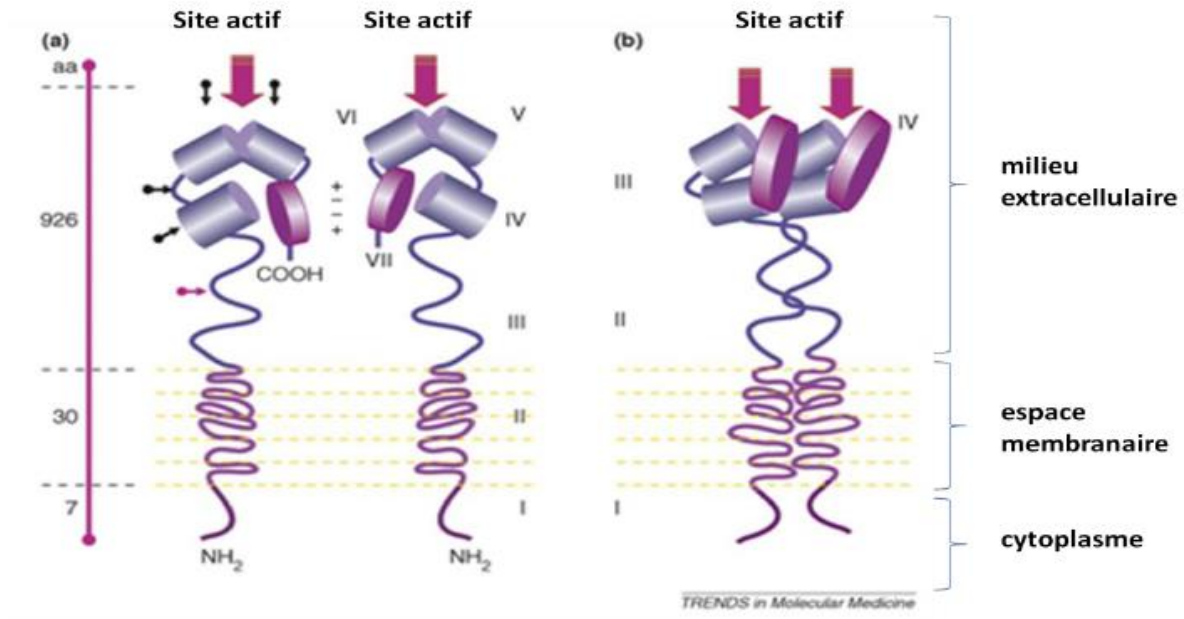


Figure 21 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'APN humaine<sup>41</sup>

### Rôles biologiques de l'APN<sup>41</sup>

L'APN est considérée comme une enzyme multifonctionnelle, elle est impliquée dans plusieurs processus biologiques :

**Récepteur viral** : L'APN est bien connue comme récepteur viral chez plusieurs espèces (coronavirus humain 229E (HCoV-229E), et d'autres coronavirus animaux)<sup>34,47</sup>.

**Régulateur d'enzyme** : L'APN règle l'activité de nombreux peptides qui participent à des processus biologiques importants : elle intervient dans la régulation des enképhalines<sup>48</sup> (neurotransmetteurs), des protéines de la matrice extracellulaire<sup>49</sup> et des cytokines<sup>50</sup>.

**Transducteur de signaux** : L'APN fonctionne comme un transducteur de signal, processus par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit. L'APN joue également un rôle dans la phagocytose, puisqu'elle est surexprimée sur des phagocytes, ainsi que dans l'adhésion cellulaire<sup>51</sup>.

**Récepteur impliqué dans l'endocytose** : L'endocytose est le mécanisme de transport de molécules ou de particules (virales, bactériennes, etc.) vers l'intérieur de la cellule.

L'APN joue également un rôle dans la différenciation cellulaire, la motilité des cellules tumorales et leurs capacités invasives, ainsi que dans la prolifération et le phénomène de l'apoptose<sup>41</sup>.

### Intérêt thérapeutique

L'APN est surexprimée sur des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse ainsi que sur certaines cellules tumorales, dont notamment les cellules tumorales du côlon. L'APN apparaît donc comme

<sup>47</sup> A. F. Kolb *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, 440, 61–67

<sup>48</sup> B. Giros, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* **1986**, 29, 281-287

<sup>49</sup> I. Saiki, *Int. J. Cancer* **1993**, 54, 137-143

<sup>50</sup> T. Hoffmann, *FEBS Lett.* **1993**, 336, 61-64

<sup>51</sup> N. Tokuda *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1996**, 211, 244-250



une cible thérapeutique potentielle intéressante en oncologie. Interférer avec l'activité catalytique de l'APN permettrait de ralentir le processus d'angiogenèse et de migration cellulaire.

### *PfA-M1 et le paludisme*

#### Caractéristiques de l'aminopeptidase M1 *Plasmodium falciparum* (PfA-M1)

Le gène de PfA-M1 encode pour une protéine de 1085 acides aminés, avec un poids moléculaire de 126 KDa. La localisation de l'enzyme dans le parasite n'est pas encore bien déterminée et reste une question sensible. En effet, certaines études proposent la localisation de PfA-M1 dans le cytosol du parasite<sup>52</sup>, alors que d'autres suggèrent sa présence à la fois dans le cytosol et dans la vacuole digestive<sup>53</sup>. Ainsi, Dalal et Klemba ont proposé que l'enzyme soit ancrée dans la membrane de la vacuole et que la partie catalytique soit du côté du cytosol<sup>54</sup>.

#### Le Paludisme

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus importante chez l'homme. L'organisation mondiale de la santé a estimé en 2015 qu'il y aurait eu 214 millions de cas, dont 438 000 décès<sup>55</sup>.

Cette maladie est due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à une autre par des piqûres de moustique femelle infectée du genre *Anophèles*. Cinq types de *Plasmodium* sont responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* et ***Plasmodium falciparum*** (le plus répandu et le plus mortel). Le parasite a un cycle de vie complexe en deux phases : une phase asexuée chez l'homme appelé **incubateur** (schizogonie) et une phase sexuée chez le moustique appelé **vecteur** (gamogonie).

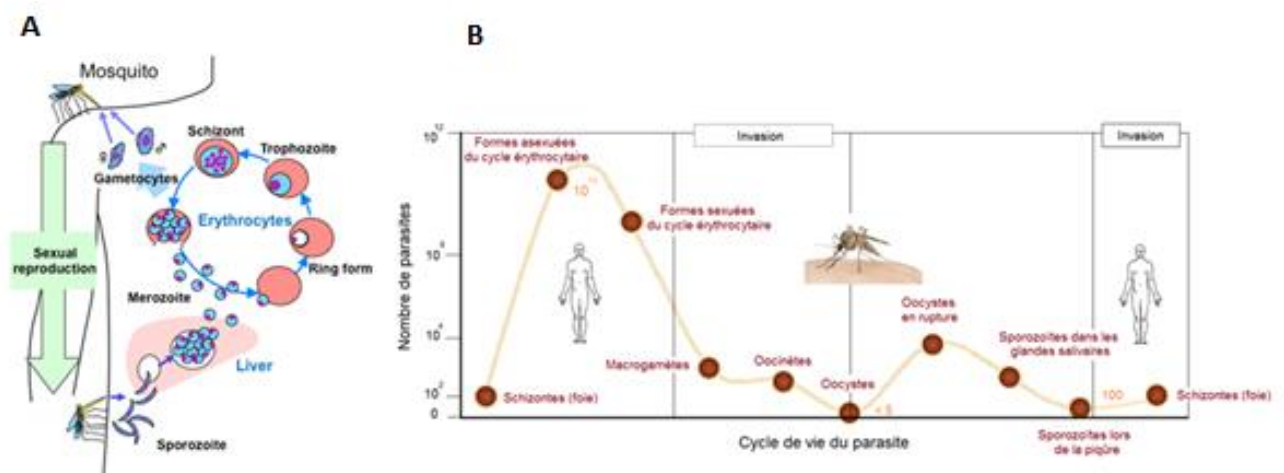


Figure 22 : cycle de vie et de reproduction du parasite *Plasmodium*

Après infections, les parasites (sporozoïtes) diffusent dans la circulation sanguine et migrent vers le foie. Dans le foie les sporozoïtes suivent le cycle hépatique où ils se divisent pour donner naissance à des nouveaux parasites, les mérozoïtes. Cette phase d'amplification intra-hépatique dure environ dix jours et est asymptomatique. Elle s'achève par l'éclatement des hépatocytes infectés permettant la libération des parasites dans le sang. Les mérozoïtes, libérés dans le sang, envahissent les globules

<sup>52</sup> I. Florent *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol* **1998**, 97, 149-160

<sup>53</sup> O. Azimzadeh *et al.*, *J. Malar* **2010**, 9, 189-205

<sup>54</sup> S. Dalal *et al.*, *J. Biol. Chem* **2007**, 282, 35978-35987

<sup>55</sup> World Malaria Report **2014**, World Health Organization, 1-242



rouges, et marque le début du cycle érythrocytaires. Les parasites suivent plusieurs stades : anneaux, trophozoïtes, schizontes et rosaces. C'est un processus cyclique de 48 heures pour *P. falciparum*, allant de l'invasion d'un globule rouge à son éclatement, permettant ainsi la libération d'une trentaine de nouveaux mérozoïtes qui pourront coloniser d'autres globules rouges. Une certaine partie de ces parasites vont se différencier en gamétocytes qui pourront être ingérés à nouveau par un vecteur *Anophèles* (Figure 22, A). L'éclatement des globules rouges lors du cycle érythrocytaire est à l'origine des nombreux symptômes cliniques du paludisme dont l'anémie jusqu'à la mort cérébrale. Ainsi, le nombre de parasite évolue rapidement durant le cycle érythrocytaire jusqu'au 10<sup>11</sup> parasites (Figure 22, B). Ces raisons font que le cycle érythrocytaire est la cible de nombreux médicaments antipaludique.

### Moyens de lutte actuels

Il existe plusieurs moyens de lutte antipaludique :

- **Lutte anti-vectorielle**<sup>56</sup> : repose principalement sur l'utilisation des moustiquaires à imprégnation durable, et des pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent.
- **Recherche d'un vaccin**<sup>57, 58</sup> : aujourd'hui, aucun vaccin n'est disponible contre le paludisme. Le parasite est très complexe et à chaque stade, le parasite est porteur d'antigènes différents qui induisent des réponses immunitaires variées. Trois stratégies de vaccination sont à l'étude : des vaccins pré-érythrocytaires, des vaccins érythrocytaires et des vaccins bloquant la transmission.

La recherche de vaccins pré-érythrocytaires est la plus avancée. Ils ont pour but de protéger contre la première étape de l'infection paludéenne, étape durant laquelle les sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes et s'y développent. Ces vaccins vont provoquer une réponse immunitaire qui empêchera soit l'infection, soit la maturation et la multiplication du parasite si l'infection des hépatocytes a débuté.<sup>59</sup>

Dans cette catégorie, le candidat vaccin pré-érythrocytaire **RTS,S/AS01**, actuellement en phase clinique III, est le plus avancé de tous les vaccins candidats.<sup>60, 61, 62</sup>

- **L'arsenal thérapeutique actuel** est réparti en quatre classes principales de médicaments (Figure 23) : les dérivés **quinoléines** (chloroquine, amodiaquine, primaquine, quinine, méfloquine), les **anti-folates** (sulfadoxine, pyriméthamine, proguanil), les **naphthoquinones** (atovaquone) et plus récemment les dérivés d'**artémisinine** (artémisinine, dihydroartémisinine, artéméther, artésunate). Certains antibiotiques ont également des propriétés antipaludéennes.

<sup>56</sup> P. A. Buffet *et al.*, *Blood* **2011**, 117, 381-392

<sup>57</sup> D. I. Stanicic *et al.*, *Trends Parasitol.* **2013**, 29, 612-622

<sup>58</sup> D. G. Heppner ; *Trav. Med. Infect. Dis.* **2013**, 11, 2-7

<sup>59</sup> P. E. Duffy *et al.*, *Expert Rev. Vacc.* **2012**, 11, 1261-1280

<sup>60</sup> The RTS, S Clinical Trials Partnership; *N. Engl. J. Med.* **2012**, 367, 2284-2295

<sup>61</sup> The RTS, S Clinical Trials Partnership; *PLoS Med.* **2014**, 11(7): e1001685

<sup>62</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=RTS%2CS%2FAS01+&Search=Search>

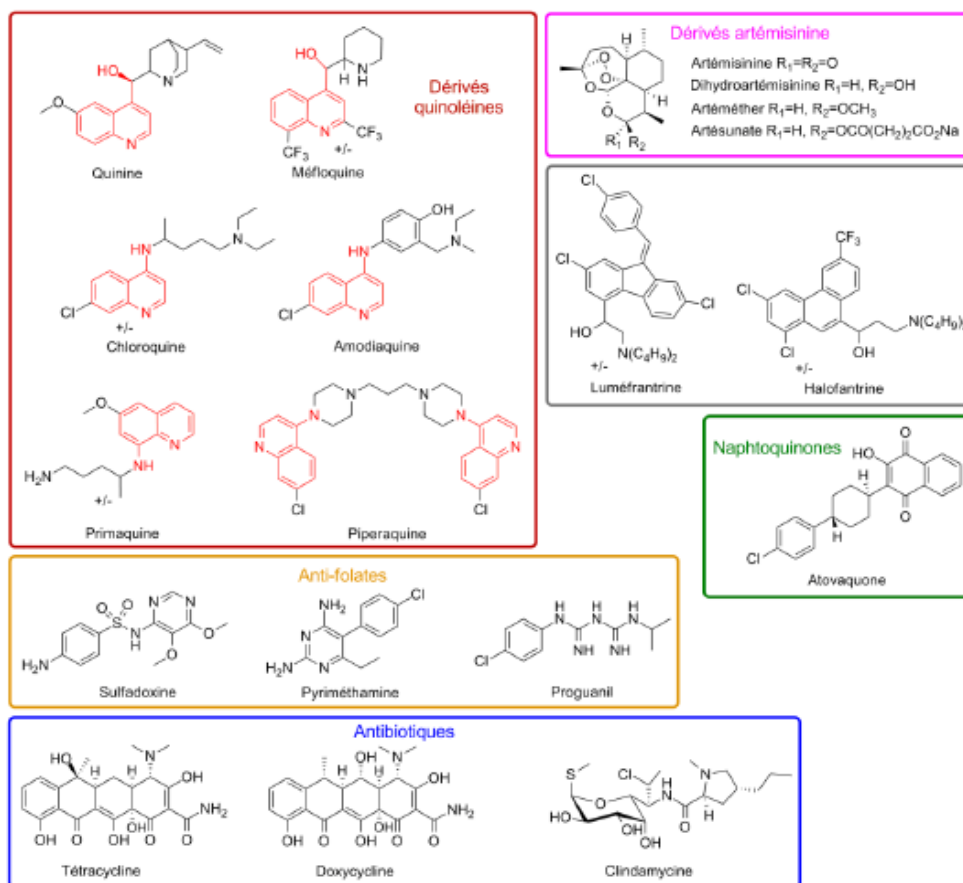


Figure 23 : principales molécules antipaludéennes

### Intérêt thérapeutique

En 2005, l'OMS a recommandé l'utilisation de **combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine** (CTA) pour le traitement des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*. Selon le rapport 2016 de l'OMS, cette recommandation, de 2005 à 2016, a conduit à une diminution du nombre de nouveau cas de 37% et à un net recul (60%) du nombre de décès. Cependant, les efforts pour le contrôle et l'éradication du paludisme sont menacés par le développement des phénomènes de résistance que ce soit de l'Anophèles vis-à-vis des insecticides ou de *Plasmodium* vis-à-vis de tous les médicaments utilisés actuellement. Ces phénomènes de résistance encouragent la communauté scientifique à découvrir de nouveaux agents antipaludéens ou de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les aminopeptidases (*PfA-M1* et *PfA-M17*) semblent être des cibles prometteuses participant à la dernière étape de la dégradation de l'hémoglobine pendant la phase intra-érythrocytaire du cycle de vie de *Plasmodium*. Ce catabolisme de l'hémoglobine a pour but de fournir les acides aminés essentiels au métabolisme du parasite (*Plasmodium* ne fabrique pas *de novo* des acides aminés). Il a été démontré que l'inhibition de *PfA-M1* et *PfA-M17*, par la bestatine, bloque la croissance *in vitro* de différentes espèces de *Plasmodium*<sup>63, 64, 65, 66, 67, 68</sup>. Des tentatives de Knock-Out sur le gène de *PfA-*

<sup>63</sup> M. B. Harbut *et al.*, *PNAS* **2011**, 108, 526-534

<sup>64</sup> C. M. Stack *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 2069-2080

<sup>65</sup> S. McGowan *et al.*, *PNAS* **2010**, 107, 2449-2454

<sup>66</sup> S. Dalal *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 35978-35987

<sup>67</sup> C. S. Gavigan *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, 117, 37-48

<sup>68</sup> M.F. Nankya-Kitaka *et al.*, *Parasitol. Res.* **1998**, 84, 552-558

M1 ou sur le gène de *PfA-M17* conduisent à l'inhibition du développement du parasite<sup>48</sup>. De plus, étant donné que *PfA-M1* et *PfA-M17* sont codées par des gènes n'existant qu'en une seule copie et qu'aucune autre aminopeptidase neutre n'a été détectée chez *P. falciparum*, ces deux enzymes ne présentent pas de redondance fonctionnelle, à l'inverse des endoprotéases de la vacuole digestive qui interviennent lors des premières étapes du catabolisme de l'hémoglobine<sup>69, 70</sup>.

Tous ces résultats indiquent que *PfA-M1* et/ou *PfA-M17* sont deux cibles prometteuses pour le développement d'une nouvelle classe d'agents antipaludéens<sup>71</sup>.

### Les oxytocinases : ERAP1, ERAP2 et IRAP

#### ERAP1 et ERAP2

#### ERAP1/2 et Spondylarthrite Ankylosante

ERAP1 et ERAP2 sont des protéines fortement glycosylées, de hauts poids moléculaires et qui ont une forte homologie de séquence primaire ( $\approx 50\%$ ). Ces enzymes se trouvent dans la lumière du réticulum endoplasmique<sup>72</sup> associées sous forme d'homodimère ou d'hétéro-dimère<sup>73</sup> chez l'homme. Il est à noter qu'ERAP2 est absent chez les rongeurs.

Ces deux enzymes ont une spécificité de substrat différente et jouent un rôle essentiel dans la présentation des antigènes aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I, appelé système HLA chez l'Homme).

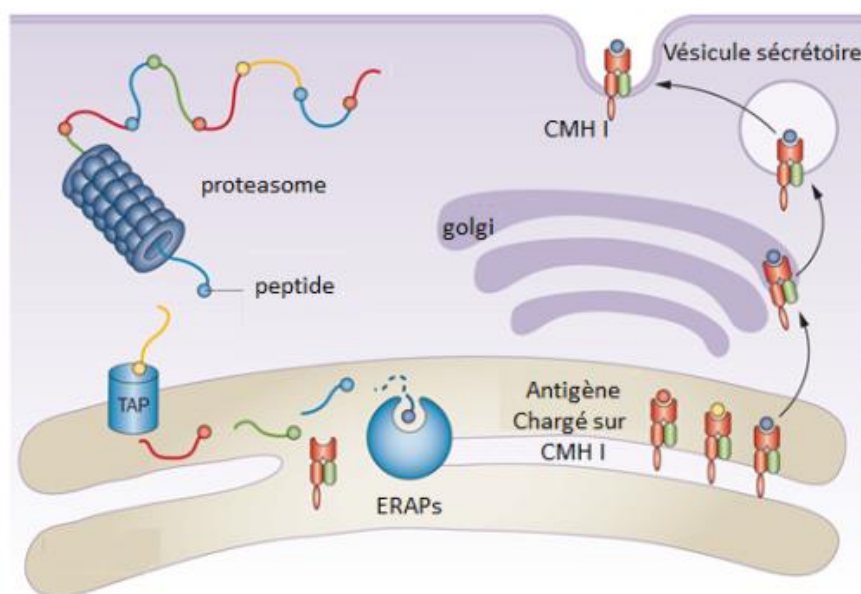


Figure 24 : processus de présentation des antigènes aux molécules du CMH-I par ERAP1/2. Au début des protéines du soi ou virales vont être prédécoupés, dans le cytosol, en peptides de plus ou moins grandes tailles par le protéasome. Ensuite, ces peptides vont entrer dans la lumière du réticulum endoplasmique via le transporteur TAP (Transporter of antigen processing). Dans le réticulum endoplasmique, ERAPs clivent les peptides en position N-terminale, pour leur

<sup>69</sup> J. Liu *et al.*, *PNAS* **2006**, 103, 8840-8845.

<sup>70</sup> A. L. Omara-Opyene *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 54088-54096.

<sup>71</sup> J. González-Bacero *et al.*, *Curr. Drug Targets* **2014**, 15, 1144-1165.

<sup>72</sup> N. D. Rawlings *et al.*, *MEROPS*. **2012**, 40, D343-D350.

<sup>73</sup> L. Saveneau *et al.*, *Nat. Immuni.* **2005**, 6, 689-697

donner la taille requise afin de s'enchâsser dans le sillon formé par les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  composants les protéines du CMH -I. Le complexe formé est alors acheminé jusqu'à la surface de la cellule où il sera reconnu par les lymphocytes T<sup>74</sup>.

Les protéases dégradent les protéines endogènes dans le cytosol en fragments peptidiques. Ces peptides, de tailles 9-16 acides aminés de longueur, sont transportés dans le réticulum endoplasmique par la protéine transporteur associée au processus antigénique TAP<sup>75</sup>. Dans le réticulum endoplasmique ERAP1 reconnaît alors les peptides de longueur comprise entre 9 et 16 résidus avec une préférence pour des résidus hydrophobes en position C-terminale du peptide. Ensuite, ERAP1 hydrolyse ces peptides en fragment plus petit de 8-11 a.a. Ces derniers se lient sur les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité pour qu'ils soient présentés au lymphocyte T à la surface cellulaire. Selon la (Figure 24).

La longueur du peptide entre 9-16 a.a. est importante afin d'induire le changement conformationnel nécessaire pour déclencher l'activité catalytique d'ERAP1. En effet Chand *et al.*<sup>76</sup> propose un modèle d'action d'ERAP1 appelé « molecular ruler » (Figure 25). Selon ce modèle, les peptides de longueur comprise entre 9 et 16 résidus ont une taille suffisante pour interagir à la fois avec le site allostérique (en position C-terminale du substrat peptidique) et le site actif de l'enzyme (en position N-terminale du substrat peptidique). Cette double interaction déclenche le changement conformationnel (forme « ouverte » vers forme « fermée ») et l'hydrolyse du substrat peptidique en position N-terminale.

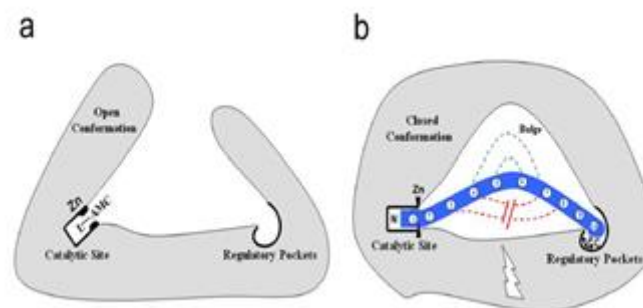


Figure 25 : mécanisme d'action d'ERAP1 pour cliver les peptides. La forme a) est la forme ouverte (inactive) et la forme b) est la forme active d'ERAP1. Le changement conformationnel est dû à l'ancrage simultané d'une chaîne peptidique de longueur convenable dans le site allostérique et dans le site catalytique de l'enzyme.

### *Spondylarthrite ankylosante (SA)*

La spondylarthrite ankylosante peut être considérée comme la forme emblématique des spondylarthropathies, et également comme la plus sévère sur le plan structural. C'est un rhumatisme inflammatoire chronique et douloureux. Elle se caractérise par une inflammation principalement au niveau des articulations sacro-iliaques et de la colonne vertébrale suivie par une fusion progressive des os. Cette fusion provoque un enraidissement progressif très invalidant pour le patient (Figure 26).

La SA peut également atteindre les articulations périphériques et est associée à une atteinte d'organe spécifique comme l'uvéite antérieure, le psoriasis et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Les patients souffrent souvent des symptômes de maux de dos, d'arthrite et de rigidité progressive de la colonne vertébrale, sans diagnostic clair pendant de

<sup>74</sup> A. Fierabracci *et al.*, *Auroimmun. Rev.* **2012**, 12, 281-288

<sup>75</sup> P. M. van Endert *et al.*, *Immunity* **1994**, 1, 491-500

<sup>76</sup> S. Chang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 17107-17112

nombreuses années<sup>77</sup>. Son diagnostic est établi par l'atteinte des articulations sacro-iliaques et mis en évidence par une radiographie du bassin.

La SA est une maladie qui touche environ 0,2% de la population<sup>78</sup>. Les études épidémiologiques indiquent qu'elle touche préférentiellement les hommes avec un ratio homme : femme de 2-3 :1 à partir de l'âge de 30 ans environ<sup>79, 80</sup>. SA est une maladie génétique et environ 90% des patients expriment le génotype HLA-B27.

HLA-B27 est une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) qui permet la reconnaissance du soi et du non-soi. Elle se localise à la surface des cellules et accepte des peptides, appelés antigènes ou épitopes (Figure 24), de taille déterminée (8-9 acides aminés) que les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques vont reconnaître ou non. S'ensuit une réponse immunitaire via libération de cytokines et destruction des cellules reconnues comme du non soi.

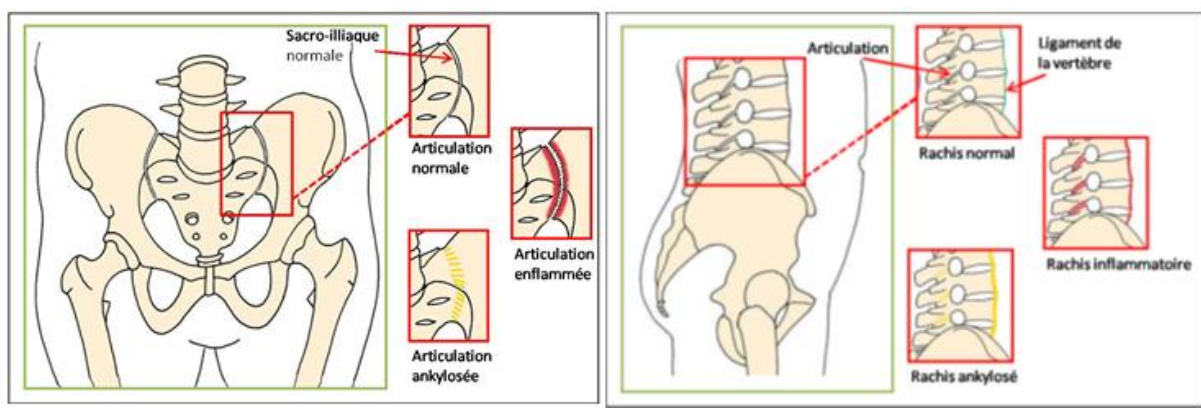


Figure 26 : L'articulation sacro-iliaque et La colonne vertébrale normale, enflammée et ankylosée

### Traitements actuels

Il n'y a pas de traitements curatifs pour la Spondylarthrite Ankylosante<sup>10, 81, 82</sup>.

**Le traitement symptomatique :** Le traitement symptomatique est un traitement visant à réduire les douleurs et raideurs et ainsi à prévenir les complications de la maladie. Il s'agit des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (comme: ibuprofène), utilisés pour réduire l'inflammation articulaire et pour améliorer la mobilité ainsi que des analgésiques opioïdes (codéine, morphine).

**Le traitement de fond :** Le traitement de fond agit directement sur la réponse du système immunitaire en la réduisant, ce sont les immunosuppresseurs comme les anti-rhumatismaux (ex : le méthotrexate qui bloque l'action de l'acide folique, la ciclosporine qui bloque les lymphocytes quiescents en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire, ou la sulfasalazine puissant anti-inflammatoire) et

<sup>77</sup> M. Dougados *et al.*, *Lancet*. **2011**, 377, 2127-2137

<sup>78</sup> R. Fischer *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, 11, M 111

<sup>79</sup> U.Kiltz *et al.*, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1946**, 137, 1745-1747

<sup>80</sup> G. Slobodin *et al.*, *Clin Rheumatol.* **2011**, 30, 1075-1080

<sup>81</sup> D. Bond *et al.*, *Nurs. Stand. R. Coll. Nurs. G. B.* **2013**, 28, 52-59

<sup>82</sup> P. C. Robinson *et al.*, *Mol. Immunol.* **2014**, 57, 2-11

les anti-TNF $\alpha$ <sup>83</sup> (Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ ) est un médiateur faisant partie du groupe des cytokines, qui est notamment produit par les lymphocytes T et les macrophages activés).

#### *HLA B27 et SA.*

La pathogénèse de la spondylarthrite est mal connue. En 1973, des études ont montré que le gène codant pour la protéine HLA-B27 constitue le facteur génétique important pour développer une SA<sup>84</sup>. Cette expression représente environ 37% du risque génétique total<sup>85</sup>. Il est présent dans 90% des cas de spondylarthrite<sup>86</sup>. Malgré sa forte association à la SA, HLA-B27 n'est pas un facteur suffisant pour développer une SA..

D'autres gènes ont récemment été mis en avant comme le gène IL23R (Interleukin 23 Receptor) et le gène ARTS1 qui code pour la protéine ERAP1.<sup>87, 88, 89, 90, 91, 92, 93</sup>

#### *Intérêt thérapeutique d'ERAP1 et ERAP2*

Des études d'association génétique pangénomique ou GWAS (Genome-Wide Association Study) ont récemment révélé que certains SNP (Single Nucleotide Polymorphism ou Polymorphisme d'un seul nucléotide) au sein du gène codant pour ERAP1 et ERAP2, peuvent aggraver ou au contraire protéger contre la SA.<sup>94, 95</sup> Il a été montré que la protection contre SA correspond à l'inactivation ou à une diminution de l'activité catalytique d'ERAP1. En plus, des études ont montré que l'association entre ERAP1 et SA est considérée uniquement chez les patients qui possèdent HLA-B27<sup>96, 97, 98</sup>. Ces résultats laissent suggérer que l'inhibition d'ERAP1 pourrait être une cible intéressante dans le traitement de la SA<sup>99</sup>. Ainsi, il a été proposé que ERAP1 et ERAP2 fonctionnent de façon complémentaire dans le processus de présentation des antigènes au système immunitaire donc l'inhibition sélective d'ERAP2 sera une cible importante pour élucider son rôle dans la régulation de la réponse immunitaire.

## IRAP

### *Caractéristique d'IRAP*

IRAP est une ectoenzyme dont la partie N-terminale, formée d'une séquence de 110 acides aminés, est située dans la région intracellulaire (rôle essentiel dans l'endocytose et la circulation). La partie transmembranaire est constituée de 22 acides aminés et est située dans le segment transmembranaire hydrophobe. Enfin, la partie extracellulaire est composée d'une séquence de 893

<sup>83</sup> H. S. Hreggvidsdottir et al., *Mol. Immunol.* **2014**, 57, 28-37

<sup>84</sup> D. A. Brewerton et al., *Lancet.* **1973**, 1, 904-907

<sup>85</sup> S. H. Laval et al., *Hum. Genet.* **2001**, 68, 918-926

<sup>86</sup> M. A. Khan et al., *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2002**, 16, 675-690

<sup>87</sup> N. Haroon et al., *Curr. Rheumatol. Rep.* **2012**, 14, 383-389

<sup>88</sup> D. J. Reveille et al., *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, 70 Suppl, i 44-50

<sup>89</sup> B. Chen et al., *Med. Hypothesis.* **2013**, 80, 36-38

<sup>90</sup> A. Kadi et al., *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, 72, 608-613

<sup>91</sup> D. M. Evans et al., *Nat. Genet.* **2001**, 43, 761-767

<sup>92</sup> M. Cherciu et al., *Tissue Antigens* **2013**, 82, 192-196

<sup>93</sup> N. Garcia-Medel et al., *Mol. Cell. Proteomics MCP.* **2012**, 11, 1416-1429

<sup>94</sup> R. Chen et al., *Rheumatol. Int.* **2012**, 32, 909-914

<sup>95</sup> B. F. Bettencourt et al., *Rheumatol. Oxf. Engl.* **2013**, 52, 2168-2121

<sup>96</sup> M. A. Brown et al., *Brief Funct. Genomic.* **2011**, 5, 249-257

<sup>97</sup> J. D. Reveille et al., *Nat. Genet.* **2010**, 2, 123-127

<sup>98</sup> A. Cortez et al., *Nat. Genet.* **2013**, 45, 730-738

<sup>99</sup> S. Keidel et al., *Curr. Opin. Immunol.* **2013**, 25, 97-102



acides aminés contenant le site catalytique de l'enzyme<sup>100</sup>. IRAP est exprimée dans divers tissus de mammifères, comme le cœur, le cerveau, les reins, les glandes surrénales et les vaisseaux sanguins<sup>101</sup>. On la trouve aussi dans les tissus adipeux localisés dans des vésicules qui contiennent le transporteur de glucose GLUT4.<sup>102</sup> Dans le cerveau IRAP est très présente dans les aires associées aux fonctions cognitives et sensori-motrices<sup>103</sup> et elle a été identifiée comme site de liaison pour l'angiotensine IV (Ang IV)<sup>104</sup>.

### *L'angiotensinogène*

L'angiotensinogène, une glycoprotéine, est le seul précurseur protéique de la famille des angiotensines I, II, III, IV et angiotensine-(1-7). L'angiotensinogène circulant provient essentiellement des hépatocytes, mais cette pro-hormone est aussi synthétisée dans le cerveau, le cœur, les vaisseaux, les reins et les adipocytes.

### *Le Système Rénine-Angiotensine*

Dans le système rénine-angiotensine (SRA), nous nous sommes intéressés à l'angiotensine IV et à ses effets sur la mémoire, l'apprentissage et l'irrigation des organes par le sang après un AVC ischémique. En général, le SRA est un système biologique impliqué de façon centrale dans la régulation de la pression artérielle (PA) et de l'homéostasie des liquides et des électrolytes<sup>105</sup>. Le SRA a été décrit comme un système circulant avec trois composants: la rénine sécrétée par le rein, l'angiotensinogène par le foie et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) par l'endothélium vasculaire selon la Figure 27.

La rénine circulante transforme l'angiotensine en angiotensine I (Ang I), qui est un peptide inactif. L'enzyme ECA transforme l'Angiotensine I (Ang I) en Angiotensine II (Ang II), qui est un peptide physiologiquement actif et un puissant vasoconstricteur. D'autres enzymes comme les chymases produites dans le cœur, constituent une voie parallèle de synthèse de l'Ang II, l'hormone peptidique la plus puissante du SRA. Ang II est reconnue comme un neuromodulateur cérébral qui induit la rétention d'eau et l'élévation de la pression artérielle par stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>R.<sup>106</sup>

Ang III se forme rapidement à partir de l'Ang II via l'aminopeptidase A. L'Ang III est considérée comme l'analogue le moins puissant de l'Ang II sur le récepteur AT<sub>1</sub>R<sup>107</sup>. Padia *et al.*<sup>108</sup> ont montré que l'Ang III provoque les effets natriurétiques chez le rat via le récepteur angiotensine II AT<sub>2</sub>R.

L'Ang (1-7) peut se former directement à partir de l'hydrolyse de l'Ang I par l'aminopeptidase neutre. Alternativement l'ACE 2 peut cliver l'acide aminé C-terminal de l'Ang I ou de l'Ang II pour

---

<sup>100</sup> A. Albitson *et al.*, *Pharmacol. Ther.* **2007**, 116, 417-427

<sup>101</sup> M. Yamazato *et al.*, *Hypertensio*, **2007**, 49, 926-931

<sup>102</sup> R. Keller *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23612-23618

<sup>103</sup> J. Wright *et al.*, *J. Renin Angiotensine Aldosterone Syst*, **2008**, 9, 26-237

<sup>104</sup> R. A. Lew *et al.*, *J. Neurochem.* **2003**, 86, 344-350

<sup>105</sup> J. L. Lavoie *et al.*, *Endocrinolog* **2003**, 144, 2179-2183

<sup>106</sup> M. Saaverda *et al.*, *Cell. Mol neurobiol.* **2005**, 25, 485-512

<sup>107</sup> M. de Gasparo *et al.*, *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 415-472

<sup>108</sup> S. Padia *et al.*, *Hypertension* **2007**, 49, 625-630

former l'Ang (1-9) [précurseur inactif de l'Ang (1-7)] ou l'Ang (1-7) respectivement<sup>109</sup>. L'Ang (1-7) est responsable de la vasodilatation, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, la libération de la vasopressine et l'homéostasie des fluides et des électrolytes<sup>110</sup>.

L'Ang IV se forme par le clivage de l'Ang III par l'aminopeptidase B ou N. Il est bien établi depuis la fin des années 1980 que l'Ang IV exerce des effets centraux dans l'apprentissage et dans la mémoire.<sup>111</sup> Plusieurs études montrent que l'Ang IV induit la vasodilatation<sup>112</sup>. L'Ang IV entraîne une augmentation du flux sanguin cérébral et rénal<sup>113</sup>. Il a été également rapporté un rôle possible de l'Ang IV dans la réparation ou le remodelage vasculaire.<sup>114</sup>

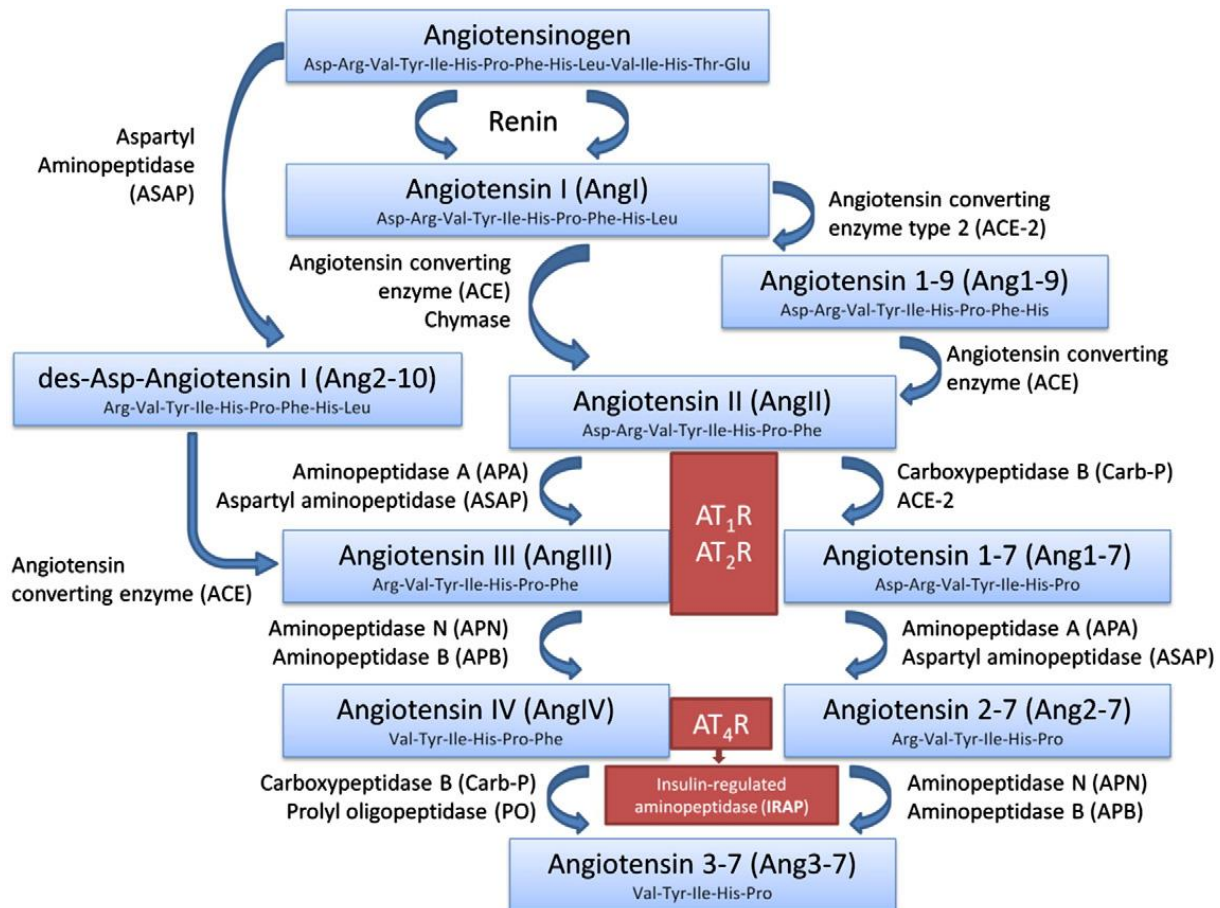


Figure 27 : schéma simplifié du système RSA. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), angiotensine I (Ang I), angiotensine II (Ang II), angiotensine III (Ang III), l'aminopeptidase A (APA), L'Aminopectidase N (APN), angiotensine IV (Ang IV), récepteurs d'angiotensine AT<sub>1</sub>R, AT<sub>2</sub>R et AT<sub>4</sub>R. Le récepteur AT<sub>4</sub>R a été proposé comme étant l'aminopeptidase à insuline (IRAP).

<sup>109</sup> E. Jones *et al.*, *Pharmacol. Ther.* **2008**, 120, 292-316

<sup>110</sup> M. A. Santos *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28618-28624

<sup>111</sup> S. Chai *et al.*, *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 2728-2737

<sup>112</sup> S. Chen *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **2000**, 279, 849-856

<sup>113</sup> M. Wu *et al.*, *J. Neurotroma* **1999**, 21, 149-161

<sup>114</sup> I. Moeller *et al.*, *Regul. Pept.* **1999**, 83, 25-30



### *Rôle d'IRAP et intérêt d'inhibition*

IRAP joue un rôle majeur dans la dégradation de plusieurs peptides vaso-actifs ou neuropeptides (ocytocine et vasopressine)<sup>115</sup>. L'ocytocine est un peptide formé de (Cys-Tyr-Ile-Gln-Am-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>) secrété en grande quantité chez les femmes pendant l'accouchement et l'allaitement<sup>116</sup>. La vasopressine formée de (NH<sub>2</sub>-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) et secrétée par l'hypothalamus. Elle joue un rôle antidiurétique au niveau des reins ainsi qu'un rôle vasoconstricteur<sup>117</sup>.

En outre, il a été montré qu'IRAP est une cible de liaison pour l'Ang IV, le site de liaison n'est pas déterminé. Cependant, cette interaction conduit à l'inhibition de l'activité enzymatique d'IRAP<sup>118</sup>. Par contre, l'inhibition d'IRAP joue un rôle dans l'amélioration de la mémoire et l'apprentissage spatial chez les rats<sup>119, 120, 121</sup>. Ces résultats suggèrent qu'IRAP est une nouvelle cible thérapeutique particulièrement attractive pour lutter contre les démences dont notamment la maladie d'Alzheimer<sup>122, 123</sup>.

Ces dernières années, plusieurs classes d'inhibiteurs ont été décrites dans la littérature. Classes que nous allons étudier en détail dans le chapitre suivant.

---

<sup>115</sup> J. Lew *et al.*, *Neuroscience* **2004**,124, 341-349

<sup>116</sup> S. Kalra *et al.*, *Indian. J. Endocrinol. Metab.* **2011**, 15, 156-161

<sup>117</sup> T. Berl *et al.*, *J Med.* **2015**, 372, 2207-2216

<sup>118</sup> B. Alesco-Lautier *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 405, 63-72

<sup>119</sup> K. Handa *et al.*, *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, 290-299

<sup>120</sup> E. Pederson *et al.*, *Regul. Pept.* **2001**, 102, 147-156

<sup>121</sup> J. Lee *et al.*, *Neuroscience*, **2004**, 124, 341-349

<sup>122</sup> A. Albitson *et al.*, *Behav. Brain Res.* **2004**, 154, 239-243

<sup>123</sup> R. Gard *et al.*, *Expert Rev. Neurother* **2004**, 4, 87-96

# **Chapitre 2 :**

## **Les inhibiteurs des aminopeptidases de la famille M1**

## Chapitre 2 : Les inhibiteurs des aminopeptidases la famille M1

Les inhibiteurs décrits dans la littérature sont conçus selon deux grandes stratégies. La première approche consiste à introduire un motif chélatant des ions métalliques dans un châssis moléculaire plus ou moins peptidique (Figure 28, A). La seconde approche consiste à mimer l'intermédiaire tétraédrique formé lors de l'hydrolyse de la liaison peptidique (Figure 28, B).

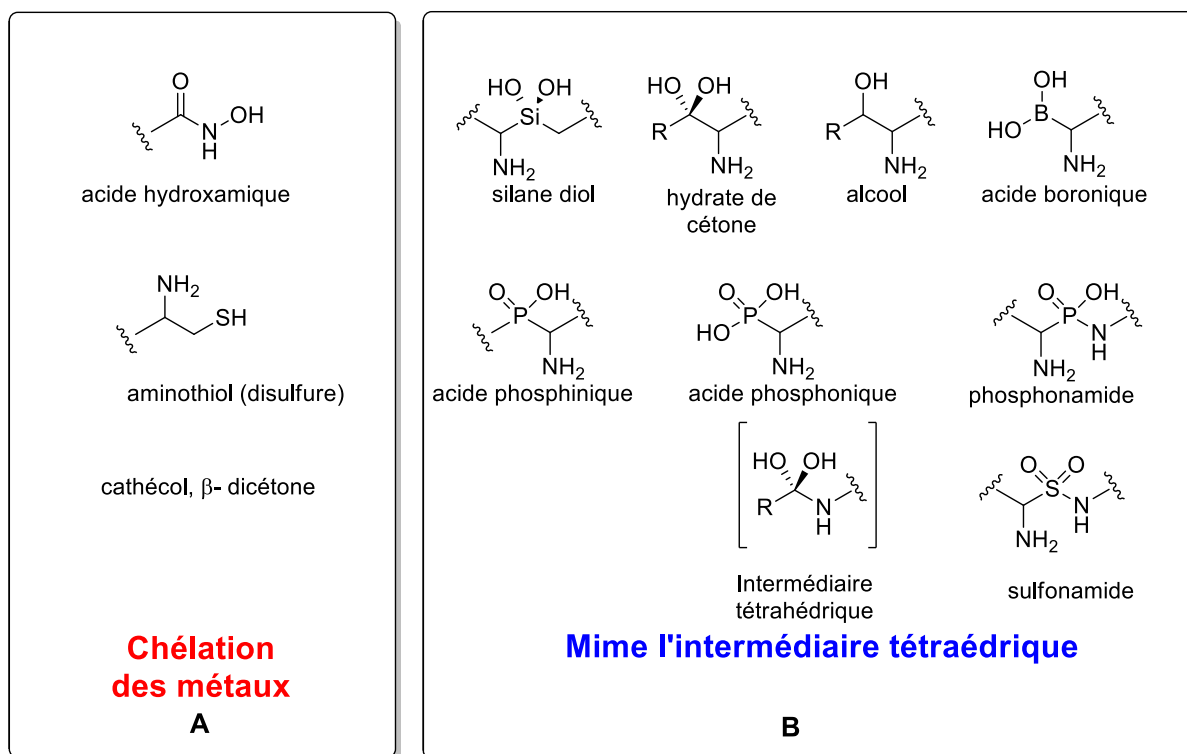


Figure 28 : stratégies d'inhibiteurs des métalloprotéases

L'existence de plusieurs familles de métalloprotéases, ayant une spécificité de substrats proches ainsi que des mécanismes catalytiques semblables, représente une difficulté pour la conception d'un inhibiteur sélectif d'une aminopeptidase donnée. Parmi les composés décrits à ce jour, peu de composés présentent une sélectivité intéressante.

### Mimes partiels de l'intermédiaires tétraédriques

#### Dérivés d' $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amino-amide

La bestatine et l'amastatine sont des substances naturelles isolées de bactéries du genre *Streptomyces*. Portant un motif ( $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amino-acide) qui peut mimer l'intermédiaire tétraédrique (selon la Figure 29). Ils sont utilisés comme des inhibiteurs compétitifs de métallo-aminopeptidases de plusieurs familles (Tableau 5) <sup>124, 125, 126, 127, 128, 129</sup>.

<sup>124</sup> H. Umezawa *et al.*, *J. Antibiot.* **1976**, 29, 97-99

<sup>125</sup> H. Suda *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, 177, 196-200

<sup>126</sup> T. Aoyagi *et al.*, *J. Antibiot.* **1978**, 31, 636-638

<sup>127</sup> S. H. Wilkes *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 13154-13162

<sup>128</sup> T. Aoyagi *et al.*, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 143-148.

<sup>129</sup> S. K. Burley *et al.*, *PNAS* **1991**, 88, 6916-6920.

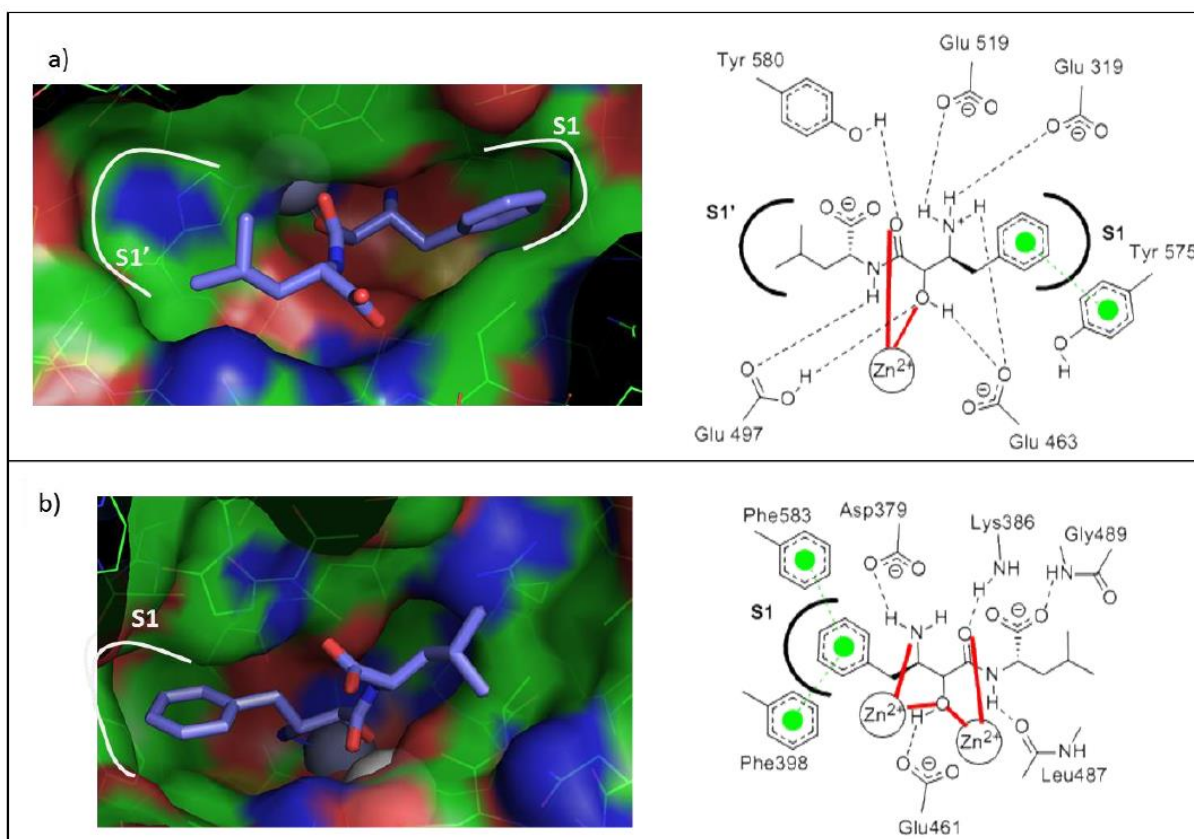


Figure 29 : a) représentation du complexe PfA-M1/bestatine (PDB 3EBH) et mode de liaison schématique ; b) représentation du complexe PfA-M17/bestatine (PDB 3KR4) et mode de liaison schématique ; ions métalliques sphères grises

Les résultats d'inhibition dans le Tableau 5 montrent l'excellente sélectivité de ces inhibiteurs vis-à-vis des aminopeptidases bimétalliques par rapport aux aminopeptidases monométalliques.

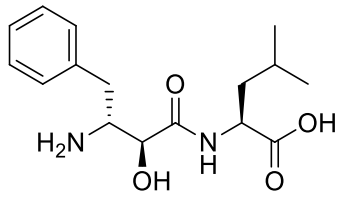
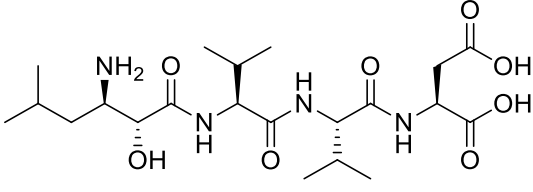
composé	Ki (μM)						
	1 ion zinc					2 ions zinc	
	APN	PfA-M1	ERAP1	ERAP2	IRAP	LAP	PfA-M17
 <p><b>Bestatine</b></p>	0,3 <sup>130</sup> - 89 <sup>131</sup>	0,2 <sup>132</sup>	11,2 <sup>133</sup>	-	-	0.00 9 <sup>134</sup>	0.025 <sup>135</sup>
 <p><b>Amastatine</b></p>	0,05	-	-	-	-	0.03 136	

Tableau 5 : inhibitions des métallo-aminopeptidases par des dérivés à cœur α-hydroxy-β-amino-acide

### Dérivés acides/esters boroniques

Les composés possédant un motif ester/acide/ boronique ont été décrits pour la première fois par Baker *et al.*<sup>137, 138</sup> comme des inhibiteurs pour l'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolitica* (APaero) (EC 3.4.11.10) (Tableau 6). Shenvi *et al.*<sup>139</sup> ont montré que le mécanisme d'interaction avec le site actif se fait en deux étapes et que l'étape déterminante correspond à la formation d'un anion boronate tétraédrique issu de l'acide boronique trigonal, (Selon la Figure 30).

<sup>130</sup> S. Tiekou *et al.* *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 44, 1725-1730

<sup>131</sup> D. Krige, *et al.*, *Cancer Res.* **2008**, 68, 6669-6679

<sup>132</sup> G. Velmourougane *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1655-1666

<sup>133</sup> J. Lee *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 181-189

<sup>134</sup> S. Harbeson.; D. Rich, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1378-1392

<sup>135</sup> Skinner-adams *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6024-6031

<sup>136</sup> S. H. Wilkes *et al.* *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 13154-13162

<sup>137</sup> J. O. Baker *et al.*, *Biochemistry* **1983**, 22, 2098-2103

<sup>138</sup> J. O. Baker *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1985**, 130, 1154-1160

<sup>139</sup> A. B. Shenvi, *Biochemistry* **1986**, 25, 1286-1291

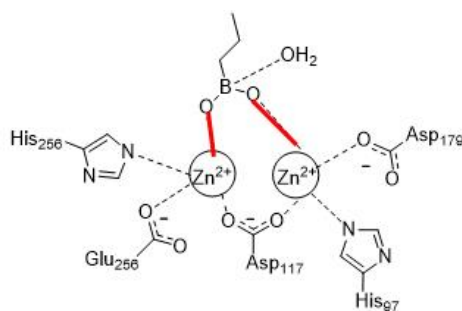
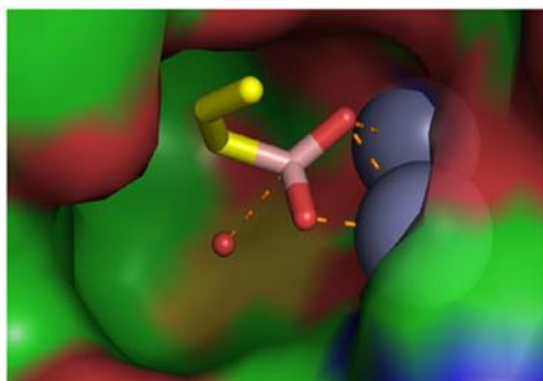


Figure 30 : représentation du complexe APAero/1-butane acide boronique (PDB 1CP6) ; ions métalliques et molécule d'eau sphères grises et rouge respectivement et mode de liaison schématisé

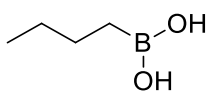
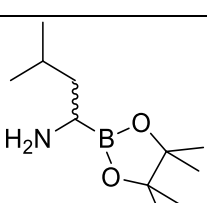
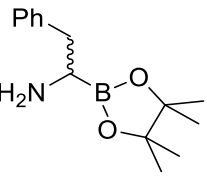
Composés	K <sub>i</sub> (μM)		
	1 ion zinc	2 ions zinc	
	APN porcine	LAP humaine	APAero
 1-butane acide boronique	-	-	9.6 <sup>132,133</sup>
 Leu-B(OH) <sub>2</sub> -pinacol	0.025 <sup>a,134</sup>	0.13 <sup>134</sup>	-
 Phe-B(OH) <sub>2</sub> -pinacol	0.020 <sup>a,134</sup>	0.050 <sup>134</sup>	-

Tableau 6 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés d'acide/ester boronique (constante d'inhibition K<sub>i</sub>) ; nd : non déterminé, a) IC<sub>50</sub>

Selon le 6, les dérivés d'acides boroniques aliphatiques décrits par Baker *et al.* ont montré une sélectivité exclusive pour les aminopeptidases bimétalliques. De plus la présence d'une amine en α de la fonction acide boronique améliore fortement l'activité inhibitrice, mais accompagnée d'une perte de sélectivité.

#### Dérives d'acides phosphiniques/phosphoniques

Certains dérivés d'acides phosphiniques/phosphoniques sont des inhibiteurs compétitifs puissants des aminopeptidases des familles M1 et M17 (Tableau 7, Tableau 8)<sup>140, 141</sup>. Les fonctions phosphonates et phosphinates ont un fort pouvoir chélatant des métaux et leur forme tétraédrique mime l'intermédiaire tétraédrique formé lors de la réaction d'hydrolyse d'un peptide. Les chaînes

<sup>140</sup> S. McGowan *et al.*, *PNAS* **2009**, 106, 2537-2542

<sup>141</sup> S. McGowan *et al.*, *PNAS* **2010**, 107, 2449-2454

latérales P1, P1' et P2' des analogues pseudo-peptides phosphiniques permettent de moduler les interactions avec les sous-sites S1, S1' et S2' des différents enzymes ciblés (selon la Figure 31). Le Tableau 7 montre quelques inhibiteurs décrits pour cibler l'APN et PfA-M1/PfA-M17.

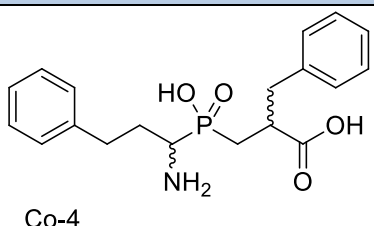
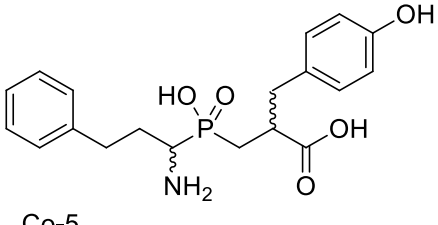
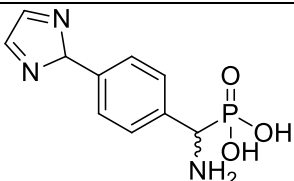
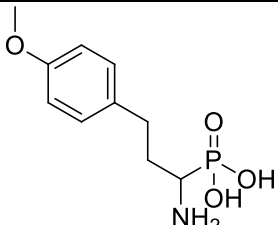
entrée	Composés	K <sub>i</sub> (μM)				IC <sub>50</sub> (μM)
		1 ion zinc		2 ions zinc		
		APN porcine	rPfA-M1	rPfA-M17	LAP porcine	Pf. 3D7
1 <sup>142</sup>	 Co-4	0.276	0.079	0.013	0.066	24±62
2 <sup>137</sup>	 Co-5	0.036	-	0.010	0.067	19±88
3 <sup>143</sup>		-	104	0.011	-	-
4 <sup>144</sup>		0.0659 <sup>a</sup>	-	-	19.5	-

Tableau 7 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés d'acide phosphinique/phosponique (constante d'inhibition K<sub>i</sub> et concentration du composé inhibant 50% de l'effet observé IC<sub>50</sub>) ; 3D7 : souche de *Plasmodium falciparum* sensible à la chloroquine; nd : non déterminé. a) hAPN

<sup>142</sup> T. S. Skinner-Adams *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6024-6031.

<sup>143</sup> S. McGowan *et al.*, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 5213-5217.

<sup>144</sup> A. Mucha *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 117, 187-196

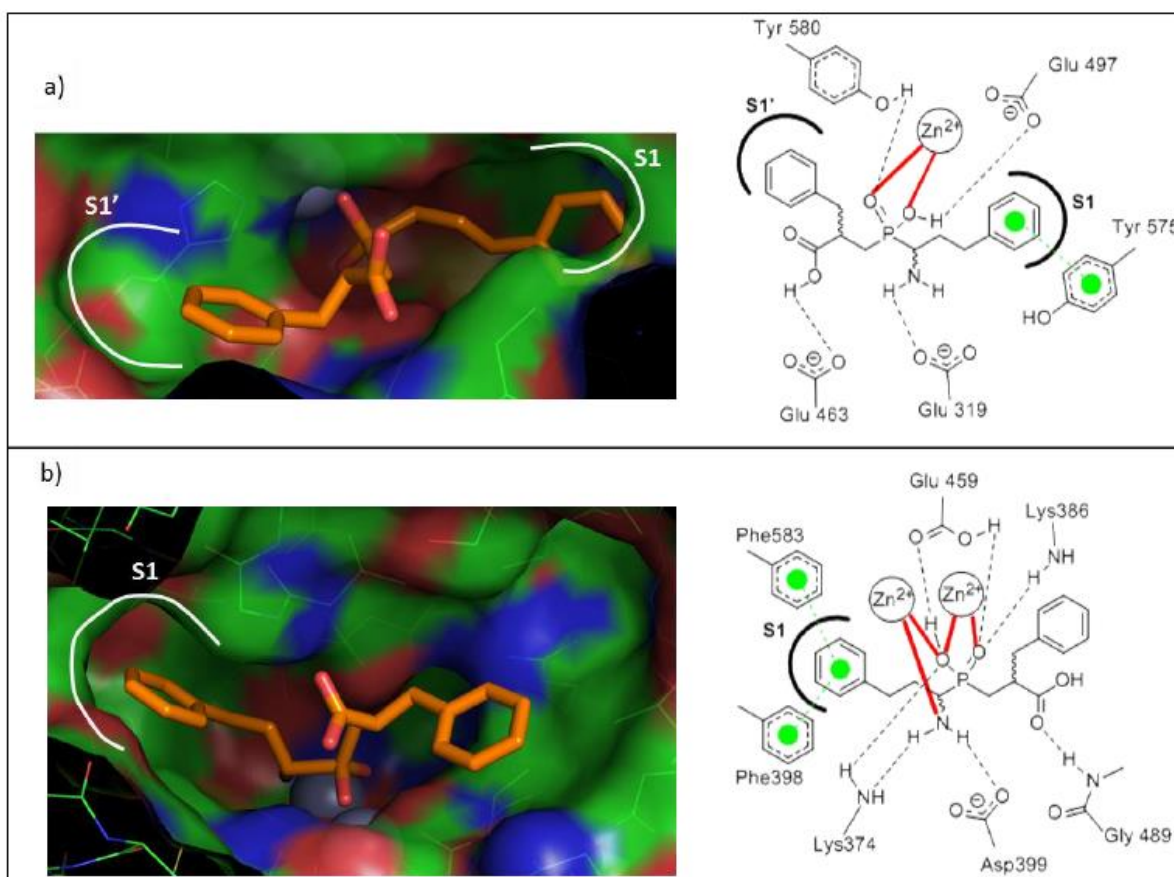


Figure 31 : a) représentation du complexe *PfA-M1/Co-4* (PDB 3EBI) et mode de liaison schématique ; b) représentation du complexe *PfA-M17/Co-4* (PDB 3KR5) et mode de liaison schématique ; ions métalliques sphères grises

Les dérivés d'acides phosphiniques Co-4 et Co-5 ont montré une activité pour les aminopeptidases monométalliques et bimétalliques. Dans le cas de *PfA-M1*, le composé le plus intéressant est noté Co-4. Il réduit modérément la croissance *in vitro* de cultures de *P. falciparum* sensibles ( $IC_{50} = 24 \pm 62 \mu M$ ) et résistantes à la chloroquine ( $IC_{50} = 20 \pm 40 \mu M$ ).

Cependant l'administration de Co-4 à un modèle murin infecté par *P. chabaudi chabaudi* réduit de 92% la parasitémie (100 mg/kg *IP*, deux fois par jour pendant sept jours). Dans le cas de l'APN, l'acide phosphinique (entrée 4) a montré une meilleure sélectivité pour l'APN par rapport aux protéases bimétalliques LAP.

Des structures du composé Co-4 avec *PfA-M1* et *PfA-M17* ont été préparées révélant l'interaction avec ce type de ligand selon la Figure 31.

Par ailleurs, Grembecka et al. ont étudié des dérivés  $\alpha$ -amino-phosphonamides. Malheureusement, ces dérivés sont instables et s'hydrolysent à des  $pH < 11$ .<sup>145</sup>

Ces analogues ont été décrits comme inhibiteurs pour ERAP1, ERAP2 et IRAP selon le (Tableau 8).

<sup>145</sup> J. Grembecka et al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2641-2655



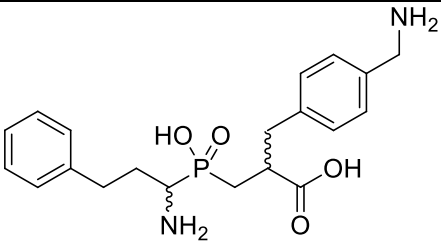
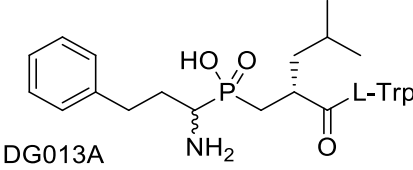
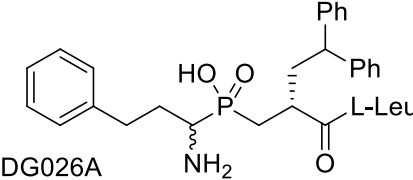
entrée	Composés	IC <sub>50</sub> (μM)		
		ERAP1	ERAP2	IRAP
1 <sup>146</sup>		0.004±0.0006	>250	-
2 <sup>147</sup>	 DG013A	0.033±0.005	0.055±0.006	0.030±0.004
3 <sup>148</sup>	 DG026A	3.694±0.908	0.740±0.129	0.032±0.009

Tableau 8 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés d'acide phosphinique

Mucha *et al.* ont décrit le dérivé phosphonique (entrée 1) comme inhibiteur sélectif d'ERAP1 par rapport à ERAP2. Cette molécule n'a pas été testée sur IRAP.<sup>146</sup>

Zervoudi *et al.* ont décrit le composé DG013A comme inhibiteur potentiel pour la sous-famille des oxytocinases. La résolution de la structure d'un co-cristal du DG013A dans le site actif d'ERAP2 a permis de continuer les investigations afin d'améliorer la sélectivité entre les membres de cette sous-famille.<sup>147</sup> Par la suite, Stratikos *et al.* ont décrit le composé DG026A comme inhibiteur potentiel et sélectif d'IRAP.<sup>148</sup>

<sup>146</sup> A. Mucha *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 16, 4122-4126

<sup>147</sup> E. Zervoudi *et al.*, *PANAS*, **2013**, 110, 19890-19895

<sup>148</sup> E. stratikos *et al.*, *J. Med. Chem. Lett.* **2016**, 59, 9107-9123

## Chélatant des métaux

### Dérivés d'acides hydroxamiques

Un acide hydroxamique peut être considéré comme un analogue d'acide carboxylique et d'amide, combinant ainsi les caractéristiques des deux groupements. De plus, le groupement hydroxamate est un bon chélatant, plan et bidentate, des ions métalliques.

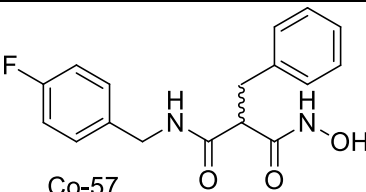
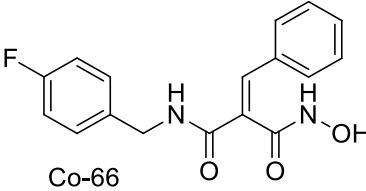
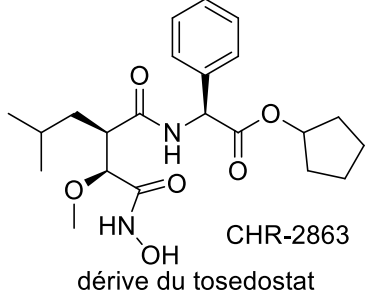
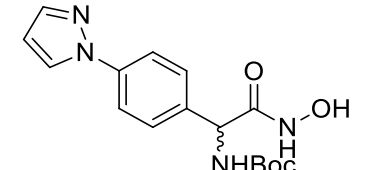
entrée	Composés	IC <sub>50</sub> (μM)				
		1 ion zinc		2 ions zinc	Pf. 3D7	Pf. FcB1
		APN porcine	PfA-M1	rPfA-M17		
1 <sup>149</sup>	 Co-57	3.6	0.027	-	57	59
2 <sup>149</sup>	 Co-66	1.4	0.006	-	13	24
3 <sup>150</sup>	 CHR-2863 dérive du tosedostat	0.22	1.4 <sup>a</sup>	0.076 <sup>a</sup>	0.370	-
4 <sup>151</sup>		-	0.8 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.078	-

Tableau 9 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés acides hydroxamiques. a) K<sub>i</sub> (μM). 3D7 : souche du *plasmodium falciparum* sensible à la chloroquine. FcB1 : souche du *plasmodium falciparum* résistante à la chloroquine

Les analogues des dérivés d'acides hydroxamiques Co57 et Co-66 (entrée 1 et 2) ont montré une activité inhibitrice intéressante pour PfA-M1.<sup>149</sup> Cependant leur activité *in vitro* sur cultures de *P. falciparum* est faible et reste de l'ordre des activités obtenues avec les inhibiteurs décrits dans les parties précédentes<sup>152</sup>.

<sup>149</sup> M. Flipo *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1322-1334

<sup>150</sup> T. S. Skinner-Adams *et al.*, *Antimicrob. Agents Ch.* **2012**, 56, 3244-3249

<sup>151</sup> S. N. Mistry *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 9168-9183

<sup>152</sup> R. Deprez-Poulain *et al.*, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10909-10917

Par contre, le composé CHR-2863 est un analogue du Tosedostat, puissant inhibiteur d'aminopeptidases de mammifères actuellement en phase clinique II pour le traitement de leucémie myéloïde aiguë. Le composé CHR-2863 inhibe les deux aminopeptidases *PfA-M1* et *PfA-M17* et est plus actif *in vitro* sur cultures de *P. falciparum* que les inhibiteurs décrits dans les parties précédentes. Il présente également une bonne activité *in vivo* : son administration par voie orale a permis une réduction de la parasitémie par 43% et 53% avec des doses de 25 et 50 mg/Kg/J pour 4 jours selon le modèle suppressif de Peter et une réduction de la parasitemie de 66% avec une dose de 50 mg/Kg/J pour deux jours suivie d'une dose de 100 mg/Kg/J pour deux autres jours toujours dans un modèle murin de *P. chabaudi chabaudi*<sup>145</sup>.

Le tosedostat a des activités inhibitrices comparables au composé CHR-2863 sur *PfA-M1* ( $K_i = 6.0 \mu\text{M}$ ) et *PfA-M17* ( $K_i = 0.079 \mu\text{M}$ ) (Tableau 9). Le mode de liaison de la forme acide du tosedostat aux sites actifs de *PfA-M1* et *PfA-M17* est présenté Figure 32 (a et b). La tête hydroxamique chélate directement le/les métaux, ce qui conduit à un mode de liaison original avec *PfA-M1* et *PfA-M17*. Il y a finalement très peu d'interactions avec les sous-sites S1 ou S1'.

Enfin, le dérivé acide hydroxamique (entrée 4) inhibe efficacement *PfA-M1* et *PfA-M17*. La Figure 32 montre les interactions des dérivés d'acides hydroxamiques (entrée 4) avec le site active de *PfA-M1* et *PfA-M17*. On remarque que la présence du carbamate en  $\alpha$ -de la fonction hydroxamique (Figure 32, C) permet une interaction avec le sous-site S1'. De plus, une interaction avec le sous-site S1 est assurée par le pyrazole. Cette double interaction avec S1 et S1' peut expliquer l'amélioration de l'interaction du dérivée hydroxamique (entrée 4) par rapport au dérivé du Tosedostat.

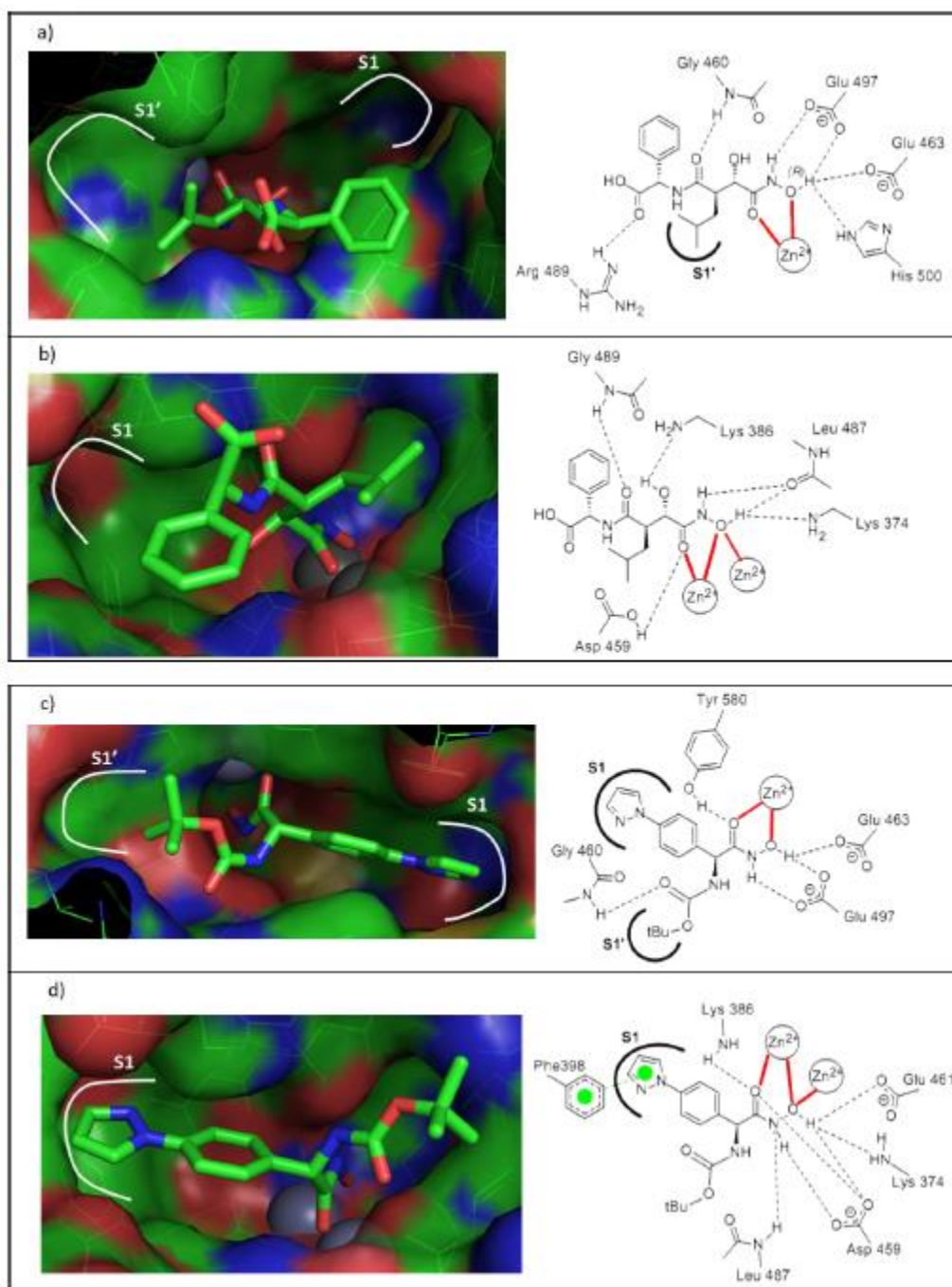


Figure 32 : a) représentation du complexe PfA-M1/forme acide du Tosedostat (PDB 4X2U) et mode de liaison schématique ; b) représentation du complexe PfA-M1 /forme acide du Tosedostat (PDB 4X2T) et mode de liaison schématique ; c) représentation du complexe PfA-M1/acide hydroxamique 7 (PDB 4R5T) et mode de liaison schématique ; d) représentation du complexe PfA-M17/acide hydroxamique 7 (PDB 4R6T) et mode de liaison schématique ; ions métalliques sphères grises

En ce qui concerne l'inhibition de l'APN, Xu *et al.*<sup>153, 154</sup> ont décrit plusieurs analogues d'acides hydroxamiques avec une activité intéressante *in vitro* et *in vivo*. L'analogue 4cc (Figure 33) est leur candidat le plus avancé qui a été sélectionné pour des tests d'efficacité sur un modèle murin

<sup>153</sup> W. Xu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 6015-6025

<sup>154</sup> W. Xu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 3807--3815

d'angiogenèse. 4cc a montré un effet anti-angiogénique et anti-métastatique sans cytotoxicité évidente vis-à-vis des cellules B16BL6 plus efficace que la bestatine<sup>155</sup>.

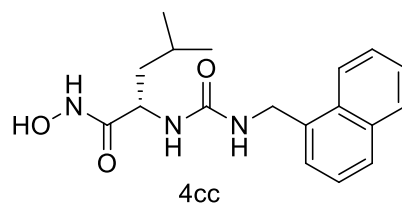


Figure 33 : analogue décrit par W. Xu *et al.* pAPN, IC<sub>50</sub> (μM) = 0.05±0.002

### Dérivés d'aminobenzamides

Les dérivés d'aminobenzamides étaient décrits comme inhibiteurs d'histone déacétylase<sup>156</sup>. Ce sont des faibles chélateurs de zinc. La Figure 34 montre les interactions du dérivé aminobenzamide avec le site actif d'ERAP2. Nous remarquons une liaison de coordination entre le l'oxygène du carbonyle de l'anilide et l'ion zinc ainsi que des interactions avec les sous-sites S1, S1' et S2'.

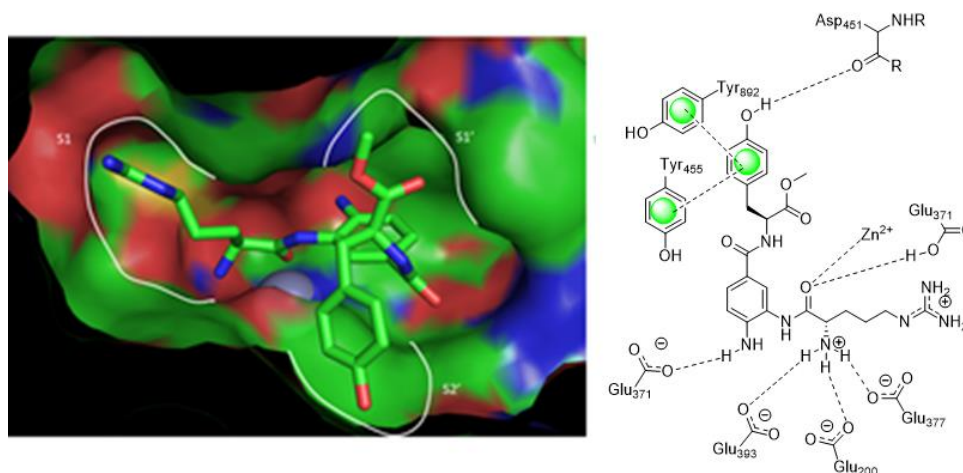


Figure 34 : représentation du complexe ERAP2 avec un dérivé d'aminobenzamide (PDB 5K1V) et mode de liaison schématique<sup>157</sup>

Zervoudi *et al.*<sup>158,159</sup> ont décrit une série de dérivés d'aminobenzamide comme inhibiteurs d'ERAP1, ERAP2 et IRAP. Ces dérivés ont montré une sélectivité intéressante pour IRAP par rapport à ERAP1/2. (Tableau 11)

<sup>155</sup> W. Xu *et al.*, *ACS Med. Chem.* **2012**, 3, 959-964

<sup>156</sup> D. F. Wang *et al.*, *Med. Chem.* **2005**, 48, 6936-6947

<sup>157</sup> E. Stratikos *et al.*, *Med. Chem. Lett.* **2017**, 21, 333-337

<sup>158</sup> A. Paparkyriakou *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 23, 4832-4836

<sup>159</sup> E. Zervoudi *et al.*, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 1524-1543

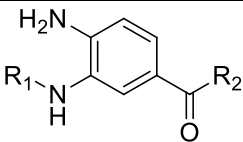
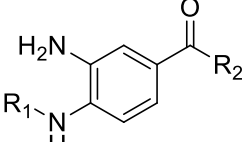
Entrée	Composé	R1	R2	IC <sub>50</sub> (μM)		
				ERAP1	ERAP2	IRAP
1		NH <sub>2</sub> -L-Leu	L-Trp-OBn	0.92±0.20	1.6±0.3	0.105±0.063
2		NH <sub>2</sub> -L-Tyr(OBn)	L-Trp-OBn	1.1±0.3	20.5±2.0	3.8±0.7

Tableau 10 : dérivé d'aminobenzamides

## Autres types d'inhibiteurs

### Dérivé d'angiotensine IV

Anderson et al.<sup>160, 161, 162</sup> ont décrit un inhibiteur d'IRAP HA-08 (Figure 35) comme un mème de la partie N-terminale de l'ocytocine. Cet analogue est 20 fois plus actif que l'Ang IV, mais des études plus poussées ont montré que HA-08 souffre d'un problème majeur de perméabilité au niveau de la barrière hématoencéphalique. Vanderheyden a proposé que l'interaction de l'angiotensine IV se fait à l'extérieur du site actif d'IRAP<sup>163</sup>.

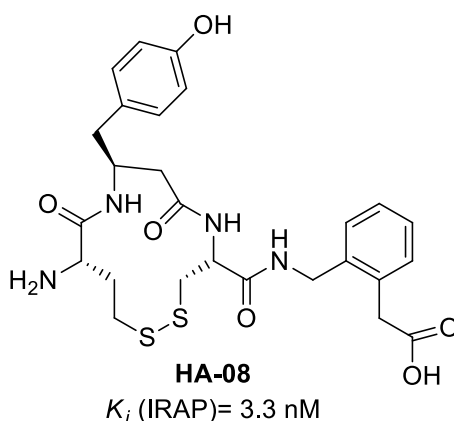


Figure 35 : HA-08 décrite par Anderson et al.

### Dérivés d'aryles sulfonamides

Hallberg et al.<sup>164</sup> ont décrit des dérivés d'aryles sulfonamides comme des inhibiteurs non peptidiques d'IRAP selon la (Figure 36).

<sup>160</sup> H. Andersson et al., *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8059–8071

<sup>161</sup> H. Andersson et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 6924–6935

<sup>162</sup> H. Andersson et al., *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8059–8071

<sup>163</sup> P. Vanderheyden et al., *molecular and cellular endocrinology* **2009**, 302, 159-166

<sup>164</sup> S. R. Borhade et al., *ChemistryOpen* **2014**, 3, 256-263

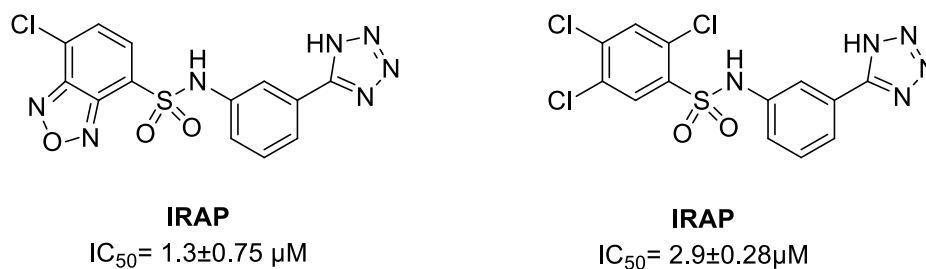


Figure 36 : Dérivés aryle sulfonamide

La (Figure 37) montre le type d'interaction de ces analogues avec le site actif de l'enzyme.

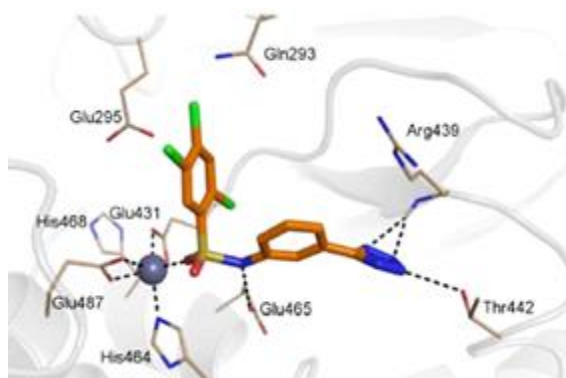
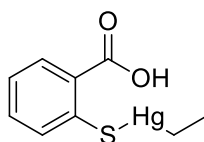


Figure 37 : simulation du ligand tri-chloro-phényl sulfonamide dans le site actif d'IRAP<sup>159</sup>.

### Thimerosal

Après un screening virtuel de plus que 265000 composés et après évaluation *in vitro*, Stamogiannos *et al.*<sup>165</sup> ont décrit le Thimerosal comme inhibiteur sélectif d'ERAP1 par rapport à ERAP2 et IRAP selon la (Figure 38)



IC<sub>50</sub>(μM)  
ERAP1: 0.24±0.11  
ERAP2/ IRAP : > 50

Figure 38 : thimerosal

La Figure 39 suggère un possible mode d'interaction du Thimerosal dans le site actif d'ERAP1 et d'ERAP2. Le modèle de docking montre une coordination du carboxylate avec l'ion zinc et l'interaction du mercure avec le Ser869 et Ser316 à l'intérieur du sous-site S1 d'ERAP1. Cette interaction n'existe pas chez ERAP2.

<sup>165</sup> A. Stamogiannos *et al.*, *Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 681-685

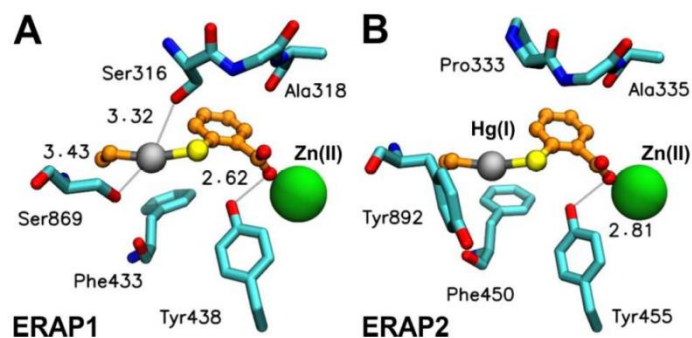


Figure 39 : docking du Thimerosal dans le site actif d'ERAP1 (PDB:2YD0) et le site actif d'ERAP2 (PDB:3SE6)<sup>160</sup> Dérivé benzopyrane

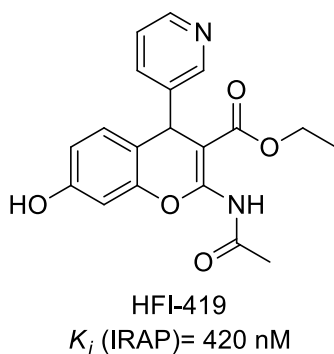


Figure 40 : l'analogue HFI-419, dérivé du benzopyrane

Albitson et al.<sup>166, 167, 168</sup> on décrit des dérivés de benzopyrane comme inhibiteur d'IRAP. Le châssis moléculaire a été identifié après un screening *in silico* de 1,5 million de molécules commerciales. La molécule HFI-419 (Figure 40) a montré la meilleure activité inhibitrice mais aussi un faible profil pharmacocinétique dont notamment une forte clairance, un temps de demi-vie faible reflétant une mauvaise stabilité métabolique (Tableau 11).

Composé	HFI-419
Paramètres PK iv (2mg/kg)	
Vd (L/Kg)	2.8
CL (mL min/Kg)	172.8
T <sub>1/2</sub> (min)	11

Tableau 11 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus après administration iv de 3 mg/kg de HFI-419

<sup>166</sup> A. L. Albiston et al., *FASEB J.* **2008**, 22, 4209–4217

<sup>167</sup> A. L. Albiston et al., *J. Pharmacol.* **2011**, 164, 37–47

<sup>168</sup> S. J. Mountford et al., *J Med Chem.* **2014**, 57, 1368–1377



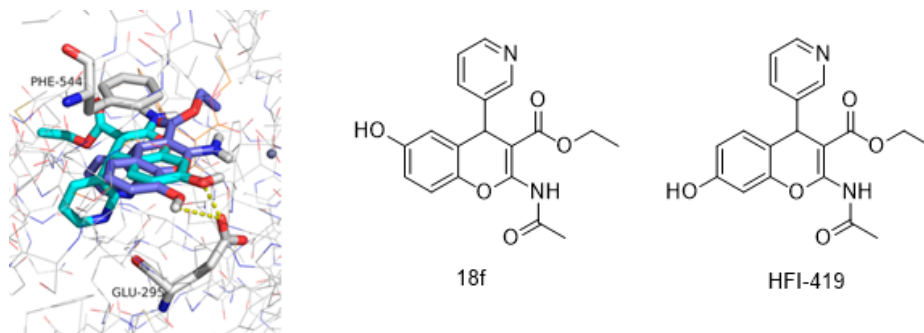


Figure 41 : modèle de docking des analogues 18f (violet) et HFI-419 (cyan) dans IRAP, la variation de la position du groupe hydroxyle conduit à la modification de la position de l'analogue pour conserver la liaison hydrogène entre l'analogue et Glu295. Selon le modèle de docking, il y a aucune interaction entre l'analogue et l'ion zinc<sup>164</sup>.

# **Chapitre 3 :**

## **Travaux antérieurs du laboratoire et objectifs**

## Chapitre 3 : Travaux antérieurs du laboratoire et objectifs

Les travaux du laboratoire se sont concentrés ces dernières années sur la conception, la synthèse et l'évaluation de dérivés amino-tétralone pour l'inhibition sélective des aminopeptidases monométalliques de la famille M1 dont notamment l'APN des mammifères (d'origine humaine ou porcine).

La 3-amino-2-tétralone **1** (Figure 42) a été décrite en 1994<sup>169</sup> comme un inhibiteur puissant et sélectif de l'APN. Cependant, l'inconvénient principal est son instabilité en solution aqueuse à pH physiologique (pH = 7,4 à 37°C) qui conduit à son aromatisation.

### Modification des fonctions en position 2 et 3 du 3-amino-2-tétralone (**1**)

Afin d'augmenter la stabilité chimique de cette molécule<sup>170</sup>, deux séries de dérivés du 3-amino-2-tétralone **1** ont été synthétisées selon (Figure 42).

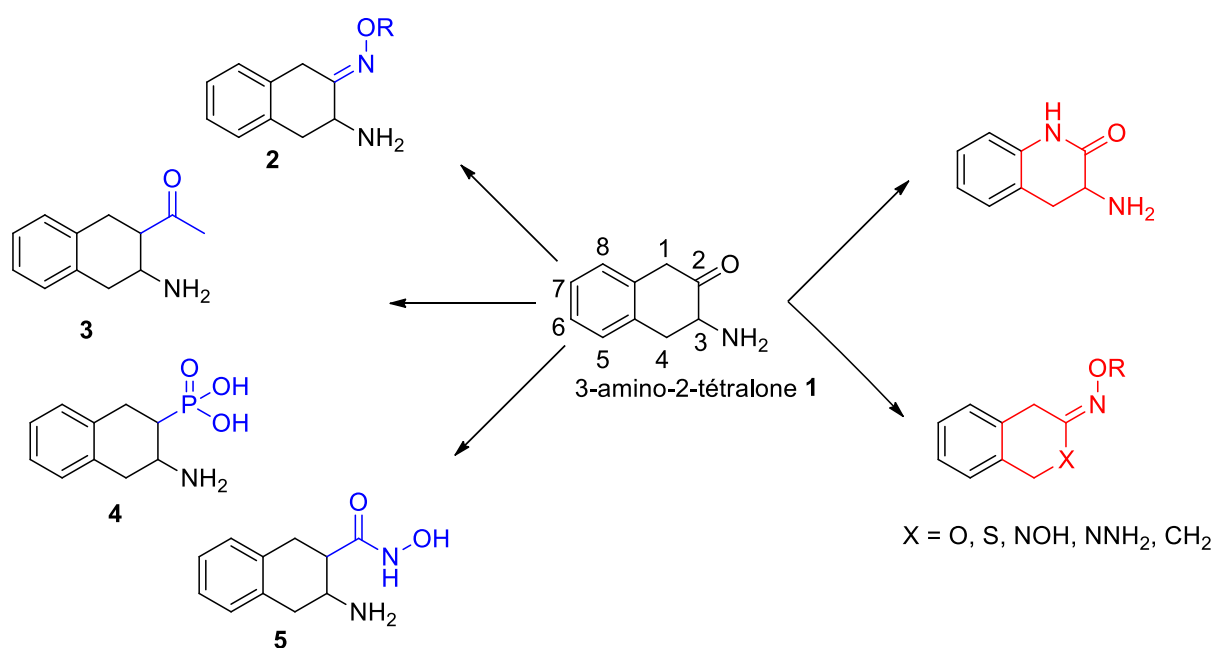


Figure 42 : les dérivés de 3-amino-2-tétralone en série racémique

La première série a consisté en des modifications de la fonction cétone en position 2 par des oximes substituées **2**, une méthyle cétone **3**, un acide phosphonique **4** et un acide hydroxamique **5**.

Les composés **2**, **3** et **4** ont montré une faible activité inhibitrice pour la plus part des aminopeptidases évaluées. En revanche, l'acide hydroxamique **5** a montré une activité inhibitrice non sélective envers les aminopeptidases mono et bimétalliques (Tableau 12).

<sup>169</sup> C. Schalk *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 311, 42-46

<sup>170</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 147, 7241-7257

composé	IC <sub>50</sub> (μM)			
	LAPc (EC.3.4.11.1)	APaero (EC.3.4.11.10)	APN (EC.3.4.11.2)	LTA <sub>4</sub> H(EC.33.2.6)
2	>1000	>1000	>1000	>1000
3	>1000	500	>1000	750
4	>1000	150	500	>1000
5	10 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	>1000

Tableau 12 : inhibitions des aminopeptidases. APN : aminopeptidase neutre, LTA<sub>4</sub>H : leukotriene A4 hydrolase, LAP : leucyl aminopeptidase, APaero : aminopeptidase d'*Aeromonas proteolitica* par des dérivés du tétralone, toutes les molécules testées sont racémiques, IC<sub>50</sub> est déterminé par des courbes de Dixon, a) K<sub>i</sub> (μM)

Une deuxième série a consisté à synthétiser des composés hétérocycliques en gardant les fonctions carbonyle et amine libre en position 2 et 3. Cette série de composés a montré une faible activité sur les deux familles d'enzymes.

### Modification de la taille du cycle

Ensuite, une étude de l'influence de la taille du cycle B de la 3-amino-2-tétralone **1** (Figure 43) a été réalisée pour étudier la stabilité de cette molécule<sup>171</sup>. Deux séries de molécules ont été conçues : les dérivés de l'amino-indanone (cycle à 5 chaînons) et ceux de l'aminobenzosubérone (cycle à 7 chaînons).

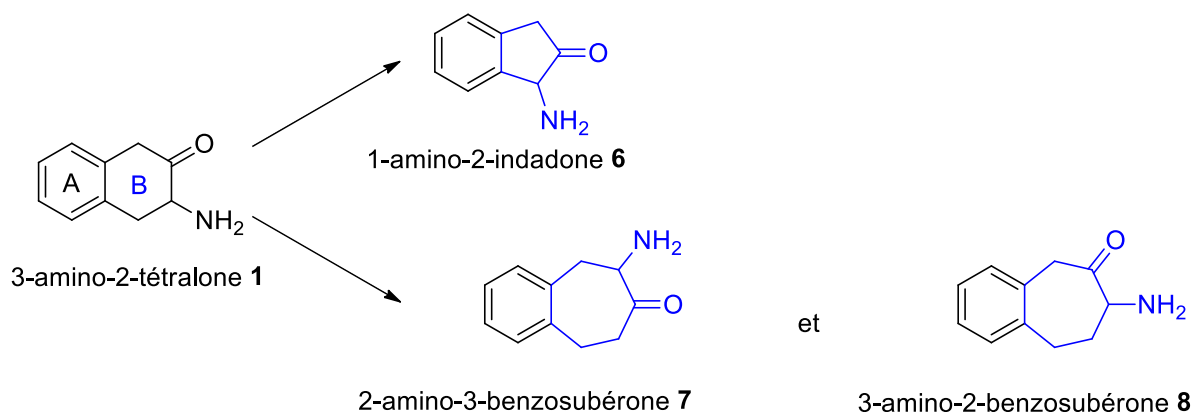


Figure 43 : séries d'analogues du tétralone 1 suite à une modification du cycle B

Cette étude a conduit à la découverte du châssis moléculaire 3-amino-2-benzosubérone **8** comme nouvelle molécule inhibant puissamment et sélectivement l'APN tout en étant stable selon le (Tableau 13):

<sup>171</sup> S. Albrecht et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 1434–1449

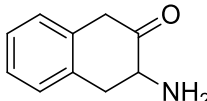
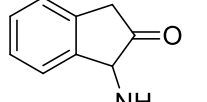
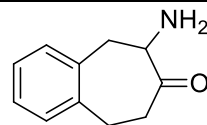
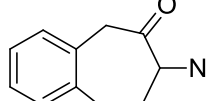
Composé	IC <sub>50</sub> (μM)			
	APN	LAPC	LTA <sub>4</sub> H	APaero
<b>1</b> 	0,5 <sup>a</sup>	120	>1000	130
<b>6</b> 	20 <sup>a</sup>	>1000	>1000	150
<b>7</b> 	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>8</b> 	1 <sup>a</sup>	>1000	>1000	900

Tableau 13 : Inhibition (IC<sub>50</sub> (μM) ou K<sub>i</sub> (μM)) des aminopeptidases ciblées par les analogues en série racémique amino-indanone ou aminobenzosubérone. a) K<sub>i</sub> (μM).

L'indanone **6** est moins active que le tétralone **1**, mais reste sélective envers l'APN humain. Par contre, la 2-amino-3-benzosubérone **7** est inactive sur toutes les aminopeptidases. Alors que, le 3-amino-2-benzosubérone **8** a montré une activité inhibitrice similaire à la tétralone **1**. L'étude de stabilité du composé **8** a été réalisée en suivant l'activité de l'APN sur une durée de 10 heures avec et sans inhibiteur. L'activité inhibitrice du composé **8** a duré 10 heures, par contre l'activité inhibitrice de la tétralone **1** n'a duré que 2 heures.

En revanche, il a été montré que la 3-amino-2-benzosubérone **8** dimérise dans une solution aqueuse à pH = 7,5 à des concentrations supérieures à 2.5 mM. Un précipité se forme après une heure et une aromatisation spontanée est observée après une nuit à température ambiante (Figure 44). Cette dimérisation n'est pas observée pour les concentrations utilisées lors des mesures d'activité enzymatique qui est de l'ordre du micromolaire<sup>167</sup>.

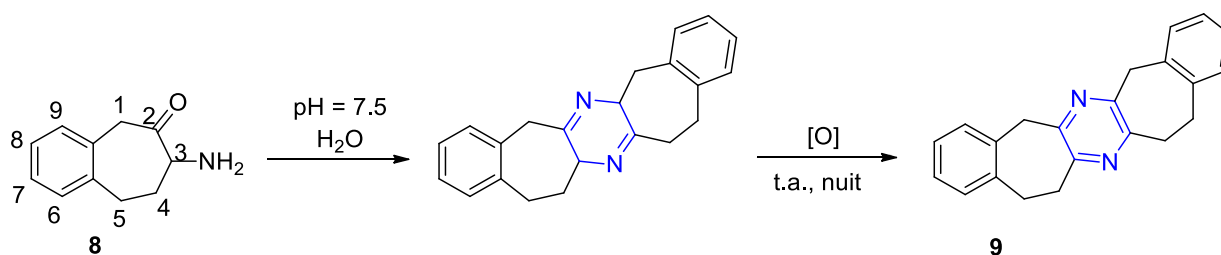


Figure 44 : Dimérisation du composé **8** en composé **9**

Il est à noter que la méthylation de l'amine primaire qui devrait empêcher ce phénomène de dimérisation conduit à une perte totale d'activité inhibitrice.

### Modification apporté sur le scaffold 3-amino-2-benzosubérone (**8**)<sup>172, 173, 174, 175</sup>

La 3-amino-2-benzosubérone **8** a donc été considérée comme la molécule la plus intéressante et toutes les études ultérieures se sont concentrées autour de cette structure. Différentes modifications ont été apportées afin d'aboutir à une meilleure inhibition et/ou meilleure sélectivité. Le Tableau 14 résume les meilleurs analogues obtenus, ces analogues ont été testés sur plusieurs métallo-aminopeptidases à un ou deux ions zinc.

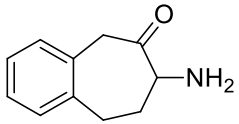
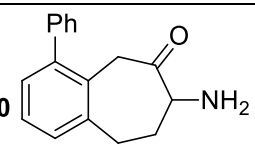
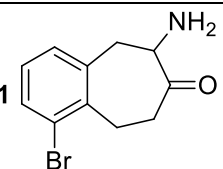
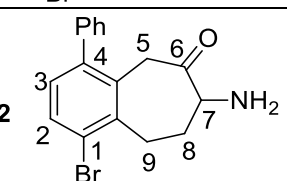
Composé	K <sub>i</sub> (μM)			
	APN porcine	LAPc	LTA <sub>4</sub> H	APaero
<b>8</b> 	1	>1000 <sup>a</sup>	>1000 <sup>a</sup>	900 <sup>a</sup>
<b>10</b> 	0,007	>100 <sup>a</sup>	19	28
<b>11</b> 	0,02	>100 <sup>a</sup>	>100 <sup>a</sup>	>100 <sup>a</sup>
<b>12</b> 	0,00006	71	Nd	0,039

Tableau 14 : inhibition des aminopeptidases étudiées par des dérivés du composé **8**., nd = non déterminé, a) IC<sub>50</sub> (μM).

Il ressort de cette étude que le composé disubstitué 1-bromo-4-phényl-7-amino-benzocycloheptan-6-one **12** présente non seulement la meilleure inhibition vis-à-vis de l'APN porcine (K<sub>i</sub> = 60 pM) mais aussi une excellente sélectivité vis-à-vis des autres métallo-aminopeptidases étudiées.

Cette série de composés a été testé sur un panel d'une vingtaine de protéase en collaboration avec Novartis et a montré une activité exclusive pour l'APN. De ce fait, le châssis moléculaire de type 3-amino-2-benzosubérone (ou 7-amino-benzocycloheptan-6-one) a été décrite, en 2011, comme un outil moléculaire prometteur pour la compréhension du rôle biologique de l'APN.

Malgré son excellent profil *in vivo*, sur des modèles de souris nues xéno greffées avec une lignée cancéreuse A-673 (rhabdomyosarcome) sur souris nude<sup>170</sup>, le composé **12** souffre de problèmes physico-chimiques et des propriétés ADME insuffisantes : faible solubilité, faible fraction non lié aux protéines plasmatiques, ainsi qu'une mauvaise stabilité métabolique. Son profil pharmacocinétique *in vivo* a été étudié sur un modèle de souris nues. Après administration par voie intrapéritonéal d'une dose de 30mg/kg, le composé **12** a montré une exposition et un temps de demi-vie faibles selon le (Tableau 15).

<sup>172</sup> C. Maieranu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 5716–5733

<sup>173</sup> L. Roux *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2586-2589

<sup>174</sup> M. Al-Lakkis-Wehbe *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2012**, 68, 6447-6455

<sup>175</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 4942-4953

Composé	12
c logP	3,17
Aire de surface polaire	43,1 Å <sup>2</sup>
Solubilité thermodynamique en milieu aqueux @ pH 7.4	2,9 µg/ml
Perméabilité passive Pe PAMPA	3,03 e <sup>-6</sup> cm/s
Taux de liaison aux protéines plasmatique	99%
Stabilité microsomale CL <sub>int</sub>	19 µl/min/mg
Dose Maximale Tolérée (souris)	100 mg/kg
Temps de demi-vie	35 min
Paramètres PK ip (3mg/kg)	
C <sub>max</sub> (ng/mL)	115
T <sub>max</sub> (min)	30
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	11427
T <sub>1/2</sub> (min)	35

Tableau 15 : Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques du dérivé 1-bromo-4-phényle (12).

## Objectifs

Pour poursuivre nos investigations, nous avons voulu optimiser les propriétés pharmacologiques de ces composés et continuer nos études des relations structure-activité (SAR) et structure-propriétés (SPR). Nous avons également étendu nos travaux à d'autres aminopeptidases d'intérêt thérapeutiques de la famille M1 comme ERAP1, ERAP2, IRAP ainsi que PfA-M1.

Dans ce contexte, **deux objectifs principaux**, illustrés (Figure 45), ont été fixés dans le cadre de mes recherches doctorales.

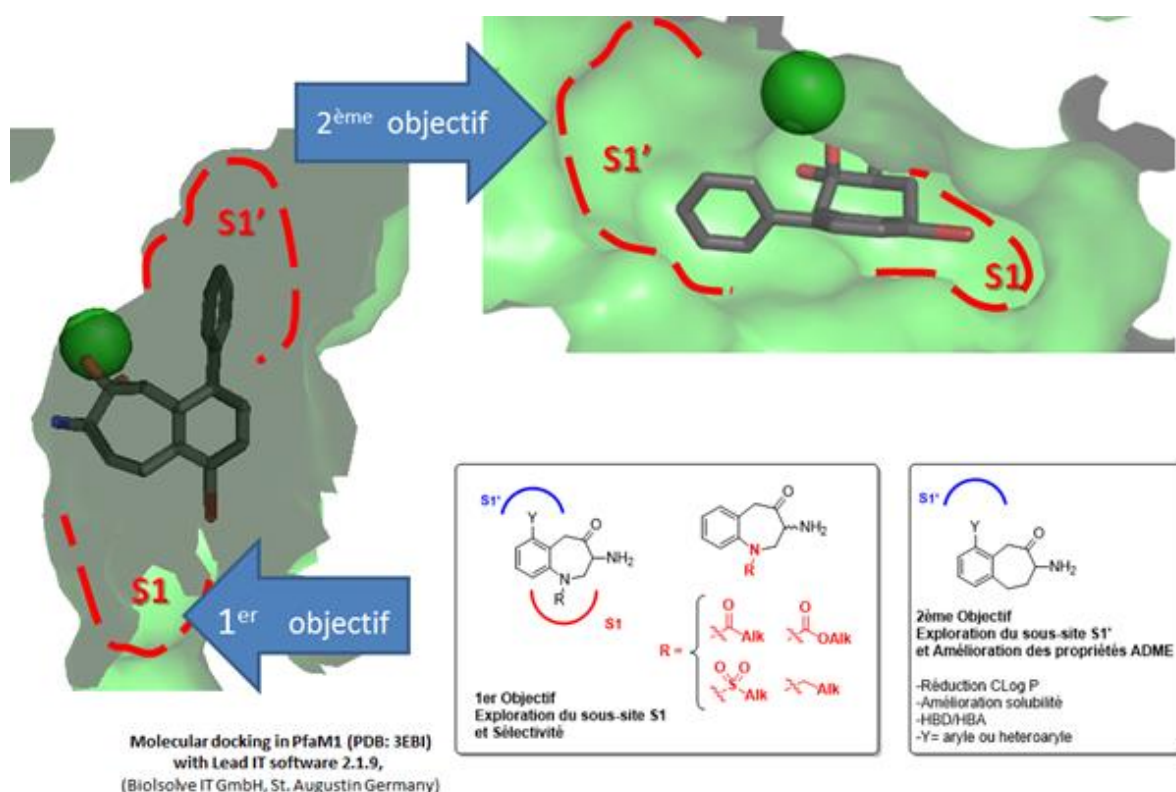


Figure 45 : Objectifs des travaux de thèse. Modèle de docking de l'analogue 12 dans le site actif de PfA-M1 (PDB: 3EB1). (Docking, Lead IT software 2.1.9, BioSolve IT GmbH, St. Augustin Germany)

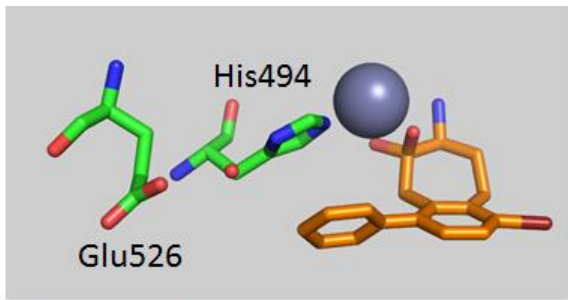
**Exploration du sous-site S1 et Sélectivité:** des études de modélisation moléculaire de l'analogue **12** dans le site actif de l'APN (PDB : 4YFT) et dans le site actif de PfA-M1 (PDB : 3EBI) nous ont suggéré que les substituants en position 1 n'interagissent pas ou très peu avec le sous-site S1 du site actif de ces aminopeptidases M1. Par conséquent développer des interactions entre cette poche et notre châssis moléculaire peut être la clé pour atteindre une certaine sélectivité vis-à-vis de chacune de ces différentes enzymes de la famille M1. Afin d'occuper cette poche, nous avons envisagé d'introduire un atome d'azote substitué par divers groupes R en position-9 de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one. L'effet de ces divers substituants R sur l'activité inhibitrice vis-à-vis des différentes enzymes de la famille M1 permettrait de mettre au point une plateforme moléculaire ultra-modulable en fonction de l'enzyme ciblée.

**Exploration du sous-site S1' et Amélioration des propriétés ADME:** les prédictions *in silico* suggèrent que le substituant en position-4 de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one interagit avec le sous-site S1' du site actif de ces aminopeptidases M1 (Figure 45). Or la voie de synthèse de nos molécules permet de moduler très facilement la position-4 du cœur aromatique. Par conséquent nous avons opté pour réaliser des pharmacomodulations sur cette position-4 afin de sonder cette poche S1' et d'améliorer les propriétés physicochimiques (solubilité, lipophilie) et pharmacocinétiques (stabilité métabolique, temps de demi-vie, exposition) de nos molécules. Le choix des substituants, divers groupes aryles ou hétéroaryles, a été basé sur un cahier des charge bien précis obéissant à un souci de réduction de la lipophilie, d'introduction d'un groupe ionisant afin d'améliorer la solubilité et d'introduction d'hétéroatomes pouvant interagir avec les résidus de ce sous-site (HBD ou HBA).

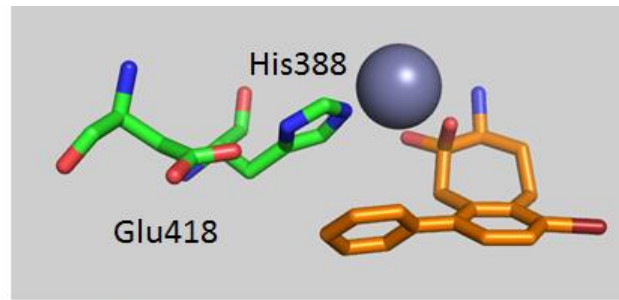
Ainsi, la variabilité du sous-site S1', en largeur et en profondeur, apparaît comme une clé de sélectivité chez les membres de cette famille. Pour cela, nous avons cherché, dans un premier temps, des interactions avec le Glu418 (APN), Glu526 (PfA-M1) et Glu494 (IRAP) et avec Lys380 (ERAP1) et Lys397 (ERAP2) pour étudier leurs effets sur l'amélioration de l'activité inhibitrice et sur la sélectivité. (Figure 46)

Finalement, un travail exploratoire de mise au point de voie de synthèse permettant la préparation de molécules substituées à la fois en position-9 et en position-4 afin d'optimiser l'occupation des sous sites S1 et S1' a été réalisé et est toujours en cours d'investigation.

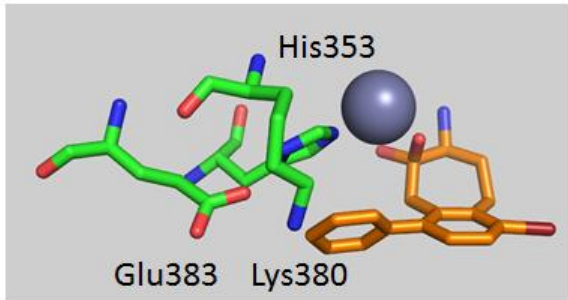




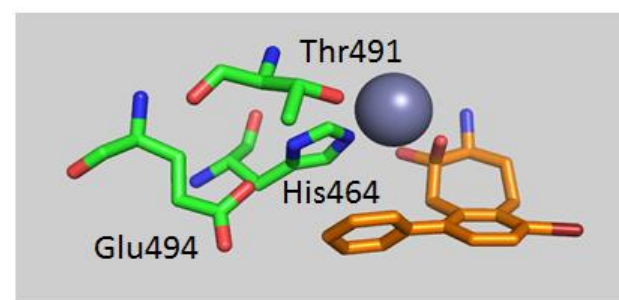
*PfA-M1*, PDB: 3EBI



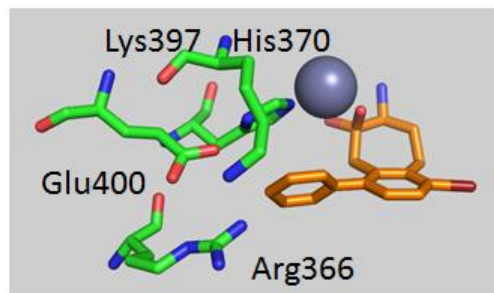
APN, PDB : 4FYT



ERAP1, PDB:2YD0



IRAP, PDB: 5MJ6



ERAP2, PDB: 5AB0

Figure 46 : pour l'APN et *PfA-M1* il a été utilisé le modèle du Docking, de l'analogue 12 dans le site actif de l'APN (PDB : 4FYT) et dans le site actif de *PfA-M1* (PDB : 3EBI), le Led IT software 2.1.9, (BioSloveIT GmbH) programme. De l'autre côté, le docking de l'analogue 12 dans le site actif d'ERAP1 résulte à des prédictions (pose ranks) de cout énergétique élevé. Pour cela dans le cas des oxytocinase, il a été proposé des superpositions de l'analogue 12 dans le site actif des cristaux d'ERAP1 (PDB : 2YD0), d'ERAP2 (PDB : 5AB0) et IRAP (PDB : 5MJ6).

# **Chapitre 4 :**

## **Exploration du sous-site S1**

## Chapitre 4 : Exploration du sous-site S1

Trois approches ont été étudiées pour construire le cycle à sept chaîons. Chacune de ces stratégies sera décrite par la suite selon l'étape clé permettant la cyclisation de la molécule : à savoir une condensation de Dieckmann, une réaction de métathèse cyclisante ou une amination réductrice

### Condensation de Dieckmann

L'étape clé de la préparation du composé 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazepin-4-one **17** serait une condensation de Dieckmann du diester **16**. Cette stratégie a été inspirée des travaux brevetés par Bristol-Myers<sup>176</sup>. Ce diester **16** serait obtenu par trois voies différentes soit par une réaction de Mitsunobu (approche A), soit par une addition de Michael (approche B) ou par une substitution nucléophile aromatique (approche C) selon la Figure 47.

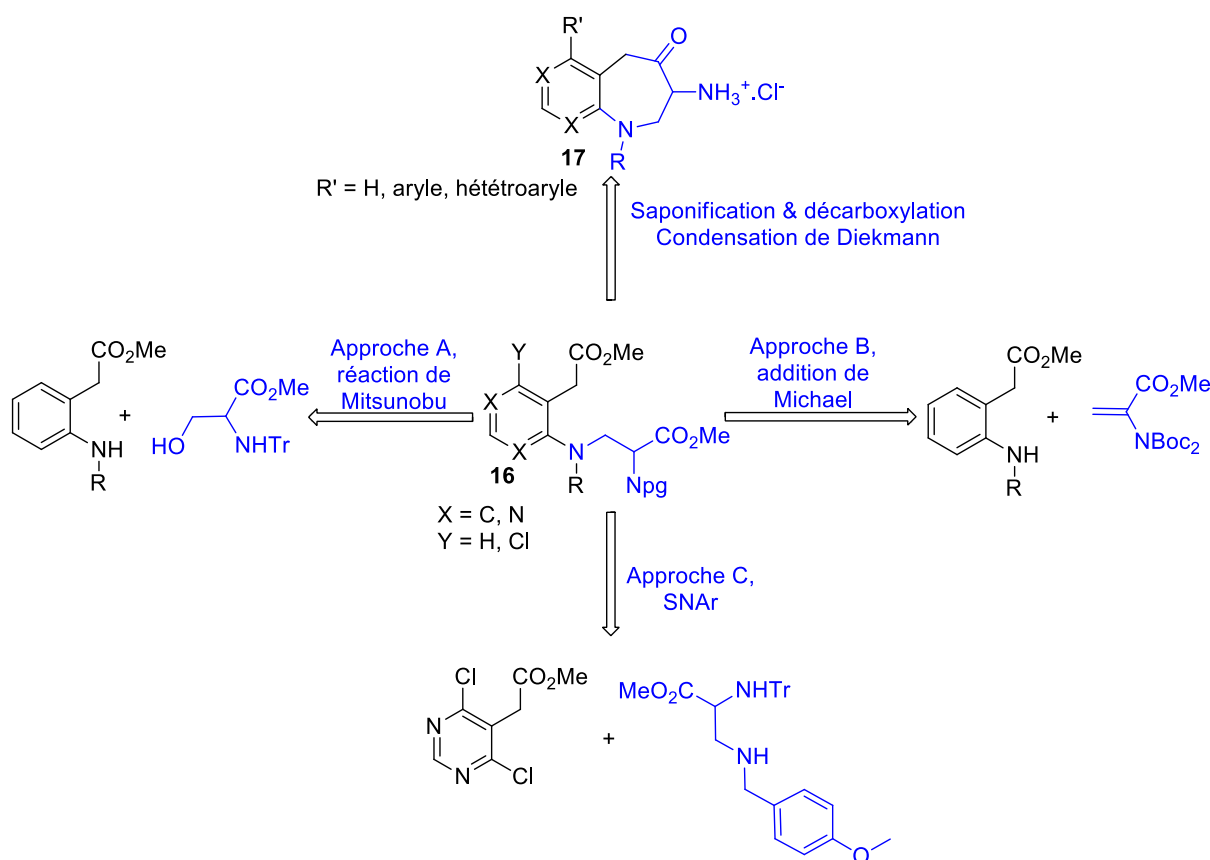


Figure 47 : approches conçues pour la formation du composé 16

### Approche A : réaction de Fukuyama-Mitsunobu

Dans cette partie, nous nous sommes inspirés des travaux de Mishra *et al.*<sup>177</sup> qui ont préparé des cycles à sept et à huit chaîons par une réaction de Mitsunobu entre des *N*-Tosylanilines (représente notre nucléophile) et diverses amino-alcools (Figure 48).

<sup>176</sup> Bristol-Myers Squibb Company, US **2007/249583 A1**, 103-104

<sup>177</sup> J. K. Mishra *et al.*, *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 244-247

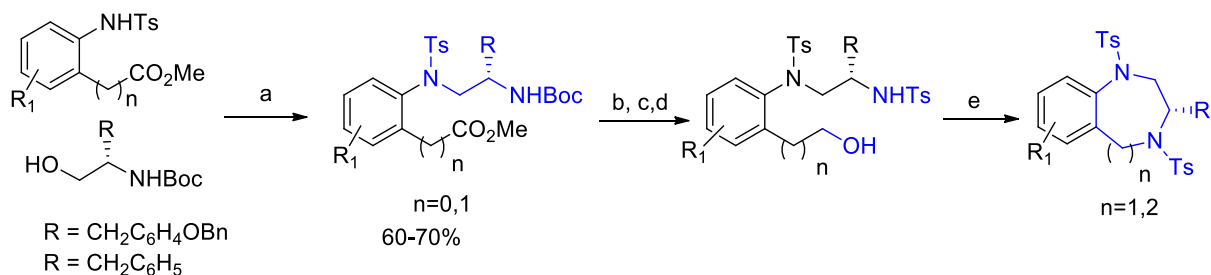


Figure 48 : travaux de Mshta *et al.* Conditions réactionnels : (a) DEAD, PPh<sub>3</sub>, 0°C (2h) puis à t.a. (10 h); (b) 6N HCl, MeOH, t.a, 45 min; (c) TsCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 h; (d) LAH, dry THF, 1 h; (e) PPh<sub>3</sub>, DEAD, THF anhydre.<sup>172</sup>

Plus récemment, Xiang *et al.*<sup>178</sup> ont noté que la protection de l'aniline sous la forme d'une sulfonanilide (par un groupe tosylo ou nosyle, plus facilement clivable) est essentielle pour le bon déroulement du couplage intermoléculaire (Figure 49). Cette protection permettrait d'améliorer la nucléophilie de l'aniline dans les conditions de Mitsunobu, en diminuant son pKa.

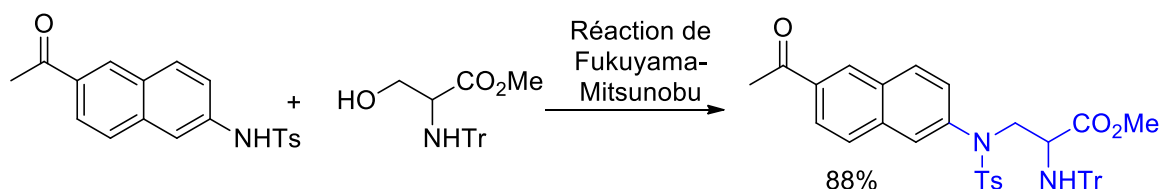


Figure 49 : travaux de Xiang *et al.*<sup>173</sup>

De plus Cherney *et al.*<sup>179</sup> se sont intéressés à des réactions de Mitsunobu sur des dérivés de la sérine (représente notre électrophile). Cherney *et al.* ont montré que la *N*-protection de la sérine par un *N*-phényl-fluorénylo (PhF) ou par un *N*-tritylo (Tr) est primordiale pour protéger le proton en  $\alpha$  de la fonction ester et ainsi éviter des réactions de  $\beta$ -élimination conduisant à la formation des dérivés du didéhydroalanine selon la Figure 50. Il est à noter que dans certains cas les auteurs ont observé la formation des dérivés d'aziridine comme produits secondaires.

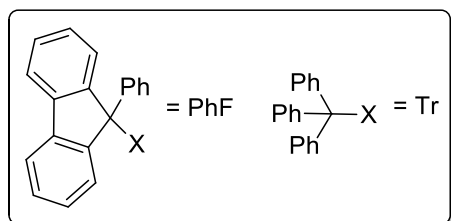
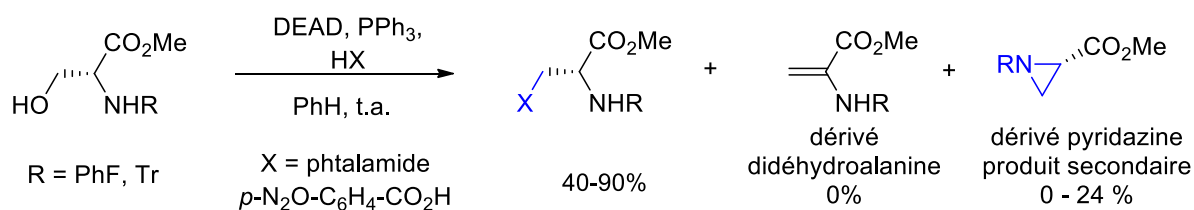


Figure 50 : travaux de Cherney *et al.* comprenant des réactions de Mitsunobu sur des dérivés de la sérine.<sup>174</sup>

<sup>178</sup> Xiang *et al.*, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 6367–6371

<sup>179</sup> R. J. Cherney *et al.*, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2544-2546

En s'inspirant des travaux précédents, l'intermédiaire **16** pourrait être obtenu par réaction de Fukuyama-Mitsunobu entre une *N*-sulfonanilide **15** et un ester de la *N*-trityl sérine **18**. La sulfonanilide **15** proviendrait de l'acide-2-nitrophényl-acétique via manipulation des fonctions acide et nitro (Figure 51).

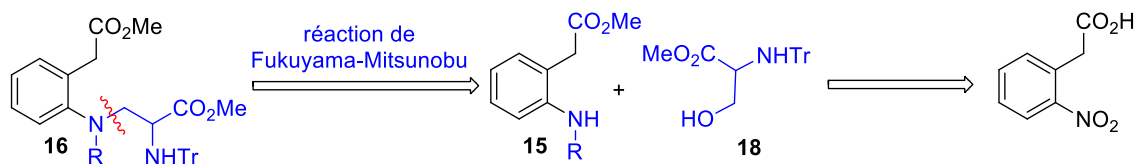


Figure 51: voie rétro-synthétique pour préparer le diester **16**

#### Préparation de l'aniline **14**

La synthèse débute par une estérification de l'acide 2-nitrophényl-acétique dans le méthanol en présence de quantité catalytique d'acide sulfurique (0.1 éqv.) selon les conditions de Lee *et al.*<sup>180</sup>. Cette réaction conduit à la formation quantitative de l'ester méthylique **13** après purification. La réduction du groupe nitro du composé **13** est réalisée par catalyse hétérogène sur palladium sur charbon 10% dans l'acétate d'éthyle et sous atmosphère d'hydrogène. Elle conduit quantitativement à l'aniline **14** après purification sur colonne (Figure 52).

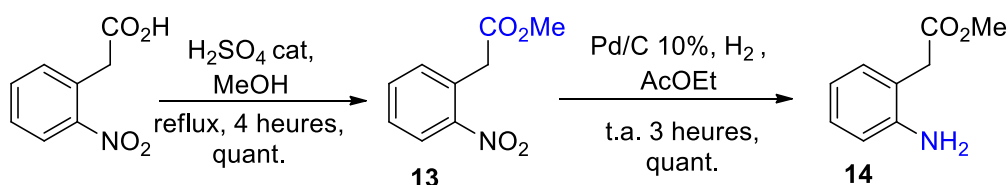


Figure 52 : synthèse de l'aniline **14**

La protection de l'aniline par différents groupes protecteurs (Nosyle, Tosyle ou Acétyl) a été réalisée dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , en présence de pyridine et à température ambiante. Cela conduit à la formation des intermédiaires **15a-c** selon (Figure 53).

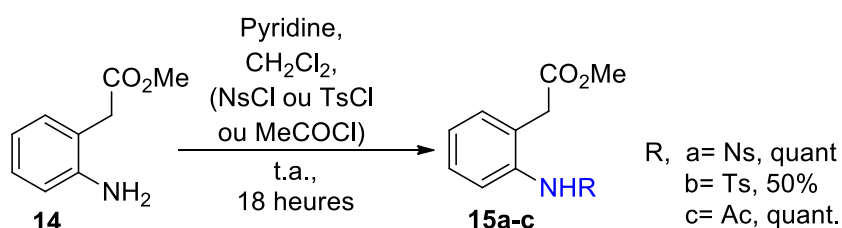


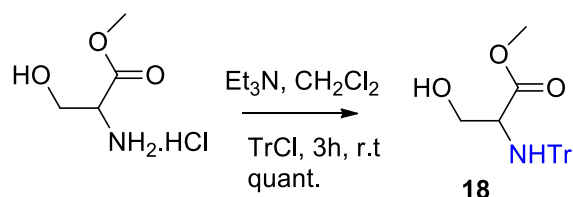
Figure 53: protection de l'intermédiaire **14**. Les rendements sont donnés après purification

#### Préparation de l'alcool **18**

La préparation de l'électrophile **18** est faite en une seule étape à partir du produit commercial, le chlorhydrate de méthyl-DL-sérine, en présence du chlorure de trityle selon les conditions développées par King *et al.*<sup>181</sup>. Ces conditions aboutissent quantitativement à la formation de l'alcool **18** après purification sur colonne.

<sup>180</sup> S. Lee *et al.*, *Tetrahedron* **1997**, 48, 16521-16532

<sup>181</sup> A. King *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4815-4830



### Préparation du diester **16** via réaction de Fukuyama-Mitsunobu

La préparation du diester **16** est envisagée par *N*-alkylation du composé **15** sur l'alcool **18** via réaction de Fukuyama-Mitsunobu selon la Figure 54.

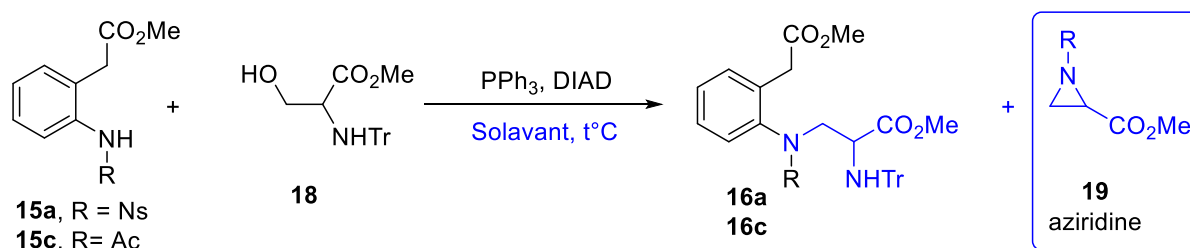


Figure 54 : formation de l'intermédiaire **16** par réaction de Fukuyama-Mitsunobu

Plusieurs conditions ont été testées pour cette réaction de Fukuyama-Mitsunobu selon le Tableau 16 :

Entrée	substrat <b>15</b>	Durée, heures	Solvant	Température, °C	Conversion <sup>a</sup> , %
1	<b>15a</b>	16	THF	t.a.	0
2	<b>15a</b>	16	THF/Toluène (1:2)	t.a.	0
3	<b>15a</b>	30	THF	120	0
4	<b>15a</b>	30	Toluène	150	0
5	<b>15a</b>	10 min	THF	100 <sup>b</sup>	0
6	<b>15a</b>	10 min	THF	120 <sup>b</sup>	0
7	<b>15a</b>	5 min	Toluène	150 <sup>b</sup>	0
8	<b>15a</b>	10 min	Toluène	150 <sup>b</sup>	0
9	<b>15c</b>	16	THF	t.a.	0
10	<b>15c</b>	10	THF	120 <sup>b</sup>	0
11	<b>15c</b>	10	Toluène	150 <sup>b</sup>	0

Tableau 16 : les conditions testées pour la *N*-alkylation de l'intermédiaire **15**. a) conversion du composé **15**. b) irradiation sous micro-ondes

Nous avons dans un premier temps testé les mêmes conditions que celles décrites par Mishra *et al.*<sup>172</sup> (entrée 1). Ces conditions ne conduisent à aucun avancement de la réaction. Les substrats de départ restant intacts. Cherney *et al.*<sup>174</sup> ont utilisé le benzène comme solvant, vue la toxicité de ce solvant nous l'avons remplacé par du toluène. Etant donné que les substrats sont peu solubles dans le toluène, du THF a été ajouté dans une proportion (1:2) (entrée 2). Ces conditions aboutissent au même résultat qu'en entrée 1. Le changement du groupe protecteur par un acétate dans les conditions de Mishra *et al.*<sup>172</sup> (entrée 9) conduit au même résultat qu'en entrée 1. Cependant, chauffer le milieu réactionnel à température plus élevée et pour une longue durée (entrée 3 et 4) conduit à la dégradation de l'alcool et également à la formation de l'aziridine **19** sans aucune modification du composé **15a**. Des résultats similaires sont obtenus quand la réaction est irradiée par

les micro-ondes (entrées 5-8, 10 et 11). Cependant, une quantité plus importante de l'aziridine **19** est observée.

Le groupement Trityle a effectivement empêché la formation de la didéhydroalanine dans nos conditions réactionnelles comme indiqué par Cherney *et al.* Par contre, le non réactivité du nucléophile **15** peut être expliqué par son encombrement stérique. Pour cela nous avons songé à la préparation de l'aniline **21** où le groupement méthyl-acétate est remplacé par un groupement allyle selon la (Figure 55). Or, cette aniline **21** est un précurseur de l'ester **15** après dihydroxylation de l'alcène et coupure oxydante du diol.

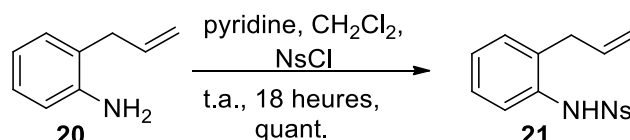


Figure 55 : préparation de l'intermédiaire **21**

La protection de l'aniline **20** par du chlorure du 2-Nitrobenzensulfonyle en présence de pyridine conduit à la formation quantitative de l'intermédiaire **21**. Malheureusement, cet intermédiaire n'a apporté aucune amélioration de la réaction de Fukuyama-Mitsunobu.

Par conséquent, l'encombrement stérique de l'alcool **18** par le groupement trityle pourrait être la raison de cette problématique, puisque Mishra *et al* ont prouvé que le couplage fonctionnait avec des anilines similaires. Par la suite, nous nous sommes concentrés sur une autre voie de synthèse pour accéder à l'intermédiaire **16** utilisant une réaction d'addition de Michael

#### Point mécanisme : réaction de Fukuyama-Mitsunobu

Le mécanisme général de la réaction de Fukuyama-Mitsunobu est décrit selon la (Figure 56) :

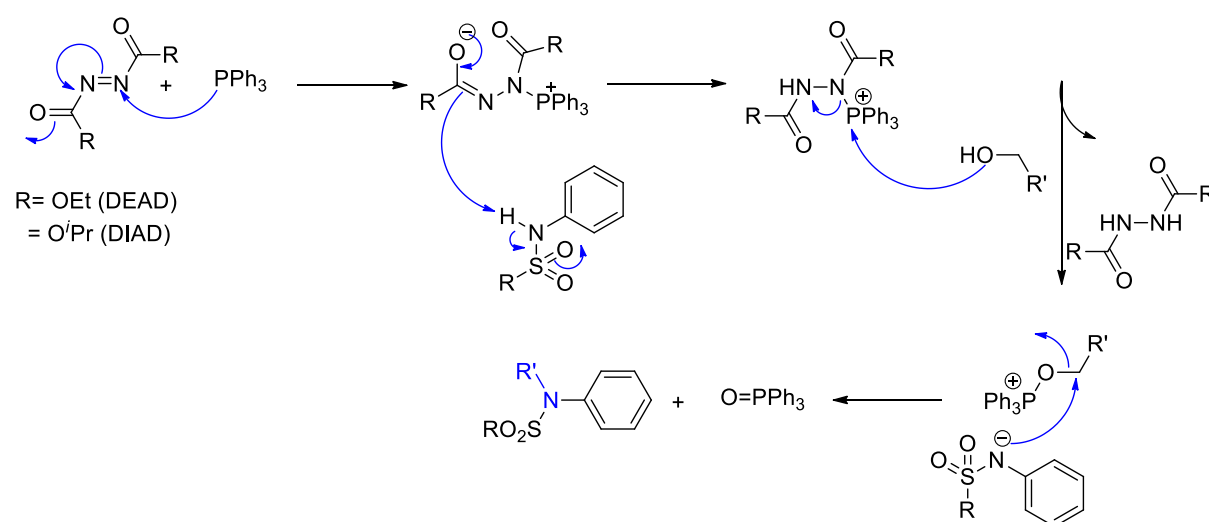


Figure 56 : mécanisme de la réaction Fukuyama-Mitsunobu

La triphenylphosphine réagit avec l'azodicarboxylate pour donner un ion phosphonium. La déprotonation de l'amine secondaire, protégée par groupement sulfonamide, va générer le nucléophile *in situ*. Puis, l'alcool primaire activé par addition sur l'ion phosphonium est attaqué

ensuite par le nucléophile azoté pour donner l'amine tertiaire ainsi libéré l'oxyde de phosphine et l'hydrazine (DIAD ou DEAD).

### Approche B : addition de Michael

Nous avons conçu une autre approche se basant sur une addition de Michael (Figure 57).

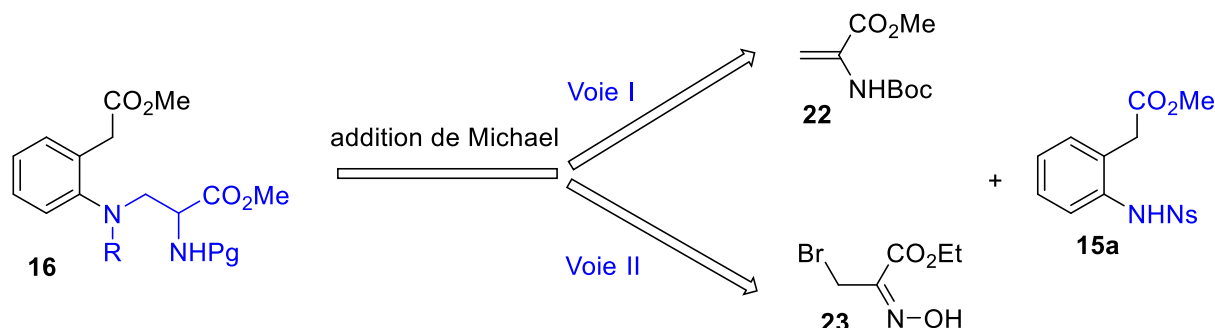


Figure 57: approche B, addition de Michael

Cette approche est répartie en deux voies : soit par addition de l'aniline **15a** sur le dérivé didéhydroalanine **22** (voie I), soit par addition de l'aniline **15a** sur le  $\alpha$ -bromo-oxime **23** (voie II).

#### Voie I : à partir de l'accepteur de Michael didéhydroalanine **22**

La préparation de l'intermédiaire **16** est envisagée par addition de Michael de la sulfonanilide **15a** et de l'accepteur de Michael **22** préparé au laboratoire selon la Figure 57.

#### Préparation de l'accepteur de Michael didéhydroalanine **22**

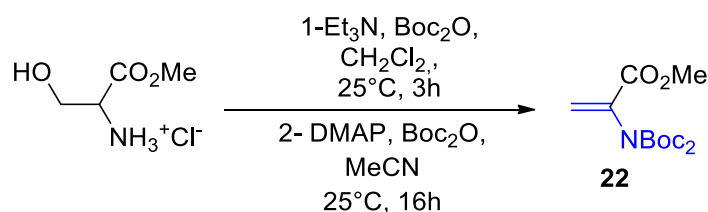


Figure 58 : préparation de l'accepteur de Michael **22**

Dans un premier temps, le composé **22** est préparé en deux étapes à partir du produit commercial l'ester méthylique de la-DL-sérine selon les conditions décrites par Ferreira *et al.*<sup>182</sup>. La première étape consiste en une *N*-mono-protection de l'amine primaire. Puis une deuxième protection de l'amine et la formation du *tert*-butylcarbonate (par addition du Boc sur l'alcool), suivie par une  $\beta$ -élimination conduisent à la formation de l'accepteur du Michael didéhydroalanine **22** (Figure 58).

<sup>182</sup> P. Ferreira *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1999**, 3697-3703



### Addition de Michael

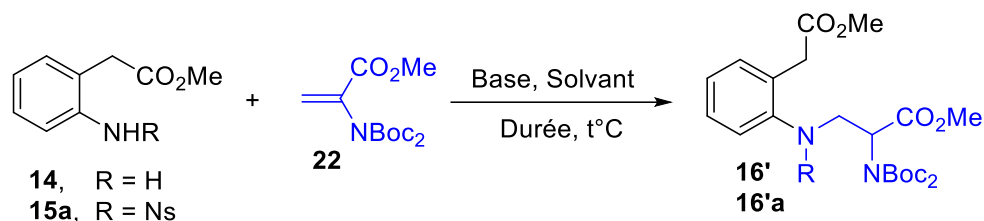


Figure 59 : formation de l'intermédiaire 16 par addition de Michael

Suite à la formation de l'intermédiaire **22**, plusieurs conditions ont été testées pour réaliser cette étape selon le Tableau 17.

Entrée	aniline	Base	Solvant	Durée, heures	Température, °C	Conversion, %
1	<b>15a</b>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MeCN	144	t.a.	0
2	<b>15a</b>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	144	t.a.	0
3	<b>15a</b>	NaH	THF	72	t.a.	0
4	<b>15a</b>	NaH	DMF	72	t.a.	0
5	<b>15a</b>	NaH	DMF	16	80	0
6	<b>15a</b>	NaH	DMF <sup>a</sup>	18	80	0
7	<b>14</b>	NaH	DMF	18	t.a.	0
8	<b>14</b>	NaH	DMF <sup>a</sup>	18	t.a.	0

Tableau 17 : les conditions testées pour l'addition de Michael <sup>a</sup>) ajout de HMPA au milieu réactionnel

Dans un premier temps, l'addition de Michael est testée en utilisant les conditions de Ferreira *et al.*<sup>183</sup> dans MeCN en présence de carbonate de césium à température ambiante pendant 6 jours (entrée 1). Ces conditions n'ont abouti à aucune conversion, les deux substrats étant récupérés intacts en fin de réaction. Par la suite, plusieurs conditions ont été envisagées en modifiant soit la base soit le solvant soit la température (entrées 2-4). Là encore, la réaction s'est soldée par un échec avec une absence de couplage. L'utilisation de l'aniline non protégé **14** a également conduit au même constat d'échec (entrée 7 et 8).

L'ajout de HMPA (hexaméthylphosphoramide), (utilisé pour sa capacité à solvater les cations et sans solvater les anions<sup>184</sup>) (entrée 6 et 8) n'a conduit à aucune amélioration de la réaction.

Selon les travaux de Ferreira<sup>178</sup>, la double protection de l'azote par un carbamate augmente la réactivité de l'accepteur de Michael **22**.<sup>185</sup> Par contre la non réactivité du nucléophile **15a** peut être expliquée par son encombrement stérique. Pour cela l'addition de Michael est testée avec les deux anilines **20** et **21** selon le (Figure 60, Tableau 18). Ces tests ont abouti aux mêmes résultats que précédemment.

<sup>183</sup> P. Ferreira *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **2000**, 3317-3324

<sup>184</sup> R. Robert *et al.*, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2001**, DOI: 10.1002/047084289X.rh020

<sup>185</sup> P. Ferreira *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **2001**, 3167-3173

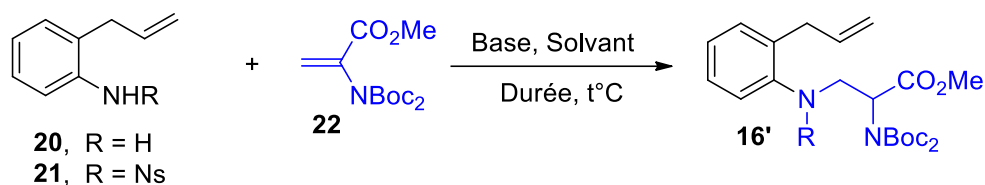


Figure 60 : formation de l'intermédiaire 16' par addition de Michael

Entrée	aniline	Base	Solvant	Durée, heures	Température, °C	Conversion, %
1	<b>21</b>	NaH	DMF	48	t.a.	0
2	<b>20</b>	NaH	DMF	12	t.a.	0
3	<b>20</b>	NaH	DMF	72	t.a.	0

Tableau 18 : les conditions testées pour l'addition de Michael des intermédiaires 20 et 21

Pour contourner ce problème nous avons envisagé un autre accepteur de Michael généré *in situ* de type nitroso alcène décrit par Pereira *et al.*<sup>186</sup> qui est plus électrophile et moins encombré.

Voie I : à partir de l'accepteur nitroso alcène 24

Dans cette voie l'addition de Michael est envisagée par addition de la sulfonamide **15a-b** sur l'accepteur nitroso-alcène **24** généré *in situ* par déhydrohalogénération de l' $\alpha$ -bromo-oxime **23** (Figure 62).

Préparation de l' $\alpha$ -bromo-oxime 23

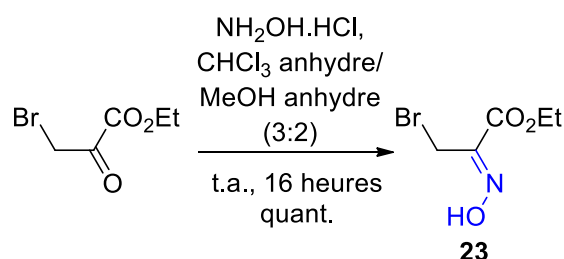


Figure 61 : préparation de l'intermédiaire  $\alpha$ -bromo-oxime 23

La synthèse débute par la condensation de l'hydroxylamine sur l'éthyle bromopyruvate dans un mélange de chloroforme anhydre et de méthanol anhydre (3: 2) à température ambiante pendant 16 heures. Cette transformation conduit à la formation de l'oxime d'éthyle bromopyruvate **23** quantitativement<sup>187</sup> (Figure 61).

<sup>186</sup> M. Pereira *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 1553–1557

<sup>187</sup> L. B. Dale *et al.*, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2999-3000

## Addition de Michael

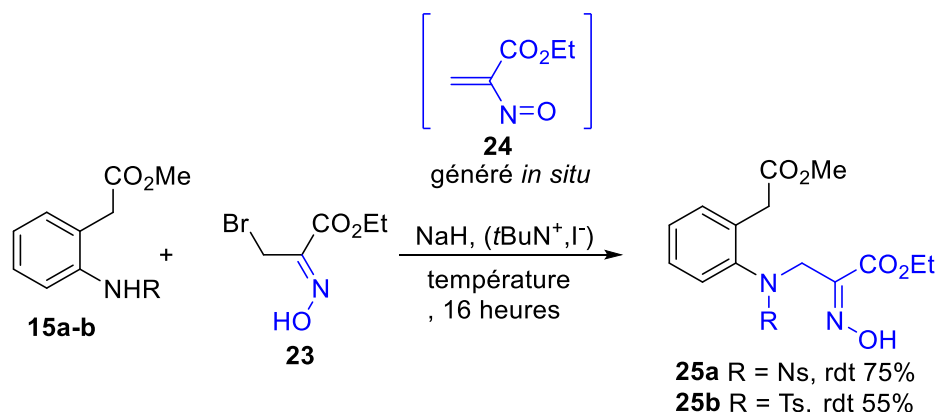


Figure 62 : préparation du diester 25a-b

Ensuite, la déprotonation de l'oxime **23** dans le THF anhydre en présence d'hydrure de sodium et du ( $t\text{BuN}^+, \text{I}^-$ ) conduit à la formation du nitroso-alcène **24** *in situ*<sup>188,189</sup>. L'addition du nucléophile **15a** ou **15b** aboutit à la formation de l'intermédiaire **25a** ou **25b** avec de bons rendements selon le Tableau 19.

entrée	aniline	Température, °C	Rendement <sup>a</sup> , %
1	<b>15a</b>	t.a.	<b>25a</b> (75%)
2	<b>15b</b>	65	<b>25b</b> (55%)

Tableau 19 : conditions pour l'addition de Michael, a) les rendements sont donnés après purification par chromatographie sur colonne

### Première tentative de Cyclisation de Dieckmann

Suite à la formation des diesters **25a** et **25b**, un essai de cyclisation de Dieckmann est réalisé sur le composé **25a** dans THF en présence d'hydrure de sodium. Ces conditions semblent favoriser une réaction de rétro-Michael régénérant le composé **15a** avec un rendement de 40% (Figure 63).

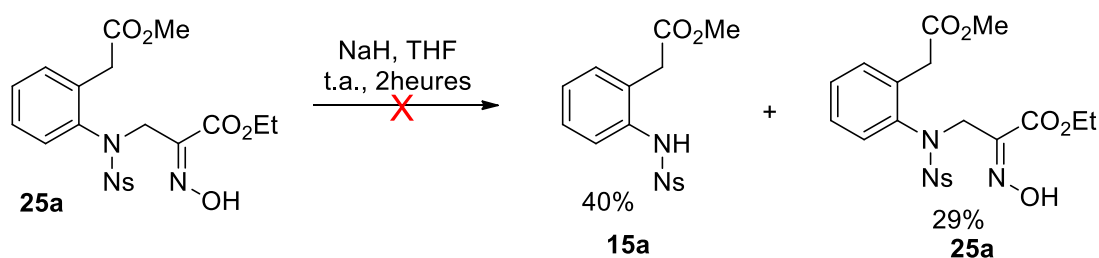


Figure 63 : condensation de Claisen. Les rendements sont donnés après purification sur plaque de silice préparative

Suite à cet échec, nous avons envisagé de préalablement réduire la fonction oxime suivie de la protection de l'amine primaire générée pour former l'intermédiaire **16**. Ensuite la cyclisation par condensation de Dieckmann de ce composé devrait conduire aux intermédiaires cyclisés **17** et **17'**(Figure 64).

<sup>188</sup> N. Pereira *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 1553-1557

<sup>189</sup> R. Plate *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 21, 3755-3758

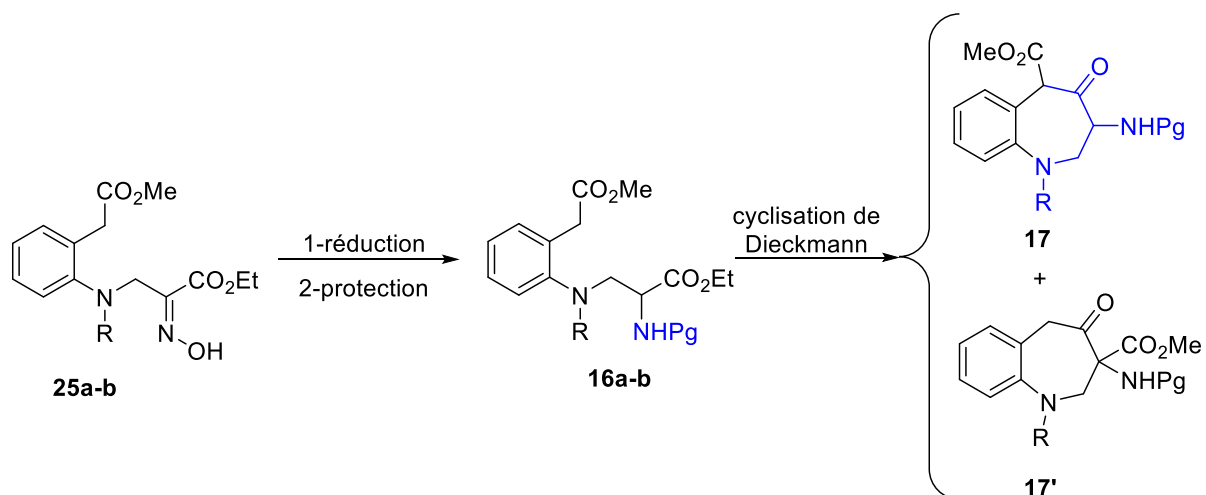


Figure 64 : nouvelle voie de synthèse par réduction de l'oxime

Malheureusement, la réduction de l'intermédiaire **25a** dans l'acide acétique en présence de poudre de zinc en quantité stœchiométrique et de poudre de Fe en tant que co-catalyseur en quantité catalytique selon les travaux de Kitagawa *et al.*<sup>190</sup> a abouti à la réduction non sélective de la fonction nitro du groupe nosyle et de la fonction oxime (Figure 65). Les différents sous-produits isolés sont caractérisés par RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C. À noter, encore une fois la présence d'un produit **15a** probablement issu d'une réaction de rétro-Michael.

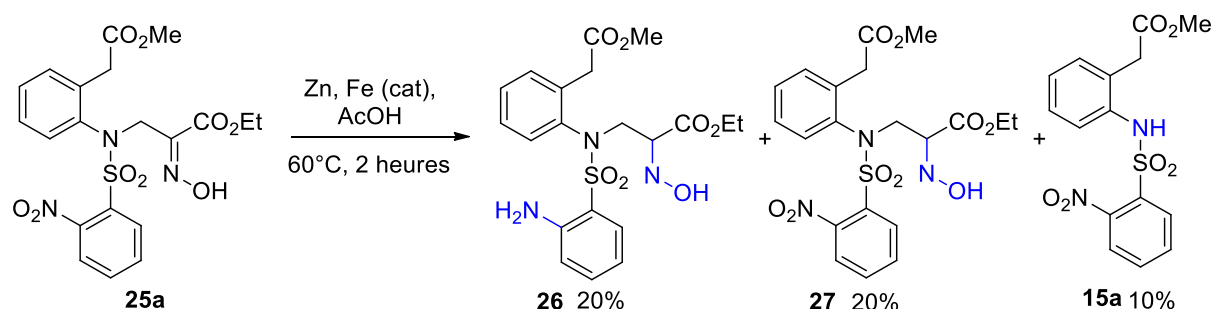


Figure 65 : sous-produits isolés après réduction de l'intermédiaire **25a**

Par contre la réduction de l'intermédiaire **25b** dans les conditions précédemment utilisées a abouti à la cyclisation spontanée de l'amine intermédiaire en lactame **28**, mais également au produit **15b** issu d'une réaction de rétro-Michael (Figure 66).

<sup>190</sup> T. Kitagawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1137-1139

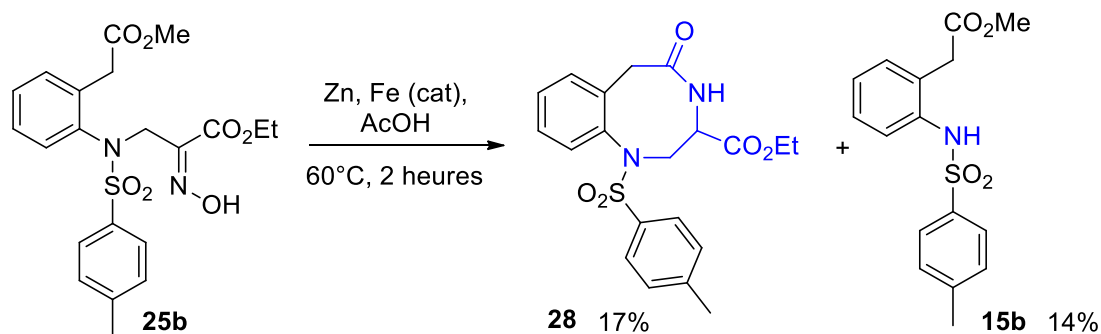


Figure 66 : sous-produits isolés après réduction de l'intermédiaire **25b**

Cette même réaction, conduite en présence de  $\text{Boc}_2\text{O}$  dans le milieu réactionnel de la réduction, ne permet pas d'obtenir le dérivé carbamate souhaité **16**.

### Approche C : Substitution nucléophile aromatique

Pour contourner les problèmes de synthèse mentionnés dans les précédentes stratégies, une approche alternative conduisant à un analogue hétéroaromatique du composé **16** a été imaginée. La synthèse de ce composé **33** repose sur une substitution nucléophile aromatique selon la voie rétro-synthétique décrit en Figure 67.

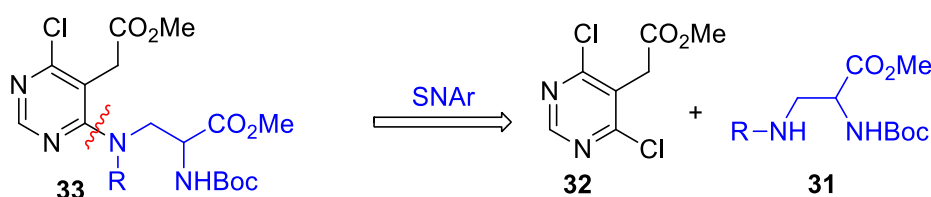


Figure 67: voie rétro-synthétique

Le composé diester **33** est préparé par substitution nucléophile aromatique à partir de l'aromatique (2-(4,6-dichloropyrimidin-5-yl) acétate de méthyle) **32** commercial et une amine secondaire **31**.

### Préparation du nucléophile **31**

Deux approches ont été envisagées pour la formation de cet intermédiaire **31**.

#### Approche 1 pour la préparation de l'intermédiaire **31**

Dans cette partie nous nous sommes inspirés des travaux de Fukuyama *et al.*<sup>191</sup> qui ont décrit le couplage de Mitsunobu entre la sulfonamide **29** et divers alcools, suivi d'une étape de déprotection dans du thiophénol/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  pour générer l'amine secondaire correspondante (Figure 68).

<sup>191</sup> T. Fukuyama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373-6374

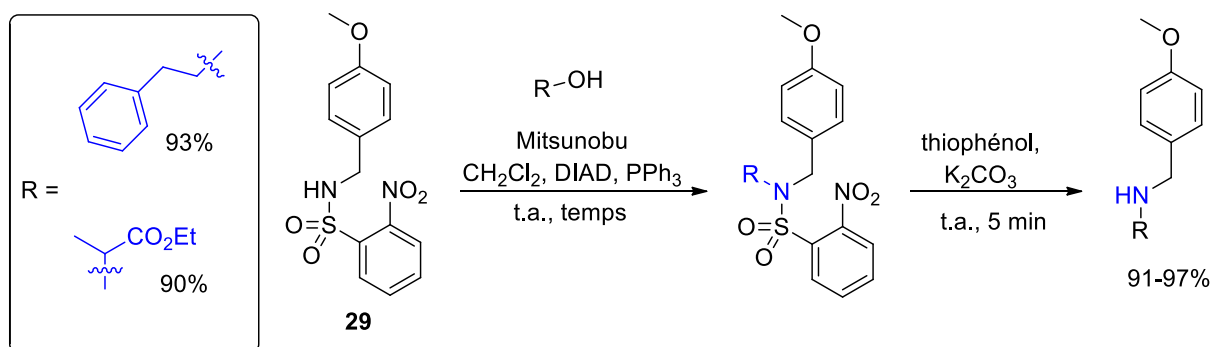


Figure 68 : réaction de Fukuyama-Mitsunobu décrite dans les travaux de Fukuyama<sup>186</sup>.

La première étape est une protection de la *p*-métoxybenzylamine par du chlorure de 4-nitrobenzenesulfonyle en présence de Et<sub>3</sub>N selon les conditions décrites par Fukuyama *et al.* Puis, une réaction de Mitsunobu est tentée selon les mêmes conditions décrites par Fukuyama (entrée 1, Tableau 20). Ces conditions ne donnent aucune conversion des substrats de départ. Le changement de solvant abouti au même résultat infructueux (entrée 2 et 3). Il en est de même du chauffage à reflux ou par irradiation sous micro-ondes dans le THF (entrée 5 et 6). (Figure 69)

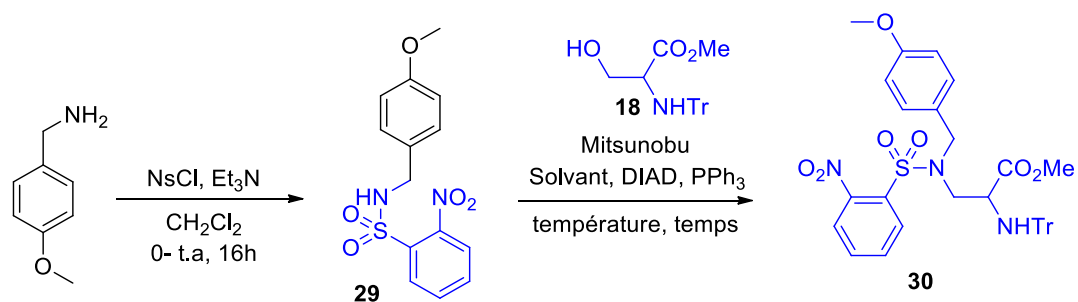


Figure 69 : préparation de l'intermédiaire 30

Entrée	Solvant	Température, °C	Durée, heures	Conversion, %
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t.a.	48	0
2	THF	t.a.	72	0
3	Toluène	t.a.	72	0
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux	24	dégradation
5	THF	reflux	72	0
6	THF	M.W. (150°C, 300W)	0,5	0

Tableau 20 : les conditions testées pour la réaction de Mitsunobu entre les intermédiaires 18 et 29

Par contre, le chauffage à reflux du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (entrée 4) a abouti à la formation de plusieurs produits de dégradation ainsi qu'à la formation de l'aziridine **19**.

#### Approche 2 pour la préparation de l'intermédiaire 31

Pour contourner les problèmes de synthèse rencontrés lors de la première approche, nous avons changé de stratégie, basée sur une réaction d'amination réductrice selon la Figure 70:

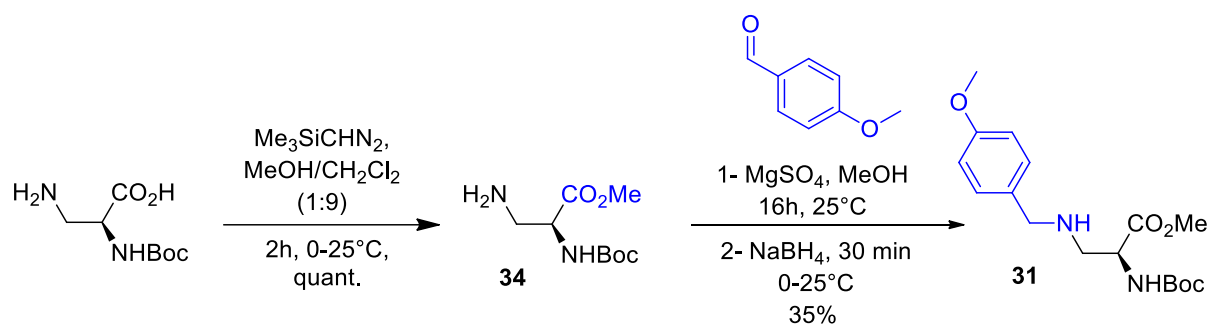


Figure 70: première voie de la synthèse

La synthèse débute par l'estérification de l'acide 3-amino-2-tert-butoxycarbonylamino-propionique (commercial) dans un mélange de  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 :9) en présence de (triméthylsilyl) diazométhane à température ambiante selon les travaux de Xiangdong *et al.*<sup>192</sup>. Ces conditions conduisent à la formation quantitative de l'ester méthylique de l'acide 3-amino-2-tert-butoxycarbonylamino-propionique **34** après purification par chromatographie sur colonne. La condensation de l'intermédiaire **34** sur le para-méthoxybenzaldéhyde (commercial) dans du  $\text{MeOH}$  anhydre et en présence de  $\text{MgSO}_4$  (agent dessicant) à température ambiante conduit à la formation de l'imine intermédiaire. Cette dernière est identifiée par RMN- $^1\text{H}$ . Il est ensuite directement réduit par  $\text{NaBH}_4$  pour former le composé diamine souhaitée **31**<sup>193</sup> avec un rendement de 35% après purification.

#### Point mécanisme : estérification par Triméthylsilyldiazométhane

Aoyama *et al.*<sup>194</sup> ont décrit en 1981 l'estérification de l'acide carboxylique par le Triméthylsilyl diazométhane comme une méthode alternative et plus sûr que celle utilisant du diazométhane. Ainsi, Kühnel *et al.*<sup>195</sup> ont montré que le méthanol dans ces conditions n'est pas l'agent de méthylation mais que ce dernier favorise la génération de diazométhane *in situ* (Figure 71).

<sup>192</sup> W. A. Xiangdong *et al.*, *WO2008/64057 A1*, **2008**, 82-83

<sup>193</sup> A. Gopin *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1853-1858

<sup>194</sup> T. Shioiri *et al.*, *Adv. Use synthons Org. Chem.* **1993**, 1, 51-101

<sup>195</sup> E. Kuhnel *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7075-7078

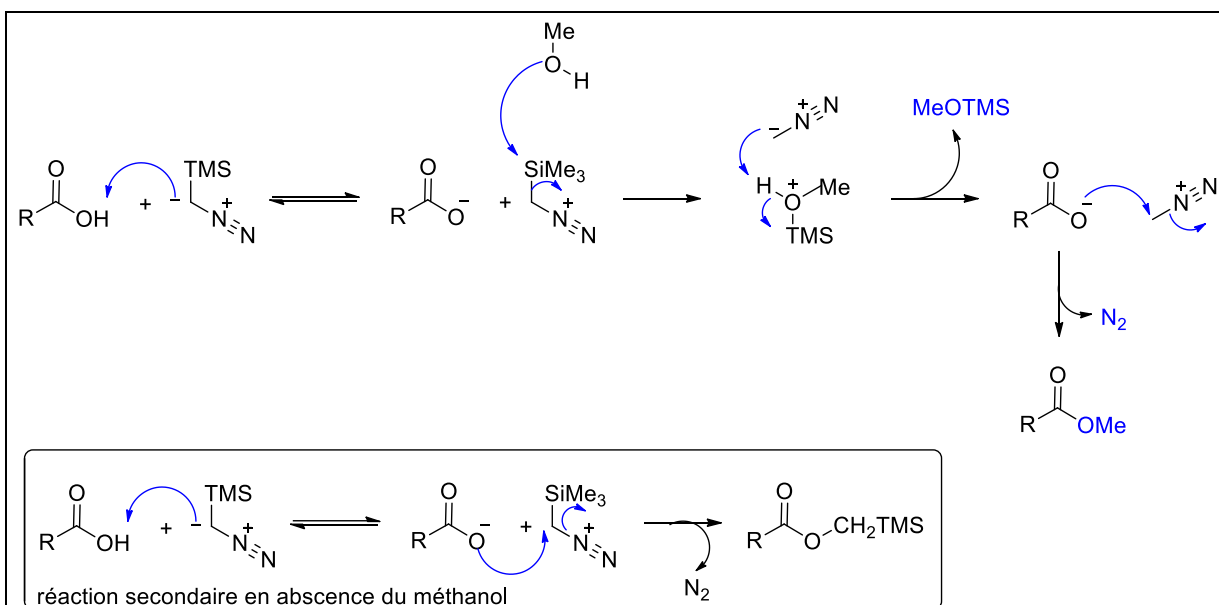


Figure 71 : mécanisme d'estérification par (triméthylsilyl) diazométhane

Le mécanisme de cette réaction est décrit selon la (Figure 71). La protonation du (triméthylsilyl) diazométhane par l'acide carboxylique suivi d'une désilylation par le méthanol dans le milieu réactionnel conduit à la génération du diazométhane *in situ*. La protonation du diazométhane suivie d'une substitution nucléophile du carboxylate sur le carbone (centre électrophile) du diazométhane conduit à la libération du  $N_2$  et la formation de l'ester méthylique.

### Substitution nucléophile hétéroaromatique (SNAr)

La formation de l'intermédiaire **35** est faite par substitution nucléophile aromatique de l'amine secondaire **31** sur le dérivé 4,6-dichloropyrimidine **32** selon la Figure 72 :

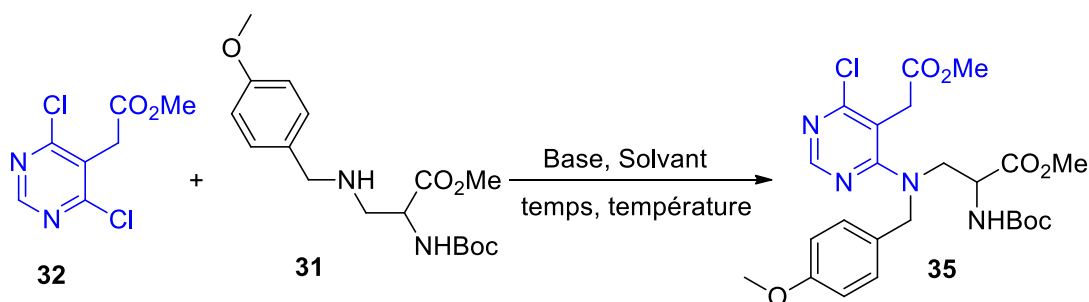


Figure 72: réaction SNAr

Cette étape s'est avérée être problématique, plusieurs conditions réactionnelles ont été testées selon le Tableau 21 et ont conduit à divers produits secondaires.



entrée	Base	Solvant	Température, °C	Temps, heures	Rendement <sup>a</sup> , %
1	DIPEA (2.2éqv.)	MeCN	t.a	16	19
2	DIPEA (2.2éqv.)	MeCN	80	16	9
3 <sup>b, c</sup>	NaHCO <sub>3</sub> (2.2éqv.)/Et <sub>3</sub> N (2.2éqv.)	<i>n</i> -Butanol	200	10/20 min	- <sup>d</sup>
4 <sup>c</sup>	NaHCO <sub>3</sub> (2.2éqv.)	DMSO	150	20 min	- <sup>d</sup>
5	NaHCO <sub>3</sub> (2.2éqv.)	DMSO	120	16	- <sup>d</sup>
6 <sup>e</sup>	DIPEA (2.2éqv.)	DMF	t.a./80	16/48	13
7	Phosphazène (P2-Et) (2.2éqv.)	THF	65	16	- <sup>d</sup>

Tableau 21 : Conditions opératoires pour la formation de l'intermédiaire **35** ; a) rendement isolé après purification. b) 200°C pendant 10 min puis 200°C pendant 20 min c) la réaction est chauffée par irradiation sous micro-ondes avec une puissance de 300W. d) l'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H montre une dégradation des substrats de départ et la formation de plusieurs sous-produits. Aucune purification n'a été réalisée. e) le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16h puis chauffer à 80°C pendant 48h.

La substitution du chlore de l'aromatique **32** par l'amine **31** dans MeCN à température ambiante (entrée 1<sup>196</sup>) conduit à la formation de l'intermédiaire **35** avec un rendement de 19% après purification sur plaque préparative. La RMN-<sup>1</sup>H du brut est propre et montre la présence du produit souhaité et des substrats de départ. Pour améliorer le rendement de la réaction nous avons chauffé le milieu réactionnel à 80°C (entrée 2). Malheureusement le chauffage a conduit à la dégradation du nucléophile. En effet trois produits ont été isolés dont **32** (rdt, 55%), **35** (rdt, 9%) et la *p*-méthoxybenzylamine (rdt, 25%). Ensuite, le chauffage est effectué par irradiation sous micro-ondes (entrées 3 et 4). Ces conditions conduisent à la dégradation des substrats de départ. Les mêmes résultats ont été obtenues par voie thermique (entrée 5). L'utilisation d'une base forte comme le Phosphazène (P2-Et) dans le THF à 65°C conduit à son tour à la dégradation des substrats de départ (entrée 7). L'utilisation de DMF à température ambiante (entrée 6)<sup>197</sup> en présence du DIPEA ne donne aucune conversion. Par contre, le chauffage du milieu réactionnel à 80°C résulte en une conversion lente et aboutit après 48h à la formation de l'intermédiaire **35** avec un rendement 13%. Les faibles rendements obtenus dans les entrées 1, 2 et 6 peut être dû à l'encombrement stérique du nucléophile. Il sera important d'optimiser les conditions expérimentales de cette étape surtout pour les entrées 1 et 6.

### Analogue en série oxygénée

Vue la difficulté de synthétiser les composés de type benzazépine, nous avons tenté de préparer l'intermédiaire **37** en série oxygénée par un schéma rétrosynthétique semblable à celui décrit précédemment. (Figure 73)

<sup>196</sup> G. R. Carr *et al.*, *Tetrahydron Lett.* **2012**, 53, 5049-5055

<sup>197</sup> Bayer HealthCare AG ; EP1471057 A1, **2004**, 24

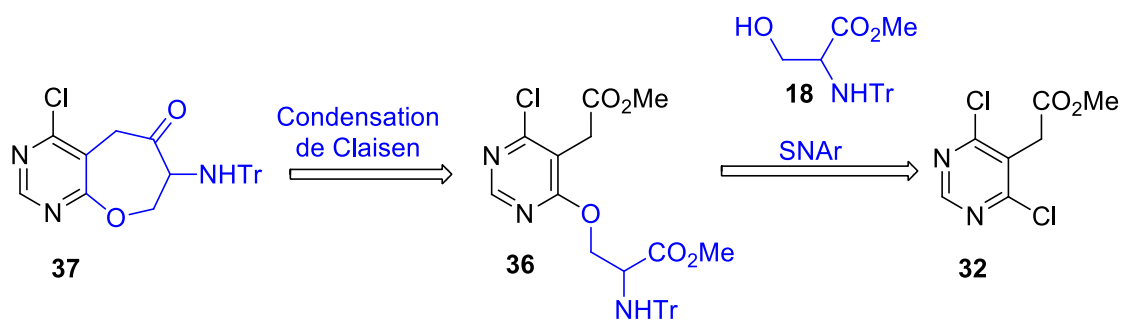


Figure 73 : voie rétrosynthétique pour former l'analogue oxygéné

Préparation de l'intermédiaire 36

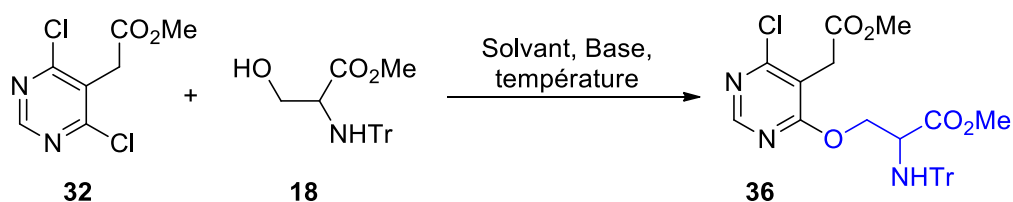


Figure 74: préparation du diester 36 par réaction SNAr

La préparation de l'intermédiaire **36** est réalisée par réaction SNAr du dérivé de la sérine **18** sur le dérivé 4,6-dichloropyrimidine **32** selon la Figure 74.

Entrée	Base	Solvant	Température, °C	Temps, heures	Rendement, %
1	KOH	THF	t.a.	16	0
2	NaH	THF	t.a	16	0
3	NaH	THF	80-90	16	50

Tableau 22 : conditions opératoires pour SNAr. Les rendements sont donnés après purifications par chromatographie sur colonne

La substitution du chlore de l'aromatique **32** par la sérine **18** dans le THF anhydre et en présence d'hydroxyde de potassium à température ambiante ne conduit à aucune conversion (entrée 1). Le changement de la base et l'utilisation de NaH (entrée 2) dans les mêmes conditions n'aboutit à aucun avancement de la réaction. Par contre, le chauffage du milieu réactionnel à 80-90°C selon les conditions décrites dans l'entrée 3 en présence de NaH aboutit à la formation du produit souhaité avec un rendement de 50% après purification.

### Condensation de Dieckmann

Ensuite, la cyclisation de l'intermédiaire **36** est tentée selon la Figure 75:

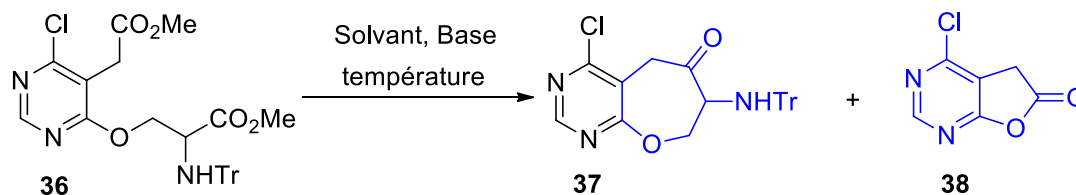


Figure 75: condensation de Claisen du diester **36**

Plusieurs conditions opératoires ont été tentées pour la cyclisation du composé **36** selon le Tableau 23.

Entrée	Base	Solvant	Température, °C	Temps, heures	Rendement, %
1 <sup>a</sup>	NaH	Toluène	t.a./reflux	16/16	0/dégradation
2 <sup>a</sup>	NaH	THF	reflux	16	0/dégradation
3	NaHDMS	Toluène	-78°C/t.a.	4/16	0
3 <sup>a</sup>	NaHDMS	THF	-78°C/t.a.	4/16	0/dégradation
5 <sup>a</sup>	<i>t</i> BuOK	Toluène	t.a./reflux	16/16	0/dégradation

Tableau 23 : conditions opératoires pour la cyclisation de Dieckmann a) dégradation du substrat de départ

La cyclisation de **36** en présence d'hydrure de sodium dans le toluène ne donne aucune conversion du substrat de départ à température ambiante. Par contre l'augmentation de la température du milieu réactionnel en chauffant à reflux aboutit à la dégradation du substrat de départ (entrée 1). De même, la cyclisation de **36** dans le THF et en présence du NaH à reflux conduit à la formation du sous-produit **38** pouvant être issu d'une réaction de rétro-Michael suivi d'une cyclisation pour donner le dérivé benzofurane (entrée 2). Par la suite, nous avons testé l'utilisation de NaHDMS dans le toluène, ces conditions ne conduisent à aucune conversion (entrée 3) que ce soit à -78°C ou à température ambiante. Cela peut être dû à un problème de solubilité du substrat dans le toluène. Le toluène a donc été remplacé par du THF sans aucune amélioration de la réaction. Enfin, nous avons tenté l'utilisation de *t*BuOK (2.2 éqv.) dans le toluène pendant 16 heures, ces conditions ne donnent aucune conversion. L'ajout supplémentaire de 2.2 éqv. de *t*BuOK conduit de même à aucun avancement de la réaction. Le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 16 heures ce qui résulte en la dégradation du substrat de départ.

Puisque la cyclisation de l'intermédiaire **36** conduit essentiellement à la dégradation du substrat, nous avons envisagé une autre stratégie pour accéder au composé **17** et qui se base sur une métathèse cyclisante.

## Métathèse cyclisante

Cette stratégie a été inspirée des travaux de Quadir *et al.*<sup>198</sup>, de Ghosh *et al.*<sup>199</sup> ainsi que de ceux de Moss<sup>200</sup>. Ces différentes équipes ont travaillé sur la synthèse des dérivés benzazépine dont l'étape clé est une métathèse cyclisante permettant de former le cycle à sept chaîsons. (Figure 76)

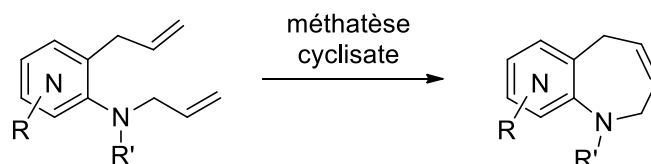


Figure 76 : dérivés benzazépine

Ce travail a été initié au laboratoire par Dr. Germain Relevant (postdoctorant). Ce dernier a décrit la préparation des dérivés de 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazépin-4-one substitués en position 1 selon le schéma réactionnel suivant (Figure 77).

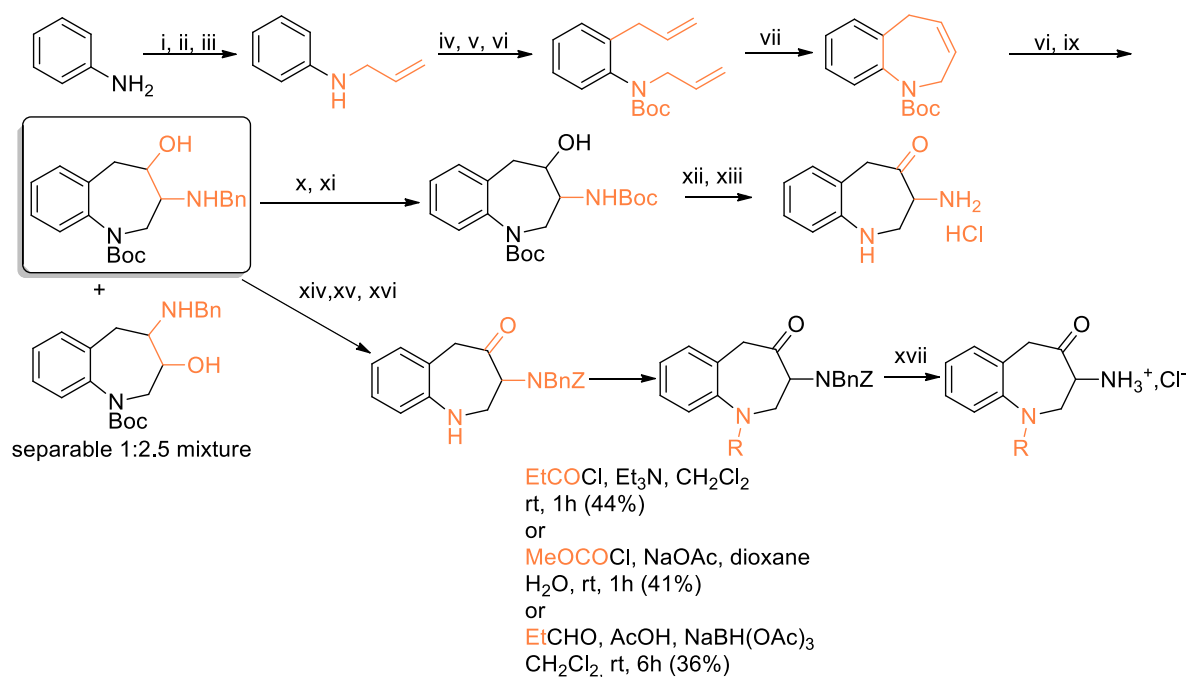


Figure 77 : préparation des dérivés 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazépin-4-one substitués en position 1 par Dr. Germain Relevant : i- Boc<sub>2</sub>O, THF, reflux, 5h (90%), ii-NaH, AllylBr, THF, rt, 2h (quant.), iii- AcCl, MeOH, rt, 2h (85%), iv-BF<sub>3</sub> Et<sub>2</sub>O, xylènes, M.W. 145°C, 2h (57%), v-Boc<sub>2</sub>O, THF, 70°C, 5h (97%), vi-NaH, AllylBr, THF, rt, 2h (60%), vii-catalyseur de Grubbs 2<sup>nd</sup>e génération, toluène, 60°C, 4h (84%), viii-oxone, NaHCO<sub>3</sub>, acetone/H<sub>2</sub>O, rt, 16h (95%), ix-benzylamine, EtOH, 80°C, 16h (70%), x-NH<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>H, Pd/C 10%, MeOH, 70°C, 2h (85%), xi-Boc<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 16h (80%), xii-DMP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 3h (50%), xiii- HCl 2N dans Et<sub>2</sub>O, dioxane, rt, 16h (95%), xiv-CbzCl, NaOAc, dioxane, H<sub>2</sub>O, rt, 4h (78%), xv-DMP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 3h (87%), xvi-TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C to rt, 2h (87%), xvii-H<sub>2</sub>, Pd/C (5%) aq. 1N HCl, EtOH rt, 4h.

<sup>198</sup> M. Quadir *et al.*, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1545-1551

<sup>199</sup> D. Ghosh *et al.*, *Synlett.* **2008**, 19, 3011-3015

<sup>200</sup> T. A. Moss *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 993-997

En se basant sur la voie de synthèse développée par Dr. G. Revelant, nous nous sommes intéressés à la préparation des analogues 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazépin-4-one substitués en positions 1 et 6. La préparation de ces dérivés **47** a été envisagée selon la voie rétrosynthétique décrite Figure 78 dont l'étape clé est la formation du cycle à sept chaîons par une réaction de métathèse cyclisante. La cétone **47** serait préparée par manipulation du groupe fonctionnel alcène du cycloalcène **46**. Ce dernier pourrait être obtenu par métathèse cyclisante à partir du di-allyle **45**, qui serait obtenu par introduction du motif allyle sur l'aniline **41a**. L'intermédiaire **41a** serait, quant à lui, préparé par un réarrangement de Claisen de l'hydroxy-aniline commercial préalablement *O*-allylé.

La présence d'une fonction hydroxy en position 6 permettrait d'introduire tardivement de la diversité *via* des réactions de couplages palladocatalysés avec le triflate correspondant. De plus, d'après les résultats des tests *in vitro* sur APN et rPfA-M1, l'azote en position 1 devrait préférentiellement être substitué par un reste carboxyméthyle (les résultats des tests *in vitro* sont détaillés en chapitre 6).

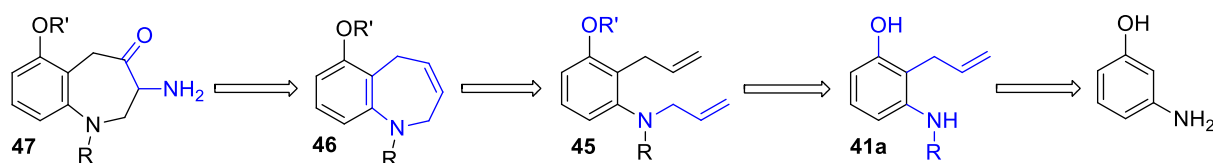


Figure 78 : voie rétrosynthétique pour la préparation des dérivés 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazépin-4-one substitués en positions 1 et 6

### Préparation de l'hydroxy-aniline (**41a**)

L'hydroxy-aniline **41a** est préparée en trois étapes à partir du produit commercial 3-hydroxyaniline (Figure 79).

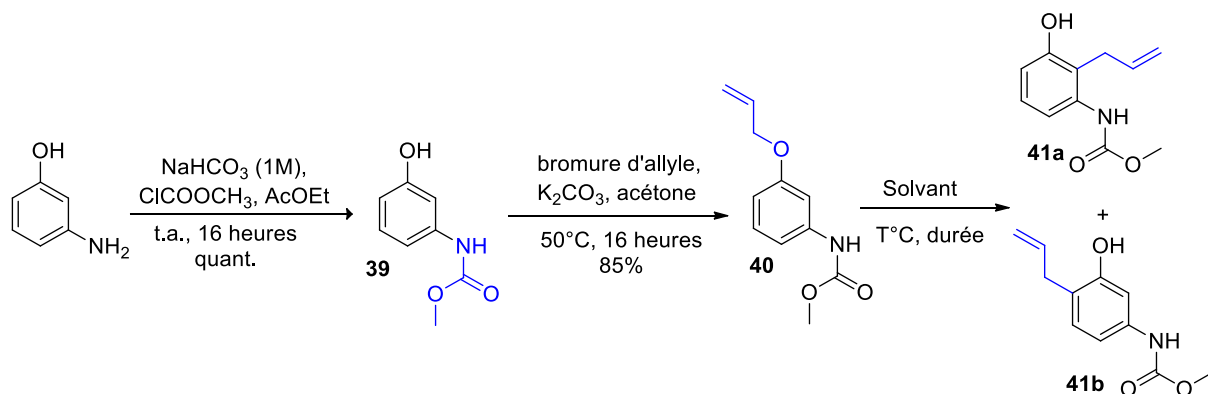


Figure 79 : préparation des anilines **41**

Ainsi, le motif carboxyméthyle est introduit dès le début de la synthèse par traitement de l'aniline commerciale avec du chloroformiate de méthyle dans l'acétate d'éthyle en présence d'une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$ , selon les conditions décrites par Steven *et al.*<sup>201</sup>. Ces conditions conduisent quantitativement au carbamate **39** après purification par chromatographie colonne. Le phénol est ensuite allylé par le bromure d'allyle dans l'acétone en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ <sup>202, 203</sup> pour donner l'éther

<sup>201</sup> J. Steven *et al.*, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6666-6671

<sup>202</sup> S. sakamuri *et al.*, *Chem. Commun.* **2001**, 475-476

<sup>203</sup> T. Richard *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 1023-1025

allylique **40** avec un rendement de 85% après purification par chromatographie colonne. Enfin, La préparation de l'hydroxy-aniline **41** a été envisagée par réarrangement de Claisen de l'éther allylique **40**. Cette réaction n'est pas régiosélective et conduit à la formation des deux régioisomères **41a** et **41b**. Plusieurs conditions opératoires ont été réalisées selon le Tableau 24.

entrée	Solvant	Température, °C	Durée	Rendement %
1 <sup>197</sup>	N, N diméthylaniline	195	16h	_ <sup>b</sup>
2	Sulfolane	195	5h30	72%
3	Xylène (non anhydre)	145 <sup>a</sup>	2h	0%
4	Sulfolane	200 <sup>a</sup>	30 min	89% <sup>c</sup>
5	Sulfolane	200 <sup>a</sup>	45 min	100% <sup>c</sup>
6	Sulfolane	200 <sup>a</sup>	1h	100% <sup>c</sup>

Tableau 24 : conditions de la réaction de Claisen. a) micro-onde à 300W. b) le spectre RMN-<sup>1</sup>H montre une conversion <10%. c) Les rendements dans les entrées 4, 5 et 6 sont calculés par RMN-<sup>1</sup>H en utilisant le 1,4-dioxane comme étalon interne.

Dans un premier temps le réarrangement de Claisen est réalisé à 195°C dans le *N, N*-diméthylaniline selon les conditions de Sakamuri *et al.*<sup>197</sup> (entrée 1). Ces conditions conduisent à un très faible avancement de la réaction. Par la suite, le sulfolane a été utilisé comme solvant à 195°C (entrée 2), ces conditions aboutissent à la formation des deux régioisomères (**41a**-35%) et (**41b**-38%) après purification par chromatographie colonne.

Pour améliorer le rendement, le milieu réactionnel a été chauffé par irradiation micro-ondes. L'utilisation du xylène comme solvant (entrée 3) conduit à la dégradation du substrat de départ. Par contre, l'utilisation du sulfolane comme solvant mène à la formation des deux régioisomères (**41a**-35%) et (**41b**-54%) après 30 minutes de chauffage (entrée 4). Par ailleurs, chauffer la réaction pendant 45 min ou 60 min (entrées 5 et 6) conduit à la formation quantitative des deux régioisomères dans des proportions 1 : 2 pour le régioisomère non-souhaité **41b**.

Par la suite, les conditions écrites dans l'entrée 2 ont été adoptées pour cette étape, puisqu'elles conduisent au meilleur rendement pour le produit **41a**.

### Point mécanistique : Réarrangement de Claisen

Le réarrangement de Claisen est une réaction formant une liaison carbone-carbone, lorsqu'on chauffe un vinyle éther allylique. Il s'agit de réactions péricycliques concertées, ou une transposition sigmatropique [3, 3] a lieu. Le mécanisme en général est comme suivant<sup>204</sup> (Figure 80)

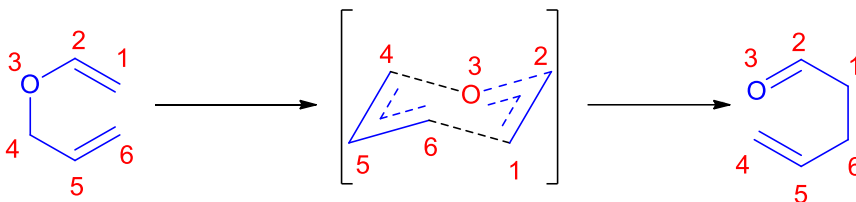


Figure 80 : mécanisme de réarrangement de Claisen

### Préparation du di-allyle (45)

La préparation du di-allyle **45** a été réalisée en deux étapes : une protection de la fonction phénol suivie d'une *N*-allylation, à partir de l'hydroxy-phényle **41a** (Figure 81). Deux groupements ont été envisagés soit par un trifluorométhanesulfonyle (Tf) (**Voie I**) ou par le groupement protecteur benzyle (Bn) (**Voie II**).

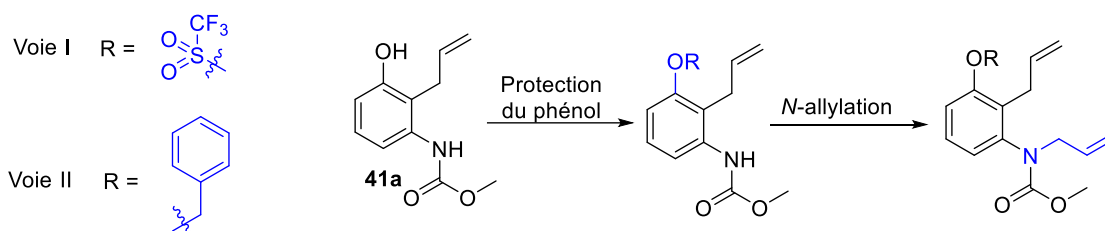


Figure 81 : préparation du di-allyle 45 par voie 1 ou voie II

Dans un premier temps nous avons introduit sur la fonction phénol un groupe trifluorométhanesulfonyle (**voie I**). Cette étape nous semble judicieuse puisque le phénol serait à la fois protégé (selon les travaux breveté par Eisai<sup>205</sup>) et activé vis-à-vis d'une réaction de couplage palladocatalysée ultérieure. Le triflate **42** est obtenu par traitement du phénol **41** par de l'anhydride trifluorométhanesulfonique dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence du triéthylamine, selon les conditions de Xu *et al.*<sup>206</sup>. Ces conditions conduisent à la formation de l'intermédiaire triflate **42** avec un rendement de 73% après purification. (Figure 82)

La *N*-allylation de l'intermédiaire triflate **42** avec du bromure d'allyle dans THF anhydre et en présence d'hydrure de sodium conduit à la formation de plusieurs sous-produits selon la Figure 82. L'isolement par chromatographie sur colonne des intermédiaires **43a** et **43b** s'est avéré impossible. Ces deux composés ont un R<sub>f</sub> identique au substrat **42**. Cependant une analyse RMN <sup>19</sup>F a montré la présence de deux produits fluorés dont le substrat **42**. Or, la RMN <sup>1</sup>H montre la présence de trois types de protons méthyléniques de l'allyle : en α de l'azote (sous forme de doublet dédoublé à 4.35) en α de l'aromatique (sous forme de doublet de triplet à 3.91 ppm) et en α de l'oxygène (sous forme

<sup>204</sup> J. Gajewski *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 219-225

<sup>205</sup> R. Eisai *et al.*, *Patent WO2009/15368 A2*, **2009**, 103

<sup>206</sup> X. H. Xu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12628-12631

de doublet de triplet à 5.54 ppm). Par ailleurs, la présence des molécules **42**, **43a** et **43b** a été confirmée par spectroscopie de masse.

En revanche, l'hydroxy-aniline **43c** a été isolée plus facilement et sa présence a été confirmée ensuite par spectroscopie de masse.

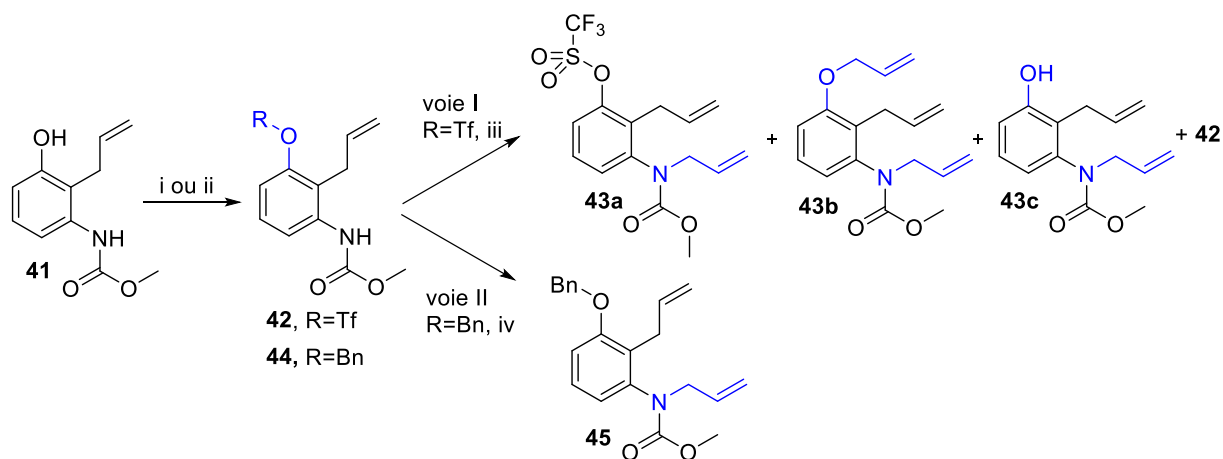


Figure 82 : préparation de l'intermédiaire di-allylique i-(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 2h. (73%), ii- Bromure de Benzyle, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, t.a., 16 h. (85%), iii-bromure d'allyle, THF, NaH, t.a., 2 heures (dégradation), iv-bromure d'allyle, THF, NaH, *t*BuNI, t.a., 2 heures (quantitatif).

Vue la difficulté de préparer l'intermédiaire di-allyle **43a**, nous avons songé à remplacer le groupe triflate par un O-benzyle selon la **voie II** (Figure 82). La protection du phénol **41** par un benzyle est faite dans les conditions classiques au laboratoire, dans la DMF en présence du bromure de benzyle et de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ces conditions conduisent à la formation de l'éther benzylique **44** avec un rendement de 85% après purification. Ensuite, la *N*-allylation de l'aniline **44** par du bromure d'allyle est faite dans du THF en présence du NaH et de *t*BuNI (en quantité catalytique) selon les travaux de Papaioannou *et al.*<sup>207</sup>. Ces conditions conduisent à la formation quantitative de l'aniline **45** après purification par chromatographie sur colonne.

#### Formation du dérivé benzazépine (46)

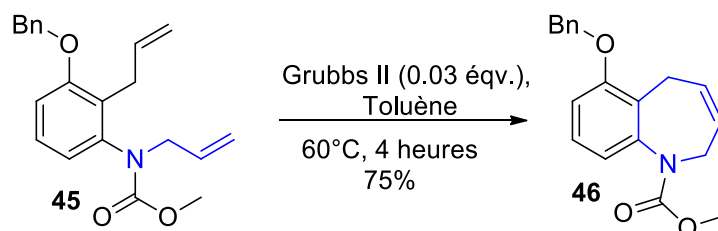


Figure 83 : métathèse cyclisante

<sup>207</sup> Papaioannou *et al.*, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 2728-2734



La cyclisation de l'intermédiaire di-allyle **45** a eu lieu via la réaction de métathèse cyclisante selon les conditions d'Otterlo *et al.*<sup>208</sup>, dans du toluène et en présence du catalyseur Grubbs II à 60°C pendant 4 heures (Figure 83). Ces conditions conduisent à la formation de l'intermédiaire bi-cyclique **46** avec un rendement de 75% après purification sur chromatographie colonne.

#### Point mécanistique : métathèse cyclisante

La réaction de métathèse cyclisante (RCM)<sup>209, 210</sup> est un outil puissant en synthèse organique pour la formation de liaisons carbone-carbone. Elle consiste en une succession de cycloaddition et rétrocycloaddition [2+2], en passant par des intermédiaires métallacyclobutanes<sup>211, 212, 213</sup> selon (Figure 84).

Chauvin et Hérisson ont proposé un mécanisme général pour cette réaction<sup>214</sup>. La première étape du cycle catalytique est une réaction de cycloaddition [2+2] entre le complexe métal-carbène A et une des deux oléfines du diène acyclique pour former le métallacyclobutane B. Une rétrocycloaddition libère alors une molécule d'éthylène et un nouveau carbène métallique C. ensuite, une nouvelle séquence de cycloaddition avec l'autre oléfine, puis une rétrocycloaddition conduit à la formation du nouveau cycle et régénère le complexe métal carbénique A.

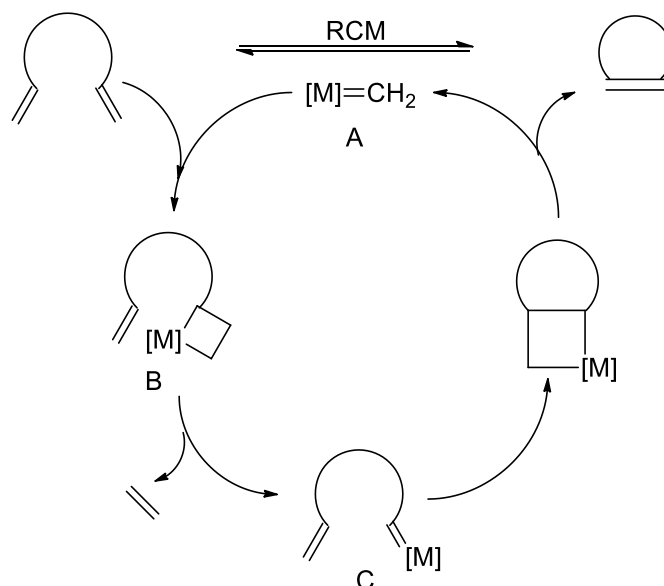


Figure 84 : mécanisme de la RCM

#### Préparation de l'intermédiaire cétonique (47)

La préparation de l'intermédiaire cétonique **47** a été envisagée par deux voies selon la (Figure 85). La **voie A** consiste en une oxydation de l'oléfine par  $\text{RuO}_4^-$  pour former l'hydroxy-cétone désirée **48a**. La **voie B** est similaire à celle développée par Dr G. Relevant et est basée sur une époxydation de l'alcène, suivie d'une ouverture de l'époxyde pour mener à l'intermédiaire alcoolique **50a** et ensuite à l'intermédiaire cétonique **47**.

<sup>208</sup> A. Otterlo *et al.*, *SYNLETT*. **2003**, 12, 1859-1861

<sup>209</sup> G. C. Fu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5426-5427

<sup>210</sup> G. C. Fu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7324-7325

<sup>211</sup> J. L. Hérisson *et al.*, *Makromol. Chem.* **1971**, 141, 161-176

<sup>212</sup> T. J. Katz *et al.*, *Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1592-1594

<sup>213</sup> E. L. Dias *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3887-3897

<sup>214</sup> J. L. Hérisson *et al.*, *Makromol. Chem.* **1971**, 141, 161-176

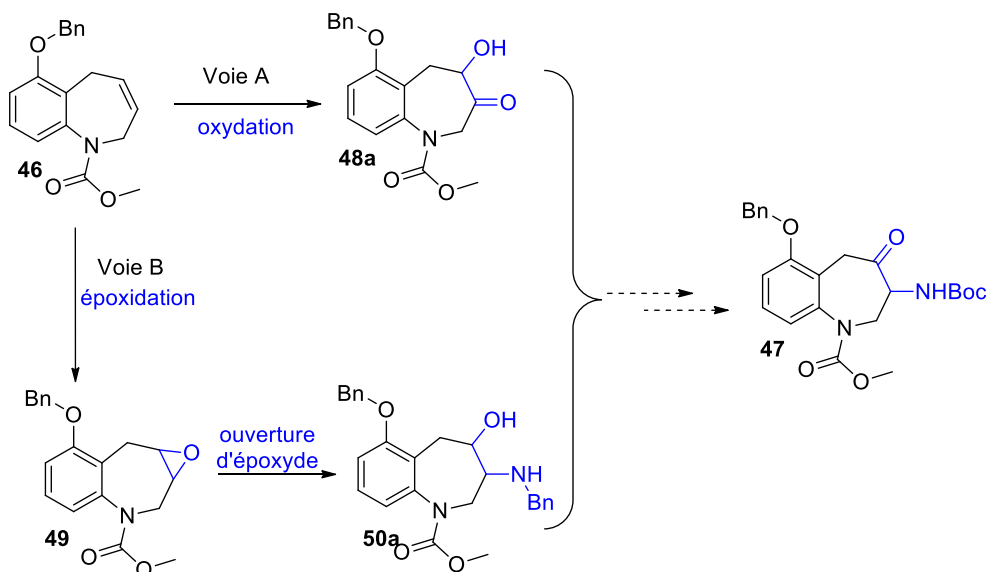


Figure 85 : fonctionnalisation du cycle à sept de l'intermédiaire bicyclique 47

#### Voie A : oxydation de l'alcène 46

Cette voie a été inspirée par les travaux de Plietker<sup>215</sup> qui a décrit l'oxydation d'un alcène en présence de  $\text{RuCl}_3$  et d'oxone dans une solution tampon à pH=7 pour former une  $\alpha$ -hydroxy-cétone. Ces conditions ont essentiellement conduit à la dégradation de l'alcène de départ 46. (Figure 86) Plietker avait noté que la présence d'un groupe fonctionnel labile en milieu acide ou d'un hétéroatome oxydable incorporé à proximité de la double liaison sont des limitations à cette réaction.

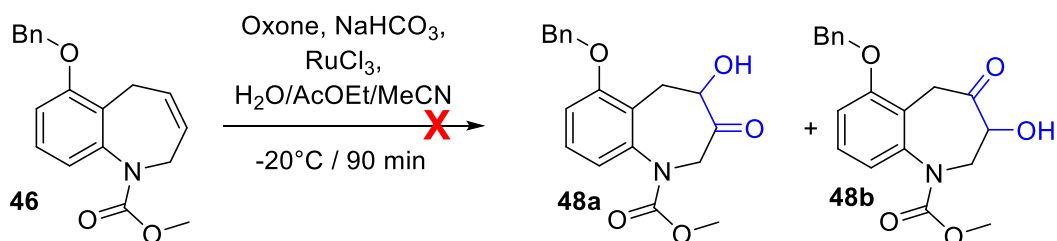


Figure 86 : oxydation de l'alcène 87

#### Voie B : formation de l'époxyde

Pour contourner les problèmes rencontrés dans la voie A, la fonctionnalisation de l'alcène 46 est envisagée selon la voie B selon la (Figure 87). Dans un premier temps, l'oxydation de l'alcène 46 par le diméthylidioxirane généré *in situ* dans les conditions classiques conduit à la formation de l'époxyde 49 avec un rendement de 62% après purification par chromatographie sur colonne. Ensuite l'ouverture de l'époxyde conduit à la formation de deux régioisomères 50a et 50b avec un ratio de (3 : 4) et un rendement de 75% pour les deux régioisomères. L'identification de ces deux produits, par RMN- $^1\text{H}$ , s'est avérée très problématique due à l'encombrement stérique et au fort empêchement de rotation. Par contre, leur formation a été confirmée par spectroscopie de masse.

<sup>215</sup> B. Plietker *et al.*, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8287-8296

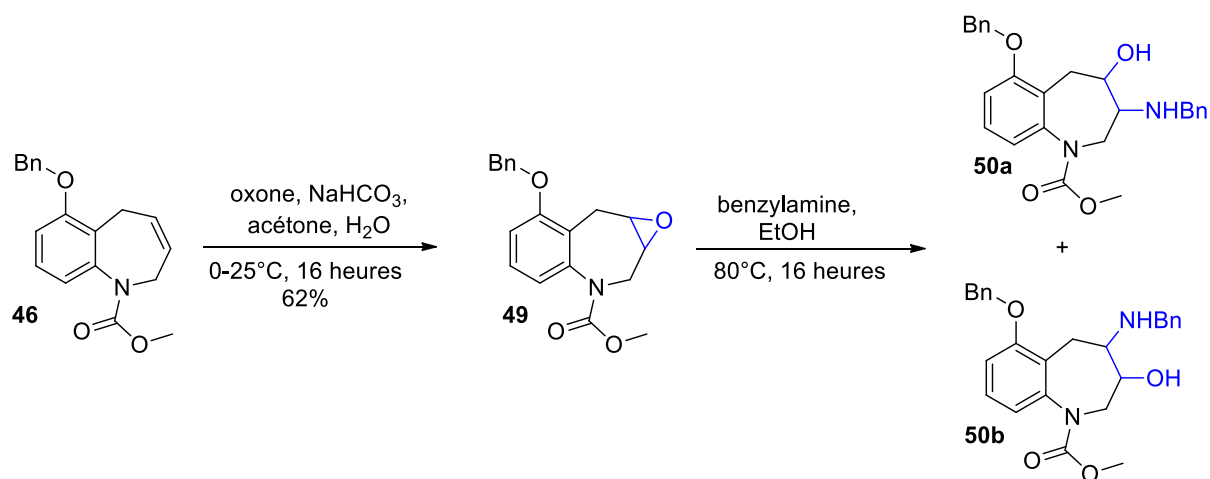


Figure 87 : voie B

Pour éviter le problème d'encombrement stérique et faciliter la caractérisation des produits, il serait envisageable d'utiliser un groupement protecteur moins volumineux ou continuer la synthèse vers l'étape suivante et déprotéger les groupements benzyle pour identifier les deux régioisomères.

## Amination réductrice

En parallèle à l'approche par métathèse cyclisante, nous avons investigué la préparation des dérivés benzazépine par amination réductrice. Cette stratégie est inspirée par les travaux de Williams *et al.*<sup>216, 217, 218</sup> ainsi que ceux de Suzuki *et al.*<sup>219</sup> qui ont décrit la synthèse des dérivés benzazocine par amination réductrice comme étape clé, pour former un cycle à huit chaînons, dans la synthèse des pro-mitosènes. Ainsi, ils ont décrit la formation du nitro-aldéhyde soit par addition nucléophile (William *et al.*) soit par réaction Sonogashira (Suzuki *et al.*) selon la Figure 88 et la Figure 89.

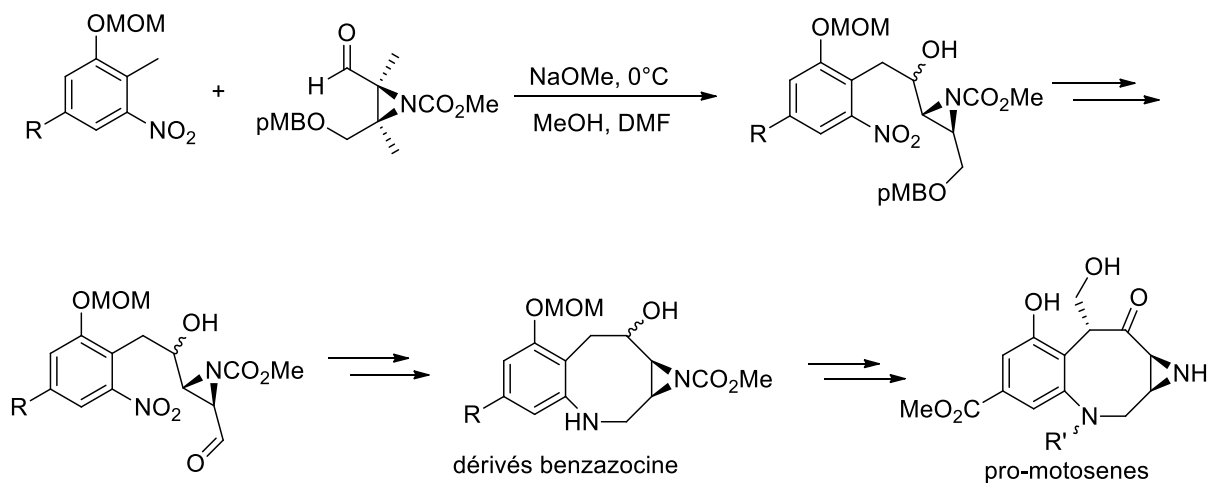


Figure 88 : préparation des dérivés benzazocine par amination réductrice selon Williams *et al.*

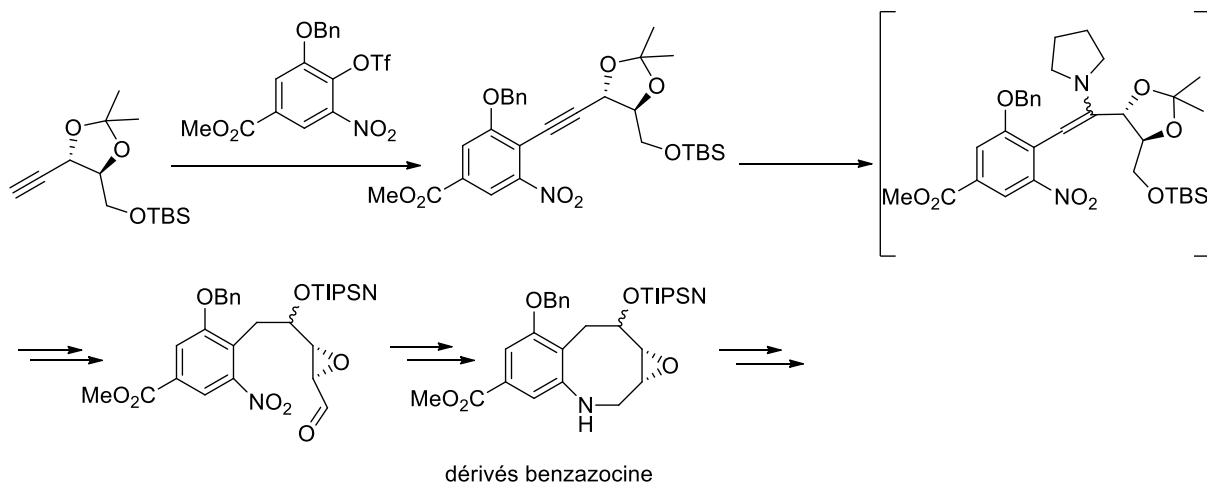


Figure 89 : préparation des dérivés benzazocine par amination réductrice selon Suzuki *et al.*

<sup>216</sup> R. Williams *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4033-4036

<sup>217</sup> R. Williams *et al.*, *Tetrahedron* **2000**, 56, 521-232

<sup>218</sup> R. Williams *et al.*, *Organic Lett.* **2002**, 4, 3711-3714

<sup>219</sup> M. Suzuki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4686-4688

### Schéma rétrosynthétique

L'étape clé de la préparation du dérivé benzazépine **54** est la formation du cycle à sept chaînons par une amination réductrice à partir du nitro aldéhyde **53**. La synthèse de ce dernier est envisagée de deux manières différentes : soit à partir du nitro-alcool **51** qui est préparé par addition nucléophile du 2-méthyl-3-nitrophénole sur l'aldéhyde de Garner (commerciaux) selon les travaux de Williams *et al.*<sup>211,212,213</sup> (**Stratégie I**), soit à partir de l'alcyne **52** qui à son tour est préparé soit par réaction de Sonogashira à partir du 1, 2-dibromo-3-nitrobenzène selon les travaux de Suzuki *et al.*<sup>214</sup> (**stratégie II**), soit par substitution nucléophile aromatique (SNAr) à partir du 1-bromo-2-fluoro-3-nitrobenzène (**stratégie III**). (Figure 90)

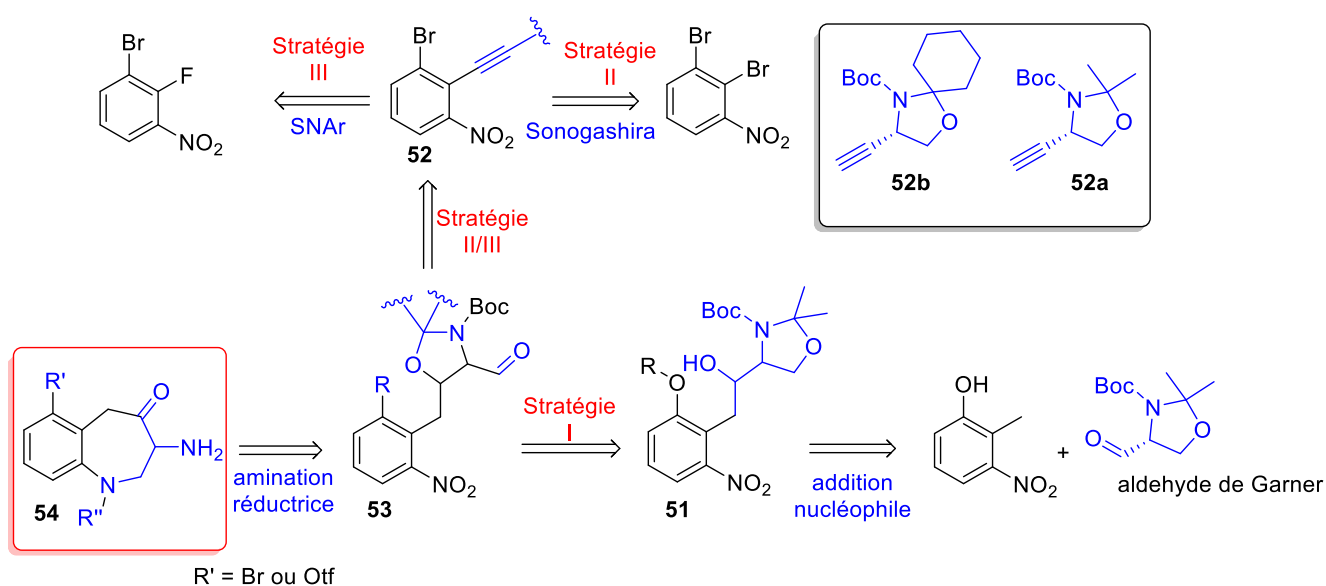


Figure 90 : stratégies de synthèse de la molécule 54

### Stratégie I : préparation des dérivés benzazépine par addition nucléophile

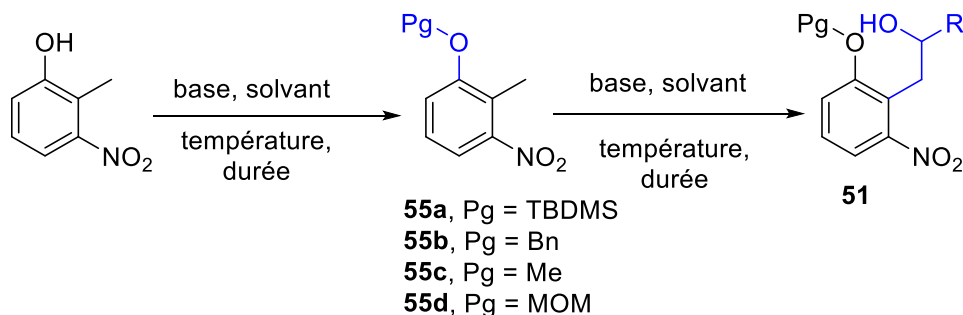


Figure 91 : préparation de l'alcool secondaire 94

Dans un premier temps, la protection du 2-méthyle-3-nitro-phénol a été réalisée par différents groupes protecteurs pour donner les intermédiaires **55a-d** (Figure 91). Les conditions réactionnelles

décrites dans la littérature nous permettent d'obtenir les produits désirés avec des rendements élevés selon le (Tableau 25)

entrée	Pg	base	solvant	température °C	durée, heures	Produit (rdt %)
1 <sup>220, 221</sup>	TBDMSCl	imidazole	THF	t.a.	16	<b>55a</b> (82%)
2 <sup>222</sup>	BnBr	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	t.a.	16	<b>55b</b> (90%)
3 <sup>223</sup>	MeI	NaH	DMF	0-80	4	<b>55c</b> (71%)
4 <sup>224</sup>	MOMCl	NaH	DMF	0-80	6	<b>55d</b> (62%)

Tableau 25 : conditions opératoires pour la protection du 2-méthyle-3-nitro-phénol. Les rendements sont donnés après purification par chromatographie sur colonne

Ensuite, la préparation de l'alcool secondaire **51** est tentée par addition nucléophile du nitrotoluène **55** sur la fonction carbonyle de l'aldéhyde convenable, à savoir l'aldéhyde de Garner ((4S)-4-formyl-2,2-diméthyl-oxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle). Cependant comme ce dernier coûte cher (1G = 417.50 euros/Sigma-Aldrich), cette étape d'addition nucléophile a été testée sur différents aldéhydes aliphatiques ou aromatiques disponibles au laboratoire (Figure 92) selon le (Tableau 26).

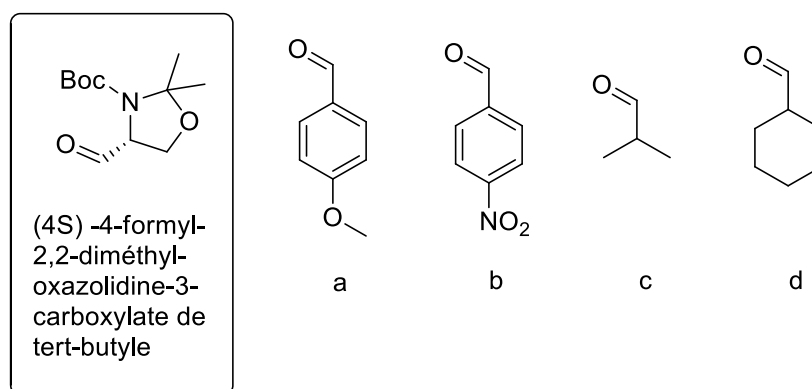


Figure 92 : les différents aldéhydes testés pour l'addition nucléophile

<sup>220</sup> Boehringer Ingelheim (canada), US2004/106791 A1, **2004**, 16

<sup>221</sup> Boehringer Ingelheim International GMBH, WO2011/63501 A1, **2011**, 37

<sup>222</sup> S. Hisayuki *et al.*, US2009/12123 A1, **2009**, 9-10

<sup>223</sup> D. Quyên *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 2677-2687

<sup>224</sup> Alvaro *et al.*, WO20114/69951 A1, **2011**, 61

Le Tableau 26 montre les différentes conditions opératoires expérimentées pour cette étape.

entrée	Nucléophile	aldéhyde	base	solvant	Température °C	Temps, heures	Rendement, %
1	<b>55a</b>	a	MeONa	DMSO	0-t.a.	16	0
2	<b>55a</b>	a	MeONa	DMF	0-t.a.	16	0
3	<b>55a</b>	a	KOH	DMF	0-t.a.	16	0
4	<b>55a</b>	a	NaH	DMF	0-t.a.	16	0
5	<b>55a</b>	a	NaH	THF	0-t.a.	16	0
6	<b>55b</b>	a	MeONa	DMSO	0-t.a.	16	0
7	<b>55b</b>	a	MeONa	DMF	0-t.a.	16	0
8	<b>55b</b>	a	MeONa	THF	0-t.a.	16	0
9	<b>55b</b>	c	MeONa	DMF	0-t.a.	16	0
10	<b>55b</b>	d	MeONa	DMF	0-t.a.	16	0
11	<b>55b</b>	a	MeONa <sup>a</sup>	DMSO	-78/t.a.	2	0
12	<b>55b</b>	a	MeONa <sup>a</sup>	DMF	-78/t.a.	2	0
14	<b>55b</b>	a	KOH	DMF	0-t.a.	16	0
15	<b>55b</b>	a	NaHDMS	THF	-78	16	0
16	<b>55b</b>	a	NaH	THF	0-t.a.	16	0
17	<b>55b</b>	c	NaH	THF	0-t.a.	16	0
18	<b>55c</b>	a	MeONa	DMSO	0-t.a.	16	0
19	<b>55d</b>	a	MeONa	DMSO	0-t.a.	16	0

Tableau 26 : les conditions testées pour la formation de l'alcool secondaire 51. Les aldéhydes a, b et d sont préalablement azéotropés avec du toluène avant de les injecter dans le milieu réactionnel. Les réactions sont faites sous-atmosphères inertes. <sup>a</sup>) MeONa est préparé *in situ*.

Les différentes conditions testées dans les entrées 1 à 5 conduisent essentiellement à la déprotection de la fonction phénolique. A la fin de la réaction le 2-méthyl-3-nitro-phénol et l'aldéhyde en question ont été isolés. Pour cette raison, le groupement TBDMS a été remplacé par un groupe benzyle. L'addition du toluène **55b** sur l'aldéhyde **a/c/d** ; selon les conditions de Williams *et al.*<sup>225</sup> (entrée 6) dans le DMF ou dans le DMSO selon les travaux de Izumi *et al.*<sup>226</sup> (entrées 7, 9 et 10), ou dans du THF (entrée 8) en présence MeONa commercial ou préparé *in situ* (entrées 11 et 12) ; conduisent malheureusement à aucun avancement de la réaction. L'utilisation du KOH selon les conditions brevetées par Bayercrop (entrée 14) ou des bases fortes telles que le NaHDMS (entrée 15) n'amènent à leur tour aucun avantage à cette réaction. Par contre l'utilisation d'hydrure de sodium comme base (entrée 16 et 17) conduit à la dégradation du nitrotoluène de départ **55b**. Enfin, nous avons testé le rôle de l'effet stérique du groupe protecteur du phénol en remplaçant le groupement benzyle par un méthyle ou méthoxyméthyle (entrée 18 et 19). Dans ces deux cas, aucune réaction n'est observée.

A noter que lors de l'addition de la base au milieu réactionnel contenant le toluène **55** dans le solvant, la solution incolore change de couleur et vire vers le rouge brique ce qui peut indiquer la formation de l'anion (adduit nucléophile). Cette coloration disparaît lors de l'ajout de l'aldéhyde ce qui peut être due à la présence de traces d'eau pouvant protoner l'anion benzylique. Ces traces d'eau pouvant être d'autant plus néfastes que ces expériences ont été conduites sur de très faibles quantités de l'ordre de 10-20 mg de dérivés nitro-toluène **55**.

<sup>225</sup> R. Williams *et al.*, *Tetrahedron* **2000**, 56, 521-532

<sup>226</sup> T. Izumi *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, 29, 1085-1090

## Stratégie II : réaction de Sonogashira

La préparation de l'intermédiaire **52** est envisagée en deux étapes à partir du produit commercial 1,2 dibromobenzène selon la Figure 93.

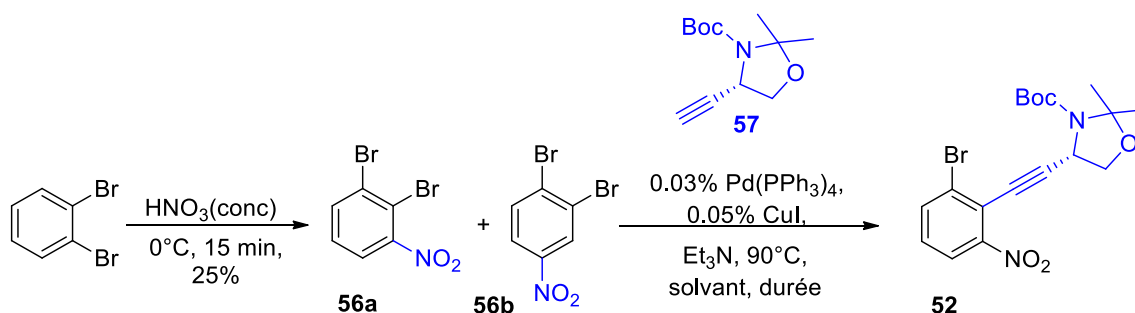


Figure 93 : préparation de l'alcène **52**

Dans un premier temps, le nitrobenzène<sup>227</sup> **56a** est préparé à partir du 1,2 dibromobenzène dans de l'acide nitrique fumant à 0°C. À savoir que la nitration du dibromobenzène conduit à la formation de deux régioisomères **56a** et **56b** avec un ratio (1:2). Ces conditions conduisent à la formation du 1,2 dibromo-3-nitrobenzène **56a** avec un rendement de 29% après purification. Ensuite, la formation de l'alcène **52** est envisagée par une réaction de Sonogashira à partir du nitrobenzène **56a** et de l'alcyne terminal **57** (Figure 93) préalablement préparé au laboratoire.

La réaction de Sonogashira est tentée selon les conditions notées dans le Tableau 27.

Entrée	Co-solvant	Durée, heures	Rendement, %
1 <sup>228</sup>	DMF	5	0
2 <sup>229</sup>	-	5	0

Tableau 27 : conditions testées lors de la réaction de Sonogashira

Singh *et al.* sont les seuls qui ont décrits le mono-couplage d'un alcyne terminal sur l'aromatique **56a**. Dans leur cas ils ont utilisé l'heptyne comme alcyne terminal. En revanche, nous avons testé cette réaction avec l'alcyne terminal **57** qui est préparé à partir du ((4S)-4-formyl-2,2-diméthyl-oxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle) commercial (*vide infra*). Dans un premier temps, le couplage est testé dans un mélange Et<sub>3</sub>N / DMF (1:1) dans les conditions décrites par Chepuri *et al.*<sup>223</sup> (entrée 1). Ces conditions ne conduisent à aucune formation du produit souhaité. Seul un produit issu de l'homo-couplage de l'alcyne est observé. Ce même résultat est obtenu en utilisant les conditions de Singh *et al.*<sup>224</sup> (entrée 2).

Pour vérifier la faisabilité de cette réaction, nous avons testé le couplage du 1-heptyne selon les conditions de Singh. Les produits mono- et di-substitués ont été obtenus avec un ratio (2 :1) ainsi que la présence de l'aromatique de départ **56a** (conversion du substrat de départ de 65%). Ces résultats ont été corroborés par des analyses RMN-<sup>1</sup>H et LC-MS.

Singh *et al.* ont noté que l'encombrement stérique est un facteur de ralentissement de la vitesse de la réaction. Conformément à leurs travaux, la présence du groupe Boc sur l'alcyne terminal **57**

<sup>227</sup> P. Robert *et al.*, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 9, 2736-2742

<sup>228</sup> R. Chepuri *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 31, 5955-5966

<sup>229</sup> R. Singh *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 54, 18, 4453-4457



pourrait être un facteur limitant de la réaction. Pour cette raison nous avons songé à préparer l'alcyne **52** par **SNAr** sur un aromatique fluoré.

La préparation des alcynes terminaux **57** et **60** a été réalisée en deux étapes selon les travaux de Yamakawa *et al.*<sup>230</sup>. à partir des aldéhydes commerciaux ((4*S*) -4-formyl-2,2-diméthyl-oxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle) et ((*S*) tert-butyle 3-formyl-1-oxa-4-azaspiro [4.5] décane-4-carboxylate d'éthyle) par une réaction de Corey-Fuchs selon la (Figure 94).

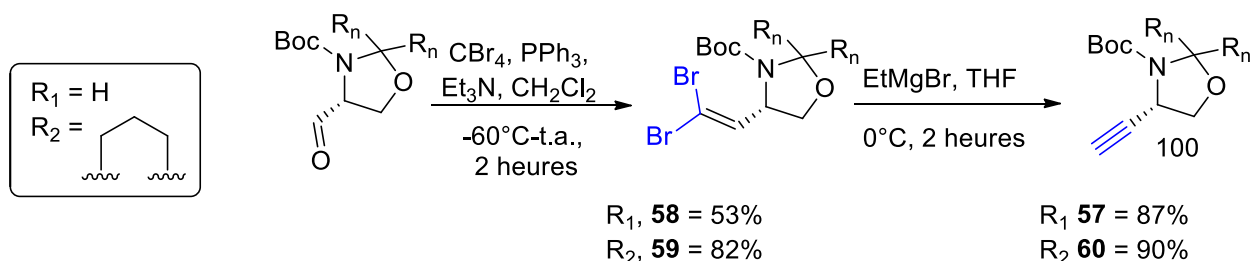
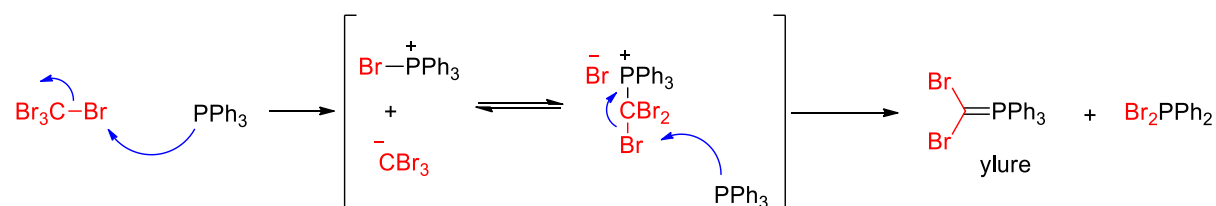


Figure 94 : préparation des alcynes terminaux **57** et **60**

### Point mécanistique : réaction de Corey-Fuchs

La réaction de Corey-Fuchs permet la formation d'alcyne terminal à partir d'un aldéhyde.<sup>231, 232</sup>  
 Le mécanisme général de cette réaction se déroule en deux étapes. Après la formation de l'ylure *in situ* à partir du  $\text{CBr}_4$  et du  $\text{PPh}_3$ , la première étape est la formation du di-bromo-oléfine à partir d'un aldéhyde, le mécanisme de cette étape est similaire au mécanisme de la réaction de Wittig. La seconde étape est le traitement du dérivé dihalogéné par deux équivalents d'une base conduisant à un échange halogène-métal suivie par un réarrangement du carbenoïde pour former l'alcyne terminal qui par déprotonation avec le deuxième équivalent de base forme l'acétylure. Enfin, la protonation de l'acétylure conduit à la formation de l'alcyne terminal.  
 L'addition du deuxième équivalent de base est judicieuse pour éviter la déprotonation de l'alcyne terminale par le carbenoïde et formation du bromoalcène comme produit secondaire<sup>233</sup>.

Formation d'ylure de phosphore :



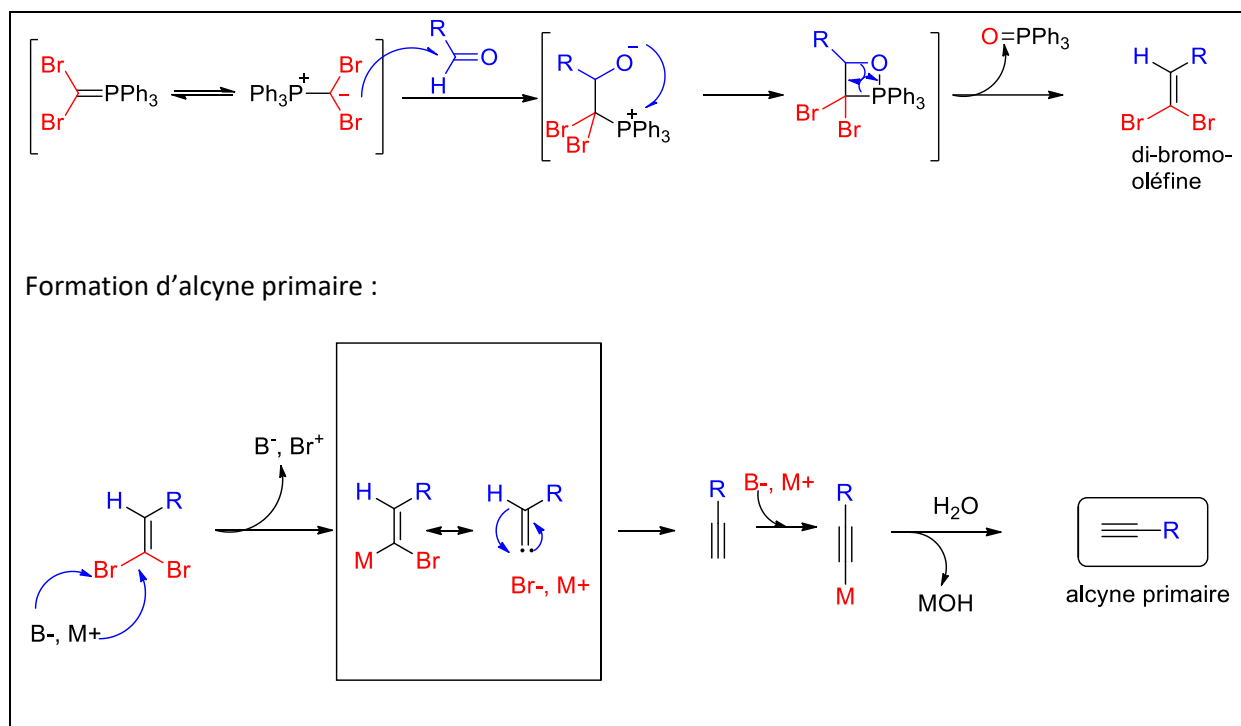
Formation du di-bromo-oléfine :

<sup>230</sup> T. Yamakawa *et al.*, *Tetrahedron* **2011**, 67, 6547-6560

<sup>231</sup> E. Corey *et al.*, *Tetrahedron* **1972**, 13, 3769-3772

<sup>232</sup> F. Ramirez *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 1745-1747

<sup>233</sup> R. Bruckner, *Advanced organic chemistry edition* **2002**, 457-458



### Stratégie III : substitution nucléophile aromatique (SNAr)

Cette étape a été inspirée par les travaux de DeRoy *et al.*<sup>234</sup> qui ont décrit la substitution nucléophile aromatique d'un alcyne terminal sur un composé fluoro-aromatique selon la (Figure 95). La présence de l'atome de fluor sur l'aromatique va augmenter la réactivité et la régiosélectivité de la réaction SNAr.

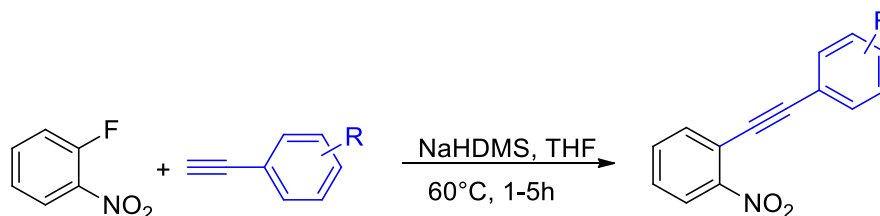


Figure 95 : travaux de DeRoy *et al.*

La préparation de l'alkyne **53** a été songée par réaction de substitution nucléophile aromatique à partir de l'électrophile 2-fluoro-3-bromonitrobenzène (commercial) et de l'alkyne **60** en présence de NaHDMS comme base (Figure 96) selon les conditions (Tableau 28).

<sup>234</sup> P. L. DeRoy *et al.*, *Org. Lett.* **2007**, 9, 2741-2743

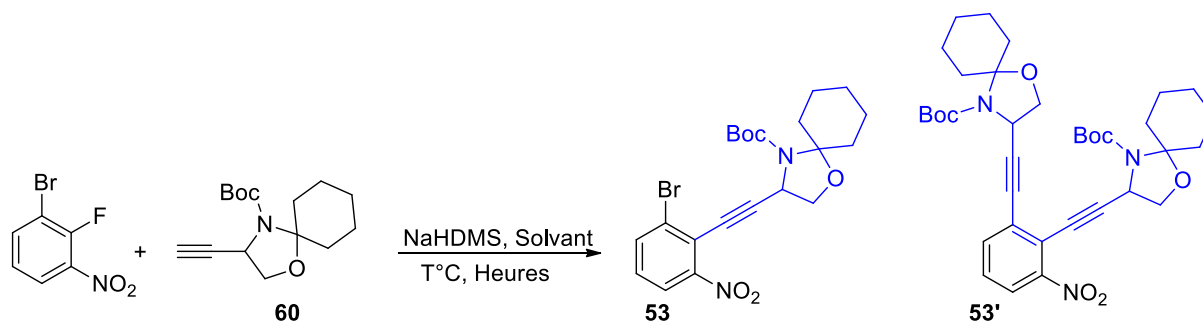


Figure 96 : préparation de l'intermédiaire 53

Plusieurs conditions ont été testées, pour cette étape selon le Tableau 28.

Entrée	Solvant	Température, °C	Durée, heures	53 : 53' (rdt%)
1 <sup>a</sup>	THF	60	18	15 : 85
2	THF	t.a/60	48/5	37 : 0

Tableau 28 : conditions testées pour la SNAr. <sup>a</sup>) 2 éqv. d'alkyne terminal 103.

L'utilisation des conditions de DeRoy avec un excès d'alkyne terminal **60** (2 éqv.) (entrée 1) conduisent après 18 heures à la formation de deux produits : le composé monosubstitué **53** (15%) ainsi que le produit disubstitué **53'** (85%) après purification. En revanche, l'utilisation de 1 équivalent de d'alkyne terminal à température ambiante pendant 42 heures ne conduit à aucune conversion (entrée 2). Le chauffage du milieu réactionnel à 60°C pendant 5 heures conduit à la formation du produit monosubstitué **53** avec un rendement de 37% après purification.

L'approche par substitution nucléophile aromatique se montre comme une stratégie prometteuse pour accéder au scaffold **54**. Il faudrait optimiser plus finement cette transformation pour atteindre des rendements correctes et pour envisager la suite de synthèse décrite selon la (Figure 97).

La suite de cette synthèse a été inspirée par les travaux de Suzuki *et al.*<sup>235</sup> et les travaux de Williams *et al.*<sup>236</sup> L'addition de pyrrolidine conduirait à la formation de l'énamine **61** qui serait immédiatement hydrolysé par AcOH : H<sub>2</sub>O (1:1) pour donner la cétone **62**. Ensuite, la réduction de la cétone dans le méthanol et en présence NaBH<sub>4</sub> générerait l'alcool secondaire, qui après protection par du triisopropylsilane (TIPS) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et en présence de 6- 2,6-lutidine aboutirait à l'éther silylé **63**. Puis, la déprotection du groupe acétonide en milieu acide AcOH : H<sub>2</sub>O (1:1) à 100°C régénérerait l'alcool primaire **64**, l'oxydation de cet alcool primaire produirait l'aldéhyde **65**. Une amination réductrice de l'intermédiaire **65** conduirait à la formation du cycle à 7 chaînons **66**. L'amine serait alors substituée par un un groupe carboxyméthyle. Enfin la déprotection de l'alcool secondaire **67** suivie d'une oxydation aboutirait au scaffold **54**.

<sup>235</sup> M. Suzuki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4686-4688

<sup>236</sup> R. M. Williams *et al.*, *Tetrahedron* **2000**, 56, 521-532

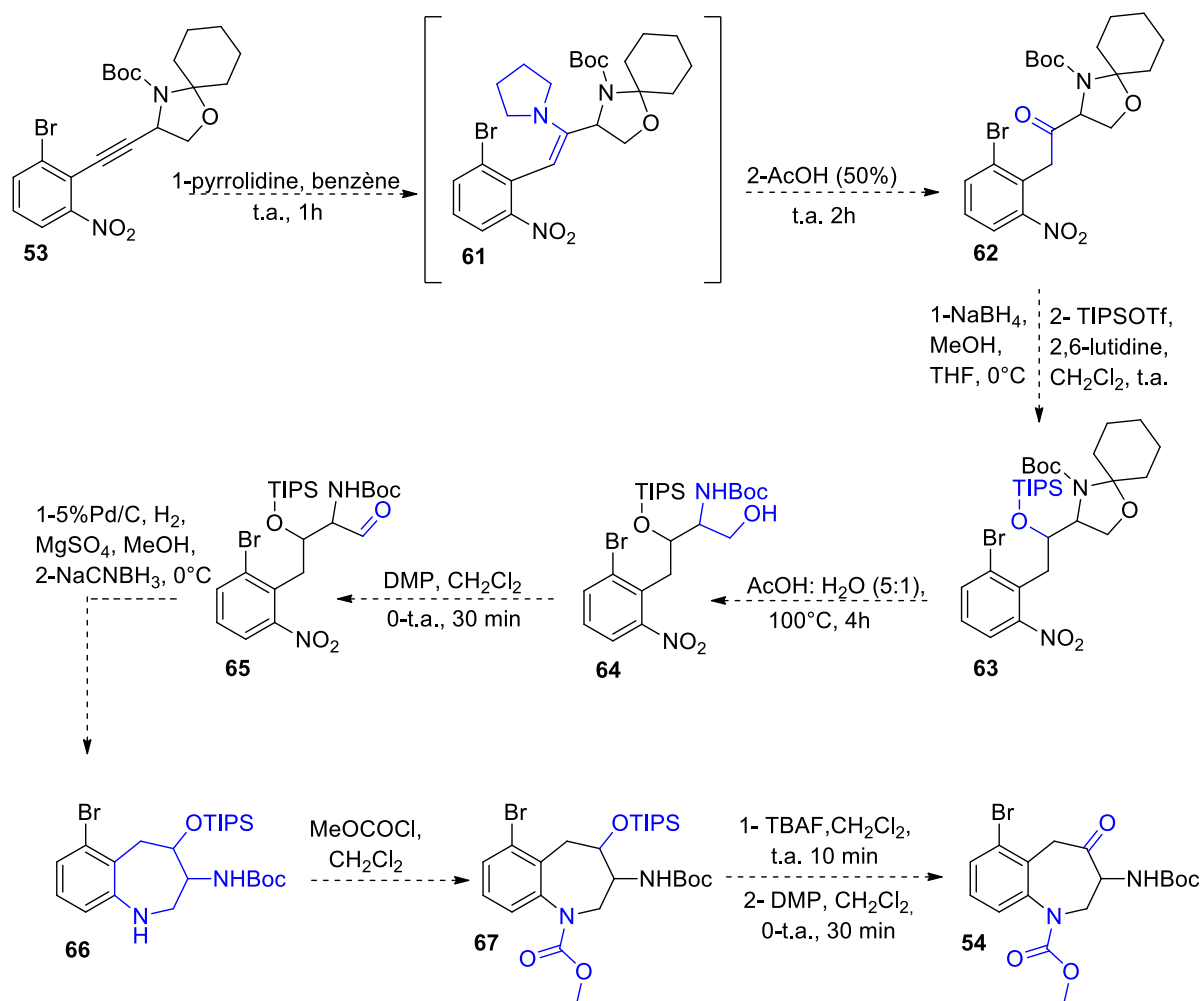


Figure 97 : suite de la voie synthétique pour la formation du scaffold 54

# **Chapitre 5 :**

## **Exploration du sous-site S1'**

## Chapitre 5 : Exploration du sous-site S1'

### Synthèse des dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4

Les prédictions *in silico* suggèrent que le substituant en position 4 du 7-amino-benzocycloheptan-6-one interagirait avec le sous-site S1' du site actif des aminopeptidases de la famille M1. Nous nous sommes alors intéressés à synthétiser des dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4 par modification tardive du châssis moléculaire 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one afin d'explorer ce sous-site et de développer de nouvelles interactions, mais également d'améliorer les propriétés physicochimiques (solubilité, lipophilie) et pharmacocinétiques (stabilité métabolique, temps de demi-vie, exposition) de nos molécules. Les travaux dans cette partie ont été réalisés en collaboration avec Dr. Germain Revelant (postdoctorant).

Nous envisageons ainsi de créer une petite chimiothèque de dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4. Le choix des substituants, aryles ou hétéroaryles, obéissent à un cahier des charges bien précis :

- 1- Introduction de groupe fonctionnel ayant la capacité de donner ou d'accepter des liaisons hydrogène (HBD ou HBA, respectivement) afin d'accroître l'affinité du ligand pour l'aminopeptidase ciblée.
- 2- Réduction de la lipophilie (diminution du clogP).
- 3- Introduction de groupe ionisant afin d'améliorer la solubilité.

Ces différents inhibiteurs (**77-124**) seront préparés sous forme d'un mélange racémique de sels d'amine (le plus souvent sous forme de chlorhydrate). L'introduction de la diversité en R est envisagée par des réactions de couplage métallo-catalysé sur l'intermédiaire clé **76**. Ce dernier serait obtenu par manipulation des groupes fonctionnels de l'hydroxy-cétone **73**, à savoir oxydation et amination réductrice. Cet intermédiaire **73** résulterait d'une réaction d' $\alpha$ -hydroxylation du composé carbonylé **70**. Il est à noter que deux régioisomères devraient être obtenus. Une attention particulière devra être portée aux différents moyens de séparation. La benzocyclohepténone **70** proviendrait d'une réaction de cyclisation entre le 3-Oxoglutarate de diméthyle commercial et le dérivé  $\alpha, \alpha'$ -Dibromo-o-xylène **68**, lui-même préparé à partir du 3-Bromo-o-xylène commercialement disponible. (Figure 98)

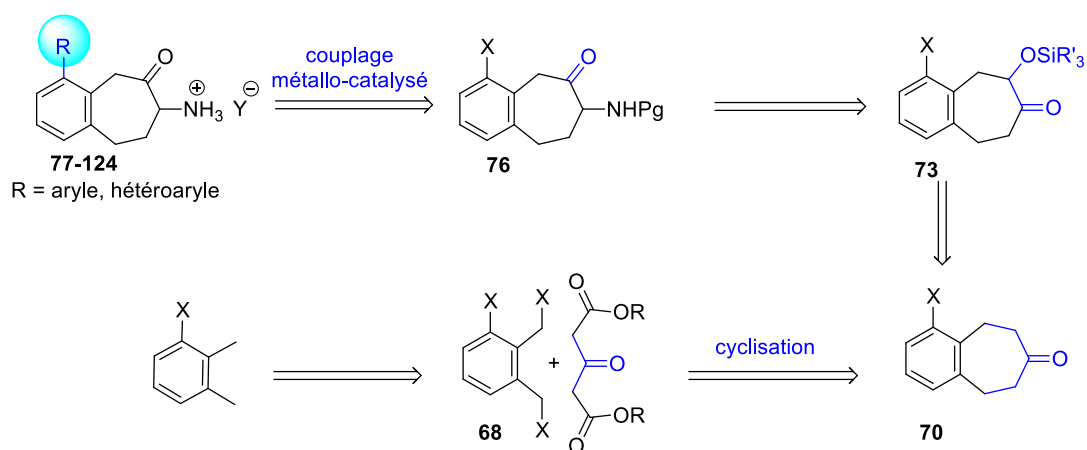


Figure 98: voie rétro-synthétique pour préparer les dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one

### Préparation de l'intermédiaire clé 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one (76)

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la préparation du châssis moléculaire 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one **76** selon la voie de synthèse optimisée dans notre laboratoire<sup>237</sup>.

### Préparation du benzocyclohépténone (70)

Le composé carbonylé **70** est obtenu avec 56% de rendement en 3 étapes à partir du 3-Bromo-*o*-xylène commercialement disponible (Figure 99).

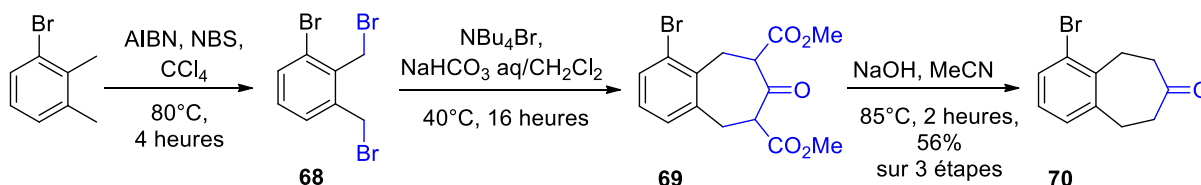


Figure 99 : formation de l'intermédiaire cétonique **70**

### Bromation radicalaire<sup>238</sup>

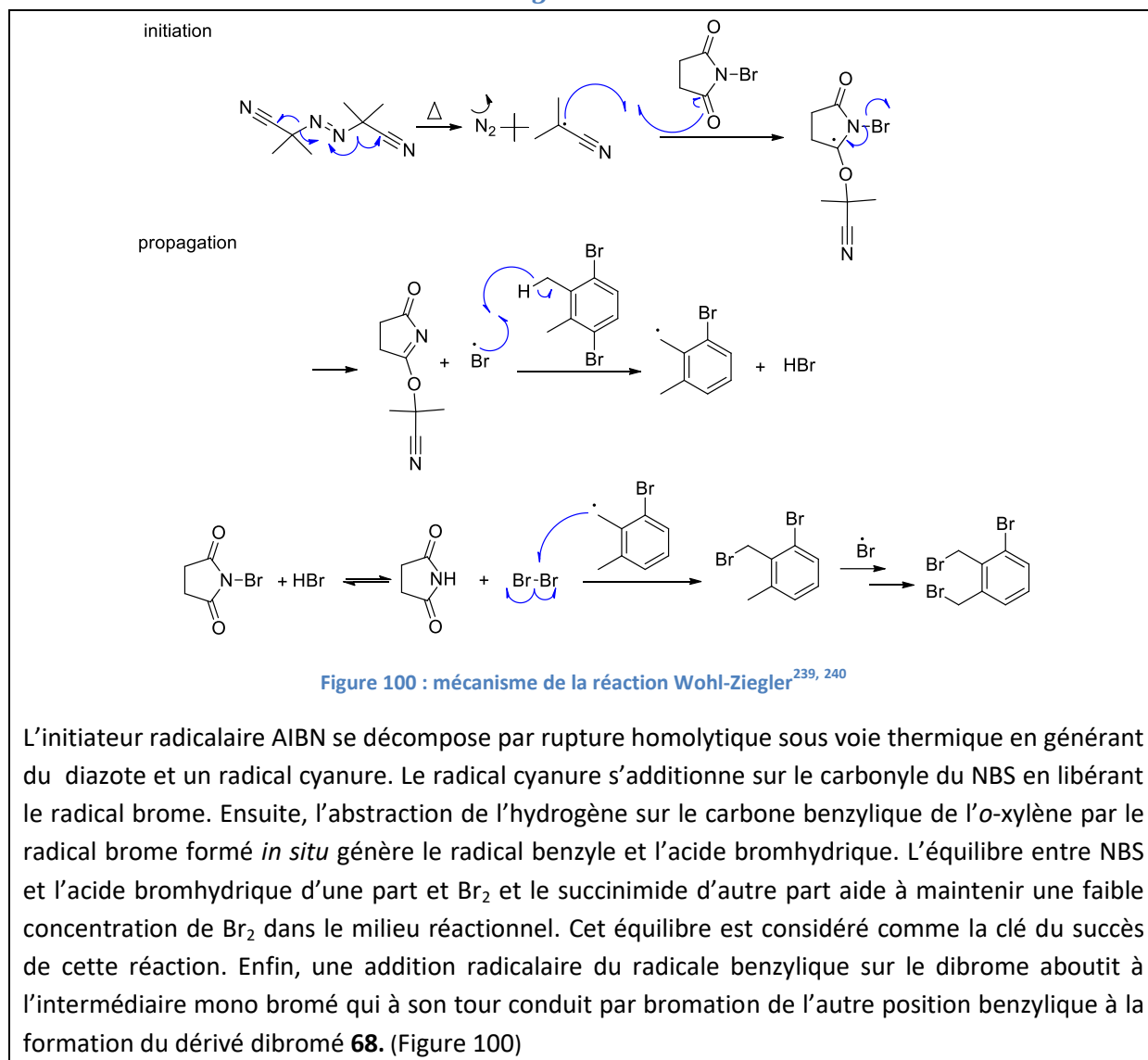
La première étape repose sur une bromation radicalaire du 3-Bromo-*o*-xylène commercial via la réaction de Wohl-Ziegler (Figure 99). Cette réaction est effectuée dans CCl<sub>4</sub>, en présence d'un excès de NBS (2 éqv.) et de l'amorceur radicalaire AIBN. A noter que la concentration élevée du milieu réactionnel conduit à la formation des produits secondaires (dibromation sur les positions benzyliques).

Après confirmation de la présence du produit souhaité par analyse RMN-<sup>1</sup>H, le dérivé  $\alpha,\alpha'$ -Dibromo-*o*-xylène **69** est directement mis en réaction.

<sup>237</sup> C. Maieranu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5716-5733

<sup>238</sup> P. Miziak *et al.*, *phytochemistry* **2007**, 68, 407-415

### Point mécanisme : la réaction de Wohl-Ziegler



L'initiateur radicalaire AIBN se décompose par rupture homolytique sous voie thermique en générant du diazote et un radical cyanure. Le radical cyanure s'additionne sur le carbonyle du NBS en libérant le radical brome. Ensuite, l'abstraction de l'hydrogène sur le carbone benzylique de l'*o*-xylène par le radical brome formé *in situ* génère le radical benzyle et l'acide bromhydrique. L'équilibre entre NBS et l'acide bromhydrique d'une part et Br<sub>2</sub> et le succinimide d'autre part aide à maintenir une faible concentration de Br<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel. Cet équilibre est considéré comme la clé du succès de cette réaction. Enfin, une addition radicalaire du radical benzyle sur le dibrome aboutit à l'intermédiaire mono bromé qui à son tour conduit par bromation de l'autre position benzylique à la formation du dérivé dibromé **68**. (Figure 100)

### Condensation et décarboxylation

Le bis ester **69** est formé par double condensation du 3-Oxoglutarate de diméthyle avec le dérivé  $\alpha,\alpha'$ -Dibromo-*o*-xylène **68** par catalyse à transfert de phase (en présence de NBu<sub>4</sub>Br) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 1M aqueux à 40°C pendant une nuit<sup>241, 242</sup>. La réaction est biphasique et doit se faire sous agitation vigoureuse. L'intermédiaire **69** est directement saponifié et décarboxylé en milieu basique NaOH 2 M aq. pour donner l'intermédiaire cétonique **70** avec un rendement de 56% sur les 3 étapes après purification par chromatographie.

<sup>239</sup> C. J. Day *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5616-5617

<sup>240</sup> D. W. McMillen *et al.*, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4516-4528

<sup>241</sup> S. Mataka *et al.*, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2653-2656

<sup>242</sup> X. M. Liu *et al.*, *Tetrahedron* **2002**, 58, 603-611



### Formation de l'intermédiaire $\alpha$ -hydroxy oxime (73a)

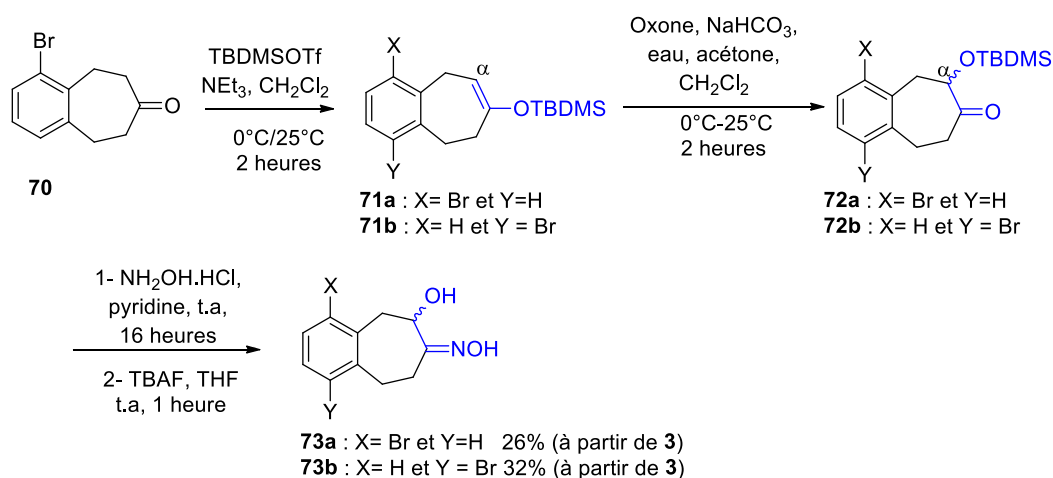


Figure 101: formation de l' $\alpha$ -hydroxy-oxime 73a

### Formation de l'éther d'énol silylé

L'intermédiaire cétonique **70** est ensuite transformé en éther d'énol silylé **71** selon la procédure développée par Simchen et Kober<sup>243</sup> en utilisant des triflates de trialkylsilyle ( $\text{R}_3\text{SiOTf}$ ) en présence de triéthylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) soit dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre à température ambiante pendant 2 h soit dans du toluène anhydre à  $80^\circ\text{C}$  pendant 1h30. Dans les deux conditions on obtient un mélange des régioisomères **71a** et **71b** dans des proportions 45/55. (Figure 101)

Le résultat est confirmé par RMN- $^1\text{H}$ . Étant donné l'instabilité de ces molécules silylées, ce mélange est immédiatement engagé dans la réaction suivante.

### Point mécanisme : Formation des éthers d'énol silylé

Deux mécanismes sont proposés pour la formation de l'éther d'énol silylé:

**Mécanisme A** : la faible concentration d'énol en solution réagit avec le triflate de trialkylsilyle pour former un ion oxonium, qui est ensuite déprotoné par une base faible ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) pour donner l'éther d'énol silylé (Figure 102).

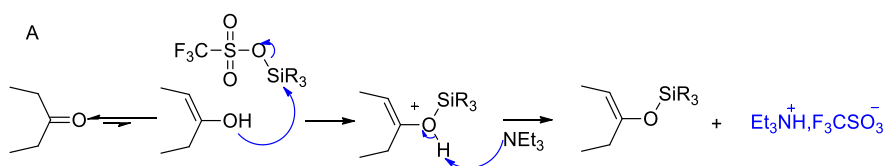
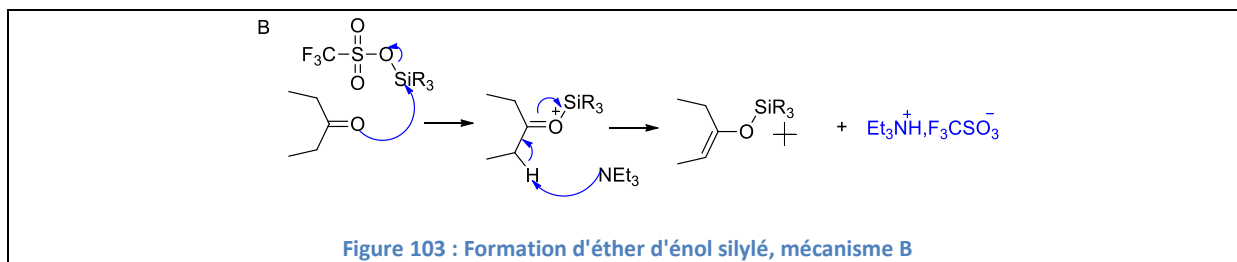


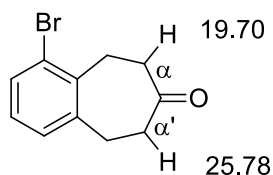
Figure 102: Formation d'éther d'énol silylé, mécanisme A

**Mécanisme B** : un autre mécanisme est possible et consiste à silyler d'abord le groupe carbonyle, puis une base faible ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) est suffisante pour arracher le proton en  $\alpha$  du carbonyle est ainsi former l'éther d'énol silylé (Figure 103). (Vue le rôle de l'encombrement stérique de favorisé la formation de l'énol éther silylé d'une côté sur l'autre, le mécanisme B est le mécanisme le plus favorable).

<sup>243</sup> G. Simchen *et al.*, *Synthesis* **1976**, 259-261



Le calcul du pKa des protons en  $\alpha$  et  $\alpha'$  de la cétone (par le logiciel ChemAxon (version 16.418.0)<sup>244</sup> montre l'acidité du proton en  $\alpha$  selon la Figure 104. Par contre, le ratio obtenu peut être expliqué par l'encombrement stérique créée par l'atome de brome qui favoriserait la formation de l'intermédiaire **71b** comme produit majoritaire avec un ratio de 55 :45.



**Figure 104 : calcul pKa, ChemAxon (Marvin sketch)**

#### Oxydation du Rubottom

Ensuite, le mélange d'éthers d'énol silylés **71a** et **71b** est oxydé par du diméthylidioxirane, généré *in situ* par réaction de l'Oxone (mélange de monopersulfate :  $\text{KHSO}_5 \cdot \frac{1}{2}\text{KHSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{K}_2\text{SO}_4$ ) sur un mélange acétone :  $\text{NaHCO}_3$  1M aq. (2 : 1). Cette oxydation, dite de Rubottom<sup>245, 246</sup>, procède via l'intermédiaire d'un époxyde silyloxylé s'ouvrant en un ion oxocarbenium qui se réarrange avec migration 1,4 du groupe silylé en  $\alpha$ -silyloxy cétones **72a** et **72b** (Figure 105). La formation totale des produits **72** est confirmée par RMN-<sup>1</sup>H. En effet, nous constatons la disparition complète de l'hydrogène éthylénique des éthers d'énol silylés **71a** et **71b** dont le déplacement chimique  $\delta$  était de 5.08 (**71a**) et 5.05 (**71b**) ppm et l'apparition d'un signal à  $\delta$  4.20 ppm, caractéristique des  $\alpha$ -hydroxy cétones **72a** et **72b**.

Ces intermédiaires étant sensibles à l'hydrolyse, les composés **72a** et **72b** sont utilisés tels quels sans aucune purification dans l'étape suivante.

<sup>244</sup> MarvinSketch (version 16.4.18.0, calculation module developed by ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>, 2016.

<sup>245</sup> G. M. Rubottom *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 4319-4322

<sup>246</sup> G. M. Rubottom *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 4603-4606

### Point mécanisme : Oxydation de Rubottom

La double liaison de l'éther d'énol silylé est époxydée par le diméthylidioxirane. Le relâchement de la contrainte cyclique (ou tension du cycle) de l'époxyde conduit à un réarrangement avec migration du groupe silyle produisant ainsi une  $\alpha$ -silyloxy cétone. (Figure 105)

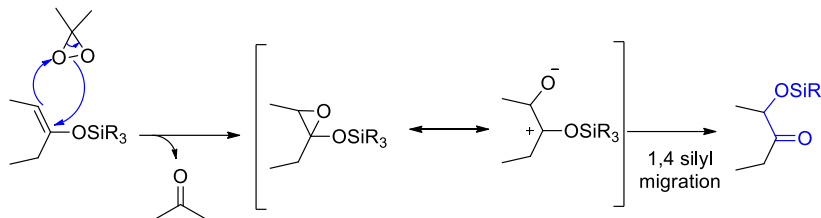


Figure 105 : mécanisme d'oxydation du Rubottom

### Formation de l'oxime

Le mélange des intermédiaire **72a** et **72b** est ensuite traité avec du chlorhydrate d'hydroxylamine dans de la pyridine à température ambiante pour donner les oximes correspondantes. Ces dernières sont ensuite désilylées à l'aide du TBAF pour donner les deux régioisomères **73a** et **73b** avec un ratio de (45:55). Une purification par chromatographie sur colonne dans un éluant de type éther de pétrole/ AcOEt (9:1) permet une bonne séparation des deux régioisomères et conduit au régioisomère souhaité **73a** avec un rendement de 26% sur 4 étapes.

### Formation de l'intermédiaire clé 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one (76)

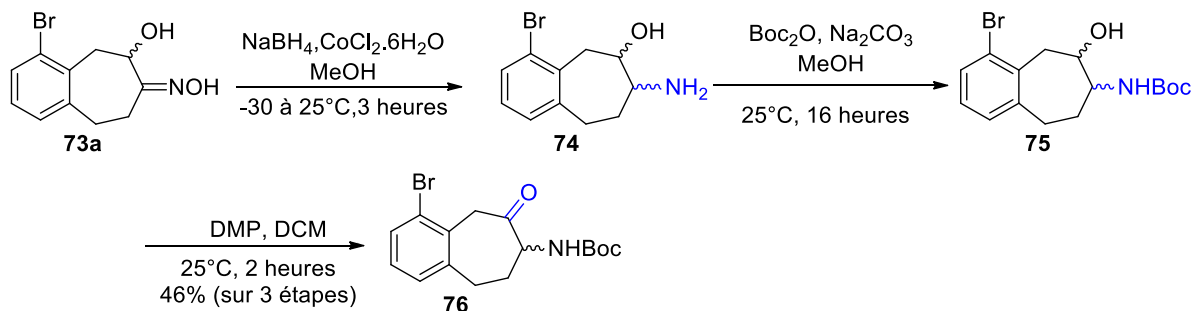


Figure 106 : formation de l'intermédiaire clé 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one 76

### Réduction de l'oxime et protection de l'amine

La réduction de l'oxime en amine a été précédemment optimisée dans le laboratoire par Dr. Relevant en s'inspirant des travaux de Georgiadis *et al.*<sup>247</sup>. La méthode utilisait du nickel de Raney comme agent réducteur. Cependant l'emploi du Nickel de Raney a posé de nombreux problèmes de reproductibilité et a notamment conduit à des réactions de débromation. Cette étape de réduction de l'oxime a dû être optimisée et différents agents de réduction ont été testés. Ainsi, le mélange Mg ou Zn /NH<sub>4</sub>COOH, SmI<sub>2</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, BH<sub>3</sub>/THF, ou les systèmes NaBH<sub>4</sub> en présence de divers sels de métaux de transition MoO<sub>3</sub>, NiCl<sub>2</sub> ou ZnCl<sub>2</sub> ont abouti soit à l'absence de réaction, soit à la débromation du produit.

<sup>247</sup> M.P. Georgiadis *et al.*, *J. Heterocyclic chem.* **1991**, 28, 697-703

Seule l'utilisation du système  $\text{NaBH}_4$  (15 éqv.)/ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2éqv.) dans le méthanol à une température de  $-30^\circ\text{C}$  pendant l'ajout de l'oxime, puis à  $25^\circ\text{C}$  pendant 3 heures a conduit à la formation de l'intermédiaire désiré **74** (Figure 106).

La réduction est faite dans des conditions hétérogènes puisque la présence du  $\text{NaBH}_4/\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  conduirait à la formation de borure de cobalt  $\text{Co}_2\text{B}$ , selon les travaux de Periasamy *et al.*<sup>248</sup> ou ceux d'Obsy *et al.*<sup>249</sup>. Ainsi, ils ont indiqué que la complexation de l'oxime sur la surface du borure de cobalt va l'activer et le rendre plus accessible à la réduction par  $\text{NaBH}_4$ . Or, Maybury *et al.*<sup>250</sup> ont noté que les borures agissent comme des clathrates contenant de l'hydrogène piégé dans le réseau et qui agit comme source d'hydrogénation.

La fonction amine résultante est ensuite immédiatement protégée sous la forme d'un carbamate **75** avec un groupement Boc dans les conditions classiques.

#### Oxydation de l' $\alpha$ -hydroxylamine **75**

La fonction alcool est oxydée par le périodine de Dess-Martin dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à température ambiante pendant 2 heures. Après purification par chromatographie colonne, l'intermédiaire clé 7-amino-benzocycloheptan-6-one **76** est obtenu avec un rendement de 46% (sur 3 étapes).

#### Point mécanisme : Oxydation de Dess-Martin<sup>251</sup>

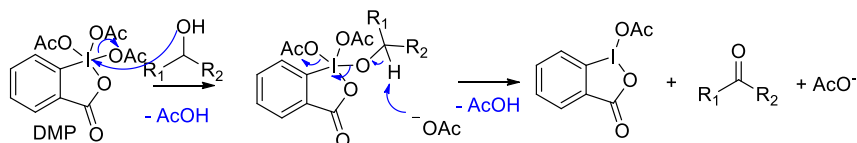


Figure 107 : oxydation de l'intermédiaire **8**

L'alcool secondaire remplace un acétate sur la périodine pour générer diacétoxyalkoxyiodinane. Ensuite, une base faible (acétate) est suffisante pour déprotoner le proton en  $\alpha$  et libérer la cétone et le mono acétoxy-iodinane. (Figure 107)

#### Diversification structurale à partir du 4-bromo-7-amino-benzocycloheptèn-6-one

A partir du châssis moléculaire **76**, une variété de groupements aryles ou hétéroaryles judicieusement choisis selon notre cahier des charges, sont introduits en position 4 par des réactions de couplage pallado-catalysées (couplage de Suzuki-Miyaura ou couplage de Stille) selon la (Figure 108).

<sup>248</sup> M. Periasamy *et al.*, *Synth. Comm.* **1989**, 19, 565-573

<sup>249</sup> J. O. Obsy *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 67-72

<sup>250</sup> P. Maybury *et al.*, *Chem. Comm.* **1974**, 14, 534-535

<sup>251</sup> D. B. Dess *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277-7287

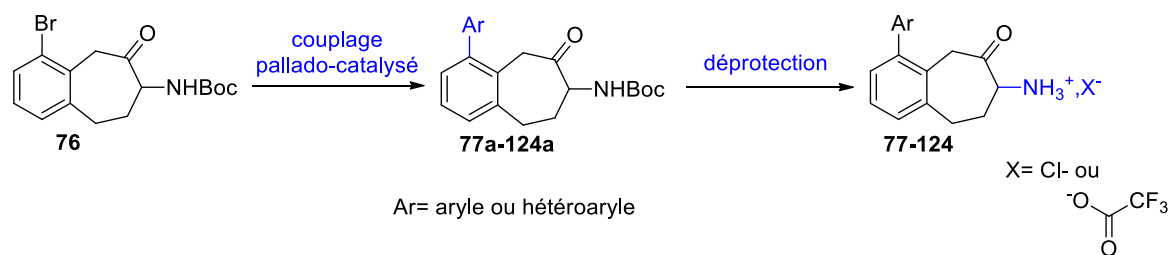


Figure 108 ; diversification moléculaire à partir de 4-bromo-7-amino-benzocyclohept-6-one

Cette diversification nous a permis d'élaborer une cinquantaine de nouveaux analogues en série racémique à partir des dérivés acides ou esters boroniques ou organostanneux (Figure 109).

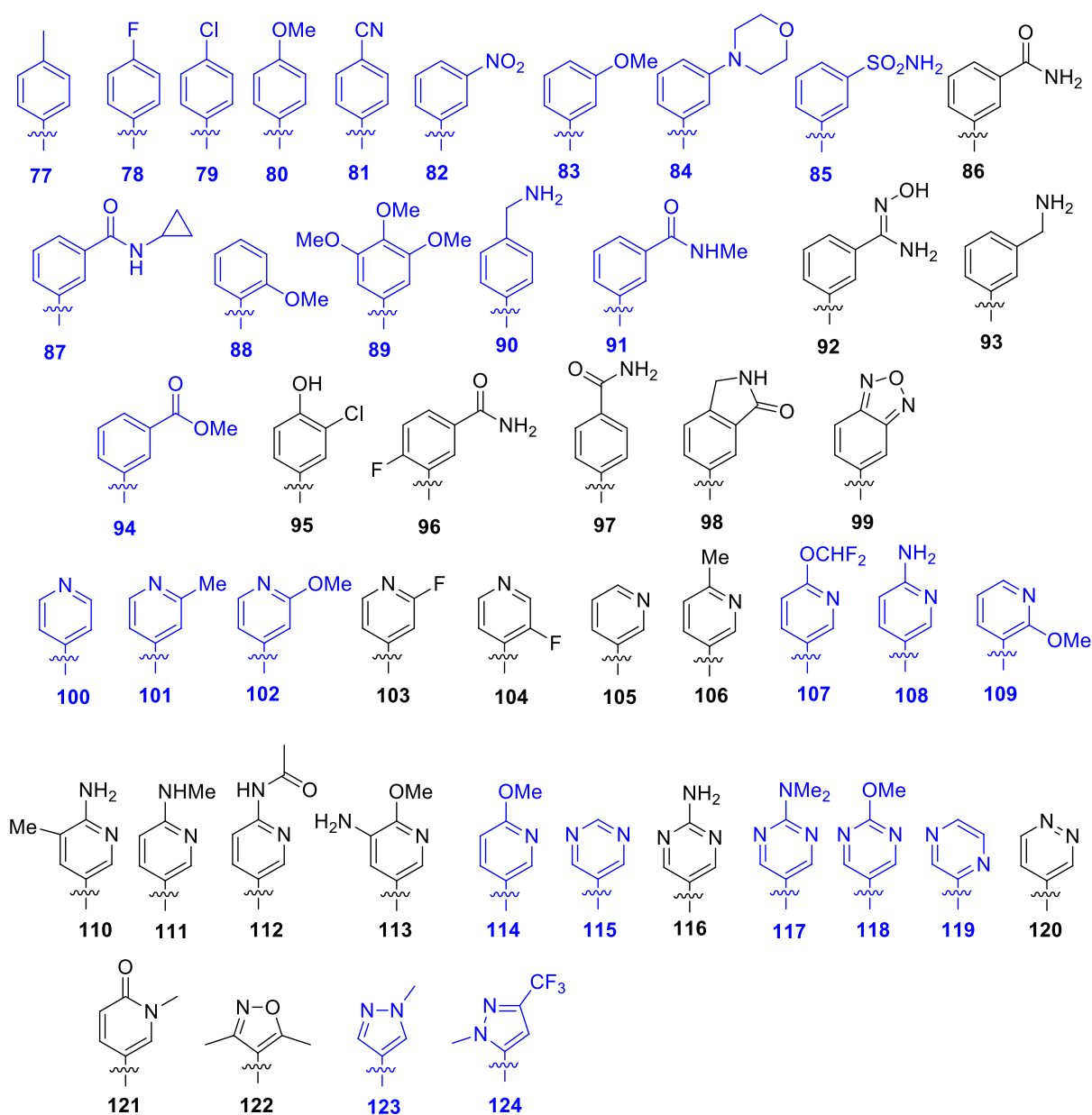


Figure 109 : dérivés du 7-amino-benzocyclohept-6-one substitué en position 4 synthétisés

Dans ce travail j'ai préparé une vingtaine d'analogues (coloré en bleu Figure 109) par couplage de Suzuki-Miyaura. Leur synthèse est détaillée par la suite.

### Point mécanisme : Couplage de Suzuki-Miyaura

La réaction de Suzuki est une réaction de couplage entre un acide ou un ester boronique avec un dérivé halogéné ou un triflate catalysée par le palladium (0) dont voici le schéma général. Le cycle catalytique (Figure 110, A) général du couplage de Suzuki-Miyaura<sup>252, 253, 254, 255</sup> débute par l'addition oxydante du complexe du palladium  $Pd^0L_2$  ( $14e^-$ ) sur le dérivé halogéné  $R_1-X$  pour générer le nouveau complexe  $Pd^{II}$ . L'halogène attaché au palladium est ensuite échangé avec l'anion de la base et l'organoborane réagit avec la base pour générer l'anion organoborate ; puis une transmétallation entre le  $Pd^{II}$  et le complexe borate conduit au complexe  $[Pd^{II}L_2R_1R_2]$ . Ce dernier subit alors une élimination réductrice pour former la nouvelle liaison C-C et ainsi régénérer l'espèce catalytique  $Pd^0L_2$ . Le rôle suggéré de la base dans la réaction de Suzuki est de former le complexe boronate pour diminuer la liaison C-B et faciliter la transmétallation. Les bases les plus souvent employées sont un carbonate aqueux et dans certaines cas un hydroxyde ou un bicarbonate voire même un ion fluorure.

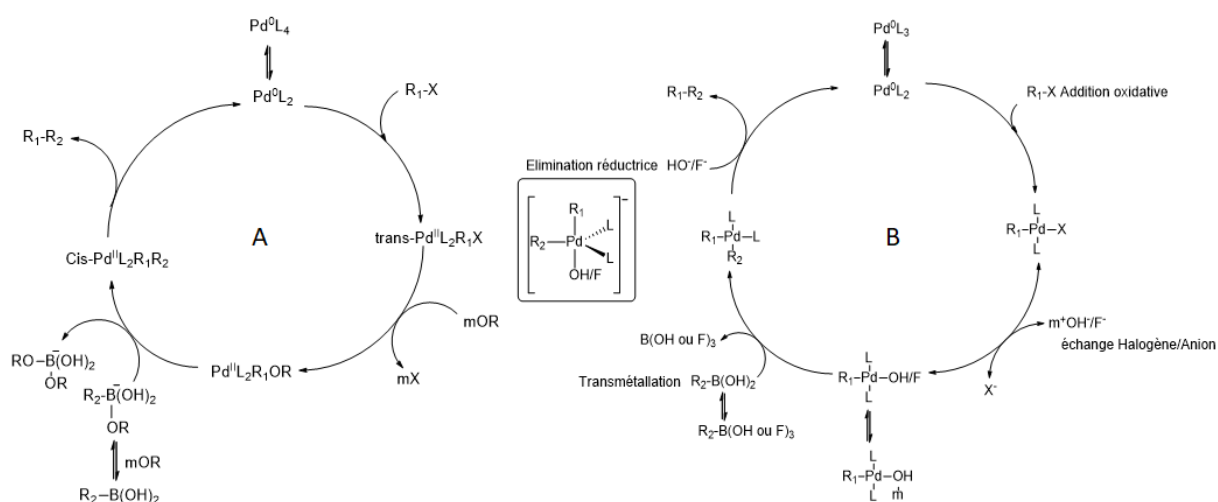


Figure 110 : Mécanisme de la réaction de Suzuki-Miyaura. A) Cycle catalytique proposé par Miyaura B) Cycle catalytique proposé par Amatore et al.

En contrepartie, des nouvelles études approfondies sur le couplage Suzuki-Miyaura (Figure 110, B) ont montré la complexité du cycle catalytique. Le mécanisme débute par le  $Pd^0$  ( $14e^-$ ) généré *in situ* à partir du complexe de palladium  $Pd^0$  ( $18e^-$ ). Une réaction d'addition oxydante du complexe  $Pd^0L_2$  sur le composé halogéné conduit à la formation d'une espèce réactive  $Pd^{II}$  ( $16e^-$ ) en configuration *cis*, puis une isomérisation *cis-trans* crucial pour le déroulement de la suite du cycle catalytique puisque seul le conformère *trans* peut être impliqué dans la transmétallation<sup>256, 257</sup>. D'autre part, il a été

<sup>252</sup> N. Miyaura et al., *J. Chem. Commun.* **1979**, 866-867

<sup>253</sup> N. Miyaura et al., *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440

<sup>254</sup> N. Miyaura et al., *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513-519

<sup>255</sup> N. Miyaura et al., *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483

<sup>256</sup> J. F. Fauvarque et al., *J. Organomet. Chem.* **1981**, 208, 419-427

montré que pour les dérivés bromés l'addition oxydante est l'étape limitante alors que pour les dérivés iodés c'est la transmétallation qui est l'étape limitante<sup>258</sup>.

Des études mécanistique récentes faites par l'équipe d'Amatore et Jutand<sup>259</sup> ont montré un rôle particulier de la base ou l'ion hydroxyle est à l'origine de deux effets antagonistes en compétition. D'une part il permet la formation d'une espèce boronate défavorable (non réactive) et d'autre part, il génère le complexe hydroxo-palladium favorable à la réaction. Ainsi, ils ont montré l'effet des contre ions à ralentir la vitesse de la réaction, cela peut être expliqué par une compétition entre l'interaction des cations à l'atome riche en électron (O ou F) ou la transmétallation<sup>260</sup>. La réaction décélère en passant  $n\text{-Bu}_4\text{N}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  et  $\text{Na}^+$ . Après la formation du complexe hydroxy-palladium, une transmétallation aura lieu où le ligand (OH) se comporte comme une base de Lewis face à l'acide boronique pour générer, par échange de ligand, l'espèce borée  $\text{B}(\text{OH})_3$ <sup>261, 262</sup>. Enfin, des travaux pionniers décrits dans la littérature ont montré l'intervention de l'anion ( $\text{HO}^-$ ) dans l'élimination réductrice. L'addition de l'ion hydroxyde sur le complexe stable *trans*- $[\text{R}_1\text{R}_2\text{PdL}_2]$  accélère la réaction par formation du complexe de palladium pentacoordiné bipyramidale à base triangulaire avec  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  en position apicale et équatoriale (cette intermédiaire contourne la problématique *cis-trans* qui ralentie l'élimination réductrice)<sup>263</sup>.

De plus, il a été montré que les ions fluorure ont le même type d'effet que l'ion d'hydroxyde sur le cycle catalytique.

### Préparations des dérivés acides ou esters boroniques non commerciaux

Les dérivés d'acides ou d'esters boroniques d'intérêt ne sont pas tous commercialement disponibles. Par conséquent, les composés **125-128**, présentés (Figure 111), ont été synthétisés au laboratoire.

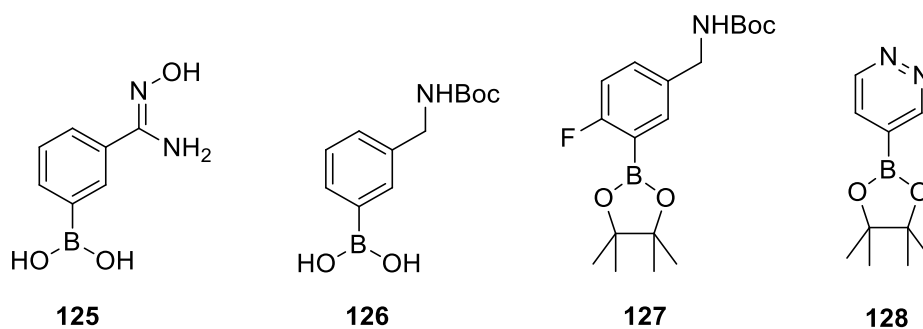


Figure 111 : dérivés d'acides ou d'esters boroniques non commerciaux

<sup>257</sup> C. Amatore *et al.*, *Organometallics* **1990**, 9, 2276-2283

<sup>258</sup> G. B. Smith *et al.*, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 8151-8156

<sup>259</sup> a) C. Amatore *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 10082-10093 b) C. Amatore *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 10082-10093

<sup>260</sup> C. Amatore *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 6616-6625

<sup>261</sup> B. P. Carrow *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6829-6836

<sup>262</sup> C. Amatore *et al.*, *Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6829-6836

<sup>263</sup> a) R. Giovannini *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11186-11187 b) F. d'Orlyé *et al.*, *Tetrahedron* **2005**, 61, 9670-9678 c) C. Amatore *et al.*, *A. J. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9531-9541 d) C. Amatore *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 314-321 e) C. Amatore *et al.*, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 957-966 f) A. Jarvis *et al.*, *Curr. Org. Chem.* **2011**, 15, 3175-3196

### Préparation de l'acide 3-(N'-hydroxy-amide)-phényle-boronique (125)

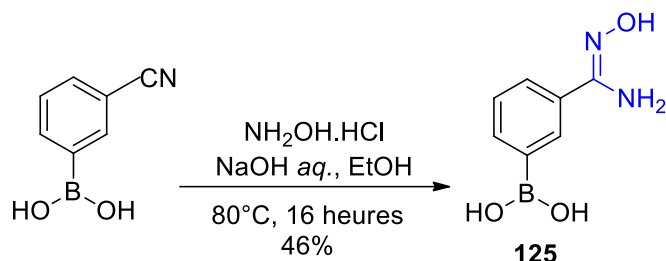


Figure 112 : préparation de l'acide 3-(N'-hydroxy-amide)-phényle-boronique

Le dérivé acide boronique **125** est facilement préparé par addition d'hydroxylamine sur la fonction nitrile de l'acide 3-cyanophényle-boronique commercial en milieu alcalin et dans l'éthanol à 80°C pendant 16 heures. Un mélange E/Z d'amidoxime est obtenu avec un rendement de 46% après purification par chromatographie sur colonne (Figure 112).

### Préparation de l'acide 3-[(tert-butoxy-carbonyl-amino)méthyle]-phényle boronique (126)

Le 3- [(tert-butoxy carbonyl amino) méthyl] phényle acide boronique **126** est préparé à partir du 3-(amino méthyle) phényle acide boronique (commercial) par protection de l'amine primaire dans les conditions classiques dans un mélange de THF : H<sub>2</sub>O (1 : 2) avec un rendement de 75% après purification sur chromatographie sur colonne (Figure 113). La protection de cette amine est cruciale pour éviter que des réactions parasites ou des complexations néfastes ne prennent le pas sur la réaction de Suzuki-Miyaura souhaitée.

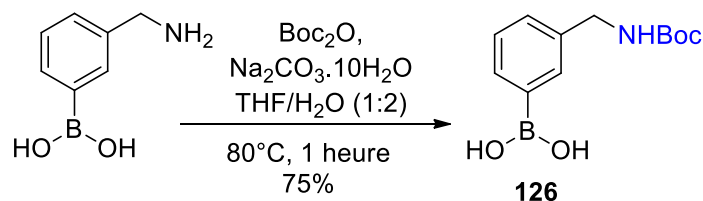


Figure 113 : protection de l'amine primaire

### Préparation de l'ester 1-fluoro-3-[(tert-butoxy-carbonyl-amino)méthyle]-phényle boronique (127)

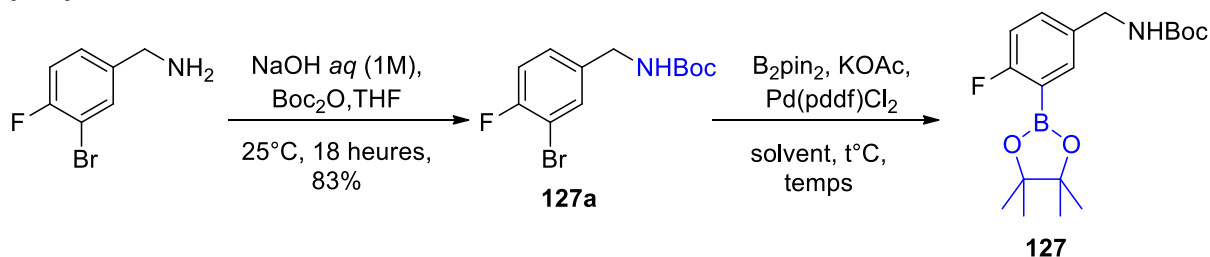


Figure 114 : préparation de l'ester boronique 127



La première étape est une protection de l'amine primaire, à partir du substrat de départ commercial en présence de Boc<sub>2</sub>O et d'hydroxyde de sodium 1M aqueux dans un mélange (1:2) THF:H<sub>2</sub>O à température ambiante pendant 18 heures selon les conditions brevetées par Amgen<sup>264</sup> (Figure 114). L'intermédiaire **127a** est obtenu avec un rendement de 83% après purification. L'ester boronique du composé **127** est alors introduit par une réaction de borylation de Miyaura entre le bis(pinacolato)diboron (B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>) et le bromure d'aryle **127a**.

Plusieurs conditions expérimentales ont été testées (tableau 1). Dans un premier temps, la réaction conduite selon les travaux de Naing *et al.*<sup>265</sup> (entrée 1), dans du DMSO à 100°C pendant 24 heures, n'a donné qu'un modeste rendement de 50% après purification. Ensuite, cette réaction a été testée selon les conditions de Watterson *et al.*<sup>266</sup> (entrée 2), dans du DMF à 80°C pendant 16 heures. Malheureusement, l'ester boronique n'est isolé qu'avec un rendement de 30%. Enfin, les conditions de Bailey *et al.*<sup>267</sup> (entrée 3) ont conduit à la formation de l'ester boronique **127** avec un rendement de 70% après purification.

entrée	solvant	température	temps (heures)	Rendement <sup>b</sup>
1 <sup>a</sup>	DMSO	100°C	24	50%
2	DMF	80°C	16	30%
3	1, 4 dioxane	80°C	16	70%

Tableau 29 : condition de réaction de Miyaura a) La réaction est chauffée au début pendant 5 heures puis le temps est prolongé jusqu'à 24 heures. b) Les rendements sont calculés après purification du produit final par chromatographie colonne.

### Point mécanisme : Borylation de Miyaura

La borylation de Miyaura utilise des complexes de palladium(II) (PdCl<sub>2</sub>(dppf), Pd(MeCN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ...) ou de palladium(0) (Pd(dba)<sub>2</sub>, ...) ainsi que du bis(pinacolato)diboron (B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>), dans un solvant polaire aprotique tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le diméthylformamide (DMF) ainsi qu'une base « oxygénée » de type acétate (KOAc), carbonate (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ou phénolate (PhOK). Le mécanisme débute par l'addition oxydante du complexe L<sub>2</sub>Pd<sup>0</sup> sur le bromure d'aryle pour générer un nouveau complexe L<sub>2</sub>Pd<sup>II</sup>ArX. Un échange de ligand se produit entre l'halogénure et l'acétate pour conduire au complexe acétoxy-palladium *trans*-L<sub>2</sub>Pd<sup>II</sup>ArOAc qui subit une transmétallation avec le B<sub>2</sub>Pin<sub>2</sub> « activé ». Cet intermédiaire activé résulte de la réaction entre B<sub>2</sub>Pin<sub>2</sub> et l'anion acétate dans le milieu réactionnel. Enfin, une élimination réductrice conduit à la formation de l'ester boronique ainsi à la régénération du complexe palladium L<sub>2</sub>Pd<sup>0</sup>. Le choix de la base n'est pas fortuit, l'acétate joue un double rôle dans l'activation du complexe acétoxy-palladium et dans l'activation du B<sub>2</sub>Pin<sub>2</sub>. Des études théoriques par DFT réalisées en 2004 par Sakaki<sup>268</sup> suggèrent que de fortes liaisons entre le bore et des ligands de type hydroxyde ou fluorure activeraient l'agent de borylation et rendrait donc l'étape de transmétallation beaucoup plus rapide.

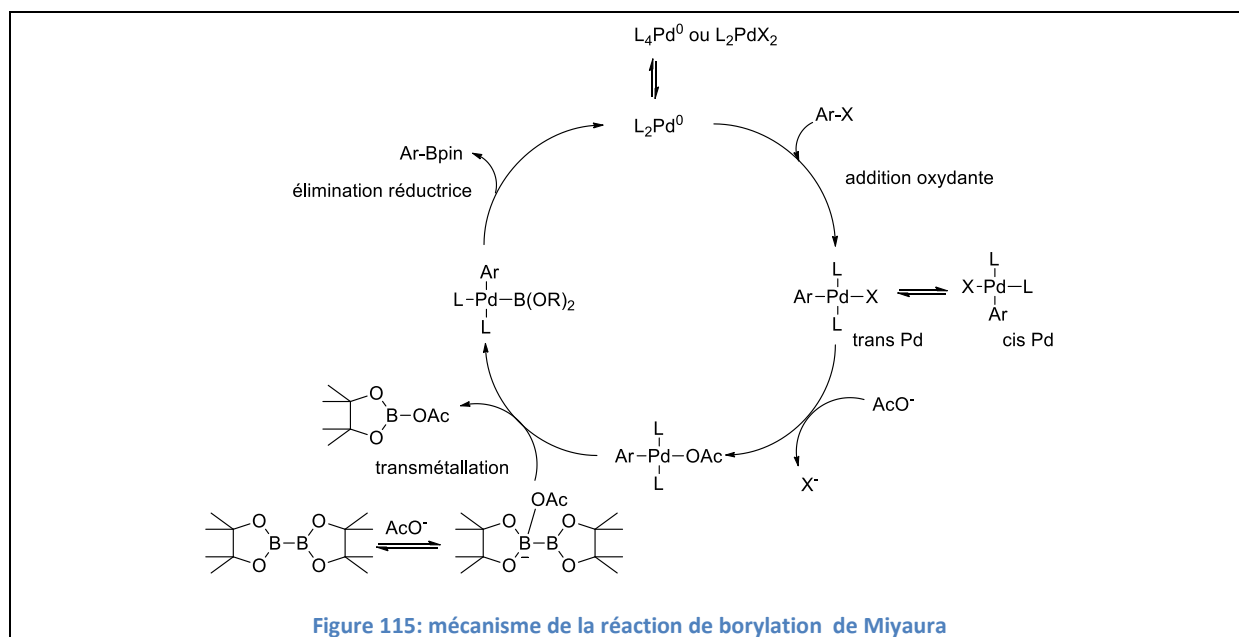
<sup>264</sup> Amgen, INC, Patent: US2003/134836 A1, **2003**

<sup>265</sup> EXELIXIS, INC.; AAY, Naing *et al.*, Patent: WO2010/138490 A1, **2010**

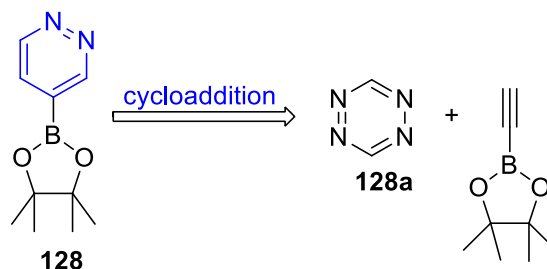
<sup>266</sup> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY; WATTERSON *et al.*, Patent: WO2016/65222 A1, **2016**

<sup>267</sup> GLAXO GROUP LIMITED; BAILEY *et al.*, Patent: WO2010/146105 A1, **2010**

<sup>268</sup> M. Sumimoto *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10457-10471



Préparation de l'ester 4-pyridazine boronique (**128**)



**Figure 116 : schéma rétro synthétique de la formation de l'ester 4-pyridazine boronique**

La préparation de l'ester 4-pyridazine boronique **128** est envisagée par une réaction de cycloaddition [4+2] entre la 1,2,4,5-tétrazine **128a** avec l'alcyne correspondant (Figure 116).

La 1,2,4,5-tétrazine est décrite, en 1959, par Carboni et Lindsey<sup>269</sup> comme un adduit fructueux dans les réactions de cycloaddition [4+2] avec des alcènes ou des alcynes simples via des réactions de Diels-Alder à demande électronique inverse. La présence des azotes dans la tétrazine **128a** appauvrit les carbones 3 et 6 en électrons ce qui abaisse l'énergie de l'orbitale frontière la plus basse vacante (BV ou LUMO) du diène. D'un autre côté, la présence de diénophile riche en électrons va élever l'énergie de l'orbitale frontière la plus haute occupée (HO ou HOMO). La réduction de la différence d'énergie entre HOMO et LUMO permet un meilleur recouvrement orbitalaire et favorise ainsi l'interaction inverse entre la HOMO du diénophile et la LUMO du diène (Figure 117).

<sup>269</sup> R. A. Carboni *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346

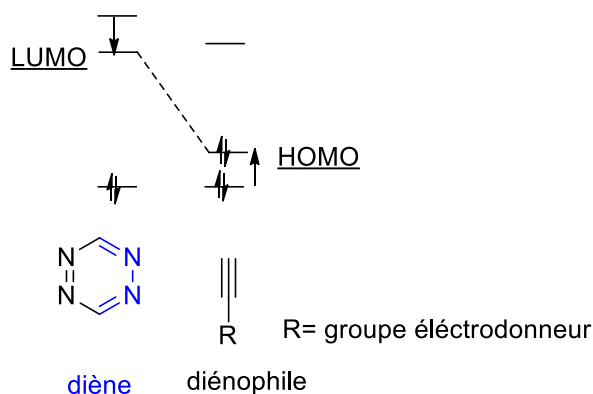


Figure 117: Diels-Alder à demande électronique inversé

La première étape consiste donc en la formation de la 1,2,4,5-tétrazine, selon les conditions décrites par Sauer *et al.*<sup>270</sup> en utilisant de l'acétate de formamidine et de l'hydrazine dans du méthanol en présence d'acide acétique à 0°C. Le milieu réactionnel est agité jusqu'à obtention d'une solution claire, puis du nitrite de sodium est ajouté au milieu réactionnel à 10°C et est agité pendant une heure (Figure 118). Après purification par sublimation, la tétrazine pure est obtenue avec un très faible rendement de 9% par rapport au rendement de 20% obtenu par Sauer *et al.*. Cette différence de rendement est liée à des problèmes techniques lors de la sublimation.

Ensuite, cette tétrazine est mise en réaction avec l'ester 2-éthynyle boronique dans le nitrobenzène à 140°C selon les conditions de réaction de cycloaddition [4+2] décrites par Harrierty *et al.*<sup>271</sup> Le produit souhaité **128** est isolé après purification par chromatographie sur colonne avec un rendement de 40%.

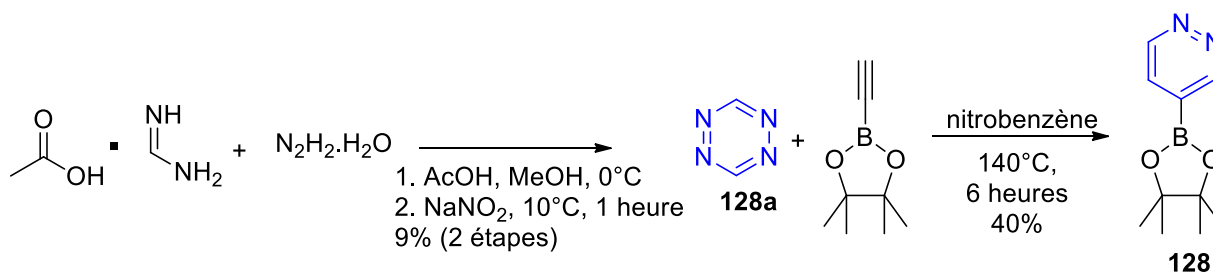


Figure 118: formation du pyridazine ester boronique

<sup>270</sup> J. Sauer *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885-2896

<sup>271</sup> M. D Helm *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3889-3892

### Point mécanisme : Formation de la 1,2,4,5-tétrazine

Sauer *et al.* ne décrivent pas le mécanisme d'obtention de la 1,2,4,5-tétrazine. En revanche, ils ont proposé la formation des intermédiaires dihydro-1,2,4,5-tétrazine (Figure 119) qui sont ensuite oxydés par le nitrite de sodium dans l'acide acétique en 1,2,4,5-tétrazine.

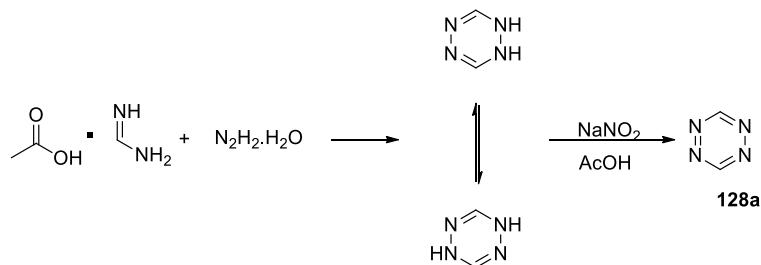


Figure 119: mécanisme proposé par Sauer *et al.*

Dans ce qui suit, nous avons envisagés la formation du 1,2,4,5-tétrazine selon le mécanisme suivant (Figure 120).

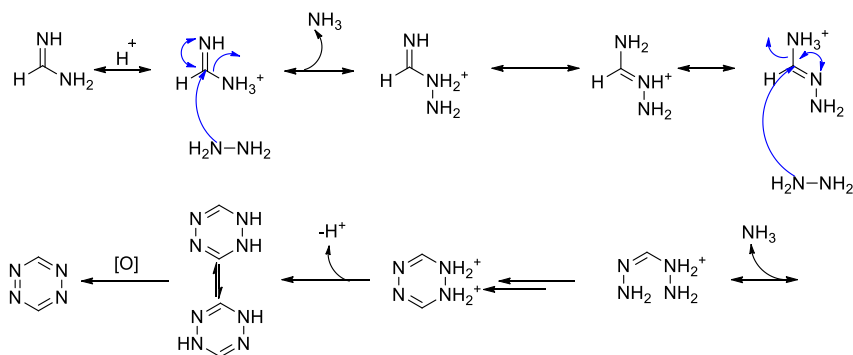


Figure 120 : mécanisme proposé pour la formation de la 1,2,4, 5-tétrazine

### Couplage de Suzuki-Miyaura

Les différentes réactions de couplage sur l'intermédiaire clé **76** avec les divers dérivés d'acides ou d'esters boroniques ont été réalisées sous irradiations micro-ondes, dans un mélange DME : H<sub>2</sub>O (4 :1) en présence de carbonate de potassium et de [Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] ou [PEPPSI-<sup>i</sup>Pr]Pd (le choix de la base et du catalyseur de palladium est basé sur un criblage réalisé au laboratoire pour déterminer les meilleurs conditions opératoires). (Figure 121).

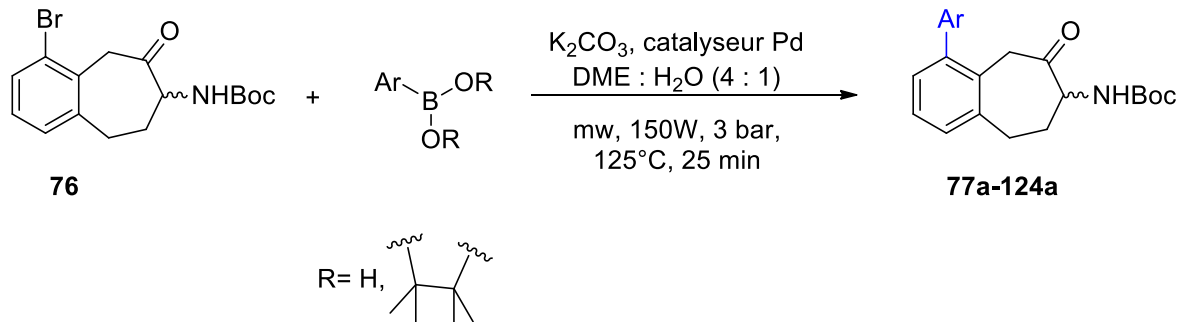


Figure 121 : substitution de l'intermédiaire 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one **76** en position 4 par couplage pallado-catalysé

La Figure 122 récapitule les différents dérivés de 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4 préparés par couplage de Suzuki-Miyaura.

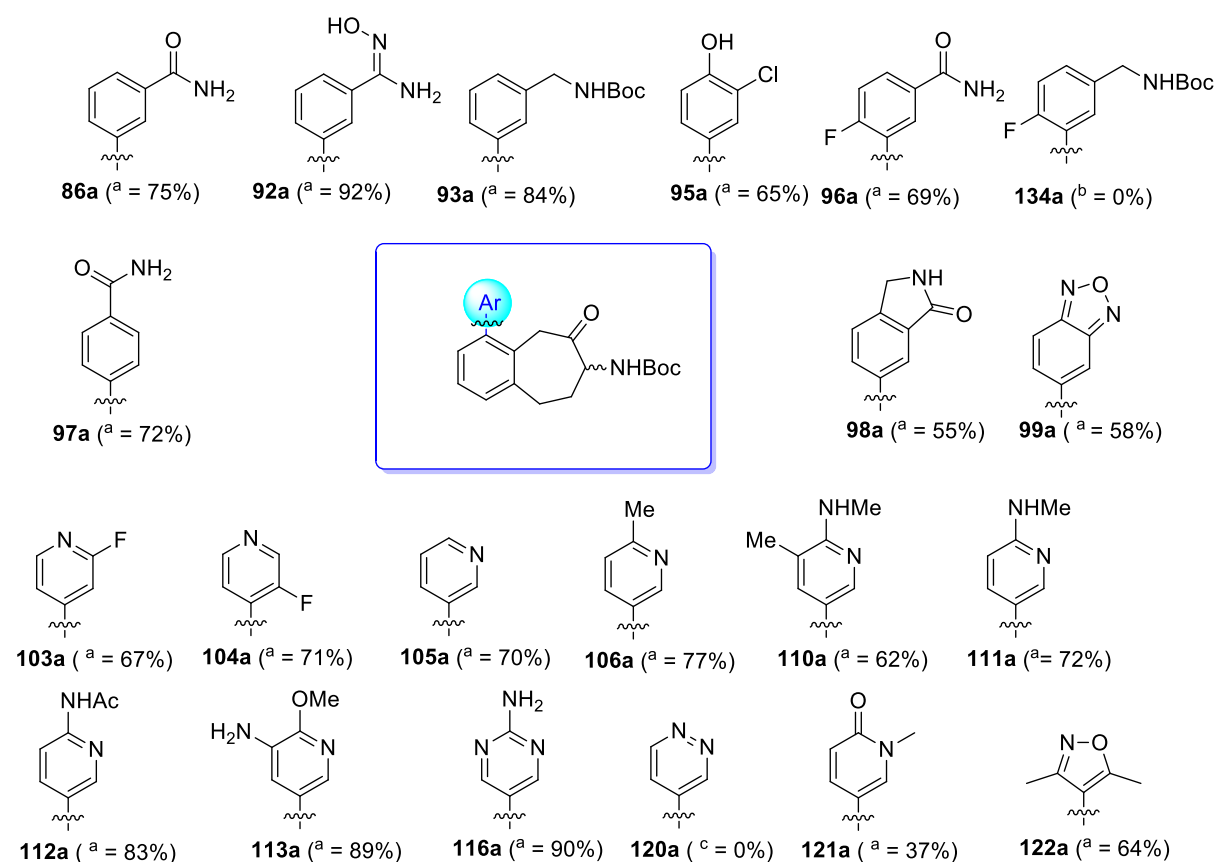


Figure 122 : dérivés d'aminobenzosubérone par couplage suzuki. <sup>a</sup>) 4-bromo-aminobenzosubérone (1éqv.), dérivé boronique (3éqv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3éqv.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ou PEPSSI-<sup>i</sup>Pr (10-15%) DME/H<sub>2</sub>O (4:1), M.O. 125°C/25 min/150W/3 bar. <sup>b</sup>) 4-bromo-aminobenzosubérone (1éqv.), dérivé boronique (1.5éqv.), CsF (2.2 éqv.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (10-15%), DME anhydre, 85°C pendant 16 heures. <sup>c</sup>) 4-bromo-aminobenzosubérone (1éqv.), dérivé boronique (1.5éqv.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3 éqv.), [Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>] (10%) (0.05 éqv.), MeCN, [(t-Bu)<sub>3</sub>PH]BF<sub>4</sub> (0.12éqv.), 50°C pendant 16 heures. Tous les rendements ont été isolés après après filtration sur célite et purification par chromatographie sur colonne.

L'obtention de de l'analogue **134a** à partir de l'ester boronique **127** a été tenté soit dans les conditions optimisées au laboratoire soit en présence de CsF et de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> dans du DME anhydre par voie thermique ou par irradiation micro-onde. Cependant toutes ces conditions se sont soldées par un absence du couplage.

Même constat d'échec pour la préparation de la 4-pyridazine-7-amino-benzocycloheptan-6-one **120a**. La réaction de couplage dans les conditions optimisées au laboratoire conduit à la dégradation de l'ester boronique et à la débromation de l'intermédiaire **76**. Par suite, le couplage est tenté selon les conditions de Helm *et al.*<sup>266</sup> dans MeCN en présence de K<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> comme base et de [Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>]/ [(t-Bu)<sub>3</sub>PH]BF<sub>4</sub> par voie thermique à 50°C. Ces conditions conduisent à la dégradation de l'ester boronique **128** par contre l'intermédiaire **76** reste intact.

Pour contourner ce problème, nous avons envisagé la préparation de l'analogue **120a** par réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse entre le diène 1,2,4,5-tétrazine **128a** et le diénophile

alcyne **129a** ou **129**. Ce dernier est préparé par couplage de Sonogashira entre le 4-Bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one **76** et le Triméthylsilyléthyne selon la (Figure 123).

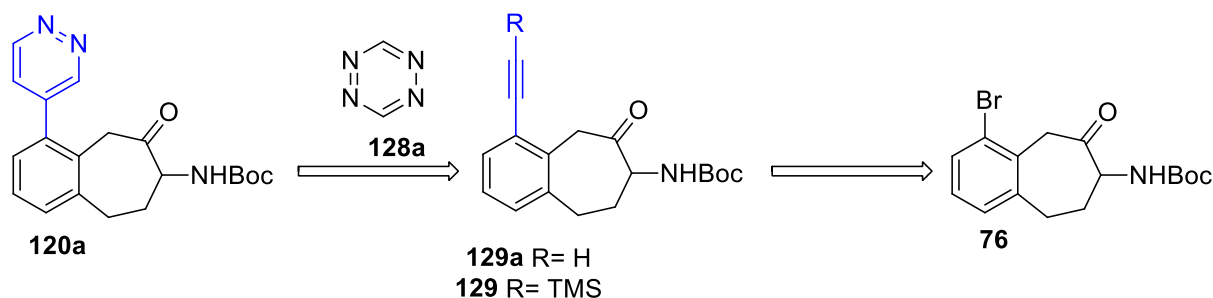


Figure 123 : Schéma rétrosynthétique pour la formation du composé pyridazine **120a**

La première étape est le couplage de Sonogashira entre le Triméthylsilylacétylène (Figure 124) et l'intermédiaire bromé **76**. Les conditions réactionnelles ont déjà été optimisées dans notre laboratoire par Dr. Lionel Roux (thèse soutenue en 2010). L'intermédiaire **129** est obtenu après purification par chromatographie sur colonne avec un rendement de 67%.

Sauer *et al.*<sup>265</sup> ont décrit la cycloaddition [4+2] entre un dérivé triméthylsilylacétylène et la 1,2,4,5-tétrazine. Par suite, une cycloaddition [4+2] entre la tétrazine et l'intermédiaire **129** a été testée dans les mêmes conditions décrites par Sauer. Ces conditions (Tableau 30) ont abouti à la dégradation de la tétrazine sans dégradation de l'intermédiaire **129**.

entrée	solvant	température	temps	Rendement
1	toluène	80°C	16 heures	0% <sup>a</sup>

Tableau 30 : condition de Sauer et al. Cycloaddition [4+2], a) dégradation de la tétrazine.

Par conséquent, une déprotection de l'éthyne<sup>272, 273</sup> a été préalablement conduite (Figure 124) dans un mélange DCM : H<sub>2</sub>O en présence du carbonate de potassium à 40°C pendant une heure. L'intermédiaire **129a** est obtenu quantitativement après purification sur chromatographie colonne. Ensuite une cycloaddition Diels-Alder [4+2] à demande électronique inverse dans le nitrotoluène à 140°C pendant 2 heures conduit après purification par chromatographie sur colonne au 4-pyridazine-aminobenzosubérone **120a** avec un rendement de 58%.

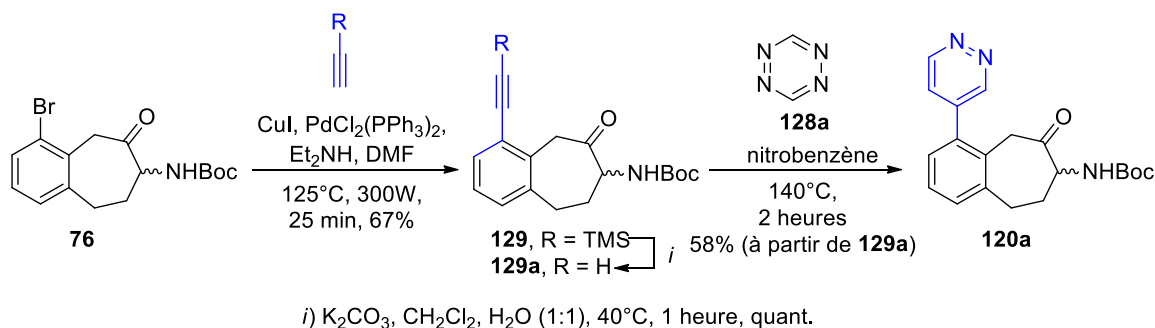


Figure 124: formation de l'intermédiaire **120a**

<sup>272</sup> F. Maya *et al.*, *Tetrahedron* **2004**, 60, 81-92

<sup>273</sup> W. Hu *et al.*, *Org. Lett.* **2008**, 10, 2669-2672

### Point mécanisme : Couplage de Sonogashira

La réaction de Sonogashira est une réaction de couplage entre un alcyne terminal et un halogénure d'aryle ou de vinyle qui nécessite l'utilisation d'un complexe de palladium (0) comme catalyseur, d'une quantité catalytique de sel de cuivre comme co-catalyseur (le plus souvent CuI) et d'une amine tertiaire qui sert de base. Le cycle catalytique du couplage de Sonogashira<sup>274, 275</sup> est (Figure 125).

- cycle du cuivre : Formation d'un complexe  $\pi$ -alcyne avec le cuivre cationique rend le proton de l'alcyne vrai plus acide, ce qui mène en présence d'une base à la formation de l'acétylure de cuivre (F.) Le composé (F) réagit ensuite avec le complexe de palladium (B) dans une réaction de transmétallation, avec régénération subséquente de l'halogénure de cuivre (G).

- cycle du palladium : Le catalyseur inactif de palladium(II) est activé par réduction en complexe de palladium(0). Le complexe actif à 14 électrons de Pd(0)L<sub>2</sub> (A) réagit avec un halogénure d'aryle ou de vinyle par addition oxydante pour donner un complexe de Pd(II) intermédiaire (B) (étape cinétiquement limitante). Le complexe (B) réagit par transmétallation avec l'acétylure de cuivre (F), produit dans le cycle catalytique du cuivre, pour donner le complexe (C) et régénérer l'halogénure de cuivre. Les ligands organiques sont orientés en trans et sont convertis en cis via une réaction d'isomérisation trans-cis pour donner le complexe (D). Dans l'étape finale, le complexe (D) subit une élimination réductrice pour donner l'alcyne, avec la régénération de l'espèce de palladium active.

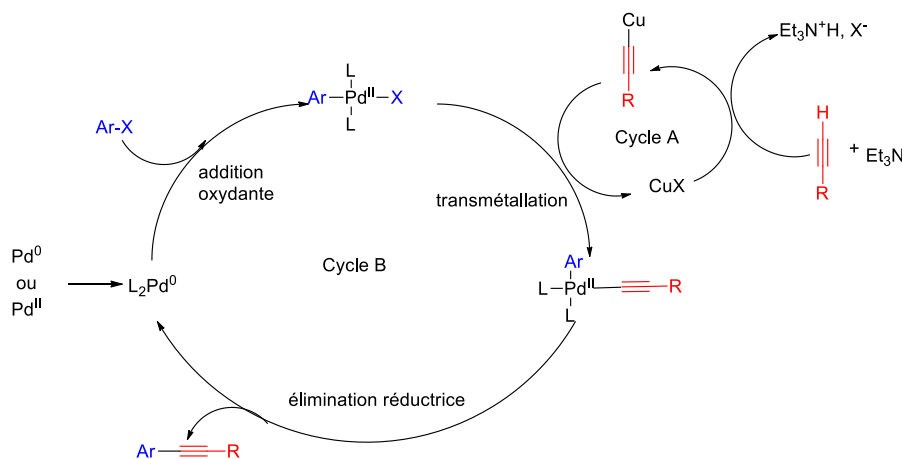


Figure 125: mécanisme du couplage de Sonogashira

Variante sans cuivre :

L'introduction du cuivre comme co-catalyseur augmente la réactivité, mais la présence de cuivre peut mener à la formation de dimère d'alcyne (Réaction de Glaser) dans des conditions oxydantes, d'où la nécessité de travailler dans des conditions inertes strictes. Des variations de la réaction de Sonogashira sans cuivre ont donc été développées pour éviter cette réaction parasite de dimérisation, mais le mécanisme reste encore un sujet de débat. La différence fondamentale entre ces 2 mécanismes est le rôle de l'alcyne ou de l'amine comme ligand le plus fort sur le complexe de palladium intermédiaire après l'étape élémentaire d'addition oxydante.

<sup>274</sup> W. Herrman *et al.*, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 687, 229-248

<sup>275</sup> N. S. Pirgulyeh *et al.*, *Tetrahedron* **1999**, 55, 12377-12386

## Préparation des sels d'amine des dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4

Les différents carbamates NH-Boc ainsi obtenus sont alors hydrolysés par une solution HCl 2M dans Et<sub>2</sub>O dans du 1,4-dioxane anhydre. Cependant, lorsque l'utilisation de ces conditions a conduit à des dégradations, l'emploi de TFA dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre a été préféré. (Figure 126)

Dans ces conditions réactionnelles, les différents sels d'amine résultants précipitent. Ils sont alors centrifugés et purifiés par une recristallisation dans *i*PrOH/Et<sub>2</sub>O.

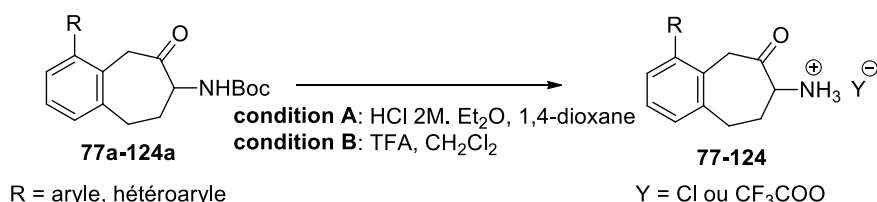


Figure 126 : déprotection des dérivés 7-amino-benzocycloheptan-6-one

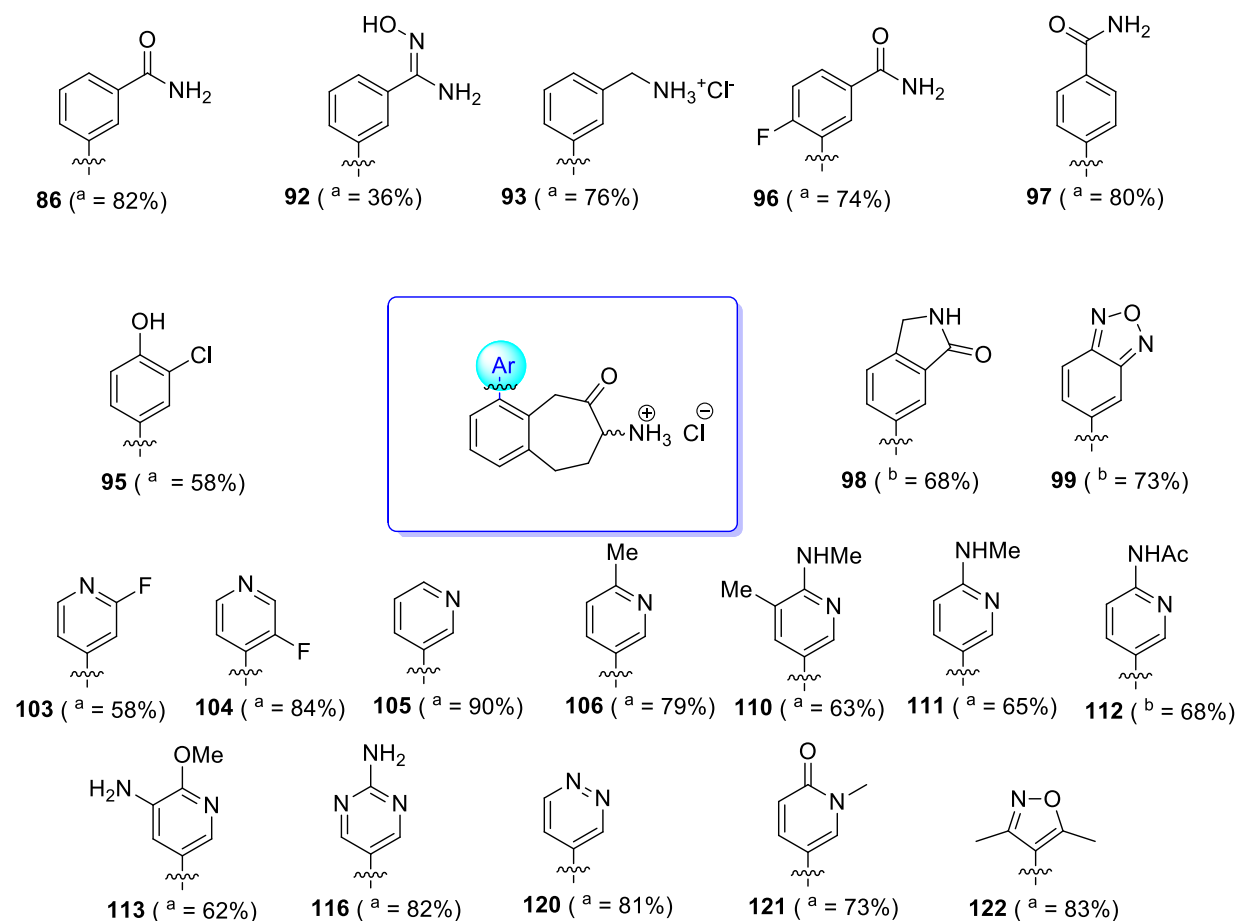


Tableau 31 : Préparation des dérivés 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position 4 sous forme de sel d'amine en série racémique. <sup>a</sup>) déprotection par HCl 2N dans (Et<sub>2</sub>O) et dans 1,4 dioxane anhydre. <sup>b</sup>) déprotection par TFA dans du DCM anhydre.

Les rendements modérés obtenus dans certains cas sont dus à la perte de produit pendant le séchage sous vide ou par lavage pendant la centrifugation.





# **Chapitre 6 :**

## **Evaluation biologique**

## Chapitre 6 : Evaluation biologique

### Evaluation biologique des dérivés du 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazepin-4-one

Une série de molécules dérivées du 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazepin-4-one substitués en position 1 ont été élaborées par Dr. Germain Revelant (Figure 127). L'activité inhibitrice de ces molécules a été testée *in vitro* sur l'APN porcine et rPfA-M1.

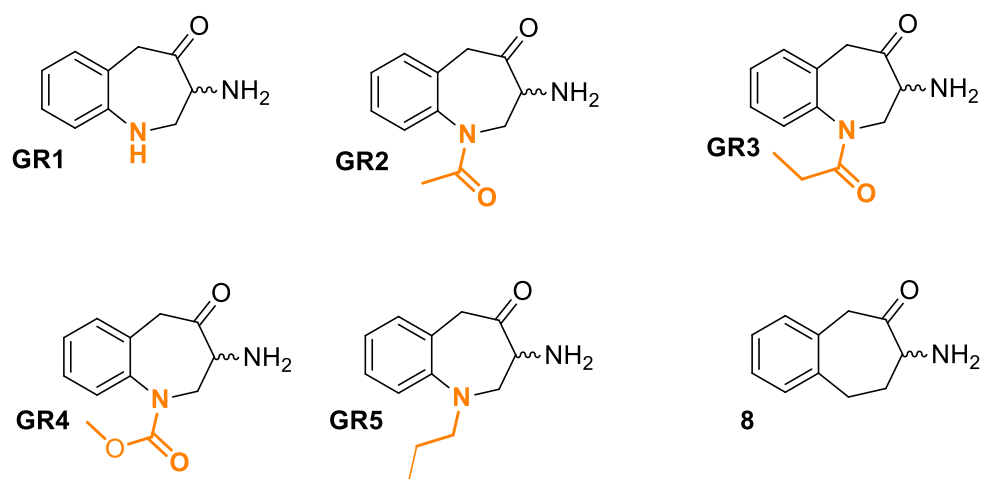


Figure 127 : dérivés de 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazepin-4-one élaboré par Dr. Germain Revelant

	8	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5
APN, $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	1	25*	1.5	27*	1.06	34*
rPfA-M1, $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	33	55	37	65	7	50

Tableau 32 : activité inhibitrice *in vitro* des dérivés de 3-amino-1,2,3,5-tétrahydro-1-benzazepin-4-one en série racémique sur l'APN et rPfA-M1. \*)  $IC_{50}$

Concernant l'inhibition de l'APN, les dérivés N-acétyle **GR2** et N-carbamate de méthyle **GR4** ont des activités inhibitrices similaires à la 3-amino-2-benzosubérone **8**.

En revanche pour l'inhibition de rPfA-M1, seul le composé **GR4** ( $IC_{50}$  7  $\mu\text{M}$ ) semble améliorer l'activité inhibitrice.

Comme nous avons discuté précédemment, ces enzymes ont une spécificité de substrat dictée par des interactions avec le sous-site S1. D'où l'importance du châssis moléculaire **GR1** dans l'exploitation de ce sous-site afin d'atteindre une sélectivité vis à vis de chacun de ces enzymes.

Il sera important de tester l'activité de ces analogues sur la sous-famille des oxytocinases. Il serait également judicieux d'élucider des structures du complexe enzyme-substrat ou réaliser de la modélisation moléculaire de ces analogues dans le site actif des aminopeptidases pour élucider la nature des interactions de nos analogues dans le site actif des enzymes et pour concevoir des analogues sélectifs pour cette famille.

### Evaluation biologique des dérivés 7-aminobenzocycloheptèn-6-one

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de la relation substrat-activité d'analogues dérivés du 7-aminobenzocycloheptèn-6-one **8** avec les enzymes d'intérêt (APN, PfA-M1, ERAP1, ERAP2 et IRAP). Une grande partie de ce travail est ainsi essentiellement consacrée à l'étude des interactions avec le sous-site S1'. Les analogues ont été préparés selon le cahier de charge précisé



composé		K <sub>i</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)			cLogP <sup>b</sup>
		APN	rPFA-M1	rERAP1	rERAP2	rIRAP	
8	aminobenzosuberone	1	15	-	-	-	0.66
10	4-phenyl	0.007	0.05	63	18	2.4	2.41
11	1-bromo	0.019	1	56	104	2.6	1.42
12	1-bromo-4-phenyl	0.06 (nM)	0.03	1.6	0.393	0.123	3.17
76	4-bromo	0.040	0.06	120	49	1.0	1.42
77	4-( <i>p</i> -methyl-phenyl)	0.008	-	-	-	-	2.86
78	4-( <i>p</i> -fluoro-phenyl)	0.006	-	-	-	-	2.86
79	4-( <i>p</i> -chloro-phenyl)	0.002	-	-	-	-	3.09
80	4-( <i>p</i> -methoxy-phenyl)	0.022	-	-	-	-	2.46
81	4-( <i>p</i> -cyano-phenyl)	0.027	-	-	-	-	2.34
82	4-( <i>m</i> -nitro-phenyl)	0.55	-	>200	24	1.2	2.16
83	4-( <i>m</i> -methoxy-phenyl)	0.130	-	-	-	-	2.34
84	4-( <i>m</i> -morpholino-phenyl)	1.350	2.2	-	-	-	2.33
85	4-( <i>m</i> -aminosulphonyl-phenyl)	0.078	0.35	>200	26	0.9	1.10
86	4-( <i>m</i> -aminocarbonyl-phenyl)	0.010	0.04	>200	>200	1.3	1.2
87	4-( <i>m</i> -cyclopropyl amino-phenyl)	0.032	0.4	-	-	-	1.94
88	4-( <i>o</i> -methoxy-phenyl)	1.700	-	-	-	-	2.42
89	4(3,4,5-methoxy-phenyl)	2.000	-	-	-	-	2.04
90	4-( <i>p</i> -methylamine-phenyl)	0.01	0.227	-	-	-	1.59
91	4-( <i>m</i> -methylamino carbonyl-phenyl)	0.03	0.18	>200	>200	5.5	1.58
92	4-( <i>m</i> -hydroxyamidino-phenyl)	0.05	0.05	>200	>200	4.9	0.70
93	4-( <i>m</i> -methylamine-phenyl)	0.02	0.09	>200	113	5	1.57
94	4-( <i>m</i> -methoxy carbonyl-phenyl)	1.3	0.4	-	-	-	1.57
95	4-( <i>m</i> -chloro- <i>p</i> -hydroxy-phenyl)	-	-	17	7.4	0.48	2.79
96	4-(1-fluoro-5-amino carbonyl-phenyl)	0.77 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	-	-	-	1.32
97	4-( <i>p</i> -aminocarbonyl-phenyl)	1 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>	>200	12	2.0	1.23
98	4-(3-oxoisindoline-5-yl)	0.5 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	>200	>200	2.3	1.16
99	4-(benzo[c][1,2,5]oxodiazom-5-yl)	0.7 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	>200	22	4.3	2.34
100	4-(4-pyridyl)	0.003	0.27	-	-	-	1.12
101	4-(2-methyl-4-pyridyl)	0.033	0.67	-	-	-	1.56
102	4-(2-methoxy-4-pyridyl)	0.160	0.98	>200	36	0.9	1.52

composé	K <sub>i</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)			cLogP <sup>b</sup>	
	APN	rP <sub>f</sub> A-M1	rERAP1	rERAP2	rIRAP		
103	4-(2-fluoro-4-pyridyl)	0.123	0.17	>200	21	0.88	1.62
104	4-(3-fluoro-4-pyridyl)	0.006	0.03	8.1	4.4	0.2	1.43
105	4-(3-pyridyl)	0.018	0.45	7.6	4.0	4.2	1.34
106	4-(6-methyl-3-pyridyl)	0.07	0.6	1.3	1.1	0.96	1.73
107	4-(6-difluoromethy-3-pyridyl)	0.12	25 <sup>a</sup>	-	-	-	2.29
108	4-(6-amine-3-pyridyl)	0.010	0.14	3.4	14	0.6	1.16
109	4-(2-methoxy-3-pyridyl)	1.300	0.26	-	-	-	1.52
110	4-(6-amine-5methyl-3-pyridyl)	-	-	>200	7.5	6.5	1.54
111	4-(6-methylamine-3-pyridyl)	0.9 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	4.6	9	0.12	1.53
112	4-(6-acetamide-3-pyridyl)	1.3 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	31	>200	9.1	0.96
113	4-(5-amine-6-methoxy-3-pyridyl)	0.8 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	>200	17	12	1.16
114	4-(6-methoxy-3-pyridyl)	0.010	0.11	36	4.3	1.2	1.73
115	4-(5-pyrimidyl)	0.060	0.18	-	-	-	0.63
116	4-(2-amino-5-pyrimidyl)	0.045	0.59	4.7	5.9	0.93	0.43
117	4-(2-dimethylamine-5-pyrimidyl)	0.39	4.7	>200	>200	2.0	1.59
118	4-(2-methoxy-5-pyrimidyl)	0.3	1.0	>200	>200	15	1.00
119	4-(pyrizine)	0.39	0.93	-	-	-	0.58
120	4-(pyridazine)	0.5 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	8.4	3.2	0.61	0.19
121	1-methyl-6-oxo-dihydropyridin-3-yl	1.7 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>	>200	>200	6.7	1.00
122	3',5'-dimethylisoxole-4-yl	4.2 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	>200	68	11	1.26
123	1-methyl-1H-pyrazol-4-yl	0.1	0.43	-	-	-	0.73
124	1-methyl-3-trifluoro methyl-1H-pyrazol-5-yl	0.069	1.9	-	-	-	1.87
130	1,4-dibromo	0.006	0.005	5.5	2.8	0.034	2.18
131	1-phenyl	0.250	2	137	>200	2.2	2.41
132	5-fluoro	0.3	-	>200	>200	14	0.73
133	1-bromo-5-fluoro	0.012	-	13	1.7	0.13	1.50

Tableau 33 : Inhibition de l'activité enzymatique de l'APN, rERAP1, rERAP2, rIRAP et rP<sub>f</sub>A-M1 par des dérivés de la 3-amino-2-benzosubérone. Tous les analogues testés sont racémiques, les activités sont calculées par l'intermédiaire de courbes de Dixon pour APN et rP<sub>f</sub>A-M1 et par le logiciel GraphPad -Prism pour rERAP1, rERAP2 et rIRAP). <sup>a</sup>) IC<sub>50</sub> (μM). <sup>b</sup>) cLogP est calculé par Molinspiration web service.

En général, les résultats des tests d'activités enzymatiques obtenus ont montré des activités inhibitrices intéressantes sur l'APN, rP<sub>f</sub>A-M1 et rIRAP. Des activités inhibitrices plus modestes sont observées dans le cas de rERAP1 et de rERAP2.

Comme nous avons indiqué précédemment, les modèles de docking sur l'APN et PfA-M1 ont montré que la substitution en position 1 ne permettrait pas ou très peu d'interactions avec le sous-site S1. Cela a été confirmé par l'étude de la structure du complexe réalisée avec l'analogue dibromé **130** dans le site actif de rPfA-M1. (Figure 129)

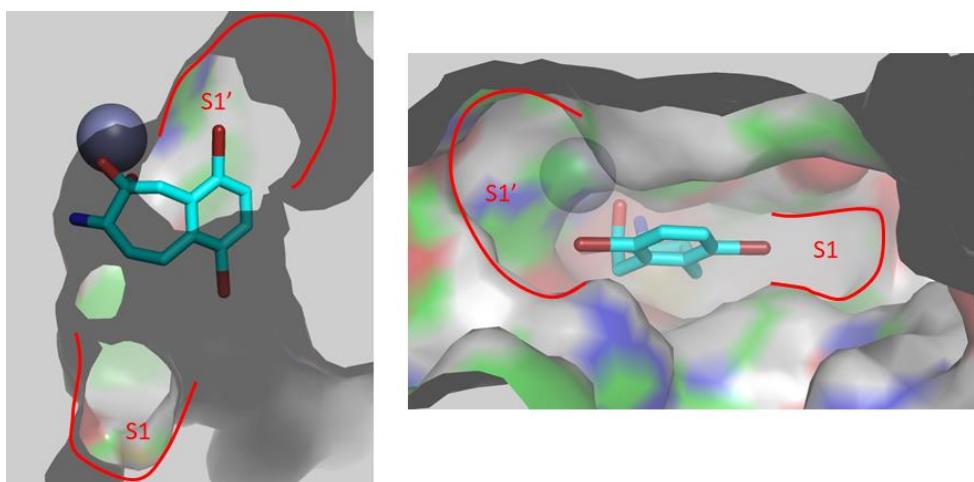


Figure 129 : Mode de liaison de l'analogue dibromé 130 dans le site actif de rPfA-M1. Représentation du site actif en surface

Le complexe enzyme-inhibiteur obtenu montre que l'espèce active adopte une conformation chaise empilée entre les chaînes latérales du Gln460, Ala461 et Met462 d'un côté et du Tyr580 de l'autre côté en établissant une interaction de type  $\pi$ -stacking avec ce dernier ( $3,5\text{\AA}$ ). L'énantiomère co-cristallisé est de configuration (S). Les groupes hydroxyles interagissent par liaisons hydrogènes avec le Tyr580 ( $2,7\text{\AA}$ ) et le Glu519 ( $3,1\text{\AA}$ ) et chélatent l'ion Zinc. En outre, l'amine primaire est engagée dans une interaction de type « pont salin » avec le carboxylate du Glu463 ( $2,7\text{\AA}$ ) du domaine GAMEN, et développe également une liaison hydrogène avec Glu319 ( $2,7\text{\AA}$ ) (Figure 130).

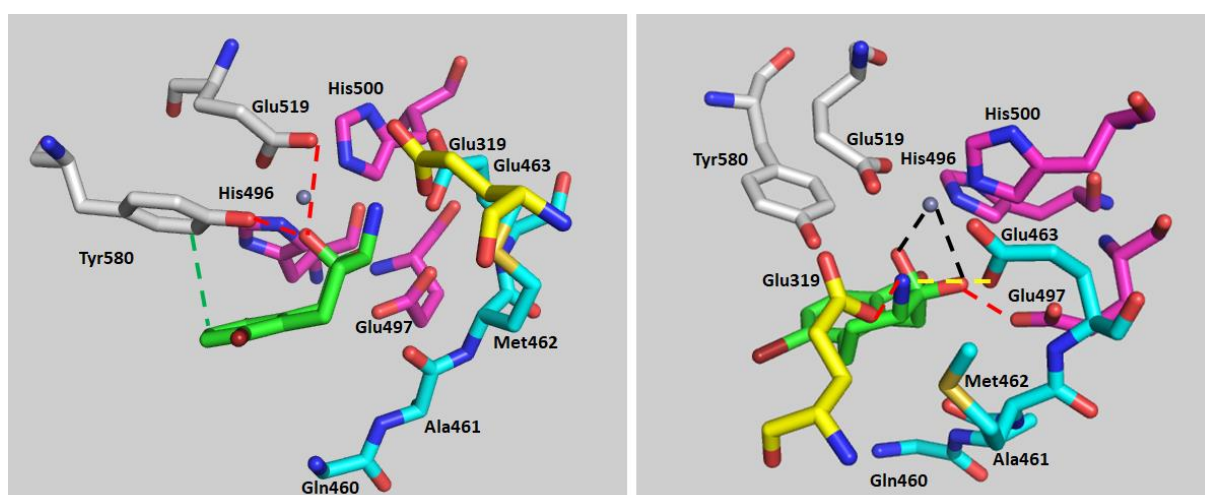


Figure 130 : Mode de liaison de l'analogue dibromé 130 dans le site actif de rPfA-M1. Interaction  $\pi$ -stacking en vert, liaison hydrogène en rouge, interaction pont salin en jaune et liaison de coordination en noir.

La présence de la cétone (sous forme d'hydrate) et l'amine primaire, permettent un meilleur ancrage de la molécule à proximité de l'ion zinc. Les résultats obtenus avec le complexe enzyme-inhibiteur sont en accord avec les résultats obtenus par les modèles de docking de nos analogues avec l'APN<sup>276</sup>.

Cet analogue dibromé **130** a montré une amélioration de l'activité inhibitrice pour toutes ces enzymes par rapport aux analogues monobromé en position 1 (composé **11**) ou en position 4 (composé **76**), cela peut être attribué à l'amphiphilicité de l'atome de brome<sup>277</sup> qui reflète très probablement un effet positif sur l'affinité de liaison. Cependant, la structure de cet analogue dans le site actif de *rPfa*-M1 montre l'existence des interactions hydrophobes entre l'anneau électronégatif du brome en position 1 avec les chaînes latérales de Val459 (3,1 Å) et du Tyr475 (3,7 Å) et probablement des interactions entre la coiffe électropositive du brome (trou sigma) et la molécule d'eau W753. Cette dernière participerait à la formation d'un pont halogène-eau-hydrogène (X-W-H) avec l'oxygène du squelette du carbonyle de Glu572. (Figure 131)

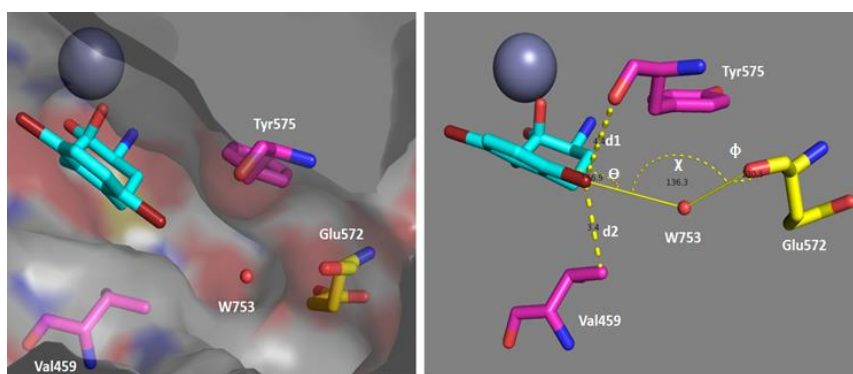


Figure 131 : interaction de l'analogue dibromé 130 avec le sous-site S1' de *Pfa*-M1.  $d_1=3.7\text{Å}$ ,  $d_2= 3.1\text{ Å}$ ,  $\theta= 166.9^\circ(\text{O753-Br-Car})$ ,  $\phi= 130,5^\circ(\text{C}_{\text{Glu572}}-\text{O}_{\text{Glu572}}-\text{O753})$ ,  $\chi= 136,3^\circ (\text{O}_{\text{Glu572}}-\text{O753-Br})$ , les distances et les angles correspondent à des critères et contraintes communs définis pour les ponts X-W-H dans les interactions protéine-ligand<sup>278</sup>

Du côté du sous-site S1', l'atome de brome en position 4 développerait essentiellement des interactions hydrophobes avec ce sous-site tout en épousant partiellement sa forme (Figure 132).

<sup>276</sup> G. Relevant *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 3192-3207

<sup>277</sup> M.R. Scholfield *et al.*, *protein science* **2012**, 22, 139-152

<sup>278</sup> Z. Peng *et al.*, *J. Struct. Biol.* **2010**, 169, 172–182



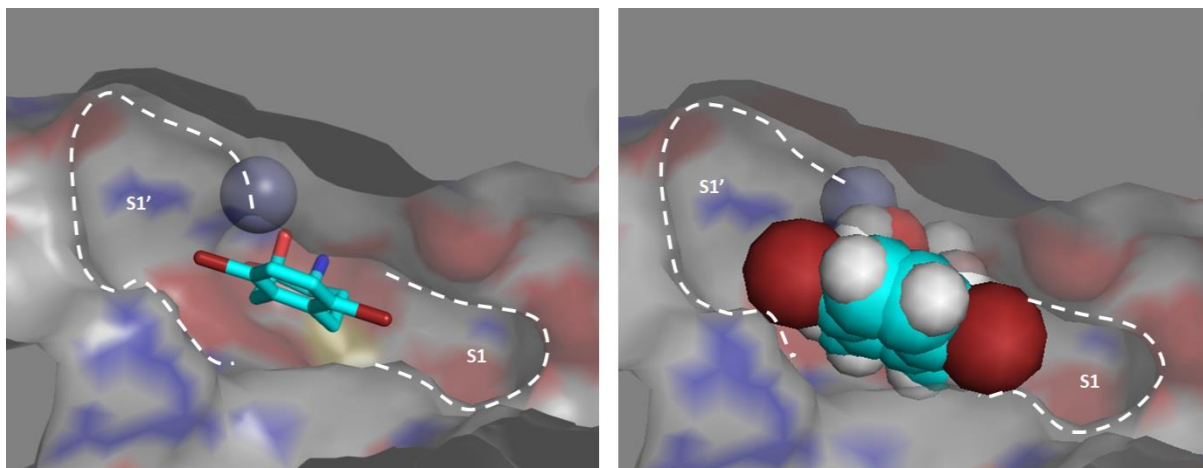


Figure 132 : interaction de l'analogue dibromé **130** avec les sous-sites S1' et S1 en modèle de bâtonnet et en modèle de sphères de van der waals

La superposition du complexe analogue dibromé **130**/*rPfA*-M1 avec le site actif de l'APN humaine (code PDB : 4FYT) nous renseigne sur le rôle déterminant de Phe896 dans l'amélioration de l'activité inhibitrice. (Figure 133) Dans l'APN de mammifère, Phe896 appartient à une boucle flexible formée de 8 résidus (891YGGGSFSF898) appartenant au domaine IV et qui restreint l'accès au sous-site S1. Dans ce cas S1 peut être considéré comme un sous-site petit et peu profond<sup>279</sup>. La plasticité de cette boucle peut contribuer à une interaction hydrophobe avec le brome et/ou une interaction de type  $\pi$ -halogène entre le brome et le noyau aromatique de Phe896.

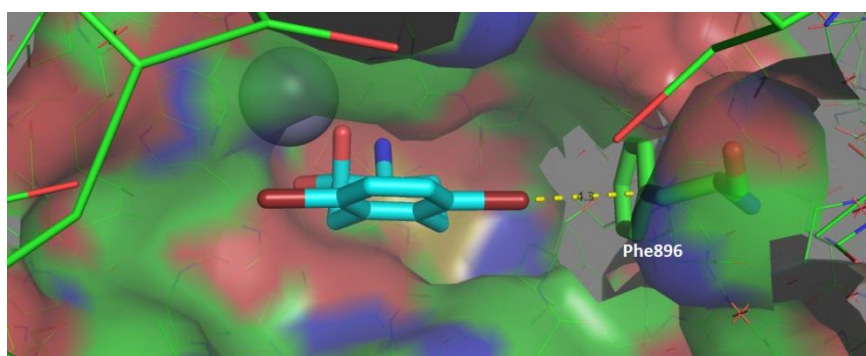


Figure 133 : Complexe *rPfA*-M1/**130** superposé avec l'APN humaine (code PDB : 4FYT)

L'importance de cette dynamique conformationnel de Phe896 peut également être illustrée par la différence d'activité inhibitrice entre le dérivé 1-bromo **11** (APN  $K_i = 19$  nM) et le dérivé 1-phényl **131** (APN  $K_i = 250$  nM). Cette activité est perdue lors du remplacement du brome par un groupement phényle **131** (groupe plus encombré stériquement). Cette perte d'affinité peut être due à un changement conformationnel de la boucle flexible 891–898, mouvement accompagné de pénalité énergétique très importante.

Il serait intéressant de faire des mesures ITC (titration calorimétrique isotherme) pour les deux analogues **11** et **131**. La détermination du transfert thermique durant la liaison permet une détermination précise des paramètres énergétiques (l'enthalpie  $\Delta H$ , l'entropie  $\Delta S$ ) ce qui permet de mieux comprendre la différence d'activité entre ces deux analogues.

<sup>279</sup> C. Santiago *et al.*, *Sci. Rep.* **2017**, 10, 46045-46059

Dans le cas de l'APN, il serait plus judicieux de chercher des interactions avec ce Phe896 dans sa conformation fermée que d'exploiter le sous-site S1.

Par ailleurs, nous supposons que l'enzyme, de par son activité catalytique, participe à la réaction d'hydratation du carbonyle pour générer *in situ* un mime de l'intermédiaire tétraédrique. En effet la proportion de la forme cétone par rapport à sa forme hydrate en solution aqueuse n'a pas d'influence majeur sur les valeurs de  $K_i$  dans le cas de l'APN de mammifère<sup>280</sup>. L'analogue **11** (20% sous forme hydratée) et l'analogue fluoré en position- $\alpha$  de la cétone **133** (85% sous forme hydratée) ont des activités inhibitrices quasi similaires. (**11**:  $K_i$  = 19 nM, **133**:  $K_i$  = 12 nM).

En revanche, l'analogue **133** a montré une amélioration de l'activité d'inhibition chez la sous-famille des oxytocinases par rapport à l'analogue **11**. (ERAP1, **11**:  $K_i$  = 56  $\mu$ M, **133**:  $K_i$  = 13  $\mu$ M). (ERAP2, **11**:  $K_i$  = 104  $\mu$ M, **133**:  $K_i$  = 1.7  $\mu$ M). (IRAP, **11**:  $K_i$  = 2.6  $\mu$ M, **133**:  $K_i$  = 0.13  $\mu$ M).

La flexibilité de la Tyrosine Tyr549/IRAP<sup>281</sup> Tyr438/ERAP1<sup>282</sup> (résidu stabilisant l'intermédiaire tétraédrique lors de l'hydrolyse enzymatique) entre la forme ouverte et la forme fermée peut influencer l'activité hydrolytique de cette sous-famille. Pour cela, favoriser la forme hydrate de nos analogues va permettre leur chélation sur l'ion zinc et améliorer leur affinité avec le site actif de l'enzyme.

### Etude SAR pour l'APN et PfA-M1

#### Discussion de l'activité inhibitrice des produits sur PfA-M1

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à explorer le sous site S1' de PfA-M1 en essayant de développer de nouvelles interactions dont notamment avec Glu526 (Figure 134). Parallèlement, nous avons réussi à obtenir des structures de six de nos ligands **10**, **86**, **93**, **104**, **108** et **130** dans le site actif de PfA-M1. L'élucidation des structures 3D ont été réalisées en collaboration entre notre laboratoire par Dr. Marjorie Schmidt et l'équipe du Dr. Jean Cavarelli (Dr. Alastair McEwen, Dr. Morgan Torchy et Pierre Poussin-Courmontagne) de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg). Ces structures permettent de mieux comprendre les interactions de nos ligands avec l'enzyme.

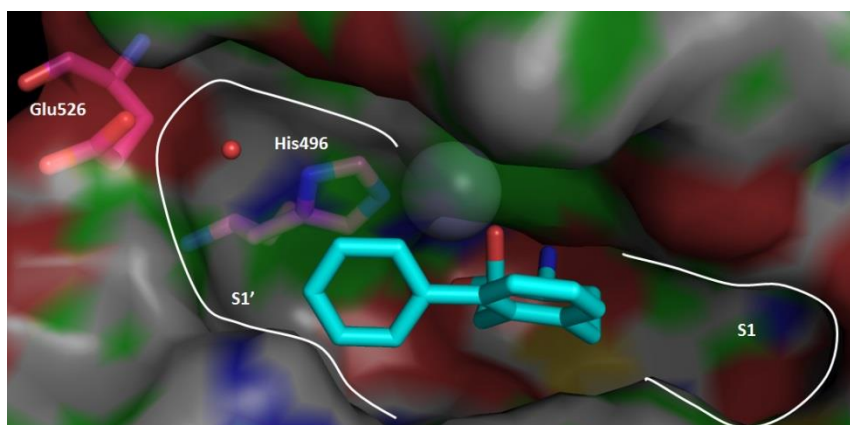


Figure 134 : Mode de liaison de l'analogue 4-phényl-aminobenzosubérone **10** dans le site actif de PfA-M1.

<sup>280</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 18, 4942–4953

<sup>281</sup> A. Mpakali *et al.*, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 2963–2972

<sup>282</sup> T.T. Nguyen *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 604–61

Dans la série phényle les analogues **10**, **86**, **92**, **93** et **94** ont montré des activités inhibitrices intéressantes sur *PfA*-M1. De plus, les structures obtenues avec les analogues **10**, **86** et **93** nous ont permis de mieux comprendre les interactions à l'intérieur du sous-site S1'.

La superposition des complexes des analogues 1,4-dibromé **130** et 4-phényl **10** montre que les deux analogues adoptent les mêmes interactions avec le site actif. Par contre, le noyau phényle en position 4 occupe le sous-site S1' formé par His496, Glu526, Val493, Thr492, Arg489 et Asp581. Le noyau phényle forme un angle de torsion de 54,5 ° et interagit avec His496 par une interaction de type  $\pi$ -stacking (3,6 Å).

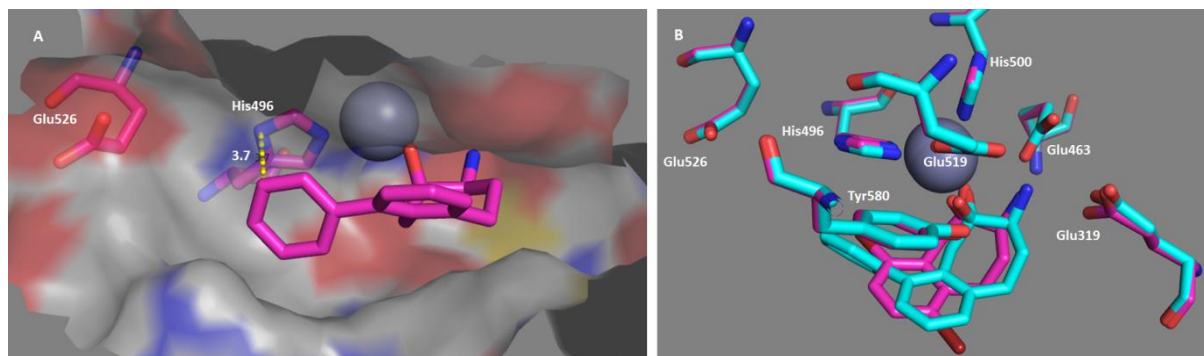


Figure 135 : A) occupation du sous-site S1' de *PfA*-M1 par le composé **10** .B) superposition des complexes analogues **130** et **10** dans le site actif de *PfA*-M1

La structure du *m*-aminocarbonyl-phényl **86** (*rPfA*-M1  $K_i$  = 40 nM) dans le site actif de *PfA*-M1 a révélé une interaction avec la molécule d'eau E1 (W9, C=O...H-O / 2,7 Å). Cette molécule d'eau est située entre His496 (NH...O-H / 2,8 Å) et Glu526 (C-O...H-O / 2,8Å). Cette fonction amide interagit également avec un réseau de molécules d'eau : E3 (W224, NH<sub>2</sub>...H-O / 2,8 Å) qui interagit à la fois avec Asp581 (C-O...H-O / 2,5 Å) et E2 (W456, O-H...O-H / 2,6 Å). Cette dernière est complexée par His543 (N...HO / 2,8 Å) et Asn527 (NH<sub>2</sub>...O / 3,2 Å) (Figure 136, A).

De façon surprenante, l'analogue benzylamine **93** ( $K_i$  = 90 nM) conçu pour gagner une interaction supplémentaire avec Glu526 est légèrement moins puissant que les composés 4-phényl **10** ( $K_i$  = 50 nM) ou *m*-aminocarbonyl phényl **86** ( $K_i$  = 40 nM). L'analyse du mode de liaison de l'analogue **93** dans le site actif de *rPfA*-M1 nous montre qu'il y aurait effectivement une interaction de type pont salin entre l'ion ammonium du groupe benzylamine et Glu526 (NH...C-O / 3,0 Å), ainsi qu'une liaison hydrogène avec la molécule d'eau E3 (W183, NH...OH / 3,0Å). Cette dernière interagissant également avec Asp581 (C-O...H-O / 2,5 Å) et une autre molécule d'eau E2 (W1044, O-H...O-H / 2,6 Å) maintenue dans le site actif par des liaisons hydrogène entre His543 (N...HO / 3,1 Å) et Asn527 (NH<sub>2</sub>...O / 2,9 Å). En revanche la molécule d'eau E1 n'est plus présente, elle a été déplacée lors de l'interaction entre l'ammonium du ligand et Glu526. D'ailleurs Glu526 s'est déplacé de façon à ce qu'un des oxygène du carboxylate occupe la place de cette molécule d'eau E1 et interagisse avec His496 (C-O...NH / 2,8 Å). (Figure 136, B)

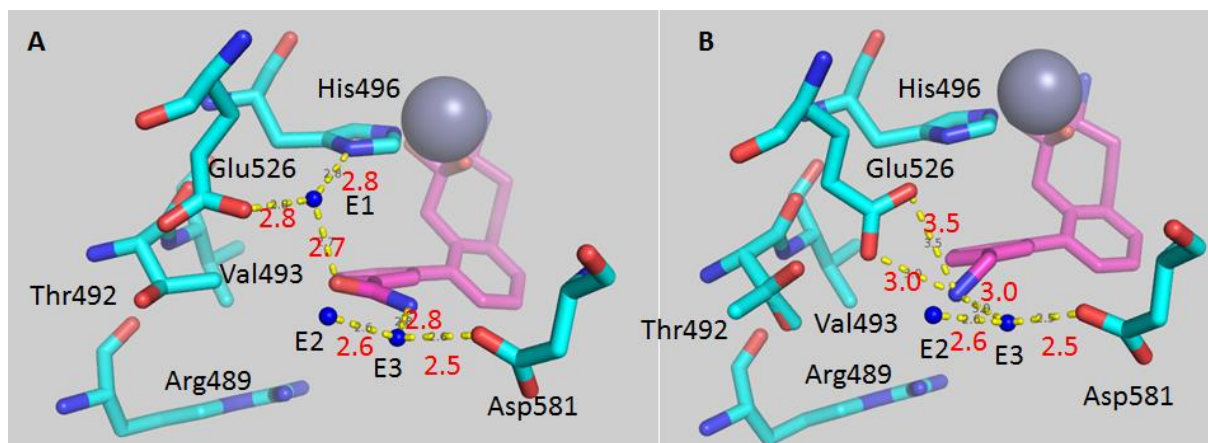


Figure 136 : Mode de liaison a) de l'analogue **86** et b) de l'analogue **93** dans le site actif de rPfA-M1. Interactions dans le sous-site S1'

Il est à noter que la superposition des complexes de rPfA-M1 avec l'analogue *m*-aminocarbonyl-phényl **86** et l'analogue benzylamine **93** montre que les molécules d'eau E2 et E3 sont localisées à des positions quasi similaires. (Figure 137)

Cette nouvelle interaction de type pont salin (enthalpiquement favorable et une des interactions non-covalentes les plus fortes, à contrebalancer avec une pénalité énergétique de désolvatation plus importante) et le déplacement d'une molécule d'eau (entropiquement favorable) aurait dû conduire à une amélioration de l'affinité du ligand **93** pour rPfA-M1. Comme le résultat inverse est observé, nous pouvons penser que la molécule d'eau E1 fait partie intégrante de la structure de la protéine et qu'il serait plus judicieux d'interagir avec cette molécule d'eau constitutive.

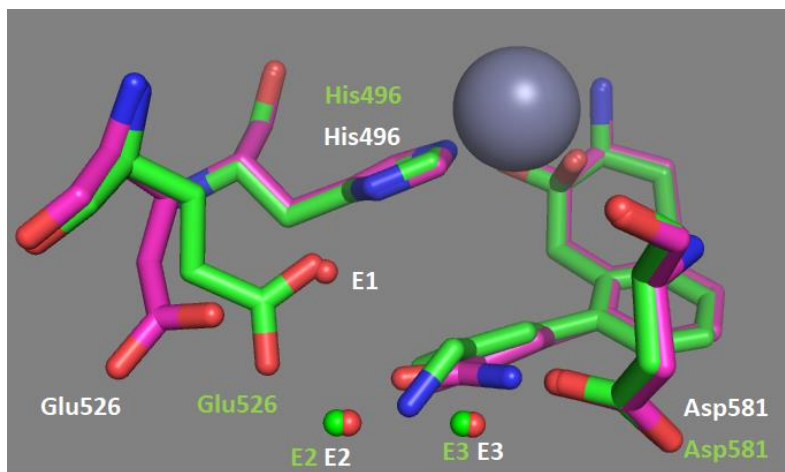


Figure 137 : Superposition des deux complexes rPfA-M1 avec l'analogues **86** et **93**

L'analogue amidoxime **92** ( $K_i = 50$  nM) semble conserver la même activité inhibitrice que l'analogue amide **86** ( $K_i = 40$  nM). Dans ce cas, l'interaction avec la molécule d'eau constitutive E1 pourrait être conservée. La méthylamide **91** ( $K_i = 0,18$   $\mu$ M) est moins active que la molécule parente **86**, certainement à cause de gêne stérique provoquée par le substituant méthyle de l'amide. Une autre possibilité pouvant expliquer cette augmentation du  $K_i$  serait liée à un possible déplacement de la molécule d'eau E3. L'analogue *m*-méthyle-ester-phényl **94** subit une plus forte perte d'activité inhibitrice ( $K_i = 0,4$   $\mu$ M). La modification amide-ester impacte essentiellement la capacité à former des liaisons H. En effet l'ester n'est plus donneur de liaison H et le carbonyle de l'ester est un

accepteur de liaison H plus faible que le carbonyle d'un amide (cf Echelle  $pK_{\text{BHX}}$  de basicité de liaison Hydrogène)<sup>283</sup>. Une liaison H moins puissante entre l'oxygène du carbonyle et la molécule d'eau E1 pourrait donc être la cause de cette augmentation de  $K_i$ .

Augmenter l'encombrement stérique avec une substitution de l'amide par un groupe cyclopropyle **87** n'est pas toléré ( $K_i = 0,4 \mu\text{M}$ ). Il en est de même avec le dérivé morpholine **84** ( $K_i = 2,2 \mu\text{M}$ )

La géométrie et les propriétés électroniques d'un sulfonamide sont différentes de celles d'un carboxamide, nous avons été intéressés à savoir comment cette substitution affecterait l'affinité. En effet, un arylsulfonamide adopte une géométrie très contrainte où les atomes d'oxygène du sulfonamide sont à  $45^\circ$  par rapport au plan de l'aromatique. De même le substituant azote est perpendiculaire au plan de cette aromatique. Par ailleurs, la fonction sulfonyl, considérée comme faiblement polaire, peut à la fois accepter des liaisons H (préférentiellement le long de l'axe S=O) et être un groupe hydrophobe (favorisant préférentiellement des interactions de van der Waals).<sup>284</sup> Expérimentalement, une perte d'activité inhibitrice est observée pour le sulfonamide **85** ( $K_i = 0,35 \mu\text{M}$ ).

En général, des substitutions en para ne sont pas tolérées. Le méthylamine en position *para* conduit à une perte d'activité (analogue **90**,  $K_i = 227 \text{ nM}$ ) qui peut être expliqué par une gêne stérique avec Glu526, Thr492 et Val493. De la même façon, la présence du groupement carboxamide en para (analogue **97**,  $IC_{50} = 5,7 \mu\text{M}$ ) a montré une activité inhibitrice modeste.

En série hétéroaromatique, l'introduction d'un ou plusieurs atomes d'azote, comme dans le 4-pyridinyl **100** ( $K_i = 0,27 \mu\text{M}$ ), le 3-pyridinyl **105** ( $K_i = 0,45 \mu\text{M}$ ), le 3,5-pyrimidinyl **115** ( $K_i = 0,18 \mu\text{M}$ ), le 2-pyrazinyl **119** ( $K_i = 0,93 \mu\text{M}$ ) ou le 4-pyridazinyl **120** ( $IC_{50} = 1,9 \mu\text{M}$ ) conduit à une perte d'activité inhibitrice ce qui peut être due à la nature hydrophobe de la cavité S1' et à des pénalités énergétiques de désolvatation importante. Il est à noter qu'à l'heure actuelle nous ne disposons que de l' $IC_{50}$  de l'analogue **120**. Des investigations sont en cours pour déterminer son  $K_i$ . Dans la série 4-pyridinyl, la substitution en position 2 **101** ( $K_i = 0,67 \mu\text{M}$ ) et **102** ( $K_i = 0,98 \mu\text{M}$ ) n'amène aucune amélioration de l'activité inhibitrice, à l'exception de l'analogue fluoré **103** ( $K_i = 0,17 \mu\text{M}$ ). Par contre, le dérivé 3-fluoro-4-pyridinyl **104** présente la meilleure activité inhibitrice pour PfA-M1 avec un  $K_i$  de 30 nM. Le mode de liaison de ce ligand dans le site actif du PfA-M1 (Figure 138) dévoile un angle de torsion du cycle 4-pyridinyl par rapport au noyau aromatique de la benzosubérone plus grand que celui des autres analogues de type aryle (composé **104**,  $63,5^\circ$  comparé aux valeurs de  $48,6^\circ$  pour **86**,  $49,9^\circ$  pour **93**,  $54,5^\circ$  pour **10** et  $54,6^\circ$  pour le dérivé **108**). Cette différence d'angle de torsion pourrait être expliquée par un certain nombre d'interactions entre l'atome de fluor ayant un caractère amphiphile et le domaine GAMEN via une probable interaction multipolaire orthogonale entre le fluor et le carbonyle de Gly460 (C-F...C=O /  $3,5 \text{ \AA}$ )<sup>279</sup>, des interactions polaires avec les NH du squelette peptidique (C-F...NH<sub>Gly460</sub> /  $3,1 \text{ \AA}$ , CF...NH<sub>Ala461</sub> /  $3,2 \text{ \AA}$ ) et un contact hydrophobe avec Gly460 (F...CH /  $3,1 \text{ \AA}$ )

<sup>283</sup> C. aurence *et al.*, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4073-4086

<sup>284</sup> C. Bissantz *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 5061-5084



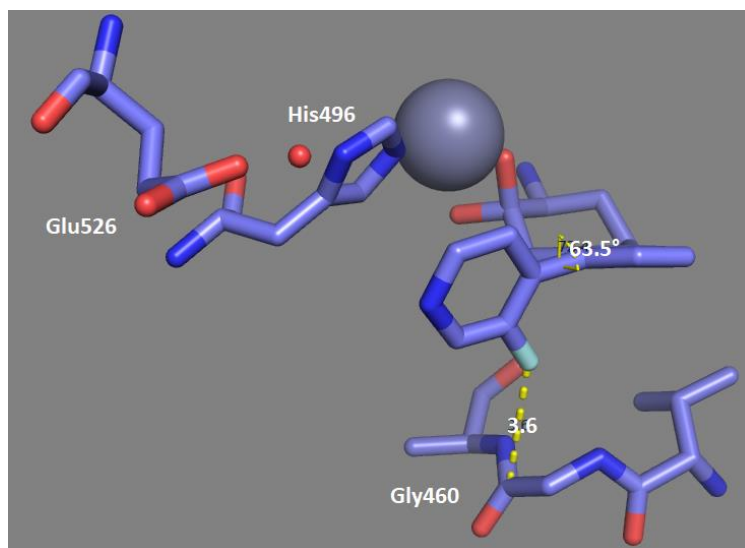


Figure 138 : Mode de liaison de l'analogue 104 dans le site actif de rPfA-M1

Dans la série des 3-pyridinyl **105**, **106**, **107**, **108**, **109** et **114** les composés **108** ( $K_i = 0,14 \mu\text{M}$ ), **109** ( $K_i = 0,26 \mu\text{M}$ ) et **114** ( $K_i = 0,11 \mu\text{M}$ ) ont montré une amélioration de l'activité inhibitrice par rapport au dérivé 3-pyridinyl **105** ( $K_i = 0,45 \mu\text{M}$ ). L'analyse du mode de liaison de l'aminopyridinyl **108** montre que nous sommes dans un cas similaire à celui de l'analogue **93** avec un repositionnement de Glu526 et départ de la molécule d'eau E1 suite à la formation d'une liaison hydrogène entre le substituant -NH<sub>2</sub> de l'aminopyridine et Glu526 (N-H...O-C / 3,2 Å). L'activité inhibitrice est également améliorée avec le 6-méthoxy-pyridinyl **114** ( $K_i = 0,11 \mu\text{M}$ ). Le groupe méthyle pourrait se loger dans un petit renflement du sous site-site S1', formé par les résidus Thr492, His493, Glu526 et Val523. Cette conformation *anti* bien précise serait énergétiquement favorisée (doublets non liants de l'atome d'oxygène orientés loin du doublet non liant de l'azote de la pyridine conduisant à un angle de torsion proche de 0°).<sup>285</sup> (Figure 139)

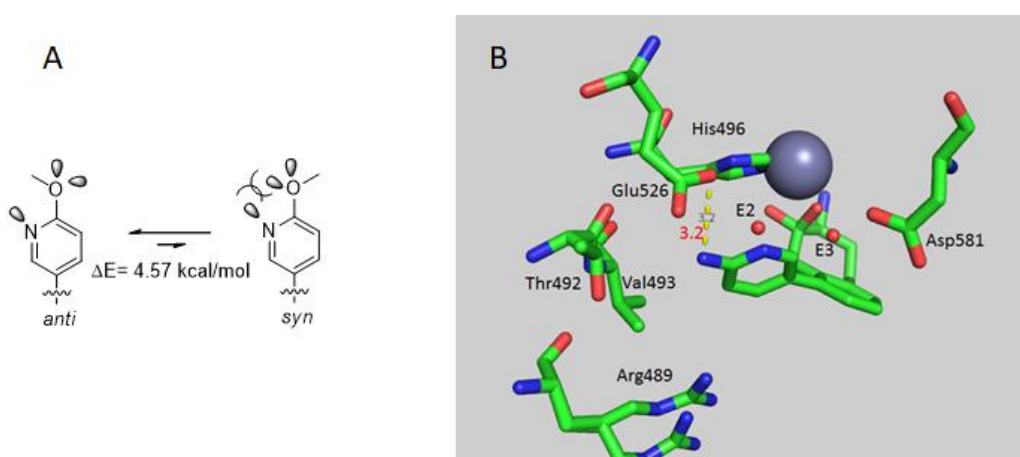


Figure 139 : A) les deux conformères *anti* et *syn* du 6-méthoxy-3- pyridinyl **114** ( $\Delta E = 4.57 \text{ kcal/mol}$ ).<sup>280</sup> B) co-cristal de l'analogue **108** dans le site actif de PfA-M1

Les analogues **110**, **111**, **112** et **113** essentiellement conçus pour cibler la sous-famille des oxytocinases n'ont présenté aucun gain d'activité inhibitrice sur PfA-M1

<sup>285</sup> N. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2529-2591

Dans la série des 5-pyrimidinyl **115** ( $K_i = 0,18 \mu\text{M}$ ), **116** ( $K_i = 0,59 \mu\text{M}$ ), **117** ( $K_i = 4,7 \mu\text{M}$ ), **118** ( $K_i = 1,0 \mu\text{M}$ ) aucune substitution n'a permis d'améliorer l'affinité.

La comparaison des activités inhibitrices entre la 6-amino-3-pyridinyl **108** ( $K_i = 0,14 \mu\text{M}$ ) et la 2-amino-5-pyrimidinyl **116** ( $K_i = 0,59 \mu\text{M}$ ) montre une perte d'activité d'un facteur 4. Cela peut être dû à l'augmentation de la polarité du noyau pyrimidine. Une observation similaire est constatée pour l'analogue 2-méthoxy-5-pyrimidinyl **118** ( $K_i = 1,0 \mu\text{M}$ ) avec une perte d'activité inhibitrice d'un facteur 9 comparé à l'aminopyridinyl **114**. Cette perte pourrait également s'expliquer par une polarité trop importante, un coût énergétique de désolvatation plus élevé mais également par une plus grande flexibilité du groupe méthoxy pouvant conduire à une gêne stérique avec Thr492 et Val493.

Le remplacement du cycle benzénique par des hétérocycles à 5 chaînons comme avec un pyrazole (**124**,  $K_i = 1,9 \mu\text{M}$  ; **123**,  $K_i = 0,43 \mu\text{M}$ ) ou un groupe isoxazole (**122**,  $\text{IC}_{50} = 68 \mu\text{M}$ ) n'a rien donné de prometteur.

A partir de ces résultats, afin d'exploiter à la fois les interactions avec Glu526 ou avec la molécule d'eau E1 et les interactions entre le substituant fluor et le domaine GAMEN, nous avons envisagé deux autres analogues, le dérivé 5-carboxamide-2-fluorophényle **96** et l'analogue 5-aminométhyl-2-fluorophényle **134** (Figure 140). Seul le composé **96** a pu être synthétisé. Il a cependant conduit à une activité inhibitrice décevante ( $\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ , la détermination du  $K_i$  est en cours d'investigation). Cela peut être expliqué par un angle de torsion inadapté entre les deux aromatiques ne permettant pas de développer l'une ou les deux interactions recherchées. Le composé **134** s'est avéré plus délicat à obtenir et nécessite de plus amples expérimentations.

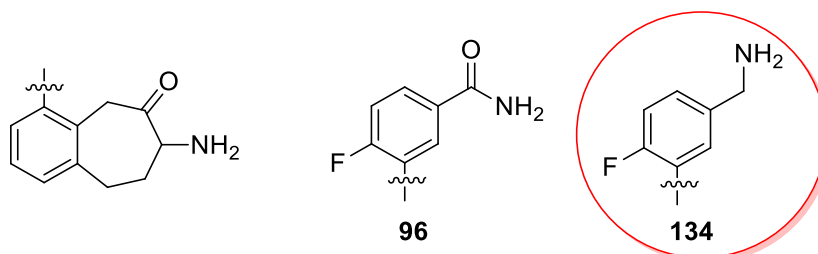


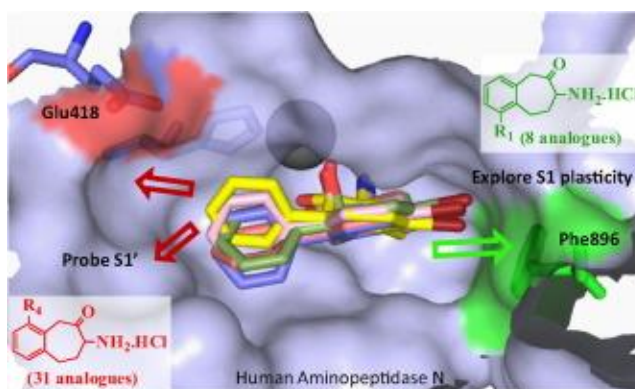
Figure 140 : analogues envisagés pour tester sur PfA-M1

Des études ultérieures d'inhibition de la croissance de *Plasmodium* ont été réalisées en collaboration avec Prof. I. Florent et Dr. L. Bounaadja (post doctorant) au Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France). Parallèlement la détermination de certaines propriétés ADME *in vitro* et des études pharmacocinétiques *in vivo* ont été expérimentés chez TechMed<sup>LL</sup> (ESBS Illkirch, France). (À détailler dans la suite de ce chapitre).

#### Discussion de l'activité des produits sur l'APN

Ces différentes molécules de type aminobenzocycloheptènone ayant initialement été conçues pour cibler l'APN, elles ont présenté des activités inhibitrices sur l'APN très intéressantes dont une partie est décrit dans la publication :

“Exploring S1 plasticity and probing S1' subsite of mammalian Aminopeptidase N/CD13 with highly potent and selective aminobenzosuberone inhibitors” Revelant, Germain; Al-Lakkis-Wehbe, mira; Schmitt, Marjorie; Alavi, Sarah; Schmitt, Céline; Roux, Lionel; Al-Masri, Mounir; Schifano-Faux, Nadège; Maieranu, Carmen; Tarnus, Céline; Albrecht, Sébastien *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3192-3207.



La publication se trouve en partie annexe

La méthylamide **91** ( $K_i = 0,03 \mu\text{M}$ ) et l'analogue amidoxime **92** ( $K_i = 0,05 \mu\text{M}$ ) ont montré une perte d'activité par rapport à la molécule parente **86** probablement due à la gêne stérique provoquée avec le Glu418. De la même façon, l'analogue *m*-méthyle-ester-phényl **94** a révélé une forte perte d'activité inhibitrice ( $K_i = 1,3 \mu\text{M}$ ) certainement à cause de l'impact de la modification amide-ester sur la formation des liaisons hydrogènes (détaillé précédemment). La présence du groupement carboxamide en para (analogue **97**,  $\text{IC}_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ ) n'est pas toléré et a montré une modeste activité inhibitrice. (Figure 141)

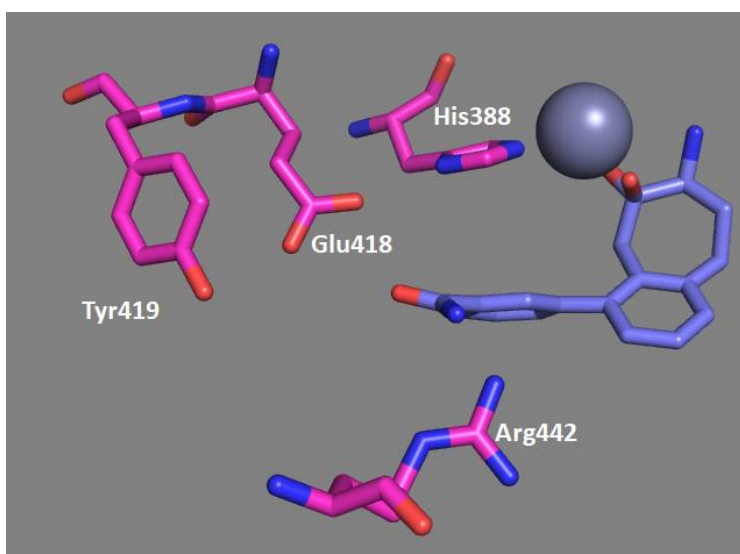


Figure 141 : superposition du complexe analogue aminocarbonyl 86/(PFA-M1)- sur l'APN humain (PDB : 4FYT)

Le *m*-aminocarbonyl-*p*-fluoro-phényle **96** a montré une activité inhibitrice modérée ( $\text{IC}_{50} = 0,77 \mu\text{M}$ , la détermination du  $K_i$  est en cours d'investigation). Ce qui pourrait être expliqué par un angle de torsion, entre les deux aromatiques, inadapté ne permettant pas de développer l'une ou les deux interactions recherchées (avec la molécule d'eau E1 et entre le substituant fluor et le domaine GAMEN).

Les analogues **98**, **99**, **111**, **112**, **113**, **121**, et **122** essentiellement conçus pour cibler la sous-famille des oxytocinases n'ont présenté aucun gain d'activité inhibitrice sur l'APN.



En série hétéroaromatique, l'activité inhibitrice modérée du 4-pyridazinyl **120** ( $IC_{50} = 0,5 \mu M$ ) peut être expliquée par la nature hydrophobe de la cavité S1' et des pénalités énergétiques de désolvatation importante.

#### *Etude SAR de la famille des oxytocinases (ERAP1, ERAP2 et IRAP)*

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à exploiter le sous-site S1' de chacune de ces enzymes en essayant de développer des nouvelles interactions avec notamment (Lys380 et Glu383 chez ERAP1, Lys397 et Glu400 chez IRAP2 et Glu494 chez IRAP). Ainsi, en profitant de la variabilité du sous-site S1' entre ces trois enzymes (en largeur et en profondeur) comme facteur de sélectivité. (Figure 142).

Cette variabilité de volume est due à l'influence de certains résidus à l'intérieur de cette cavité. Chez ERAP1, le sous-site S1' apparaît comme une poche profonde et étroite due à la présence du Lys380 qui la resserre. La Lys397 chez ERAP2 est plus espacé que la Lys380 (ERAP1) mais la présence d'Arg366 rétrécit cette cavité, S1' apparaît chez ERAP2 comme une cavité large mais peu profonde. Par contre, chez IRAP cette cavité S1' paraît plus large et plus profonde (Lys380 et Lys397 sont remplacés par Thr491 chez IRAP).

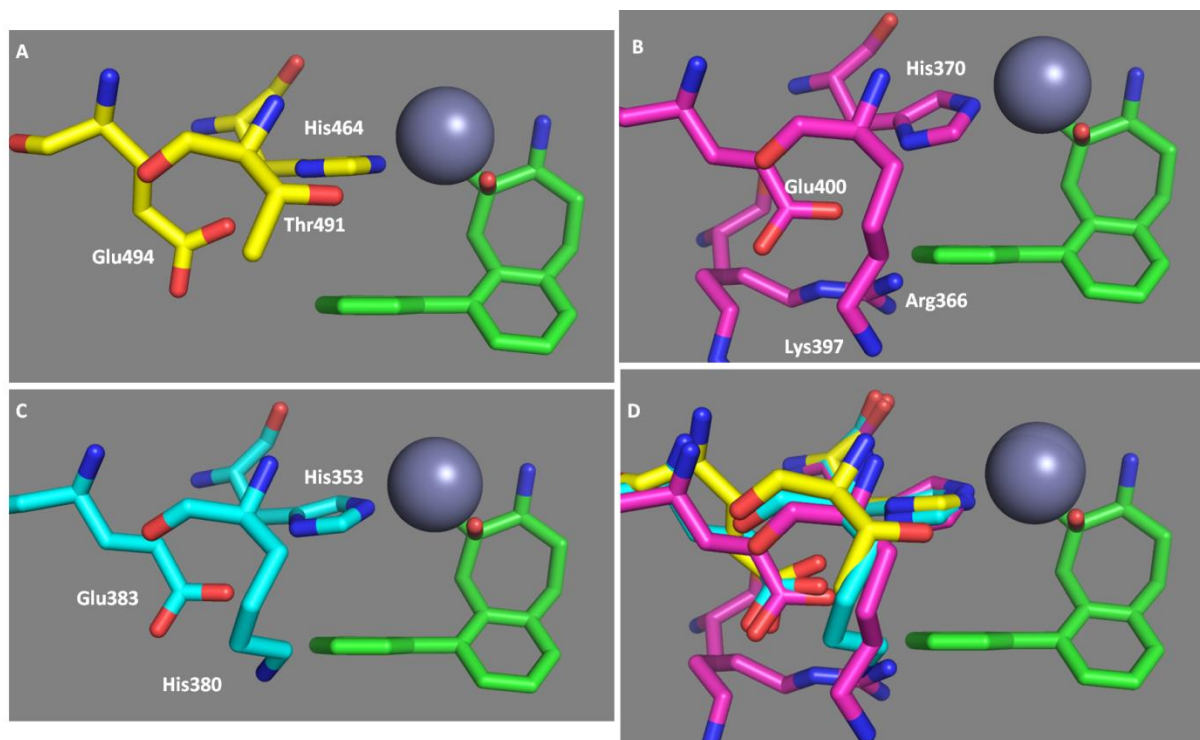


Figure 142 : sous-site S1' chez la sous-famille des oxytocinase. A- IRAP (PDB : 4Z7I). B- ERAP2 (PDB : 4E36). C- ERAP1 (PDB : 2YDO) conformation fermé. D- ERAP1 en bleu, ERAP2 en rose et IRAP en Jaune (les codes PDB sont les mêmes cités précédemment en parties A, B et C.

#### Discussion de l'activité des produits sur ERAP1

Dans la série phényl, seul le *m*-chloro-*p*-hydroxy-phényl **95** ( $IC_{50} = 17 \mu M$ ) montre une activité sur ERAP1 avec une amélioration d'un facteur 4 par rapport à la molécule parente **10** ( $IC_{50} = 63 \mu M$ ) probablement due à des interactions de types liaison hydrogène avec Glu383. L'encombrement stérique en méta des autres analogues n'a conduit à aucune activité inhibitrice ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ) sur cet enzyme.

Dans la série 4-pyridyl, la substitution en méta des analogues 2-méthoxy-4-pyridinyl **102** et 2-fluoro-4-pyridinyl **103** montrent une perte d'activité sur ERAP1 ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ). Cependant, le 3-fluoro-4-pyridinyl **104** ( $IC_{50} = 8,1 \mu M$ ) révèle une amélioration d'activité d'un facteur 8 par rapport au 4-phényl **10** ce qui est expliqué par des interactions multipolaires orthogonales entre le fluor et le domaine GAMEN.

Le 3-pyridinyl **105** ( $IC_{50} = 7,6 \mu M$ ) présente une amélioration d'activité d'un facteur 8 par rapport au 4-phényl **10** ce qui pourrait être due à des interactions de type liaison hydrogène avec Lys380. Le 3-*p*-méthyle-pyridinyl **106** ( $IC_{50} = 1,3 \mu M$ ) est plus actif que la molécule parente 3-pyridinyl **105** d'un facteur 7. Cette amélioration résulte probablement d'interactions hydrophobes à l'intérieur du sous-site S1'. Le composé **106** est le composé le plus puissant sur ERAP1 parmi tous les analogues testés sur cet enzyme.

Les analogues 6-méthylamine-pyridinyl **111** ( $IC_{50} = 4,6 \mu M$ ) et 2-amino-5-pyridinyl **108** ( $IC_{50} = 3,4 \mu M$ ) montre une activité similaire sur ERAP1 ce qui est probablement due à des interactions de type liaison hydrogène avec Glu383. Cette activité est réduite avec le 4-acétamide-pyridinyl **112** ( $IC_{50} = 31 \mu M$ ) et avec le 6-méthoxy-pyridinyl **114** ( $IC_{50} = 36 \mu M$ ). Cela montre l'importance d'un groupe donneur de liaison hydrogène à cette position. De la même façon que précédemment, l'encombrement stérique en méta des analogues 4-amine-5-méthyle-pyridinyl **110** et 5-amine-4-méthoxy-3-pyridinyl **113** est à l'origine de cette non activité inhibitrice sur ERAP1 ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ).

Dans la série 3,5 pyrimidinyl, la comparaison des composés 2-amino-5-pyrimidinyl **116** ( $IC_{50} = 4,7 \mu M$ ) et 2-amino-5-pyridinyl **108** ( $IC_{50} = 3,4 \mu M$ ) ont montré une activité comparable ce qui suggère que l'augmentation de la polarité du noyau pyrimidine n'a pas d'influence sur l'activité de ces composés. Par contre, le gêne stérique provoqué par les groupements méthoxy et diméthylamine des analogues 2-méthoxy-5-pyrimidinyl **118** et 2-diméthylamine-5-pyrimidinyl **117** ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ) avec Glu383 mène à une perte d'activité sur cette enzyme ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ).

Le noyau 4-pyridazinyl **120** ( $IC_{50} = 8,4 \mu M$ ) a révélé une activité similaire au 3-pyridinyl **105** ( $IC_{50} = 7,6 \mu M$ ). Cependant la répulsion électrostatique entre le composé **121** et le Glu383 pourrait expliquer la non activité de cet analogue ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ).

#### Discussion de l'activité des produits sur ERAP2

Dans la série phényl, les analogues **86**, **91**, **92** et **98** n'ont montré aucune activité inhibitrice sur ERAP2 ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ), certainement à cause de gêne stérique provoquée par les substituants en *mé*ta et Lys397 et/ou Arg366. Cette gêne stérique explique probablement la faible activité inhibitrice de la méthylamine **93** ( $IC_{50} = 113 \mu M$ ).

Les analogues *m*-chloro-*p*-hydroxy-phényl **95** ( $IC_{50} = 7,4 \mu M$ ) et *p*-aminocarbonyl-phényl **97** ( $IC_{50} = 12 \mu M$ ) ont montré la meilleure activité inhibitrice dans cette série probablement via des interactions de type liaison hydrogène avec Glu400 et/ou Arg366.

Le composé 3-fluoro-4-pyridinyl **104** présente la meilleure activité inhibitrice dans la série 4-pyridinyl ( $IC_{50} = 4,4 \mu M$ ) ce qui est due à des interactions multipolaires orthogonales entre le fluor et le domaine GAMEN. Cependant, la substitution en méta des composés 2-méthoxy-4-pyridinyl **102** et 2-fluoro-4-pyridinyl **103** est plus tolérée chez ERAP2 qu'ERAP1.

Le 3-pyridinyl **105** ( $IC_{50} = 4,0 \mu M$ ) présente une amélioration d'activité d'un facteur 4 par rapport au composé **10** ( $IC_{50} = 18 \mu M$ ) ce qui pourrait être dû à des interactions de type liaison hydrogène avec Lys397. Le 3-*p*-méthyle-pyridinyl **106** ( $IC_{50} = 1,1 \mu M$ ) est plus active que la molécule parente 3-pyridinyl **105** d'un facteur 4. Cette amélioration est probablement résultante des interactions hydrophobes à l'intérieur du sous-site S1'. Cependant, le composé **106** est le composé le plus puissant sur ERAP2 parmi tous les analogues testés sur cet enzyme.

La différence d'activité entre les composés 6-méthoxy-pyridinyl **114** ( $IC_{50} = 4,3 \mu M$ ) et 6-méthylamine-pyridinyl **111** ( $IC_{50} = 9,0 \mu M$ ) peut être expliqué par l'inflexibilité du groupement méthoxy en position para, le méthoxy adopte une conformation *anti* bien précise est énergétiquement favorisée (détaillé précédemment) alors que le méthylamine est plus flexible ce qui peut mener à une gêne stérique entre le groupement méthylamine et le Glu400 et/ou Arg397. L'insertion d'une amine en méta pour le composé 5-amine-4-méthoxy-3-pyridinyl **113** ( $IC_{50} = 17 \mu M$ ) conduit à une perte d'activité par rapport à l'analogue 6-méthoxy-pyridinyl **114** ce qui est probablement dû à des pénalités énergétiques de désolvatation. Par contre, l'insertion d'un méthyle en méta pour le composé 4-amine-5-méthyle-pyridinyl **110** ( $IC_{50} = 7,5 \mu M$ ) conduit à une amélioration de l'activité inhibitrice par rapport à l'analogue 2-amino-5-pyridinyl **108** ( $IC_{50} = 14 \mu M$ ). Cependant, la non activité de 4-acétamide-pyridinyl **112** ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ) est certainement dû à la gêne stérique provoqué par l'acétamide et le Glu400 et/ou Arg366.

Dans la série 3,5 pyrimidinyl, l'augmentation de la polarité du noyau 2-amino-5-pyrimidinyl **116** ( $IC_{50} = 5,9 \mu M$ ) révèle une amélioration d'activité inhibitrice par rapport à l'analogue 2-amino-5-pyridinyl **108** ( $IC_{50} = 14 \mu M$ ). Par contre, le gêne stérique provoquée par les groupements méthoxy et diméthylamine des analogues 2-méthoxy-5-pyrimidinyl **118** et 2-diméthylamine-5-pyrimidinyl **117** ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ) avec Glu400 et/ou Arg366 mène à une perte d'activité inhibitrice sur cette enzyme ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ). À noter que le groupement méthoxy de l'analogue **118** est plus flexible que dans le cas du 6-méthoxy-pyridinyl **114**.

Le noyau 4-pyridazinyl **120** ( $IC_{50} = 3,2 \mu M$ ) a révélé une activité similaire au 3-pyridinyl **105** ( $IC_{50} = 4,0 \mu M$ ). Cependant, la perte d'activité inhibitrice pour le 4-acétamide-pyridinyl **112** ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ) est certainement due par une gêne stérique provoqué par le groupe acétamide et Arg366.

#### Discussion de l'activité des produits sur IRAP

Dans la série phényl, Le *m*-chloro-*p*-hydroxy-phényl **95** ( $IC_{50} = 0,48 \mu M$ ) est la molécule la plus puissante avec une amélioration d'activité d'un facteur de 6 par rapport à la molécule parente **10** ( $IC_{50} = 2,4 \mu M$ ).

Des interactions de type hydrogène avec le Glu494 pourrait expliquer l'amélioration d'activité inhibitrice du composé *m*-aminocarbonyl **86** ( $IC_{50} = 1,3 \mu M$ ).

Le composé 3-fluoro-4-pyridinyl **104** présente la meilleure activité inhibitrice dans la série 4-pyridinyl ( $IC_{50} = 0,2 \mu M$ ) ce qui est due à des interactions multipolaire orthogonale entre le fluor et le domaine GAMEN. Ce composé est un des composés les plus puissants sur IRAP parmi tous les analogues testés.

Dans la série 3-pyridinyl, le 3-*p*-méthyle-pyridinyl **106** ( $IC_{50} = 1.1 \mu M$ ) a montré une amélioration d'activité par rapport à la molécule parente 3-pyridinyl **105** d'un facteur 4. La comparaison des

activités inhibitrices des composés 6-méthoxy-pyridinyl **114** ( $IC_{50} = 1,2 \mu M$ ) et 6-méthylamine-pyridinyl **111** ( $IC_{50} = 0,12 \mu M$ ) montre l'importance de l'azote en para comme donneur de liaison hydrogène. Par conséquent, l'activité du composé **111** est certainement dû à des interactions de type liaison hydrogène avec Glu494. Ainsi, la perte d'activité du 4-acétamide-pyridinyl **112** ( $IC_{50} = 9,1 \mu M$ ) est probablement due à la présence d'un groupe électroattracteur sur l'amine ce qui impact la capacité à former des liaisons hydrogène. L'insertion d'une amine en méta pour le composé 5-amine-4-méthoxy-3-pyridinyl **113** ( $IC_{50} = 12 \mu M$ ) conduit à une perte d'activité par rapport à l'analogue 6-méthoxy-pyridinyl **114** ce qui pourrait être due à des pénalités énergétiques de désolvatation. Or, l'insertion d'un méthyle en méta pour le composé 4-amine-5-méthyle-pyridinyl **110** ( $IC_{50} = 6,5 \mu M$ ) amène à une perte d'activité par rapport à l'analogue 2-amino-5-pyridinyl **108** ( $IC_{50} = 0,6 \mu M$ ).

Dans la série 3, 5-pyrimidinyl, l'analogue 2-méthoxy-5-pyrimidinyl **118** ( $IC_{50} = 15 \mu M$ ) a révélé une perte d'activité inhibitrice d'un facteur 13 comparé au 6-méthoxy-pyridinyl **114**. Cette perte d'activité inhibitrice pourrait s'expliquer par une plus grande flexibilité du groupe méthoxy pouvant conduire à une gêne stérique avec Glu494.

### Activité antipaludique in cellulo

L'inhibition de la croissance de deux souches de *Plasmodium falciparum* (3D7, sensible à la chloroquine et FcB1, résistante à la chloroquine) par nos différents analogues donne des résultats intéressants avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du µM. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour la bestatine et aux différents produits décrits dans la littérature. La meilleure inhibition est obtenue pour le composé **93** (FcB1 IC<sub>50</sub> = 1,1 µM et 3D7 IC<sub>50</sub> = 3,9 µM). En outre, la cytotoxicité de ces analogues a été évaluée sur des cellules L6 (ligné de cellules de muscle squelettique des rats) ou sur des cellules Vero (lignée de cellule épithéliale du rein de singe vert africain) (Tableau 34).

Composé		Evaluation <i>In vitro</i> / <i>In cellulo</i>			
		K <sub>i</sub> (µM) PfA-M1	IC <sub>50</sub> (µM) FcB1	CC <sub>50</sub> (µM) 3D7	IC <sub>50</sub> (µM) L6/Vero*
<b>Bestatine</b>		0.1–1.5	9.0 ± 2.1 (n=7)	8.2 ± 1.9 (n=7)	> 300
<b>8</b>	aminobenzosuberone	15	57.3±7.4 (n=4)	64.4±10.7 (n=3)	129*
<b>10</b>	4-phenyl	0.05	6.5 ± 2.4 (n=7)	11.2 ± 3.4 (n=5)	141.0 ± 12.1
<b>11</b>	1-bromo	1	17.0±4.0 (n=5)	17.9±4.9 (n=3)	21*
<b>12</b>	1-bromo-4-phenyl	0.03	33.9±9.9 (n=6)	20.3±11.5 (n=5)	26*
<b>76</b>	4-bromo	0.06	22.0 ± 9.4 (n=6)	37.3 ± 6.0 (n=3)	21.3*
<b>84</b>	4-( <i>m</i> -morpholino-phenyl)	2.2	30.5 ± 3.3 (n=3)	26.4 ± 2.2 (n=3)	> 200
<b>85</b>	4-( <i>m</i> -aminosulfonyl-phenyl)	0.35	39.9 ± 4.2 (n=3)	25.1 ± 5.7 (n=3)	42.1 ± 9.1
<b>86</b>	4-( <i>m</i> -aminocarbonyl-phenyl)	0.04	13.91 ± 3.3 (n=8)	18.31 ± 6.6 (n=8)	47.0 ± 7.4
<b>87</b>	4-( <i>m</i> -cyclopropylamino carbonyl-phenyl)	0.4	28.9 ± 0.4 (n=3)	25.0 ± 2.0 (n=3)	> 200
<b>91</b>	4-( <i>m</i> -methylamino carbonyl-phenyl)	0.18	24.4 ± 6.0 (n=4)	42.1 ± 3.9 (n=5)	76.0 ± 7.6
<b>92</b>	4-( <i>m</i> -hydroxyamidino-phenyl)	0.05	7.4 ± 4.2 (n=4)	32.1 ± 2.6 (n=4)	54.6 ± 5.8
<b>93</b>	4-( <i>m</i> -methylamine-phenyl)	0.09	1.1 ± 0.3 (n=4)	3.9 ± 1.0 (n=6)	34.4 ± 5.4

Composés		Evaluation <i>In vitro</i> / <i>In cellulo</i>			
		$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
		<i>PfA</i> -M1	FcB1	3D7	L6/Vero*
100	4-(4-pyridyl)	0.27	9.3 ± 1.1 (n=3)	22.9 ± 4.3 (n=3)	82.9 ± 13.6
101	4-(2-methyl-4-pyridyl)	0.67	13.2 ± 4.4 (n=6)	24.8 ± 8.4 (n=4)	65.8 ± 6.7
102	4-(2-methoxy-4-pyridyl)	0.98	30.6 ± 4.8 (n=3)	24.5 ± 0.2 (n=3)	95.7 ± 7.4
103	4-(2-fluoro-4-pyridyl)	0.17	3.25 ± 1.1 (n=4)	20.3 ± 2.4 (n=4)	> 200
104	4-(3-fluoro-4pyridyl)	0.03	8.0 ± 3.9 (n=7)	29.0 ± 7.8 (n=5)	51.5 ± 7.8
105	4-(3-pyridyl)	0.45	6.0 ± 0.1 (n=3)	10.4 ± 1.1 (n=3)	75.4 ± 9.8
106	4-(6-methyl-3-pyridyl)	0.6	21.4 ± 8.4 (n=4)	42.0 ± 1.8 (n=5)	96.2 ± 2.5
107	4-(6-difluoromethoxy-3-pyridyl)	25 <sup>a</sup>	13.2 ± 2.3 (n=4)	18.7 ± 2.4 (n=4)	93.3 ± 13.8
108	4-(6-amino-3-pyridyl)	0.14	11.0 ± 3.2 (n=6)	21.0 ± 11.5 (n=6)	41.1 ± 10.6
109	4-(2-methoxy-3-pyridyl)	0.26	23.6 ± 2.7 (n=3)	40.7 ± 2.1 (n=3)	> 200
114	4-(6-methoxy-3-pyridyl)	0.11	14.6 ± 0.9 (n=3)	27.9 ± 6.3 (n=3)	117.9 ± 27.3
115	4-(5-pyrimidyl)	0.18	6.7 ± 1.5 (n=6)	13.1 ± 3.4 (n=8)	64.2 ± 2.1
116	4-(2-methyl-5-pyrimidyl)	0.59	7.0 ± 1.1 (n=8)	7.6 ± 3.4 (n=8)	35.6 ± 2.8
117	4-(2-dimethylamine-5-pyrimidyl)	4.7	15.3 ± 9.1 (n=6)	23.1 ± 0.5 (n=4)	159.6 ± 32.0
118	4-(2-methoxy-5-pyrimidyl)	1.0	17.1 ± 7.7 (n=6)	24.9 ± 2.2 (n=6)	77.0 ± 16.6
119	4-(pyrazine)	0.93	38.4 ± 17.1 (n=4)	71.6 ± 5.4 (n=5)	> 200
130	1,4 dibromo	0.005	19.6±3.5 (n=5)	29.7±15.1 (n=5)	90*
131	1-(phenyl)	2	3.1±1.0 (n=5)	3.5±1.8 (n=3)	33*

Tableau 34 : évaluation *in cellulo* des dérivés d'aminobenzosubérone sur des souches de *Plasmodium falciparum* 3D7 et FcB1 (résistante à la chloroquine) et cytotoxicité sur des cellules Véro ou L6. n correspond au nombre de répliques a) IC<sub>50</sub> (μM).

Il est à noter qu'il existe plusieurs ordres de grandeur de différence entre les valeurs de K<sub>i</sub> sur PfA-M1 et celles des IC<sub>50</sub> de l'inhibition de la croissance du parasite *in vitro*. Cette situation est couramment rencontrée lors de la conception d'inhibiteurs via l'approche dite « target-based ». En effet les inhibiteurs doivent passer au travers de plusieurs barrières biologiques avant d'atteindre leur cible, réduisant ainsi considérablement l'activité inhibitrice des molécules.

Par ailleurs, les résultats obtenus *in cellulo* n'était pas tout à fait cohérents avec les résultats obtenus *in vitro*. Les analogues **76** et **130** ont montré des activités *in vitro* de l'ordre de nanomolaire (K<sub>i</sub> = 50 et 5 nM), Or, leurs activités d'inhibition de la croissance parasitaire sont plus faibles que les analogues **100** et **105** (K<sub>i</sub> = 270 et 450 nM). Ceci peut être dus à plusieurs facteurs : la solubilité de nos composés dans les conditions des tests *in cellulo*, la pénétration dans les globules rouges et dans le parasite ainsi que d'éventuelle complexation à des composés des globules rouges (comme l'anhydrase carbonique, métalloprotéase à zinc présente dans les globules rouges à forte concentration (le total des isoformes représenterait environs 150 μM).

Les analogues 1-bromo **11** et 1-phényl **131** ont montré des activités proches *in vitro* (K<sub>i</sub> = 1 et 2 μM).

Or, l'activité d'inhibition de la croissance parasitaire de l'analogue **131** est meilleure que celle de l'analogue **11** d'un facteur 6ll se pourrait que l'activité du composé 1-phényl **131** soit due à des effets sur d'autres cibles que la cible principale visée (effet off-target).

La différence d'activité inhibitrice des molécules entre les tests *in vitro* et *in cellulo* n'est pas surprenante. Dans les tests *in vitro* les molécules sont évaluées avec des enzymes recombinantes, ces tests donnent une idée de l'activité inhibitrice de molécules et permettent leurs optimisations afin d'améliorer l'affinité pour la cible donnée. Dans les tests *in cellulo*, les molécules sont en face d'un système biologique. Ces tests permettent d'avoir une idée des propriétés de ces molécules et permettent leur modification pour avoir un meilleur Lead. En fait, les deux voies sont complémentaires et permettent l'optimisation hit-to-lead avec un faible risque d'échec à des stades avancés du développement d'un candidat médicament<sup>286</sup>.

---

<sup>286</sup> H. van de Wterbeemd et al., *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1313-1333

### Etude des propriétés pharmacocinétiques *in vitro*

Les propriétés ADME *in vitro* ont été réalisées par TechMed<sup>ILL</sup> (ESBS Illkirch, France) sur certaines de nos molécules. (Tableau 35)

Composé		Propriétés pharmacocinétiques				
		Solubilité cinétique ( $\mu\text{M}$ )	log D	Taux de liaison aux protéines plasmatiques humaines (fraction liée, %)	PAMPA log Pe (cm/s)	CL <sub>int</sub> ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protéine)
10	4-(phenyl)	151 $\pm$ 1	2,51	83%	-5,11	18
86	4-( <i>m</i> -aminocarbonyl-phenyl)	> 200	1,21	59%	-6,22	< 1
92	4-( <i>m</i> -hydroxy amidino -phenyl)	75 $\pm$ 2	-	-	-	2
93	4-( <i>m</i> -methylamine-phenyl)	89 $\pm$ 4	-	22%	-6,2	1,2
100	4-(4-pyridyl)	> 200	-	-	-	-
104	4-(3-fluoro-4-pyridyl)	58 $\pm$ 0	-	39%	-5,26	16
105	4-(3-pyridyl)	> 200	1,29	-	-	-
115	4-(5-pyrimidyl)	> 200	0,78	-	-	-
116	4-(2-methy-5-pyrimidyl)	> 200	nd	28%	-6,29	19

Tableau 35 : Propriétés ADME des analogues sélectionnés testés à pH 7,4 et à une température de 37°C). nd valeurs expérimentalement non détecté dans les conditions chromatographiques.

La solubilité cinétique (la solubilité cinétique est définie comme la concentration où le composé précipite lors de l'addition d'une solution de DMSO dans un tampon aqueux) de ces analogues est en général satisfaisante. En revanche, des résultats intrigants ont été constatés, notamment pour le dérivé benzylamine **93**, moins soluble que le dérivé phényle **10**. Or la benzylamine **93** devrait avoir une meilleure solubilité du fait de la présence d'un groupement ionisant supplémentaire. Cette différence de solubilité nous amène à nous interroger sur la vitesse de dimérisation de ces amino-cétones et plus précisément des composés particulièrement solubles. En effet, en augmentant la quantité de molécule soluble dans le milieu, la probabilité de dimérisation devrait augmenter. Pour rappel, l'aminobenzosubérone **8** dimérise en solution aqueuse à pH=7,5 à des concentrations supérieures à 2,5 mM avec un temps de demi-vie d'environ 1h.

Pour vérifier cette hypothèse des tests de mesure de la vitesse de dimérisation de ces analogues sont en cours d'investigations. Pour être proche des conditions expérimentales de détermination de



la solubilité cinétique, ces analogues seront dissouts dans une solution de D<sub>2</sub>O/DMSO dans un tampon à pH=7,4 à une concentration de 200 µM. Les quantités des différents produits seront alors mesurées au cours du temps par RMN-<sup>1</sup>H en présence d'un étalon interne.

Une propriété importante à contrôler lors de la conception d'un candidat-médicament est la lipophilie. C'est un facteur important qui peut influencer l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et l'affinité pour une cible. Pour cela, le log D (coefficient de partage (octanol/eau) à pH 7,4) a été étudié et a montré une lipophilie idéal ( $1 < \log D_{7,4} < 3$ ) pour les analogues **10**, **86** et **105** et une lipophilie modérée ( $\log D_{7,4} < 1$ ) pour l'analogue **115** et probablement **116**.<sup>287</sup> De façon intéressante, les valeurs de log D obtenus sont cohérentes avec les valeurs clogP calculées précédemment, ce qui peut être un avantage économique. Par la suite nous nous sommes contentés des valeurs du clogP calculé.

Les valeurs du taux de liaison aux protéines plasmatiques (plasma humain) des analogues **93**, **104** et **116** sont faibles. Le composé **86** est quant à lui, modérément lié aux protéines plasmatiques alors que le composé **10** est le plus fortement lié.

La perméabilité passive de ces analogues a été testée sur une membrane cellulaire artificielle PAMPA. Elle nous renseigne sur la diffusion passive de ces analogues. Les analogues **86**, **93** et **116** se sont montrés beaucoup plus perméables que les autres dérivés testés.

Enfin, la stabilité microsomale de ces analogues a été déterminée par rapport aux microsomes de foie humain. Les analogues **86**, **92** et **93** semblent être stables. Par contre, des tests d'inhibition des cytochromes CYP450 par l'analogue **10** ont montré une inhibition de l'isozyme 3A4 avec une concentration de 5,7 µM (Tableau 36).

isozyme CYP450	IC <sub>50</sub> , µM
2C9	>10
2D6	>10
3A4	5.7

Tableau 36 : valeurs d'inhibition des CYP450 par l'analogue **10**. La famille 2C9 constitue 18% du CYP humaine et il est responsable du métabolisme de 10% des médicaments. 2D6 constitue 2% du CYP humaine et il est responsable du métabolisme de 30% des médicaments. La famille 3A4 constitue 28% du CYP humaine et il est responsable du métabolisme de 50% des médicaments.

Ce résultat d'inhibition du CYP3A4 pose la question sur la signification des résultats de stabilité métabolique et sur la fiabilité des valeurs pour les analogues **86**, **92** et **93**. Ces analogues sont-ils effectivement stables ou sont-ils stables suite à l'inhibition de CYP3A4. Par conséquent, il serait important de tester l'inhibition des CYP450 par ces analogues. Par ailleurs, il nous faudra surveiller les valeurs d'inhibition des CYP450 afin d'éviter tout type interactions médicamenteuses.

Suite à ces résultats, le phényle **10** et le *m*-aminocarbonyle **86** ont été sélectionnées afin d'étudier leurs profils **pharmacocinétique in vivo**.

### **Etude pharmacocinétique in vivo**

Dans un premier temps, l'étude de la solubilité thermodynamique de ces composés a été réalisée afin de contrôler et améliorer leur solubilité dans l'eau via l'ajout d'excipient. Avoir la meilleure solubilité possible est primordiale lors de l'administration du composé par voie intraveineuse.

<sup>287</sup> J. Corner; *method and principals in medicinal chemistry*, **2003**, 21-45

### Etude de la solubilité thermodynamique

L'étude de la solubilité thermodynamique a montré que la meilleure solubilité dans le PBS (tampon phosphate salin) est atteinte en présence de 10% de l'excipient hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (H $\beta$ C) (Tableau 37) avec une concentration de  $5,5 \pm 0,2$  mM pour le phényle **10** et de  $6,8 \pm 0,6$  pour la *m*-aminocarbonyl-Ph **86**.

Solubilité thermodynamique dans PBS (pH 7.4)		
excipient	<b>10</b> /(mM)	<b>86</b> /(nM)
10% Kolliphor EL <sup>a</sup>	$0,046 \pm 0,004$	-
15% Kolliphor HS15 <sup>b</sup>	$0,017 \pm 0,002$	-
10% polysorbate 80 <sup>c</sup>	$0,325 \pm 0,012$	-
50% PEG 400 <sup>d</sup>	$2,8 \pm 0,1$	-
10% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin <sup>e</sup>	$5,5 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,6$

Tableau 37 : solubilité thermodynamique des molécules **10** (4-phenyl) et **86** (4-(*m*-(aminocarbonyl)-4-phenyl)) avec différents excipients. a) Kolliphor EL est le nom commercial de l'huile de ricin polyéthoxylée utilisé comme surfactant non-ionique utilisé pour stabiliser des émulsions de composés non-polaires dans l'eau. b) polyéthylène glycol (15)-hydroxy stéarate utilisé comme agent de solubilisation non ionique et comme émulsifiant. c) polyoxyéthylène (20) monoooléate de sorbitane utilisé comme un surfactant non ionique et hydrophile. d) polyéthylène glycol 400 utilisé comme agent épaississants et gel collant. e) hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (H $\beta$ C) augmente la solubilité des produits lipophiles par interaction guest-host complexe (entre le produit et H $\beta$ C) à l'intérieur de la cavité non polaire du H $\beta$ C.

### Etude pharmacocinétique *in vivo*

L'étude pharmacocinétique des molécules **10** et **86** a été réalisée sur des souris CD-1 après administration par voie intraveineuse (*iv*), orale (*po*) ou intrapéritonéale (*ip*) d'une dose de 3mg/Kg de composé dans un tampon PBS-10% H $\beta$ C.

Le PK par voie intraveineuse nous renseigne sur des données clés comme sur le volume de distribution, la clairance et le temps de demi-vie.

Le volume de distribution apparent à l'état stationnaire  $V_{d_{ss}}$  reflète la distribution du produit dans le corps (sang+tissus). Les deux molécules ont montré un volume distribution acceptable (**10** :  $V_{d_{ss}} = 7,4$  L/Kg et **86** :  $V_{d_{ss}} = 2,7$  L /Kg).

La clairance plasmatique (Cl<sub>b</sub>) a été déterminée, elle permet d'indiquer la vitesse d'élimination du produit du système, Cl système = Cl hépatique +Cl rénale. Cette valeur peut être calculée par voie intraveineuse par  $Cl = \text{Dose}/\text{AUC}_{iv}$ . Les valeurs obtenues pour les deux produits sont modérées et conformes à la stabilité métabolique *in vitro*. La clairance est plus faible pour le composé **86**.

Le temps de demi-vie est le temps nécessaire pour que la concentration du produit dans le sang soit diminuée de moitié. Les deux produits ont montré un temps de demi-vie faible lors de la phase terminale.

Les deux produits ont montré une absorption rapide que ce soit par administration *ip* ou *po* avec  $T_{max}$  de 15 min et un  $C_{max}$  (0,8-1,3  $\mu\text{mol/L}$ ) modéré, avec une meilleure exposition pour le produit **86**. Ces deux composés ont présenté des biodisponibilités acceptables pour les deux produits  $\approx 40\%$  *po* et autour de 50% *ip*. La biodisponibilité est la fraction du produit qui accède dans le système circulatoire non-modifié. La biodisponibilité est calculée à partir de l'exposition *iv* et *po* ou *ip* selon la formule suivante.  $\%F_{po} = (\text{AUC}_{PO}/\text{AUC}_{IV}) \cdot (\text{Dose}_{IV}/\text{Dose}_{PO}) \cdot 100\%$ .

Composé	10	86
<b>PK iv (3 mg/kg)</b>		
Clairance Cl <sub>b</sub> <sup>a</sup> (mL/min/kg)	43	22
Volume de distribution Vd <sub>ss</sub> <sup>b</sup> (L/kg)	7,4	2,7
Temps de demi-vie terminal T <sub>1/2</sub> (min)	132	95
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	64146	129258
<b>Paramètres PK po (3mg/kg)</b>		
C <sub>max</sub> (μmol/L)	0,8	1,1
T <sub>max</sub> (h)	0,25	0,25
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	26275	49369
Biodisponibilité F(%)	41	38
<b>Paramètres PK ip (3mg/kg)</b>		
C <sub>max</sub> (μmol/L)	1,3	-
T <sub>max</sub> (h)	0,25	-
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	31521	-
Biodisponibilité F(%)	49	-

Tableau 38 : Etude pharmacocinétique des composés **10** (4-phenyl) et **86** (4-(*m*-(aminocarbonyl)-4-phenyl)) sous forme de sel de chlorhydrate. a) clairance plasmatique, b) Vd<sub>ss</sub> volume de distribution à l'état stationnaire

La comparaison des résultats obtenus pour les deux analogues **10** et **86** montre une meilleure clairance avec une meilleure exposition pour l'analogue **86**. Par contre un meilleur temps de demi-vie pour l'analogue **10** et une disponibilité proche pour les deux analogues.

Afin de démontrer l'application de cette série de molécules en tant que nouveaux agents antipaludéens ciblant sélectivement PfA-M1, l'analogue **10** a été sélectionné pour des études d'efficacité *in vivo* en raison de son profil pharmacologique intéressant mais aussi pour sa disponibilité à grande échelle dans la chimiothèque du laboratoire (800 mg synthétisé).

#### Etude de l'efficacité *in vivo*

L'efficacité de la molécule **10** a été évaluée en suivant la réduction de la parasitémie *in vivo* selon un test suppressif de 4 jours de Peter<sup>288</sup>, en utilisant un modèle murin (souris BALB/c femelle âgée de 9 semaines) infecté par des parasites non létal *Plasmodium chabaudi chabaudi* (souche 864VD).

Les solutions de molécules testées ont été préparées extemporanément dans un véhicule DMSO/5% glucose (10/90). Cinq groupes de six souris ont été utilisés. Chaque groupe s'est vu administré quotidiennement pendant 4 jours une dose par voie *ip*. Groupe 1 (contrôle négatif): véhicule; Groupe 2: composé **10** à une dose de 12 mg/kg dans le véhicule; Groupe 3: composé **10** à une dose de 24 mg/kg dans le véhicule; Groupe 4 (molécule de référence): bestatine à une dose de 100 mg/kg dans le véhicule; Groupe 5 (contrôle positif): chloroquine à une dose de 5 mg/kg dans un tampon PBS.

L'évolution de la parasitémie a été suivie tous les jours jusqu'au 25<sup>ème</sup> jour.

Dans la courbe des souris infectées et non traitées, le pic de parasitémie est observé entre le 13<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour avec des valeurs allant de 27,9% à 49,6%(Figure 143, A). Après une courte recrudescence au 19<sup>ème</sup> jour après infection, les parasites ne sont plus détectés. En revanche, chez les souris

<sup>288</sup> W. Peters: *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. 1987

traitées par la molécule **10** avec les doses de 12 mg/kg et 24 mg/kg, on remarque que la pic de parasitémie s'étale entre les jours 13 et 16, avec des valeurs comprises entre 19,6-29,2% et 22,2-37,3% respectivement (Figure 143, D et E). Par contre, le bestatine montre des valeurs comprises entre 22,0-45,5% au pic de parasitémie (Figure 143, B). Dans le contrôle positif, les souris infectées et traitées avec l'antipaludéen standard chloroquine, la parasitémie est inférieure à 0,02% tout au long de l'expérience (Figure 143, C). Cela correspond à une complète élimination des parasites.

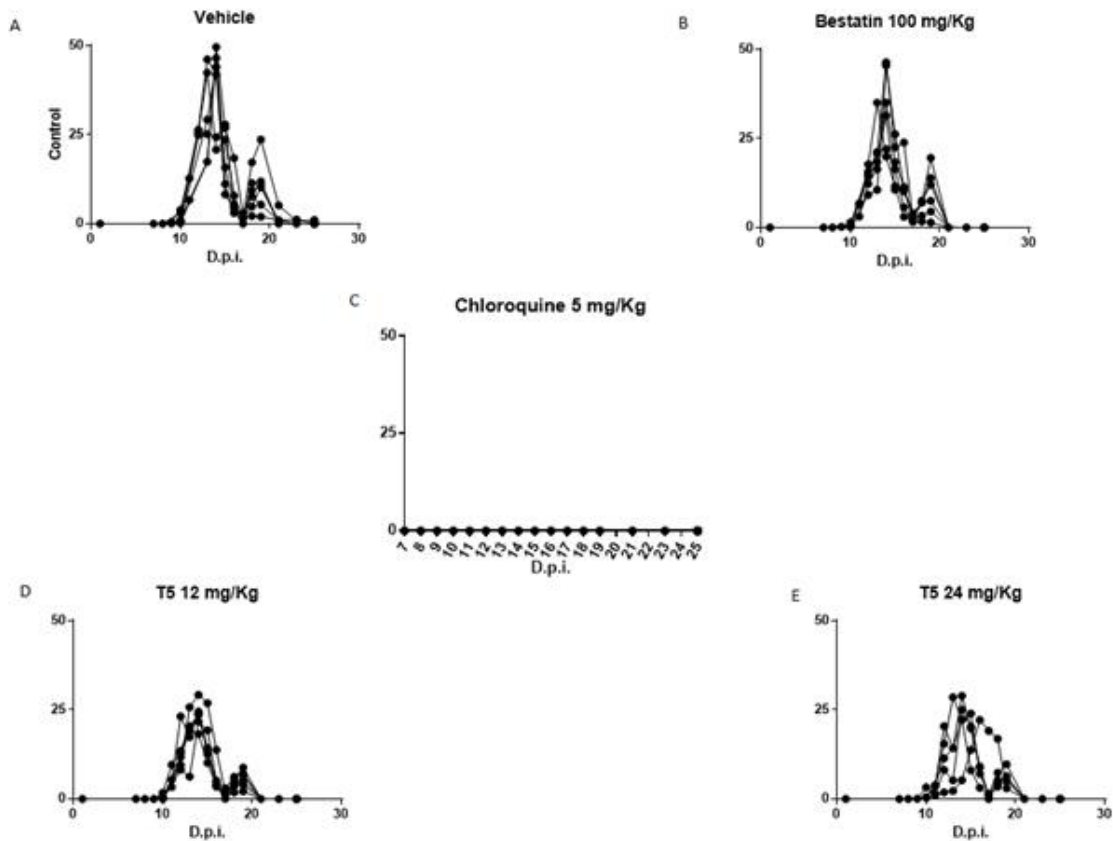


Figure 143 : Efficacité in vivo de la bestatine, de la molécule 10 et de la chloroquine contre l'infection par *P. c. chabaudi* chez la souris. Les souris femelles BALB/c infectées par *P. chabaudi* 864VD ont été traitées avec: sans médicament (A), 100 mg / kg de bestatine (B), 12 mg / Kg de composé 2 (C), 24 mg / Kg de composé 10 (D) 5 mg / Kg de chloroquine (E). Les concentrations de molécules (mg / Kg) indiquées correspondent à une injection quotidienne pendant 4 jours. D. ip., n = 6 souris par groupe

La Figure 144 résume l'efficacité des différents traitements en traçant la parasitémie moyenne au pic, pour chaque groupe de souris traitées, normalisée par la parasitémie au pic pour le groupe témoin (souris infectées non traitées). Une telle représentation permet de visualiser plus rapidement les résultats après 4 jours de traitement. La dose de 100 mg/kg de bestatine n'a pas réduit de manière significative l'infection parasitaire avec une réduction de parasitémie de l'ordre de 16%. En revanche un traitement de 4 jours à une dose quotidienne de 12 mg/kg ou 24 mg/kg de la molécule **10** a considérablement réduit l'infection avec une réduction de parasitémie de 44% et 40% respectivement (Figure 144, A).

Une comparaison de la parasitémie moyenne atteinte par chaque groupe de souris pour le pic de recrudescence au 19<sup>ème</sup> jour a également été représentée (Figure 144, B). Indiquant une faible

réduction de la parasitémie avec seulement 20,7% pour la bestatine, alors que l'analogue **10** a conduit à une réduction de parasitémie de 54,7% pour 12 mg/kg et 51,5% pour 24 mg/kg.

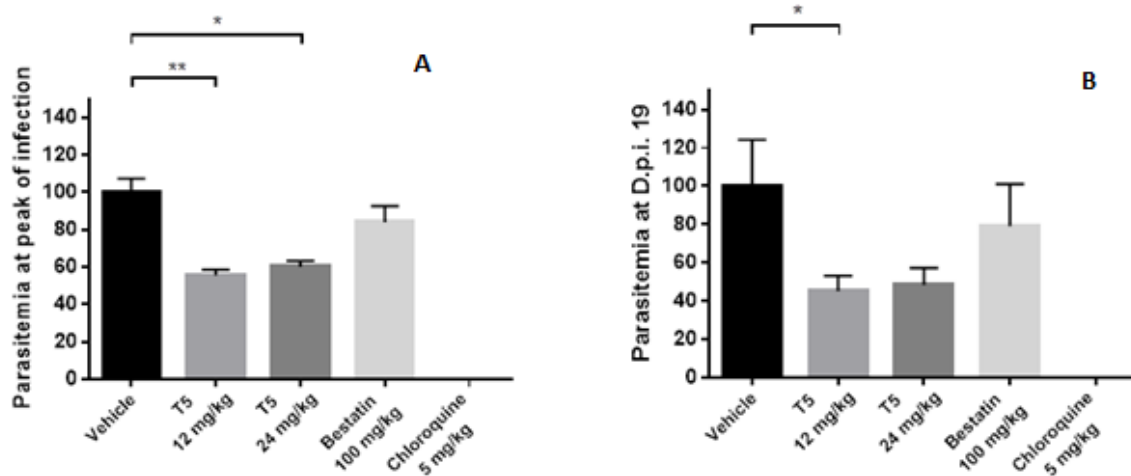


Figure 144 : comparaison de l'efficacité antipaludique, la parasitémie au pic de l'infection a été comparée pour le groupe témoin et les groupes recevant les doses de 12 mg/kg et 24 mg / kg de 2, 100 mg / kg de bestatine et 5 mg / kg de chloroquine (A : après 13 à 14/16 jours et B : après 19 jours).

En conclusion, la molécule **10** est capable de réduire la parasitémie globale au pic de l'infection et de recrudescence de 40 à 44%, aux deux doses testées. Il est intéressant de noter que les traitements avec cette molécule aux doses 12 et 24 mg/Kg n'ont pas présenté de différences significatives de l'activité antiparasitaire, ce qui suggère des limites dans la biodisponibilité de ce composé. Il serait intéressant d'étudier la pharmacocinétique de l'analogue **10** à 12mg/kg et à 24 mg/kg et de comparer ces résultats avec ceux déjà obtenus. Par ailleurs d'autres doses devraient être envisagées avec une fréquence et une durée d'administration plus importantes afin de maintenir une concentration élevée de notre analogue dans le sang pendant une période plus longue. Ainsi l'efficacité *in vivo* avec des doses plus faible de 6 mg/kg ou 12 mg/kg *b.i.d* (2x par jour) pendant 4 ou 7 jours pourrait être explorée. Nous pourrions ainsi comparer l'efficacité de l'analogue **10** avec la molécule Co-4 décrite par Skinner-Adams *et al.*<sup>289</sup> (ciblant PfA-M1 et PfA-M17) en suivant leur modèle qui consiste en une dose de 100mg/kg deux fois par jour et pour sept jours par voie intrapéritonéale. Parallèlement à ces tests, il serait judicieux pour des raisons éthiques de sélectionner quelques molécules du Tableau 35 pour tester leurs profils pharmacocinétiques et en choisir quelques -unes pour étudier leurs efficacités *in vivo*.

<sup>289</sup> T. S. Skinner-Adams *et al.*, *J Med Chem* **2007**, 50, 6024-6031



# Conclusion Générale

## Conclusion Générale et perspectives

Les travaux de cette thèse viennent dans la continuité des travaux précédemment réalisés au laboratoire, elles s'intéressent à la fois à l'amélioration des propriétés ADME d'une série de molécules de type 7-amino-benzocycloheptan-6-one et à la conception d'une plateforme moléculaire modulable pouvant inhiber sélectivement l'aminopeptidase M1 ciblée (APN, Pfa-M1, ERAP1, ERAP2 et IRAP). Cette sélectivité peut être atteinte en interagissant avec le sous-site S1 ou S1'. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la synthèse des dérivés du 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitué en position 9 (dérivés de type Benzazépine) en présence ou non d'une substitution en position 4. Ensuite, nous avons cherché à optimiser les propriétés pharmacologiques des dérivés de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one en interagissant avec le sous-site S1' par des substitutions en position-4 du cœur aromatique de notre molécule. (Figure 145)

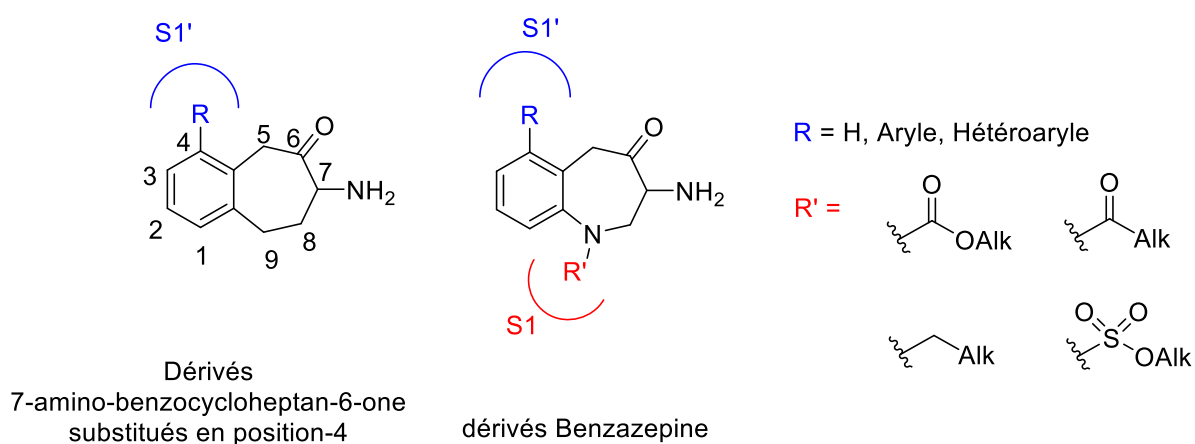


Figure 145 : objectifs des travaux de la thèse

### Préparation des dérivés de type Benzazépine

Les voies de synthèse exploitées pour la préparation des dérivés de type Benzazépine ont montré plus ou moins de succès. Trois approches ont été étudiées pour construire le cycle à sept chaînons et qui passent par 3 étapes clés : condensation de Dieckmann, métathèse cyclisante et amination réductrice.

#### Condensation de Dieckmann

Cette approche a été très fastidieuse et délicate. La préparation de l'intermédiaire diester en série azotée a fait intervenir plusieurs réactions de type Fukuyama-Mitsunobu, addition de Michael ou substitutions nucléophiles aromatiques et se sont toutes soldées par un échec. En revanche, un analogue de l'intermédiaire **5** en série oxygénée a pu être préparé, mais sa cyclisation par condensation de Claisen a essentiellement donné lieu à des dégradations du substrat de départ. (Figure 146)



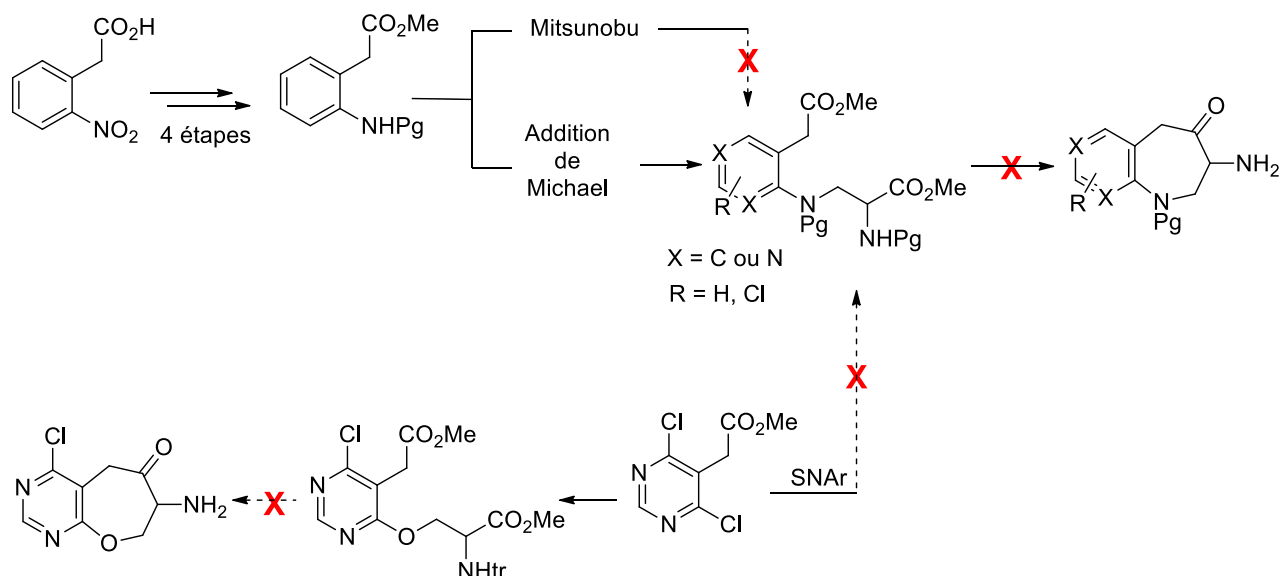


Figure 146 : voie synthétique de la préparation du cycle à sept chaîons par Condensation de Dieckmann

#### Amination réductrice

Cette stratégie a conduit à des résultats plus encourageants et a comme étape clé une amination réductrice. Cependant, la préparation de l'intermédiaire clé par addition nucléophile sur des aldéhydes adéquats (**voie A**) s'est avérée infructueuse. Il faudrait revoir cette étape avec des quantités plus importantes pour éviter les traces d'eau qui pourraient être néfastes surtout que ces expériences ont été faites sur des faibles quantités 10-20 mg. De même, le coupage palladocatalysé de Sonogashira (**voie B-1**) n'a pas conduit à la formation de l'alcyne désiré. Par contre, la SNAr (**voie B-2**) s'est révélée comme une voie prometteuse, cette étape mérite une optimisation pour améliorer le rendement du produit désiré. Cette voie de synthèse est en cours d'investigation au laboratoire (Figure 147).

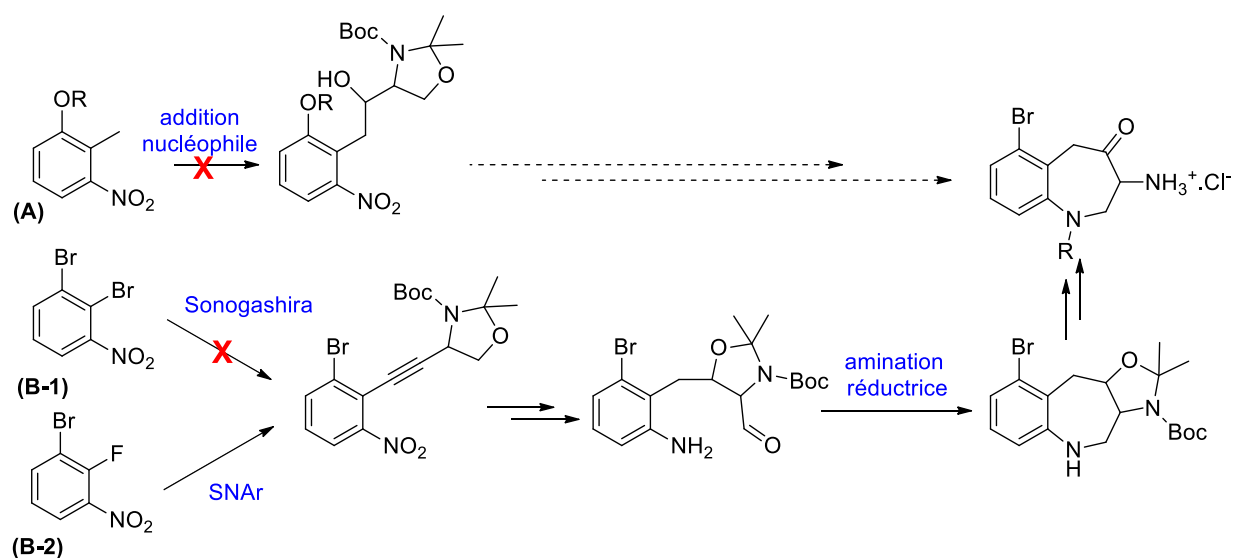


Figure 147 : voie synthétique de la préparation du cycle à sept chaîons par amination réductrice

### Métathèse cyclisante

Cette voie a montré des résultats très encourageants. Elle consiste à la formation du cycle à sept chaîons par une réaction de métathèse cyclisante, puis à introduire les fonctions amine et alcool. L'intermédiaire benzocycloheptène a été préparé avec succès en 6 étapes. L'oxydation de l'alcène par RuCl<sub>3</sub>/Oxone a conduit à la dégradation du substrat de départ (**Voie A**). La fonctionnalisation de l'oléfine par époxydation puis ouverture de l'époxyde par la benzylamine (**voie B**) est la plus prometteuse et est en cours d'exploration pour aboutir aux analogues de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position-9 et en position-4. (Figure 148)

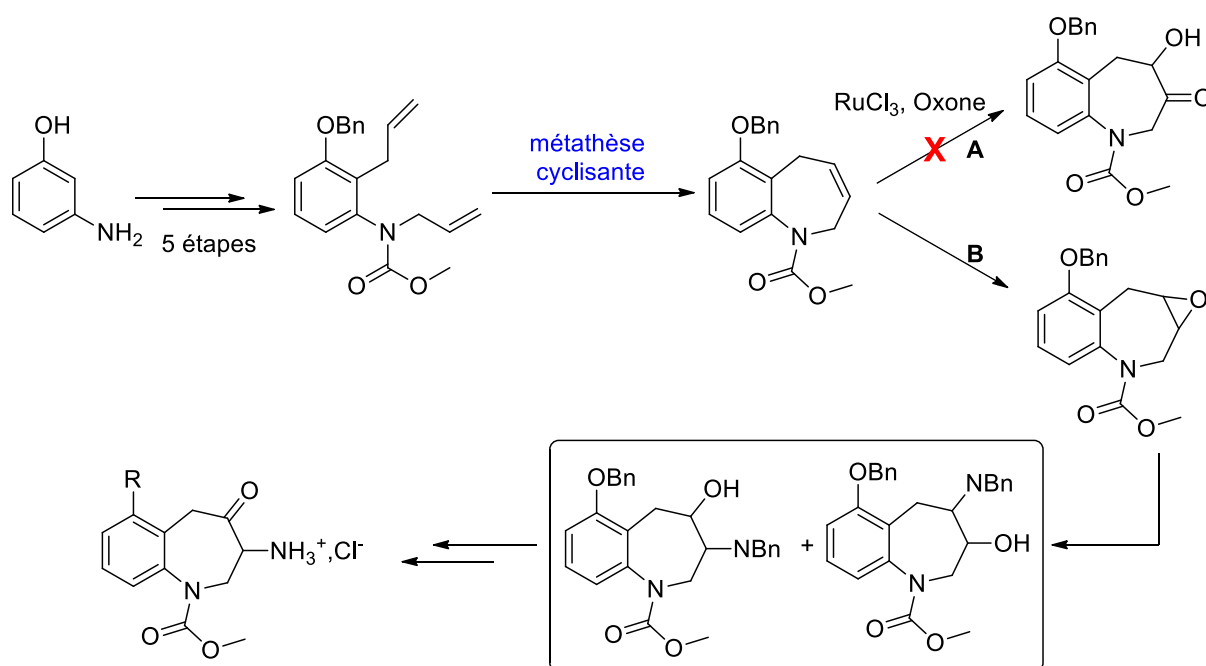


Figure 148 : voie synthétique de la préparation du cycle à sept chaîons par métathèse cyclisante

### Préparation des dérivés de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitué en position-4

La préparation des dérivés de 7-amino-benzocyclohept-6-one substitué en position 4 est établie suivant une voie de synthèse développée et re-optimisée au laboratoire par Dr G. Revelant. Cette stratégie consiste en la préparation de l'intermédiaire 4-bromo-7-amino-benzocycloheptan-6-one en 10 étapes. Ensuite, des groupements aryles ou hétéroaryles obéissant à notre cahier des charges sont introduits par couplage pallado-catalysé. Ensuite, la déprotection de cet intermédiaire conduit à la formation du produit final sous forme de sel d'amine. (Figure 149)

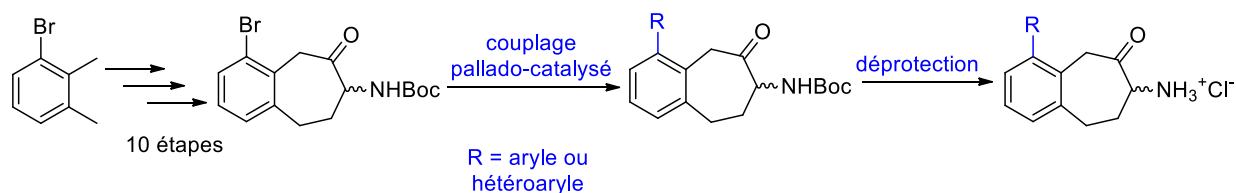


Figure 149 : Préparation d'analogues substitués en position-4 de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one

Des résultats biologiques intéressants ont été obtenus concernant l'inhibition de l'APN, IRAP et PfA-M1. Des structures de six de nos ligands dans le site actif de PfA-M1 ont été préparées, ce qui nous a permis une meilleure compréhension et rationalisation du mode d'interactions entre le site actif de ces aminopeptidases et nos molécules. Par ailleurs, diverses propriétés ADME *in vitro* ont été déterminées et des études pharmacocinétiques *in vivo* ont été menées sur les candidats les plus prometteurs. Les excellentes activités inhibitrices *in vitro* envers PfA-M1 nous ont encouragés à positionner ces dérivés 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en tant qu'agents antipaludéens potentiels. L'étude de l'inhibition *in cellulo* de la croissance de *Plasmodium falciparum* a montré des résultats encourageants et compétitifs par rapport à ceux décrits dans la littérature. Suite à ces études, une sélection de molécules a été étudiée *in vivo* dans un modèle murin de paludisme et le 7-amino-4-phényl-benzocycloheptan-6-one **10** a montré une réduction de la parasitémie de 40% dans un modèle de Peter après administration *ip* de 12 mg/kg/jour.

- Il sera important de 1) répéter le test préclinique avec des doses plus fréquentes et une durée plus importante afin de maintenir une concentration élevée de notre analogue dans le sang et pour une période plus longue. 2) concevoir et tester des molécules dérivées de **10** dont les propriétés pharmacologiques seraient améliorés
- il sera judicieux pour des raisons éthiques de sélectionner quelques molécules pour tester leurs profils pharmacocinétiques et en choisir quelques-unes pour étudier leurs efficacités *in vivo*.

Une nouvelle approche est envisagée pour la conception des nouvelles molécules et l'exploitation des nouvelles sites de nos enzymes selon les travaux de Sharpless<sup>290</sup>. Cette nouvelle méthodologie implique la cible biologique dans la sélection et la synthèse de ses propres inhibiteurs par réaction de Click Chemistry. En effet, la protéine cible sélectionne les groupements les plus affins à partir d'un mélange de «buildings blocks» et synthétise son propre inhibiteur. La liaison simultanée de deux composés à deux sites adjacents de l'enzyme place ceux-ci de manière à ce qu'ils réagissent spontanément entre eux. Cette méthode a permis à Sharpless *et al.* de découvrir des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE)(Figure 150). La synthèse de nos molécules est conçue à partir dipolarophile **129a** (déjà synthétisé au laboratoire) et du 1,3-dipôle (azoture adéquat). (Figure 151)

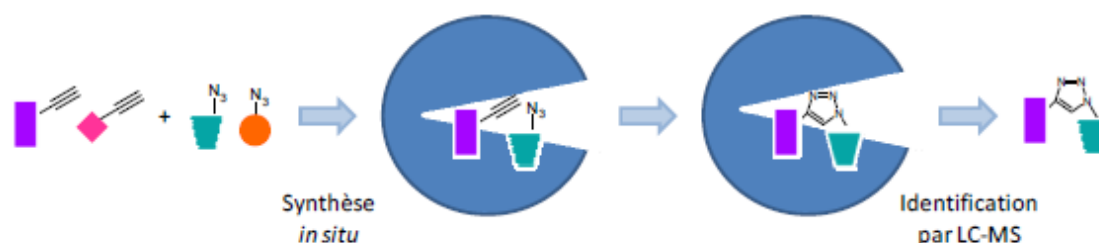


Figure 150 : stratégie de Sharpless

<sup>290</sup> K. B. Sharpless *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1053-1057

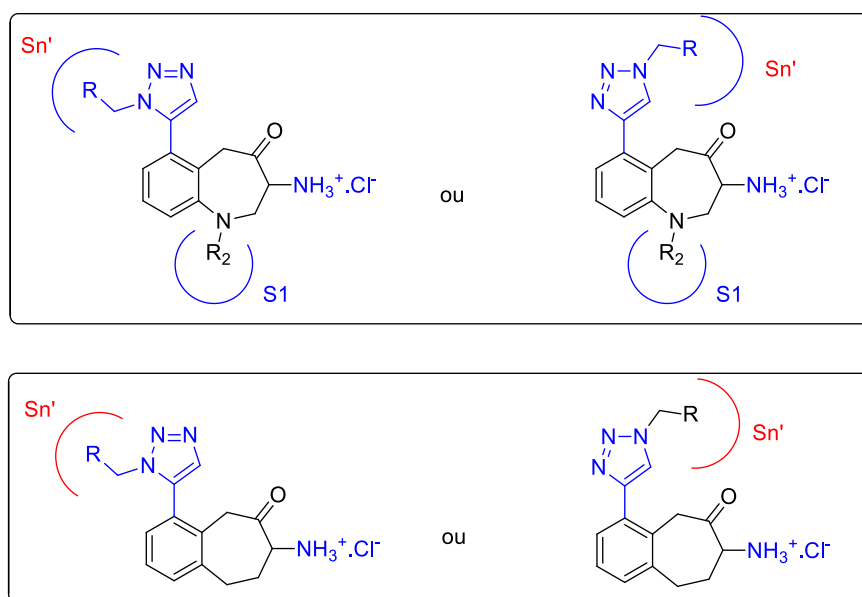
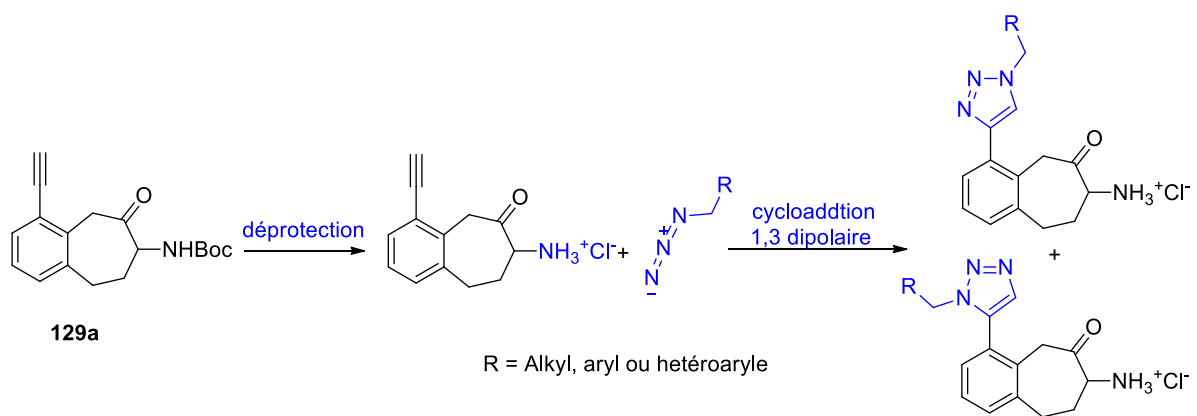


Figure 151 : exploitation des sous sites Sn' à partir des dérivé 1,2,3 triazole

# **Chapitre 7 :**

## **Partie expérimentale**

## Chapitre 7 : Partie expérimentale

### Solvant

Tous les solvants employés ont été préalablement distillés. Les solvants anhydres sont séchés lorsque nécessaire, juste avant réaction selon les méthodes présentées (Tableau 39). Les réactions sont réalisées sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>).

Solvant	Méthode
THF	Na/benzophénone
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CaH <sub>2</sub>
Toluène	CaH <sub>2</sub>

Tableau 39 : méthodes de séchage des solvants

### Matériels et méthodes

#### *Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)*

Les spectres RMN du proton (RMN<sup>1</sup>H), du carbone (RMN<sup>13</sup>C) et du Fluore (RMN<sup>19</sup>F) sont enregistrés sur des spectromètres Brüker Avance 400 et 300 MHz. Les solvants utilisés (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO) sont indiqués entre parenthèses. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport à une référence interne (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO). Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées : (s), singulet ; (br s), singulet large ; (d), doublet ; (t), triplet ; (q), quadruplet ; (m), multiplet.

#### *Spectroscopie de masse*

Les spectres de masse ont été réalisés sur les appareils de :

- HRMS, Agilent Technologies 6510 series, QToF LC/MS (source dual ESI, mode positif).
- LCMS, Agilent Technologies 1100 series, couplé à une MSD/5L.

#### *Appareillage micro-onde*

Certaines réactions ont été réalisées dans une micro-onde Discover CEM en monomode.

#### *Spectroscopie infra-rouge (IR)*

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un Nicolet 400 FT. Les échantillons ont été préparés en pastille de bromure de potassium. Les nombres d'onde sont exprimés en cm<sup>-1</sup>.

#### *Chromatographie*

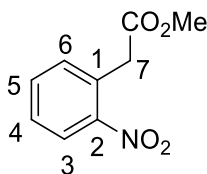
Chromatographie sur colonne : les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur du gel de silice Merck 60 (230-400 Mesh)

Chromatographie sur couche mince : les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur gel de silice E. Merck 60F254 sur support d'aluminium.

## Exploitation du sous-site S1

### Condensation de Dieckmann

#### 2-nitrophényl-acétate de méthyle (**13**)



**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>

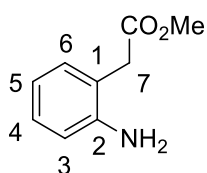
**Poids moléculaire :** 195.175

A une solution d'acide 2-nitrophényl-acétique (1 g, 5.52 mmol) dans du MeOH (5.52 mL) est ajouté H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> *conc.* (0.03 mL, 0.55 mmol, 0.1 éqv.). Le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 4 heures.

Le milieu réactionnel est concentré sous vide, repris dans AcOEt puis lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> *aq.* (1M) puis de la Saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :2). Le produit **13** est obtenu sous forme d'huile incolore (1.1 g, rdt. quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :** 8.11 (dd, *J* = 7.9 et 1.2 Hz, 1H, H-3) ; 7.61 (dt, *J* = 7.7 et 1.5 Hz, 1H, H-5) ; 7.49 (dt, *J* = 7.9 et 1.5 Hz, 1H, H-4) ; 7.38 (dd, *J* = 7.6 et 1.2 Hz, 1H, H-6) ; 4.04 (s, 2H, H-7) ; 3.73 (s, 3H, OMe). Même valeurs que la littérature<sup>291</sup>

#### 2-aminophényl-acétate de méthyle (**14**)



**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>

**Poids moléculaire :** 165.19.

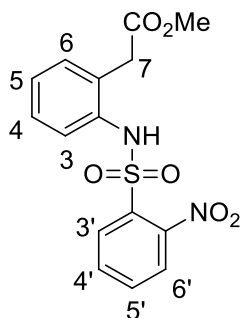
A une solution de 2-nitrophényl-acétate de méthyle **13** (1 g, 5.52 mmol) dans AcOEt (12 mL) est ajouté du Pd/C 10% (117 mg, 1.1 mmol, 0.2 éqv.) sous atmosphère d'H<sub>2</sub>. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 heures.

<sup>291</sup> S. Lee *et al.*, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 16521-16532

Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite, séché sur  $\text{MgSO}_4$ , puis concentré. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :2). Le produit désiré **14** est obtenu sous forme d'huile incolore (0.9 g, rdt. quantitatif).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):** 7.10 (m, 2H, H-4 et H-6) ; 6.75 (m, 2H, H-3 et H-5) ; 4.07 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ; 3.69 (s, 3H, OMe) ; 3.58 (s, 2H, H-7). Même valeurs que la littérature.<sup>288</sup>

2-2'-nitrophenyl-sulfonamido-phényl-acétate de méthyle (**15a**)



**Formule brute :**  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$

**Poids moléculaire :** 350.35

A une solution de 2-aminophényl-acétate de méthyle **14** (1 g, 6.05 mmol) et de la pyridine (1.08 mL, 13.3 mmol, 2.2 éqv.) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre (59.5 mL) à  $0^\circ\text{C}$  est ajouté du chlorure de 2-nitrobenzène-1-sulfonyle (1.47 g, 6.66 mmol, 1.1 éqv.) par petites portions, Le mélange est maintenu à  $0^\circ\text{C}$  pendant 30 min. Puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est lavé avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Le produit **15a** est obtenu sous forme d'un solide jaune (2.0 g, rdt. quantitatif)

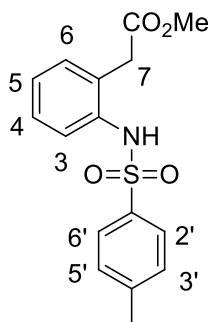
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :** 8.20 (br s, 1H, NH) ; 7.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-6') ; 7.85 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-3') ; 7.81 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5') ; 7.63 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-4') ; 7.35 (m, 1H, H-3) ; 7.20 (m, 3H, H-4, H-5 et H-6) ; 3.75 (s, 3H, OMe) ; 3.56 (s, 2H, H-7).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) :** 172.0 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ) 147.9 (C-2') ; 134.6 (C-2) ; 133.8 (C-1') ; 133.7 (C-3') ; 132.6 (C-5') ; 131.2 (C-6) ; 131.1 (C-6') ; 129.9 (C-7) ; 127.6 (C-5), 128.5 (C-4) ; 127.0 (C-3) ; 125.1 (C-6') ; 52.6 (C-1) ; 37.6 (C-2)

**HR-MS (ESI-QToF) :**  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$  [ $\text{M} + \text{NH}_4^+$ ] calculé : 368.0916, trouvé : 368.0907.



## 2-4-méthylphényl-sulfonylamino-phényle-acétate de méthyle (**15b**)



**Formule brute:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>S

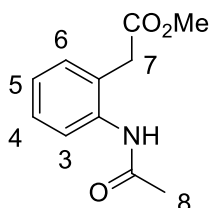
**Poids moléculaire:** 319.38

A une solution de 2-aminophényl-acétate de méthyle **14** (300 mg, 1.8 mmol) et de la pyridine (0.32 mL, 3.99 mmol, 2.2 éqv.) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (17.8 mL) à 0°C est ajouté du chlorure du tosylé (9.80.9 mg, 1.99 mmol, 1.1 éqv.) par petite fraction à 0°C pendant 30 min. Puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide puis dilué dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée avec de l'H<sub>2</sub>O puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :1). Le produit **15b** est obtenu sous forme de solide jaune (2.0 g, rdt. 50%)

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.96 (br s, 1H, NH) ; 7.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2' et H-6') ; 7.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3) ; 7.22 (m, 3H, H-4, H-3' et H-5') ; 7.10 (m, 2H, H-3 et H-5) ; 3.68 (s, 3H, OMe) ; 3.29 (s, 2H, H-7) ; 2.38 (s, 3H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>292</sup>

## 2-acetamidophényl-acétate de méthyle (**15c**)



**Formule brute :** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire :** 207.09

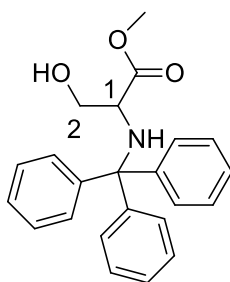
A une solution de 2-aminophényl-acétate de méthyle **14** (400 mg, 2.43 mmol) et de la pyridine (0.19 mL, 2.43 mmol, 1.0 éqv.) dans du MeCN (24.0 mL) à 0°C est ajouté du chlorure d'acétyle (0.21 mL, 2.91 mmol, 1.2 éqv.) goutte à goutte. Le mélange est agité à 0°C pendant 30 min. puis à température ambiante pendant une 16 heures.

<sup>292</sup> J. K. Mishra et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 244-247

Le milieu réactionnel est concentré sous vide puis dilué dans du AcOEt. Le mélange réactionnel est ensuite lavé à l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées sur l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :1). Le produit **15c** est obtenu sous forme d'huile (501.2 mg, rdt. quantitatif).

RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 8,71 (br, 1H, NH); 7,87 (d, J = 8.04 Hz, 1H, H-3); 7,32 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-5); 7,20 (d, J = 8.04 Hz, 1H, H-6); 7,12 (t, J=7.7 Hz, 1H, H-4); 3,74 (s, 3H, OMe); 3,65 (s, 2H, H-1); 2,23 (s, 3H, H-8). Même valeurs que la littérature<sup>293</sup>

#### N-trityl-L-serine méthyl ester (**18**)



**Formule brute** : C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 361.43

A une solution d'ester méthylique de DL-serine (1 g, 6.43 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 mL) à 0°C sont ajoutés de la Et<sub>3</sub>N (1.79 mL, 12.9 mmol, 2 éqv.) et du chlorure de trityle (1.79 g, 6.43 mmol, 1 éqv.) par petites portions. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min. puis à température ambiante pendant une nuit.

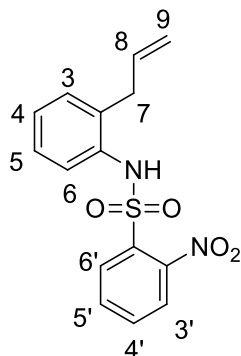
Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M) puis lavé avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :1). Le produit **18** est obtenu sous forme de solide incolore (2.2 g, rdt. quantitatif).

RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 7.50 (m, 6H, Ar) ; 7.29 (m, 2H, Ar) ; 7.19 (m, 7H, Ar) ; 3.69 (m, 1H, H-1) ; 3.54 (m, 2H, H-2) ; 3.30 (s, 3H, OMe) ; 2.92 (br s, 1H, NH) ; 2.32 (br s, 1H, OH). Même valeurs que la littérature<sup>294</sup>.

<sup>293</sup> I. Marquez *et al.*, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 1529-1541

<sup>294</sup> A. King *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4815-4830

## N-(2-nosyl)-2-allyl-aniline (**21**)



**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

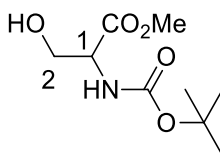
**Poids moléculaire** : 318.35

A une solution de 2-allyle-aniline (200 mg, 1.51 mmol) et de la pyridine (0.27 mL, 3.31 mmol, 2.2 éqv.) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (14.8 mL) à 0°C est ajouté du chlorure 2-nitrobenzène-1-sulfonyl (366.1 mg, 1.66 mmol, 1.1 éqv.) goutte à goutte, Le mélange est maintenu à 0°C pendant 30 min. Puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit.

Le milieu réactionnel est lavé à l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques rassemblés sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié sur chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :1). Le produit 21 est obtenu sous forme de solide jaune pâle (415 mg, rdt. quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**: 8.67 (br s, 1H, NH) ; 7.89 (dd, *J* = 7.9 et 1.3 Hz, 1H, H-3') ; 7.84 (dd, *J* = 8.1 et 1.3 Hz, 1H, H-6') 7.73 (dt, *J* = 7.8 et 1.4 Hz, 1H, H-5') ; 7.62 (dt, *J* = 7.8 et 1.3 Hz, 1H, H-4') ; 7.38 (m, 1H, H-6) ; 7,19 (m, 3H, H-3, H-4 et H-5) ; 5,85 (m, 1H, H-8) ; 5,09 (dq, *J* = 10 et 1.4 Hz, 1H, Ha-9) ; 4.95 (dd, *J* = 17.2 et 1.6 Hz, 1H, Hb -9) ; 3,32 (d , *J* = 5.9 Hz = 2H, H-7). Même valeurs que la littérature<sup>295</sup>

## Ester méthylique de N-(tert-butoxycarbonyl)-DL-serine (**22a**)



**Formule brute** : C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>

**Poids moléculaire** : 219.23

A une solution d'ester méthylique de DL-serine (1 g, 6.43 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (6.43 mL) à 0°C sont ajoutés Et<sub>3</sub>N (1.97 mL, 14.1 mmol, 2.2 éqv.) et Boc<sub>2</sub>O (1.54 g, 7.07 mmol, 1.1 éqv.) par petites

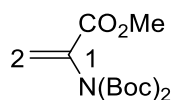
<sup>295</sup> Yin *et al.*, *Heterocyclics* **2006**, 68, 23-31

portions. Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant 3 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide, dilué avec Et<sub>2</sub>O, lavé avec KHSO<sub>4</sub> aq. (1M) puis avec NaHSO<sub>4</sub> aq. (1M) et enfin avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :2). Le produit **21a** est obtenu sous forme d'huile incolore (1.4 g, rdt. quantitative).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 5.58 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH) ; 4.33 (br s, 1H, H-1) ; 3.96 (dd, *J* = 11.3 et 3.5 Hz, 1H, Ha-2) ; 3.87 (dd, *J* = 11.3 et 3.7Hz, 1H, Hb-2) ; 3.76 (s, 3H, OMe) ; 2.81(br s, 1H, OH) ; 1.44 (s, 9H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>296</sup>

Ester méthylique (N-N-tert-butoxycarbonyl)-déhydroalinine (**22**)



**Formule brute** : C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>

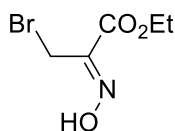
**Poids moléculaire** : 301.34

A une solution de l'intermédiaire **22a** (1409 mg, 6.43 mmol) dans MeCN (12.9 mL) sont ajoutés Boc<sub>2</sub>O (3085 mg, 3.03 mL, 14.1 mmol, 2,2 éqv.) et DMAP (392 mg, 3.21 mmol, 0.5 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit.

Le milieu réactionnel est concentré sous vide puis séparer entre éther diéthylique et KHSO<sub>4</sub> aq. (1M). La phase organique est lavée par KHSO<sub>4</sub> aq. puis par NaHSO<sub>4</sub> aq. (1M) enfin avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant AcOEt : Ether de pétrole (1 :2). Le produit **22** est obtenu sous forme d'huile incolore (1.8 g, rdt. quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 6.35 (s, 1H, Ha-1) ; 5.65 (s, 1H, Hb-1) ; 3.80 (s, 3H, OMe) ; 1.47 (s, 18H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>294</sup>

3-bromo-2(hydroxyamino) pyruvate d'éthyle (**23**)



**Formule brute** : C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>BrNO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 210.03

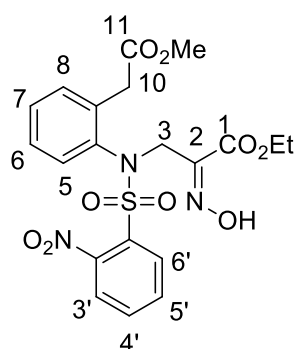
<sup>296</sup> P. Ferreira et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1999**, 3697-3703

À une solution d'éthyle bromopyruvate (1.05 g, 5.4 mmol) dans le chloroforme anhydre (48.35 mL) et du méthanol anhydre (33.03 mL) est ajouté du chlorure d'hydrate de l'hydroxylamine (124.8 mg, 5.94 mmol, 1.1 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite dissout dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , lavé avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  *aq.* (2M) puis avec de la saumure. Le produit solide est filtré puis séché sous vide et enfin recristallisé avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et de l'hexane. Le produit **23** est obtenu sous forme de solide incolore (964 mg, rdt. 85%).

**RMN<sup>1</sup>H** ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) : 9.72 (br s, 1H, OH); 4.41 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H, OEt), 4.28 (s, 2H), 1.40 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, OEt). Même valeurs que la littérature<sup>297</sup>

2- (N-hydroxyimino) -3- {N- [2- (2-méthoxy-2-oxoéthyl) phényl] (2-nitrobenzène) sulfonamido} propanoate d'éthyle (**25a**)



**Formule brute** :  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$

**Poids moléculaire** : 479.46

A une solution de l'intermédiaire **15a** (30 mg, 0.08 mmol) et de l'intermédiaire **23** (17.9 mg, 0.08 mmol, 1 éqv.) dans THF anhydre (0.8 ml) sont ajoutés du NaH (6.85 mg, 0.17 mmol, 2 éqv.) et de l'iodure de tétrabutylammonium (3.16 mg, 0.008 mmol, 0.1 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont ensuite séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentrées sur l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est séparé sur une plaque préparative avec un éluant d'acétate d'éthyle : Ether de pétrole (1 :1). Le produit **25a** est obtenu sous forme d'huile jaune (28 mg, rdt 75%).

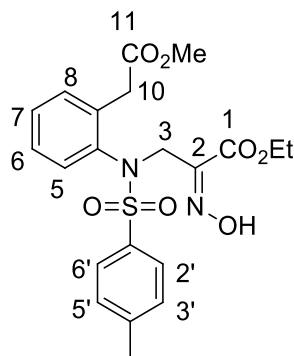
**RMN<sup>1</sup>H** ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) : 7.66 (m, 2H, H-3' et H-6') ; 7.45 (m, 2H, H-4' et H-5') ; 7.37 (dd,  $J = 7.3$  et 1.4 Hz, 1H, H-5) ; 7.31 (dt,  $J = 7.3$  et 1.4 Hz, 1H, H-6) ; 7.12 (dt,  $J = 7.3$  et 1.4 Hz, 1H, H-7) ; 7.02 (dd,  $J = 7.3$  et 1.4 Hz, 1H, H-8) ; 5.03 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H, Ha-3) ; 4.87 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H, Hb-3) ; 4.20 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H, OEt) ; 3.70 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H, Ha-10) ; 3.66 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H, Hb-10) ; 3.66 (s, 3H, OMe) ; 1.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, OEt)

**RMN<sup>13</sup>C** ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) : 171.73 (C-11); 162.30 (C-1); 147.60 (C-2); 135.92 (C-5); 135.68 (C-2'); 133.78 (C-3'); 132.71 (C-5'); 131.68 (C-6); 131.45 (C-4); 131.29 (C-4'); 130.41 (C-8); 129.30 (C-9);

<sup>297</sup> L. B. Dale *et al.*, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2999-3000

128.08 (C-1'); 127.84 (C-7); 123.91 (C-6'); 62.16 (C-10); 52.02 (C-OMe); 44.69 (C-3); 35.40 (C-OEt); 13.93 (C-OEt)

Éthyl (2Z) -2- (N-hydroxyimino) -3- {N- [2- (2-méthoxy-2-oxoéthyl) phényl] (4-méthylbenzène) sulfonamido} propanoate d'éthyle (**25b**)



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S

**Poids moléculaire** : 448.49

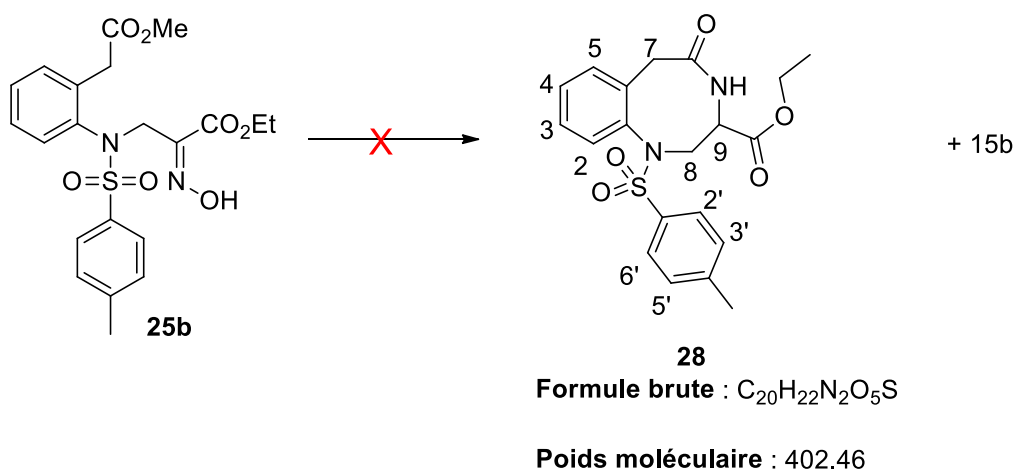
A une solution de l'intermédiaire **15a** (310 mg, 0.98 mmol) et de l'intermédiaire **23** (291.2 mg, 0.98 mmol, 1 éqv.) dans THF anhydre (0.8 ml) sont ajoutés du NaH (77.64 mg, 1.94 mmol, 2 éqv.) et de l'iodure de tétrabutylammonium (35.85 mg, 0.09 mmol, 0.1 éqv.). Le mélange réactionnel est chauffé à 65°C pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont ensuite séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est séparé par une plaque préparative avec un éluant d'acétate d'éthyle : Ether de pétrole (1 :1). Le produit **25b** est obtenu sous forme d'huile jaune (239 mg, rdt 55 %).

**RMN<sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 9.46 (br s, 1H, OH); 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-6' et H-2'); 7.37 (dd, J = 8.1 et 1.6 Hz, 1H, H-8); 7.27 (d, d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3' et H-5'); 7.24 (m, 1H, H-6), 7.04 (dt, J = 8.1 et 1.6 Hz, 1H, H-5); 6.49 (dd, J = 8.1 et 1.5 Hz, 1H, H-7); 4.77 (d, J = 13.5 Hz, 1H, Ha-3) ; 4.26 (d, J = 13.5 Hz, 1H, Hb-3) ; 4.23 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OEt), 3.92 (d, J = 16.7 Hz, 1H, Ha-10) ; 3.81 (d, J = 16.7 Hz, 1H, Hb-10) ; 3.67 (s, 3H, OMe); 2.42 (s, 3H, Me); 1.25 (t, J=7.07, 3H, OEt)

**RMN<sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): 172.85 (C-11); 163.06 (C-1); 148.10 (C-2); 144.35 (C-5); 139.14 (C-4'); 136.24 (C-9); 133.71 (C-1'); 131.52 (C-8); 129.75 (C-2' et C-6'); 128.89 (C-3' et C-5'); 128.80 (C-7); 127.79 (C-6); 127.53 (C-4); 62.39 (C-OEt); 52.32 (C, OMe); 44.21 (C-10); 36.34 (C-3), 21.91 (C, Me); 14.28 (C, OEt)

Réduction du 2- (N-hydroxyimino) -3- {N- [2- (2-méthoxy-2-oxoéthyl) phényle] (4-méthylbenzène) sulfonamido} propanoate d'éthyle



A une solution de l'intermédiaire **25b** (204 mg, 0.46 mmol) dans AcOH (5.2 mL) sont ajoutés du poudre de Zinc (297.5 mg, 4.55 mmol, 10 éqv.) et de la poudre de Fer (5.08 mg, 0.09 mmol, 0.2 éqv.) par petite portion. Le mélange réactionnel est chauffé à 65°C pendant deux heures.

Le milieu réactionnel est ensuite filtré, neutralisé avec du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> *aq.* (1M) puis lavé avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant d'Acétate d'éthyle : Ether de pétrole (1 :1). Cinq spots sont séparés nommés S1 à S5 du moins polaire au plus polaire.

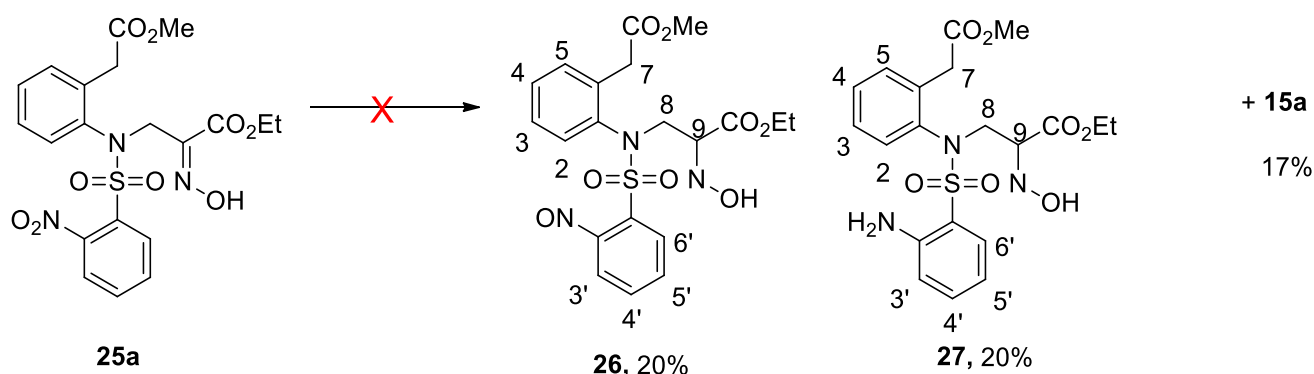
**S1 (15b)** est obtenue (20 mg, rdt = 14%).

**S2, S3** et **S5** sont indéterminés.

**S4 (28)** est obtenue (31 mg, rdt = 17%). Ce produit est caractérisé par RMN<sup>1</sup>H et RMN cosy.

**RMN<sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.75 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, Ts); 7.53 (m, 1H, H-2); 7.36 (m, 3H, H-3' et H-5' et H-3), 7.08 (m, 1H, H-5); 6.97 (m, 1H, H-4); 6.34 (br s, 1H, NH); 4.86 (m, 1H, H-9) ; 4.78 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, Ha-8); 4.34 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, OEt); 3.97 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Ha-7); 3.35 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Hb-7); 3.10 (q, *J* = 15.4 Hz, 1H, Hb-8); 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, OEt).

Réduction du 2- (N-hydroxyimino) -3- {N- [2- (2-méthoxy-2-oxoéthyl) phényle] (2-nitrobenzène) sulfonamido} propanoate d'éthyle



A une solution de l'intermédiaire **25a** (20 mg, 0.08 mmol) dans AcOH (1.1 mL) sont ajoutés du poudre de Zinc (51.16 mg, 0.79 mmol, 10 éqv.) et de la poudre de Fer (0.4 mg, 0.008 mmol, 0.2 éqv.) par petites portions. Le mélange réactionnel est chauffé à 65°C pendant deux heures.

Le milieu réactionnel est ensuite filtré, neutralisé avec du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> *aq.* (1M) puis lavé avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur plaque préparative avec un éluant d'Acétate d'éthyle : Ether de pétrole (1 :1). Quatre spots sont séparés nommés S1 à S4 du moins polaire au plus polaire

**S1 (26)** est obtenu (3.7 mg, rdt = 20%). Ce produit est caractérisé par RMN<sup>1</sup>H et RMN cosy.

**RMN<sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 8.43 (d, *J* = 8.3 et 1.1Hz, 1H, H-3') ; 7.79 (dd, *J* = 8.1 et 1.4 Hz, 1H, H-6') ; 7.60 (dt, *J* = 7.5 et 1.2 Hz, 1H, H-4') ; 7.39 (dd, *J* = 7.7 et 1.2Hz, 1H, H-2) ; 7.32 (dt, *J* = 7.5 et 1.2Hz, 1H, H-4) ; 7.23 (dt, *J* = 7.5 et 1.0 Hz, H-5') ; 7.17 (m, 1H, H-3) ; 6.63 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-5) ; 4.55 (m, 1H, H-9) ; 4.32 (m, 3H, OEt et Ha-8) ; 3.89 (m, 1H, Hb-8) ; 3.85 (s, 3H, OMe) ; 1.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, OEt).

**S2 (27)** est obtenue (4.1 mg, rdt = 20%). Ce produit est caractérisé par RMN<sup>1</sup>H et RMN cosy.

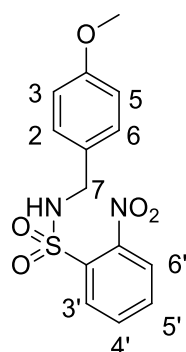
**RMN<sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.30 (m, 3H, H-3'et H4' et H-5') ; 7.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-6') ; 7.03 (d, *J* = 7.7 Hz, , 1 H, H-2) ; 6.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-5) ; 6.64 (m, 2H, H-3 et H-4) ; 4.75 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 4.55 (m, 1H, H-9) ; 4.39 (dd, *J* = 13.4 et 3.6 Hz, 1H, Ha-8) ; 4.30 (q, 2H, *J* = 7.4 Hz, OEt) ; 3.98 (dd, *J* = 13.4 et 3.6 Hz, 1H, Hb-8) ; 3.84 (s, 3H, OMe) ; 1.43 (t, *J* =7.4 Hz, 3H, OEt).

**S3 (15a)** est obtenue (2.3 mg, rdt = 17%).

**S4** est indéterminé.



## N- (4-méthoxybenzyl) -2-nitrobenzènesulfonamide (**29**)



**Formule brute** : C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S

**Poids moléculaire** : 322.06

A une solution de 4-méthoxybenzylamine (619 mg, 4.52 mmol) et de Et<sub>3</sub>N (1.26 ml, 9.03 mmol, 2 éqv.) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 ml) 0°C est ajouté du chlorure de nitro-benzène-sulfonamide (1000 mg, 4.52 mmol, 1 éqv.) au goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 16 heures.

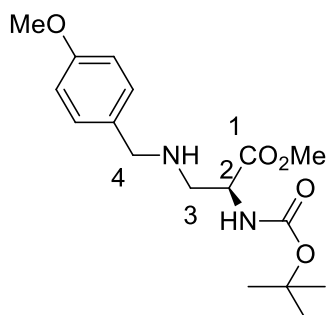
Le milieu réactionnel est concentré sous vide, repris dans AcOEt et lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> aq. (1N) puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant d'acétate d'éthyle : Ether de pétrole (1 :1). Le produit **29** est obtenu sous forme d'une huile incolore (1.45 g, Rdt = quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 8.02 (dd, *J* = 7.5 et 2 Hz, 1H, H-6') ; 7.84 (dd, *J* = 7.5 et 2 Hz, 1H, 3') ; 7.66 (m, 2H, H-4' et H-5') ; 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 5.63 (br s, 1H, NH) ; 4.27 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-7) ; 3.77 (s, 3H, OMe). Même valeurs que la littérature

<sup>298</sup>

<sup>298</sup> T. Fukuyama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373-6374

(S)-2-((tert-butoxycarbonyl) amino)-3- (4-méthoxy-benzylamino) propanoate de méthyle (**31**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Poids moléculaire** : 338.18

A une solution de l'intermédiaire **34** (201 mg, 0.72 mmol) et de MgSO<sub>4</sub> (199 mg, 1.66 mmol, 2.3 éqv.) dans le MeOH (7.9 mL) est ajouté du *para*-méthoxybenzaldéhyde (55 mg, 1.08 mmol, 1.5 éqv.). Le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. La formation de l'imine est confirmée par RMN <sup>1</sup>H.

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 8.20 (s, 1H, CH=N) ; 7.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar) ; 6.92 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar) ; 4.65 (m, 1H, H-2) ; 3.85(s, 3H, OMe) ; 3.75(s, 3H, OMe) ; 3.85-3.75 (m, 2H, H-3) ; 1.45 (s, 9H, Me).

Ensuite, du NaBH<sub>4</sub> (147 mg, 1.44 mmol, 2 éqv.) est ajouté au milieu réactionnel à 0°C en petites portions. Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 min.

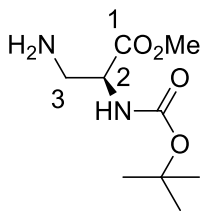
Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide, dissout dans NaHSO<sub>4</sub> aq. (1M) et extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est alcalinisée par NaOH aq. (1M) et extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant éther de pétrole et d'acétate d'éthyle (1 :1). Le produit **31** est obtenu sous forme d'une huile incolore (128 mg, Rdt =35%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.20 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ar) ; 6.85 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ar) ; 5.42 (br s, 1H, NH) ; 4.41 (m, 1H, H-2) ; 3.81(s, 3H, OMe) ; 3.74(s, 3H, OMe) ; 3.80-3.71 (m, 2H, H-3) ; 2.97 (m, 2H, H-4) ; 1.45 (s, 9H, Me).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 172.40 (C-1) ; 158.73 (C=O) ; 155.53 (C-Ar) ; 131.87 (C-Ar) ; 129.26 (2C-Ar) ; 113.78 (2C-Ar) ; 79.95 (C-Boc) ; 55.26 (C-OMe) ; 53.50 (C-2) ; 52.77 (C-3) ; 52.36 (OMe) ; 49.86 (C-4) ; 28.29 (C-Me)

**HR-MS (ESI- QTof)**: C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 339.19145; trouvé : 339.19151.

(S)-3-amino-2-((tert-butoxycarbonyl) amino) propanoate de méthyle (**34**)



**Formule brute** : C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

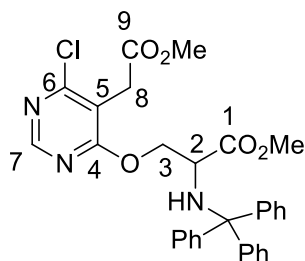
**Poids moléculaire** : 218.13

A une solution d'acide (S) 3-amino-2-((tert-butoxycarbonyl) amino) propanoïque (250 mg, 1.23 mmol) dans un mélange MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 8) (4.22 mL) à 0°C est ajouté du (triméthylsilyl) diazométhane (0.74 mL, 1.47 mmol, 1.2 éqv.) au goutte à goutte. Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le produit **34** est obtenu sous forme d'une huile incolore (209 mg, Rdt. 78%) et est directement utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)** : 4.18 (br, 1H, NH) ; 3.75 (s, 3H, OMe) ; 3.74 (m, 1H, H-1) ; 3.01 (dd, J = 13.4 et 7.1 Hz, 1H, Ha-2) ; 2.87 (dd, J = 13.4 et 7.1 Hz, 1H, Hb-2) ; 1.45 (s, 9H, Boc). Même valeurs que la littérature<sup>299</sup>

3 - {[6-chloro-5- (2-méthoxy-2-Oxoéthyl) pyrimidin-4-yl] oxy} -2- [(Triphénylméthyl) amino] propanoate de méthyle (**36**)



**Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**Poids moléculaire** : 545.17

A une solution de méthyle 4,6-dichloro-pyrimidin-5-yl-acétate (55.6 mg, 0.25 mmol) et de l'intermédiaire **18** (100 mg, 0.28 mmol, 1.1 éqv.), dans le THF (2.5 mL) à 0°C, est ajouté du NaH (22.13 mg, 0.56 mmol, 2.2 éqv.) par petites portions. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit.

Le milieu réactionnel est concentré sous vide, repris dans de l'AcOEt et ensuite lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> aq. (1N) puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées. Le mélange a été purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant d'Acétate

<sup>299</sup> W. A. Xiangdong *et al.*, WO2008/64057 A1, 2008, 82-83

d'éthyle : Ether de pétrole et (1: 3). Le produit **36** est obtenu sous forme d'une huile incolore (117 mg, Rdt =50%).

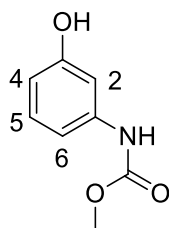
**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 295 K)** : 8.51 (s, 1H, H-7) ; 7.51 (m, 6H, Ar) ; 7.25 (m, 9H, Ar) ; 4.78 (dd, *J* = 10.5 et 5.1 Hz, 1H, Ha-3) ; 2.87 (dd, *J* = 10.5 et 7.7 Hz, 1H, Hb-3) ; 3.76 (m, 1H, H-2) ; 3.70 (s, 2H, H-8) ; 3.66 (s, 3H, OMe) ; 3.19 (s, 3H, OMe) ; 2.85 (br d, 1H, *J* = 10.7 Hz, NH) .

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 295 K)** : 172.92 (C-1) ; 169.19 (C-9) ; 167.87 (C-4) ; 160.68 (C-7) ; 156.22 (C-6) ; 145.50 (C-Tr) ; 128.67-127.97 (15C- Tr), 126.59 (3C-Tr) ; 113.84 (C-3) ; 69.43 (C-Tr) ; 55.30 (C-2) ; 52.32 (OMe) ; 51.92 (OMe) ; 31.43 (C-8).

**HR-MS (ESI- QTof)**: C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>NaN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> calculé : 568.16097; trouvé : 568.16202.

## Métathèse cyclisante

### Méthyle N- (3-hydroxyphényl) carbamate (**39**)



**Formule brute** : C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>

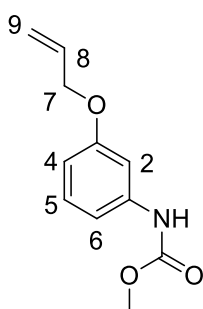
**Poids moléculaire** : 167.16

A une solution, de 3-aminophénol (200 mg, 1.83 mmol) dans l'acétate d'éthyle (20mL) sont ajoutés une solution de NaHCO<sub>3</sub> *aq.* 1M (5.2 mL, 3 éqv.), suivie par le chloroformiate de méthyle (156  $\mu$ L, 2.02 mmol, 1.1 éqv.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

Les deux phases sont séparées. La phase organique est ensuite lavée avec une solution de HCl *aq.* (1N) puis avec de l'eau et enfin avec de la saumure. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant d'AcOEt : Ether de pétrole et (1 : 1). Le produit **39** est obtenue sous forme d'une huile incolore (306 mg, quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.32 (m, 1H, H-2); 7.15 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5); 6.71 (br s, 1H, NH); 6.68 (ddd, *J* = 8.1, 2.0 et 0.7 Hz, 1H, H-4) ; 6.58 (ddd, *J* = 8.10, 2.2 et 0.9 Hz, 1H, H-6) ; 6.23 (br s, 1H, OH) ; 3.80 (s, 3H, OMe). Même valeurs que la littérature<sup>300</sup>

### Méthyl-N- (3-allyloxy-phényle) carbamate (**40**)



**Formule brute** : C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 207.23

<sup>300</sup> J. Steven *et al.*, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6666-6671

A une solution de N- (3-hydroxyphényl) carbamate **39** (100 mg, 0.60 mmol) dans l'acétone (6 mL) sont ajoutés du carbonate de potassium (99 mg, 0.72 mmol, 1.2 éqv.) et du bromure d'allyle (63 µL, 0.82 mmol, 1.2 éqv.). Puisle milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 16 heures.

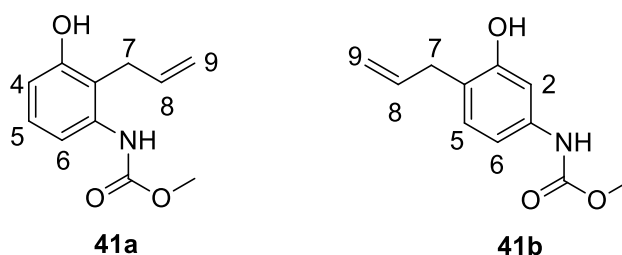
Le milieu réactionnel est évaporé à sec, puis dilué dans l'acétate d'éthyle. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice avec comme éluant un mélange 9 :1 d'Ether de pétrole : AcOEt. Le produit **40** est obtenu sous forme d'une huile incolore (104 mg, rdt = 84%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.19 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5) ; 7.15 (m, 1H, H-2) ; 6.87 (dd, *J* = 8.2 et 1.1 Hz, 1H, H-4) ; 6.68 (br s, 1H, NH) ; 6.64 (ddd, *J* = 8.2 , 2.3 et 0.9 Hz, 1H, H-6) ; 6.04 (m, 1H, H-8) ; 5.42 (dq, *J* = 17.2 et 1.6 Hz, 1H , Ha-9) ; 5.28 (dq, *J* = 10.1 et 1.5 Hz, 1H, Hb-9) ; 5.54 (dt, *J* = 5.2 et 1.4 Hz, 2H, H-7) ; 3.78 (s, 3H, OMe).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** : 159.6 (CO); 154.3 (C-3); 139.4 (C-1); 133.5 (C-8); 130.1 (C-5); 118.1 (C-9); 111.4 (C-6); 110.3 (C-4); 105.6 (C-2); 69.2 (C-7); 52.7 (OMe).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> calculé : 230.0788; trouvé : 230.0771.

Réarrangement de Claisen : Méthyle N- (4-allyl-3-hydroxy-phényl) carbamate (**41a**) et Méthyle N-(2-allyl-3-hydroxy-phényl) carbamate (**41b**)



**Formule brute** : C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 207.23

Du méthyle N- (3-allyloxy-phényl) carbamate (208 mg, 9.65 mmol) est dissout dans du Sulfolane (40 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 195°C pendant 6 heures.

Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante puis dilué dans de l'eau chaude et extrait avec de le tertio-butyle méthyléther. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne (éluant Ether de pétrole : AcOEt, 8 : 2). Les deux régioisomères **41a** et **41b** sont alors isolés. Le composé **41a** est obtenu avec un rendement de 45% et **41b** avec un rendement de 55%.

**Produit 41a :**

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.37 (br s, 1H, H-6) ; 7.11 (t, J = 8.3 Hz, 1H, H-5); 6.62 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-4) ; 6.57 (br s, 1H, NH); 5.96 (m, 1H, H-8); 5.22 (br s, 1H, OH) ; 5.16 (dq, J = 10.4 et 1.7 Hz, 1H, Ha-9) ; 5.06 (dq, J = 17.4 et 1.6 Hz, 1H, Hb-9) ; 3.77 (s, 3H, OMe) ; 3.44 (dt, J = 5.7 et 1.7 Hz, 2H, H-7).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)** : 153.6 (CO); 136.9 (C-3); 134.9 (C-4); 127.2 (C-5 et C-1); 115.7 (C-6 et C-8); 111.3 (C-9); 110.1 (C-2); 52.1 (CMe<sub>3</sub>); 28.3 (C-7).

**HR-MS (ESI-QTof)** : C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub> [M+H] calculé : 208.09868; trouvé : 208.0966.

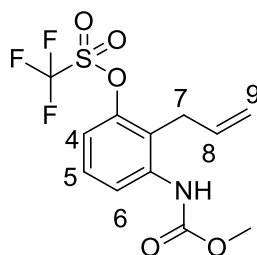
#### Produit 41b :

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.12 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-2) ; 7.01 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5) ; 6.73 (dd, J = 8.1 et 2.0 Hz, 1H, H-6) ; 6.56 (br s, 1H, OH) ; 5.99 (m, 1H, H-8) ; 5.14 (dq, J = 9.5 et 1.6 Hz, 1H, Ha-9) ; 5.10 (br t, J = 1.5 Hz, 1H, Hb-9) ; 3.78 (s, 3H, OMe) ; 3.36 (br d, J = 6.3 Hz, 2H, H-7).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)** : 154.9 (CO); 137.7 (C-3); 136.9 (C-8); 130.8 (C-5); 116.3 (C-4); 116.3 (C-9); 112.2 (C-1); 111.4 (C-6); 107.0 (C-2); 52.6 (OMe); 34.5 (C-7).

**HR-MS (ESI-QTof)** : C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub> [M+H] + calculé : 208.0987; trouvé : 208.0960.

#### Méthyle N -(2-allyl-3-trifluorométhanesulfonyloxy-phényl) carbamate (**42**)



**Formule brute:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>S

**Poids moléculaire:** 339.29

À une solution de Méthyl-N-(2-allyl-3-hydroxy-phényl) carbamate **41a** (200 mg, 0.9 mmol) et de Et<sub>3</sub>N (269 µL, 1.93 mmol, 2 éqv.) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (10 mL) est ajoutée de l'anhydride trifluorométhanesulfonique (209 µL, 1.26mmol, 1.3 éqv.) à 0°C. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est traité par NaHCO<sub>3</sub> concentré puis dilué avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après séparation des phases, la phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (3 : 1). Le produit **42** est obtenu sous forme d'une huile orange avec un rendement de 73 %.

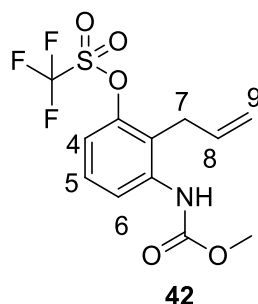
**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6) ; 7.35 (t, J = 8.5 Hz, 1H, H-5) ; 7.08 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-4) ; 6.81 (br s, 1H, NH) ; 5.92 (m, 1H, H-8) ; 5.24 (dq, J = 10.2 et 1.4 Hz, 1H, Ha-9) ; 5.11 (dq, J = 17.2 et 1.2 Hz, 1H, Hb-9) ; 3.79 (s, 3H, OMe) ; 3.49 (dt, J = 5.7 et 1.7 Hz, 2 H, H-7).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** 192.8 (CO) ; 153.9 (C-3); 147.7 (C-1); 138.8 (C-2); 133.4 (C-8); 128.4 (C-5); 121.3 (C-6); 120.6 (CF<sub>3</sub>); 117.7 (C-9); 116.6 (C-4); 52.6 (OMe); 29.5 (C-7)

**RMN <sup>19</sup>F (δ, CDCl<sub>3</sub>, 282 MHz):** -73.74 (s, CF<sub>3</sub>)

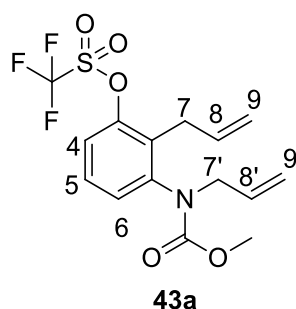
**HR-MS (ESI-QToF) :** C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>S[M+H]<sup>+</sup> calculé : 340.0461; trouvé : 340.0455.

Méthyle N,N-allyl -(2-allyl-3-trifluorométhanesulfonyloxy-phényl) carbamate (**43a**)



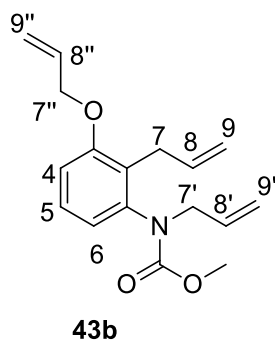
**Formule brute:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>S

**Poids moléculaire :** 339.29



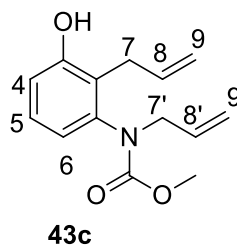
**Formule brute:** C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>S

**Poids moléculaire :** 379.35



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire :** 287.35



**Formule brute :** C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire :** 247.29

A une solution de l'intermédiaire **42** (40 mg, 0.12 mmol) dans le THF (2 mL) à 0°C est ajouté du NaH (65.5 mg, 0.13 mmol, 1.1 éqv.) pendant 30 min. A ce mélange sont ajoutés du bromure d'allyle (16 µL, 0.18 mmol, 1.1 éqv.) et de l'iodure de tétrabutylammonium (4 mg, 0.01 mmol, 0.1 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite traité avec de l'eau puis extrait avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée avec du MgSO<sub>4</sub> puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (98 : 2). Quatre produits sont séparés.

Les produits **42**, **43a** et **43b** sortent très proches et leur séparation par chromatographie sur colonne est difficile. Par contre, leur présence est identifiée par RMN <sup>19</sup>F et par spectroscopie de masse



La RMN  $^{19}\text{F}$  a montré la présence de deux produits :

**RMN  $^{19}\text{F}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 282 MHz):** -73.93 (s,  $\text{CF}_3$ ) (**42**), -78.33 (s,  $\text{CF}_3$ ) (**43a**)

La spectroscopie de masse a montré la présence de trois produits

**(42) HR-MS (ESI-QToF) :**  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé : 340.0461; trouvé : 340.04622.

**(43a) HR-MS (ESI-QToF) :**  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé : 380.07740; trouvé : 380.07764.

**(43b) HR-MS (ESI-QToF) :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé : 288.15942; trouvé : 288.15980.

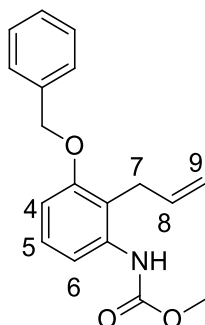
Le produit secondaire **43c** est isolé sous-forme d'une huile incolore (6 mg, rdt = 23%)

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :** 7.14 (t,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-5) ; 6.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-6) ; 6.73 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-4) ; 5.89 (m, 2H, H-8 et H-8') ; 5.20-2.08 (m, 5H, H-9, H9' et OH) ; 4.43 (dd,  $J = 14.5$  et 5.8 Hz, 1H, Ha-7') ; 3.94 (dd,  $J = 14.5$  et 5.8 Hz, 1H, Hb-7') ; 3.62 (br s, 3H, OMe), 3.34 (br d,  $J = 3.5$  Hz, 2H, H-7)

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) :** 156.6 (C-CO) ; 155.6 (C-1) ; 154.4 (C-2) ; 135.6 (C-8') ; 133.1 (C-8) ; 127.5 (C-5) ; 123.9 (C-3) ; 120.9 (C-6) ; 118.4 (C-4) ; 116.3 (C-9') ; 115.8 (C-9) ; 53.7 (C-OMe) ; 53.06 (C-7') ; 30.3 (C-7).

**HR-MS (ESI-QToF) :**  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé : 248.12812; trouvé : 248.12897.

Méthyl N-(2-allyle-3- benzyloxy-phényl) carbamate (**44**)



**Formule brute :**  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3$

**Poids moléculaire :** 297.35

À une solution de Méthyl-N-(2-allyl-3-hydroxy-phényl) carbamate **41a** (200 mg, 0.97 mmol) et de carbonate du potassium (200 mg, 1.45 mmol, 1.5 éqv.) dans du DMF (2 mL) est ajouté du bromure de Benzyle (128  $\mu\text{L}$ , 1.07 mmol, 1.3 éqv.) à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

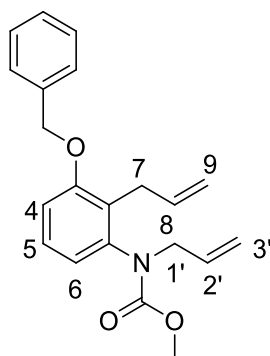
Le milieu réactionnel est dilué dans du diéthyle éther puis lavé avec de l'eau. La phase organique est ensuite lavée avec de la saumure, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (4 : 1). Le produit **44** est obtenu sous forme d'une huile orange (243 mg, rdt = 85 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6) ; 7.45-7.32 (m, 5H, Ar) ; 7.22 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5) ; 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4) ; 6.67 (br s, 1H, NH) ; 5.92 (m, 1H, H-8) ; 5.14-5.03 (dd, *J* = 1.5 Hz, 2H, Ha-9 et Hb-9) ; 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 3.79 (s, 3H, OMe) ; 3.49 (Br d, *J* = 5.5, 2 H, H-7).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**: 155.6 (C-CO) ; 154.4 (C-3); 137.2 (C-1); 137.1 (C-Ar); 135.7 (C-5); 128.6 (2C-Ar); 127.9 (C-Ar); 127.1 (C-8); 127.5 (2C-Ar); 115.1 (C-9); 114.3 (C-4); 108.2 (C-6); 107.4 (C-2); 69.9 (CH<sub>2</sub>); 51.8 (OMe); 28.2 (C-7)

**HR-MS (ESI-QTof)** : C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup> calculé : 298.1477; trouvé : 298.1429.

Méthyl-N, N allyle- (2-allyl-3-benzyloxy-phényl) carbamate (**45**)



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 337.41

À une solution de 2-allyl-3-benzyloxy N- (méthoxy ester carbonyle) aniline **44** (90 mg, 0.31 mmol) dans du THF (3.6 mL), est ajoutée du NaH (13.32 mg, 0.34 mmol, 1.1 éqv.). Le milieu réactionnel est alors agité à 0°C pendant 30min. À ce mélange sont ajoutés du bromure d'allyle (40mg, 0.34 mmol, 1.1 éqv.) et de l'iodure de tétrabutylammonium. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures.

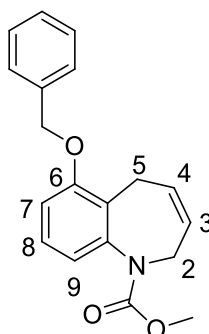
Le milieu réactionnel est traité avec de l'eau puis lavée avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporé à l'évaporateur rotatif. Le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (95 : 5). Le produit **45** est obtenue sous forme d'une huile orange (102 mg, Rdt = quantitative).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.46-7.31 (m, 5H, Ar) ; 7.18 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5) ; 6.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-6) ; 6.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4) ; 5.92 (m, 2H, H-8 et H-8') ; 5.14 (br s, 1H, Ha -9) ; 5.10 (s, 3H, Hb -9 et CH<sub>2</sub>) ; 5.00 (m, 1H, Ha -9') ; 4.96 (m, 1H Hb-9') ; 4.53 (br m, 1H, Ha -7') ; 3.76 (br m, 1H, Hb-7') ; 3.61 (s, 3H, OMe) ; 3.36 (Br d, *J* = 6.2, 2 H, H-7).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**: 157.5 (C-CO) ; 156.2 (C-3); 135.9 (C-1); 135.7 (C-Ar); 133.4 (C-5); 128.5 (2C-Ar); 128.3 (C-Ar); 127.9 (C-8); 127.1 (2C-Ar); 121.6 (C-2'); 118.0 (C-6); 115.1 (C-9); 111.1 (C-4); 107.4 (C-2); 98.1 (C-3'); 70.2 (CH<sub>2</sub>); 57.5 (C-3') ; 52.8 (OMe); 28.21 (C-7)

**HR-MS (ESI-QTof)** : C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup> calculé : 338.1751; trouvé : 338.1749

Méthyl-6- (benzyloxy) -2,5-dihydro-1H-1-benzazépine-1-Carboxylate (**46**)



**Formule brute** : C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 309.14

A une solution de l'intermédiaire **45** (90 mg, 0.27 mmol) dans du toluène (2.7 mL) est ajouté le catalyseur de Grubbs II (6.81 mg, 0.008 mmol, 0.03 éqv.). Le milieu réactionnel est agité à 60°C pendant 4 heures.

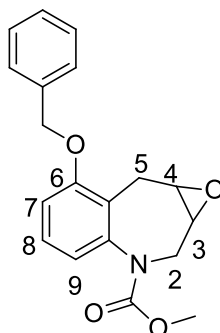
Le milieu réactionnel est filtré puis purifié par chromatographie sur colonne avec comme éluant un mélange 95 : 5 d'Ether de pétrole : Acétate d'éthyle. Le produit **46** est obtenu sous forme d'une huile orange (62 mg, Rdt = 75 %).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 323 K) : 7.46-7.33 (m, 5H, Ar) ; 7.18 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-8) ; 6.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-9) ; 6.89 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7) ; 5.80 (m, 1H, H-3) ; 5.53 (m, 1H, H-4) ; 4.33 (br s, 2H, H-2) ; 3.72 (s, 3H, OMe) ; 3.56 (Br d, 2H, H-5).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): 155.9 (C-CO) ; 155.7 (C-6) ; 137.1 (C-1) ; 129.4 (C-Ar) ; 129.2 (C-2) ; 128.1 (2C-Ar) ; 127.9 (C-3) ; 127.3 (2C-Ar) ; 127.1 (C-Ar) ; 126.9 (C-4) ; 124.7 (C-9) ; 120.1 (C-7) ; 111.7 (C-6a) ; 71.1 (C-CH<sub>2</sub>) ; 52.8 (C-OMe) ; 47.6 (C-2) ; 22.5 (C-5)

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup> calculé : 310.1438; trouvé : 310.1427.

Méthyl-6- (benzyloxy) -2,3,4,5- tétrahydro-3,4-epoxy-1H-1-benzazépine -1-Carboxylate (**49**)



**Formule brute** : C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 325.13

A une solution de l'intermédiaire **46** (100 mg, 0.33 mmol) dans de l'acétone (9 mL) sont ajoutés une solution de NaHCO<sub>3</sub> *aq.* 1M (10 mL, 11 mmol, 34 éqv.) et de l'oxone (1.9 g, 3.23 mmol, 10 éqv.) à 0°C. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 2 heures.

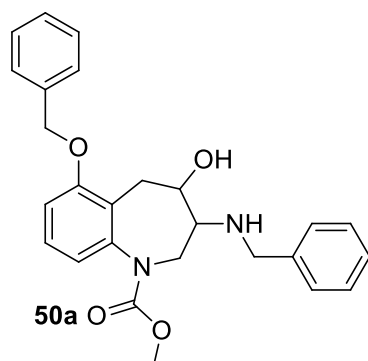
Ensuite, l'acétone est évaporée sous-vide et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporée. Le résidu est alors purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (95 : 5). Le produit **49** est obtenu sous forme d'une huile incolore (21 mg, 62%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 323 K) : 7.46-7.35 (m, 5H, Ar) ; 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-8) ; 6.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-9) ; 6.89 (br d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-7) ; 5.17 (m, 1H, Ha-2) ; 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 4.45 (m, 1H, Hb-2) ; 3.77 (m, 2H, H-5) ; 3.65 (br s, 3H, OMe) ; 3.31 (m, 1H, H-3) ; 3.31 (br s, 1H, H-4).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) : 156.1(C-CO) ; 142.4 (C-6) ; 137.1(C-1) ; 134.3 (C-Ar) ; 130.5 (C-8) ; 128.9 (2C-Ar) ; 128.3 (C-Ar) ; 127.7 (2C-Ar) ; 120.3 (C-7) ; 112.6 (C-9) ; 110.6 (C-6a) ; 71.1 (C-CH<sub>2</sub>) ; 60.7 (C-3) ; 58.7 (C-4) ; 54.2 (C-OMe) ; 53.5 (C-2) ; 52.8 (C-5).

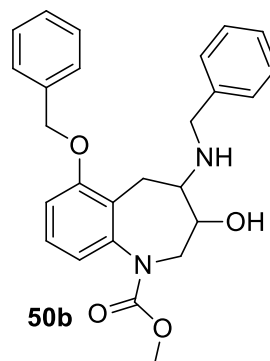
**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>[M+H]<sup>+</sup> calculé : 326.1387 ; trouvé : 326.1383.

Méthyl- 3- (benzylamino) -6- (benzyloxy) -4-hydroxy- 2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépine-1-carboxylate (**50a**) et méthyl- 4- (benzylamino) -6- (benzyloxy) -3-hydroxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1-benzazépine-1-carboxylate (**50b**)



**Formule brute** : C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 432.51



**Formule brute** : C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 432.51

À une solution de l'intermédiaire **49** (22 mg, 0.06 mmol) dans de l'EtOH (1 ml) est ajoutée de la benzylamine (9 µL, 0.08 mmol, 1.2 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à 80°C pendant 20 heures jusqu'à conversion totale du substrat de départ.

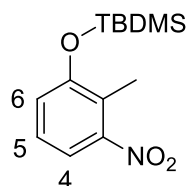
Le milieu réactionnel est traité avec de l'eau puis extrait avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur plaque préparative avec un éluant Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (7 : 3). Deux produits correspondants aux produits souhaités sont séparés (9 mg, rdt. 31%) et (13 mg, rdt. 44%). La caractérisation de ces produits par RMN-<sup>1</sup>H est très difficile due à l'empêchement de rotation et à l'encombrement stérique ainsi qu'à la présence de plusieurs diastéréoisomères. Par contre, leur formation est confirmée par spectroscopie de masse.

**Première produit : HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 433.2122; trouvé : 433.2127.

**Deuxième produit : HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 433.2122; trouvé : 433.2135.

### Amination réductrice

tert-butyl-diméthyle (2-méthyl-3-nitrophénoxy) silane (**55a**)



**Formule brute** : C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si

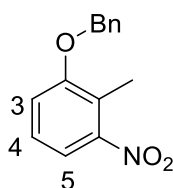
**Poids moléculaire** : 267.40

A une solution de 2-méthyl-3-nitrophénol (400 mg, 2.6 mmol) dans du THF (13.6 mL) sont ajoutés de l'imidazole (462.3 mg, 6.8 mmol, 2.6 éqv.) et du chlorure de *tert*-butyl-diméthyl-silyle (995.6 µL, 5.8 mmol, 2.2 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est concentré sous vide puis dilué avec de l'Et<sub>2</sub>O et ensuite lavé avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (1 : 3). Le produit final **55a** est obtenu sous forme d'une huile incolore (572.8 mg, rdt = 82 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4) ; 7.17 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5) ; 7.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6) ; 2.37 (s, 3H, Me) ; 1.04 (s, 9H, TBDMS), 0.26 (s, 6H, TBDMS). Même valeurs que la littérature<sup>301</sup>

2-benzyloxy-6-nitrotoluène (**55b**)



**Formule brute**: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 243.25

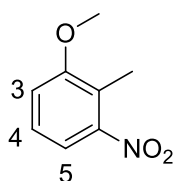
A une solution de 2-méthyl-3-nitrophénol (1.2 g, 6.5 mmol) dans de la DMF (10 mL) à température ambiante sont ajoutées du carbonate de potassium (1.4 g, 9.8 mmol, 1.5 éqv.) et du bromure de benzyle (859.1 µL, 7.2 mmol, 1.1 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

<sup>301</sup> Boehringer Ingelheim International GMBH; WO2011/63501 A1, 2011, 37

Le milieu réactionnel est concentré sous vide puis dilué avec de l'Et<sub>2</sub>O. Il est ensuite lavé avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant d'Ether de pétrole : AcOEt (1 : 3). Le produit **55b** est obtenu sous forme d'une huile incolore (1.4 g, rdt = 90 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.43 (m, 6H, H-5 et Bn) ; 7.25 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-4) ; 7.12 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-3) ; 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 2.44 (s, 3H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>302</sup>

#### 2-métoxy-6-nitrotoluène (**55c**)



**Formule brute:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire :** 167.06

A une solution de 2-méthyl-3-nitrophénol (250 mg, 1.6 mmol) dans de la DMF (15 mL) à 0°C est ajouté de l'hydrure de sodium (72 mg, 1.8 mmol, 1.1 éqv.) par petites portions. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30min. Ensuite, à ce mélange est ajouté de l'iodure de méthyle (112 µL, 1.8 mmol, 1.1 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à 80°C pendant 4 heures.

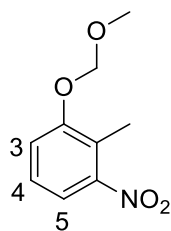
Ensuite, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, puis lavé avec de l'eau, et enfin avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (1 : 3). Le produit final **55c** est obtenu sous forme d'une huile incolore (195 mg, rdt = 71 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5) ; 7.30 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4) ; 7.05 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3) ; 3.90 (s, 3H, OMe) ; 2.36 (s, 3H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>303</sup>

#### 2-métoxy-métoxy-6-nitrotoluène (**55d**)

<sup>302</sup> Hisayuki *et al.*, *US2009/12123 A1*, **2009**, 9-10

<sup>303</sup> D. Quyên *et al.*, *Eur.J.Med.Chem.* **2008** ; 43 ; 12 ; 2677-2687



**Formule brute:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

**Poids moléculaire :** 197.07

A une solution de 2-méthyl-3-nitrophénol (1 g, 6.5 mmol) dans de la DMF (60 mL) à 0°C est ajouté de l'hydrure de sodium (313.4 mg, 7.9 mmol, 1.2 éqv.), le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30min. A ce mélange est alors ajouté du chlorure de méthoxyméthyle (744 µL, 9.8 mmol, 1.5 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à 80°C pendant 6 heures.

Le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, puis lavé avec de l'eau et enfin avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (1 : 3). Le produit final **55d** est obtenu sous la forme d'une huile incolore (800 mg, rdt = 69 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** 7.47 (dd, *J* = 8.1 et 1.36 Hz, 1H, H-5); 7.30 (m, 2H, H-4 et H-3) ; 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 3.50 (s, 3H, OMe) ; 2.40 (s, 3H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>304</sup>

1,2-dibromo-3-nitrobenzène (**56a**)



**Formule brute :** C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

**Poids moléculaire :** 280.90

A une solution de 1, 2 -dibromonitrobenzène (2 g, 8.47 mmol) à 0°C est ajouté de l'acide nitrique fumant (4 mL, 87.9 mmol, 10.4 éqv.). Le mélange réactionnel est agité pendant 15 min à 0°C.

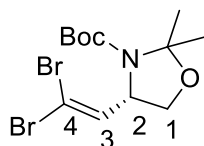
Le milieu réactionnel est versé dans de l'eau froide puis est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la saumure (1x), séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (95 : 5). Le produit **56a** est obtenu sous forme d'une huile incolore (595 mg, Rdt =25%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :** 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.2 et 1.7 Hz, H4) ; 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.2 et 1.7 Hz, H6) ; 7.29 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, H5). Même valeurs que la littérature<sup>305</sup>

<sup>304</sup> Alvaro *et al.*, WO20114/69951 A1, 2011, 61



(4S) -4- (2,2-dibrométhéthyl) -2,2-diméthyle-1,3-oxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle (**58**)



**Formule brute** : C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>

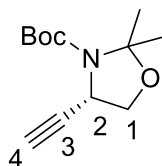
**Poids moléculaire** : 385.09

A une solution de CBr<sub>4</sub> (723 mg, 2.2 mmol, 2 éqv.) dans du dichlorométhane (2 mL) est ajoutée au goutte à goutte une solution de PPh<sub>3</sub> (1.2 g, 4.4 mmol, 4 éqv.) dans du dichlorométhane (2mL) à -30°C. Après 20 min d'agitation, la couleur du milieu réactionnel vire vers le rouge-orange indiquant la formation de l'ylure. Le milieu réactionnel est refroidi à -60°C puis y est ajoutée au goutte à goutte une solution de ((4S) -4-formyl-2,2-diméthyl-oxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle) (250 mg, 1.1 mmol) et de la triéthylamine (151.6 µL, 1.1 mmol, 1 éqv.) dans du dichlorométhane (5 mL). Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est traité par une solution NaHCO<sub>3</sub> aq. (1N), lavé avec de l'eau, puis avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à sec à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant ether de pétrole : AcOEt (95 : 5). Le produit **58** est obtenu sous forme d'un solide incolore (221 mg, Rdt =53 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**: 6.46 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-3), 4.53 (m, 1H, H-2) ; 4.11 (dd, J = 8.1 et 6.3 Hz, 1H, Ha-1) ; 3.82 (br d, J = 8.1 Hz, 1H, Hb-1) ; 1.62 (br s, 3H, Me) ; 153 (Br s, 3H, Me) ; 1.50 (s, 9H, tBu). Même valeurs que la littérature<sup>306</sup>

Tert-butyl (S)-4-éthynyl-2,2-diméthyle-oxazolidine-3-carboxylate (**57**)



**Formule brute** : C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 225.28

A une solution de **58** (221 mg, 0.58 mmol) dans du THF à 0°C est ajouté au goutte à goutte du bromure d'éthyle magnésium (3M, dans diéthyle éther) (382.6 µL, 1.148 mmol, 2 éqv.) . Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est traité avec une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl, extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporée. Le

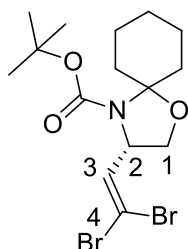
<sup>305</sup> P. Robert *et al.*, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2736-2742

<sup>306</sup> G. Reginato *et al.*, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6187-6192

résidu est purifié par chromatographie sur silice avec comme éluant un mélange 95 : 5 d'Ether de pétrole : AcOEt. Le produit **57** est obtenu sous forme d'une huile jaune (113mg, Rdt =87 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** 4.52 (br s, 1H, H-2); 4.04 (m, 2H, H-1) ; 2.28 (br s, 1H, H-4) ; 1.62 (br s, 3H, Me) ; 1.51 (br s, 3H, Me) ; 1.47 (br s, 3H, tBu). Même valeurs que la littérature<sup>304</sup>

(4S) -4- (2,2-dibrométhéthyl) -2,2-spiro [4.5] décane-1,3-oxazolidine-3-carboxylate de tert-butyle (**59**)



**Formule brute :** C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire :** 425.16

A une solution de CBr<sub>4</sub> (615.6 mg, 1.8 mmol, 2 éqv.) dans du dichlorométhane (2 mL) est ajoutée au goutte à goutte une solution de PPh<sub>3</sub> (973.8 mg, 3.8 mmol, 4 éqv.) dans du dichlorométhane (2mL) à -30°C. Après 20 min d'agitation, la couleur du milieu réactionnel vire vers le rouge-orange indiquant la formation de l'ylure. Le milieu réactionnel est refroidi à -60°C et y est ajoutée au goutte à goutte une solution de (S)-tert-butyle 3-formyl-1-oxa-4-azaspiro [4.5] décane-4-carboxylate d'éthyle (250 mg, 0.9 mmol) et de la triéthylamine (129 µL, 0.9 mmol, 1 éqv.) dans le dichlorométhane (4.5 mL). Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant 2 heures.

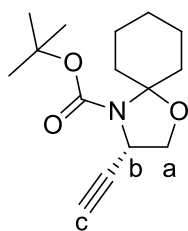
Le milieu réactionnel est traité avec une solution NaHCO<sub>3</sub> aq. (1N), lavé avec de l'eau, puis avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée à sec à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (95 : 5). Le produit **59** est obtenu sous forme d'un solide incolore (314 mg, Rdt =80 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** 6.43 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H-3), 4.50 (m, 1H, H-2) ; 4.01 (dd, J = 8.5 et 6.3 Hz, 1H, Ha-1) ; 3.74 (br d, J = 8.5 Hz, 1H, Hb-1) ; 2.44 (m, 1H, CH<sub>2</sub>) ; 2.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub>) ; 1.59 (m, 7H, CH<sub>2</sub>) ; 1.50 (s, tBu) ; 1.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** 151.2 (C-CO) ; 138.6 (C-3) ; 95.4 (C-NCO) ; 92.2 (C-4) ; 79.9 (C-Me<sub>3</sub>) ; 66.8 (C-1) ; 59.5 (C-2) ; 30.7 (2C-CH<sub>2</sub>) ; 28.1 (3C-Me<sub>3</sub>) ; 24.1 (C-CH<sub>2</sub>) ; 22.9 (C-CH<sub>2</sub>) ; 22.8 (C-CH<sub>2</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF) :** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NBr<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 426.0000; trouvé : 426.0010.

Tert-butyl (S)-4-ethynyl-2,2-spiro [4.5] décane-oxazolidine-3-carboxylate (**60**)



**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 265.13

A une solution de l'intermédiaire **59** (209 mg, 0.49 mmol) dans du THF à 0°C est ajouté au goutte à goutte du bromure d'éthyle magnésium (3M, dans diéyle éther) (492.4 µL, 1.47 mmol, 3 éqv.) . Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 2 heures.

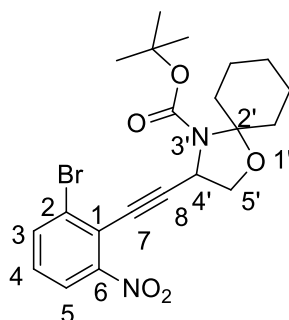
Le milieu réactionnel est traité avec une solution NH<sub>4</sub>Cl saturée, extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (95 : 5). Le produit **60** est obtenu sous forme d'une huile jaune (120 mg, Rdt =92 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)**: 4.49 (m, 1H, H-2) ; 3.99 (m, 2H, H-1) ; 2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.24 (m, 2H, H-4 et CH<sub>2</sub>); 1.59 (m, 7H, CH<sub>2</sub>); 1.48 (s, tBu); 1.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)**: 150.3 (CO); 95.7 (OCN); 83.1 (C-3); 80.3 (C-Me<sub>3</sub>); 69.8 (C-4); 68.5 (C-1); 48.2 (C-2); 34.1 (C-CH<sub>2</sub>); 31.5 (C-CH<sub>2</sub>); 28.3 (3C-Me<sub>3</sub>); 24.5 (C-CH<sub>2</sub>); 23.3 (C-CH<sub>2</sub>); 23.2 (C-CH<sub>2</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : la source d'ionisation est non convenable pour ioniser cette molécule.

Tert-butyle 3- [2- (2-bromo-6-nitrophényl) éthynyl] -1-Oxa-4-azaspiro [4.5] décane-4-carboxylate (**53**)



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Poids moléculaire** : 465.34

A une solution de l'alkyne terminal **60** (20 mg, 0.07mmol) et de 1-bromo-2-fluoro-3-nitrobenzène (20 mg, 0.09 mmol, 1.2 éqv.) dans du THF (1.5 mL) est ajouté du NaHDMS (100 µL, 0.19 mmol, 2.5 éqv.). Le mélange réactionnel est agité à 60°C pendant 5 heures.

Le milieu réactionnel est dilué dans du diéther et extrait avec de l'eau. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , puis évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (95 : 5). Le produit **53** est obtenu sous forme d'une huile jaune (13 mg, Rdt =37 %).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):** 8.01 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-3) ; 7.89 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-5) ; 7.32 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-4); 4.65 (m, 1H, H-4') ; 4.26 (dd,  $J = 8.5$  et 6.3 Hz, 1H, Ha-5') ; 4.03 (dd,  $J = 8.5$  et 6.3 Hz, 1H, Hb-5') ; 2.38 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 1.77 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ); 1.57 (s, 9H, tBu)

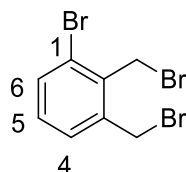
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):** 153.5 (C-CO) ; 148.4 (C-6) ; 132.1 (C-3) ; 1307 (C-1) ; 128.6 (C-5) ; 127.9 (C-4) ; 120.7 (C-2) ; 94.8 (C-NCO); 88.3 (C-7); 83.1 (C-8); 81.4 (C-C-Me); 68.5 (C5'); 58.1 (C-4'); 34.4 (2C- $\text{CH}_2$ ); 28.2(3C-Me); 25.2 (C- $\text{CH}_2$ ); 23.5 (2C- $\text{CH}_2$ )

**HR-MS (ESI-QToF) :**  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé : 465.0947 ; trouvé : 465.1025.

## Exploitation du sous-site S1'

### Synthèse d'aminobenzosubérone (Caractérisations identiques à celles décrites dans la littérature <sup>307</sup>)

1 bromo-2,3-bis (bromo-méthyle)-benzène (**68**)



**Formule brute** : C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>3</sub>

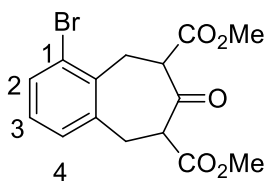
**Poids moléculaire** : 342.85

A une solution de 3-bromo-*o*-xylène (10 g, 54.1 mmol) et de NBS (19.4 g, 108.1 mmol, 2 éqv.) dans du CCl<sub>4</sub> (59 mL) est ajouté de l'AIBN (0.27 mg, 1.63 mmol, 0,03 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à 80 °C pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite filtré et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. Le produit **68** est obtenu sous forme d'une huile jaune claire (18.53 g, quant). Le produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : 7.60 (d, *J* = 8.12 Hz, 1H, H-6) ; 7.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4) ; 7.60 (t, *J* = 7.88, 1H, H-5) ; 4.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br) ; 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br).

Diméthyle 1 bromo-7-oxo-5,6,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène -6,8-dicarboxylate (**69**)



**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>5</sub>

**Poids moléculaire** : 355.18

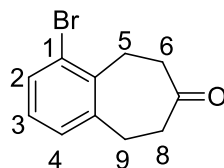
A une solution de 1 bromo-2,3-bis (bromo-méthyle)-benzène **68** (18.5 g, 54.1 mmol) et de diméthyl 1,3-acétonedicarboxylate (9.58 mL, 64.86 mmol, 1.2 éqv.) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) est ajoutée goutte à goutte une solution de NBu<sub>4</sub>Br (10.4 g, 32.4 mmol, 0.6 éqv.) et de NaHCO<sub>3</sub> aq. 1 M (200 mL) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (97.53 mL), à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à 40°C pendant 16 heures.

<sup>307</sup> C. Maieranu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5716-5733

Après séparation des phases, la phase aqueuse est lavée avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les phases organiques obtenues sont évaporées à l'évaporateur rotatif puis reprises avec de l'AcOEt, lavées avec de la saumure, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentrées de nouveau à l'évaporateur rotatif. Le produit **69** est obtenu sous forme d'une huile jaune (19.2 g, quant). Le produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :** 7.45 (m, 1H, H-2) ; 7.20-7.10 (m, 2H, H-3 et H-4) ; 4.20-3.40 (m, 12H).

1 bromo-5,6,8,9-tétrahydrobenzocycloheptène-7-one (**70**)



**Formule brute :**  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrO}$

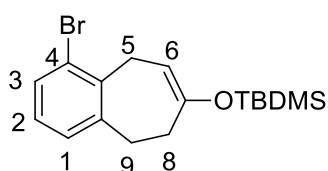
**Poids moléculaire :** 239.11

À une solution du Diméthyle 1-bromo-7-oxo-5,6,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6,8-dicarboxylate (9.6 g, 27.2mmol) dans du MeCN (100 mL) est ajoutée une solution aqueuse de NaOH *aq.* (2 M) (95.1 mL, 190.3 mmol, 7 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à 85°C pendant 16 heures.

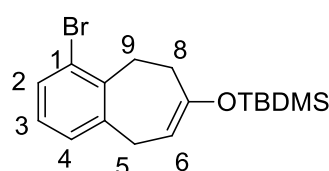
Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé par HCl concentré et le produit est extrait avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec de la saumure, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (9 : 1). Le produit **70** est obtenu sous forme d'un solide incolore (3.8 g, 56%).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :** 7.53 (d,  $J = 8.25$  Hz, 1H, H-2) ; 7.18 (d,  $J = 7.17$  Hz, 1H, H-4) ; 7.53 (t,  $J = 7.25$  Hz, 1H, H-3) ; 3.20 (m, 2H, H-6) ; 2.98 (m, 2H, H-8) 2.62 (m, 4H, H-9 et H-5).

4 bromo-7-(tert-butyldiméthylsilyoxy)-6,9-dihydro-9H-benzocycloheptène (**71a**) 1 bromo-7-(tert-butyldiméthylsilyoxy)-6,9-dihydro-5H-benzocycloheptène (**71b**)



**71a, Rdt = 45 %**



**71b, Rdt = 55 %**

**Formule brute :**  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{BrOSi}$

**Poids moléculaire :** 353.37

À une solution de 1-bromo-5,6,8,9-tétrahydrobenzocycloheptène-7-one (1 g, 4.18 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (16.23 mL) sont ajoutés au goutte à goutte du NEt<sub>3</sub> (0.76 mL, 5.44 mmol, 1.3 éqv.) et du TBDMSOTf (1.25 mL, 5.44 mmol, 1.3 éqv.) à 0°C et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures.

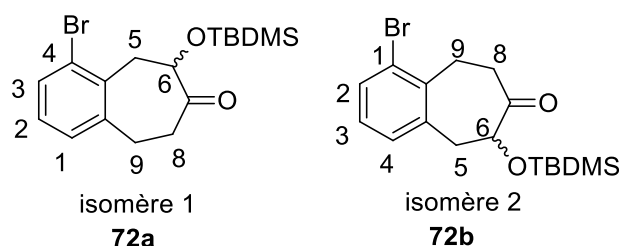
Le milieu est ensuite lavé par une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> (1M) puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le mélange des deux régioisomères **71a** et **71b** est obtenu sous forme d'une huile brune (1.48 g, quant). Le produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :**

**Isomère 71a, (45%) :** 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2) ; 7.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-4) ; 6.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3) ; 5.05 (tt, *J* = 6.2 et 1.3 Hz, 1H, H-6) ; 3.31 (dt, *J* = 6.2 et 2.1 Hz, 2H, H-5) ; 3.18 (m, 2H, H-9) ; 2.31 (m, 2H, H-8) ; 0.90 (s, 9H, TBDMS) ; 0.12 (s, 6H, TBDMS).

**Isomère 71b, (55%) :** 7.40 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-3) ; 7.01 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-1) ; 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-2) ; 5.08 (tt, *J* = 6.5 et 1.4 Hz, 1H, H-6) ; 3.54 (dt, *J* = 6.5 et 1.9 Hz, 2H, H-5) ; 2.96 (m, 2H, H-8) ; 2.31 (m, 2H, H-9) ; 0.90 (s, 9H, TBDMS) ; 0.12 (s, 6H, TBDMS).

4 bromo-6-(tert-butyldiméthylsilyoxy)-5,6,8,9- tétrahydrobenzocycloheptèn-7-one (**72a**) et 1 bromo-6-(tert-butyldiméthylsilyoxy)-5,6,8,9- tétrahydrobenzocycloheptèn-7-one (**72b**)



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>BrOSi

**Poids moléculaire :** 353.37

À une solution d'oxone (87.09 g, 141.50 mmol, 5 éqv.) et NaHCO<sub>3</sub> (47.55 g, 566.00 mmol, 20 éqv.) dans un mélange 1 : 2 d'H<sub>2</sub>O : acétone (820 mL) est ajouté au goutte à goutte une solution du mélange des deux régioisomères **72a** et **72b** (10.00 g, 28.30 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (273 mL), à 0 °C. le mélange réactionnel est agité à 25°C pendant 16 heures.

Après séparation des phases, les phases organiques sont lavées avec de la saumure puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Ensuite, les phases sont concentrées à l'évaporateur rotatif. Le mélange des deux régioisomères est obtenu sous la forme d'une huile brune (10.46 g, quant). Le produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

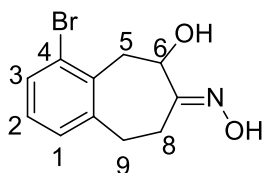
**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :**

**isomère 1 :** 7.52 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-3) ; 7.14 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-1) ; 7.05 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-2) ; 4,19 (ddd, 1H, *J* = 9.5, 3.2 et 1.0 Hz, H-6) ; 3.42 (ddd, 1H, *J* = 14.6, 10.3 et 3.0 Hz, Ha -5) ; 3.21 (ddd, 1H,

$J = 14.6, 10.3$  et  $3.0$  Hz, Hb-5) ;  $3.0$ - $2.8$  (m, 3H, Ha-9, Hb-9 et Ha-8) ;  $2.41$  (t, 1H,  $J = 11.0$  Hz, Hb-8) ;  $0.84$  (s, 9H, TBDMS) ;  $0.12$  (s, 6H, TBDMS).

**isomère 1** :  $7.51$  (d, 1H,  $J = 8.0$ , H-2) ;  $7.18$  (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-4) ;  $7.06$  (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz, H-3) ;  $4.20$  (ddd, 1H,  $J = 9.5, 3.2$  et  $1.0$  Hz, H-6) ;  $3.42$  (ddd, 1H,  $J = 15.0, 8.4$  et  $2.6$  Hz, Ha-9) ;  $3.14$  (dd, 1H,  $J = 14.2$  et  $9.5$  Hz, Ha-5) ;  $3.02$  (m, 1H, H-9b) ;  $3.00$  (m, 1H, H-5b) ;  $2.84$  (ddd, 1H,  $J = 13.6, 8.4$  et  $2.3$  Hz, H-8a) ;  $2.41$  (ddt, 1H,  $J = 13.6, 11.0$  et  $2.6$  Hz, H-8b) ;  $0.84$  (s, 9H, TBDMS) ;  $0.12$  (s, 6H, TBDMS).

4 bromo-6-hydroxy-5,6,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-7-hydroxyimine (**73a**)



**Formule brute** :  $C_{11}H_{12}BrNO_2$

**Poids moléculaire** : 370.12

À une solution du mélange des deux régioisomères **72a** et **72b** (10.46 g, 28.43 mmol) dans de la pyridine (76.56 mL) est ajouté  $NH_2OH, HCl$  (2.37 g, 34.11 mmol, 1.2, éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures et sous atmosphère inerte.

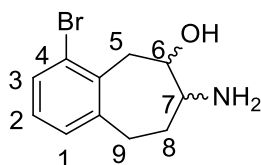
La pyridine est évaporée. Le résidu est repris dans du THF et traité avec du TBAF (85.28 mL, 85.28 mmol, 3 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure.

Après évaporation du solvant, le résidu est dilué avec de l'AcOEt, lavé avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur  $MgSO_4$  puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (gradient de 20 -50 % AcOEt). Le produit **73a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (2 g, 26%).

**RMN  $^1H$  ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ , 400 MHz)** :  $7.43$  (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-3) ;  $7.14$  (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-1) ;  $7.02$  (t, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H-2) ;  $4.39$  (dd, 1H,  $J = 8.2$  et  $4.5$  Hz, H-6) ;  $3.39$  (dd, 1H,  $J = 14.3$  et  $8.2$ , Ha-5) ;  $3.34$  (dd, 1H,  $J = 14.3$  et  $4.5$  Hz, Hb-5) ;  $3.20$  (m, 1H, Ha-8) ;  $3.04$  (ddd, 1H,  $J = 14.4, 8.2$  et  $5.0$  Hz, Ha-9) ;  $2.83$  (ddd, 1H,  $J = 14.4, 7.9$  et  $4.8$  Hz, Hb-9) ;  $2.41$  (ddd, 1H,  $J = 14.3, 7.9$  et  $5.0$  Hz, Hb-8).



### 7-Amino-4 bromo-6-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-ol (**74**)



**Formule brute** : C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>BrNO

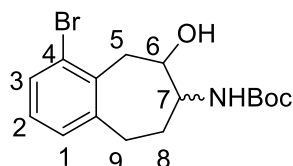
**Poids moléculaire** : 256.14

A une solution du produit **73a** (1.63 g, 5.94 mmol) dans du MeOH (59 mL) sont ajoutées CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (2.82 g, 11.85 mmol, 2 éqv.) et du NaBH<sub>4</sub> (15 eq., 3.37 g, 88.85 mmol) par petites portions à -30 °C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures.

Le milieu est ensuite dilué avec NaOH (1M) puis extrait avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif pour donner le produit **74** (1.37g, quant). Le produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.41(d, 1H, J = 8.1 Hz, H-3) ; 7.28 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-1) ; 7.06 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-2) ; 5.04 (br d, J = 8.5 Hz, 1H, NH) ; 4.15 (br s, 1H, H-6) ; 3.12 (m, 2H, H-5) ; 2.95 (m, 1H, H-7) ; 2.75 (m, 2H, H-9) ; 1.95 (br, m, 1H, Ha-8) ; 1.66 (m, 1H, Hb-8).

### 4 bromo-7-(tert-butoxycarbonylamino)-5,6,8,9-tétrahydro-5H-benzocycloheptèn-6-ol (**75**)



**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 356.25

À une solution de l'intermédiaire **74** (0.98 g, 3.83 mmol) dans du MeOH (59.00 mL) sont ajoutés du Boc<sub>2</sub>O (1.26 g, 5.75 mmol, 1.5 éqv.) et du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.43 g, 4.98 mmol, 1.3 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures.

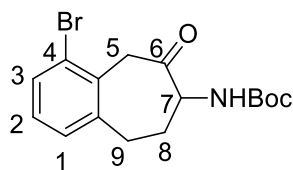
Le solvant est évaporé et le brut est repris dans de l'AcOEt. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le produit **75** est obtenu sous forme d'une huile jaune (1.37 g, quant). Le produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** :

**isomère trans** : 7.44 (dd, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-3) ; 7.01 (br d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-1) ; 6.97 (t, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H-2) ; 4.53 (br , NH) ; 3.69 (br m, 1H, H-7) ; 3.63 (dd, 1H ,  $J = 14.2, 1.6$  Hz, Ha-5) ; 3.35 (br t, 1H , H-6) ; 3.08 (br s, 1H , OH) ; 2.95 (dd, 1H, ,  $J = 14.2, 10.0$  Hz, Hb-5) ; 2.87 (ddd, 1H ,  $J = 14.7, 11.0, 1.8$  Hz, Ha-9) ; 2.76 (ddd, 1H ,  $J = 14.7, 7.5, 2.0$  Hz, Hb-9) ; 2.21 (m, 1H , Hb-8), 1.46 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 1.32 (m, 1H , H-8b)

**Isomère cis** : 7.46 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-3) ; 7.06 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz, H-1) ; 7.01 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz, H-2) ; 5,04 (br d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, NH) ; 4.19 (br s, 1H, H-6) ; 3.77 (br s, 2H, Ha-5 et H-7) ; 2.98 (d, 1H,  $J = 14.3$  Hz, Hb-5) ; 2,79 (m,2H, H-9) ; 1.99 (m, 1H, Ha-8) ; 1,50 (br m, 1H, Hb-8) ; 1,45 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>).

4-bromo-7-(tert-butoxycarbonylamino)-5,7,8,9-tétrahydro-5H-benzocycloheptèn-6-one (**76**)



**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 354.24

À une solution de l'intermédiaire **75** (1.37 g, 3.83 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (38.3 mL) est ajouté du périodinate de Dess-Martin (2.76 g, 16.51 mmol, 3éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est alors dilué avec de l'AcOEt. Puis une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> 1M (41 mL, 41 mmol, 11 éqv.) contenant du Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (4.8 g, 30.36 mmol, 8 éqv.) y est ajoutée. Ce mélange est alors agité 45 min à température ambiante.

Les phases sont séparées et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse du NaHCO<sub>3</sub> 1M puis avec de la saumure. Les phases organiques sont ensuite séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (9 : 1). Le produit **76** est obtenu sous forme d'un solide incolore (0.62 g, 46%).

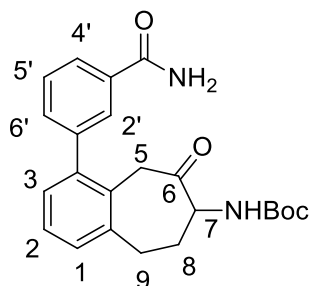
**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.49 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-3) ; 7.12 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-1) ; 7.06 (t, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H-2) ; 5.41 (d, 1H,  $J = 7.0$  Hz, NH) ; 4.49 (m, 1H, H-7) ; 4.15 (d, 1H,  $J = 16.5$  Hz, Ha-5) ; 3.99 (d, 1H,  $J = 16.5$  Hz, Hb-5) ; 2.97 (m, 1H, Ha-9) ; 2.89 (ddd, 1H,  $J = 14.2, 10.1$  et  $4.6$  Hz, Hb-9) ; 2.62 (m, 1H, Ha-8) ; 1.54 (m, 1H, Hb-8) ; 1.42 (s, CMe<sub>3</sub>).

### Préparation des dérivées d'aminobenzosubérone par couplage de Suzuki

**Procédure générale :** à une solution de 4-bromo aminobenzosubérone (1 éqv.), d'acide ou d'ester boronique (3 éqv.) et de  $K_2CO_3$  (3 éqv.) dans un mélange 4 : 1 de 1,2-diméthoxyéthane (DME) :  $H_2O$  (10 mL) est ajouté du  $[Pd(Ph_3)_4]^a$  ou  $[PEPPSI-^iPr]^b$  (0.1-0.15 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le mélange est chauffé à 125°C par irradiation aux micro-ondes à 150 W sous agitation et pendant 30 min.

Le milieu réactionnel est filtré sur célite puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(3-aminocarbonylphényl)-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptène-6-one **(86a)**



**Formule brute :**  $C_{23}H_{26}N_2O_4$

**Poids moléculaire :** 394.19

L'intermédiaire **86a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (64 mg, 75%).

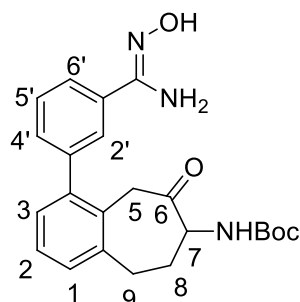
**RMN  $^1H$  ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ , 400 MHz) :** 8.02 (td,  $J = 4.2$  and  $2.1$  Hz, 1H, H-2'); 7.83 (m, 1H, H-6'); 7.57 (m, 2H, H-4' et H-5'); 7.21-7.29 (m, 3H, H-1, H-2 et H-3); 5.42 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, NH); 4.65 (m, 1H, H-7); 3.81 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H, Ha-5); 3.64 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H, Hb-5); 3.16 (m, 1H, Ha-9); 3.03 (m, 1H, Hb-9); 2.69 (m, 1H, Ha-8); 1.52 (m, 1H, Hb-8); 1.44 (s, 9H, tBu).

**RMN  $^{13}C$  ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ , 100 MHz) :** 206.3 (C-6); 169.4 (C- $CONH_2$ ); 155.6 (C- $NCO_2$ ); 155.34 (C-9a); 133.2(C-3'); 132.9 (C-5'); 132.5 (C-4); 130.3 (C-4a); 129.6 (C-3); 129.5 (C-4'); 129.3 (C-2); 129.1 (C-1'); 127.9 (C-1); 127.8 (C-2'); 127.7 (C-6'); 80.4 (C- $CMe_3$ ); 66.3 (C-7); 43.9 (C-5); 35.4(C-8); 30.1 (C-9); 28.8 (C- $CMe_3$ ).

**IR (KBr) :** 3438, 2066, 1642, 1393, 1280, 1170, 988, 761  $cm^{-1}$ .

**HR-MS (ESI-QToF) :**  $C_{23}H_{26}NaN_2O_4$   $[M+Na]^+$  calculé : 417.1785; trouvé : 417.1782.

7-tert-butoxycarbonylamino-4- [3-(N'-hydroxiamidino) phényl] -5, 7, 8,9-tétrahydro benzocycloheptène-6-one<sup>a</sup> (**92a**)



**Formule brute** : C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 409.20

Le produit **92a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (11 mg, 92%).

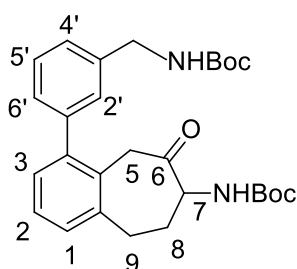
**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.74 (br d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-6') ; 7.64 (dd, *J* = 7.8 et 2.0 Hz, 1H, H-4') ; 7.44 (m, 2H, H-5' et H-2') ; 7.23 (m, 3H, H-1 et H-2 et H-3) ; 7.20 (dd, *J* = 6.3 et 2.5 Hz, 1H, H-1) ; 5.47 (br s, 1H, NH) ; 5.29 (br s, 1H, OH) ; 4.89 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 4.62 (ddd, *J* = 12.1, 5.5 et 3.1 Hz, 1H, H-7) ; 3.82 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.64 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.11 (ddd, *J* = 14.6, 9.1 et 2.5 Hz, 1H, Ha-9) ; 3.02 (m, *J* = 14.6, 8.6 et 3.0 Hz, 1H, H-9b) ; 2.71 (m, 1H, Ha-8) ; 1.57 (m, 1H, Hb-8) ; 1.45 (s, 9H, tBu)

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 205.7 (C-6) ; 155.5 (C-CN<sub>2</sub>NOH) ; 152.9 (NCO<sub>2</sub>) ; 142.4 (C-9a) ; 141.2 (C-3') ; 132.8 (C-4) ; 132.4 (C-1') ; 131.2 (C-4a) ; 130.4 (C-2') ; 129.5 (C-2) ; 129.1 (C-5') ; 129.1 (C-1) ; 127.8 (C-3) ; 126.2 (C-4') ; 125.2 (C-6') ; 80.3 (CMe<sub>3</sub>) ; 62.1 (C-7) ; 43.8 (C-5) ; 35.1 (C-8) ; 32.2 (C-9) ; 28.7 (C-CMe<sub>3</sub>)

**IR (KBr)**: 3466, 2925, 1641, 1366, 1261, 1165, 803, 699 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 410.2074; trouvé : 410.2078.

7-tert-butoxycarbonylamino-4- {3- [(tert-butoxycarbonylamino) methyl] phényl} -5,7,8,9-tétrahydro- benzo cycloheptane-6-one <sup>a</sup> (**93a**)



**Formule brute** : C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Poids moléculaire** : 480.60

Le produit **93a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (12 mg, 84%).

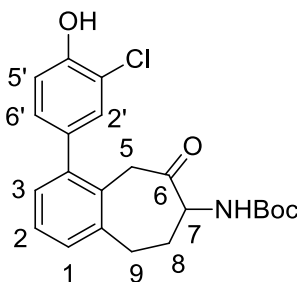
**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.41 (m, 1H, H-2'); 7.32 (m, 1H, H-5'); 7.22 (m, 2H, H-4' et H-6'); 7.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3); 7.11 (m, 2H, H-1 et H-2); 5.36 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, NH); 4.98 (m, 1H, NH); 4.48 (ddd, *J* = 11.1, 6.6 et 4.3 Hz, 1H, H-7); 4.32 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.71 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, Ha-5); 3.60 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, Hb-5); 3.00 (ddd, *J* = 14.9, 8.1 et 4.1 Hz, 1H, Ha-9); 2.90 (ddd, *J* = 14.9, 9.1 et 3.8 Hz, 1H, Hb-9); 2.61 (m, 1H, Ha-8); 1.51 (s, 9H, tBu); 1.45 (m, 1H, Hb-8); 1.39 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 205.4 (C-6); 155.9 (C-NCO<sub>2</sub>) (C-NCO<sub>2</sub>); 142.4 (C-9a); 141.0 (C-4); 140.9 (C-1'); 138.4 (C-4'); 130.0 (C-4a); 129.2 (C-2); 129.1 (C-3'); 128.6 (C-5'); 128.5 (C-1); 127.3 (C-3); 126.4 (C-6'); 126.2 (C-2'); 79.8 (C-CMe<sub>3</sub>) (C-CMe<sub>3</sub>); 60.8 (C-7); 44.6 (CH<sub>2</sub>); 43.5 (C-5); 34.5 (C-8); 31.5 (C-9); 28.4 (C-CMe<sub>3</sub>) (C-CMe<sub>3</sub>).

**IR (KBr)**: 3367, 2977, 2930, 1700, 1521, 1366, 1259, 1164, 1049 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 481.2525; trouvé : 481.2516

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(3-chloro-4-hydroxyphényl)-5,7,8,9-Tétrahydro-benzocycloheptène -6-one <sup>a</sup> (**95a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 401.88

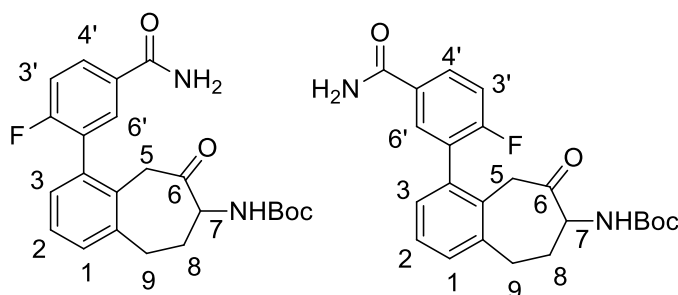
Le produit **95a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (30 mg, 65%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.41 (br s, 1H, H2'); 7.24 (m, 2 H, H-6'et H-3) ; 7.18 (m, 2H, H-1 et H-2); 7.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5') ; 5.84 (br s, 1H, OH) ; 5.47 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH) ; 4.59 (ddd, *J* = 11.4, 5.6 et 4.6 Hz, 1H, H-7) ; 3.78 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, H-5a) ; 3.69 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, H-5b) ; 3.09 (ddd, *J* = 14.3, 9.1 et 6.0 Hz, 1H, Ha-9) ; 2.96 (ddd, *J* = 14.5 et 9.6, 5.6 Hz, 1H, Hb-9) ; 2.68 (m, 1H, H-8a) ; 1.56 (m, 1H, H-8b) ; 1.44 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 205.4 (C-6); 155.3 (C-NCO<sub>2</sub>); 151.1 (C-1'); 141.4 (C-4'); 141.1 (C-9a); 134.3 (C-4a); 134.2 (C-4); 130,6 (C-2'); 130.3 (C-3'); 129.6 (C-1 et C-3), 128.9 (C-2); 127.6 (C-6'); 116.2 (C-5'); 80.2 (C-CMe<sub>3</sub>); 61.3 (C-7); 43.6 (C-5); 35.1 (C-8); 31.8 (C-9); 28.8 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClNO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 402.1472; trouvé : 402.1464.

7-tert-butoxycarbonylamino-4- (5-aminocarbonyl 2- fluorophényle) -5, 7, 8,9-tétrahydro benzo cyclo heptène-6-one<sup>a</sup> (**96a**)



**Formule brute** : C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 412.18

Le produit **96a** est obtenu sous forme d'un mélange racémique de deux atropoisomères (un majoritaire (M) et un minoritaire (m)) avec un ratio 64 : 36. Les produits **96a** sont obtenus sous la forme d'une huile jaune (41 mg, 69%).

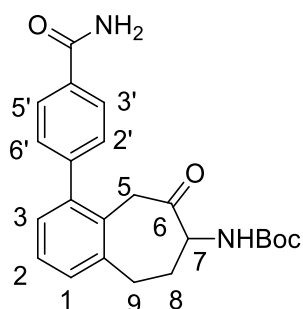
**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 8.02 (m, 1H, H-4', M+m); 7.92 (dd, *J* = 6.8 et 2.7 Hz, 1H, H-6', M); 7.89 (d, *J* = 6.9 Hz, H-6', 1H, m); ; 7.34-7.22 (m, 3H, H-3' et H-3 et H-2 M+ m); 7.07 (br s, 1H, H-1, M+m); 5.99 (br s, 1H, NH<sub>2</sub>, M+m); 5.51 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH, M); 5.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH, m); 4.69 (m, 1H, H7, M); 4.47 (m, 1H, H7, m); 3.85 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, Ha-5, M); 3.55 (t, *J* = 16.1 et 13.3 Hz, 2H, Hb-5 M et H-5 m); 3.16 (m, 1H, Ha-9, M); 3.02 (m, 2H, Hb-9 M et H-9 m); 2.6 (m, 1H, Ha-8, M); 2.4 (m, 1H, Ha-8, m); 1.55 (m, 1H, Hb-8, M); 1.51 (m, 1H, Hb-8); 1.44 (s, 9H, tBu, M) ; 1.44 (s, 9H, tBu, m)

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 207.4 (C-6, m); 205.3 (C-6, M); 168.3 (C-CONH<sub>2</sub>, M); 167.6 (C-CONH<sub>2</sub>, m); 161.8 (C-2', *J* = 252.8 Hz, m) ; 161.7 (C-2', *J* = 252.8 Hz, M) ; 155.5 (C-9a, m); 154.9 (C-9a, M); 142.2 (C-4, M); 139.8 (C-4, m); 135.1 (C-5', M); 134.9 (C-5', m); 132.9 (C-2', *J* = 3.9 Hz, M); 130.9 (C-6', *j* = 3.9 Hz, m); 130.4 (C-4a, M); 130.3 (C-4a, m); 130.4 (C-4', *j* = 9.1 Hz, M); 129.4 (C-2,

M+m); 129.4 (C-1, M); 129.3 (C-1, m); (C-4',  $J = 9.1$  Hz, M); 129.3 (C-4',  $J = 9.1$  Hz, m); 129.1 (C-1', m); 129.1 (C-1', M); 127.5 (C-3',  $J = 23.47$  Hz, m); 127.2 (C-3, M); 127.1 (C-3, m); 116.7 (C-3',  $J = 23.47$  Hz, M); 80.1 (C-CMe<sub>3</sub>, m); 79.9 (C-CMe<sub>3</sub>, M); 60.3 (C-7, M); 57.9 (C-7, m); 44.2 (C-5, m); 43.4 (C-5, m); 35.0 (C-8, M); 32.0 (C-9, m); 31.9 (C-9, M); 30.2 (C-8, m); 28.3 (C-CMe<sub>3</sub>, M); 28.2 (C-CMe<sub>3</sub>, m).

**HR-MS (ESI-QToF):** C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 413.1871; trouvé : 413.1876.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(4-aminocarbonylphényl)-5,7,8,9-Tétrahydro-benzocycloheptène -6-one<sup>a</sup> (**97a**)



**Formule brute :** C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire :** 394.46

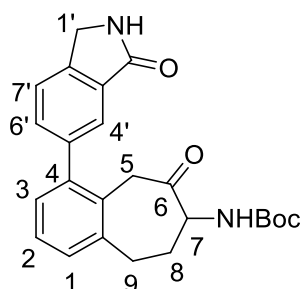
Le produit **97a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (8 mg, 72%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :** 7.90 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-5' et H-6'); 7.52 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-2' et H-3'); 7.24 (m, 3 H, H-1 et H-2 et H-3); 6.16 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5.84 (br s, 1H, NH<sub>2</sub>); 5.43 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH); 4.57 (ddd,  $J = 11.2, 6.9$  et  $4.9$  Hz, 1H, H-7); 3.79 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H, Ha-5); 3.67 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H, Hb-5); 3.09 (ddd,  $J = 14.8, 8.7$  et  $3.6$  Hz, 1H, Ha-9); 2.99 (ddd,  $J = 14.7, 9.2$  et  $3.3$  Hz, 1H, Hb-9); 2.68 (m, 1H, Ha-8); 1.56 (m, 1H, Hb-8); 1.43 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) :** 205.3 (C-6); 171.5 (C-CONH<sub>2</sub>); 169.4 (C-NCO<sub>2</sub>); 155.4 (C-4'); 145.1 (C-9a); 141.8 (C-4a); 144.1 (C-4); 132.1 (C-1'); 130.7 (C-2' et C-3'); 129.5 (C-2); 129.4 (C-1); 127.8 (C-3); 127.7 (C-5' et C-6'); 80.3 (C-CMe<sub>3</sub>); 60.8 (C-7); 43.7 (C-5); 34.9 (C-8); 31.9 (C-9); 28.7 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF) :** C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 395.1893; trouvé : 395.1980.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(3-oxoisindoline-5-yl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocyclo heptène - 6-one<sup>b</sup> (**98a**)



**Formule brute** : C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 406.47

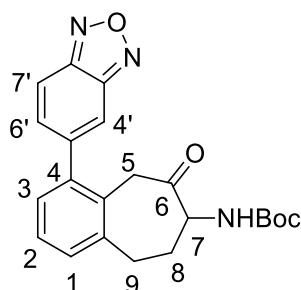
Le produit **98a** est obtenu sous la forme d'un solide jaune claire (15 mg, 55%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, C-7'), 7.61 (m, 2H, C-5' et C-4'); 7.28 (m, 1H, H-3); 7.22 (m, 2H, H-1 et H-2); 4.54 (br d, 2H, NH) ; 4.46 (s, 2H, C-8'); 4.50 (m, 1H, C-7); 3.88 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, Ha-5); 3.60 (d, 1H, *J* = 13.8 Hz, Cb-5); 3.20 (ddd, *J* = 14.2, 9.5 et 2.7 Hz, 1H, Ha-9); 3.03 (ddd, *J* = 14.8, 8.6 et 3.0 Hz, 1H, Hb-9); 2.42 (m, 1H, Ha-8); 1.63 (m, 1H, Hb-8); 1.42 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 207.0 (C-6); 173.6 (NCO<sub>2</sub>) ; 173.1 (C-1'); 146.6 (C-3'a); 146.0 (C-7'a); 143.1 (C-9a); 143.1 (C-4); 132.2 (C-5'); 132.04 (C-4a), 130.3 (C-1 et C-2); 129.1 (C-3); 128.5 (C-5') ; 126.4 (C-4'); 124.4 (C-7') ; 80.5 (C-CMe<sub>3</sub>) ; 62.7 (C-7); 47.1 (C-8'), 43.9 (C-5); 34.9 (C-8); 32.5 (C-9); 28.8 (C-CMe<sub>3</sub>)

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 407.1970; trouvé : 395.1964.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(benzo[*c*][1,2,5]oxodialzom-5-yl)-5,7,8,9-tétrahydro- benzo cyclo heptène-6-one<sup>b</sup> (**99a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 393.17



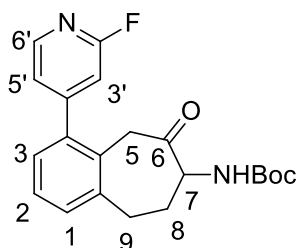
Le produit **99a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (17 mg, 58%).

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.96 (m, 2H, H-4' et H-7'); 7.63 (m, 1H, H-6'); 7.32 (m, 3H, H-1, H-2 et H-3); 4.51 (ddd,  $J = 11.2, 6.8$  et  $4.3$  Hz, 1H, H-7); 3.92 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H, Ha-5); 3.66 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, Hb-5); 3.24 (ddd,  $J = 14.2, 9.6$  et  $2.8$  Hz, 1H, Ha-9); 3.07 (ddd,  $J = 14.5, 8.7$  et  $2.7$  Hz, 1H, Hb-9); 2.45 (m, 1H, Ha-8); 1.63 (m, 1H, Hb-8); 1.43 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 206.7 (C-6); 175.6 (C-NCO<sub>2</sub>); 158.0 (C-5'); 150.9 (C-1'); 150.1 (C-4'); 143.80 (C-4); 141.6 (C-9a); 137.1 (C-7'), 132.3 (C-4a); 131.3 (C-1); 13.0 (C-2); 129.1 (C-3); 117.4 (C-4'); 117.1 (C-6'); 80.9 (C-CMe<sub>3</sub>); 63.2 (C-7); 44.1 (C-5); 35.2 (C-8); 32.7 (C-9); 29.1 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)**: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 394.1761; trouvé : 394.1765.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(2'-fluoro-4'-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocyclo heptène-6-one<sup>b</sup> (**103a**)



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 370.17

Le produit **103a** est obtenu sous la forme d'une huile incolore (36 mg, 67%).

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 8.29 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, H-6'); 7.31 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, H-5'); 7.27 (m, 2H, H-2 et H-3); 7.17 (m, 1H, H-1); 7.04 (s, 1H, H-3'); 5.44 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, NH); 4.60 (ddd,  $J = 11.3$  et  $6.6$  et  $5.0$  Hz, 1H, H-7); 3.82 (d,  $J = 14.1$  Hz, 1H, Ha-5); 3.64 (d,  $J = 14.1$  Hz, 1H, Hb-5); 3.11 (ddd,  $J = 14.6$  et  $9.6$  et  $3.0$  Hz, 1H, Ha-9); 3.02 (ddd,  $J = 14.6$  et  $8.6$  et  $3.3$  Hz, 1H, Hb-9); 2.71 (m, 1H, Ha-8); 1.54 (m, 1H, Hb-8); 1.44 (s, 9H, tBu)

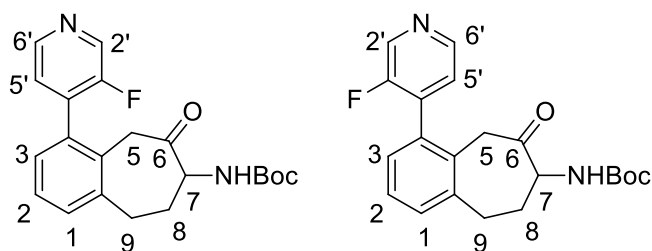
**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 204.7 (C-6); 164.2 (d,  $J = 240$  Hz, (C-2')); 155.4 (C-9a); 154.6 (NCO<sub>2</sub>); 147.9 (d,  $J = 15$  Hz, (C-6')); 142.2 (C-4); 139.14 (C-4'); 130.5 (C-2); 130.1 (C-4a); 129.1 (C-1); 128.2 (C-3); 123.3 (C-5'); 110.1 (d,  $J = 38$  Hz, (C-3')); 80.4 (C-CMe<sub>3</sub>); 61.8 (C-7); 43.4 (C-5); 35.1 (C-8); 32.0 (C-9); 28.7 (C-CMe<sub>3</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 282MHz) : -67.60 (s)

**IR (KBr)**: 3437, 1721, 1671, 1549, 1401, 1366, 1258, 1160, 987, 794 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 371.1766; trouvé : 371.1773.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(3'-fluoro-4'-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one<sup>a</sup> (**104a**)



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 370.17

Les produits **104a** sont obtenus sous la forme d'un mélange racémique de deux atropoisomères (un majoritaire (M) et un minoritaire (m)) avec un ratio de 65 : 35. Les produits **104a** sont obtenus sous la forme d'un solide jaune pâle (44 mg, 71%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 8.55 (s, 1H, H-2', M+m); 8.51 (m, 1H, H-6', M+m); 7.43 (m, 1H, H-5', M+m); 7.32 (m, 2H, H-2 et H-3, M+m) ; 7.19 (m, 1H, H-1, M+m); 5.42 (br s, 1H, NH, M) ; 5.36 (br s, 1H, NH, m) ; 4.59 (m, 1H, H-7, M) ; 4.44 (m, 1H, H-7, m) ; 3.78 (d, J = 15.6 Hz, 1H, Ha-5, M) ; 3.59 (d, J = 15.6 Hz, 1H, Hb-5, m) ; 3.49 (d, J = 15.6 Hz, 1H, Hb-5, M) ; 3.13 (m, 2H, H-9, m) ; 3.00 (m, 2H, H-9, M) ; 2.73 (m, 1H, Ha-8, M) ; 2.63 (m, 1H, Ha-8, m) ; 1.54 (m, 1H, Hb-8, M+m) ; 1.44 (s, 9H, tBu, M+m).

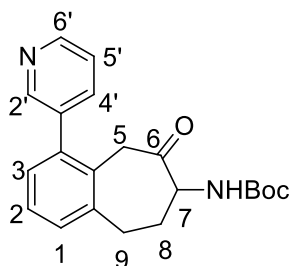
**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 204.7 (C-6); 158.1 (NCO<sub>2</sub>); 155.45(d, J = 235 Hz, C-3'); 155.34 (C-9a); 146.3 (C-6'); 141.8 (C-4); 140.7 (C-4'); 139.0 (d, J = 36 Hz, C-2'); 131.3 (C-4a); 130.6 (C-2); 129.6 (C-1); 128.2 (C-3); 126.9 (C-5'); 80.3 (C-CMe<sub>3</sub>); 61.2 (C-7); 44.1 (C-5); 34.8(C-8); 31.8 (C-9); 28.8 (C-CMe<sub>3</sub>).

**RMN <sup>19</sup>F** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 282 MHz) : -128.52 (s, m); -129.79 (s, M)

**IR (KBr)**: 3437, 1724, 1671, 1548, 1412, 1281, 1164, 796 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 371.1766; trouvé : 371.1772.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(3-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one<sup>a</sup> (**105a**)



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 352.18

Le produit **105a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (7 mg, 70%).

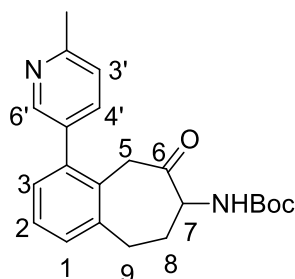
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 8.63 (m, 2H, H6' et H-2'); 7.82 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, H-4'); 7.40 (dd,  $J$  = 7.6 et 6.3 Hz, 1H, H-5'); 7.29-7.18 (m, 2H, H-1 et H-2) 7.19 (dd,  $J$  = 7.3 et 2.5 Hz, 1H, H-3) ; 5.44 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, NH) ; 4.59 (ddd,  $J$  = 11.1, 7.1 et 6.3 Hz, 1H, H-7) ; 3.80 (d,  $J$  = 14.0 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.63 (d,  $J$  = 14.0 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.11 (ddd,  $J$  = 14.9, 9.3 et 2.7 Hz, 1H, Ha-9) ; 2.99 (ddd,  $J$  = 14.9, 8.8 et 3.3 Hz, 1H, Hb-9) ; 2.70 (m, 1H, H-8a) ; 1.55 (m, 1H, H-8b) ; 1.40 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 204.3 (C-6); 157.2 (NCO<sub>2</sub>); 149.9 (C-6'); 148.2 (C-2'); 141.1 (C-9a); 138.3 (C-4); 137.2 (C-4'); 136.1 (C-4a); 130.0 (C-5'); 129.1 (C-3); 129.1 (C-1); 127.5 (C-2'); 122.6 (C-3'); 79.5 (C-CMe<sub>3</sub>); 60.8 (C-7); 42.9 (C-5); 34.3 (C-8); 31.2 (C-9); 27.9 (C-CMe<sub>3</sub>).

**IR (KBr)**: 3285, 2984, 2925, 1723, 1672, 1544, 1459, 1365, 1276, 1255, 1165, 1004, 786, 720 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 353.1859; trouvé : 353.1853.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(6-méthyle-3-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène -6-one<sup>a</sup> (**106a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 366.19

Le produit **106a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (8 mg, 77%).

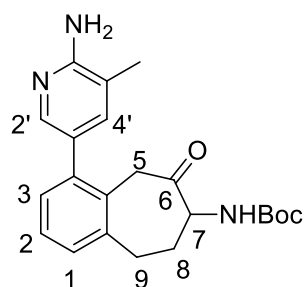
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 8.50 (s, 1H, H-2'); 7.72 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, H-4'); 7.24 (m, 2H, H-3, H-5'); 7.21 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-1) ; 7.18 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-2) ; 5.45 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, NH) ; 4.58 (ddd,  $J$  = 11.3, 7.1 et 6.8 Hz, 1H, H-7) ; 3.81 (d,  $J$  = 14.1 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.65 (d,  $J$  = 14.1 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.10 (ddd,  $J$  = 14.6, 9.1 et 2.7 Hz, 1H, Ha-9) ; 2.98 (ddd,  $J$  = 14.6, 8.8 et 3.0 Hz, 1H, Hb-9) ; 2.69 (m, 1H, H-8a) ; 2.63 (s, 3H, Me) ; 1.55 (m, 1H, H-8b) ; 1.40 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 204.7 (C-6); 157.2 (C-NCO<sub>2</sub>); 149.4 (C-6'); 141.3 (C-2'); 138.8 (C-4); 137.8 (C-9a); 133.4 (C-4'); 130.3 (C-4a); 129.4 (C-3'); 129.1 (C-2) ; 129.5 (C-1) ; 127.9 (C-3) ; 123.0 (C-5'); 79.81 (C-CMe<sub>3</sub>); 61.09 (C-7); 43.26 (C-5); 34.64 (C-9); 31.55 (C-8); 28.31 (C-CMe<sub>3</sub>); 24.14 (Me).

**IR (KBr)**: 3436, 1705, 1676, 1552, 1365, 1278, 1166, 793 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 367.2016; trouvé : 367.2021

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(6-amino-5-méthyl-pyridyl)-5,7,8,9- Tétrahydro -benzocyclo heptène -6-one<sup>a</sup> (**110a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 381.47

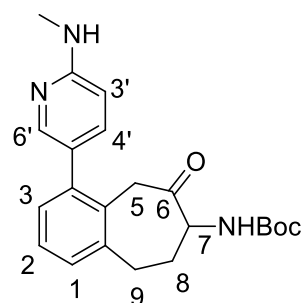
Le produit **110a** est obtenu sous la forme d'une solide jaune pâle (20 mg, 62%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.96 (d, *J* = 1.51 Hz, 1H, H-2') ; 7.44 (br s, 1H, H-4') ; 7.17 (m, 3 H, H-1, H-2 et H-3) ; 5.45 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, NH) ; 4.55 (ddd, *J* = 11.2, 7.4 et 6.7 Hz, 1H, H-7) ; 4.50 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 3.83(d, *J* = 14.9 Hz, 1H, H-5a) ; 3.73 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, H-5b) ; 3.07 (ddd, *J* = 13.6, 9.3 et 2.5 Hz, 1H, H-9a) ; 2.95 (ddd, *J* = 13.6, 8.3 et 3.1 Hz, 1H, H-9b) ; 2.67 (m, 1H, Ha-8) ; 2.21 (s, 3H, Me) ; 1.54 (m, 1H, Hb-8) ; 1.43 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 205.5 (C-6); 156.1 (C-6'); 154.9 (C-NCO<sub>2</sub>); 145.8 (C-2'); 143.8 (C-9a) ; 141.1 (C-4a); 139,5 (C-4); 139.4 (C-3'); 129.4 (C-2); 128.4 (C-4'); 128.4 (C-1); 127.3 (C-3); 115.8 (C-5'); 79.7 (C-CMe<sub>3</sub>); 60.9 (C-7); 43.4 (C-5); 34.6 (C-8); 31.5 (C-9); 28.3 (C-CMe<sub>3</sub>); 17.1 (Me).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 382.2125; trouvé : 382.2120.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(6-méthoxy-3pyridyl)-5,7,8,9-Tétrahydro-benzocyclo heptène -6-one<sup>a</sup> (**111a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 381.47

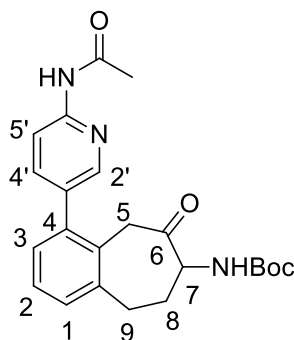
Le produit **111a** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (8 mg, 72%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 8.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-6'); 7.61 (dd, *J* = 8.9 et 1.2 Hz, 1H, H-4'); 7.18 (m, 3H, H-1, H-2 et H-3); 6.49 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-3'); 5.45 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, NHboc); 4.67 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, NH); 4.57 (ddd, *J* = 11.1, 7.1 et 4.6 Hz, 1H, H-7); 3.85 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, Ha-5); 3.73 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, Hb-5); 3.09 (m, 1H, Ha-9); 2.97 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, Me); 2.96 (m, 1H, Hb-9); 2.68 (m, 1H, Ha-8); 1.56 (m, 1H, Hb-8); 1.44 (s, 9H, *t*Bu).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)** : 205.1 (C-6); 158.6 (NCO<sub>2</sub>); 154.9 (C-2'); 148.4 (C-6'); 141.1 (C-9a); 139.5 (C-5'); 139.2 (C-4'); 137.4 (C-4); 130.4 (C-4a); 129.4 (C-2); 128.3 (C-3); 127.3 (C-1); 105.3 (C-3'); 79.7 (C-CMe<sub>3</sub>); 60.9 (C-7); 43.4 (C-5); 34.6 (C-8); 31.5 (C-9); 29.1 (NMe); 28.3 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 382.2125; trouvé : 382.2123.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(6-acetylamino-3-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptène-6-one<sup>b</sup> (**112a**)



**Formule brute** : C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 409.20

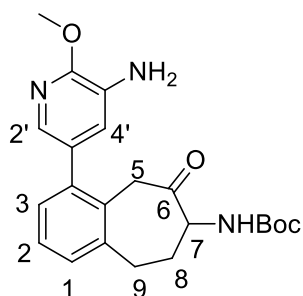
Le produit **112a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (10 mg, 83%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 8.05 (br d, 1H, H-2'); 7.75 (m, 1H, H-5'); 7.26 (m, 2H, H-3 et H-4'); 7.19 (m, 1H, H-2); 7.09 (m, 1H, H-1); 4.49 (ddd, *J* = 11.8 et 6.6 et 4.8 Hz, 1H, H-7); 3.91 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, Ha-5); 3.62 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, Hb-5); 3.21 (ddd, *J* = 14.2 et 8.1 et 2.4 Hz, 1H, Ha-9); 3.04 (ddd, *J* = 14.2 et 8.6 et 2.7 Hz, 1H, Hb-9); 2.44 (m, 1H, Ha-8); 2.17 (s, 3H, Me); 1.60 (m, 1H, Hb-8); 1.43 (s, 9H, *t*Bu).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)** : 206.6 (C-6); 172.2 (C-NCO<sub>2</sub>); 153.2 (C-NCO); 152.2 (C-6'); 143.3 (C-9a); 141.1 (C-4); 139.5 (C-2'); 134.2 (C-3'); 132.4 (C-4a); 130.5 (C-5'); 130.4 (C-2); 128.6 (C-1); 121.1 (C-3); 115.7 (C-4'); 80.7 (C-CMe<sub>3</sub>); 63.1 (C-7); 43.7 (C-5); 35.1 (C-8); 32.6 (C-9); 28.8 (C-CMe<sub>3</sub>); 25.1 (Me).

**HR-MS (ESI-QToF)**: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 411.2106; trouvé: 411.2101

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(5-amino-6-méthoxy-pyridyl)-5,7,8,9-Tétrahydro-benzocycloheptèn -6-one<sup>a</sup> (**113a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 397.47

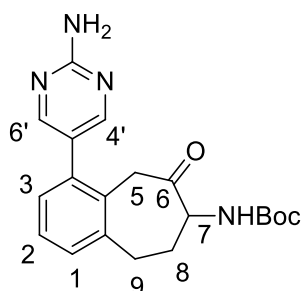
Le produit **113a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (10 mg, 89%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.57 (d, *J* = 1.51 Hz, 1H, H-2'); 7.22 (m, 2H, H-1 et H-2) ; 7.18 (dd, 1H, *J* = 7.3 et 2.5 Hz, 1H, H-3) ; 7.02 (br s, 1H, H-4') ; 5.44 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH) ; 4.57 (ddd, *J* = 11.2, 6.9 et 6.8 Hz, 1H, H-7) ; 4.04 (s, 3H, Me) ; 3.88 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 3.82 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.72 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.06 (ddd, *J* = 14.9, 9.3 et 3.3 Hz, 1H, H-9a) ; 2.97 (ddd, *J* = 14.9, 8.9 et 3.4 Hz, 1H, H-9b) ; 2.67 (m, 1H, H-8a) ; 1.53 (m, 1H, H-8b) ; 1.43 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 205.0 (C-6); 154.6 (C-6'); 151.9 (C-NCO<sub>2</sub>); 140.6 (C-5'); 139.1 (C-4a); 134.7 (C-2'); 130.1 (C-9a); 129.9 (C-2); 129.8 (C-1); 129.1 (C-3); 128.2 (C-3'); 126.9 (C-4); 121.7 (C-4'); 79.4 (C-CMe<sub>3</sub>); 60.5 (C-7); 53.1 (C-OMe); 43.1 (C-5); 34.2 (C-8); 31.1 (C-9); 28.0 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 398.2074; trouvé : 398.2063.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(2-amino-5-pyrimidyl)-5,7,8,9-tétrahydro benzocyclo heptène-6-one<sup>a</sup> (**116a**)



**Formule brute** : C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 368.18

Le produit **116a** est obtenu sous la forme d'une solide jaune pâle (10 mg, 90%).

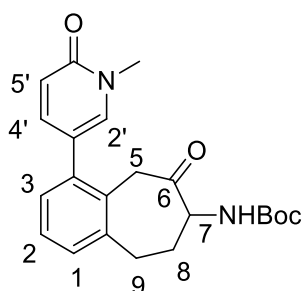
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 8.42 (s, 2H, H-4' et H-6') ; 7.22 (m, 2H, H-2 et H-3) ; 7.15 (dd,  $J = 7.5$  et 1.6 Hz, 1H, H-1) ; 4.45 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, NH) ; 5.15 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 4.59 (ddd,  $J = 11.3$  et 6.5 et 6.3 Hz, 1H, H-7) ; 3.85 (d,  $J = 14.2$  Hz, 1H, Ha-5) ; 3.66 (d,  $J = 14.2$  Hz, 1H, Hb-5) ; 3.11 (ddd,  $J = 14.9$  et 9.4 et 2.5 Hz, 1H, Ha-9) ; 2.99 (ddd,  $J = 14.9$  et 9.4 et 2.5 Hz, 1H, Hb-9) ; 2.70 (m, 1H, Ha-8) ; 1.49 (m, 1H, Hb-8) ; 1.45 (s, 9H, tBu)

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 204.8 (C-6); 162.4 (C-NCO<sub>2</sub>); 159.2 (C-4' et C-6'); 142.2 (C-2'); 136.3 (C-9a) ; 133.5 (C-4) ; 131.0 (C-4a); 129.9 (C-1) ; 129.7 (C-3) ; 128.1 (C-2) ; 125.0 (C-5') ; 80.3 (C-CMe<sub>3</sub>); 61.8 (C-7) ; 43.7 (C-5) ; 35.2 (C-8) ; 32.0 (C-9) ; 28.8 (C-CMe<sub>3</sub>)

**IR (KBr)**: 3294, 2977, 2929, 1724, 1704, 1677, 1544, 1460, 1184, 722, 541 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 369.1921; trouvé : 369.1926

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(1-méthyl-6-oxo-1,6-dihydropyridin-3-yl)-5,7,8,9-tétrahydro - benzocycloheptène-6-one<sup>b</sup> (**121a**)



**Formule brute** : C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 382.19

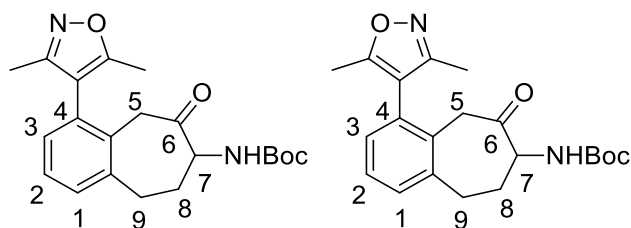
Le produit **121a** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (6 mg, 37%).

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.55 (br s, 1H, H-2') ; 7.46 (d, 1H,  $J = 9.8$  Hz, H-5') ; 7.23 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-3) ; 7.19 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-1) ; 7.16 (dt,  $J = 7.2$  et 1.8 Hz, H-2) ; 6.66 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H-4') ; 5.42 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, NH) ; 4.62 (m, 1H, H-7) ; 3.89 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H, Ha-5) ; 3.72 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H, Hb-5) ; 3.15 (m, 1H, Ha-9) ; 2.95 (m, 1H, Hb-9) ; 2.72 (m, 1H, Ha-8) ; 1.55 (m, 1H, Hb-8) ; 1.44 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 212.7 (C-6'); 204.8 (C-6); 162.2 (C-NCO<sub>2</sub>); 254.9 (C-3'); 141.9 (C-5'); 141.8 (C-9a); 139.4 (C-4); 137.2 (C-2'); 130.3 (C-4a); 139.1 (C-2); 128.9 (C-1); 127.6 (C-3); 120.1 (C-4'); 79.9 (C-CMe<sub>3</sub>); 61.7 (C-7); 43.1 (C-5); 37.8 (C-CH<sub>3</sub>); 34.9 (C-8); 31.7 (C-9); 28.3 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)**: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 383.1965; trouvé: 383.1955.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-5,7,8,9-tétrahydro- benzocyclo heptène-6-one **(122a)**



**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 370.17

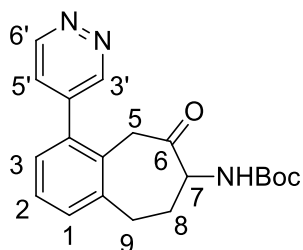
Les produits **122a** sont obtenus sous la forme d'un mélange de deux atropoisomères (un majoritaire (M) et un minoritaire (m)) avec un ratio 55 : 45. Les produits **122a** sont obtenu sous la forme d'un solide jaune (8mg, 64%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.30 (2H, m, H-1 et H-2); 7.08 (1H, m, H-3); 4.44 (m, 1H, H-7); 3.85 (d, J = 14.3 Hz, 1H, Ha-5, m); 3.81 (d, J = 14.3 Hz, 1H, Ha-5, M); 3.46 (d, J = 14.3 Hz, 1H, Hb-5, m); 3.37 (d, J = 14.3 Hz, 1H, Hb-5, M); 3.18 (m, 1H, Ha-9); 3.02 (m, 1H, Hb-9); 2.40 (m, 1H, Ha-8); 2.28 (s, 1H, Me, m); 2.24 (s, 1H, Me, M); 2.12 (s, 1H, Me, m); 2.08 (s, 1H, Me, M); 1.59 (m, 1H, Hb-8), 1.40 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) 206.3 (C-6); 168.2 (C-NCO<sub>2</sub>); 161.3 (C-3'); 160.8 (C-2'); 143.2 (C-9a et C-4); 134.6 (C-4'); 131.31 (C-1); 131.1 (C-2); 130.2 (C-4a); 128.9 (C-3); 117.3 (1C, 4'); 80.6 (C-CMe<sub>3</sub>); 62.4 (C-7); 44.4 (C-5); 34.9 (C-8); 32.3 (C-9); 28.8 (C-CMe<sub>3</sub>); 11.5 (C-Me, m); 11.3 (C-Me, M); 10.5 (C-Me, m); 10.4 (C-Me, M).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé: 371.1965; trouvé : 371.1968.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-pyridazine 5, 7, 8, 9- Tétrahydro – benzocycloheptène -6-one **(120a)**



**Formule brute** : C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 353.41



A une solution de l'intermédiaire **129a** (22 mg, 0.08 mmol) dans du nitrotoluène (200 µL) est ajoutée de la 1,2,4,5-tétrazine (6.7 mg, 0.09 mol, 1.1 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à 140°C pendant 2 heures.

Le solvant est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (9 : 1). Le produit **120a** est obtenu sous la forme d'une huile brune (21 mg, Rdt = 81%).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 9.30 (br s, 2H, H-3' et H-6') ; 7.73 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-5') ; 7.32 (m, 2H, H-2 et H-3) ; 7.19 (m, 1H, H-1) ; 5.54 (d, J = 6.7 Hz, 1H, NH) ; 4.63 (m, 1H, H-7) ; 3.82 (d, J = 13.8 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.55 (d, J = 13.8 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.13 (m, 1H, Ha-9), 3.03 (m, 1H, Hb-9), 2.72 (m, 1H, Ha-8) ; 1.53 (m, 1H, Hb-8) ; 1.44 (s, 9H, Boc)

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : 204.2 (C-6); 155.3 (C-CO); 152.7 (C-3'); 151.3 (C-6'); 142.6 (C-9a); 139.3 (C-4'); 131.7 (C-4a); 131.1 (C-3); 130.6 (C-4); 129.3 (C-2); 128.4 (C-1); 127.5 (C-5'); 80.4 (C-CMe<sub>3</sub>); 62.2 (C-7); 43.2 (C-5); 35.2 (C-8); 32.1 (C-9); 28.7 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 354.1812 ; trouvé : 354.1813

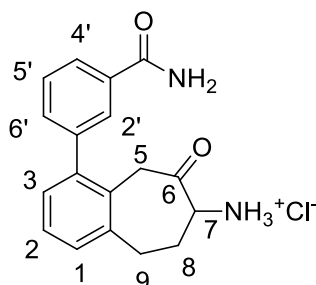
### Déprotection des amino benzosubérones

**Procédure générale A** : à une solution du dérivé d'aminobenzosubérone (1 mmol) dans du 1, 4-Dioxane anhydre (11 mL) est ajouté du HCl (2N) (dans du diéthyle éther sec) (27.5 mL, 55 éqv.) à température ambiante sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit.

**Procédure générale B** : à une solution du dérivé d'aminobenzosubérone (1 mmol) dans du DCM anhydre (10 mL) est ajouté du TFA (12 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit.

Le produit final est séparé par centrifugation. Le précipité est alors lavé avec de l'Et<sub>2</sub>O, puis recristallisé dans un minimum de MeOH ou *i*PrOH. Après ajout d'Et<sub>2</sub>O ou *i*Pr<sub>2</sub>O, le précipité est filtré et lavé avec une solution froide d'Et<sub>2</sub>O ou *i*Pr<sub>2</sub>O.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(3-aminocarbonylphényl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one (**86**)



**Formule brute** : C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 330.11

Le produit **86** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (48 mg, 82%)

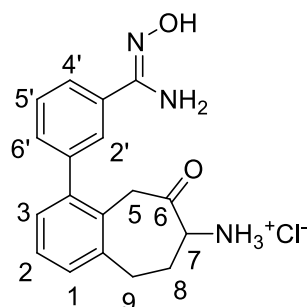
**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 300 MHz)** : 8.18 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 7.93 (br s, 1H, NH<sub>2</sub>); 7.81 (dt, *J* = 7.3 et 1.5 Hz, 1H, H-6'); 7.76 (s, 1H, H-2'); 7.46 (m, 2H, H-4' et H-5'); 7.35 (br s, 1H, NH<sub>2</sub>); 7.22 (m, 2H, H-1 et H-3); 7.13 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-2); 4.34 (dd, *J* = 11.6 et 6.5 Hz, 1H, H-7); 3.97 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H, Ha-5); 3.48 (d, 1H, *J* = 13.8 Hz, Hb-5); 3.19 (m, 1H, Ha-9); 2.93 (m, 1H, Hb-9); 2.45 (m, 1H, Ha-8); 1.56 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 750 MHz)** : 202.7 (C-6); 168.1 (C-CONH<sub>2</sub>); 141.7 (C-9a); 141.6 (C-3'); 140.7 (C-4); 134.8 (C-1'); 132.7 (C-4'); 129.8 (C-2); 129.6 (C-3); 129.3 (C-4a); 129.0 (C-2'); 128.6 (C-5'); 127.8 (C-1); 126.8 (C-6'); 59.7 (C-7); 42.6 (C-5); 31.7 (C-8); 30.2 (C-9).

**IR (KBr)**: 3412, 2953, 1722, 1659, 1597, 1504, 1149, 1046, 797, 703 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 295.1441; trouvé : 295.1445.

Chlorhydrate de la 7-amino-4[3-(N'-hydroxyamidino)phényl]-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one (**92**)



**Formule brute** : C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 345.12

Le produit **92** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (18 mg, 36%).

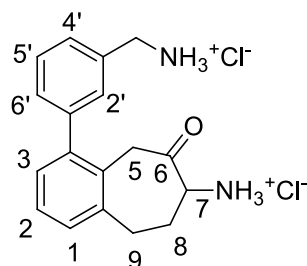
**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 400 MHz)** : 11.16 (br s, 1H, OH); 9.01 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8.33 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 7.76 (m, 1H, H-6'); 7.72 (m, 2H, H-5' et H-4'); 7.60 (m, 1H, H-2'); 7.33 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H-1 et H-3); 7.29 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H-2); 4.47 (m, 1H, H-7); 4.11 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, Ha-5); 3.59 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, Hb-5); 3.31 (m, 1H, Ha-9); 3.03 (m, 1H, Hb-9); 2.55 (m, 1H, Ha-8); 1.63 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 100 MHz)** : 202.7 (C-6); 163.38 (CNH<sub>2</sub>NOH); 141.9 (C-9a); 141.2 (C-3'); 140.72 (C-4); 134.32 (C-1'); 129.8 (C-2); 129.7 (C-1); 129.4 (C-4a); 129.3 (C-2' et C-5'); 128.2 (C-4'); 127.8 (C-3); 126.9 (C-6'); 59.8 (C-7); 42.5 (C-5); 31.7 (C-8); 30.2 (C-9).

**IR (KBr)**: 3413, 3015, 1722, 1668, 1618, 1464, 1383, 1151, 1046, 800 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 310.1550; trouvé : 310.1550.

Chlorhydrate de la 7-amino-4- [3-(aminométhyl) phényle]-5,7,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-6-one (**93**)



**Formule brute** : C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

**Poids moléculaire** : 352.11

Le produit **93** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (32 mg, 76%).

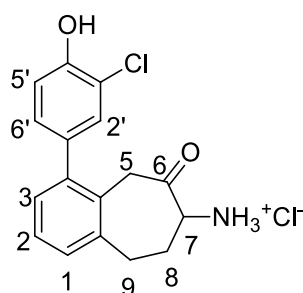
**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 400 MHz)** : 8.56 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 8.40 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 7.53 (m, 3H, H-2', H-4' et H-5'); 7.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-6'); 7.32 (m, 2H, H-1 et H-3); 7.20 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-2); 4.41 (m, 1H, H7); 4.09 (m, 3H, CH<sub>2</sub> et Ha-5); 3.64 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, H-5b); 3.27 (m, 1H, Ha-9); 3.04 (m, 1H, Hb-9); 2.54 (m, 1H, Ha-8); 1.63 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 100 MHz)** : 202.4 (C-6); 141.2 (C-4); 140.6 (C-9a); 139.8 (C-1'); 134.3 (C-3'); 130.2 (C-2'); 129.6 (C-6'); 129.2 (C-4a); 129.1 (C-2); 128.9 (C-1); 128.5 (C-5'); 127.7 (C-4'); 127.4 (C-3); 59.1 (C-7); 42.2 (C-5); 42.0 (CH<sub>2</sub>); 31.1 (C-8); 29.7 (C-9).

**IR (KBr)**: 3460, 3024, 1717, 1592, 1509, 1461, 790, 712 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 281.1648; trouvé : 281.1651.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(3-chloro-4-hydroxy-phényl)-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptène -6-one (**95**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 337.06

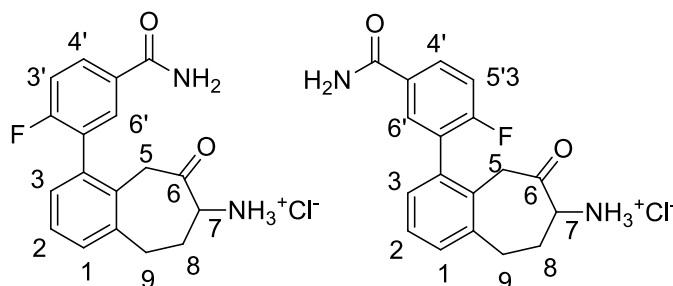
Le produit **95** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (12 mg, 58%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** :7.36 (br s, 1H, H-2'); 7.27 (m, 2H, H-5' et H-3); 7.18 (m, 2H, H-1 et H-2); 6.99 (d, ,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H6'); 4.42 (m, 1H, H-7); 4.02 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H, Ha-5); 3.77 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H, Hb-5); 3.34 (m, 1H, Ha-9); 3.13 (m, 1H, Hb-9); 2.60 (m, 1H, Ha-8); 1.74 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 203.5 (C-6); 154.4 (C-4'); 143.2 (C-9a); 142.8 (C-1'); 142.8 (C-4a); 132.9 (C-2'); 132.1 (C-4); 131.3 (C-1); 131.1 (C-5'); 130.3 (C-2); 129.3 (C-3); 122.1 (C-3'); 117,8 (C-6'); 61.9 (C-7); 43.8 (C-5); 33.7 (C-8); 32.1 (C-9).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub> [M+2H]<sup>+</sup> calculé : 303.1020; trouvé : 303.0996.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(5-aminocarbonyl-2-fluorophenyl)-5,7,8,9-tétrahydro benzocyclo heptène-6-one (**96**)



**Formule brute** : C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 348.10

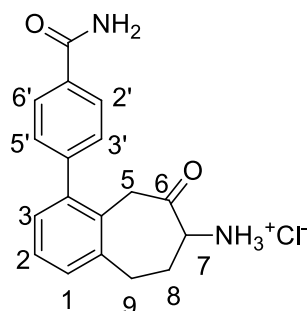
Les produits **96** sont obtenus sous la forme d'un mélange de deux atropoisomères (un majoritaire (M) et un minoritaire (m)) avec un ratio de 64 : 36. Les produits **96** sont obtenus sous la forme d'un solide incolore (17 mg, 74%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 7.99 (m, 1H, H-2', M+m); 7.947 (m, 1H, H-6', M); 7.78 (m, 1H, H-6', m); 7.28 (m, 4H, H-3, H-2, H-1 et H-3', M+m); 4.34 (m, 1H, H-7, M); 4.27 (d, 1H, H-7, m); 3.96 (d, 1H, *J* = 15.1 Hz, Ha-5, M); 3.87 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz, Ha-5, m); 3.63 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz, Hb-5, m); 3.60 (d, 1H, *J* = 15.1 Hz, Hb-5, M); 3.27 (m, 1H, Ha-9, M+m); 3.17 (m, 1H, Hb-9, M+m); 2.59 (m, 1H, Ha-8, M+m); 1.81 (m, 1H, Hb-8, M+m).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 203.2 (C-6, M); 202.7 (C-6, m); 162.3 (C-1',m); 161.9 (C-1',M); 142.2 (C-5', M+m); 142.1 (C-9a, M+m); 136.7 (C-4a, M+m); 135.5 (*J* = 264.9 Hz, C-4', M+m); 133.7 (*J* = 6.1 Hz, C-2', M); 133.1 (*J* = 6.1 Hz, C-2', m); 133.7 (C-6', M+m); 131.3 (C-4); 131.2 (C-3, M+m); 131.1 (C-2, M+m); 129.4 (C-1, M); 129.3 (C-1, m); 117.2 (*J* = 25.6 Hz, C-3', m); 117.1 (*J* = 25.6 Hz, C-3', M); 62.8 (C-7, M); 60.5 (C-7, m); 44.5 (C-5, m); 44.3 (C-5, M); 33.1 (C-9, M); 32.8 (C-9, m); 31.5 (C-8, m); 34.4 (C-8, M).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 313.1342; trouvé : 313.1347

chlorhydrate de la 7-amino-4-(4-aminocarbonylphényle)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one (**97**)



**Formule brute** :  $C_{18}H_{19}ClN_2O_2$

**Poids moléculaire** : 330.81 MA429

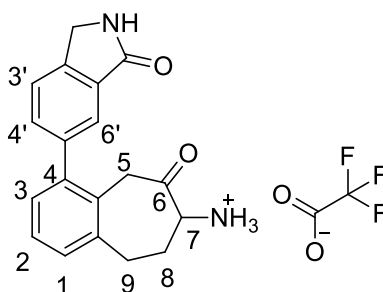
Le produit **97** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (15 mg, 80%).

**RMN  $^1H$**  ( $\delta$ , MeOD, 400 MHz) : 7.98 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-2' et H-6'); 7.52 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-3' et H-5'); 7.32 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, H-1 et H-2); 7.25 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, H-3); 4.42 (m, 1H, H-7); 4.03 (d, 1H,  $J = 13.8$  Hz, Ha-5); 3.76 (d, 1H,  $J = 13.8$  Hz, Hb-5); 3.18 (m, 1H, Ha-9); 2.61 (m, 1H, Hb-9); 1.75 (m, 1H, Ha-8); 1.32 (m, 1H, Hb-8).

**RMN  $^{13}C$**  ( $\delta$ , MeOD, 100 MHz) : 202.7 (C-6); 171.9 (C-CONH<sub>2</sub>); 145.6 b(C-1'); 142.9 (C-9a); 142.4 (C-4'); 133.9 (C-4a); 131.2 (C-2' et C-6'); 130.5 (C-3' et C-5'); 130.26 (C-2); 129.7 (C-4); 128.9 (C-3); 128.6 (C-1); 61.3 (C-7); 43.2 (C-5); 33.1 (C-8); 31.5 (C-9).

**HR-MS (ESI-QToF)** :  $C_{18}H_{19}N_2O_2$  [M+H]<sup>+</sup> calculé : 296.1473; trouvé : 296.1469.

Trifluoroacetate de la 7-amino-4-(3-oxoisindolin-5-yl) -5,7, 8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-6-one (**98**)



**Formule brute** :  $C_{21}H_{19}F_3N_2O_4$

**Poids moléculaire** : 420.13

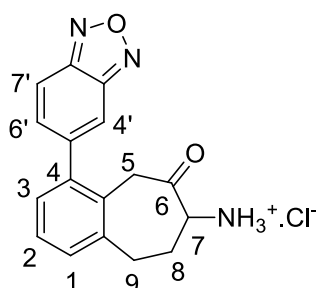
Le produit **98** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (16 mg, 68%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4'); 7.59 (m, 2H, H-6' et H-7'); 7.32 (m, 2H, H-1 et H-3); 7.25 (m, 1H, H-2); 4.54 (s, 2H, C-1'); 4.42 (m, 1H, H-7); 4.03 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, Ha-5); 3.71 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, Hb-5); 3.34 (m, 1H, Ha-9); 3.15 (m, 1H, Hb-9); 2.81 (m, 1H, Ha-8); 1.75 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)** : 202.7 (C6 et C-3'); 173.3 (C-4'); 146.1 (C-8'); 145.8 (C-5'); 143.1 (C-4); 142.3 (C-9a); 131.1 (C-7'); 130.6 (C2 et C-4a); 130.3 (C-1); 128.8 (C-3), 126.1 (C-6'); 123.9 (C-4'); 61.2 (C-7); 46.8 (C-1'); 43.2 (C-5); 33.1 (C-8); 31.4 (C-9)

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 307.1441; trouvé : 307.1433

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(benzo[*c*][1,2,5]oxodialzom-5-yl)-5,7,8,9-tetrahydro-benzocyclohepten-6-one (**99**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>16</sub> ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 329.78

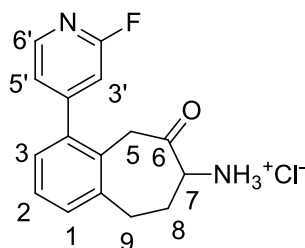
Le produit **99** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (22 mg, 73%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 10.63 (br s, NH); 8.33 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H-4'); 8.16 (br s, 1H, H-7'); 7.81 (dd, *J* = 8.3 et 2.1 Hz, 1H, H-6'); 7.32 (d, *J* = 4.7, 2H, H-1 et H-3); 4.48 (m, 1H, H-7); 4.11 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, Ha-5); 3.56 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz, Hb-5); 3.29 (m, 1H, Ha-9); 3.03 (m, 1H, Hb-9); 2.45 (m, 1H, Ha-8); 1.61 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 203.0 (C-6); 150.9 (C-8'); 150.1 (C-3'); 143.3 (C-5'); 141.9 (C-9a); 136.9 (C-4); 131.5 (C-1); 131.1 (C-4a); 130.6 (C-2); 129.6 (C-3); 118.2 (C-4'); 117.7 (C-7'); 117.4 (C-6'); 61.9 (C-7); 55.2 (C-5); 43.7 (C-8); 31.9 (C-9)

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 294.1237; trouvé : 294.1227.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(2-fluoro-4-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocyclohepten-6-one  
(103)



**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClFN<sub>2</sub>O

**Poids moléculaire** : 306.09

Le produit **103** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (16.8 mg, 58%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 300 MHz)** : 8.40 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 8.36 (d, 1H, J = 5.0 Hz, H-6') ; 7.41 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H-5') ; 7.39 (dd, J = 7.3 et 1.5 Hz, 1H, H-3) ; 7.36 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-2) ; 7.26 (dd, J = 7.3 et 1.5 Hz, 1H, H-1) ; 7.25 (s, 1H, H-3') ; 4.50 (dd, J = 10.8 et 5.3 Hz, 1H, H-7) ; 4.12 (d, J = 13.6 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.53 (d, J = 13.6 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.31 (m, 1H, Ha-9) ; 3.04 (m, 1H, Hb-9) ; 2.58 (m, 1H, Ha-8) ; 1.63 (m, 1H, Hb-8).

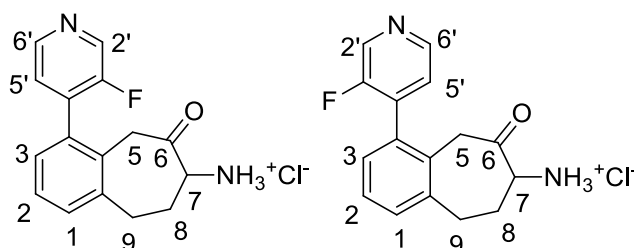
**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 750 MHz)** : 202.5 (C-6) ; 163.5 (d, J = 235 Hz, (C-2')) ; 154.3 (d, J = 8 Hz, (C-4')) ; 147.9 (d, J = 16 Hz, (C-6')) ; 142.2 (C-9a) ; 138.4 (C-4) ; 130.6 (C-3) ; 129.8 (C-4a) ; 129.1 (C-1) ; 128.1 (C-2) ; 123.6 (d, J = 4 Hz, (C-5')) ; 110.6 (d, J = 37 Hz, (C-3')) ; 59.8 (C-7) ; 42.3 (C-5) ; 31.7 (C-9) ; 30.1 (C-8).

**RMN <sup>19</sup>F (δ, DMSO, 282 MHz)** : -68.51 (s)

**IR (KBr)**: 3422, 2929, 1723, 1615, 1548, 1493, 1461, 1402, 1217, 1156, 1045, 915, 792 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 271.1241; trouvé : 271.1242.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(3-fluoro-4-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocyclohepten-6-one  
(104)



**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClFN<sub>2</sub>O

**Poids moléculaire** : 306.09



Les produits **104** sont obtenus sous la forme d'un mélange de deux atropoisomères (un majoritaire (M) et un minoritaire (m)) avec un ratio de 65 : 35. Les produits **104** sont obtenus sous la forme d'un solide jaune pâle (30 mg, 84%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 400 MHz)** : 8.73 (m, 1H, H-2', M+m); 8.60 (m, 1H, H-6', M); 8.54 (m, 1H, H-6', m); 8.33 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, M); 8.27 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, m) ; 7.49 (m, 1H, H-5', M+m); 7.42 (d, J = 7.6 Hz, H-1, 1H, M+m) ; 7.37 (t, J = 7.6 Hz, H-2, 1H, M+m); 7.26 (d, J = 7.6 Hz, H-3, 1H, M+m); 4.40 (m, H-7, 1H, M+m) ; 4.12 (d, J = 14.1 Hz, 1H, Ha-5, M+m) ; 3.52 (d, J = 14.1 Hz, 1H, Hb-5, M+m) ; 3.30 (m, 1H, Ha-9, M+m); 3.06 (m, 1H, Hb-9, M+m) ; 2.55 (m, 1H, Ha-8, M+m); 1.65 (m, 1H, Hb-8, M+m).

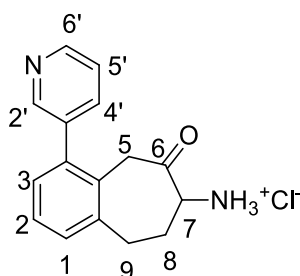
**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 100 MHz)** : 202.0 (C-6); 156.4(C-3'); 146.1 (C-6'); 141.9 (C-9a); 138.5 (C-4); 138.3 (C-2'); 132.7 (C-4'); 130.8 (C-4a); 130.6 (C-1); 129.4 (C-3); 128.1 (C-2); 126.9 (C-5'); 59.9 (C-7); 42.9 (C-5); 31.6 (C-8); 29.9 (C-9).

**RMN <sup>19</sup>F (δ, CDCl<sub>3</sub>, 282 MHz)** : -128.96 (s, m); -130.11 (s, M)

**IR (KBr)**: 3414, 2980, 1724, 1638, 1524, 1463, 1230, 1045, 799 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 271.1241; trouvé : 271.1244.

Chlorohydrate de la 7-amino-(3- pyridyle)-5,7,8,9-tétrahydro- benzocycloheptène-6-one (**105**)



**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O

**Poids moléculaire** : 329.78

Le produit **105** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (18.4 mg, 90%).

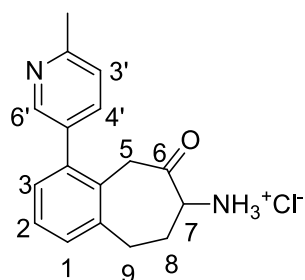
**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 8.98 (br s, 1H, H-2'); 8.94 (br d, 1H, J = 4.9 Hz, H-6') ; 8.72 (br d, J = 7.9 Hz, 1H, H-2) ; 8.20 (dd ; J = 7.5 et 1.8 Hz, 1H, H-4') ; 7.48-7.38 (m, 3H, H-3, H-4 et H-5') ; 4.57 (m, 1H, H-7) ; 4.17 (d, J = 13.5 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.58 (d, J = 13.5 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.44 (m, 1H, Ha-9) ; 3.18 (m, 1H, H9-9) ; 2.67 (m, 1H, Ha-8) ; 1.73 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 202.9 (C-6); 148.7 (C-4'); 143.9 (C-3'); 143.6 (C-2'); 141.3 (C-6'); 141.7 (C-4a); 137.6 (C-4); 136.5 (C-9a); 132.4 (C-1); 131.1 (C-3); 129.7 (C-5'); 128.3 (C-2); 61.8 (C-7); 43.1 (C-5); 33.5 (C-9); 31.6 (C-8).

**IR (KBr)**: 3421, 2973, 1720, 1551, 1471, 1151, 1040, 982, 814, 796, 688, 618 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 253.1335; trouvé : 253.1329.

Chlorohydrate de la 7-amino-4-(6-méthyle-2-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one (**106**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O

**Poids moléculaire** : 329.78

Le produit **106** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (21 mg, 79%).

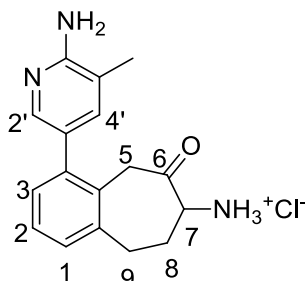
**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 8.7 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-2') ; 8.45 (dd, *J* = 8.2 et 2.1 Hz, 1H, H-4') ; 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5') ; 7.48-7.32 (m, 3H, H-1, H-2 et H-3), 4.54 (m, 1H, H-7) ; 4.14 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, Ha-5) ; 5356 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.42 (m, 1H, Ha-9) ; 3.14 (m, 1H, Hb-9) ; 2.84 (s, 3H, Me) ; 2.68 (m, 1H, Ha-8) ; 1.72 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 202.9 (C-6); 155.1 (C-6'); 147.5 (C-4a); 143.5 (C-2'); 138.5 (C-4); 136.8 (C-9a); 132.1 (C-4'); 131.4 (C-2); 131.1 (C-1); 130.5 (C-3'); 129.6 (C-3); 128.4 (C-5'); 61.8 (C-7); 43.1 (C-5); 33.5 (C-9); 31.6 (C-8); 20.2 (C-Me).

**IR (KBr)**: 3429, 2919, 2865, 1724, 1623, 1496, 1449, 1286, 1145, 1044, 1021, 803, 739 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QToF)**: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé: 267.1492; trouvé: 267.1484.

Chlorohydrate de la 7-amino-4-(6-Amino-5-méthyl-3-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one (**110**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O

**Poids moléculaire** : 317.81

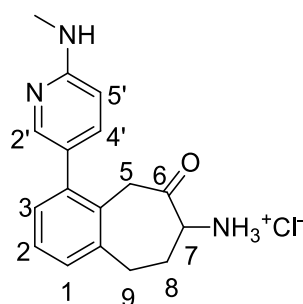
Le produit **110** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (12 mg, 63%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 7.91 (s, 1H, H-2'); 7.85 (s, 1H, H-4'); 7.35 (m, 2H, H-1 et H-2); 7.25 (m, 1H, H-3); 4.55 (m, 1H, H-7); 4.15 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, Ha-5); 3.65 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, Hb-5); 3.39 (m, 1H, Ha-9); 3.15 (m, 1H, Hb-9); 2.63 (m, 1H, Ha-8); 2.34 (s, 3H, Me); 1.74 (m, 1H, Ha-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 202.8 (C-6); 154.2 (C-6'); 146.1 (C-2'); 143.1 (C-9a); 137.2 (C-4a); 134.1 (C-4'); 131.1 (C-4); 131.2 (C-3'); 131.1 (C-3); 130.7 (C-1); 129.2 (C-2); 127.1 (C-5'); 61.5 (C-7); 43.1 (C-5); 33.3 (C-9); 31.5 (C-8); 16.7 (C-Me).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 282.1601; trouvé : 282.1600.

Chlorohydrate de la-7-amino-4-(6-méthylamine-3-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène -6-one (**111**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O

**Poids moléculaire** : 317.81

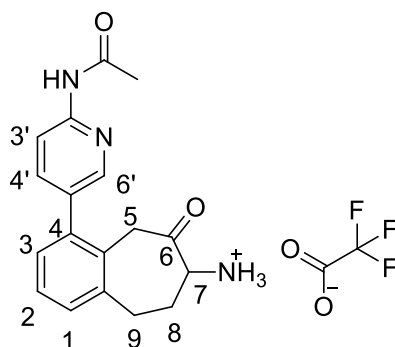
Le produit **111** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (16 mg, 65 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 7.97 (m, 2H, H-2' et H-5'); 7.36 (m, 2H, H-3 et H-2); 7.27 (m, 1H, H-1), 7.13 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-4') ; 4.55 (m, 1H, H-7) ; 4.16 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.66 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.40 (m, 1H, Ha-9) ; 3.14 (m, 1H, Hb-9) ; 3.09 (s, 3H, Me) ; 2.63 (m, 1H, Ha-8) ; 1.70 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 203.0 (C-6); 154.5 (C-6'); 146.1 (C-2'); 143.3 (C-9a); 137.2 (C-4a); 136.3 (C-5'); 131.4 (C-4); 131.4 (C-2); 130.8 (C-1); 129.5 (C-3); 126.6 (C-3'); 114.5 (C-4'); 61.8 (C-7); 43.3 (C-5); 33.6 (C-8); 31.3 (C-9); 29.1 (C-Me).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 282.1601; trouvé : 282.1593.

Trifluoroacetate de la 7-amino-4-(2'-acetylpyridine)-5,7,8,9-tetrahydro-benzocycloheptène-6-one (**112**)



**Formule brute** : C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 423.14

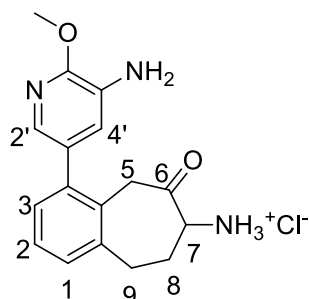
Le produit **112** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (30 mg, 68 %).

**RMN <sup>1</sup>H** (δ, MeOD, 400 MHz) : 10.63 (br s, NH); 8.33 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-6'); 8.16 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-3'); 7.81 (dd, J = 8.3 et 2.1 Hz; 1H, H-4'); 7.32 (d, 2H, J = 4.7, H-1 et H-3) ; 7.22 (t, J = 4.7 Hz, 1H, H-2) ; 4.48 (m, 1H, H-7) ; 4.11 (d, 1H, J = 13.7 Hz, Ha-5) ; 3.56 (d, 1H, J = 13.7 Hz, Hb-5) ; 3.29 (m, 1H, Ha-9) ; 3.03 (m, 1H, Hb-9) ; 2.45 (m, 1H, Ha-8) ; 1.61 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C** (δ, MeOD, 100 MHz): 202.1 (C-6); 169.2 (NCO); 151.1 (C-2'); 147.3 (C-6'); 141.3 (C-4); 138.9 (C5'); 137.8 (C-9a); 131.1 (C-3'); 129.5 (C-4a); 129.2 (C-1); 128.9 (C-2) ; 127.3 (C-3) ; 112.4 (C-4'); 59.3 (C-7); 41.9 (C-5); 31.2 (C-8); 29.6 (C-9); 23.7 (Me).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup> calculé : 310.1500; trouvé : 310.1542.

Chlorohydrate de la 7-amino-4-(5-amino-6-méthoxy-3-pyridyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one (**113**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 333.82

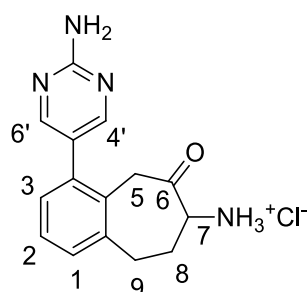
Le produit **113** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (17.4 mg, 62%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 7.28 (m, 5H, Ar); 4.46 (m, 1H, H-7) ; 4.13 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.75 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.35 (m, 1H, Ha-9) ; 3.32 (s, 3H, OMe); 3.12 (m, 1H, Hb-9) ; 2.61 (m, 1H, Ha-8) ; 1.68 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)**: 201.5 (C-6); 141.3 (C9' et C-6'); 137.3 (C-4a); 129.8 (C-5'); 129.3 (C-2'); 129.1 (C-2); 127.6 (C-3 et C-4'); 127.5 (C-4) ; 126.0 (C-1) ; 120.1 (C-3') ; 60.1 (C-7) ; 48.2 (OMe) ; 41.8 (C-5) ; 32.0 (C-8) ; 30.2 (C-9).

**HR-MS (ESI-QTof)** : C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 298.1550; trouvé : 289.1546.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(2-amino-5-pyrimidyl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocyclohepten-6-one (**116**)



**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O

**Poids moléculaire** : 304.11

Le produit **116** est obtenu sous la forme d'un solide jaune (21 mg, 82%).

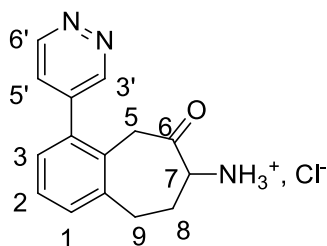
**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 300 MHz)** : 8.55 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 7.80 (s, 2H, H-4' et H-6'); 7.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3); 7.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-2) ; 7.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1) ; 4.62 (m, 2H, H-5), 4.11 (m, 1H, Ha-9); 3.56 (m, 1H, Hb-9); 3.01 (m, 1H, Ha-8); 2.30 (m, 1H, Hb-8)

**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 750 MHz)** : 206.0 (C-6); 153.5 (C-4' et C-6') ; 136.9 (C-2') ; 135.9 (C-9a) ; 135.1 (C-4) ; 129.5 (C-4a); 129.2 (C-3); 119.7 (C-1); 117.7 (C-2); 116.3 (C-5') ; 59.8 (C-7); 54.5 (C-5); 29.8 (C-8) ; 27.6 (C-9).

**IR (KBr)**: 3401, 3015, 1718, 1671, 1560, 1480, 1171, 802 cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS (ESI-QTof)** : C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 269.1397; trouvé : 269.1396.

Chlorohydrate de la 7-amino-4-(pyridazine)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptène-6-one (**120**)



**Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O

**Poids moléculaire** : 289.71

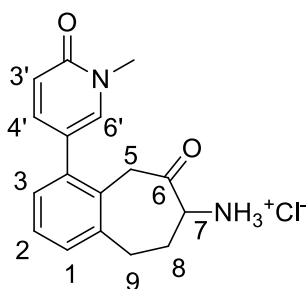
Le produit **120** est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle (10 mg, 81 %).

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\delta$ , MeOD, 400 MHz) : 9.55 (br s, 1H, H-3'); 9.50 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H, H-6'); 8.27 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H, H-5'), 7.47 (m, 3H, H-1 et H-2 et H-3) ; 4.57 (m, 1H, H-7) ; 4.20 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.63 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.45 (m, 1H, Ha-9) ; 3.19 (m, 1H, Hb-9) ; 2.67 (m, 1H, Ha-8) ; 1.78 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\delta$ , MeOD, 100 MHz): 202.8 (C-6); 154.3 (C-3'); 151.8 (C-6'); 145.5 (C-9a); 144.1 (C-4'); 136.4 (C-4a); 133.2 (C-2); 132.7 (C-5'); 131.6 (C-4); 131.2 (C-1); 130.1 (C-3); 62.1 (C-7); 43.6 (C-5); 33.7 (C-8); 31.8 (C-9).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> calculé : 254.1293; trouvé : 254.1288.

Chlorhydrate de la 7-amino-4-(1-méthyl-6-oxo-1,6-dihydropyridin-3-yl)-5,7,8,9-tetrahydro-benzo cyclohepten-6-one (**121**)



**Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 318.11

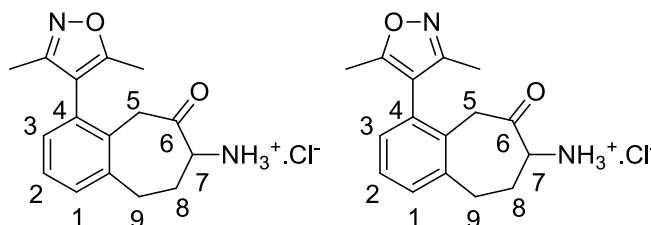
Le produit **121** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (18 mg, 73%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, DMSO, 400 MHz)** : 8.36 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 7.77 (d, 1H, *J* = 3.0, H-6') ; 7.53 (dd, 1H, *J* = 9.1 et 3.0 Hz, H-4') ; 7.20 (m, 3H, H-1 et H-2 H-3) ; 6.51 ( d, *J* = 9.1, 1H, H-3') ; 4.27 (m, 1H, H-7) ; 4.10 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, Ha-5) ; 3.62 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, Hb-5) ; 3.27 (m, 1H, Ha-9) ; 2.99 (m, 1H, Hb-9) ; 2.54 (m, 1H, Ha-8) ; 1.63 (m, 1H, Hb-8).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, DMSO, 100 MHz)** : 202.7 (C-6) ; 161.1 (C-2') ; 142.1 (C-6') ; 141.7 ( C-5') ; 140.8 (C-9a) ; 139.8 (C-3') ; 137.3 (C-4) ; 130.1 (C-4a) ; 129.3 (C-2) ; 129.1 (C-1) ; 127.7 (C-3) ; 118.8 (c-4') ; 59.6 (C-7) ; 42.4 (C-5) ; 37.2 (Me), 31.5 (C-8) ; 30.0 (C-9).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 283.1441; trouvé : 283.1439.

Chlorohydrate de la 7-amino-4-(3',5'-diméthylisoxazole-4-yl)-5,7,8,9-tétrahydro-benzocyclohepten-6-one (**122**)



**Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Poids moléculaire** : 306.11

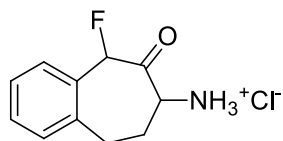
Les produits **122** sont obtenus sous la forme d'un mélange de deux atropoisomères (un majoritaire (M) et un minoritaire (m)) avec un ratio de 55 : 45. Les produits **122** sont obtenus sous la forme d'un solide incolore (13 mg, 83 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, MeOD, 400 MHz)** : 7.34 (m, 2H, H-1 et H-3) ; 7.12 (m, 1H, H-2) ; 4.40 (m, 1H, H-7) ; 4.06 (m, 1H, H-5a) ; 3.47 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, H-5b) ; 3.13 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, H-9a) ; 2.60 (m, 1H, H-9b) ; 2.28 (m, 1H, H-8a) ; 2.24 (s, 3H, Me, M.) ; 2.17 (s, 3H, Me, m.) ; 2.07 (s, 3H, Me, M.) ; 2.00 (s, 3H, Me, m.) ; 1.70 (m, 1H, H-b).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, MeOD, 100 MHz)** : 202.3 (C-6, M) ; 202.1 (C-6, m) 168.3 (C-3') ; 167.6 (C-5') ; 142.7 (C-4) ; 133.3 (C-9a) ; 131.8 (C-2) ; 131.3 (C-1) ; 131.3 (C-4a) ; 130.9 (C-4') ; 129.4 (C-3) ; 70.2 (C-7) ; 61.5 (C-5) ; 44.0 (C-8, M) ; 43.9 (C-8, m) ; 33.4 (C-9, M) ; 33.3 (C-9, m) ; 11.5 (Me, M) ; 11.2 (Me, m) ; 10.5 (Me, M) ; 10.4 (Me, m)

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 271.1441; trouvé : 271.1436

Chlorohydrate de la 7-Amino-5-fluoro-5, 7, 8, 9-tetrahydrobenzocycloheptène-6-one (**132**)



**Formule brute** : C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClFNO

**Poids moléculaire** : 229.68 MA321

Le produit **132** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (7 mg, 90 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, D<sub>2</sub>O, 295 K)** : 7.41–7.19 (m, 4H, Har); 5.48 (d, 1H, *J* = 45.5 Hz, H-5); 3.88 (m, 1H, H-7); 3.09 (m, 1H, H-9a); 2.85 (m, 1H, H-9b); 2.19 (m, 1H, H-8a); 1.77 (m, 1H, H-8b). Même valeurs que la littérature<sup>308</sup>

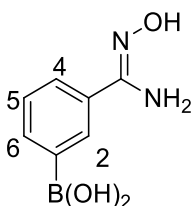
---

<sup>308</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 4942-4953



## Synthèse des acide boroniques

### Acide 3-(N'-hydroxy-carbamidoyl) phényl boronique (**125**)



**Formule brute** :  $C_7H_9BN_2O_3$

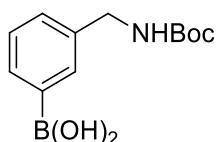
**Poids moléculaire** : 251.13

A une solution d'acide 3-cyanophénylboronique (110 mg, 0.48 mmol) dans de l'éthanol (0.5 ml) sont ajoutés du NaOH (1M) (0.5ml) et du chlorhydrate d'hydroxylamine (199 mg, 1.66 mmol, 2.3 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à 80°C pendant 16 heures.

Le milieu réactionnel est filtré et le précipité obtenu est lavé avec de l'éthanol pour conduire au produit final **125** sous la forme d'un solide incolore (49 mg, 46%).

**RMN  $^1H$  ( $\delta$ , DMSO, 300 MHz)** : 9.91 (s, 1H, OH); 8.60 (s, 1H, H-2); 8.03 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-6); 7.91 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-4); 7.55 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-5).

### Acide [3-((tert-butoxycarbonyl) aminométhyl) phényl] boronique (**126**)



**Formule brute** :  $C_{12}H_{18}BNO_4$

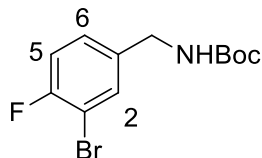
**Poids moléculaire** : 251.13

A une solution de chlorhydrate d'acide [3-(aminométhyl) phényl] boronique (200 mg, 1.07 mmol) dans un mélange (1 : 2) de THF : H<sub>2</sub>O (2.1 mL) sont ajoutés du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · 10H<sub>2</sub>O (611 mg, 2.13 mmol, 2 éqv.) et du Boc<sub>2</sub>O (257 mg, 1.2 mmol, 1.1 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à 80°C pendant 1 heure.

Le milieu réactionnel est ensuite concentré, dilué avec de l'AcOEt, lavé avec de l'eau, puis lavé avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporées à l'évaporateur rotatif. Le produit **126** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (204 mg, 75%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** 8.15 (m, 2H, Ar); 7.53 (m, 2H, Ar); 4.97 (br s, 1H, NH); 4.46 (d, 2H, J = 5.2 Hz, CH<sub>2</sub>); 1.51 (s, 9H, tBu). Même valeurs que la littérature<sup>309</sup>

Tert-butyl [3-bromo-4-fluorobenzyl] carbamate (**127a**)



**Formule brute :** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>FNO<sub>2</sub>

**Poids moléculaire :** 303.03

A une solution de 3-bromo-4-fluorobenzyl amine (300 mg, 1.5 mmol) dans du THF (7.5 mL) sont ajoutés du NaOH (642 µL, 1.5 mmol, 1M, 1 éqv.) et du Boc<sub>2</sub>O (654.7 mg, 3 mmol, 2 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures.

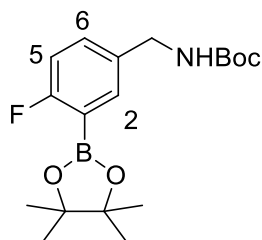
Les phases sont ensuite séparées et la phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (1 : 1). Le produit **127a** est obtenu sous la forme d'une huile incolore (380 mg, 83%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) :** 7.47 (dd, 1H, J = 6.8 et 2.1 Hz, H-2) ; 7.19 (m, 1H, H-6) ; 7.16 (t, 1H, J = 8.7 Hz, H-5) ; 4.89 (br s, 1H, NH) ; 4.28 (d, J = 8.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 1.46 (s, 9H, tBu).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) :** 159.8 (d, J = 250.1Hz, C-4) ; 156.1 (OCNH) ; 136.9 (C-1) ; 132.7 (C-2) ; 127.3 (d, J = 8.1Hz, C-6) ; 116.9 (d, J = 22.1Hz, C-5) ; 109.7 (d, J = 20.9 Hz, C-3) ; 80.3 (C-CMe<sub>3</sub>) ; 43.9 (C-CH<sub>2</sub>) ; 28.77 (C-CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF) :** non ionisable avec la source au Laboratoire.

Tert-butyl-[4-fluoro-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2 dioxaborolan-2-yl)-benzyl]carbamate (**127**)



**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>BFNO<sub>4</sub>

**Poids moléculaire :** 351.22

<sup>309</sup> T. Trash *et al.*, US2006/4002 A1, 2006, 40

A une solution de l'intermédiaire **127a** (250 mg, 0.82 mmol) dans du 1,4-dioxane (8.3 ml) sont ajoutés de l'acétate de potassium (161.3 mg, 1.65 mmol, 2 éqv.), du bis(pinacolato)diborane (417.5 mg, 1.65 mmol, 2 éqv.), et un complexe (1: 1) de Dichloro [1,1'-bis (diphénylphosphino) ferrocène] palladium (II) et de dichlorométhane (20.1 mg, 0.02 mmol, 0.03 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est chauffé à 85°C pendant 18 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite filtré puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (9 :1). Le produit **127** est obtenu sous la forme d'une huile incolore (200 mg, 70%)

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)** : 7.49 (dd, *J* = 6.4 et 2.3 Hz, 1H, H-2) ; 7.20 (m, 1H, H-6) ; 7.08 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5) ; 4.88 (br s, 1H, NH) ; 4.19 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 1.46 (s, 9H, *t*Bu) 1.27 (s, 12 H, Me).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)** : 158.6 (*J* = 252.7 Hz, C-4); 156.1 (OCNH) ; 136.8 (C-1) ; 132.6 (C-2) ; 128.2 (*J* = 4.6 Hz, C-6) ; 116.8 (*J* = 27.1Hz, C-5) ; 115.82 (C-Me) ; 115.6 (C-Me) ; 109.2 (*J* = 22.5 Hz, C-3) ; 83.8 (CMe<sub>3</sub>) ; 43.8 (CH<sub>2</sub>) ; 28.6 (CMe<sub>3</sub>), 25.3 (4xMe).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>BFNO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 352.2093 trouvé : 352.2090.

1,2,4,5-tétrazine (**128a**)



**Formule brute** : C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>4</sub>

**Poids moléculaire** : 82.06

A une solution d'acétate de formamidine (7.5 g, 72.04 mmol) dans du méthanol (12.5 mL) sont ajoutés de l'hydrate d'hydrazine (7.3 mL, 234 mmol, 3.3 éqv.) et de l'acide acétique glacial (25 mL, 436 mmol, 6 éqv.) par petites fractions à 0°C et sous atmosphère inerte. Le milieu réaction est agité à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution claire.

Ensuite, du nitrite de sodium (10.94 mg, 158.5 mmol, 2.2 éqv.) est ajouté à la solution précédente à 10°C. Le milieu réactionnel est agité à 10°C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 1 heure.

Enfin, une solution aqueuse du NaHCO<sub>3</sub> (10M). (18.6 mL, 186 mmol, 2.6 éqv.) est ajoutée au milieu réactionnel qui est agité à température ambiante pendant 30 min.

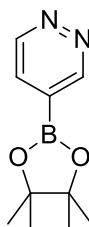
Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est extrait avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturé, avec de l'eau, puis séchée sur CaCl<sub>2</sub> pendant une nuit. Le brut réactionnel est concentré sous pression atmosphérique puis purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant de 100 % dichlorométhane.

Le brut est concentré sous pression atmosphérique, les traces de solvant sont évaporées à l'évaporateur rotatif.

Enfin, le résidu est purifié par sublimation (4 mbar, 25°C) pour donner le produit **128a** sous la forme de cristaux rouges (520 mg, 9%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) :** 10.36 (s, 2H, H-3 et H-6). Même valeurs que la littérature<sup>310</sup>

Ester pinacolique de l'acide-pyridazine boronique (**128**)



**Formule brute :** C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

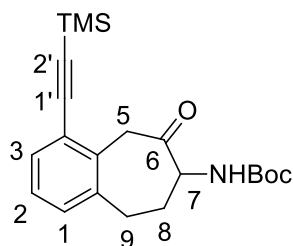
**Poids moléculaire :** 206.05

A une solution de 1,2,4,5-tétrazine (60 mg, 0.74 mmol) dans du nitrobenzène (1.2 mL) est ajouté de 1,2-éthynyl-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (122.2 mg, 0.81 mmol, 1.1 éqv.). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 140°C pendant 6 heures.

Le milieu réactionnel est concentré sous vide puis le résidu est recristallisé avec de l'AcOEt pour conduire au produit **128** obtenu sous la forme de cristaux jaunes (10 mg, 40 %).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) :** 9.42 (br s, 1H, H-3) ; 9.19 (dd, 1H, J = 4.9 et 1.5 Hz, H-6) ; 7.84 (dd, 1H, J = 4.8 et 1.4 Hz, H-5) ; 1.32 (s, 12H, Me). Même valeurs que la littérature<sup>311</sup>

7-tert-butoxycarbonylamino-4-((Triméthylsilyl)éthynyl) 5, 7, 8, 9- Tétrahydro - benzocycloheptène -6-one (**129**)



**Formule brute :** C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>3</sub>Si

**Poids moléculaire :** 371.55

A une solution de l'intermédiaire **76** (10 mg, 0.03 mmol) dans un mélange de DMF (1 mL) et de diéthylamine (3 mL) sont ajoutés du Triméthylsilylacétylène (8 μL, 0.06 mol, 2 éqv.), de la triphénylphosphine (0.4 mg, 0.002 mmol, 0.05 éqv.), du CuI (0.6 mg, 0.003 mmol, 0.1 éqv.) et du PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 mg, 0.003 mmol, 0.1 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est chauffé sous irradiation aux micro-ondes à 125°C, 300W pendant 25 minutes.

<sup>310</sup> J. Sauer *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885-2896

<sup>311</sup> M. D Helm *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3889-3892

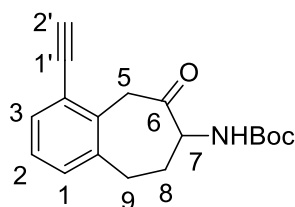
Le milieu réactionnel est ensuite filtré, évaporé à l'évaporateur rotatif puis purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : AcOEt (9 : 1). Le produit **129** est obtenu sous la forme d'un solide incolore (7 mg, 67%).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.39 (m, 1H, H-2) ; 7.18 (m, 2H, H-1 et H-3) ; 5.47 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, NH) ; 4.51 (m, 1H, H-7) ; 4.16 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, Ha -5) ; 3.96 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, Hb -5) ; 2.88 (m, 2H, H-9), 2.63 (m, 1H, Ha-8) ; 1.55 (m, 1H, Hb-8) ; 1.42 (s, 9H, Boc), 0.27 (s, 9H, SiMe<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)** : 205.4 (C-6); 154.8 (C-CO); 139.9 (C-9a); 134.2 (C-4a); 131.3 (C-4); 129.4 (C-2); 127.3 (C-1); 123.3 (C-3); 103.1 (C-1'); 99.2 (C-2'); 79.7 (C-CMe<sub>3</sub>); 59.3 (C-7); 45.1 (C-5); 34.1 (C-8); 30.8 (C-9); 28.3 (C-CMe<sub>3</sub>); 0.1 (C-SiMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup> calculé : 372.1989; trouvé : 372.1979.

7-tert-butoxycarbonylamino-4-éthynyl 5, 7, 8, 9- Tétrahydro – benzocycloheptène -6-one  
(**129a**)



**Formule brute** : C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>

**Poids moléculaire** : 299.36

A une solution de l'intermédiaire **129** (30 mg, 0.09 mmol) dans un mélange 1 : 1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et d'eau (2 mL) est ajouté du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (56 mg, 0.4 mmol, 5 éqv.) à température ambiante et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est chauffé à 40°C pendant une heure.

Le milieu réactionnel est ensuite dilué par ajout d'un mélange de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et de l'eau puis décanté. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne avec un éluant Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (8 : 2). Le produit **129a** est obtenu sous la forme d'un solide jaune (22 mg, quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : 7.30 (dd, *J* = 6.0 et 3.4 Hz, 1H, H-2) ; 7.18 (m, 2H, H-1 et H-3) ; 5.47 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz, NH) ; 4.51 (ddd, *J* = 11.0 et 7.1 et 3.8 Hz, 1H, H-7) ; 4.16 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, H-5a) ; 4.06 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, H-5b) ; 3.31 (s, 1H, H-2') ; 2.95 (ddd, *J* = 14.3, 8.9 et 2.4 Hz, 1H, Ha-9) ; 2.95 (ddd, *J* = 14.4, 9.9 et 4.5 Hz, 1H, Hb-9) 2.63 (m, 1H, Ha-8) ; 1.53 (m, 1H, Hb-8) ; 1.42 (s, 9H, Boc).

**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)** : 205.1 (C-6); 154.8 (NCO<sub>2</sub>); 140.2 (C-9a); 134.5 (C-4a); 131.7 (C-2); 129.7 (C-1); 129.8 (C-4); 127.5 (C-3); 122.3 (C-1'); 81.7 (C-2'); 79.7 (CMe<sub>3</sub>); 59.6 (C-7); 44.8 (C-5); 34.1 (C-8); 30.9 (C-9); 28.3 (CMe<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI-QToF)** : C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculé : 300.1600; trouvé : 300.1600

## Tests biologiques

### Essais enzymatiques *in vitro*

Expression et purification des aminopeptidases recombinantes d'intérêts

#### *Expression et purification des enzymes recombinantes (ERAP1, ERAP2 et IRAP)*

L'expression et la purification des enzymes recombinant humaines (ERAP, ERAP2 et IRAP) sont décrites par Stratikos *et al.*<sup>312</sup> et Mpakali *et al.*<sup>313,314</sup>. Les baculovirus recombinantes contenant le gène de chaque enzyme sont produites dans des cellules d'insectes (*Spodoptera frugiperda sf9*) selon les instructions du fournisseur (Bac-to-Bac système d'expression des baculovirus, Invitrogen). Les protéines recombinant sont exprimé dans des cellules d'insectes (Hi5) (cellules ovariennes du *Trichoplusia ni*) après infection avec la baculovirus recombinante convenable. Les protéines recombinant sont récoltées par centrifugation (3000 rpm, 30 min, 4°C) du milieu de culture après 3 jours d'infection et purifié par chromatographie d'affinité Ni-NTA-Agar, selon la procédure décrite par Stratikos *et al.* Enfin, les protéines récoltés sont stockés à -82°C dans une solution tampon contenant (10 mM Hepes pH 7.0, 100 mM NaCl, 10% glycérole).

#### *Expression et purification de l'enzyme recombinante PfA-M1 (Dr. M. Schmitt)*

L'expression de l'enzyme recombinante PfA-M1 est produite dans des bactéries E. Coli. L'ADN vecteur (ou plasmide) est préparé par clonage du gène synthétique codant pour la quasi-totalité de l'enzyme. L'ADN vecteur a été construit de manière à ce que la protéine d'intérêt soit fusionnée à une étiquette Histidine. Le plasmide contient dans sa séquence plusieurs caractéristiques importantes dont une origine de répllication, des sites de restriction, un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline, un opéron lactose et un gène répresseur de cet opéron. Le plasmide est ensuite introduit dans la bactérie (E.Coli) par choc thermique. La sélection des bactéries transformées se fait par culture dans un milieu contenant les antibiotiques (ampicillines et chloramphénicol).

Les protéines produites par les bactéries (dont rPfA-M1) sont récupérées par centrifugation après lyse des cellules. La protéine d'intérêt est purifiée par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). Les ions nickel chargés sur la colonne sont chélatés par l'étiquette histidine de la protéine d'intérêt, qui est donc plus retenue que les autres protéines au passage sur la colonne. La protéine d'intérêt est ensuite éluée avec de l'imidazole. L'étape finale de dialyse ou de filtration sur gel permet d'éliminer l'imidazole restant et d'enrichir la protéine en ions zinc. rPfA-M1 est enfin conservée au congélateur (-80 °C) dans du glycérol.

### Essais enzymatiques

#### *Essais d'activité enzymatique des enzymes recombinantes humaines ERAP1, ERAP2 et IRAP*

Les activités enzymatiques sont déterminées par la mesure d'absorbance de la 7-amido-4-méthyl-coumarine libérée à 460 nm (selon la Figure 152). La L-Leucine-7-amido-4-méthyl-coumarine (L-Leu-AMC ; Sigma-Aldrich) est sélectionnée comme substrat pour ERAP1, IRAP et la L-arginyl-7-amido-4-méthyl-coumarine (L-Arg-AMC; Sigma-Aldrich) pour ERAP2.

<sup>312</sup> E. Zervoudi *et al.*, *Biochem. J.* **2011**, 435, 411-420

<sup>313</sup> A. Mpakali *et al.*, *J. Immunol.* **2015**, 195, 2842-2851

<sup>314</sup> A. Mpakali *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 260621-26032

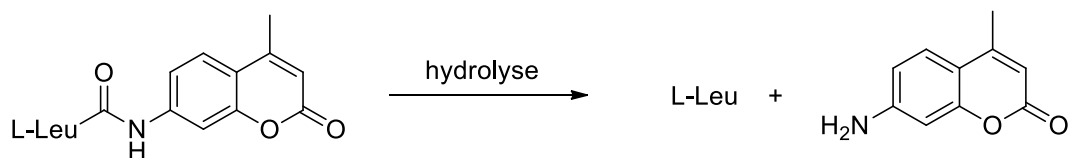


Figure 152 : hydrolyse de la leucine 7-amido-4-méthyl -coumarine par ERAP1, ERAP2 ou IRAP

Les mesures ont été effectuées en plaque 96-puits (volume totale de chaque puit = 150µL) avec un lecteur de fluorescence de plaque (TECAN infinite M200). 30 nM d'ERAP1 ou 6 nM d'ERAP2 ou 6 nM d'IRAP est ajouté dans chaque puit, avec 50 µM du substrat fluorogène et une concentration variable d'inhibiteur (de 1 nM jusqu'à 200 µM). La réaction est suivie à température ambiante pendant 10 minutes et l'activité enzymatique est mesurée par la mesure de la pente de la courbe (temps, fluorescence). Les calculs des IC<sub>50</sub> expérimentales sont réalisés l'équation (1) suivante en utilisant le logiciel (GraphPad Prism software) (selon la Figure 153.).

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})}) \quad (1)$$

Y (activité enzymatique) et X (concentration d'inhibiteur)

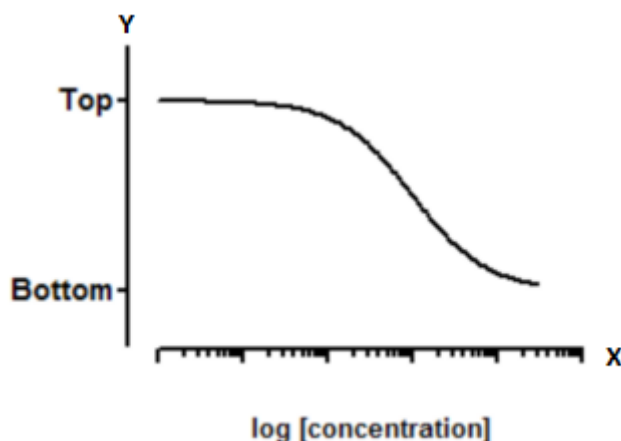


Figure 153 : model calculé par le logiciel (GraphPad Prism software). X = Log de concentration de l'inhibiteur, Y = activité enzymatique, Top = inhibition maximal, Bottom = inhibition minimal, HillSlope = la pente du courbe.

Essais d'activité enzymatique de l'enzyme recombinante PfA-M1 (Dr. M. Schmitt)

Les activités de rPfA-M1 (10 nM) sont déterminées par la mesure de l'absorbance de la *para*-nitroaniline libérée à 405 nm (selon la Figure 154). L'Alanine-*para*-nitroanilide est sélectionnée comme substrat pour rPfA-M1 (Km = 1.5 mM) et la L-Leucine-*para*-nitroanilide est sélectionnée comme substrat pour APN (Km = 0.2 mM). Les tests sont réalisés sur HP/Agilent UV-Visible diode array spectrophotomètre 8453, à 30°C, pendant 1 heure, dans Tris HCl 200 mM, à pH 7.5 pour rPfA-M1 et pour l'APN.

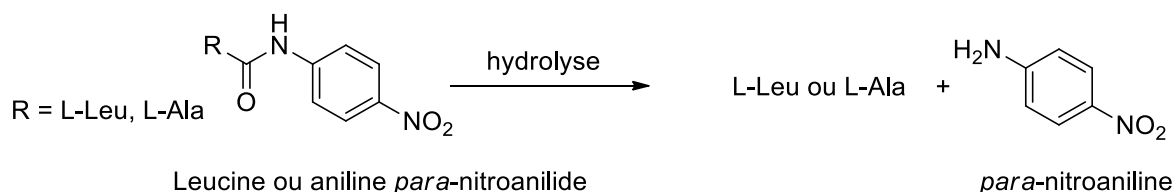


Figure 154 : hydrolyse de la leucine *para*-nitroanilide par une PfA-M1 ou APN

## Essais de cytotoxicité

### Sur les cellules L6 :

La cytotoxicité a été évaluée à l'aide de la lignée cellulaire L6 du muscle squelettique du Rat, maintenue à 37 ° C dans le milieu RPMI 1640 complété par un sérum de veau foetal à 10% (v/v). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (20000 cellules / ml) et incubées pendant 24 heures, puis, les cellules L6 ont été traitées avec la molécule inhibitrice pendant 72 heures. Après incubation, le milieu de croissance cellulaire a été remplacé par 100 µL de RPMI 1640 contenant 20% (v/v) d'alar blue (Thermofisher, France). Les cellules viables fluorescentes ont été surveillées après 5 heures d'incubation à 37 ° C, à une longueur d'onde de 530 nm pour l'excitation et à 590 nm pour l'émission, dans un spectromètre à luminescence FL600 (Biotek, France). Le  $CC_{50}$ , correspondant aux concentrations de médicament provoquant une inhibition de la prolifération des cellules L6 à 50%, a été calculé à partir des courbes concentration-réponse du médicament.

Remarque : Alamar blue (ou resazurine) est un indicateur bleu réduit au sein des mitochondries (en générale en présence du NADPH ou NADH déhydrogénase) en résorufine de couleur rose fortement fluorescent.

### Sur les cellules Vero :

La cytotoxicité a été évaluée sur la lignée cellulaire Vero (à partir des cellules épithéliales du rein du singe) qui ont été cultivées à 37 ° C dans le milieu Eagle Eagle modifié par Dulbecco, additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal. Un volume de 100 µL de cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10 000 cellules / puits) et incubées pendant une nuit. Les cellules ont été traitées avec des inhibiteurs dissous dans du DMSO, à une concentration finale maximale de 1% de DMSO. Les puits de contrôle ont reçu un volume égal de DMSO et 5-Fluorouracil (Sigma) a été utilisé comme témoin positif. Après 72 h, le milieu de croissance cellulaire a été éliminé et remplacé par 100 µL de milieu de culture contenant 10% de solution de MTT (5 mg/ml). Les plaques ont été incubées pendant les 4 h suivantes à 37 ° C. Une solution 100 µl de SDS / DMF a été ajouté par puits et incubé durant la nuit. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm pour l'excitation et à 620 nm pour l'émission à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek Instruments, Inc., USA).  $CC_{50}$ , correspondant aux concentrations de médicament provoquant une inhibition de la prolifération de cellules Vero à 50%, ont été calculés à partir des courbes concentration-réponse du médicament

Remarque : la solution MTT ou sel de tétrazolium (couleur jaune) est réduit par la succinate mitochondriate des cellules vivantes en formazan. Ceci précipite dans la mitochondrie en couleur violet

## Essais d'activité antipaludique *in cellulo*

Des tests antipaludiques, *in cellulo*, ont été réalisés sur des souches sensibles à la chloroquine 3D7 (Tanzanie) et sur des souches résistantes à la chloroquine FcB1 (Columbia) comme décrit précédemment<sup>315, 316</sup>. Les parasites ont été cultivés dans des érythrocytes humains à 37 ° C dans du milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) en présence du sérum humain à 10 % (v/v) inactivé par la chaleur (à 56 °C pendant 45 minutes) sous une atmosphère de 3% de CO<sub>2</sub>, 6% d'O<sub>2</sub> et 91% de N<sub>2</sub>, comme l'ont

<sup>315</sup> M. Flipo *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1322-1334

<sup>316</sup> M. Flipo *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2659-2662



décrit Trager et Jensen<sup>317</sup>. L'activité antipaludique *in vitro* est déterminée en utilisant une série de micro-dilution selon la technique de Desjardins *et al.*<sup>318</sup> des solutions de composés dérivés d'aminobenzosuberone (20 mM) et de la bestatine (Sigma-Aldrich, 30 mM) ont été préparées dans du DMSO; La chloroquine (Sigma-Aldrich, 10 mM) a été préparée dans de l'eau distillée stérile (contrôle positif). Ceux-ci ont été dilués en série avec un milieu de culture et introduits dans des cultures parasitaires asynchrones (1% de parasitémie et 1% d'hématocrite final) a été ajoutée aux puits de plaques à 96 puits pendant 24 heures à 37 ° C dans un incubateur candle jar system (200 µL de volume par puit). Après 24 heures d'incubation, on a ajouté 0,5 µCi de 3H-hypoxanthine (11,1 / mmol; Perkin-Elmer, France) par puits et les plaques ont été renvoyées à une incubation à 37°C dans le candle jar system pour une incubation supplémentaire de 24 h. Le lendemain, les plaques ont été congelées / décongelées et des lysats cellulaires ont été recueillis sur des filtres en fibres de verre pour être comptés dans un spectromètre à scintillation liquide. L'inhibition de la croissance pour chaque concentration de médicament a été déterminée en comparant la radioactivité incorporée dans les cultures traitées avec la radioactivité incorporée dans des cultures témoins (sans médicament, mais avec du DMSO à la même concentration) maintenues sur les mêmes plaques. La concentration des molécules résultant de 50% de l'inhibition de la croissance du parasite exprimée en concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>) a été déterminée par une analyse de régression non linéaire des données à l'aide de GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA). La concentration de DMSO dans les dosages n'a jamais dépassé 0,5%, c'est-à-dire la limite au-dessus de laquelle la croissance du parasite est affectée par ce solvant. Bestatin et chloroquine ont été utilisés comme témoins positifs dans les dosages.

#### Déterminations des propriétés ADME *in vitro* (TechMed <sup>LL</sup>)

Les composés sont stockés dans du DMSO à 4°C à une concentration de 10 mM

#### *Solubilité cinétique*

La solubilité cinétique a été mesurée en diluant 20 µL de solution mère de DMSO 10 mM du composé en question dans 980 µL d'une solution tampon (PBS) saline tamponnée au phosphate à pH 7.4 avec la composition suivante: composition: NaCl 137.5 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM et 1,4 MM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Les échantillons ont été secoués pendant 16 heures à 20-22°C. Après une ultracentrifugation à 15000t/min pendant 10 min à 20°C, la concentration dans le surnageant a été mesurée par une procédure HPLC sur une colonne kinetex 2.6 µm C18 100A 50x2.1 mm en utilisant une courbe d'étalonnage établie pour le composé en diluant le stock 10 mM de DMSO Solution aux concentrations adaptées. Le volume d'injection était de 20 µL, le débit de la phase mobile était de 2 mL / min et le programme suivant était appliqué pour l'élution: 0-0.1 min, 5% B; 0,1-2,6 min, 5-95% B; 2,6-3,1 min, 95% B; 3,1-3,3 min, 95 à 5% de B et 3,3 à 6 min, 5% de B. Le solvant A était un mélange d'acide trifluoroacétique à 0,05% dans l'eau et le solvant B était de l'acétonitrile. La longueur d'onde de détection était de 254 nm et le temps de rétention était de 1,64 min.

#### *Solubilité thermodynamique*

La solubilité thermodynamique a été mesurée en dissolvant 1 mg du composé a étudié dans 500 µL d'une solution tampon à pH 7.4 (PBS) de 500 µL avec la composition suivante: NaCl 137.5 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM additionné ou non 10% de Kolliphor EL, 15% de Kolliphor HS15, 10% de polysorbate 80, 50% de PEG 400 ou 10% d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine.

<sup>317</sup> W. Trager *et al.*, *Science* **1976**, 193, 673-675

<sup>318</sup> R. Desjardins *et al.*, *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy* **1979**, 16, 710-718

Les échantillons ont été agités pendant 24 heures à 20-22 ° C. La saturation a été confirmée par la présence de poudre non dissoute. Après une ultracentrifugation à 15 000 t/min pendant 10 min, la concentration dans le surnageant a été mesurée par une procédure HPLC sur une colonne Kinetex 2.6 µm C18 100A 50x4.6 mm en utilisant une courbe d'étalonnage établie pour le composé en diluant la solution stock DMSO 10 mM à des concentrations adaptées. Le volume d'injection était de 20 µL, le débit de la phase mobile était de 2 mL / min et le programme suivant était appliqué pour l'élution: 0-0.1 min, 5% B; 0,1-2,6 min, 5-95% B; 2,6-3,1 min, 95% B; 3,1-3,3 min, 95 à 5% de B et 3,3 à 6 min, 5% de B. Le solvant A était un mélange d'acide trifluoroacétique à 0,05% dans l'eau et le solvant B était de l'acétonitrile. La longueur d'onde de détection était de 254 nm et le temps de rétention était de 1,64 min.

#### *CHI-Détermination du log D*

Les solutions sont analysées en utilisant une HPLC avec un détecteur à diodes (254 nm et 280 nm). La chromatographie est effectuée en phase inversée à température ambiante sur une colonne Luna C18 5µ 100A 50 x 4.6mm, en utilisant un mélange d'acétate d'ammonium 50 mM comme solvant aqueux et de l'acétonitrile comme solvant organique. Le débit de phase mobile était de 2 mL / min et le programme suivant a été appliqué pour l'élution: 0-0.1 min, 0% B; 0,1-2,6 min, 0-100% B; 2,6-3,1 min, 100% B; 3,1-3,3 min, 100-0% B et 3,3 à 6 min, 0% B. Le solvant A était l'acétate d'ammonium aqueux 50 mM pH 7,4 et le solvant B était l'acétonitrile.

Solutions de test: la solution mère est diluée 1/50 dans un mélange tampon-acétate d'ammonium 50 mM-acétonitrile (7: 3 v/v).

Une courbe d'étalonnage est obtenue en utilisant 10 composés standards (CHI connu) dissous dans un mélange tampon-acétonitrile (7: 3 v/v) pour atteindre une concentration de 0,1 mg/mL dans chaque étalon. Le modèle linéaire de CHI (Indices d'hydrophobicité chromatographique) vs  $t_R$  permet de déterminer le CHI pour nos composés une fois qu'ils connaissent leur temps de rétention avec ce système éluant.

L'estimation de LogD est calculée en utilisant l'équation de corrélation obtenue par TechMedILL:  $\log D_{CHI} = 0,0515 \cdot CHI + 1.2464$ .

#### *Détermination de la clairance intrinsèque ( $Cl_{int}$ )*

Une solution 100 µM est tout d'abord préparée en diluant 10 µL de solution mère dans 990 µL d'un mélange eau/acétonitrile (1: 1 v/v). Cette solution est ensuite diluée à 1/100 dans un tampon phosphate (pH 7.4) contenant des microsomes hépatiques humains (0,5 mg/mL), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 mM de NADPH (volume d'incubation: 400 µL, concentration en composé: 1 µM, température: 37°C). Au temps zéro puis à 15, 30, 45 et 60 min, deux aliquotes (70 µL) du mélange d'incubation est éliminée et diluée avec de l'acétonitrile (70 µL) pour arrêter la réaction. Les échantillons sont agités pendant 3 min, sont soniqués pendant 3 min et centrifugés à 15 000 t/min pendant 5 min. L'analyse est ensuite effectuée en utilisant un UHPLC couplé avec Shimadzu quadripolo LC-MS8030. Le contrôle négatif est effectué en remplaçant NADPH par un volume de tampon similaire. Le contrôle positif est effectué en utilisant de la testostérone. Le débit de la phase mobile était de 0,5 ml / min et le programme suivant a été appliqué pour l'élution: 0 min, 5% B; 0-1,2 min, 5-95% B; 1,2-1,4 min, 95% B; 1,4-1,42 min, 95-5% B et 1,42-2,8 min, 5% B. Le solvant A était un mélange de 0,05% d'acide formique dans l'eau et le solvant B était de l'acétonitrile. La longueur d'onde de détection était de 254 nm.

### *Détermination de la perméabilité passive PAMPA*

Une solution de travail 1 mM est préparée en diluant 50 µL de solution stock de DMSO 10 mM dans 450 µL de DMSO. La solution de donneur (composé 50 µM dans du DMSO à 5% v/v / PBS, 1% de Lucifer yellow) a été préparée en diluant 1/20 de la solution de travail dans du Lucifer Yellow / PBS à 1% v/v. Une aliquote (150 µL) de la solution donneuse a été ajoutée aux puits de la plaque donneur contenant une membrane de filtre PVDF (surface 0,24 cm<sup>2</sup>) pré-revêtue avec 5 µL de phosphatidylcholine à 2% dans du dodécane. Les puits de la plaque accepteur de PTFE a été rempli avec 300 µL de PBS, et la plaque donneur et la plaque accepteur ont été combinées et incubées pendant 16 h à 20°C. Les plaques ont été retirées du shaker et l'échantillon accepteur a été préparé en mélangeant 270 µL de solution du puits accepteur avec 130 µL d'acétonitrile. L'échantillon donneur a été préparé en diluant une aliquote de solution du puits donneur (20 µL) avec du PBS (250 µL) et de l'acétonitrile (130 µL). L'échantillon témoin a été préparé en diluant une aliquote de solution donneur (20 µL) avec du PBS (250 µL) et de l'acétonitrile contenant un étalon interne (130 µL). Pour déterminer la concentration du composé à l'équilibre, on a dilué 150 µL de solution donneuse (composé 50 µM dans du DMSO à 5% v/v / PBS, 1% de Lucifer jaune) avec 300 µL de PBS (pH 7.4). Les échantillons préparés ont été analysés par LC-MS/ MS en mesurant la zone sous le pic (AUC) du composé sur le chromatogramme en utilisant un UHPLC sur une colonne Kinetex 2.6 µm C18 100A 50x2.1 mm couplée à un Shimadzu LCMS-8030 Quadripôle Le débit de la phase mobile était de 0,5 ml / min et le programme suivant a été appliqué pour l'élution: 0 min, 5% B; 0-1,2 min, 5-95% B; 1,2-1,4 min, 95% B; 1,4-1,42 min, 95-5% B et 1,42-2,8 min, 5% B. Le solvant A était un mélange de 0,05% d'acide formique dans l'eau et le solvant B était de l'acétonitrile. La longueur d'onde de détection était de 254 nm.

La valeur de perméabilité effective (Pe) a été calculée en utilisant l'équation suivante

$$Pe = -C \operatorname{Ln} \left[ 1 - \frac{AUC_A}{AUC_{eq}} \right]$$
$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times area \times time}$$

Des expériences similaires ont été effectuées en parallèle avec le chloramphenicol et la testostérone utilisés comme marqueurs de perméabilité négative (expérimentale log Pe = -6.4, valeur de la littérature -7.0) et positif (log Pe = -4.6, valeur de la littérature -4.4).

### *Essais de liaison aux protéines plasmatiques*

Dans une plaque de base RED PTFE sont positionnées des inserts RED à usage unique. Chaque insert était composé de 2 chambres séparées par une membrane de cellulose semi-perméable alignée verticalement avec un poids moléculaire Cut-off (MWCO) de 12 kDa.

Les solutions à tester sont composées de la molécule en question ou du verapamil (contrôle positive) dans du DMSO à concentration de 100 µM (10 µL de solution stock + 990 µL de DMSO). A ce mélange est ajouté plasma humain enrichi avec une concentration finale est de 1 µM.

Cette solution préalablement préparée est ajoutée à la chambre rouge de l'insert de l'appareil RED et une solution de PBS (350 µL) a été ajoutée à la chambre blanche. Les échantillons sont dialysés pendant 4 heures à 37 ° C en agitant à une vitesse de 250 tr/min. Chaque échantillon a été incubé en duplicat. A la fin de l'incubation, des aliquotes de 70 µL ont été retirées de chaque chambre et

adaptées à la matrice, c'est-à-dire un volume égal de PBS a été ajouté à l'échantillon d'incubation au plasma et un volume égal de plasma a été ajouté à l'échantillon d'incubation du test PBS. Les échantillons ont été précipités avec 350 µL d'acétonitrile et ont été congelés avant analyse. Après décongélation, les échantillons ont été mélangés par vortex pendant 3 min et ont été soniqués pendant 3 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15 000t/min pendant 5 min à 4 ° C pour précipiter toutes les protéines. Les surnageants ont été analysés par UHPLC sur une colonne Kinetex 2,6 µm C18 100A 50x2.1 mm couplée à un quadripôle Shimadzu LCMS-8030 en utilisant une courbe de calibration. Le débit de la phase mobile était de 0,5 ml / min et le programme suivant a été appliqué pour l'élution: 0 min, 5% B; 0-1,2 min, 5-95% B; 1,2-1,4 min, 95% B; 1,4-1,42 min, 95-5% B et 1,42-2,8 min, 5% B. Le solvant A était un mélange de 0,05% d'acide formique dans l'eau et le solvant B était de l'acétonitrile. La longueur d'onde de détection était de 254 nm.

La fraction non liée a été déterminée comme le rapport de la surface du pic dans le tampon à celui du plasma. Le contrôle positif a été effectué en utilisant du verapamil (expérimental Fu 10%, valeur littéraire 8%).

#### Détermination des propriétés pharmacocinétiques *in vivo*

A des souris CD-1 femelles ont été administrées par voie intraveineuse. Une solution du composé à étudier (**10** ou **86**) de 2 ml/kg (dose de 3 mg/kg, 1,5 mg / ml de (**10** ou **86**) dissous dans une solution de PBS contenant 10% d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine). Dans des études supplémentaires, des souris ont été administrées par voie intrapéritonéale avec une solution de 10 ml / kg de (**10** ou **86**) (solution de 3 mg/kg, solution *iv* diluée à 1: 5 avec une solution de PBS) ou administré par voie orale une solution de 10 ml/kg de (**10** ou **86**) (dose de 3 mg/kg, Solution *iv* diluée 1:5 avec de l'eau distillée). Les animaux ont été sacrifiés à 5, 15 et 30 minutes, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après administration (n = 3 par temps), et des échantillons de sang ont été prélevés par ponction cardiaque. Le plasma a été séparé par centrifugation et conservé congelé à -80°C. 400 µL de chaque échantillon de plasma ont été mélangés avec 1 ml d'acétonitrile, suivi d'un mélange au vortex pendant 3 min et une sonication pendant 3 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15 000 t/min pendant 5 min à 4°C pour précipiter toutes les protéines. Après centrifugation, la concentration dans les surnageants a été analysée par UHPLC sur une colonne Kinetex 2,6 µm C18 100A 50x2.1 mm couplée à un triple quadripôle Shimadzu LCMS-8030. Le débit de la phase mobile était de 0,5 ml / min et le programme suivant a été appliqué pour l'élution: 0 min, 5% B; 0-1,2 min, 5-95% B; 1,2-1,4 min, 95% B; 1,4-1,42 min, 95-5% B et 1,42-2,8 min, 5% B. Le solvant A était un mélange de 0,05% d'acide formique dans l'eau et le solvant B était de l'acétonitrile. La longueur d'onde de détection était de 254 nm.

Les paramètres pharmacocinétiques ont été dérivés de la courbe du temps de concentration sanguine en utilisant l'analyse non compartimentale de PK Solver 2.0<sup>319</sup>.

#### Test suppressif de 4 jours de Peter (efficacité *in vivo*)

L'activité antipaludique *in vivo* de la molécule10 a été évaluée à l'aide de la souche *P. c. chabaudi* 864VD<sup>320</sup> chez des souris femelles BALB/c de 9 semaines (Janvier, France), en utilisant la bestatine comme référence et la chloroquine comme contrôle positif. Les animaux ont été acclimatés pendant

<sup>319</sup> Y. Zhang *et al.*, *Comput Methods Programs Biomed* **2010**, 99, 306-314

<sup>320</sup> G. Karadjian *et al.*, *Parasite* **2014**, 21, 16-27

trois semaines à l'environnement expérimental. Toutes les molécules ont été évaluées pour leur effet en utilisant un test suppression de Peter de 4 jours<sup>321</sup>.

Les molécules testées ont été mises en suspension quotidiennement dans une solution de (DMSO/ 5% de solution de glucose: 10/90). Cinq groupes de six souris ont été utilisés. Groupe 1: témoin; Groupe 2: la molécule **10** à la dose de 12 mg/kg dans les souris; Groupe 3: la molécule **10** à la dose de 24 mg/kg dans les souris; Groupe 4: bestatin à la dose de 100 mg/kg; Groupe 5: chloroquine à la dose de 5 mg/kg dans le PBS. Les souris (poids moyen 20 g) des six groupes, hébergés sous la lumière du jour, ont été infectées au jour 0 à 9h30, par voie intrapéritonéale, avec 10<sup>6</sup> globules rouges infectés par *P.c.chabaudi* 864VD souche. Les cinq groupes de six souris ont été injectés par la même dose quotidiennement du jour 0 au jour 3 à 11h30. Les cinétiques d'infection ont ensuite été suivies quotidiennement pendant 25 jours, par une inspection microscopique des frottis de sang de sang colorés de Giemsa effectués tous les jours à ~ 10 heures (stades cycliques). Les souris ont été logées dans l'établissement de soins des animaux du laboratoire UMR7245 CNRS-MNHN dans des conditions spécifiques non pathogène.

---

<sup>321</sup> Peters W: *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. 1987.

# Résumé de la thèse

## Chapitre 8 : Résumé de la thèse

### Introduction

Les aminopeptidases de la famille M1 sont des protéases qui catalysent la réaction d'hydrolyse d'une liaison peptidique en position N-terminale d'un peptide. Elles sont largement distribuées dans le règne animal et végétal et sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (angiogenèse, inflammation et système immunitaire), mais également dans des désordres métaboliques, tels que la progression tumorale, des maladies auto-immunes, ainsi que dans des infections virales, bactériennes et parasitaires. Pour ces raisons, ces aminopeptidases sont considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles (Tableau 40).<sup>322,323</sup>

Aminopeptidase M1	Rôles Biologiques	maladies associées
<i>hAPN</i>	rôles importants dans le système de l'angiotensine, le système immunitaire, système neurologique, le système de l'angiogenèse et la mobilité cellulaire	sensation de douleur, maladies inflammatoires, cancer et infections des voies respiratoires supérieures
<i>hIRAP</i>	rôles importants dans le système de l'angiotensine, le système de la vasopressine, le système de l'ocytocine et maintenir l'homéostasie pendant la grossesse	AVC ischémique Désordres cognitifs
<i>hERAP1/hERAP2</i>	Présentation des antigènes au système CMH de classe I	Maladies auto-immunes
<i>PfA-M1</i>	Catabolisme de l'hémoglobine hôte dans la vacuole digestive de <i>Plasmodium</i>	Paludisme

Tableau 40 : rôle biologique et maladies associées à des membres des aminopeptidases de la famille M1

En général, les aminopeptidases, sont des métalloenzymes possédant un ou deux ions métalliques essentiels à la catalyse ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Ni^{2+}$ ). Les aminopeptidases de la famille M1, ne possèdent qu'un seul ion  $Zn^{2+}$  dans leur site actif. Elles ont une homologie de séquence primaire entre 10 et 30% et une homologie structurale de l'ordre de 90%<sup>324,325</sup> avec un site catalytique très conservé. Ce site est composé<sup>326</sup> : 1) d'un motif consensus de type His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa18-Glu (HEXXHX<sub>18</sub>E) liant l'ion  $Zn^{2+}$ . Il est à noter que l'ion zincique est tétracoordiné avec une molécule d'eau catalytique ; 2) d'un domaine GAMEN qui reconnaît l'amine primaire libre en position N-terminale d'un peptide ; 3) d'une tyrosine, essentielle à l'activation du peptide et à la stabilisation de

<sup>322</sup> andbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edn, vol. 2, N. D. Rawlings, G. Salvesen, Elsevier Academic Press 2004

<sup>323</sup> Taylor, A. *FASEB Journal*, **1993**, 7, 290-298

<sup>324</sup> B. W. Matthews *et al.*, *J Biol Chem* **1974**, 249, 8030-8044.

<sup>325</sup> M. A. Holmes *et al.*, *J Mol Biol* **1982**, 160, 623-639.

<sup>326</sup> W. N. Lipscomb; N. Sträter; *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375-2433

l'intermédiaire tétraédrique ainsi que d'un acide glutamique catalytique, activant la molécule d'eau (Figure 155).

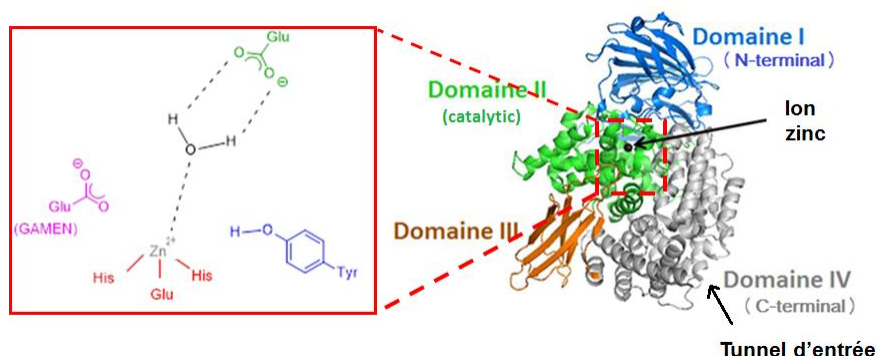


Figure 155: Structure tridimensionnelle et zoom sur le site actif des aminopeptidases de la famille M1

Ces aminopeptidases M1, en fonction de leur localisation cellulaire et de leur spécificité de substrat vont avoir des rôles physiologiques différents. Cette spécificité de substrat est apportée par la reconnaissance de la chaîne latérale de l'acide aminé en position N-terminale avec le sous-site S1 du site actif de l'enzyme. Ce sous-site est en général décrit comme un cylindre lipophile<sup>1</sup>. (Figure 156).

Aminopeptidase M1	Spécificité de substrat
hAPN	Ala, Phe, Tyr, Leu, ...
hIRAP	Cys, Leu, ...
hERAP1	Leu, Met, ...
hERAP2	Arg, Lys, ...
PfA-M1	Lys, Arg, Leu, Ala, ...

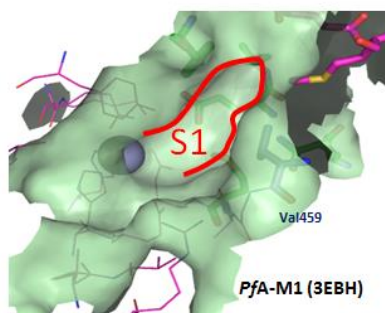


Figure 156 : Spécificité de substrat de différentes aminopeptidases de la famille M1 et représentation en surface du sous-site S1 d'une des aminopeptidases M1, PfA-M1 (code PDB : 3EBH)

Une des difficultés majeures lors de la conception d'inhibiteurs est d'obtenir des composés sélectifs de l'enzyme d'intérêt.

Le laboratoire a découvert un châssis moléculaire modulable, de type 3-amino-2-benzosubérone **7**, inhibant sélectivement l'activité catalytique de l'APN (membre de la famille M1, impliqué dans le processus d'angiogenèse lors de la croissance tumorale).<sup>327,328,329</sup> Une première séquence d'optimisation a conduit au dérivé 1-bromo-4-phényle **12**, inhibiteur le plus puissant et sélectif envers l'APN de mammifère connu à ce jour (hAPN  $K_i = 0,06$  nM et sélectif vis-à-vis d'un panel d'une trentaine de protéases de différentes classes)<sup>330</sup> (Figure 157).

<sup>327</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7241–7257

<sup>328</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1434–1449 1435

<sup>329</sup> C. Maieranu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5716–5733

<sup>330</sup> S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4942–4953



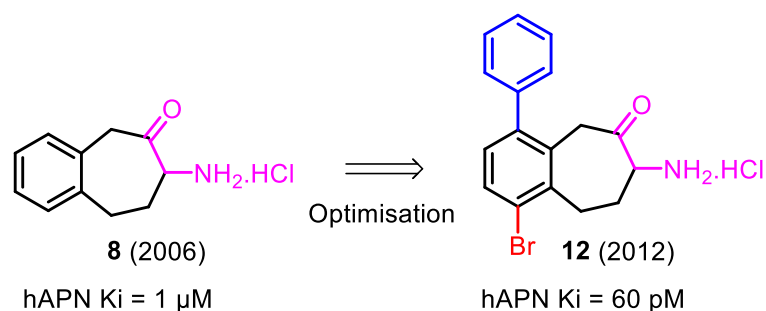


Figure 157 : Optimisation de la série des aminobenzosubérones vers l'inhibiteur le plus puissant et sélectif connu à ce jour.

Ce composé **12** souffre de problèmes physico-chimiques (solubilité) et pharmacocinétiques (exposition et temps de demi-vie) majeurs limitant un développement futur.<sup>331</sup>(Tableau 41).

Composé	12
c logP	3,17
Aire de surface polaire	43,1 Å <sup>2</sup>
Solubilité thermodynamique en milieu aqueux @ pH 7.4	2,9 µg/ml
Perméabilité passive Pe PAMPA	3,03 e <sup>-6</sup> cm/s
Taux de liaison aux protéines plasmatique	99%
Stabilité microsomale CL <sub>int</sub>	19 µl/min/mg
Dose Maximale Tolérée (souris)	100 mg/kg
Temps de demi-vie	35 min
Paramètres PK ip (3mg/kg)	
C <sub>max</sub> (nM)	115
T <sub>max</sub> (min)	30
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	11427
T <sub>1/2</sub> (min)	35

Tableau 41 : Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques du dérivé 1-bromo-4-phényl **12**

Pour poursuivre nos investigations, nous avons optimisé les propriétés pharmacologiques de ces composés et continué nos études des relations structure-activité (SAR) et structure-propriétés (SPR). Nous avons également étendu nos travaux à d'autres aminopeptidases de la famille M1 comme ERAP1, ERAP2, IRAP ainsi que PfA-M1.

Dans ce contexte, **deux objectifs principaux**, illustrés Figure 157, ont été fixés dans le cadre de cette thèse :

<sup>331</sup> G. Revelant *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3192–3207

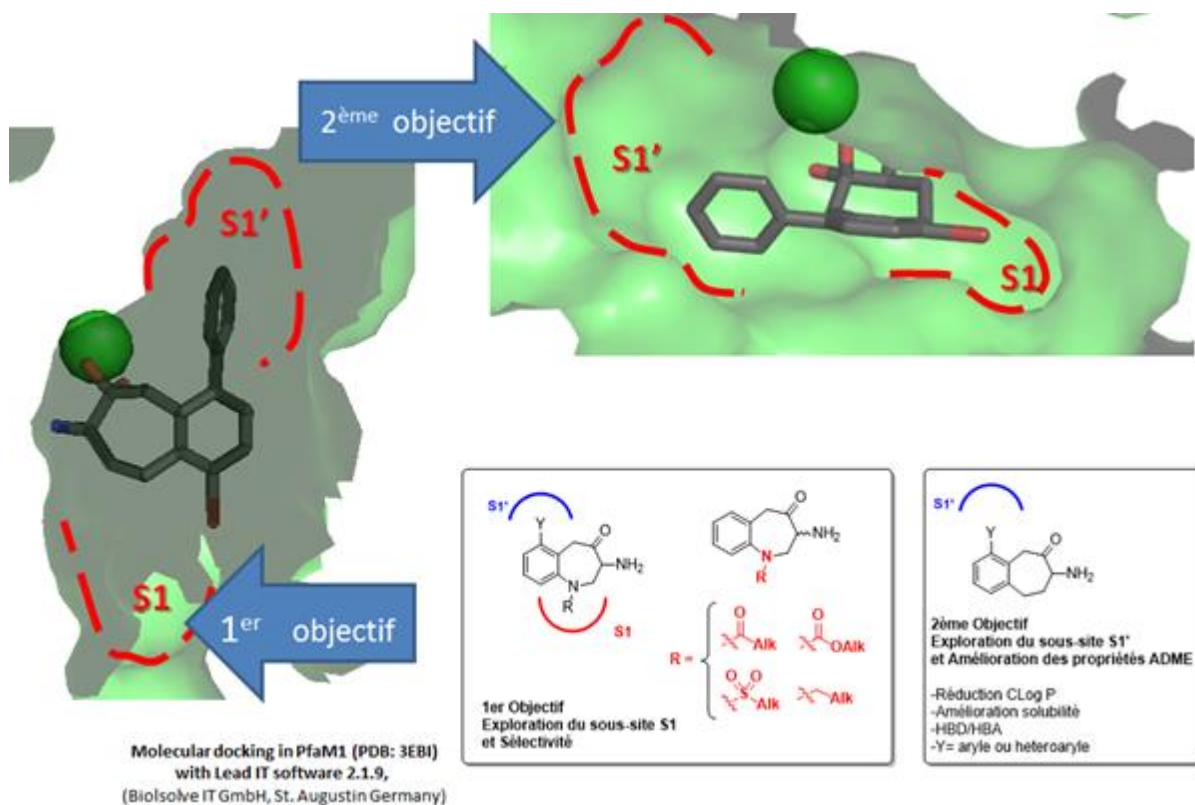


Figure 158 : Objectif des travaux de ma thèse. HBA : accepteur de liaison-hydrogène et HBD : donneur de liaison-hydrogène

**Exploration du sous-site S1 et Sélectivité:** des études de modélisation moléculaire nous ont suggéré que nos molécules n'interagissent pas ou très peu avec le sous-site S1 du site actif de ces aminopeptidases M1. Or ces enzymes ont une spécificité de substrat dictée par des interactions avec ce sous-site. Par conséquent développer des interactions entre cette poche et notre châssis moléculaire peut être la clé pour atteindre une certaine sélectivité vis-à-vis de chacune de ces différentes enzymes de la famille M1. Afin d'occuper cette poche, nous avons envisagé d'introduire un atome d'azote substitué par divers groupes R en position-9 de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one. L'effet de ces divers substituants R sur l'activité inhibitrice vis-à-vis des différents enzymes de la famille M1 permettrait de mettre au point une plateforme moléculaire ultra-modulable en fonction de l'enzyme ciblée.

**Exploration du sous-site S1' et Amélioration des propriétés ADME:** les prédictions *in silico* suggèrent que le substituant en position-4 de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one interagit avec le sous-site S1' du site actif de ces aminopeptidases M1. Or la voie de synthèse de nos molécules permet de moduler très facilement la position-4 du cœur aromatique. Par conséquent nous avons opté pour réaliser des pharmacomodulations sur cette position-4 afin de sonder cette poche S1' et d'améliorer les propriétés physicochimiques (solubilité, lipophilie) et pharmacocinétiques (stabilité métabolique, temps de demi-vie, exposition) de nos molécules. Le choix des substituants, divers groupes aryles ou hétéroaryles, a été basé sur un cahier des charges bien précis obéissant à un souci de réduction de la lipophilie, d'introduction d'hétéroatomes pouvant interagir avec les résidus amino acides de ce sous-site (HBD ou HBA) et d'introduction d'un groupe ionisant afin d'améliorer la solubilité.

Finalement, un travail exploratoire de mise au point de voie de synthèse permettant la préparation de molécules substituées à la fois en position-9 et en position-4 afin d'optimiser l'occupation des sous sites S1 et S1' a été réalisé et est toujours en cours d'investigation.

## Résultats et discussion

### Exploration du sous-site S1 et Sélectivité

Les travaux dans cette partie s'intéressent à la synthèse d'analogues de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position-9 en présence ou en absence d'une substitution en position-4. L'obtention de ces analogues a été envisagée selon trois voies de synthèses différentes (Figure 159) :

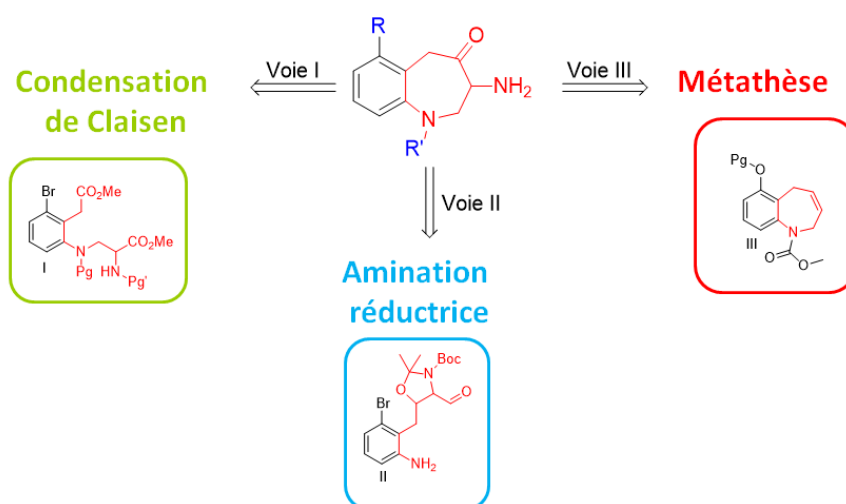


Figure 159 : Voies de synthèse d'analogues de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position-9 en présence ou en absence d'une substitution en position-4

Dans une première approche, la formation du cycle à sept chaînons a fait intervenir une réaction clé de condensation de Claisen de l'intermédiaire linéaire I. La préparation de cet intermédiaire en série azotée a été très fastidieuse et délicate. Divers essais faisant intervenir des réactions de Mitsunobu, des additions de Michael ou des substitutions nucléophiles aromatiques se sont avérés infructueux. En revanche, un analogue de l'intermédiaire I en série oxygénée a pu être préparé, mais sa cyclisation par condensation de Claisen a essentiellement donné lieu à des dégradations du substrat de départ.

Une seconde stratégie a alors été imaginée, et a comme étape clé une amination réductrice de l'aniline II. Là encore, la préparation de l'intermédiaire linéaire II a été problématique. Des réactions d'addition de divers anions benzyliques sur des aldéhydes adéquats ou des couplages pallado-catalysés de Sonogashira entre le 2,3-dibromonitrobenzène et l'alcyne correspondant n'ont conduit qu'à des traces de produits souhaités. Seule une réaction de substitution nucléophile aromatique entre le 2-fluoro-3-bromo-nitrobenzène et l'alcyne correspondant a donné des résultats encourageants et est en cours d'investigation.

Finalement, une dernière méthode consiste à former le cycle à sept chaînons par une réaction de métathèse cyclisante, puis à introduire les fonctions amine et alcool. Dans ce cas, l'intermédiaire benzocycloheptène III a été préparé avec succès. Par la suite, la méthode basée sur une époxydation,

puis une ouverture de l'époxyde résultant par la benzylamine est la plus prometteuse et est en cours d'exploration pour aboutir aux analogues de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position-9 en présence ou en absence d'une substitution en position-4.

## Exploration du sous-site S1' et Amélioration des propriétés ADME

La voie de synthèse des analogues de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position-4 a été développée et ré-optimisée afin de produire de larges quantités de l'intermédiaire clé bromé **76**, nécessaire à une diversification structurale tardive. La synthèse de cet intermédiaire est réalisée en dix étapes à partir du 3-bromo-*o*-xylène commercialement disponible.

Puis les groupes aryles ou hétéroaryles judicieusement choisis et obéissant à notre cahier des charges sont introduits en position-4 par des réactions de couplage pallado-catalysées (réaction de Suzuki ou Stille) selon la Figure 160.

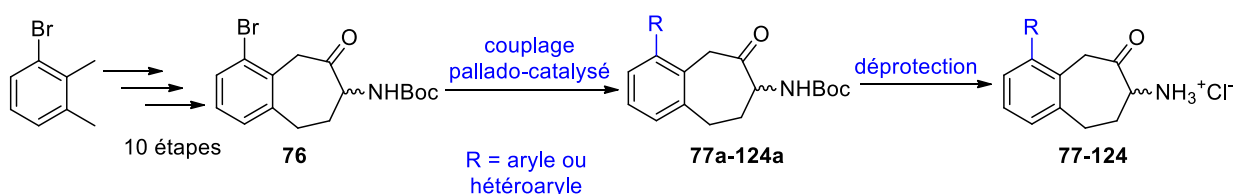


Figure 160 : Préparation d'analogues substitués en position-4 de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one

Cette diversification tardive a permis de préparer une cinquantaine de nouveaux analogues en série racémique dont l'activité inhibitrice a été évaluée *in vitro* sur cinq aminopeptidases M1 d'intérêt thérapeutique: APN de mammifère, *h*ERAP1/2, *h*IRAP et *Pf*A-M1. Des résultats forts encourageants ont été obtenus pour l'inhibition de l'APN, d'IRAP et également de *Pf*A-M1. Des investigations ultérieures ciblant *Pf*A-M1 ont concerné l'inhibition *in cellulo* de la croissance de *Plasmodium falciparum* (souche FcB1 et 3D7), agent pathogène responsable du paludisme et ont conduit à des activités inhibitrices de l'ordre du micromolaire. Par ailleurs, un certain nombre de structure du complexe (enzyme-inhibiteur) avec *Pf*A-M1 et *E. Coli* PepN<sup>332</sup> et six de nos ligands ont été obtenu. La compréhension de leur mode d'interactions avec le site actif de la protéine a permis de rationaliser l'introduction de nouveaux substituants pouvant présenter de meilleures activités. De plus, les propriétés physico-chimiques et ADME *in vitro* ont été déterminés pour les composés les plus prometteurs (Tableau 42, Figure 161).

<sup>332</sup> C. Tarnus *et al.*, *Proteins*, **2017**, *85*, 1413-1421

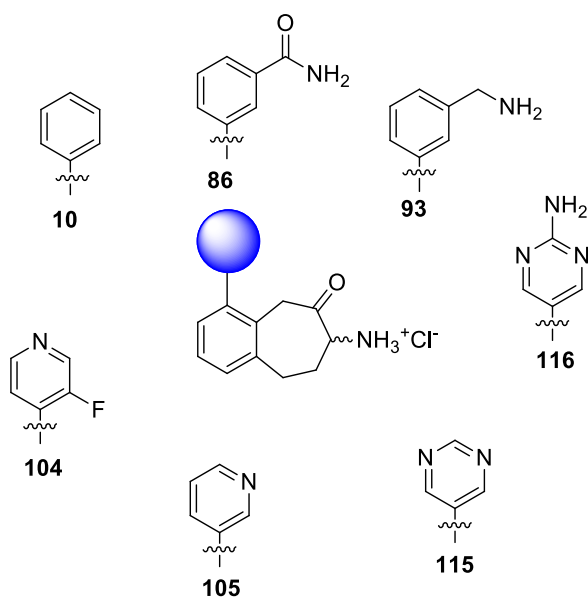


Figure 161 : les composés les plus prometteurs pour l'évaluation des propriétés physico-chimiques et ADME

composé	10	86	93	104	105	115	116
$pAPN K_i$ ( $\mu M$ )	0,007	0,01	0,02	0,006	0.018 <sup>a</sup>	0,06	0,045
$r PfA-M1 K_i$ ( $\mu M$ )	0,05	0,04	0,09	0,03	0,45 <sup>a</sup>	0,18	0,59
FcB1 $EC_{50}$ ( $\mu M$ )	6,5±2,4 (n = 7)	13,91±3,3 (n = 8)	1,1±0,3 (n = 4)	8,0±3,9 (n = 7)	6,0±0,1 (n = 3)	6,7±1,5 (n = 6)	7.0±1.1 (n = 8)
3D7 $EC_{50}$ ( $\mu M$ )	11,2±3,4 (n = 5)	18,3±6,6 (n = 8)	18.31±6,6 (n = 8)	29,0±7,8 (n = 5)	10,4±1,1 (n = 3)	13,1±3,4 (n = 8)	7.6±3.4 (n = 8)
$r hERAP1 IC_{50}$ ( $\mu M$ )	63	>200	>200	8,1	7.6	-	4,7
$r hERAP2 IC_{50}$ ( $\mu M$ )	18	>200	113	4,4	4,0	-	5,9
$r hIRAP IC_{50}$ ( $\mu M$ )	2,4	1,3	5,0	0,2	4,2	-	0,93
cLogP	2,41	1,2	1,57	1,43	1,34	0.63	0,43
Perméabilité passive PAMPA, log Pe	-5,11	-6,22	-6.2	-5,26	-	-	-6,29
Liaison aux protéines plasmatiques humaines, F <sub>Libre</sub>	17%	41%	78%	61%	-	-	72%
Stabilité microsomale CL <sub>int</sub> ( $\mu L/min/mg$ )	18	< 1	1,2	16	-	-	19

Tableau 42 : Evaluation biologique et détermination des propriétés ADME *in vitro* de certains analogues de la 7-amino-benzocycloheptan-6-one substitués en position-4. a)  $IC_{50}$  ( $\mu M$ )

En fonction de nos critères de sélection, les molécules **10** et **86** ont été sélectionnées pour des études *in vivo* de pharmacocinétiques dont les résultats majeurs sont présentés tableau 4.

Hormis une biodisponibilité encourageante autour de 40% et une amélioration de l'exposition ainsi que du temps de demi-vie, les paramètres pharmacocinétiques de ces deux molécules restent modérés.

Composé	10	86
<b>PK <i>iv</i> (3 mg/kg)</b>		
Clairance Cl <sub>b</sub> <sup>a</sup> (mL/min/kg)	43	22
Volume de distribution Vd <sub>ss</sub> <sup>b</sup> (L/kg)	7,4	2,7
Temps de demi-vie T <sub>1/2</sub> (min)	132	95
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	64146	129258
<b>Paramètres PK <i>po</i> (3mg/kg)</b>		
C <sub>max</sub> (μmol/L)	0,8	1,1
T <sub>max</sub> (h)	0,25	0,25
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	26275	49369
Biodisponibilité F(%)	41	38
<b>Paramètres PK <i>ip</i> (3mg/kg)</b>		
C <sub>max</sub> (μmol/L)	1,3	-
T <sub>max</sub> (h)	0,25	-
AUC <sub>0-8</sub> (ng min/mL)	31521	-
Biodisponibilité F(%)	49	-

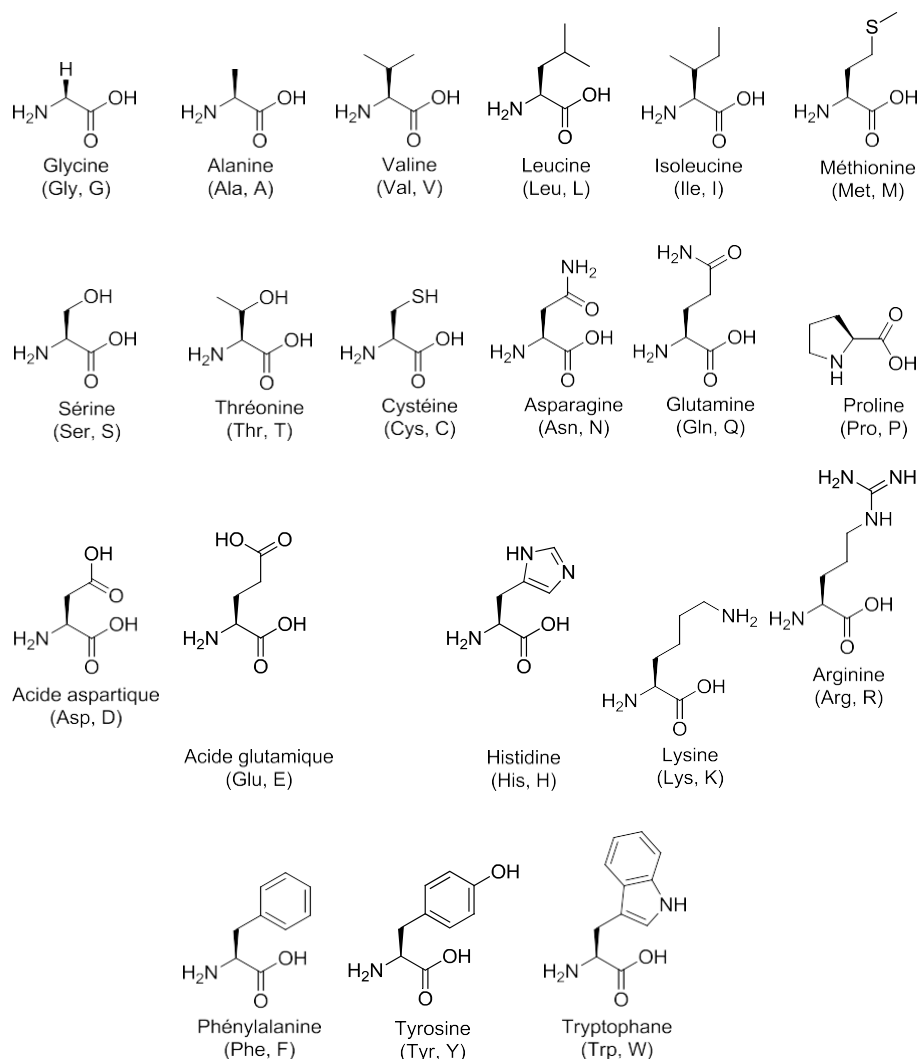
Tableau 43 : Paramètres pharmacocinétiques obtenus après administration de 3 mg/kg des analogues 110 et 86. a) clairance plasmatique, b) Vd<sub>ss</sub> volume de distribution à l'état stationnaire

**Application au paludisme, test préclinique:** le composé **10** administré par voie intrapéritonéale à 12 mg/kg/jour a démontré une réduction de la parasitémie de 40% dans un modèle murin de paludisme en respectant le test de Peters (sur 4 jours). D'autres études *in vivo* sont en cours avec d'autres composés.

# Annexes

## Annexes

### Annexe 1 : Liste des acides aminés

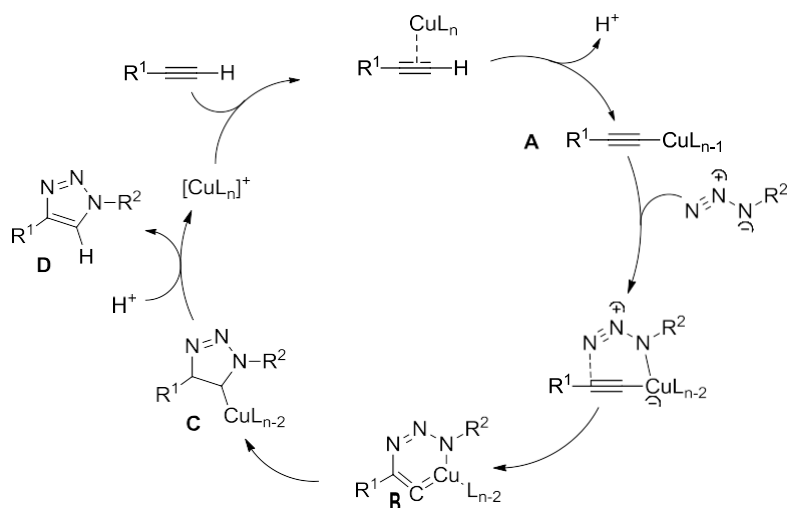


### Annexe 2 : Mécanisme de la réaction de cycloaddition alcyne/azoture catalysée au cuivre

Sharpless *et al.* proposent le mécanisme illustré ci-dessous pour la réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre.<sup>287</sup> Cette réaction a lieu en présence d'une quantité catalytique de sels de cuivre (I) ou cuivre (II) et d'une quantité catalytique d'ascorbate de sodium. Ce dernier permet de réduire le cuivre (II) en cuivre (I) et empêche l'homocouplage oxydant des alcynes (Gläser).

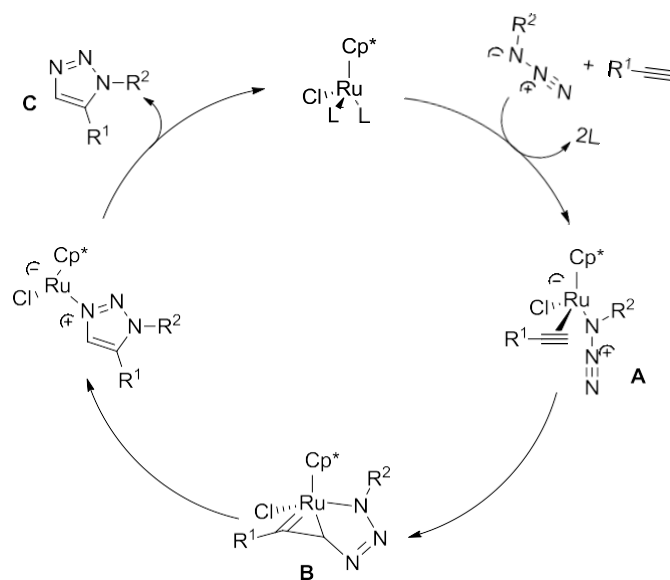
Le cycle catalytique débute par la formation d'un complexe cuivre-acétylure **A**, puis l'azoture déplace un ligand et se lie au cuivre. La réaction ne passe ensuite pas par un mécanisme de cycloaddition [2+3] concerté, mais par un métallacycle à six chaînons cuivre (III) **B** inhabituel. La contraction de ce cycle en dérivé triazolyl-cuivre **C** est suivie d'une protonolyse qui libère le produit triazole **D** et ferme le cycle catalytique.



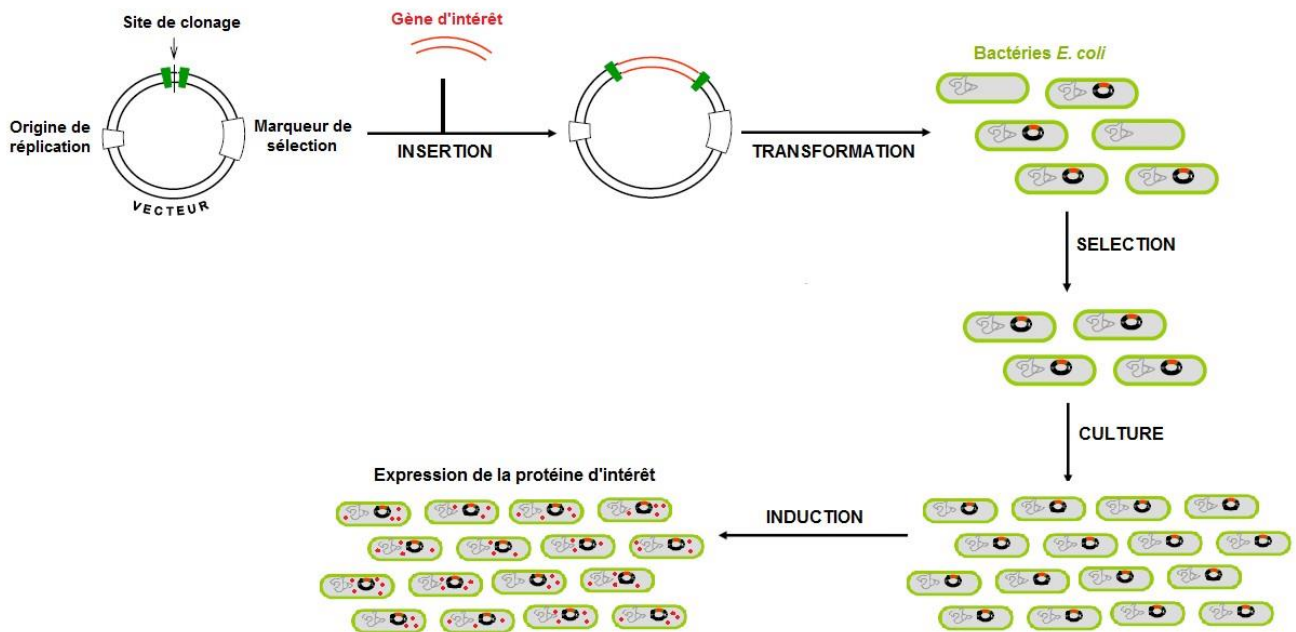


### Annexe 3 : Mécanisme de la cycloaddition alcyne/azoture catalysée au ruthénium

**Boren *et al.*** proposent le mécanisme illustré ci-dessous pour la réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au ruthénium.<sup>307</sup> Le déplacement de ligands par l'alkyne et l'azoture produit un complexe activé **A**, qui est converti en ruthénacycle **B** par couplage oxydant de l'alkyne et de l'azoture. Cette étape contrôle la régiosélectivité de la réaction. La nouvelle liaison C-N est créée entre le carbone le plus électronégatif et le moins encombré de l'alkyne et l'azote terminal de l'azoture. L'intermédiaire métallacycle **B** subit une élimination réductrice libérant le produit triazole **C** et régénérant le catalyseur ou le complexe activé **A**.

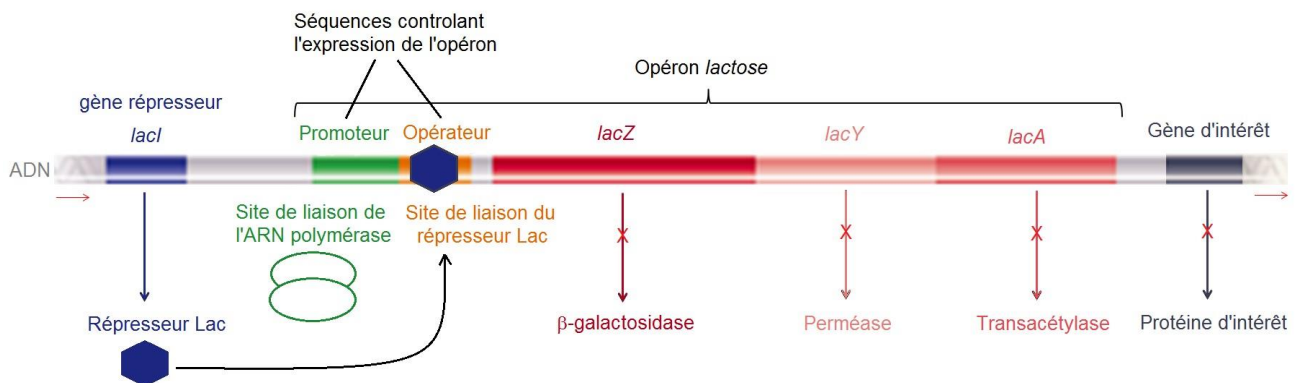


#### Annexe 4 : production d'une enzyme recombinante par un organisme hôte

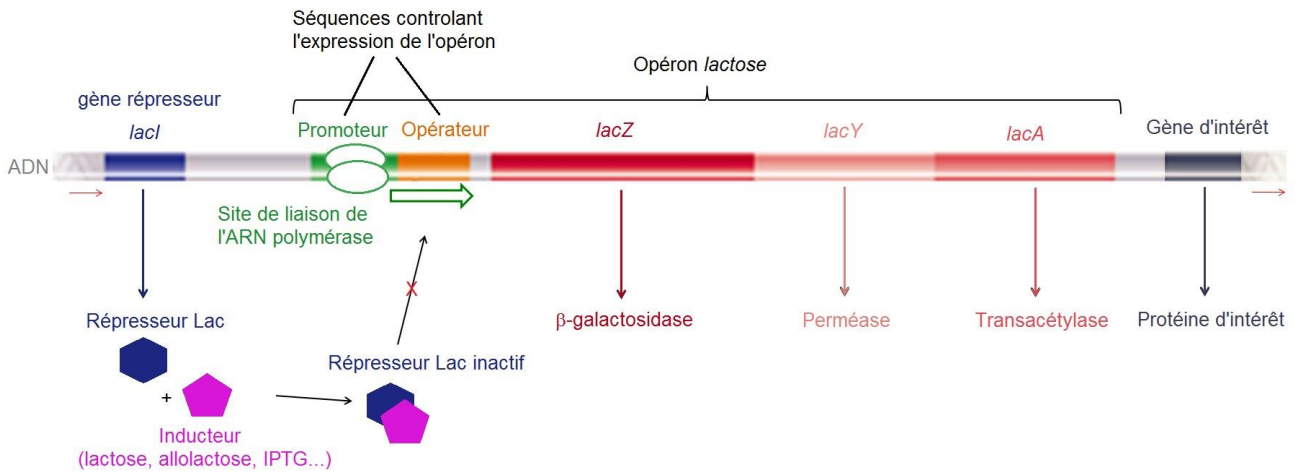


#### Annexe 5 : induction de l'expression du gène d'intérêt via l'opéron lactose

En absence d'inducteur, le répresseur Lac se lie à l'opérateur de l'opéron lactose et empêche la transcription de l'opéron lactose et du gène d'intérêt situé après.



Un inducteur (lactose, allolactose, IPTG...) se fixe sur le répresseur Lac, ce qui l'empêche de se lier à l'opérateur. Ainsi l'ARN polymérase peut se lier au promoteur et assurer la transcription des gènes de l'opéron lactose et du gène d'intérêt situé après.



Annexe 6 : Publication