



Accès aux hétérocycles azotés et oxygénés par des réactions multicomposants et par catalyse organométallique : étude des propriétés anti-angiogéniques par inhibition de la thymidine phosphorylase

Alexis Bontemps

► **To cite this version:**

Alexis Bontemps. Accès aux hétérocycles azotés et oxygénés par des réactions multicomposants et par catalyse organométallique : étude des propriétés anti-angiogéniques par inhibition de la thymidine phosphorylase. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB249 . tel-04474927

HAL Id: tel-04474927

<https://theses.hal.science/tel-04474927>

Submitted on 23 Feb 2024

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

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



UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Faculté de Pharmacie de Paris

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (MTCI).

UMR-CNRS 8638 : Chimie Organique, Médicinale et Extractive
et Toxicologie Expérimentale (COMETE).

*Equipe Cancer et Angiogenèse :
Hétérocycles et Peptides pour une Approche Ciblée.*

**Accès aux hétérocycles azotés et oxygénés par
des réactions multicomposants et par
catalyse organométallique.**

**Etude des propriétés anti-angiogéniques
par inhibition de la thymidine phosphorylase.**

Par **Alexis BONTEMPS**

Thèse de doctorat
Spécialité : Chimie Organique et Médicinale

Dirigée par les Prs. **Philippe BELMONT** et **Sylviane GIORGI-RENAULT**

Présentée et soutenue le 23 novembre 2016
Devant un jury composé de :

Patrick DALLEMAGNE, Professeur, Université de Caen
Catherine GUILLOU, Directeur de Recherche, CNRS
Jean-François PEYRAT, Professeur, Université Paris Sud

Président
Rapporteur
Rapporteur

Philippe BELMONT, Professeur, Université Paris Descartes
Sylviane GIORGI-RENAULT, Professeur, Université Paris Descartes

Directeur de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'ensemble des membres du jury, qui me font l'honneur de juger ce travail :

Monsieur le Professeur **Philippe Belmont**, directeur de thèse
Professeur à l'Université Paris Descartes
UMR 8638 (COMETE) - Equipe « Cancer et Angiogenèse »

Madame le Professeur **Sylviane Giorgi-Renault**, directeur de thèse
Professeur à l'Université Paris Descartes
UMR 8638 (COMETE) - Equipe « Cancer et Angiogenèse »

Monsieur le Professeur **Patrick Dallemagne**, président
Professeur à l'Université de Caen
UFR des Sciences Pharmaceutiques
Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN)

Madame le Directeur de Recherche **Catherine Guillou**, rapporteur
Directeur de Recherche CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN)
Equipe « Synthèse de produits naturels d'intérêt biologique et chimie médicinale »

Monsieur le Professeur **Jean-François Peyrat**, rapporteur
Professeur à l'Université Paris-Sud
Equipe « Conception et Synthèse de Molécules à Activité Thérapeutique (CoSMIT) »

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier mes deux directeurs de thèse, grâce à qui ces trois années de thèse ont été très productives et m'ont apporté beaucoup de choses, tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel.

Merci à toi Philippe, pour tes précieux conseils et ton encadrement efficace. Tu en as vraiment fait beaucoup pour moi, et grâce à toi j'ai beaucoup appris, que ce soit au niveau de la chimie ou du milieu de la recherche académique. Tu m'as encouragé à participer à un maximum de congrès, bien que la communication ne soit pas du tout mon fort. Tu t'es montré particulièrement patient malgré mon caractère très obstiné et je veux bien croire que cela n'a pas dû être facile tous les jours ! Plus important encore, tu m'as fait comprendre qu'il est important de s'ouvrir aux autres dans la vie professionnelle, chose que j'ai eue assez de mal à faire pendant ma thèse. Mais j'essaierai à l'avenir d'appliquer au mieux ce précepte.

Je tiens également à remercier vivement le Professeur Sylviane Giorgi-Renault, pour son accueil et la confiance qu'elle m'a accordée en me confiant ce projet de recherche. Un grand merci pour son encadrement tout au long de ma thèse et pour son importante contribution à la relecture de ce manuscrit.

Mes remerciements vont aussi à toi Stéphanie, avec qui j'ai le plus travaillé au jour le jour. Tes conseils et ton soutien m'ont grandement aidé à avancer sur ce projet, au niveau de la chimie bien sûr, mais aussi et surtout lors des tests bio aux Saints-Pères. Des tests sur lesquels nous nous sommes bien arrachés les cheveux ! Je pense que j'aurais eu du mal à en voir le bout sans toi. Mais ton plus grand mérite a été de t'attaquer à la relecture de ce manuscrit. S'il a beaucoup gagné en clarté et en concision, c'est bien grâce à toi.

Je n'oublie pas Philippe (le grand), qui m'a souvent été de bon conseil pour la synthèse, et qui a un peu été mon mentor au cours de ma mission d'enseignement. Ce fut un plaisir d'encadrer les TPs de chimie thérapeutique à tes côtés.

Une petite pensée pour Aurélien, qui n'est resté qu'un an au labo mais avec qui j'ai passé de bons moments pendant ma première année de thèse.

Etienne, tu m'as vraiment mis la pression lors de ton arrivée au labo, mais je pense que j'en avais un peu besoin et cela m'a été bénéfique au final. Quoi qu'il en soit, j'ai vraiment apprécié échanger avec toi sur la chimie (et pas que), et ton aide m'a été précieuse à de multiples reprises au cours de ces deux dernières années. Je t'en remercie.

Je terminerai en te remerciant, Doriane, car ton énergie et ta bonne humeur m'ont redonné le sourire plus d'une fois, notamment lors des moments de doute qui ont jalonné ma dernière année de thèse. Rédiger à tes côtés a été un sacré challenge (#ellechante sifortdanslelaboqu'onl'entenddanslebureaumêmeaveclaportefermée), mais cela n'est rien en comparaison des séances de rigolade et de papotinage que nous avons partagées. Je te souhaite tout la réussite possible pour la suite de ta thèse !

Ce travail est également l'œuvre des différentes stagiaires que j'ai encadrées durant ma thèse. Merci à Mylène, Amanda et Myrtichou pour leur contribution (plus ou moins prolifique), ainsi qu'aux stagiaires que je n'ai pas supervisés mais qui ont contribué à créer une bonne ambiance de travail dans le labo.

Remerciements

Un grand merci aux autres membres de l'équipe Hétérocycles et Peptides, pour leurs propositions et contributions ponctuelles à ce projet, mais également pour l'ambiance sympathique qui règne au sein de cette équipe.

Merci également au Professeur Marie-Agnès Sari, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ses conseils avisés concernant l'évaluation biologique des composés, ainsi qu'à Maryse Jaouen pour la gentillesse et l'efficacité dont elle a fait preuve lors de mes passages à la Faculté des Saints-Pères.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Philippe Chavatte et le Docteur Amaury Farce pour leur contribution importante à ce projet, que ce soit au travers des études de modélisation réalisées et de la mise en forme des données ou des discussions que nous avons eues.

Je souhaiterais adresser des remerciements particuliers au Professeur Bernold Hasenknopf qui, en m'acceptant au sein de son Master à l'UPMC, m'a donné une chance de concrétiser mon désir de reconversion vers la chimie organique. J'en profite également pour remercier le Docteur Marion Barbazanges, qui m'a pris en charge lors de mon stage de M2. Merci à toi Marion. Si ces 6 mois de stage ont été l'une des plus belles expériences professionnelles de ma vie, c'est en grande partie grâce à toi.

Mes pensées vont bien sûr à l'ensemble de ma famille, qui a toujours su être présente pour moi, même dans les moments les plus difficiles, ainsi qu'à l'ensemble de mes amis, pour les moments de joie vécus ensemble qui m'ont permis de tenir bon jusqu'au bout !

Je conclurai par une pensée pleine de tendresse pour toi Maxime, que je ne remercierai jamais assez pour ton soutien sans faille et le bonheur que tu m'apportes chaque jour.

Sommaire

Abréviations & Acronymes	9

Avant-propos	13

Chapitre 1

I. Angiogenèse tumorale et thérapies anti-angiogéniques	17

I.A. Le processus angiogénique	17

I.B. Thérapies anti-angiogéniques	20

I.B.1. Anti-angiogéniques à action directe	21

I.B.2. Anti-angiogéniques à action indirecte.....	22

I.B.3. Anti-angiogéniques à action mixte.....	24

I.B.3.a. Les anticorps monoclonaux et les récepteurs solubles	24

I.B.3.b. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs)	25

I.B.4. Résistance aux anti-angiogéniques.....	25

I.B.5. Conclusion et perspectives	27

II. La thymidine phosphorylase	28

II.A. Activité physiologique de la TPase.....	28

II.A.1. Localisation	28

II.A.2. Activité physiologique.....	29

II.A.3. TPase et MNGIE.....	31

II.B. TPase et cancer	34

II.B.1. Surexpression dans les cancers et contrôle transcriptionnel	34

II.B.2. Marqueur de la progression tumorale et du pronostic vital	35

II.B.3. Activité pro-angiogénique	36

II.B.3.a. Les produits terminaux de glycation	40

II.B.3.b. Les espèces réactives de l'oxygène	41

II.B.3.c. Autres mécanismes	43

II.B.4. Rôle dans la formation de métastases.....	45

II.B.5. Activité anti-apoptotique.....	46

II.B.5.a. Rappel sur le mécanisme d'apoptose.....	46

II.B.5.b. Activité anti-apoptotique liée à l'activité enzymatique de la TPase	47

II.B.5.c. Activité anti-apoptotique indépendante de l'activité enzymatique.....	48

II.B.6. TPase et chimiothérapies à base de fluoropyrimidines	50

II.B.7. Conclusion.....	52

II.C. Structure moléculaire de la TPase	54

II.C.1. Structure générale	54

II.C.2. Le site actif.....	55

II.C.3. Interaction enzyme-ligand	57

II.C.3.a. EcTPase	57

II.C.3.b. HuTPase-TPI.....	59

II.C.3.c. HuTPase-thymine et 5-iodouracile	60
II.C.4. Mécanisme de la réaction	61
III. Inhibiteurs de la TPase	65
III.A. Inhibiteurs mono-substrat	65
III.A.1. Inhibiteurs de type pyrimidinedione	65
III.A.1.a. Inhibiteurs de première génération	65
III.A.1.b. La 7-déazaxanthine et ses analogues	66
III.A.1.c. Substitution de la position 6	67
III.A.1.d. Substitution de la position 5	72
III.A.2. Analogues de la thymidine	73
III.A.3. Autres structures	74
III.A.4. Prodrogues	76
III.B. Inhibiteurs bi-substrats	77
III.B.1. Les nucléosides phosphonates acycliques	78
III.B.2. Les nucléosides phosphonates cycliques	81
III.C. Inhibiteurs autres que compétitifs	84
III.C.1. Mécanisme d'inhibition autre que compétitif	84
III.C.2. Mécanisme d'inhibition inconnu	89
III.D. TAS-102 / Lonsurf®	90
IV. Projet de recherche	93

Chapitre 2

I. Synthèse des pyrimido[4,5-<i>b</i>]quinoléines-2,4(1<i>H</i>,3<i>H</i>)-diones (série A)	101
I.A. Contexte	101
I.B. Travaux antérieurs	103
I.C. Synthèses réalisées	105
I.C.1. Composés déjà préparés au laboratoire	105
I.C.2. Nouveaux composés synthétisés	106
I.C.3. Essais avec des <i>o</i> -phénylènediamines	108
II. Synthèse des 2<i>H</i>-pyrroloquinoléine-1,3-diones / pyrimidinediones de la série B	111
III. Synthèse des 2<i>H</i>-pyrroloquinoléine-1,3-diones / pyrimidinediones de la série C	113
III.A. Contexte	113
III.B. Accès aux dérivés halogénés en position 5 de la pyrimidinedione	114
III.B.1. Synthèse de l'intermédiaire non substitué (64)	114
III.B.2. Accès aux composés halogénés en position 5	115
III.B.2.a. Composé bromé (62)	115
III.B.2.b. Composé chloré (65)	116
III.B.2.c. Composé iodé (66)	117
III.C. Introduction d'un méthyle en position 5 de la pyrimidinedione	117
III.C.1. Essais à partir du 6-chlorométhyl-5-méthyluracile (67)	118
III.C.1.a. Préparation du dérivé 67	118

III.C.1.b. Couplage de 67 avec la quinoléine-imide 46	121
III.C.2. Essais à partir du composé bromé C6	122
III.D. Couplage de la quinoléine-imide sur la position 5 de la pyrimidinedione.....	123
III.D.1. Premières tentatives de couplage	124
III.D.2. Tentative avec un autre groupe protecteur	124
III.E. Synthèse du composé 85	127
IV. Synthèse des pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8-tétraones (série D)....	128
IV.A. Contexte	128
IV.B. Synthèse du composé benzylé en N^7 (90).....	129
IV.B.1. Synthèse de 90 via l'intermédiaire 91	129
III.B.1.a. Synthèse de 91	129
III.B.1.b. Accès au produit 90 par substitution de la position 7	133
IV.B.2. Synthèse de 90 à partir du <i>N</i> -benzylmaléimide	134
IV.C. Extension aux molécules substituées en N^7	136
IV.C.1. Introduction de substituants aromatiques et aliphatiques.....	136
IV.C.2. Introduction d'une pyrimidinedione	136
IV.D. Extension aux dérivés polysubstitués	139
V. Conclusion	140

Chapitre 3

I. Introduction	143
II. Synthèse des furoquinoléines et pyranoquinoléines (séries E1 et E2)	144
II.A. Contexte bibliographique	145
II.A.1. Les réactions tandem d'addition/cycloisomérisation	145
II.A.2. Les réactions de cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile oxygéné	147
II.A.3. Les réactions de cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile carboné.....	149
II.B. Travaux antérieurs du groupe	150
II.C. Synthèse des précurseurs aldéhyde-yne.....	152
II.C.1. Préparation des quinoléines de départ.....	152
II.C.2. Couplage de Sonogashira.....	155
II.C.2.a. Cas général des 2-chloroquinoléines.....	156
II.C.2.b. Quinoléines avec des substituants mésomères donneurs (-OR)	156
II.C.2.c. Quinoléines avec des substituants à effet inductif attracteur (-Cl, -F).....	158
II.C.2.d. Cas de la quinoléine 136	159
II.D. Réactions tandem de cyclofonctionnalisation.....	160
II.D.1. Cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile oxygéné (série E1)	160
II.D.2. Cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile carboné (série E2)	163
II.D.2.a. Mise au point de la réaction.....	164
II.D.2.b. Proposition de mécanisme de cyclofonctionnalisation	165
II.D.2.c. Généralisation de la méthode	167

III. Synthèse du motif pyrano-pyrido-pyrimidinedione (série E3).....	171
III.A. Accès au squelette pyridopyrimidine.....	172
III.A.1. Via une réaction de Meth-Cohn	172
III.A.2. Via une réaction multicomposants.....	174
III.A.3. Via une réaction de « réarrangement/cyclisation »	174
III.B. Obtention de la structure finale.....	178
VI. Conclusion	180

Chapitre 4

I. Introduction	183
II. Evaluation d'inhibiteurs de la TPase.....	185
II.A. Etude bibliographique	185
II.A.1. Tests utilisant un substrat radioactif	185
II.A.2. Tests basés sur la séparation CLHP	187
II.A.3. Tests basés sur la mesure UV <i>in situ</i>	187
II.B. Méthodes utilisées pour l'évaluation biologique	188
II.B.1. Test utilisant un substrat radioactif	188
II.B.1.a. Test initial	188
II.B.1.b. Tentatives d'amélioration du test.....	189
II.B.2. Test utilisant la mesure UV <i>in situ</i>	190
II.B.2.a. Premier criblage	191
II.B.2.b. Calcul des CI_{50}	191
II.B.2.c. Compétition vis-à-vis du phosphate.....	191
II.B.2.d. Etude mécanistique.....	192
III. Résultats et discussion	193
III.A. Considérations générales.....	193
III.B. Série A.....	193
III.B.1. Dérivés avec des substituants alkyles.....	194
III.B.2. Dérivés avec des substituants éther-oxydes	196
III.B.3. Dérivés avec des substituants halogénés	198
III.B.4. Dérivés avec annélation de cycles aromatiques.....	199
III.B.5. Molécules substituées sur la position 5	200
III.C. Série B	201
III.D. Série C.....	203
III.D.1. Evaluation biologique.....	203
III.D.2. Etude de docking	204
III.E. Série D	205
III.E.1. Evaluation biologique	205
III.E.2. Etude de docking	207
III.F. Séries E.....	208
III.F.1. Série E1	208

III.F.1.a. Premiers inhibiteurs	208
III.F.1.b. Introduction de chaînes alkyles	210
III.F.2. Série E2	210
Conclusion & perspectives	215
Experimental part.....	221
Materials and methods	223
Index of molecules	224
Series A	225
Series C	233
Series D	247
Series E.....	267
Biological evaluation	327
Table des références	331

Abréviations & Acronymes

Français

Anglais

2dR	2-Désoxy-D-ribose	2dR	2-Deoxy-D-ribose
2dR1P	2-Désoxy-D-ribose-1-phosphate	2dR1P	2-Deoxy-D-ribose-1-phosphate
2dR5P	2-Désoxy-D-ribose-5-phosphate	2dR5P	2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate
5-FU	5-Fluorouracile	5-FU	5-Fluorouracile
5'-dFUR	5'-Désoxy-5-fluorouridine	5'-dFUR	5'-Deoxy-5-fluorouridine
5'-dFCR	5'-Désoxy-5-fluorocytidine	5'-dFCR	5'-Deoxy-5-fluorocytidine
6A5BrU	6-Amino-5-bromouracile	6A5BrU	6-Amino-5-bromouracile
6A5ClU	6-Amino-5-chlorouracile	6A5ClU	6-Amino-5-chlorouracile
6AT	6-Aminothymine	6AT	6-Aminothymine
7DX	7-Déazaxanthine	7DX	7-Deazaxanthine
AcOH	Acide acétique	AcOH	Acetic acid
AIFU	5-Fluoro-6-aminoimadazolyl méthyluracile	AIFU	5-Fluoro-6-aminoimadazolyl methyluracile
ADN	Acide désoxyribonucléique	DNA	Deoxyribonucleic acid
AEAC	6-(2-Aminoéthylamino)-5- chlorouracile	AEAC	6-(2-Aminoethylamino)-5- chlorouracile
ANRORC		ANRORC	Addition of the nucleophile, ring opening and ring closure
APTS	Acide <i>para</i> -toluène sulfonique	PTSA	<i>p</i> -Toluenesulfonic acid
ARN	Acide ribonucléique	ARN	Ribonucleic acid
Ang	Angiopoïétine	Ang	Angiopoietine
ATP	Adénosine triphosphate	ATP	Adénosine triphosphate
BNIP3		BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein- interacting protein 3
bFGF	Facteur basique de croissance des fibroblastes	bFGF	Basic fibroblast growth factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique	BBB	Blood-brain barrier
BSA	Bis(triméthylsilyl)acétamide	BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamide
BsPYNPase	Pyrimidine nucléoside phosphorylase de <i>Bacillus Stearothermophilus</i>	BsPYNPase	<i>Bacillus Stearothermophilus</i> pyrimidine nucleoside phosphorylase
Bz	Benzyle	Bz	Benzyle
CAM	Membrane chorio-allantoïdienne	CAM	Chorio-allantoic membrane
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium	CAN	Ceric ammonium nitrate
CCM	Chromatographie sur couche mince	TLC	Thin-layer chromatography
CH ₂ THF	5,10-Méthylènetétrahydrofolate	CH ₂ THF	5,10-Methylenetetrahydrofolate
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50 %	IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance	HPLC	High-performance liquid chromatography
COSY		COSY	Correlation spectroscopy
COX-2	Cyclooxygénase 2	COX-2	Cyclooxygenase 2
CXCL10		CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DCE	Dichloroéthane	DCE	Dichloroethane
DCM	Dichlorométhane	DCM	Dichloromethane
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4- benzoquinone	DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4- benzoquinone
DIB	(Diacétoxy)iodobenzène	DIB	(Diacetoxy)iodobenzene

Abréviations & Acronymes

DIBAL-H	Hydruure de diisobutylaluminium	DIBAL-H	Diisobutylaluminium hydride
DISC		DISC	Death inducing signaling complex
DMF	Diméthylformamide	DMF	Dimethylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde	DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPD	Dihydropyridine déshydrogénase	DPD	Dihydropyridine deshydrogenase
dppf	1,1'-Bis(diphénylphosphino) ferrocène	dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino) ferrocene
dUMP	2'-Désoxyuridine-5'-monophosphate	dUMP	2'-Deoxyuridine-5'-monophosphate
EcTPase	TPase d' <i>Escherichia coli</i>	EcTPase	TPase of <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Facteur de croissance épidermique	EGF	Epidermal growth factor
EMA	Agence européenne des médicaments	EMA	European medicines agency
ERK		ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Et ₃ N	Triéthylamine	Et ₃ N	Triethylamine
Et	Ethyle	Et	Ethyl
EtOH	Ethanol	Ethanol	Ethanol
FADD	Fas-Associated Death Domain	FADD	Fas-Associated Death Domain
FAK	Kinase d'adhésion focale	FAK	Kinase d'adhésion focale
FDA		FDA	Food and drug administration
FdUMP	5-Fluoro-2'-désoxyuridine-5'-monophosphate	FdUMP	5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate
FdUrd	5-Fluoro-2'-désoxyuridine	FdUrd	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
FdUTP	5-Fluoro-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate	FdUTP	5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes	FGF	Fibroblast growth factor
FUMP	5-Fluorouridine-5'-monophosphate	FUMP	5-Fluorouridine-5'-monophosphate
FUTP	5-Fluorouridine-5'-triphosphate	FUTP	5-Fluorouridine-5'-triphosphate
GAS	Site activé par l'interféron gamma	GAS	Gamma interferon-activated site
GCL	Glutamate-cistéine ligase	GCL	Glutamate-cysteine ligase
GSH	Glutathion	GSH	Glutathione
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes	HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Facteur induit par l'hypoxie	HIF	Hypoxia-inducible factor
HMBC		HMBC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
HO-1	Hème oxygénase 1	HO-1	Heme oxygenase 1
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution	HRMS	High-resolution mass spectrometry
HSQC		HSQC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HuTPase	TPase humaine	HuTPase	Human TPase
HUVEC	Cellules endothéliales de cordon ombilical humain	HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IFN	Interféron	IFN	Interferon
IFU	5-fluoro-6-imidazoilméthyluracile	IFU	5-Fluoro-6-imidazoilmethyluracile
IL	Interleukine	IL	Interleukine
Im	Imidazole	Im	Imidazole
ISRE	Elément de réponse stimulé par les interférons	ISRE	Interferon-stimulated response element
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase	ITK	Tyrosine-kinase inhibitor
K _i	Constante d'inhibition	K _i	Inhibitory constant
MAPK		MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Abréviations & Acronymes

m-CPBA	Acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque	m-CPBA	<i>meta</i> -Chloroperoxybenzoic acid
Me	Méthyle	Me	Methyl
MeCN	Acétonitrile	MeCN	Acetonitrile
MeOH	Méthanol	MeOH	Methanol
MMP	Métalloprotéase	MMP	Metalloprotease
MNGIE	Encéphalopathie myo neuro gastrointestinale	MNGIE	Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy
MOM	Méthoxyméthyle	MOM	Methoxymethyle
MPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale	MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NBS	N-bromosuccinimide	NBS	N-bromosuccinimide
NCS	N-chlorosuccinimide	NCS	N-chlorosuccinimide
N.D.	Non déterminé	N.D.	Not determined
NDMA	N-diméthylacétamide	NDMA	N-dimethylacetamide
NFκB		NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells
NIS	N-iodosuccinimide	NIS	N-iodosuccinimide
NPA	Nucléoside phosphonate acyclique	NPA	Acyclic nucleoside phosphonate
NPC	Nucléoside phosphonate cyclique	NPC	Cyclic nucleoside phosphonate
Nu	Nucléophile	Nu	Nucleophile
OPRT	Orotate phosphoribosyle transférase	OPRT	Orotate phosphoribosyle transferase
PBAU	6-(4-Phénylbutylamino)uracile	PBAU	6-(4-Phenylbutylamino)uracile
PD-ECGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes	PD-ECGF	Platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	PDGF	Platelet-derived growth factor
Ph	Phényle	Ph	Phenyl
PMB	<i>para</i> -Méthoxybenzyle	PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PTGs	Produits terminaux de glycation	AGEs	Advanced glycation end-products
PYNPase	Pyrimidine nucléoside phosphorylase	PYNPase	Pyrimidine nucleoside phosphorylase
RMN	Résonance magnétique nucléaire	NMR	Nuclear magnetic resonance
ROS	Espèce réactive de l'oxygène	ROS	Reactive oxygen species
TAM	Macrophage infiltrant la tumeur	TAM	Tumor-infiltrating macrophages
TBAB	Bromure de tetra- <i>n</i> -butylammonium	TBAB	Tetra- <i>n</i> -butylammonium bromide
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium	TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TEBAC	Chlorure de benzyltriéthylammonium	TEBAC	Benzyltriethylammonium chloride
Tf	Triflate	Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique	TFA	Trifluoroacetic acid
TFT	5-Trifluorothymidine	TFT	5-Trifluorothymidine
TFT-MP	5-Trifluorothymidine-monophosphate	TFT-MP	5-Trifluorothymidine- monophosphate
TFT-TP	5-Trifluorothymidine-triphosphate	TFT-TP	5-Trifluorothymidine-triphosphate
THF	Tétrahydrofurane	THF	Tetrahydrofurane
TIE-2		TIE-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
TK	Thymidine kinase	TK	Thymidine kinase
TLR	Récepteur de type Toll	TLR	Toll-like receptor
TMP	Thymidine-5'-monophosphate	TMP	Thymidine-5'-monophosphate
TMS	Triméthylsilyle	TMS	Trimethylsilyl
TNF	Facteur de nécrose tumorale	TNF	Tumo-necrosis factor
TPase	Thymidine phosphorylase	TPase	Thymidine phosphorylase
TPI	Tipiracile	TPI	Tipiracile
TS	Thymidylate synthase	TS	Thymidylate synthase

Abréviations & Acronymes

UK	Uridine kinase	UK	Uridine kinase
UPase	Uridine phosphorylase	UPase	Uridine phosphorylase
VDA	Agent de destruction vasculaire	VDA	Vascular disrupting agent
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	VEGF	Vascular endothelial growth factor
XO	Xanthine oxydase	XO	Xanthine oxydase

Avant-propos

Avec 350 000 nouveaux cas recensés et près de 150 000 morts estimées chaque année, le cancer est la première cause de décès en France.¹ Bien que ces chiffres restent élevés, la mortalité en France est en baisse depuis les années 1980, chez l'homme comme chez la femme, et ce grâce aux progrès réalisés en termes de diagnostic et de prise en charge des patients.² Face à l'enjeu scientifique, humain et socio-économique que représente le cancer, les acteurs de la recherche tentent actuellement de mieux prévenir la maladie en identifiant et en limitant l'impact des facteurs de risque, de mieux la dépister par la recherche de nouveaux biomarqueurs, et de mieux la soigner en développant des thérapies à la fois efficaces et entraînant un minimum d'effets indésirables.³

Caractérisé par une croissance incontrôlée de cellules malignes ayant échappé aux processus de régulation de l'organisme, le cancer est traité classiquement par la pratique de l'exérèse, chimiothérapie et/ou radiothérapie. Que ce soit à cause des toxicités secondaires des chimiothérapies, du développement de résistances ou de la tendance des tumeurs solides à induire des métastases, ces traitements manquent parfois d'efficacité et réduisent considérablement la qualité de vie des patients.

Il y a quelques années, grâce aux progrès de la génomique et une meilleure connaissance de la biologie du microenvironnement tumoral, une médecine de précision, ou « personnalisée », a vu le jour.^{4,5} Parmi les nouvelles thérapies qui y sont associées, une approche intéressante est la stratégie anti-angiogénique et/ou antivasculaire, qui consiste à enrayer le processus de vascularisation de la tumeur.^{6,7} L'angiogenèse tumorale, ou néo-angiogenèse, est indispensable à la croissance et à une éventuelle dissémination des tumeurs. Détruire ces nouveaux vaisseaux sanguins (stratégie avasculaire) ou empêcher leur formation (stratégie anti-angiogénique) devrait permettre une régression ou un maintien de la tumeur à un stade précoce de développement, le stade avasculaire, tout en prévenant la formation de métastases. L'association à une chimiothérapie cytotoxique classique permettrait ensuite d'éradiquer complètement la tumeur.

La thymidine phosphorylase (TPase), une enzyme impliquée dans le métabolisme des nucléosides, pourrait représenter une cible de choix pour la stratégie anti-angiogénique.⁸ En effet, la surexpression de cette enzyme a été rapportée dans le cadre de nombreux cancers à

¹ Données épidémiologiques de l'Institut National du Cancer (INCa), <http://www.e-cancer.fr/> (site internet consulté le 14/09/2016).

² Situation de la chimiothérapie des cancers, état des lieux et des connaissances, INCa, juillet 2015.

³ D. S. Dizon, L. Krilov, E. Cohen, T. Gangadhar, P. A. Ganz, T. A. Hensing, S. Hunger, S. S. Krishnamurthi, A. B. Lassman, M. J. Markham, E. Mayer, M. Neuss, S. K. Pal, L. C. Richardson, E. Schilsky, G. K. Schwartz, D. R. Spriggs, M. A. Villalona-Calero, G. Villani, G. Masters, *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 987-1011.

⁴ S. E. Jackson, J. D. Chester, *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 262-6.

⁵ V. Prasad, T. Fojo, M. Brada, *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 81-6.

⁶ G. C. Jayson, R. Kerbel, L. M. Ellis, A. L. Harris, *The Lancet* **2016**, *388*, 518-29.

⁷ M. Abdelrahim, S. Konduri, M. R. Basha, P. A. Philip, C. H. Baker, *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 5-18.

⁸ Y. Y. Elamin, S. Rafee, N. Osman, K. J. O'Byrne, K. Gately, *Cancer Microenv.* **2016**, *9*, 33-43.

tumeurs solides, où elle est corrélée à la production de plusieurs facteurs pro-angiogéniques. La TPase favorise ainsi la vascularisation des cellules tumorales, mais également leur invasivité, leur dissémination et leur échappement à la réponse immunitaire. L'inhibition de cette enzyme permettrait d'agir à un stade précoce de la croissance tumorale, tout en ayant des effets secondaires limités puisque l'angiogenèse est un phénomène relativement rare chez l'adulte sain.⁹

Dans le cadre de ma thèse, j'ai pris part à un projet de recherche basé sur la conception et la synthèse de composés anti-angiogéniques dont l'évaluation biologique est réalisée par inhibition de la TPase. Ce projet a été ébauché lors de travaux réalisés précédemment au sein de notre laboratoire et en particulier pendant la thèse de Karen Aknin.¹⁰

Le **premier chapitre** de ce manuscrit fera l'objet d'une étude bibliographique abordant les différentes thérapies anti-angiogéniques existantes, la TPase et son incidence dans la néo-angiogenèse, ainsi que les principaux inhibiteurs de cette enzyme développés à ce jour. Ce chapitre sera conclu par l'exposé de notre projet de recherche.

Dans le **deuxième chapitre**, nous présenterons la synthèse de plusieurs séries d'inhibiteurs reposant sur des réactions multicomposants élaborées au laboratoire. Il s'agit de molécules construites autour d'un squelette pyrimido[4,5-*b*]quinoléine-2,4-dione, pyrrolo[3,4-*b*]quinoléine-1,3-dione / pyrimidinedione ou encore pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8-tétraone. En particulier, une méthode de synthèse faisant appel à des synthons originaux et permettant d'accéder à des dérivés sélectivement substitués et basés sur ce dernier squelette sera décrite.

Le **troisième chapitre** sera consacré aux inhibiteurs de type furoquinoléine ou pyranoquinoléine, dont la chimie découle des travaux de thèse de Gaëlle Mariaule.¹¹ La description de leurs synthèse inclura une étude méthodologique relative à une réaction tandem de cyclofonctionnalisation catalysée à l'argent permettant d'introduire des nucléophiles carbonés sur les structures pyranoquinoléines.

Pour finir, dans le **quatrième et dernier chapitre**, après une brève présentation des protocoles décrits dans la littérature, nous aborderons l'évaluation biologique des différentes séries d'inhibiteurs synthétisées. Les résultats de cette étude seront analysés au regard de ceux du docking de ces molécules dans le site actif de l'enzyme par modélisation moléculaire.

⁹ S. Liekens, E. De Clercq, J. Neyts, *Biochem Pharmacol.* **2001**, *61*, 253-70.

¹⁰ K. Aknin, Conception et synthèse de composés anti-angiogéniques par inhibition de la thymidine phosphorylase, enzyme surexprimée dans les tumeurs solides. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris, France, Juin 2009.

¹¹ G. Mariaule, Accès original aux hétérocycles par la catalyse organométallique. Développement de nouveaux inhibiteurs de kinases. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris, France, Novembre 2014.

Chapitre 1 :

La thymidine phosphorylase et l'angiogenèse tumorale

I. Angiogenèse tumorale et thérapies anti-angiogéniques

I.A. Le processus angiogénique

L'angiogenèse est un processus permettant de fournir un apport correct en oxygène et en nutriments aux cellules des tissus en cours de développement ou de réparation. Ce mécanisme se déclenche en réponse à une hypoxie provoquée localement, par une lésion par exemple. Dans un cadre physiologique, ce phénomène est autorégulé, ce qui fait qu'il reste limité dans l'espace et le temps. Dans les tissus adultes, l'angiogenèse est relativement rare et l'endothélium est dans un état quiescent. Elle va survenir de manière ponctuelle au cours de la cicatrisation, de l'inflammation, du cycle menstruel ou de la gestation (au niveau des glandes mammaires et du placenta).

Dans le cadre d'ischémies, l'angiogenèse est bénéfique puisqu'un défaut d'apport sanguin artériel entraîne une néovascularisation en réponse à une hypoxie tissulaire locale. A l'inverse, une dérégulation des processus angiogéniques est liée à de nombreuses pathologies. En effet, une angiogenèse excessive est impliquée dans la progression de nombreuses maladies dont des maladies inflammatoires (psoriasis, arthrite rhumatoïde, athérosclérose...), des maladies oculaires (dégénérescence maculaire, rétinopathie diabétique) et de nombreux cancers à tumeurs solides.

En ce qui concerne le cancer, le processus angiogénique est désigné par le terme néo-angiogenèse, et est activé par un stress environnemental subi par le foyer tumoral initial. Cette activation d'une angiogenèse pathologique constitue l'une des premières étapes du développement de la maladie. La plupart des tumeurs ne dépassant pas 2 à 3 mm³ restent dans un état quiescent pendant des mois voire des années. Non vascularisées, les tumeurs sont mal alimentées en oxygène et en nutriments, ce qui provoque localement un stress hypoxique, un des principaux déclencheurs de l'angiogenèse tumorale. Le développement de néovaisseaux va accompagner la croissance de la tumeur en lui fournissant oxygène et nutriments, tout en la débarrassant de ses déchets cataboliques. On distingue globalement deux phases dans le développement tumoral :

- ✓ Une première phase, dite prévasculaire, caractérisée par une taille et une croissance très faibles de la tumeur. Les cellules tumorales sont en réplication rapide mais ce phénomène est compensé par une forte mortalité cellulaire par apoptose. Grâce à cet équilibre entre réplication et mort cellulaire, une tumeur peut stagner dans cette phase prévasculaire pendant une longue période.
- ✓ Une seconde phase, dite vasculaire, caractérisée par un développement tumoral important. De plus, en ayant accès à la circulation générale, les cellules tumorales vont pouvoir se disséminer dans l'organisme pour former des métastases.

Initialement, les tumeurs solides sont maintenues dans un état prévasculaire par un équilibre délicat entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ces molécules sont de natures très diverses : facteurs de croissance et leurs récepteurs, molécules d'adhésion, facteurs de signalisation, facteurs de transcription, protéinases, protéines de la matrice extracellulaire... La plupart d'entre elles sont listées dans la figure 1. Le basculement vers un phénotype angiogénique correspond à un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Ces derniers sont surexprimés tandis que l'on observe une diminution des facteurs anti-angiogéniques. Plusieurs éléments de stress cellulaire peuvent être à l'origine de ce déséquilibre, comme l'hypoxie (par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 α , de l'anglais « hypoxia-inducible factor »), le manque de nutriments, la formation de radicaux oxygénés ou l'altération de gènes suppresseurs de tumeur.¹² Cette transition entre état prévasculaire et vasculaire est appelée « switch » angiogénique.

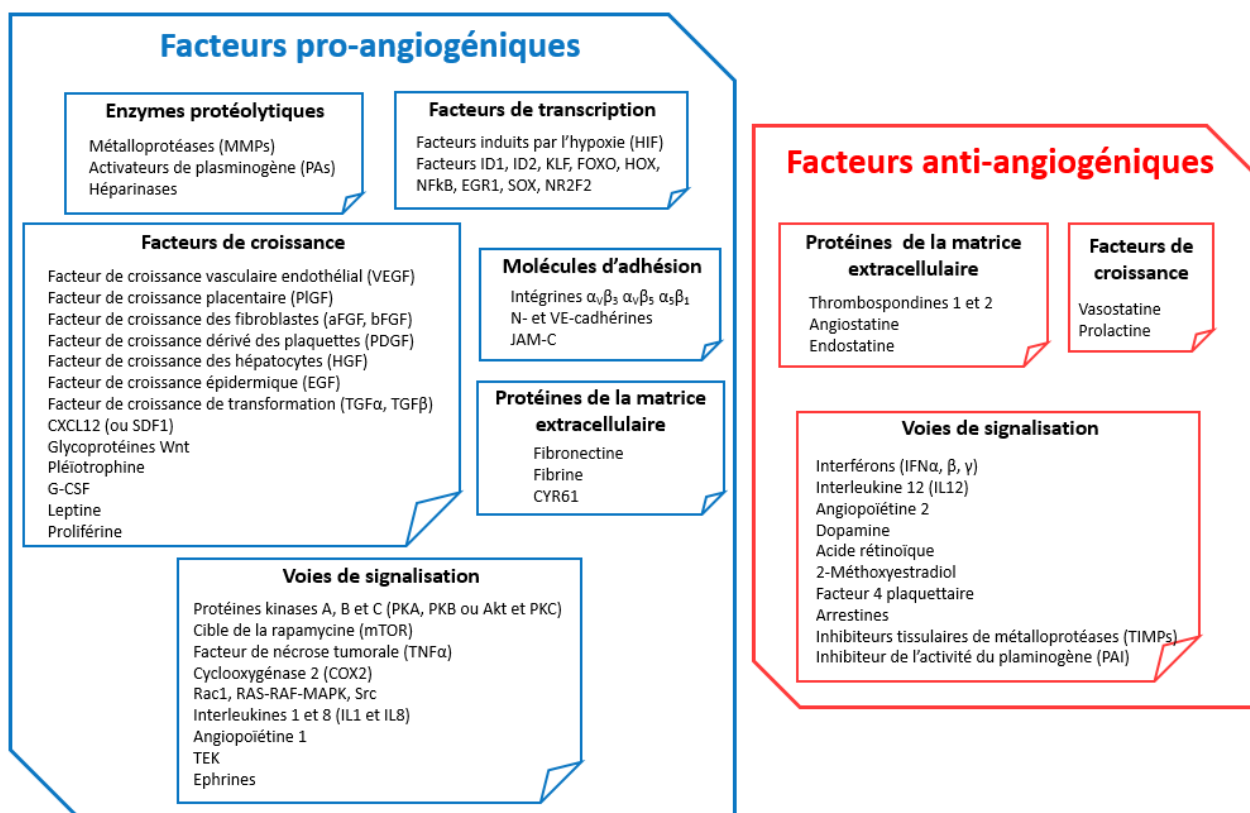


Figure 1 : Principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse.¹³

Le mécanisme de l'angiogenèse tumorale est similaire à celui de l'angiogenèse physiologique,¹⁴ et il peut être découpé en trois phases successives (regroupées sur la figure 2) :

- ✓ **La phase d'initiation** : la tumeur produit des facteurs pro-angiogéniques tels que l'interleukine 8 (IL-8), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) et l'angiopoïétine 2 (Ang-2), qui vont activer et recruter les cellules endothéliales au niveau des vaisseaux environnant

¹² S. North, M. Moenner, A. Bikfalvi, *Cancer Lett.* **2005**, 218, 1-14.

¹³ S. Y. Yoo, S. M. Kwon, *Mediat. Inflamm.* **2013**, Article ID 127170.

¹⁴ M. Papetti, I. M. Herman, *J. Physiol. Cell Physiol.* **2002**, 282, C947-70.

la tumeur. Les cellules endothéliales deviennent plus perméables, tandis que les péricytes qui les entourent se détachent. Les vaisseaux sanguins sont ainsi dilatés et plus perméables, ce qui entraîne une extravasation locale de protéases (métalloprotéases ou MMPs, activateurs de plasminogène, héparanases...) à l'origine de la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire périphérique.

- ✓ La phase de progression : les cellules endothéliales activées se mettent à proliférer et migrent vers le foyer tumoral. Elles vont progressivement s'aligner pour former des structures tubulaires aboutissant à la construction de néovaisseaux. En même temps, elles recrutent des cellules inflammatoires qui sécrètent des protéases, ce qui amplifie le processus de dégradation de la matrice extracellulaire, et qui mobilisent des précurseurs de cellules endothéliales, dont les progéniteurs endothéliaux.
- ✓ La phase de maturation : les néovaisseaux se réorganisent en un réseau de capillaires qui se stabilise progressivement par l'intermédiaire de péricytes, d'une membrane basale et de cellules musculaires lisses.

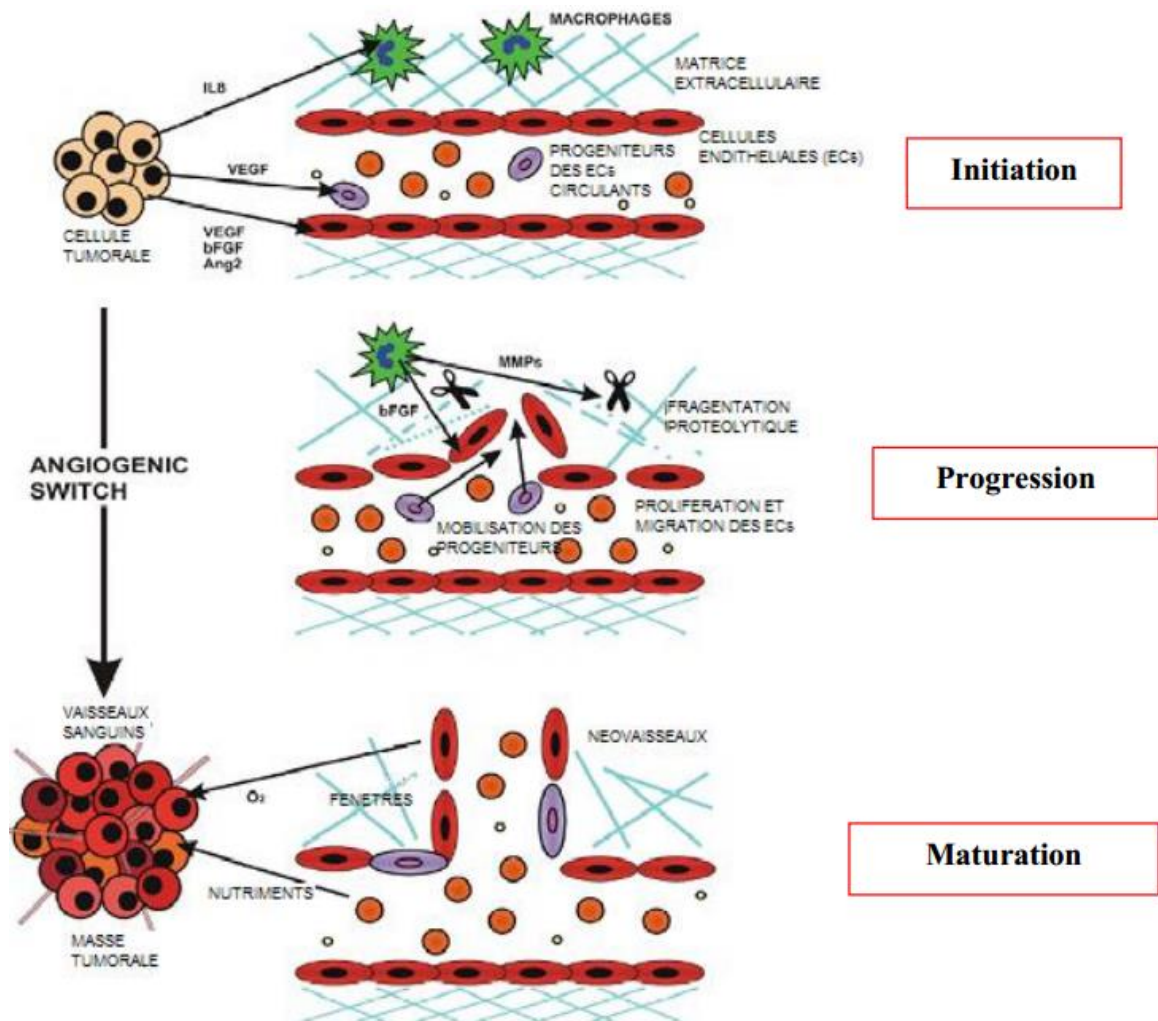


Figure 2 : Les trois phases de la néo-angiogenèse.¹⁵

¹⁵ L. Persano, M. Crescenzi, S. Indraccolo, *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 87-114.

Les vaisseaux générés à l'issue du switch angiogénique ont des caractéristiques différentes des vaisseaux normaux. En effet, ces nouveaux capillaires ont une organisation chaotique et sont plus dilatés, plus perméables et moins fonctionnels.¹⁶ Le flux sanguin qui irrigue la tumeur est hétérogène, par conséquent le microenvironnement tumoral reste en partie hypoxique, acide et mal alimenté en nutriments. En outre, les tumeurs ont tendance à comprimer leur néovascularisation, ce qui accentue cet effet. Toutes ces caractéristiques entretiennent l'angiogenèse tumorale. Enfin, des travaux récents ont montré que les néovaisseaux ne se contentent pas d'alimenter la tumeur en oxygène et en nutriments, mais qu'ils peuvent aussi stimuler le développement tumoral par sécrétion de facteurs de croissance (ce qui représenterait une voie de signalisation dite « angiocrine »).¹⁷

L'angiogenèse est donc une étape-clé dans le développement tumoral puisqu'il s'agit de la transition entre un état quiescent et une prolifération puis une dissémination incontrôlées des cellules tumorales. L'incorporation d'une composante anti-angiogénique dans les thérapies antitumorales actuelles semble donc nécessaire.

I.B. Thérapies anti-angiogéniques

En 1971, Folkman a été le premier à proposer une inhibition thérapeutique de la néo-angiogenèse.¹⁸ Toutefois, le développement de thérapies anti-angiogéniques n'a connu un réel essor qu'une fois les médiateurs moléculaires de l'angiogenèse identifiés, notamment le VEGF.¹⁹ Les thérapies ciblant ce dernier (ou ses différents récepteurs) sont les plus nombreuses à ce jour car la surexpression du VEGF est retrouvée dans presque tous les types de cancers solides. On sait aujourd'hui qu'une multitude de récepteurs et de facteurs sont impliqués dans le processus angiogénique (figure 1), ce qui équivaut à autant de cibles potentielles pour de nouveaux traitements anti-angiogéniques.

Les thérapies anti-angiogéniques ne sont pas les seuls traitements ciblant la vasculature tumorale. Les agents anti-vasculaires (VDAs, de l'anglais « vascular disrupting agents ») en font également partie et ciblent les vaisseaux déjà formés par néo-angiogenèse. L'objectif commun de ces thérapies est d'empêcher la prolifération et la dissémination tumorales en maintenant la tumeur isolée de la circulation sanguine. Toutefois, les anti-angiogéniques et les VDAs se distinguent principalement par trois éléments : leur cible, le stade de la maladie où ils sont employés et leurs modalités d'administration (tableau 1).⁷ Contrairement aux VDAs, les anti-angiogéniques ont une action préventive qui vise à limiter l'apparition de néovaisseaux. Dans cette section, seuls les anti-angiogéniques seront évoqués.

Dans la littérature, les composés anti-angiogéniques sont diversement classifiés. Une méthode consiste à les regrouper en fonction de leur mode d'action et de leur cible, méthode proposée

¹⁶ G. Bergers, L. E. Benjamin, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 401-10.

¹⁷ J. M. Butler, H. Kobayashi, S. Rafii, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10, 138-46.

¹⁸ J. Folkman, *New Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-6.

¹⁹ N. Ferrara, W. J. Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, 161, 851-8.

par Folkman et reprise dans une publication récente.²⁰ Les différents anti-angiogéniques seront présentés sur la base de cette classification. Il s'agit de composés utilisés en clinique ou qui font actuellement l'objet d'études cliniques.^{6,20,21,22}

	Cible	Stade de la maladie	Administration
Anti-angiogéniques	formation de néovaisseaux	précoce (action préventive)	chronique
VDAs	néovaisseaux déjà formés	avancé (effet immédiat)	ponctuelle

Tableau 1 : Principales différences entre anti-angiogéniques et VDAs
(d'après Abdelrahim *et al.*⁷).

I.B.1. Anti-angiogéniques à action directe

Les anti-angiogéniques à action directe vont agir sur les cellules effectrices de l'angiogenèse, les cellules endothéliales, et vont réguler leurs fonctions qui sont associées à l'angiogenèse (prolifération, migration, structuration en microvaisseaux...).

Dans cette catégorie, on trouve des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse tels que l'angiostatine, l'endostatine et les arrestines, qui sont des fragments issus de la protéolyse de protéines de la matrice extracellulaire. Ils empêchent la migration et la prolifération des cellules endothéliales induites par plusieurs facteurs pro-angiogéniques (VEGF, bFGF, IL-8 et le facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF). Néanmoins, l'évaluation en clinique d'analogues des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, tels que l'endostatine, n'a pas permis de valider cette approche pour le moment.²⁰

Les protéines d'adhésion, telles que les intégrines, jouent un rôle important dans la migration et la survie des cellules endothéliales. Par conséquent, les antagonistes de ces chimiokines constituent également des anti-angiogéniques à action directe. Parmi les molécules qui font actuellement l'objet d'études cliniques, on peut citer l'abritumab (cancer colorectal métastatique, phase I - II) et le volociximab (cancer du poumon non à petites cellules, phase I), deux anticorps monoclonaux ciblant respectivement les intégrines α_v et $\alpha_5\beta_1$. Des petites molécules sont aussi en cours de développement comme l'E7820, un inhibiteur de la sous-unité α_2 des intégrines actuellement en étude clinique de phase II pour le traitement du cancer colorectal métastatique (figure 3). Enfin, l'ADH-1 / Exherin® est un petit peptide inhibant la N-cadhérine, une autre protéine d'adhésion (figure 3). Il est à l'étude pour la prise en charge des cancers métastatiques du canal biliaire et du pancréas (phase I).^{23,24}

²⁰ A. E. El-Kenawi, A. B. El-Remessy, *Brit. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 712-29.

²¹ Y. Zhao, A. A. Adjei, *The Oncologist* **2015**, *20*, 1-14.

²² I. Marech, C. Leporini, M. Ammendola, M. Porcelli, C. D. Gadaleta, E. Russo, G. De Sarro, G. Ranieri, *Cancer Lett.* **2015**, *380*, 216-26.

²³ A. W. Holle, J. L. Young, J. P. Spatz, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2016**, *97*, 270-9.

²⁴ O. W. Blaschuk, *Phil. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370*, 20140039.

Pour finir, on trouve au sein des anti-angiogéniques directs divers composés affectant les cellules endothéliales, comme par exemple les analogues de la fumagilline, qui inhibent la méthionine aminopeptidase 2. Parmi ces molécules, le PPI-2458 a donné des résultats prometteurs sur des lymphomes non hodgkiniens et des tumeurs solides lors d'essais cliniques de phase I (figure 3). Le thalidomide / Thalidomide Celgene® et deux de ses analogues, le lenalidomide / Revlimid® et le pomalidomide / Imnovid®, sont quant à eux employés en clinique dans la prise en charge du myélome multiple (figure 3). Leur action anti-tumorale semble liée à la fois à des effets cytotoxiques directs et à des propriétés immunomodulatrices et anti-angiogéniques. Vu l'importance de la néovascularisation pour le développement fœtal, la tératogénicité du thalidomide semble liée à ses propriétés anti-angiogéniques.²⁵

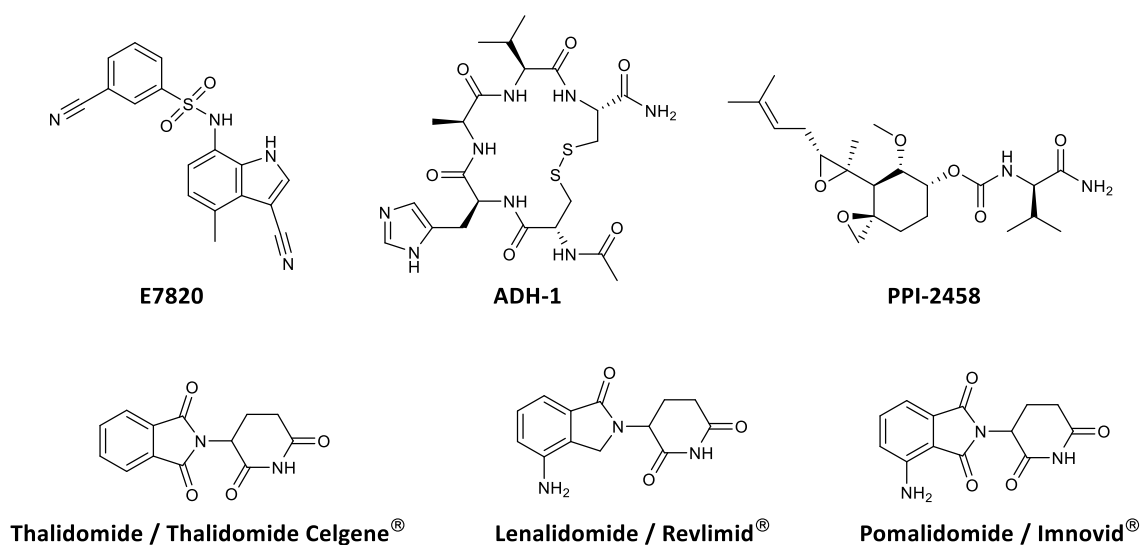


Figure 3 : Structures d'anti-angiogéniques à action directe.

I.B.2. Anti-angiogéniques à action indirecte

Les inhibiteurs indirects de l'angiogenèse empêchent l'expression ou bloquent l'activité de protéines intervenant dans la libération de facteurs pro-angiogéniques ou qui sont impliquées dans des processus extracellulaires.

Les MMPs, les activateurs du plasminogène et les héparanases interviennent dans la dégradation de la membrane basale des vaisseaux existants et dans le remodelage de la matrice extracellulaire, des mécanismes essentiels pour la néo-angiogenèse. L'inhibition de ces enzymes a donc fait l'objet de nombreuses recherches, malgré des résultats cliniques souvent nuancés à cause de toxicités sévères et d'un effet accentuant la formation de métastases. On peut toutefois citer le PI-88 / Muparfostat®, un mélange d'oligosaccharides qui inhibe l'héparanase en mimant son substrat naturel, le sulfate d'héparane. Récemment, une étude clinique de phase II où il était utilisé comme adjuvant après résection du cancer du foie a donné des résultats encourageants, et le PI-88 est également en cours d'étude de phase II pour la prise en charge du mélanome avancé.²⁰

²⁵ R. J. D'Amato, M. S. Loughman, E. Flynn, J. Folkman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4082-5.

Plusieurs autres familles de protéases jouent aussi un rôle, indirect, dans l'angiogénèse. C'est le cas des tryptases et des chymases, qui possèdent une activité pro-angiogénique à la fois *in vitro* et *in vivo*, activité en partie due à l'activation de certaines métalloprotéases.²² Actuellement utilisé dans le traitement du myélome multiple, le bortézomib / Velcade® (figure 4) cible diverses protéases dont des chymases. Le gabexate mésylate / Foy® (figure 4) fait l'objet d'une étude de phase III où cet inhibiteur de tryptase est utilisé après résection du cancer du foie. Le nafamostat mésylate / Futhan® (figure 4), un autre inhibiteur de tryptase, a donné des résultats prometteurs après une étude clinique de phase I - II sur des patients atteints du cancer du pancréas.

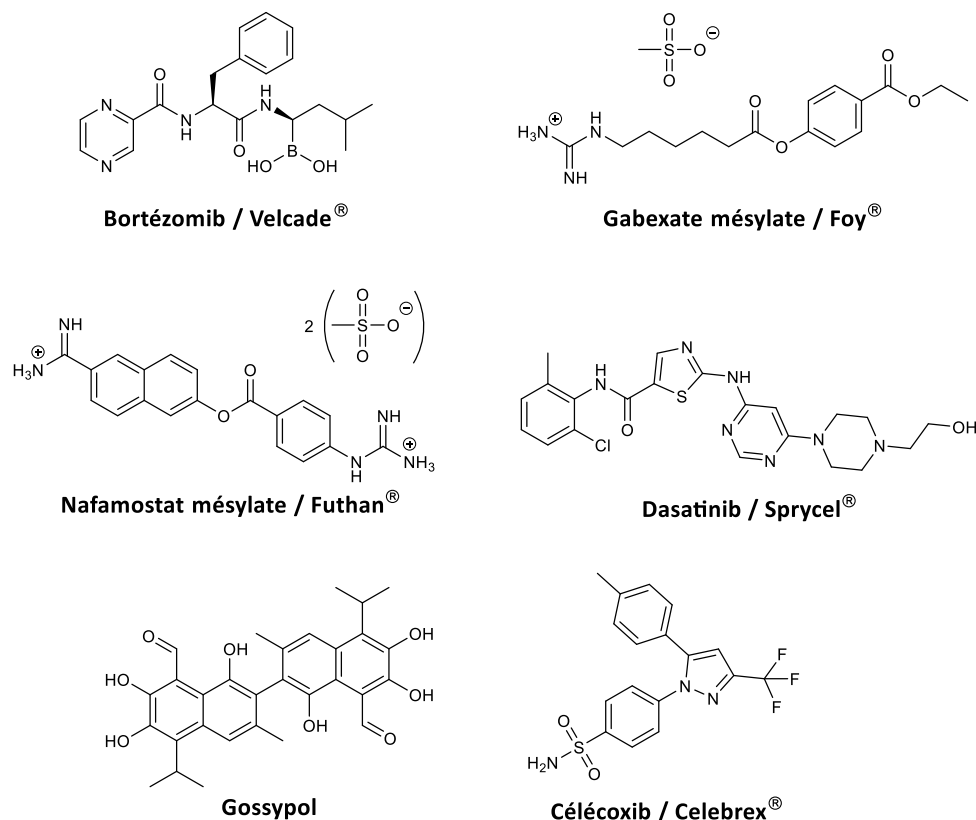


Figure 4 : Structures d'anti-angiogéniques à action indirecte.

D'autres anti-angiogéniques à action indirecte ciblent les oncogènes, dont l'expression favorise la survenue de cancers et entraîne la surexpression d'un certain nombre de protéines pro-angiogéniques. On peut citer le dasatinib / Sprycel® (figure 4), un inhibiteur de kinase de type Src à large spectre actuellement sur le marché, et le gossypol (figure 4), un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui est étudié en clinique dans le cadre du cancer de la prostate (phase I - II) et du cancer du poumon non à petites cellules (phase III).²⁰

Pour finir, d'autres molécules anti-angiogéniques ont pour cible les processus inflammatoires et les leucocytes recrutés au niveau de la tumeur.²⁰ C'est le cas du célécoxib / Celebrex® (figure 4), un inhibiteur de la cyclooxygénase 2 (COX-2), une enzyme impliquée dans les mécanismes inflammatoires. Ce composé est actuellement en essai clinique comme adjuvant en traitement post-opératoire (cancer du pancréas, phase IV) et en plurithérapie de nombreux cancers avancés ou métastasés (cancers de la prostate, du système nerveux central, colorectal,

du poumon non à petites cellules, de la cavité buccale ou du nasopharynx, et sarcome d'Ewing). Il existe également des anticorps monoclonaux actuellement utilisés dans la prise en charge de certains lymphomes ou des leucémies lymphoïdes chroniques, comme l'alemtuzumab / Lemtrada® et le rituximab / MabThera®. Ces agents se fixent à certains antigènes présents à la surface des lymphocytes B et T.

I.B.3. Anti-angiogéniques à action mixte

Une autre catégorie de composés anti-angiogéniques est capable d'interagir à la fois avec les cellules endothéliales et les cellules tumorales, et sont appelés pour cette raison anti-angiogéniques à action « mixte ». Ils appartiennent essentiellement à trois classes : les anticorps monoclonaux, les récepteurs solubles et les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs). Leur mécanisme d'action consiste le plus souvent à bloquer des voies de signalisation pro-angiogéniques faisant intervenir une ou plusieurs familles de facteurs de croissance.

I.B.3.a. Les anticorps monoclonaux et les récepteurs solubles

Les anti-angiogéniques de type anticorps monoclonal ont des cibles très diverses mais également une forte spécificité d'action. Les plus utilisés en thérapeutique sont ceux inhibant la voie de signalisation du VEGF, que ce soit par reconnaissance du VEGF lui-même (bevacizumab / Avastin®) ou celle de ses récepteurs (ramucirumab / Cyramza®). Après avoir été utilisé pour la prise en charge de la forme néovasculaire de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le ranibizumab / Lucentis®, un autre anticorps monoclonal ciblant le VEGF, a été récemment testé sur le mélanome de la choroïde (deux études cliniques de phase II et III).²² Le bevacizumab et le ramucirumab sont également en cours d'essais cliniques sur ce type de tumeurs (phase III).

Il existe d'autres anticorps actuellement utilisés en clinique, en particulier ceux ciblant les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF), tels que le panitumumab / Vectibix®, le cetuximab / Erbitux®, le trastuzumab / Herceptin® et le pertuzumab / Perjeta®.

Parmi les anticorps actuellement en développement clinique, certains ciblent le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) : le ficlatuzumab (cancer du poumon non à petites cellules, phase II), le rilotumumab (cancer du poumon, phase II - III) et le ganitumab (sarcome d'Ewing et cancer du sein, phase II). Des anticorps anti-angiopoïétines sont également à l'étude, tels que le MEDI-3617 (mélanome, phase I) et le nesvacumab (tumeurs solides, phase I). Enfin, d'autres agents ciblent les facteurs de nécrose tumoral (TNFs), tels que le certolizumab pegol / Cimzia® (adénocarcinome, phase I), ou l'interleukine-6 (IL-6), comme le siltuximab / Sylvant® (myélome multiple, phase I - II).²²

Les récepteurs solubles ont un mode d'action semblable à celui des anticorps monoclonaux et neutralisent divers facteurs pro-angiogéniques. L'aflibercept / Zaltrap® est utilisé en thérapeutique et cible le VEGF, tandis que le FP-1039, évalué actuellement en clinique contre des tumeurs solides avancées ou métastatiques, cible le facteur de croissance des fibroblastes (FGF).²²

I.B.3.b. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs)

Les ITKs possèdent des structures très variées et interagissent au niveau du site de fixation de l'adénosine triphosphate (ATP) du domaine tyrosine kinase qui est conservé entre plusieurs familles de récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR, PDGFR, FGFR, EGFR, Raf et c-Kit). De ce fait, leur spécificité d'action est moindre que celle des anticorps monoclonaux. Ces dix dernières années, des ITKs capables de cibler plusieurs types de récepteurs ont vu le jour. Ces agents ont donné des résultats très prometteurs lors de tests cliniques. L'inhibition combinée des voies VEGF, FGF et PDGF, par exemple, s'effectue non seulement au niveau des cellules tumorales, mais aussi sur les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules musculaires lisses, ce qui permet une réduction simultannée de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et du développement de métastases.²⁶ Il existe aujourd'hui plus d'une quinzaine d'ITKs sur le marché dont plus de la moitié cible plusieurs types de récepteurs. Parmi ces derniers, on trouve le sunitinib / Sutent® et le sorafenib / Nexavar®, ainsi que le nintedanib / Vargatef® et le lenvatinib / Lenvima®, arrivés plus récemment (figure 5).

L'imatinib / Glivec® et le nilotinib / Tasigna® agissent sur la voie du PDGF tandis que le gefitinib / Iressa®, le lapatinib / Tyverb® ou encore l'erlotinib / Tacerva® interagissent de manière préférentielle avec le domaine tyrosine kinase des récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGF) (figure 5). Une meilleure connaissance du rôle de la voie de signalisation du HGF dans la progression tumorale a récemment permis d'élaborer des agents ciblant le HGF ou son récepteur Met, et a abouti à l'autorisation de mise sur le marché récente du crizotinib / Xalkori® en Europe et aux Etats-Unis (figure 5).²²

I.B.4. Résistances aux anti-angiogéniques

Les thérapies anti-angiogéniques, qui ciblent pour beaucoup d'entre elles les cellules endothéliales, génétiquement stables, des néovaisseaux, laissent espérer un faible développement de résistances. Cependant, de nombreux patients présentent des résistances intrinsèques ou acquises à certains anti-angiogéniques, en particulier ceux ciblant le VEGF et ses récepteurs. En effet, en présence de traitements visant à bloquer la voie du VEGF, des mécanismes compensatoires se mettent en place, notamment par l'intermédiaire d'autres médiateurs de l'angiogenèse tels que le PDGF et le FGF.

Les résistances innées qui ont été rapportées semblent liées à la nature hétérogène de la vascularisation tumorale.²⁷ La croissance des tumeurs peut en effet s'effectuer au travers d'une angiogenèse dont les voies de signalisation ne font pas intervenir le VEGF, ou encore *via* l'utilisation des systèmes vasculaires préexistants. Cette dernière possibilité, la cooption vasculaire, a surtout été observée pour des tumeurs présentes dans des organes très vascularisés

²⁶ F. Hilberg, G. J. Roth, M. Krssak, S. Kautschitsch, W. Sommergruber, U. Tontsch-Grunt, P. Garin-Chesa, G. Bader, A. Zoephel, J. Quant, A. Heckel, W. J. Rettig, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4774-82.

²⁷ J. A. Nagy, H. F. Dvorak, *Clin. Exp. Metastasis* **2012**, *29*, 657-62.

(poumons, foie et cerveau).²⁸ Ces résistances innées pourraient en outre être accentuées par les traitements anti-angiogéniques.

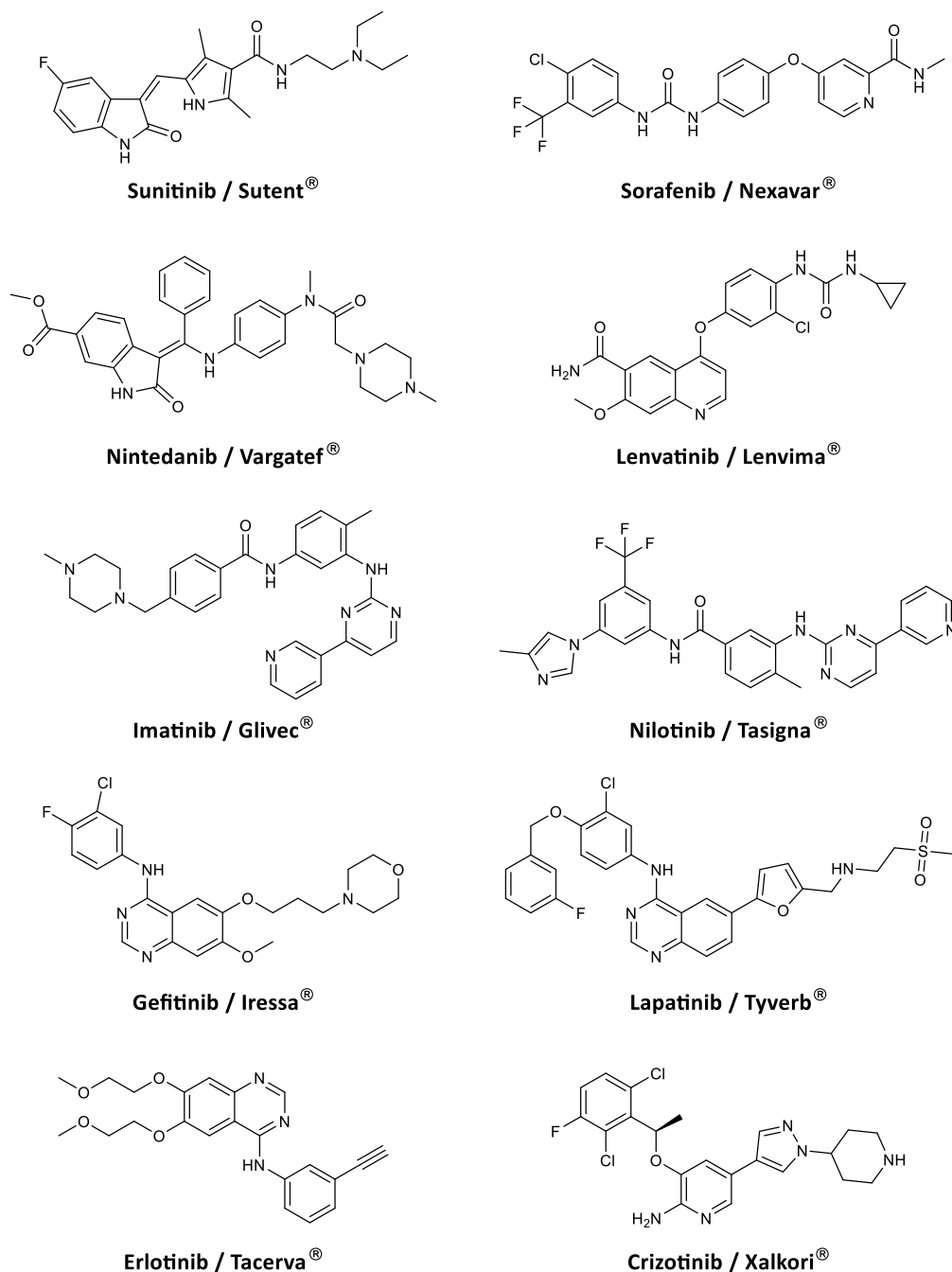


Figure 5 : Principaux ITKs utilisés en clinique. ^{6,20,21,22}

Une des causes principales des résistances acquises semble être l'augmentation de l'hypoxie, responsable d'une élévation du taux de HIF-1 α et par la suite de la production d'autres facteurs pro-angiogéniques. D'autres mécanismes sont également envisagés, tels qu'une sélection de cellules tumorales résistantes à l'hypoxie, un remodelage des vaisseaux en un phénotype

²⁸ F. Pezzella, A. Di Bacco, S. Andreola, A. G. Nicholson, U. Pastorino, A. L. Harris, *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2494-500.

vasculaire plus mature ou une infiltration de la tumeur par des cellules souches capables de stimuler l'angiogenèse sans VEGF.⁶

Pour pallier ces phénomènes de résistance, l'inhibition simultanée de plusieurs médiateurs de l'angiogenèse (VEGF et PDGF notamment) est à l'étude et a déjà donné des résultats prometteurs.²¹ Une autre stratégie consisterait à combiner des inhibiteurs de la voie VEGF et de celle des angiopoïétines, ce qui devrait augmenter significativement l'activité anti-angiogénique sans avoir de toxicité accrue.⁶

I.B.5. Conclusion et perspectives

Aujourd'hui, la majorité des anti-angiogéniques utilisés en thérapeutique sont des ITKs, les plus récents ciblant un grand nombre de récepteurs différents. Bien que prometteurs, les ITKs manquent de spécificité d'action. La pharmacologie des ITKs étant particulièrement complexe, on observe une grande variabilité intra- et interindividuelle, ce qui rend la prédiction de l'exposition à une dose fixe très aléatoire. Les anticorps monoclonaux, en revanche, ont généralement un profil de toxicité plus prévisible et favorable.^{6,20} Par ailleurs, des problèmes de toxicités additionnelles apparaissent notamment lors de l'utilisation de certains ITKs en combinaison avec des agents cytotoxiques.^{29,30}

En comparaison, peu d'agents ciblant des facteurs pro-angiogéniques ont fait l'objet d'une autorisation de mise sur le marché. De plus, les composés existants ciblent préférentiellement une famille de récepteurs ou de facteurs pro-angiogéniques, ce qui constitue un facteur limitant pour ces traitements. Le développement de composés pouvant inhiber la libération simultanée de plusieurs facteurs pro-angiogéniques pourrait constituer une approche prometteuse.

²⁹ L. Moserle, G. Jiménez-Valerio, O. Casanovas, *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 31-41.

³⁰ H. Gharwan, H. Groninger, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *13*, 209-27.

II. La thymidine phosphorylase

II.A. Activité physiologique de la TPase

Décrite pour la première fois en 1954 à partir de tissus de mammifères, la thymidine phosphorylase (TPase) a été identifiée comme une enzyme-clé de la voie de métabolisme des nucléosides pyrimidiques.³¹ En 1987, une « nouvelle » protéine, considérée comme capable de stimuler la croissance des cellules endothéliales, a été isolée d'un lysat plaquettaire humain.³² Elle a été alors nommée PD-ECGF (de l'anglais « platelet-derived endothelial cell growth factor »). Des travaux ultérieurs ont mis en évidence ses propriétés chimotactiques *in vitro* et angiogéniques *in vivo*.³³

Plus tard, diverses études ont révélé que PD-ECGF et la TPase d'*Escherichia coli* (EcTPase, décrite en 1958 par Razzell *et al.*³⁴) présentent des similitudes en termes de structure et d'activité.^{35,36} Une analyse plus poussée de la séquence d'acides aminés et de la structure tridimensionnelle de ces deux protéines a montré que PD-ECGF est en fait la TPase humaine (HuTPase).^{37,38} Cette enzyme, dont le rôle principal consiste en la phosphorylation de la thymidine et de la 2'-désoxyuridine, appartient à la famille des pyrimidines nucléosides phosphorylases (PYNPases), qui chez les mammifères est constituée de la TPase et de l'uridine phosphorylase (UPase). Dans les organismes primitifs, il existe également une enzyme capable de réaliser la phosphorylation des deux substrats, la PYNPase.

II.A.1. Localisation

Présente dans les cellules somatiques humaines et animales, la thymidine phosphorylase se retrouve également dans certains micro-organismes pathogènes ou non (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*...). C'est une enzyme intracellulaire, exprimée à la fois dans le cytoplasme et le noyau, et elle n'est pas sécrétée dans le milieu extracellulaire.

Très fortement exprimée dans le sang, c'est dans les plaquettes que l'activité de la TPase est la plus forte, ce qui suggère que les thrombocytes jouent un rôle important dans le métabolisme de la thymidine. Ce rôle pourrait avoir un lien avec leur fonction physiologique, à savoir les

³¹ M. Friedkin, D. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 245-56.

³² K. Miyazono, T. Okabe, A. Urabe, F. Takaku, C.-H. Heldin, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4098-103.

³³ F. Ishikawa, K. Miyazono, U. Hellman, H. Drexler, C. Wernstedt, K. Hagiwara, K. Usuki, F. Takaku, W. Risau, C. H. Heldin, *Nature* **1989**, *338*, 557-62.

³⁴ W. E. Razzell, H. G. Khorana, *Biochem. Biophys. Acta* **1958**, *28*, 562-6.

³⁵ K. Usuki, J. Saras, J. Waltenberger, K. Miyazono, G. Pierce, A. Thomason, C.-H. Heldin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 1311-6.

³⁶ A. Moghaddam, R. Bicknell, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12141-6.

³⁷ T. Furukawa, A. Yoshimura, T. Sumizawa, M. Haragushi, S. Akiyama, K. Fukui, M. Ishizawa, Y. Yamada, *Nature* **1992**, *356*, 668.

³⁸ G. Spraggon, D. Stuart, C. Ponting, C. Finnis, D. Sleep, Y. Jones, *J. Biol. Chem.* **1993**, *234*, 879-80.

phénomènes de réparation. En revanche, la présence de TPase dans le plasma et le sérum est probablement la conséquence de la dégradation plaquettaire ou de la régénération cellulaire.³⁹

La TPase a également été détectée dans la lymphe ainsi que dans de nombreux organes et tissus, avec des concentrations élevées au sein des cellules gliales, des cellules des glandes salivaires, du foie, de l'œsophage, du rectum, du cerveau, de la vessie, de la rate, des ganglions lymphatiques, des poumons, des ovaires et du placenta.³⁹ Dans ces tissus, les concentrations en enzyme sont particulièrement élevées dans les cellules constituant le stroma (macrophages, lymphocytes infiltrants, fibroblastes, cellules de Kupffer...).

Des concentrations importantes de TPase ont été relevées dans le placenta, où l'enzyme existe sous deux formes alternatives. La première est un variant d'épissage de 27 kDa de l'HuTPase, tandis que l'autre ne diffère que de quelques acides aminés par rapport à celle-ci.^{40,41} Lieu d'une angiogenèse importante à chaque cycle menstruel, l'endomètre est également un tissu où la TPase est présente en grandes quantités.³⁹

Enfin, on retrouve aussi la TPase dans le système nerveux central, où elle contribue au développement et à la régénération de celui-ci. Isolée en 1992 à partir de neurofibromes humains, elle est alors appelée gliostatine. Les trois appellations TPase, PD-ECGF et gliostatine peuvent être indifféremment rencontrées dans la littérature mais désignent toutes la même et seule enzyme. Ce dernier terme, gliostatine, est néanmoins réservé au contexte de la neurologie.

L'expression de la TPase n'est pas limitée aux sites présumés de l'angiogenèse, comme l'endomètre ou le placenta, puisqu'on la trouve aussi dans d'autres sites tels que l'épithélium de certains organes (au niveau du tube digestif en particulier). En outre, l'expression de la TPase dans certaines cellules immunitaires telles que les macrophages ou les lymphocytes est en accord avec une implication de l'enzyme dans les phénomènes pathologiques plus que dans les processus physiologiques.

II.A.2. Activité physiologique

La TPase catalyse la phosphorylation de la thymidine et de la 2'-désoxyuridine pour former leurs bases respectives ainsi que le α -2-désoxy-D-ribose-1-phosphate (2dR1P) (schéma 1). Bien qu'il existe une uridine phosphorylase chez l'homme, le catabolisme de la 2'-désoxyuridine est principalement assuré par la TPase.

Bien que la réaction de phosphorylation soit réversible, la fonction métabolique de la TPase semble être essentiellement catabolique. La réaction anabolique, beaucoup plus lente, est

³⁹ A. Bronckaers, F. Gago, J. Balzarini, S. Liekens, *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 903-53.

⁴⁰ M. R. Jackson, E. W. Carney, S. J. Lye, J. W. Ritchie, *Placenta* **1994**, *15*, 341-53.

⁴¹ K. Usuki, L. Norberg, E. Larsson, K. Miyazono, U. Hellman, C. Wernstedt, K. Rubin, C. H. Heldin, *Cell Reg.* **1990**, *1*, 577-84.

limitée par la faible concentration intracellulaire en 2dR1P, qui est rapidement métabolisé au sein de la cellule.⁴²

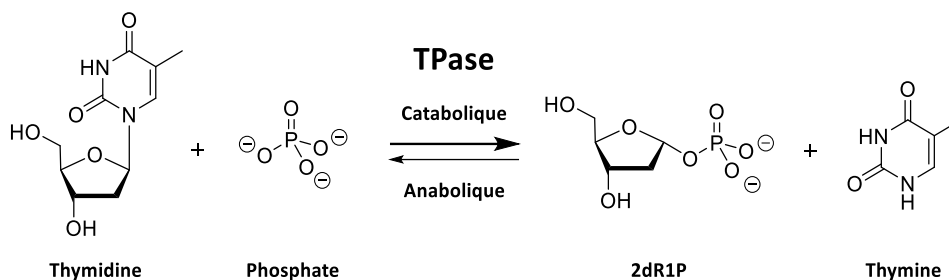


Schéma 1 : Réaction enzymatique catalysée par la TPase.

D'autre part, la TPase possède une activité désoxyribosyltransférase (schéma 2). Elle catalyse en effet le transfert d'un fragment désoxyribose d'un désoxynucléoside à une autre base pyrimidique.⁴³

Il s'agit donc d'une enzyme-clé dans le maintien de l'équilibre du pool nucléotidique. En effet, par phosphorylation des nucléosides issus notamment de la dégradation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou de l'acide ribonucléique (ARN), la TPase contrôle l'homéostasie des acides nucléiques. Les nucléotides sont indispensables à la bonne répllication et réparation de l'ADN. Un excès est mutagène alors qu'un apport insuffisant est létal.⁴⁴ L'importance de l'homéostasie en nucléotides est particulièrement visible dans les mitochondries où l'apport en nucléosides ne peut pas être compensé par la synthèse nucléotidique, comme cela se produit dans le noyau.

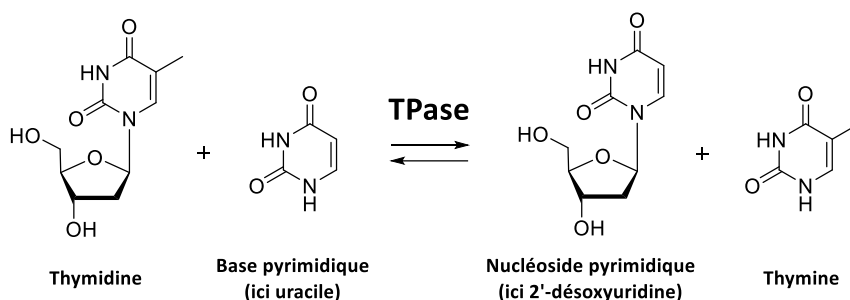


Schéma 2 : Activité désoxyribosyltransférase de la TPase

Comme nous l'avons précédemment évoqué, la TPase semble participer à l'action réparatrice des thrombocytes. En sécrétant de la thymidine, les plaquettes stimulent l'angiogenèse en augmentant la mobilité des cellules endothéliales et leur prolifération, permettant ainsi la régénération de la membrane endothéliale.⁴⁵

⁴² D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnson, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 35, 330-8.

⁴³ M. Zimmerman, J. Seidenberg, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2618-21.

⁴⁴ U. Hübscher, S. Spadari, *Physiol. Rev.* **1994**, 74, 259-304.

⁴⁵ G. Pula, E. Garonna, W. B. Dunn, M. Hirano, G. Pizzorno, M. Campanella, E. L. Schwartz, M. H. el Kouni, C. P.D. Wheeler-Jones, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, 30, 2631-8.

La TPase semble jouer un rôle dans le cycle menstruel et la gestation chez la femme puisque de forts taux de TPase ont été détectés dans l'endomètre et le placenta. L'enzyme suit un schéma de distribution caractéristique qui dépend de chaque phase du cycle menstruel : à mesure que le cycle progresse, l'expression de la TPase migre du stroma vers l'épithélium et est inversement corrélée à la concentration d'estradiol.^{46,47} L'enzyme interviendrait donc dans les processus angiogéniques associés à la décidualisation de l'endomètre. En outre, pendant le premier trimestre de grossesse, elle est retrouvée dans les trophoblastes, tout comme le VEGF, ce qui indique que ces deux facteurs jouent un rôle dans la gestation.⁴⁰

Une autre action physiologique de la TPase a été découverte dans le système nerveux central. La gliostatine, telle qu'elle est nommée dans ce cas, est un facteur neurotrophique ainsi qu'un inhibiteur de la prolifération gliale. Dans ce cas particulier, l'enzyme est d'abord excrétée par la cellule puis elle vient se lier à un récepteur cellulaire.⁴⁸ Elle semble participer à la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), au développement et à la régénération du système nerveux.⁴⁹

Une déficience en TPase peut être à l'origine d'une pathologie nommée encéphalopathie myo-neuro-gastrointestinale et désignée par l'acronyme MNGIE (de l'anglais « mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy »), comme nous allons le voir dans la section suivante.

II.A.3. TPase et MNGIE

La MNGIE est une maladie métabolique rare, de transmission autosomique récessive, associée à de multiples dommages dans l'ADN mitochondrial des muscles squelettiques. Bien que moins de 250 cas aient été recensés dans la littérature, son incidence est certainement sous-estimée.⁵⁰ En effet, cette pathologie est souvent mal reconnue par les cliniciens, notamment dans les cas les plus atypiques, qui la confondent avec d'autres syndromes (anorexie mentale, syndrome de la pince mésentérique, maladie de Whipple...). L'âge auquel se déclare la maladie est très variable, des cas ayant été rapportés de 5 mois à 65 ans. Elle est généralement diagnostiquée avant l'âge de 30 ans (en moyenne, 18 ans) et l'espérance de vie est d'environ 35 ans.⁵¹

Les premières manifestations de la maladie apparaissent entre 10 et 40 ans (le plus souvent avant 20 ans). La symptomatologie est progressive et dominée par des troubles gastro-intestinaux modérés à sévères (douleurs abdominales, satiété précoce, nausées, vomissements, diarrhées, pseudo-obstruction intestinale, dysphagie et gastroparésie) dus à des anomalies de la

⁴⁶ L. Zhang, I. Z. MacKenzie, M. C. Rees, R. Bicknell, *Endocrinology* **1997**, *138*, 4921-30.

⁴⁷ J. Fujimoto, S. Ichigo, H. Sakagushi, R. Hirose, T. Tamaya, *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 509-13.

⁴⁸ K. Asai, K. Nakanishi, I. Isobe, I. Eksiglu, A. Hirano, K. Hama, T. Miyamoto, T. Kato, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20311-6.

⁴⁹ K. Szigetti, N. Sule, A. M. Adesina, D. L. Armstrong, G. M. Saifi, E. Bonilla, M. Hirano, J. R. Lupski, *Ann. Neurol.* **2004**, *56*, 881-6.

⁵⁰ R. Cabrera-Pérez, J. Torres-Torronteras, F. Vila-Julià, F. J. Ortega, Y. Cámara, J. Barquinero, R. Martí, *Expert Opin. Orph. Drugs* **2015**, *3*, 1167-82.

⁵¹ C. Garone, S. Tadesse, M. Hirano, *Brain* **2011**, *134*, 3326-32.

motricité intestinale pouvant aboutir à un tableau de pseudo-obstruction intestinale chronique conduisant à la cachexie.

L'étude morphologique des muscles des personnes souffrant de la MNGIE révèle une faible proportion de fibres musculaires avec prolifération de leur mitochondrie, pouvant aller jusqu'au syndrome myogène. L'atteinte neurologique associée à la MNGIE est variable et peut comprendre une neuropathie périphérique sensitivomotrice, une ophtalmoplégie externe chronique progressive avec ou sans ptosis et une leuco-encéphalopathie diffuse.⁵² En revanche, une perte de fonction de la TPase ne provoque pas de dommages cérébraux tels que la prolifération gliale ou la dégénérescence neuronale.

D'autres troubles sont plus rarement observés, tels que des désordres métaboliques (hyperlactacidémie, hyperprotéïnorachie), une rétinopathie ou une cardiomyopathie.⁵³

Les patients souffrants de la MNGIE sont habituellement très minces et de petite taille, et décèdent souvent à la suite de complications provoquées par leur mauvais état nutritionnel et le dysfonctionnement de leur système gastro-intestinal.

La présence de thymine et parfois d'uracile dans les acides organiques urinaires est un premier élément de diagnostic. Celui-ci est généralement confirmé par un taux anormalement élevé de thymidine mais aussi de 2'-désoxyuridine dans le plasma et l'urine. Un autre paramètre de diagnostic est la réduction de l'activité de la TPase dans les lymphocytes et les tissus des malades. Dans un cas typique de MNGIE, l'activité enzymatique de la TPase correspond au maximum à 10 % de l'activité observée chez les individus sains.⁵⁰ Des cas de déficience partielle de l'enzyme ont été rapportés, mais dans ce cas la maladie ne se déclare que tardivement. En effet, ces patients conservant 10 à 15 % de l'activité TPase, les nucléosides s'accumulent moins rapidement dans l'organisme.⁵⁶ Ainsi, chez les porteurs asymptomatiques, une activité réduite de la TPase semble suffire à maintenir un taux faible de thymidine plasmatique.

La mutation responsable de la MNGIE a été localisée sur le chromosome 22q13.32 où est situé le gène de la TPase (TPPM). A ce jour, 83 mutations différentes de ce gène ont été associées à la MNGIE.⁵⁰ Néanmoins, selon certaines études, il semblerait que les mutations fonctionnelles sur le gène de la TPase ne soient pas suffisantes pour induire une MNGIE, puisque ces mutations se retrouvent aussi chez des individus sains.⁵⁴

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* montrent que l'excès systémique de thymidine et de 2'-désoxyuridine dans le plasma et les tissus des patients provoque un déséquilibre en désoxynucléosides triphosphates au sein des mitochondries. En particulier, un excès en thymidine triphosphate et un défaut de désoxycytidine triphosphate ont été rapportés. S'ensuit un dysfonctionnement des mécanismes de réplication de l'ADN mitochondrial conduisant

⁵² M. L. Valentino, R. Martí, S. Tadesse, L. C. Lopez, J. L. Manes, J. Lyzak, A. Hahn, V. Carelli, M. Hirano, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3410-4.

⁵³ A. Benureau, P. Meyer, O. Maillet, N. Leboucq, S. Legra, E. Jeziorski, S. Fournier-Favre, C. Jeandel, P. Gaignard, A. Slama, F. Rivier, A. Roubertie, M. Carneiro, *Arch. Pédiatrie* **2014**, *21*, 1370-4.

⁵⁴ Y. Kumagai, Y. Sugiura, H. Sugeno, Y. Takebayashi, S. Takenoshita, T. Yamamoto, *Intern. Med.* **2006**, *45*, 443-6.

in fine à diverses altérations de ce dernier (déplétion, délétions et mutations ponctuelles). La chaîne respiratoire mitochondriale est alors perturbée, provoquant le phénotype clinique de la maladie.

Chez les individus sains, l'enzyme n'est que très peu exprimée dans les cellules des muscles squelettiques, qui sont pourtant les tissus les plus touchés par la MNGIE.⁵⁵ Ce constat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle les symptômes de la maladie ne seraient pas directement liés à l'absence d'activité de la TPase mais plutôt à une accumulation toxique des deux métabolites thymidine et 2'-désoxyuridine (figure 6).

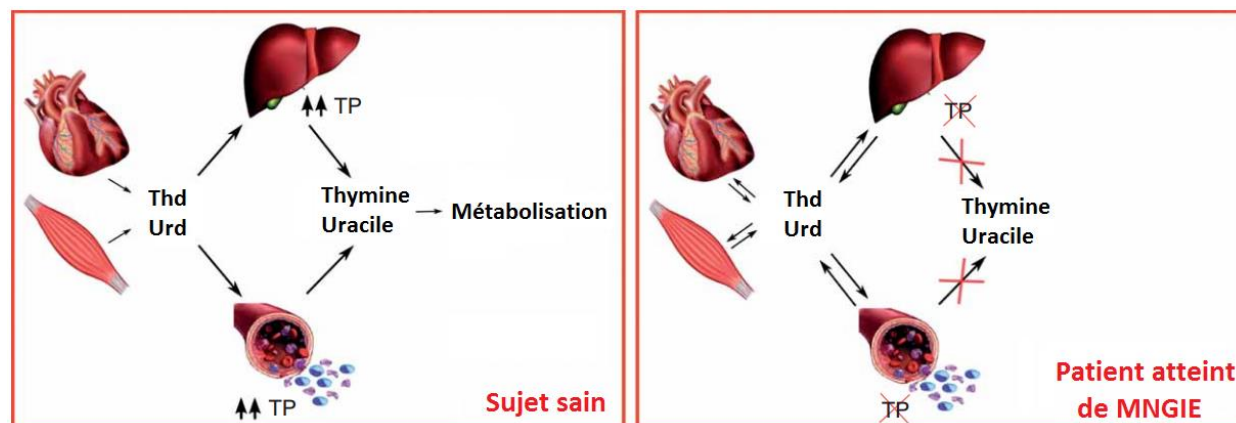


Figure 6 : Mécanisme d'accumulation des nucléosides dans le cadre de la MNGIE (d'après Cabrera-Pérez *et al.*⁵⁰).

Bien que la perte d'activité de la TPase n'entraîne pas de forte atteinte du système nerveux central, une baisse d'activité de la TPase pourrait induire une altération de la BHE. Celle-ci provoquerait une fragilité cérébrale à l'origine d'infections, d'inflammations, de maladies dégénératives et d'autres maladies nerveuses.⁵⁶ Par principe de précaution, dans l'optique d'un développement d'inhibiteurs de la TPase, il faudra veiller à ce que ceux-ci ne franchissent pas la BHE.

En revanche, l'inhibition de la TPase pourrait devenir problématique à cause d'un déséquilibre de l'homéostasie des acides nucléiques qu'elle assure. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la TPase à des fins thérapeutiques pourrait avoir des conséquences sur la régulation du pool nucléotidique et entraîner des symptômes similaires à ceux observés dans le cadre de la MNGIE. Il est possible de prévoir un moyen d'éliminer par épuration du plasma la thymidine et l'uridine qui risqueraient de s'accumuler.⁵⁷ Dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale, limitée dans le temps, l'utilisation de tels inhibiteurs reste ainsi envisageable.

⁵⁵ A. Yoshimura, Y. Kuwazuru, T. Furukawa, H. Yoshida, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1034, 107-13.

⁵⁶ M. Hirano, R. Martí, J. J. G. M. Verschuuren, A. Buchman, I. Hirano, S. Tadesse, A. B. van Kuilenburg, A. H. van Gennip, B. J. H. M. Poorthuis, *Ann. Neurol.* **2005**, 58, 649-52.

⁵⁷ M. Hirano, C. Lagier-Tourenne, M. L. Valentino, R. Martí, Y. Nishigaki, *Gene* **2005**, 354, 152-6.

II.B. TPase et cancer

II.B.1. Surexpression dans les cancers et contrôle transcriptionnel

La surexpression de la TPase a été observée dans le cadre de nombreuses tumeurs solides, tels que le carcinome épidermoïde oral et les cancers de l'œsophage, du sein, de l'ovaire, de l'endomètre, de l'estomac, du pancréas, du rein, du poumon, du côlon, du rectum, de la vessie et du col utérin.⁸

Des taux élevés en enzyme sont ainsi mesurés dans les tissus tumoraux mais aussi dans le plasma des patients. Toutefois, les cellules tumorales ne sont pas les seules à surexprimer la TPase, puisque c'est également le cas des cellules endothéliales, des fibroblastes, des lymphocytes et en particulier des macrophages infiltrant la tumeur (TAMs). Des concentrations importantes en TPase ont été relevées dans les TAMs de nombreux cancers (mélanome, glioblastome, astrocytome, cancer de l'estomac, du sein, du colon, de l'endomètre utérin et de la prostate).³⁹

Au-delà de son expression constitutive au sein des cellules tumorales et des TAMs, la TPase peut être surexprimée *via* l'activation de son gène par de nombreux facteurs transcriptionnels. Le gène TYMP possède de nombreux sites de fixation pour divers facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, un cluster de 6 à 9 sites de fixation du facteur de transcription SP1 est situé juste après le site d'initiation. SP1 est également impliqué dans la transcription du VEGF, ce qui va de pair avec la co-expression TPase/VEGF qui a été rapportée dans de nombreux cas de cancers.³⁹ La séquence promotrice du gène TYMP contient en outre des sites ISRE (élément de réponse stimulé par les interférons) et GAS (site activé par l'interféron gamma). Des travaux *in vitro* ont montré que les interférons α , β et γ (IFN- α , - β et - γ) sont capables de promouvoir l'expression de la TPase par activation de ces séquences. Ce mécanisme est certainement renforcé par des processus post-transcriptionnels. En particulier, l'IFN- γ semble exacerber la stabilité de l'ARN messager codant pour la TPase.^{58,59} D'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et les interleukines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) stimulent l'expression de la TPase. L'action du TNF- α s'effectue par l'activation de plusieurs facteurs transcriptionnels, dont SP1 et NF κ B (« Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »).⁶⁰

Certains traitements antitumoraux, tels que les rayons-X ou la chimiothérapie (à base de paclitaxel, docetaxel, doxorubicine, oxaliplatine, cyclophosphamide et mitomycine C, entre autres) provoquent une augmentation du niveau de TPase dans les cellules tumorales. Cette régulation positive est probablement une conséquence indirecte de ces traitements, puisque ceux-ci induisent la production de cytokines qui à leur tour déclenchent une surexpression de la TPase.

Enfin, des conditions de stress dans le microenvironnement tumoral peuvent aussi être à l'origine d'une expression de la TPase. Ainsi, l'hypoxie, l'hypoglycémie et un faible pH sont des

⁵⁸ E. L. Schwartz, E. Wan, F. S. Wang, N. Baptiste, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1551-7.

⁵⁹ H. Goto, K. Kohno, S. Sone, S. Akiyama, M. Kuwano, M. Ono, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 469-73.

⁶⁰ I. V. Bijnsdorp, M. de Bruin, A. C. Laan, M. Fukushima, G. J. Peters, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2008**, *27*, 681-91.

facteurs qui augmentent le niveau d'expression et l'activité de l'enzyme.⁶¹ Cela expliquerait pourquoi on retrouve des taux particulièrement élevés de TPase dans les cellules tumorales situées à proximité de zones nécrotiques ou après occlusion de la vascularisation tumorale.

Il semble peu probable que la surexpression de la TPase dans les cellules tumorales puisse être provoquée par une mutation de son gène. Les taux élevés de TPase également relevés dans les cellules non malignes du microenvironnement tumoral suggèrent que cette surexpression est plus probablement la conséquence du stress et de l'inflammation caractérisant ce type d'environnement plutôt que de mutations génétiques.⁸ L'observation de la surexpression de TPase dans certaines maladies inflammatoires chroniques non malignes comme l'arthrite ou le psoriasis conforte cette hypothèse.^{62,63}

II.B.2. Marqueur de la progression tumorale et du pronostic vital

D'après les résultats de nombreuses études, l'expression de la TPase dans les cellules tumorales est généralement corrélée à une plus grande densité tumorale de microvaisseaux, un stade plus avancé de la tumeur et à une augmentation des métastases (figure 7).

En outre, cette surexpression est le plus souvent associée à un mauvais pronostic vital, bien que les constats divergent pour certains cancers. Par exemple, sept études du cancer du côlon sur neuf ont associé l'expression de la TPase à un mauvais pronostic (figure 8), les deux autres, dont celle de Saito *et al.*, montrant l'inverse.⁶⁴ Ces observations contradictoires sont probablement causées par des différences entre les études au niveau du type histologique de cancer, du stade de la maladie, du nombre de patients examinés et du protocole employé pour mesurer le taux de TPase.³⁹

Une concentration élevée en TPase dans d'autres cellules et tissus peut être également un marqueur de la progression de la maladie. Dans le cas du cancer du col de l'utérus, le taux plasmatique en TPase est corrélé au stade clinique, à la taille de la tumeur, aux métastases dans les ganglions lymphatiques et à un très mauvais pronostic. Chez des patients atteints de carcinome épidermoïde de l'œsophage, c'est la concentration sanguine qui est associée à l'invasivité et à la réponse au traitement antitumoral.³⁹

Enfin, dans les cellules infiltrant la tumeur telles que les TAMs, l'expression de la TPase semble être corrélée à la densité de microvaisseaux ainsi qu'à l'invasivité de la tumeur. L'infiltration des macrophages est liée à une angiogenèse accrue puisque ceux-ci ne peuvent accéder qu'à des sites de la tumeur qui ont déjà fait l'objet d'une néo-angiogenèse. En outre, plusieurs études cliniques et précliniques ont montré que les TAMs favorisent la progression du cancer et qu'ils

⁶¹ L. Griffiths, G. U. Dachs, R. Bicknell, A. L. Harris, I. J. Stratford, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 570-2.

⁶² K. Ikuta, Y. Waguri-Nagaya, K. Kikuchi, T. Yamagami, M. Nozaki, M. Aoyama, K. Asai, T. Otsuka, *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14*, R87.

⁶³ Y. Toyoda, S. Tabata, J. Kishi, T. Kuramoto, A. Mitsunashi, A. Saijo, H. Kawano, H. Goto, Y. Aono, M. Hanibuchi, H. Horikawa, T. Nakajima, T. Furukawa, S. Sone, S. Akiyama, Y. Nishioka, *Arthritis & Rheum.* **2014**, *66*, 560-8.

⁶⁴ S. Saito, N. Tsuno, H. Nagawa, E. Sunami, J. Zhengxi, T. Osada, J. Kitayama, Y. Shibata, T. Tsuruo, T. Muto, *Cancer* **2000**, *88*, 42-9.

sont signe de mauvais pronostic.^{65,66} Folkman suggéra que les cellules tumorales pouvaient stimuler l'angiogenèse par le recrutement ou l'activation des macrophages, responsables de la libération de nombreux facteurs de croissance, de protéases, de chimiokines et de cytokines.⁶⁷ Ces cytokines inflammatoires produites par les TAMs augmentent notamment l'expression de la TPase, à la fois dans les cellules tumorales et dans les cellules du stroma.

II.B.3. Activité pro-angiogénique

L'activité pro-angiogénique de la TPase a été prouvée à plusieurs reprises et s'effectue *via* deux mécanismes : l'activation de la migration des cellules endothéliales et la production de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral.

La TPase induit la migration cellulaire ainsi que la formation de vaisseaux *in vitro*, et stimule également l'angiogenèse dans plusieurs modèles *in vivo* ou *ex vivo*, dont le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de poulet.^{33,68}

De nombreux travaux ont mis en évidence l'effet de la TPase et du 2-désoxy-D-ribose (2dR) sur l'expression et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques au niveau des tumeurs. L'analyse de nombreux médiateurs solubles dans le stroma tumoral a montré que la TPase est souvent coexprimée avec des molécules impliquées dans les processus inflammatoires ou angiogéniques (MMPs, VEGF, TNFs, ILs et HIFs entre autres).^{69,70} A titre d'exemple, une corrélation entre la surexpression de MMP-1 ainsi que d'autres métalloprotéases (en particulier MMP-2, 3, 7 et 9) et celle de la TPase a été mise en évidence dans plusieurs études. Ainsi, dans le cancer du sein, l'expression de la TPase est corrélée à celle de MMP-9 et, dans le cancer de la vessie, à celles de MMP-1 et MMP-9.³⁹

L'étude de Bijnsdorp *et al.*⁷¹ sur des cellules endothéliales de type « human umbilical vein endothelial cell » (HUVEC) propose que l'action pro-angiogénique de la TPase s'exerce par la libération d'une combinaison de facteurs pro-angiogéniques, en particulier IL-8, bFGF et TNF- α . En effet, l'inhibition d'un seul de ces facteurs pro-angiogéniques par des anticorps spécifiques provoque la totale inhibition de la migration et de l'invasion des HUVECs. Ces effets coopératifs avaient aussi été relevés par Rofstad *et al.*⁷² qui ont travaillé sur des xénogreffes de mélanomes. Ces derniers ont montré que l'angiogenèse développée par ces tumeurs pouvait être arrêtée par des anticorps ciblant un seul facteur pro-angiogénique, cette fois parmi le VEGF, l'IL-8 ou le bFGF.

⁶⁵ T. Hagemann, J. Wilson, F. Burke, H. Kulbe, N. F. Li, A. Pluddemann, K. Charles, S. Gordon, F. R. Balkwill, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 5023-32.

⁶⁶ J. W. Pollard, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 71-8.

⁶⁷ J. Folkman, *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1091-2.

⁶⁸ M. Haragushi, K. Miyadera, K. Uemura, T. Sumizawa, T. Furukawa, K. Yamada, S. Akiyama, Y. Yamada, *Nature* **1994**, *368*, 198.

⁶⁹ S. Liekens, A. Bronckaers, M. J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1555-67.

⁷⁰ M. De Bruin, O. H. Temmink, K. Hoekman, H. M. Pinedo, G. J. Peters, *Cancer Ther.* **2006**, *4*, 99-124.

⁷¹ I. V. Bijnsdorp, F. Capriotti, F. A. E. Kruij, N. Losekoot, M. Fukushima, A. W. Griffioen, V. L. Thijssen, G. J. Peters, *Brit. J. Cancer* **2011**, *104*, 1185-92.

⁷² E. K. Rofstad, E. F. Halsor, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4932-8.

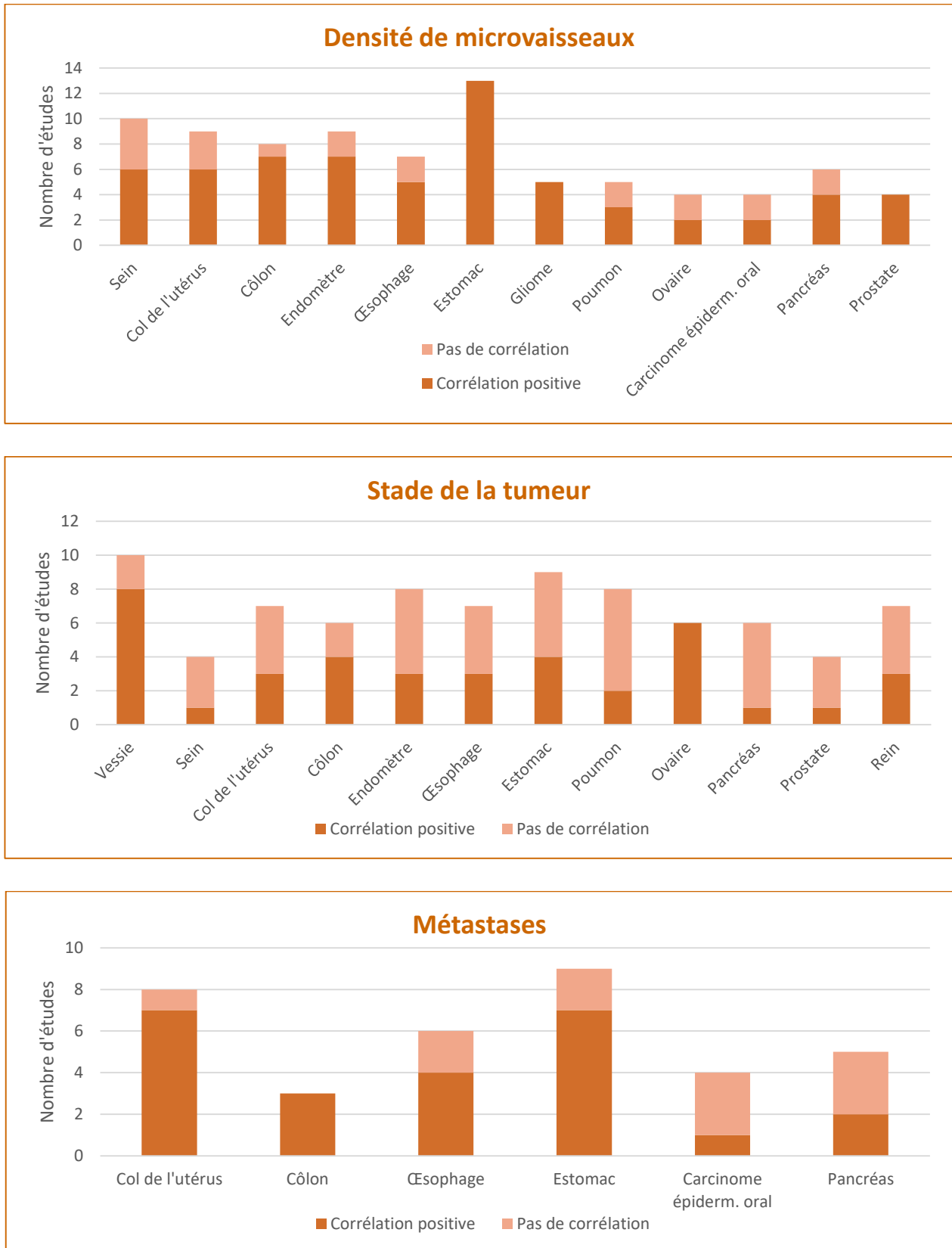


Figure 7 : Eléments de corrélation entre niveau d'expression de la TPase et densité en microvaisseaux, stade de la tumeur et métastases.³⁹

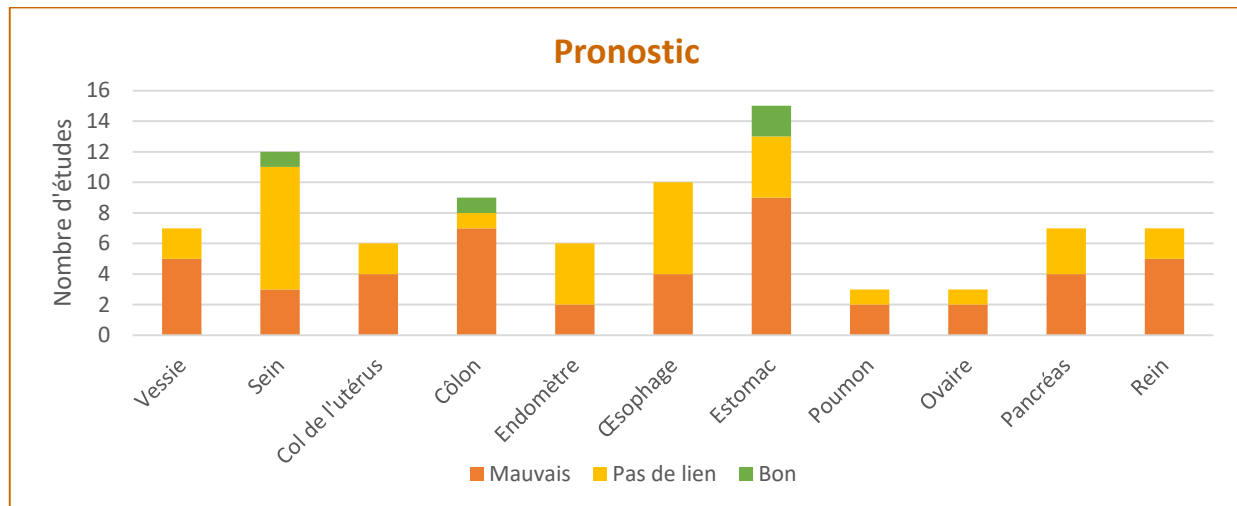


Figure 8 : Eléments de corrélation entre niveau d'expression de la TPase et pronostic vital.³⁹

Bien qu'observée à de multiples reprises, la corrélation entre la sécrétion du VEGF et l'expression de la TPase reste controversée.^{73,74} Une étude sur des cellules humaines de carcinome de la vessie (RT112) a montré que l'activité de la TPase en conditions hypoxiques augmente le taux de facteur induit par l'hypoxie HIF-1 α , conduisant ainsi à la sécrétion de VEGF, dont la transcription est connue pour être dirigée par ce facteur hypoxique.⁷⁴ Toutefois, les travaux plus récents de Wu *et al.*⁷⁵ ont mis en évidence un lien différent entre le VEGF, la TPase et les deux principaux régulateurs de l'hypoxie chez les mammifères, HIF-1 α et HIF-2 α . Leurs résultats suggèrent que l'apport d'oxygène par les néovaisseaux produits à la suite d'un switch angiogénique entraîne une diminution de HIF-1 α et de la production de VEGF ainsi qu'une augmentation de l'expression de HIF-2 α . Cette dernière provoque alors l'activation de la TPase, dont l'action permet le maintien de l'angiogenèse. Ainsi, le VEGF et la TPase semblent avoir des rôles complémentaires en permettant respectivement l'initiation et le maintien de l'angiogenèse.

La libération de ces différents facteurs pro-angiogéniques est due à l'action phosphorolytique de l'enzyme. La TPase ne pouvant être sécrétée hors de la cellule, elle a besoin d'un médiateur pour agir sur les cellules endothéliales et celles du microenvironnement tumoral. Le 2dR, issu de la déphosphorylation du 2dR1P, possède une action chimotactique *in vitro* ainsi qu'une activité angiogénique *in vivo*, et est certainement le médiateur de la TPase. Contrairement à la TPase, le 2dR est capable de traverser la paroi cellulaire.

Dans les zones hypoxiques de la tumeur, l'ADN de cellules nécrotiques est dégradé, libérant ainsi de la thymidine qui est assimilée par les cellules environnantes. Ces cellules surexprimant la TPase, la thymidine est rapidement convertie en thymine et 2dR1P. Contrairement à la thymine qui peut s'accumuler dans le cytoplasme, le 2dR1P est rapidement métabolisé en 2dR par déphosphorylation ou en 2-désoxyribose-5-phosphate (2dR5P) par la phosphopentomutase (schéma 3).

⁷³ K. A. Hotchkiss, A. W. Ashton, E. L. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 19272-9.

⁷⁴ N. S. Brown, E. H. Streeter, A. Jones, A. L. Harris, R. Bicknell, *Br. J. Cancer* **2005**, 92, 1696-701.

⁷⁵ X. H. Wu, C. Quian, K. Yuan, *Chin. Med. J.* **2011**, 124, 11-8.

Le 2dR et le 2dR5P sont des sucres réducteurs dont les capacités de glycation protéique sont connues.⁷⁶ Ainsi, le ribose sous forme ouverte se lie par sa fonction aldéhyde à un groupe amino d'une protéine (généralement une lysine) au cours d'une réaction non enzymatique appelée réaction de Maillard.⁷⁷ Cela produit une base de Schiff, qui peut se réarranger en α -hydroxycétone (ou produit d'Amadori), un intermédiaire instable qui va spontanément s'oxyder en présence d'ions métalliques (Cu^{2+} ou Fe^{3+}) et d'oxygène moléculaire pour produire un composé dicarboxylé ainsi qu'un radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ce radical est le précurseur de la formation d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROSs, de l'anglais « reactive oxygen species »). En effet, la superoxyde dismutase se charge de convertir le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui à son tour va former un radical hydroxyle, espèce particulièrement toxique, *via* la réaction de Fenton (schéma 3).

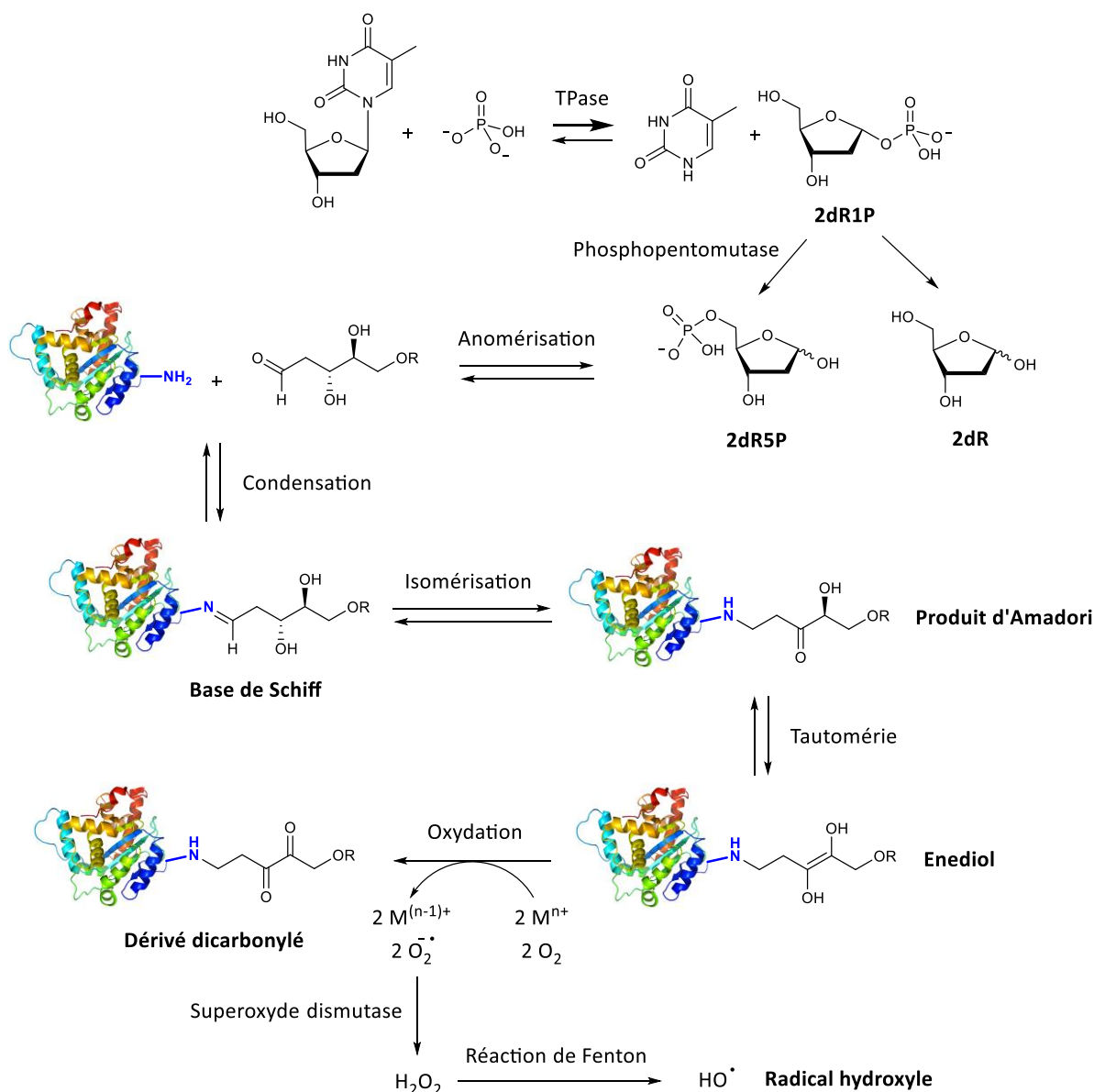


Schéma 3 : Mécanismes de formation des PTGs et des ROSs (d'après Brown *et al.*⁷⁷).

⁷⁶ I. Syrový, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1994**, *28*, 115-21.

⁷⁷ N. S. Brown, A. Jones, C. Fujiyama, A. L. Harris, R. Bicknell, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6298-302.

L'existence de ce stress oxydant corrélé à la TPase est en accord avec la co-expression de cette enzyme avec l'hème-oxygénase 1 (HO-1) dans les cellules du microenvironnement tumoral.⁷⁷ HO-1 est une enzyme recrutée lors de la présence de radicaux oxygénés et est pour cette raison un marqueur biologique classique du stress oxydatif. En effet, elle diminue le stress oxydatif cellulaire en faisant baisser le taux d'hème pro-oxydant, qu'elle dégrade en monoxyde de carbone, en fer et en biliverdine. Cette dernière est ensuite transformée en bilirubine, un antioxydant.⁷⁸ La surexpression de HO-1 peut être induite par l'hypoxie, certaines cytokines et divers facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. Par ailleurs, on a attribué des propriétés pro-angiogéniques à HO-1, principalement *via* le monoxyde de carbone et la biliverdine qu'elle génère.³⁹

D'autres métabolites de la réaction catabolique de la TPase ont une activité pro-angiogénique, tels que l'acide β -amino-iso-butyrique (un produit de dégradation de la thymine) ou le 2dR1P. Toutefois, ces effets semblent anecdotiques en comparaison de ceux induits par le 2dR.³⁹

Comme nous allons le voir, la présence de produits terminaux de glycation (PTGs, ou AGEs pour « Advanced Glycation End-products ») et de ROSs provoquent la libération de facteurs pro-angiogéniques effecteurs de l'activation, de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Ces deux mécanismes expliquent la néo-angiogenèse induite par le 2dR.

II.B.3.a. Les produits terminaux de glycation

Les PTGs sont des protéines ayant subi une glycation dont l'accumulation conduit à un dysfonctionnement biologique, en particulier celui de l'endothélium. Ils peuvent se lier à un certain nombre de récepteurs, dont le récepteur RAGE (« receptor for AGEs »), présent à la surface de nombreux types cellulaires (hépatocytes, cellules endothéliales, monocytes, neurones et cellules musculaires lisses). Le récepteur RAGE est responsable de la transduction du signal et peut ainsi activer de nombreuses voies de signalisation impliquées dans les phénomènes inflammatoires et la migration, la survie et la prolifération cellulaire. Il active notamment des cascades de signalisation *via* l'activation d'effecteurs cellulaires comme le facteur de transcription NF κ B ou la protéine partenaire ERK (« extracellular signal-regulated kinase »), ce qui aboutit à la libération de facteurs pro-angiogéniques (schéma 4).⁷⁹ A titre d'exemple, d'après les travaux de Ko *et al.*,⁸⁰ l'activation de RAGE par les PTGs provoque la phosphorylation de protéines de type ERK, qui conduit à une surexpression des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9.

En plus d'activer des voies de signalisation sous-jacentes au récepteur RAGE, le 2dR peut interférer avec l'activité de protéines impliquées dans la régulation du stress oxydant, comme le glutathion (GSH). Ce peptide est un des principaux moyens de défense intracellulaires contre le stress oxydant. Lors d'études *in vitro*, il a été montré que le 2dR est capable de faire baisser

⁷⁸ R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, B. N. Ames, *Science* **1987**, 235, 1043-6.

⁷⁹ J. Xie, J. D. Méndez, V. Méndez-Valenzuela, M. Montserrat Aguilar-Hernández, *Cell. Signal.* **2013**, 25, 2185-97.

⁸⁰ S.-Y. Ko, H.-A. Ko, T.-M. Shieh, W.-C. Chang, H.-I. Chen, S.-S. Chang, I.-H. Lin, *Plos One* **2014**, 9, e110542.

le taux de GSH et d'inhiber sa biosynthèse dans divers types cellulaires.⁸¹ Deux mécanismes semblent être impliqués dans ce processus de régulation (schéma 4). Le premier correspond à la glycation de la glutamate cystéine ligase (GCL), l'enzyme qui catalyse une étape de la synthèse du GSH.⁸² Récemment, Backos *et al.* ont montré que le 2dR peut se lier de manière covalente à la GCL, provoquant ainsi une baisse de son activité enzymatique potentiellement à l'origine d'une diminution du taux de GSH.⁸³ Dans le second mécanisme qui semble être à l'œuvre, le 2dR se conjuguerait cette fois directement sur le glutathion et réduirait significativement ses propriétés antioxydantes.⁸³ Cette réaction déjà observée dans le cas du ribose et du glucose, pourrait également s'effectuer avec le 2dR.^{84,85} Tous ces processus induisant une diminution du taux de GSH, ils participent à la génération d'un stress oxydatif important qui est l'autre médiateur majeur de l'action pro-angiogénique du 2dR. Ils pourraient, en outre, être auto-entretenus puisque le GSH est aussi un moyen de défense contre la glycation des protéines.

II.B.3.b. Les espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène et la capacité d'un système biologique à détoxifier ces intermédiaires réactifs. Ce déséquilibre peut conduire à des effets toxiques car les radicaux et les peroxydes qui sont produits vont endommager des composants cellulaires vitaux tels que les protéines et l'ADN. Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore tout à fait établis, la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par la TPase et le 2dR va provoquer la libération de plusieurs facteurs pro-angiogéniques, tels que l'IL-8, le VEGF et des métalloprotéases (MMP-1, 2 et 9).^{77,86}

Le principal mécanisme d'action pro-angiogénique du stress oxydant fait intervenir la voie du VEGF (schéma 4). La stimulation de cette voie de signalisation par les ROS dans divers types cellulaires, dont les cellules endothéliales, est un phénomène connu qui s'effectue à la fois par activation du récepteur VEGFR2 et par stabilisation du facteur HIF-1 α .⁸⁷ D'une part, les produits d'oxydation générés par le stress oxydant, tels que les phospholipides peroxydés, semblent capables d'activer directement le VEGFR2, et d'autre part, la stabilisation de HIF-1 α entraîne une surexpression du VEGF aboutissant *in fine* à une activation de ses récepteurs.

⁸¹ M. M. Schmidt, H. Greb, H. Koliwer-Brandl, S. Kelm, R. Dringen, *Neurochem. Res.* **2010**, *35*, 1848-56.

⁸² C. C. Franklin, D. S. Backos, I. Mohar, C. C. White, H. J. Forman, T. J. Kavanagh, *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 86-98.

⁸³ D. S. Backos, K. S. Fritz, D. G. McArthur, J. K. Kepa, A. M. Donson, D. R. Petersen, N. K. Foreman, C. C. Franklin, P. Reigan, *Neurochem. Res.* **2013**, *38*, 1838-49.

⁸⁴ C. Januel, L. B. Fay, D. Ruggiero, M. Lagarde, E. Vericel, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1620*, 125-32.

⁸⁵ M. D. Linetsky, E. V. Shipova, R. D. Legrand, O. O. Argirov, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1724*, 181-93.

⁸⁶ G.-Y. Liou, P. Storz, *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 479-96.

⁸⁷ C. Sanhuesa, S. Wehinger, J. C. Bennett, M. Valenzuela, G. I. Owen, A. K. G. Quest, *Molecular Cancer* **2015**, *14*:198.

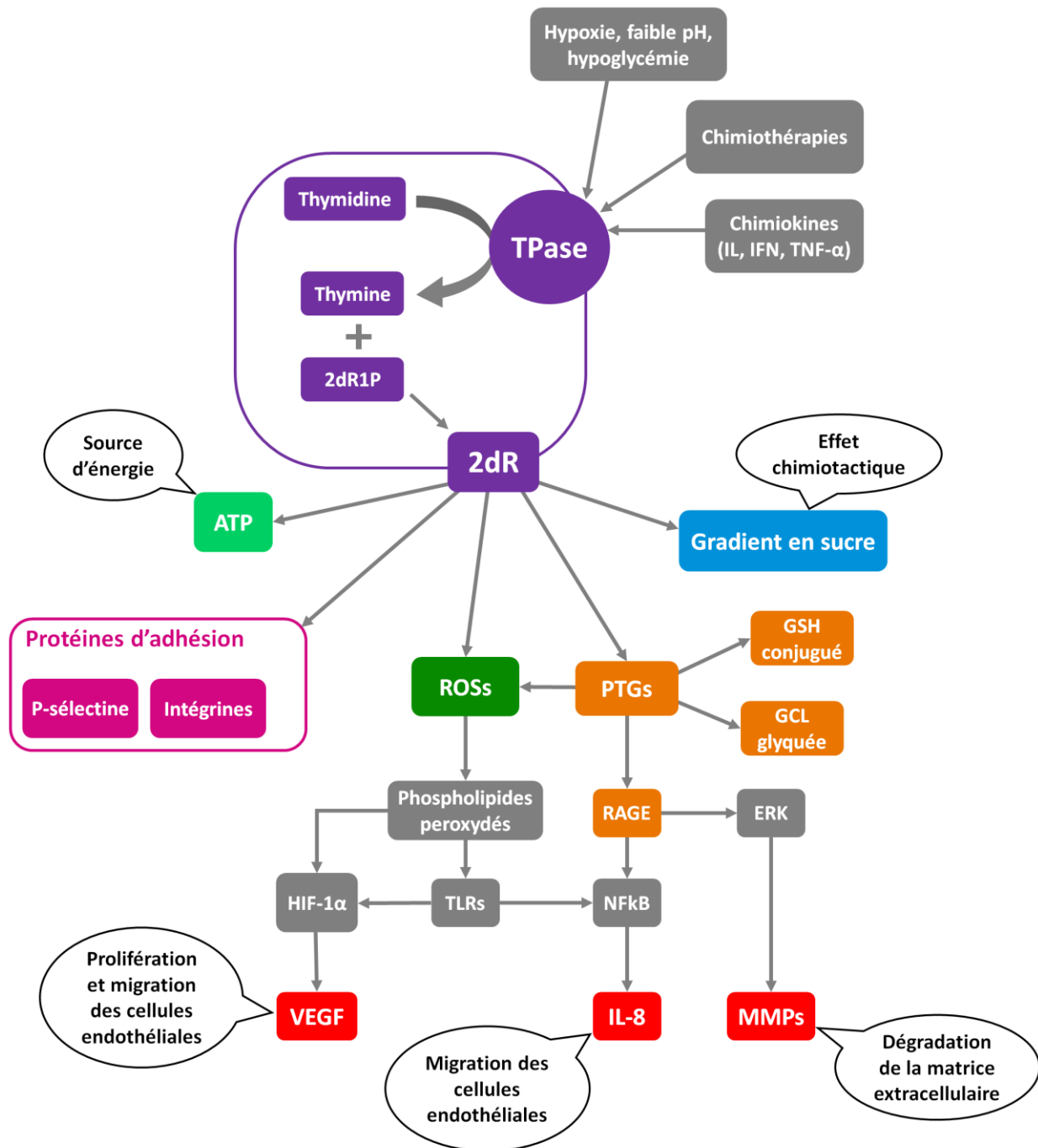


Schéma 4 : Mécanismes de l'activité pro-angiogénique de la TPase.

Le stress oxydant semble toutefois avoir aussi une action pro-angiogénique ne faisant pas intervenir le VEGF. En effet, les produits issus de l'oxydation des phospholipides conduisent à la formation de divers métabolites ainsi qu'à des modifications post-traductionnelles à l'origine d'adduits protéiques, tels que les ω -carboxyalkylpyrroles. Ces différents produits constituent des ligands pour plusieurs récepteurs de type Toll (TLRs) impliqués, entre autres, dans les voies de signalisation de l'angiogenèse (schéma 4).^{87,88} L'activation du récepteur TLR4 est responsable par exemple de l'activation du facteur de transcription nucléaire NFκB. Cette activation pourrait également s'effectuer d'une manière plus directe, *via* l'oxydation réversible par les

⁸⁸ Y.-W. Kim, T. V. Byzova, *Blood* **2016**, 123, 625-31.

ROSs de phosphatases régulant certaines cascades de signalisation.⁸⁶ Le promoteur de IL-8 possédant un site de liaison pour le facteur NFκB, ce dernier semble intervenir dans la régulation de ce facteur pro-angiogénique. Tabata *et al.* ont récemment montré que les cellules tumorales surexprimant la TPase activent davantage ce facteur de transcription que les cellules non transfectées.^{89,90} L'ajout d'antioxydants inhibe cet effet, ce qui confirme que le stress oxydant est à l'origine de l'activation de voies de signalisation aboutissant à la translocation de NFκB.

Pour finir, des travaux ont aussi montré que le récepteur TLR2, un autre récepteur de type Toll, régule l'expression de HIF-1α. Le mécanisme d'action des adduits générés par l'oxydation des phospholipides semble donc en partie relié à la voie du VEGF.⁸⁸

II.B.3.c. Autres mécanismes

Le 2dR pourrait être une source d'énergie importante pour les cellules endothéliales et ainsi induire leur migration par formation de pseudopodes. Après phosphorylation du 2dR par la phosphoribomutase, le 2dR5P formé peut alors être converti en G3P (glycéraldéhyde-3-phosphate) par la désoxyribosephosphate aldolase, qui va ensuite entrer dans la glycolyse pour former de l'ATP (schéma 5).⁹¹ Une molécule de 2dR génère ainsi deux molécules d'ATP. Cette série de réactions enzymatiques a été identifiée chez la bactérie *Bacillus Cereus* mais aucun mécanisme similaire n'a encore été établi dans la cellule eucaryote. La migration cellulaire induite par le 2dR pourrait ainsi s'expliquer par l'effet chimiotactique de ce dernier. Des travaux ont en effet montré que les cellules endothéliales migraient vers les sucres présents dans le milieu extracellulaire, qui sont des sources d'énergie facilement accessibles. La production localisée de 2dR et sa diffusion dans le microenvironnement tumoral créerait un gradient de concentration en sucre à l'origine d'une migration cellulaire (schéma 4).⁹²

Par ailleurs, la TPase et le 2dR sont impliqués dans la migration des cellules endothéliales par une voie de signalisation faisant intervenir les intégrines (schéma 4). Ces protéines transmembranaires favorisent les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire en activant un grand nombre de voies de signalisation (attachement, migration, adhésion, prolifération, survie...).⁹³ L'association d'une intégrine à son ligand extracellulaire forme une zone d'adhésion au niveau de laquelle il y a recrutement de protéines comme la kinase FAK (« focal adhesion kinase »). L'autophosphorylation de cette dernière est un des processus initiant la migration cellulaire. Divers travaux ont fait le lien entre l'autophosphorylation de FAK et l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire. Ainsi, l'activation de la voie FAK/Akt-mTOR-p70/S6 semble être un des mécanismes par lesquels la

⁸⁹ S. Tabata, R. Ikeda, M. Yamamoto, T. Furukawa, T. Kuramoto, Y. Takeda, K. Yamada, M. Haragushi, Y. Nishioka, S. Sone, *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 895-902.

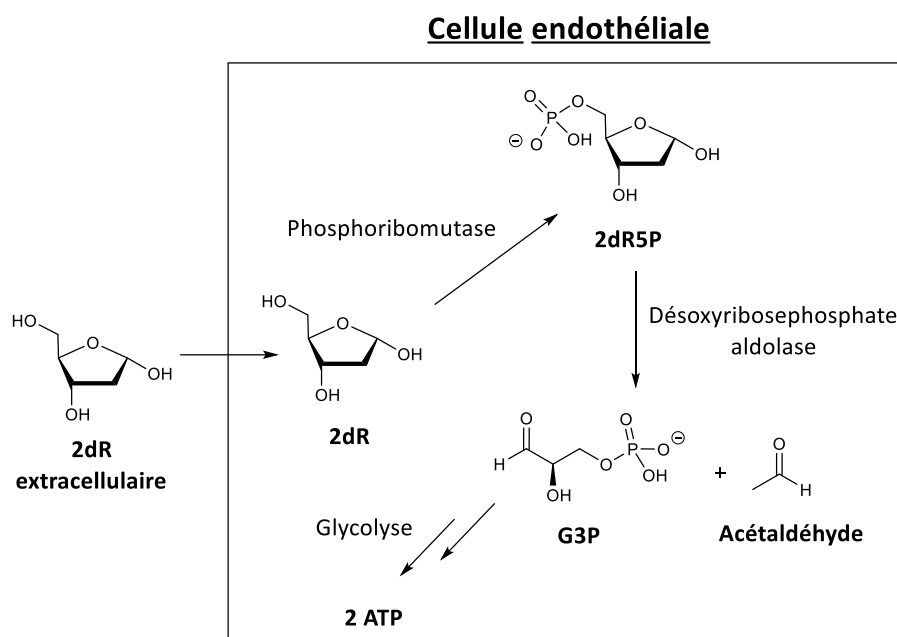
⁹⁰ S. Tabata, R. Ikeda, M. Yamamoto, S. Shimaoka, N. Mukaida, Y. Takeda, K. Yamada, T. Soga, T. Furukawa, S. Akiyama, *Oncotarget* **2014**, *5*, 10473-85.

⁹¹ S. Sengupta, L. A. Sellers, H. B. Matheson, T. D. Fan, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 219-31.

⁹² T. Vogel, D. A. Blake, D. R. Wilkhart, N.-H. Guo, V. S. Zabrenetzky, D. W. Roberts, *J. Cell Physiol.* **1993**, *157*, 359-66.

⁹³ F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028-32.

phosphorylation de FAK aboutit à la migration des cellules endothéliales.^{94,95} Une étude de Hotchkiss *et al.*⁷³ a montré que la TPase et le 2dR stimulent la formation de points d'adhésion focaux et activent l'autophosphorylation de la protéine FAK dans des cellules de type HUVEC. De plus, ces travaux ont révélé que l'effet de la TPase sur la migration des HUVECs est lié aux intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$. Ce lien a été confirmé par l'utilisation d'anticorps anti $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, dont l'ajout a entraîné la suppression de l'autophosphorylation de FAK et de la migration des cellules endothéliales induites par la TPase et le 2dR. Dans cette étude, un mécanisme d'action similaire a été mis en évidence pour le VEGF, mais contrairement au couple TPase/2dR, celui-ci semble ne faire intervenir que les intégrines $\alpha_v\beta_3$.



Pour finir, l'activité pro-angiogénique de la TPase semble aussi liée à une autre protéine d'adhésion, la P-sélectine (schéma 4). Il s'agit d'une molécule d'adhésion vasculaire qu'on retrouve principalement à la surface des cellules endothéliales. Elle est surtout impliquée dans les processus inflammatoires consécutifs à la coagulation mais semble également contribuer au développement tumoral. En effet, elle promeut l'activation des cellules endothéliales et donc la néo-angiogénèse, la protection de la tumeur vis-à-vis de la surveillance immunitaire mais aussi l'adhésion des cellules tumorales et leur transmigration à travers l'endothélium lors du processus d'extravasation essentiel à l'invasivité et à la formation de métastases.^{96,97} Une étude a montré que la TPase pouvait provoquer une surexpression de la P-sélectine dans des cellules de cancer du sein et des HUVECs.⁹⁸ Le mécanisme sous-jacent n'est pas encore connu dans le

⁹⁴ H. Seeliger, M. Guba, G. E. Koehl, A. Doenecke, M. Steinbauer, C. J. Bruns, C. Wagner, E. Frank, K. W. Jauch, E. K. Geissler, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1843-52.

⁹⁵ Y. Nakajima, R. Madhyastha, M. Maruyama, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 239-45.

⁹⁶ L. Morbidelli, L. Brogelli, H. J. Granger, M. Ziche, *Life Sci.* **1998**, *62*, PL7-11.

⁹⁷ B. Nieswandt, M. Hafner, B. Echtenacher, D. N. Mannel, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1295-300.

⁹⁸ S. P. Gunningham, M. J. Currie, H. R. Morrin, E. Y. Tan, H. Turley, G. U. Dachs, A. I. Watson, C. Frampton, B. A. Robinson, S. B. Fox, *J. Pathol.* **2007**, *212*, 335-44.

détail mais pourrait faire intervenir l'activation des récepteurs aux angiopoïétines TIE-2 (de l'anglais « tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains »), activation qui provoque la translocation de la P-sélectine à la surface de l'endothélium.⁹⁹ Contrairement aux mécanismes d'action cités précédemment, aucune preuve de l'implication du 2dR dans ce dernier processus n'a été fournie pour le moment.

II.B.4. Rôle dans la formation de métastases

La formation des métastases est un processus multi-étapes qui est initié par la perte de la capacité d'adhésion des cellules tumorales qui se détachent de la tumeur primaire, et qui se poursuit par l'acquisition de la mobilité cellulaire. Il se produit ensuite un remodelage de la matrice extracellulaire faisant intervenir les MMPs et une intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques situés à proximité de la tumeur primaire.⁶⁰ Les cellules tumorales circulantes peuvent alors migrer et métastaser dans d'autres tissus après extravasation et récupération de leur capacité d'adhésion.

L'action pro-angiogénique de la TPase donnant accès à la circulation sanguine aux cellules tumorales, elle favorise indirectement la formation de métastases par ce biais. De plus, l'enzyme intervient aussi à différents stades du processus métastatique. La corrélation entre métastases et TPase a été mise en évidence dans de nombreuses études (figure 8). Des travaux *in vitro* ont montré que, comme dans le cas de l'activité angiogénique, l'implication de la TPase dans le processus métastatique est liée à son activité enzymatique.¹⁰⁰

Dans le paragraphe II.B.3.c, le lien entre la TPase et des protéines d'adhésion telles que les intégrines ou la P-sélectine a été établi. Ces deux protéines ont un rôle majeur dans la migration et l'invasion cellulaires. Les intégrines sont responsables de la rupture de la cohésion de l'épithélium et la P-sélectine participe à la capture de la cellule tumorale circulante et à sa dissémination dans l'organe cible. De même, nous avons également montré que la TPase induit une surexpression de certaines MMPs, dont l'action permet un remodelage de la matrice extracellulaire et un détachement de cellules tumorales, ainsi que celle d'autres facteurs pro-angiogéniques.

Enfin, l'expression de la TPase a été corrélée à une surexpression de kinases intracellulaires telles que la protéine kinase B (ou Akt) qui contrôle plusieurs des mécanismes fondamentaux de la cellule comme la prolifération, la transcription, la migration et l'apoptose.¹⁰¹

⁹⁹ C. Lemieux, R. Maliba, J. Favier, J. F. Theoret, Y. Merhi, M. G. Sirois, *Blood* **2005**, *105*, 1523-30.

¹⁰⁰ S. Takao, S. I. Akiyama, A. Nakajo, H. Yoh, M. Kitazono, S. Natsugoe, K. Miyadera, M. Fukushima, Y. Yamada, T. Aikou, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5345-8.

¹⁰¹ T. Gotanda, M. Haraguchi, T. Tachiwada, R. Shinkura, C. Koriyama, S. Akiba, M. Kawahara, K. Nishiyama, T. Sumizawa, T. Furukawa, H. Mimata, Y. Nomura, S.-I. Akiyama, M. Nakagawa, *Int. J. Mol. Med.* **2006**, *17*, 1085-91.

II.B.5. Activité anti-apoptotique

La plupart des tumeurs solides possèdent des régions tissulaires anoxiques ou hypoxiques réparties au sein de la masse tumorale. On sait que les cellules tumorales de ces régions sont plus résistantes à la radiothérapie ou à la chimiothérapie que celles qui sont mieux oxygénées et qu'elles sont capables de résister à l'apoptose induite par l'hypoxie.⁹⁵ Après un bref rappel sur l'apoptose, nous présenterons les mécanismes reliant la TPase à la résistance à l'apoptose de certaines cellules tumorales.

II.B.5.a. Rappel sur le mécanisme d'apoptose

L'apoptose consiste en un processus de mort cellulaire dans lequel des mécanismes complexes sont mis en jeu afin d'aboutir à la destruction de la cellule.¹⁰² Il s'agit d'un événement physiologique clé dans les organismes pluricellulaires car il permet d'assurer leur homéostasie, c'est-à-dire un équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire.

L'activation du processus d'apoptose peut se faire de manière extrinsèque, avec activation de certains récepteurs, Fas étant l'un des plus étudiés.¹⁰² Lorsque le ligand naturel de ce récepteur, FasL, ou qu'un anticorps anti-Fas agoniste se lie à Fas, il provoque son activation et son oligomérisation. L'activation de Fas entraîne le recrutement de la protéine FADD (de l'anglais « Fas-associated death domain ») qui elle-même active la caspase 8 (figure 9). Ces diverses protéines forment alors un complexe protéique nommé « complexe de signalisation de la mort induite » ou DISC (de l'anglais « death inducing signaling complex »). La caspase 8 active à son tour la caspase 3, dont le rôle est de recruter les molécules effectrices de l'apoptose.

La seconde voie permettant d'activer l'apoptose est un processus intrinsèque impliquant la mitochondrie.¹⁰² A la suite d'un stress ou un dommage cellulaire, on observe une perméabilisation des membranes mitochondriales conduisant au relargage de protéines pro-apoptotiques dans le cytosol. Cela s'accompagne généralement d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et d'une perturbation de la chaîne respiratoire. Parmi les composés libérés dans le cytosol, le cytochrome c mitochondrial va induire la formation d'un complexe multi protéique, l'apoptosome, à l'origine de l'activation de la caspase 9. Cette dernière intervient dans la production d'autres caspases exécutrices, comme les caspases 3 ou 7.

Les molécules de la famille Bcl-2 sont d'une importance décisive dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire par apoptose. On trouve dans cette famille aussi bien des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim) qu'anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Nr13). Elles interviennent principalement dans la régulation de la voie d'activation intrinsèque de l'apoptose, pouvant ou non déclencher la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

¹⁰² Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, *Traité de Chimie Thérapeutique*, Volume 6, TEC et DOC 2003.

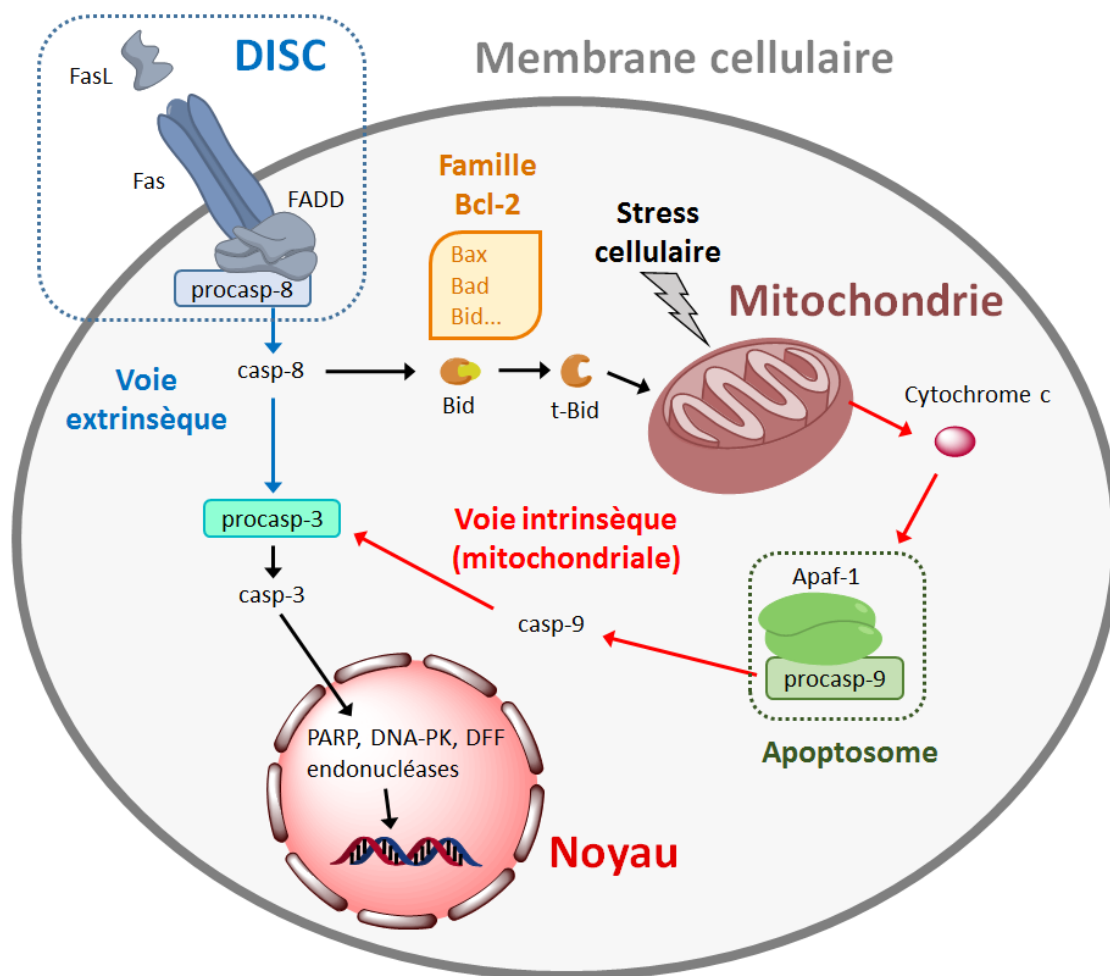


Figure 9 : Représentation simplifiée des voies de l'apoptose (d'après réf. 102).

II.B.5.b. Activité anti-apoptotique liée à l'activité enzymatique de la TPase

Déjà, en 1995, Moghaddam *et al.* avaient constaté que les carcinomes mammaires qui exprimaient davantage la TPase avaient une croissance plus rapide et ce, sans présenter une augmentation significative de la densité en microvaisseaux.¹⁰³ Des observations semblables ont été faites sur des cas du cancer du côlon et de l'estomac. De là est venue l'idée que l'enzyme était capable de stimuler la croissance tumorale par un autre mécanisme que l'angiogénèse. La corrélation entre résistance à l'apoptose et l'activité enzymatique de la TPase a ensuite été rapidement établie par Kitazono *et al.*¹⁰⁴ En travaillant sur des cellules humaines de carcinome épidermoïde, ces derniers ont montré que la TPase induisait une résistance à l'apoptose liée à l'hypoxie grâce à son activité catabolique, et que les produits de la réaction, le 2dR et la thymine, produisaient un effet similaire. Un mécanisme d'action moléculaire a été proposé peu de temps après par Ikeda *et al.* après étude sur des cellules leucémiques humaines HL60.¹⁰⁵ Ils

¹⁰³ A. Moghaddam, H. T. Zhang, T. P. Fan, D. E. Hu, V. C. Lees, H. Turley, S. B. Fox, K. C. Gatter, A. L. Harris, R. Bicknell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 998-1002.

¹⁰⁴ M. Kitazono, Y. Takebayashi, K. Ishitsuka, S. Takao, A. Tani, T. Furukawa, K. Miyadera, Y. Yamada, T. Aikou, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, 253, 797-803.

¹⁰⁵ R. Ikeda, T. Furukawa, M. Kitazono, K. Ishitsuka, H. Okumura, A. Tani, T. Sumizawa, M. Haraguchi, M. Komatsu, H. Uchimiya, X. Q. Ren, T. Motoya, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, 291, 806-12.

ont observé qu'en conditions hypoxiques, la TPase et le 2dR inhibent un certain nombre d'événements associés à l'apoptose, tels que l'activation des caspases 3 et 9, la libération du cytochrome c mitochondrial, la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et la diminution du niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl.

Lors de travaux ultérieurs, Ikeda *et al.*¹⁰⁶ ont constaté qu'en conditions hypoxiques, le 2dR bloque la phosphorylation de la kinase p38 MAPK (de l'anglais « mitogen-activated protein kinase »). Les MAP kinases constituent une famille de sérine/thréonine kinases jouant un rôle de médiateur dans la voie d'activation intrinsèque de l'apoptose. En empêchant la phosphorylation de p38 MAPK, le 2dR pourrait prévenir les mécanismes pro-apoptotiques sous-jacents à la kinase p38 MAPK, à savoir la translocation de la protéine Bax sur la mitochondrie, avec pour conséquence la libération du cytochrome c mitochondrial et l'activation de caspases.

Un autre mécanisme a été identifié par la même équipe, lorsque celle-ci a étudié l'effet de la TPase sur l'expression de la protéine pro-apoptotique BNIP3 (« BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 ») dans des cellules leucémiques.¹⁰⁷ Régulée par HIF-1 α , la protéine BNIP3 est notamment surexprimée en conditions hypoxiques dans des cellules endothéliales, de carcinome ou des macrophages.¹⁰⁸ Elle vient se lier à la mitochondrie et ouvre le pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP), entraînant la mort cellulaire selon un mécanisme à la fois apoptotique et nécrotique. Les résultats d'Ikeda *et al.*¹⁰⁷ suggèrent qu'en conditions hypoxiques, le 2dR produit par la TPase est capable d'inhiber l'expression de BNIP3 et le mécanisme pro-apoptotique associé.

II.B.5.c. *Activité anti-apoptotique indépendante de l'activité enzymatique*

La TPase présente également un effet anti-apoptotique indépendant de son activité enzymatique, dans lequel plusieurs mécanismes sont à l'œuvre.

Résistance à l'apoptose liée au récepteur Fas

Un premier mécanisme s'oppose à l'apoptose induite par le récepteur Fas. Même si le mécanisme d'action n'a pas encore été clairement établi, il semblerait que la TPase inhibe l'apoptose en empêchant la formation du complexe protéique DISC.¹⁰⁹ Ni la thymidine, ni la thymine, ni le 2dR, ni le TPI (un inhibiteur de la TPase, paragraphe III.A.1.c) n'ont eu d'effet

¹⁰⁶ R. Ikeda, X. F. Che, M. Ushiyama, T. Yamaguchi, H. Okumura, Y. Nakajima, Y. Takeda, Y. Shibayama, T. Furukawa, M. Yamamoto, M. Haraguchi, T. Sumizawa, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2006**, *342*, 280-5.

¹⁰⁷ R. Ikeda, Y. Tajitsu, K. Iwashita, X.-F. Che, K. Yoshida, M. Ushiyama, T. Furukawa, M. Komatsu, T. Yamaguchi, Y. Shibayama, M. Yamamoto, H.-Y. Zhao, J. Arima, Y. Takeda, S.-I. Akiyama, K. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2008**, *370*, 220-4.

¹⁰⁸ H. M. Sowter, P. J. Ratcliffe, P. Watson, A. H. Greenberg, A. L. Harris, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6669-73.

¹⁰⁹ S. Mori, S. Takao, R. Ikeda, H. Noma, Y. Mataka, X. Wang, S. Akiyama, T. Aikou, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, *295*, 300-5.

sur cette activité anti-apoptotique, ce qui laisse supposer qu'elle est indépendante du catabolisme de la TPase.

Résistance à l'apoptose induite par les dégâts causés à l'ADN

Le cisplatine est un agent cytotoxique alkylant l'ADN dont l'action va provoquer la mort cellulaire par apoptose en libérant le cytochrome c mitochondrial et par activation de caspases. Un mécanisme de défense vis-à-vis de l'apoptose consiste en une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 contrôlant notamment la libération du cytochrome c. Des cellules exprimant la TPase ou une TPase mutante ne possédant pas d'activité enzymatique ont présenté une résistance à l'apoptose induite par le cisplatine, sans modification du taux des protéines pro- ou anti-apoptotiques (en particulier Bcl-2, Bcl-X_L et Bax).¹¹⁰ Le mécanisme est donc indépendant de l'action enzymatique de la TPase et ne semble pas faire intervenir une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Des travaux ultérieurs ont montré une activité similaire de la TPase contre les dégâts sur l'ADN provoqués par le rayonnement UV et divers agents cytotoxiques dont, à nouveau, le cisplatine.¹¹¹ Cet effet est lié à la surexpression de la kinase Akt induite par la TPase déjà évoquée à la section II.B.4. Akt est en effet impliquée dans la survie cellulaire après exposition à des agents délétères pour l'ADN. Son activité anti-apoptotique passe par la phosphorylation et l'inactivation de plusieurs protéines des voies de signalisation de l'apoptose, telles que la protéine Bad ou la caspase 9.

Résistance à l'apoptose liée aux agents tubulo-affins

Une dernière voie mécanistique a été identifiée, il s'agit d'une résistance à l'apoptose induite par les agents tubulo-affins. Ces agents (vincristine, vinblastine, paclitaxel et 2-méthoxyestradiol) interfèrent avec les microtubules et conduisent ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M puis à l'initiation de l'apoptose. Le mécanisme pro-apoptotique induit par les agents tubulo-affins semble faire intervenir l'activation de diverses kinases, la phosphorylation de la protéine Bcl-2 et probablement une surexpression du ligand FasL. C'est en inhibant la phosphorylation de Bcl-2 et l'expression de FasL que la TPase confère une résistance à l'apoptose induite par les agents tubulo-affins.¹¹² Son action est encore une fois indépendante de son activité enzymatique, puisque ni le TPI ni le 2dR n'ont eu d'effet sur ce mécanisme.

¹¹⁰ R. Ikeda, T. Furukawa, R. Mitsuo, T. Noguchi, M. Kitazono, H. Okumura, T. Sumizawa, M. Haraguchi, X. F. Che, H. Uchimiya, Y. Nakajima, X. Q. Ren, S. Oiso, I. Inoue, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, *301*, 358-63.

¹¹¹ H. C. Jeung, X. F. Che, M. Haraguchi, H. Y. Zhao, T. Furukawa, T. Gotanda, C. L. Zheng, K. Tsuneyoshi, T. Sumizawa, J. K. Rho, S. Akiyama, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1294-302.

¹¹² H. C. Jeung, X. F. Che, M. Haraguchi, T. Furukawa, C. L. Zheng, T. Sumizawa, S. Y. Rha, J. K. Rho, S. Akiyama, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 13-21.

II.B.6. TPase et chimiothérapies à base de fluoropyrimidines

Le métabolisme des antitumoraux antimétabolites de type fluoropyrimidines, que ce soit le 5-fluorouracile (5-FU, figure 10) ou l'un de ses analogues, fait intervenir plusieurs réactions enzymatiques dont la réaction catabolique de la TPase. Il s'agit de la réaction inverse de celle impliquée dans le processus angiogénique et le développement tumoral associés à la TPase.

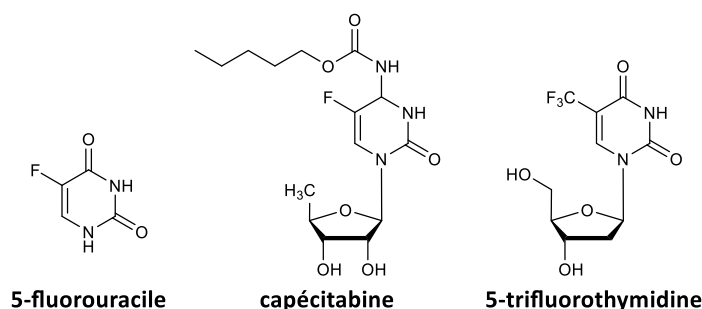


Figure 10 : Structures du 5-FU, de la capécitabine et de la TFT.

L'activité antitumorale du 5-FU a été mise en évidence en 1957 par Heidelberger *et al.*¹¹³ Plus de cinquante ans après sa première synthèse, le 5-FU et ses dérivés restent encore largement utilisés dans la prise en charge du cancer colorectal, du cancer de l'œsophage, de l'estomac, du cancer oto-rhino-laryngologique mais également des cancers du sein et de l'ovaire. Le 5-FU est un antimétabolite altérant la synthèse de l'ADN et de l'ARN, dont l'activité fait intervenir plusieurs mécanismes (figure 11). Il induit d'une part l'incorporation de fluoronuécléotides dans l'ADN et l'ARN et, de l'autre, l'inhibition de la thymidylate synthase (TS), une enzyme-clé de la synthèse des nucléosides et donc de l'ADN.⁴² Ce dernier mécanisme semble être le principal mode d'action du 5-FU.

Pour acquérir sa forme active ciblant la TS, le 5-FU doit d'abord être pris en charge par la TPase, qui le convertit en 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FdUrd ou floxuridine). En revanche, cette réaction anabolique ne se produit que si la concentration en co-substrat, le 2dR1P, est suffisante. Par conséquent, la sensibilité des tumeurs au 5-FU induite par la TPase augmente avec la biodisponibilité du 2dR1P. Dans un second temps, la FdUrd est phosphorylée en 5-fluoro-2'-désoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP) par la thymidine kinase (TK). La TS, la 2'-désoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) et le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (CH₂THF) forment un complexe ternaire permettant le transfert d'un groupe méthyle sur la position 5 de la dUMP pour produire de la thymidine-5'-monophosphate (TMP). En présence de la FdUMP, la TS forme un complexe ternaire non dissociable, du fait de la présence du fluor, avec la FdUMP et le CH₂THF, ce qui conduit à l'inhibition de la TS.¹¹⁴

Par ailleurs, après phosphorylation du FdUMP en 5-fluoro-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate (FdUTP), il pourra servir de substrat aux ADN polymérases et être incorporé à l'ADN. Enfin, le 5-FU peut être transformé en 5-fluorouridine-5'-monophosphate (FUMP), puis phosphorylé à

¹¹³ C. Heidelberger, N. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duchinsky, R. Schnitzer, E. Plevin, J. Scheiner, *Nature* **1957**, 179, 663-6.

¹¹⁴ M. Malet-Martino, R. Martino, *Oncologist* **2002**, 7, 288-323.

nouveau en 5-fluorouridine-5'-triphosphate (FUTP), qui peut être incorporé dans l'ARN (figure 11).

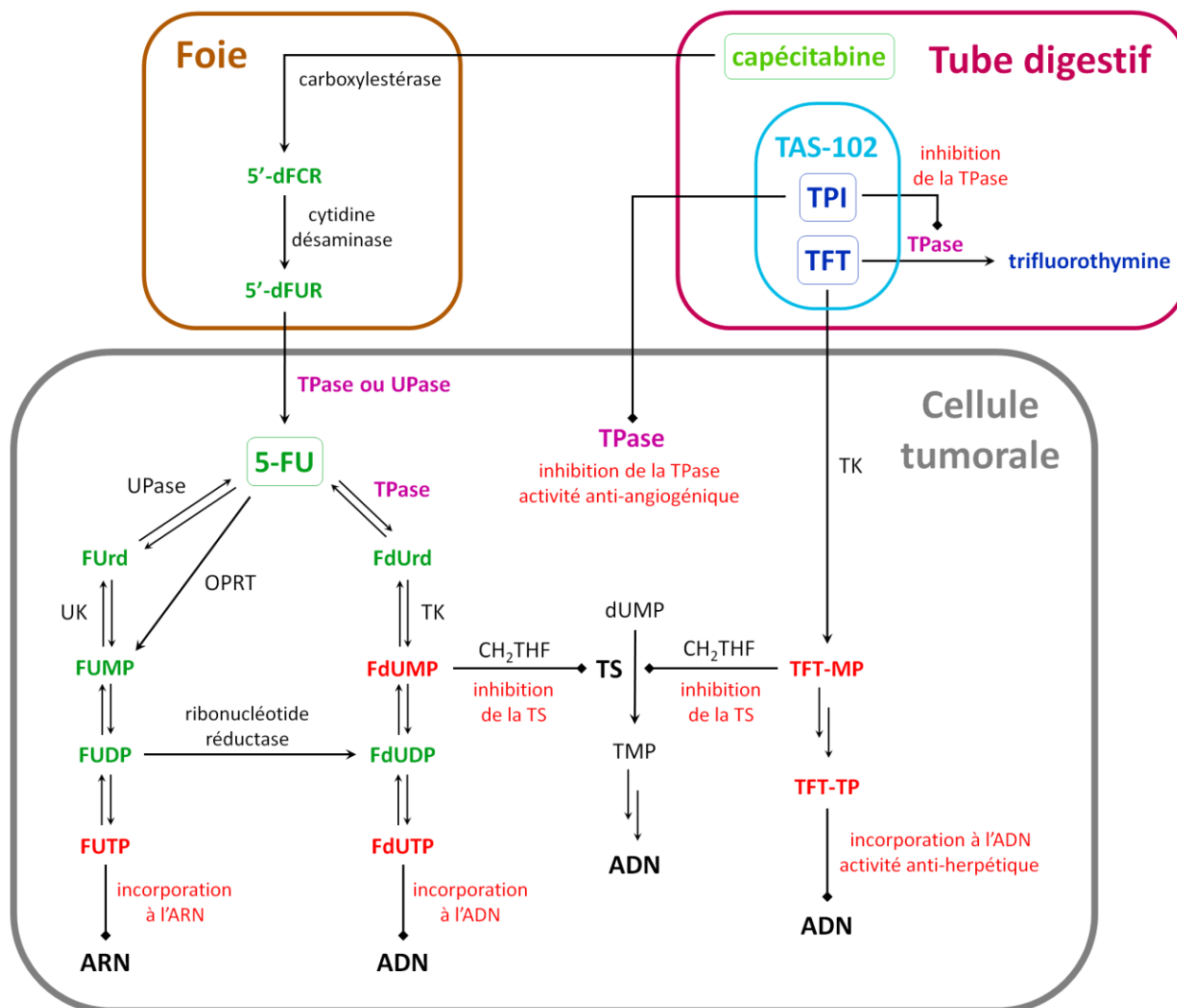


Figure 11 : Mode d'action du 5-FU, de la capécitabine et du TAS-102.

En raison de sa faible biodisponibilité orale, le 5-FU est essentiellement administré par voie intraveineuse, ce qui implique un inconfort conséquent pour le patient. Le développement de prodrogues a été stimulé par la possibilité d'une administration orale, mais aussi une réduction de la toxicité et une amélioration de la spécificité de cet anti-métabolite. L'une d'elles, la capécitabine / Xéloda® (figure 10), est métabolisée en 5-FU en 3 étapes dont une met en jeu la TPase (figure 11). Une fois passée la barrière intestinale, la capécitabine, toujours intacte, est d'abord hydrolysée dans le foie en 5'-désoxy-5-fluorocytidine (5'-dFCR) par la carboxylestérase. Ensuite, la 5'-dFCR est convertie en 5'-désoxy-5-fluorouridine (5'-dFUR) par la cytidine désaminase, principalement exprimée dans le foie et divers types de tumeurs. Enfin, la dernière étape est la conversion de la 5'-dFUR en 5-FU par la TPase ou l'UPase. Cette conversion est effectuée préférentiellement dans les tissus tumoraux, où ces deux enzymes sont largement surexprimées.^{114,115} Certaines études suggèrent par ailleurs que le rôle de l'UPase dans

¹¹⁵ C. M. Walko, C. Lindley, *Clin. Ther.* **2005**, 27, 23-44.

ce métabolisme pourrait être plus important que celui de la TPase.¹¹⁶ De la sorte, la capécitabine délivre spécifiquement le 5-FU au sein des tissus tumoraux tout en ayant une toxicité systémique limitée. La capécitabine est largement prescrite pour traiter le cancer colorectal et certains cancers du sein et de l'estomac, en mono- ou plurithérapie.

La 5-trifluorothymidine (TFT, figure 10) est un nucléoside dont la synthèse est connue depuis 1964 et elle est utilisée en traitement topique de la kératite herpétique depuis les années 1980. En outre, la TFT est, après activation par la TK en 5-trifluorothymidine-monophosphate (TFT-MP), un autre inhibiteur de la TS (figure 11). Son mécanisme d'inhibition est différent de celui de la FdUMP mais passe lui aussi par une liaison covalente au site actif.¹¹⁷ La TFT-MP est aussi phosphorylée à nouveau en 5-trifluorothymidine-triphosphate (TFT-TP) et incorporée à l'ADN sous cette forme. Ce dernier mécanisme semble d'ailleurs être responsable de l'essentiel de son activité pro-apoptotique.¹¹⁸ Néanmoins, les propriétés antitumorales de la TFT n'ont pas pu être exploitées cliniquement à cause de sa trop forte toxicité et de sa trop faible demi-vie plasmatique, qui ne dépasse pas les vingt minutes. En effet, la TFT est rapidement prise en charge par la TPase au niveau de l'épithélium du tube digestif et dans le foie, et est convertie en sa base inactive, la trifluorothymine.⁶⁹ Il y a une quinzaine d'année, la TFT a été combinée au TPI, un puissant inhibiteur de la TPase, dans une spécialité appelée TAS-102 / Lonsurf®, avec un ratio molaire 1:0,5. Le TPI limite la dégradation de la TFT, augmentant ainsi sa biodisponibilité et sa spécificité d'action. De plus, l'inhibition de la TPase permet de contrer ses propriétés pro-angiogéniques. Plus de détails concernant le TAS-102 sont donnés à la section III.D.

II.B.7. Conclusion

Dans la plupart des tumeurs solides, la thymidine phosphorylase est surexprimée dans les cellules tumorales, mais également dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les TAMs. Cette expression constitutive peut être renforcée par l'action de certaines chimiokines (interférons, interleukines et TNF- α), certains traitements anti-tumoraux et des conditions de stress cellulaire (hypoxie, hypoglycémie et faible pH). Des observations réalisées lors d'essais cliniques ont permis d'associer la surexpression de la TPase à une plus forte densité en microvaisseaux au niveau de la tumeur, un stade de la maladie plus avancé, un risque de formation de métastases plus important et un pronostic défavorable.

La co-expression de la TPase avec plusieurs facteurs pro-angiogéniques (VEGF, IL-8, bFGF, TNF- α et MMPs, entre autres), en particulier au sein des cellules tumorales et des TAMs, reflète son action pro-angiogénique. Celle-ci est liée à son activité enzymatique et s'effectue par l'intermédiaire de son médiateur, le 2dR.

¹¹⁶ O. H. Temmink, M. de Bruin, A. W. Turksma, S. Cricca, A. C. Laan, G. J. Peters, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 565-75.

¹¹⁷ O. H. Temmink, T. Emura, M. de Bruin, M. Fukushima, G. J. Peters, *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 779-89.

¹¹⁸ G. J. Peters, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2014**, *33*, 358-74.

Au-delà de la néovascularisation qu'elle génère, la TPase possède aussi une action pro-métastatique par activation de gènes codant pour des protéines impliquées dans les phénomènes de migration cellulaire et de dégradation de la matrice extracellulaire.

Pour finir, la TPase possède des propriétés anti-apoptotiques dont une part est dépendante de son activité enzymatique mais également selon d'autres mécanismes.

La TPase est donc une cible prometteuse pour le développement d'inhibiteurs car son inhibition permettrait de freiner la prolifération et la dissémination des cellules tumorales qu'elle favorise par divers mécanismes. Cependant cette enzyme est aussi impliquée dans l'activation de certaines fluoropyrimidines utilisées en chimiothérapies antitumorales, comme le 5-FU ou l'une de ses prodrogues.

On pourrait penser qu'une chimiothérapie basée sur les dérivés du 5-FU est incompatible avec l'emploi d'inhibiteurs de la TPase. En effet, celle-ci réalise l'activation métabolique du 5-FU par phosphorylation en FUMP. Cependant, cette activation peut également être assurée par l'UPase puis l'uridine kinase (UK) ou encore l'orotate phosphoribosyle transférase (OPRT) (figure 11). La conversion directe en FUMP par l'OPRT est d'ailleurs considérée comme le mécanisme principal d'activation du 5-FU. En outre, dans certaines cellules tumorales où la TPase et l'UPase ont été inhibées, une activité phosphorolytique résiduelle a été observée.¹¹⁹ Ces différents mécanismes indépendants de la TPase pourraient permettre une activation suffisante des fluoropyrimidines pour envisager l'association d'une chimiothérapie au 5-FU avec des inhibiteurs de la TPase. Il en va de même pour la capécitabine puisque, même si la TPase est inactivée, la dernière étape de sa conversion en 5-FU peut être catalysée par l'UPase.

Par ailleurs, des inhibiteurs de la TPase auraient un rôle important à jouer dans le cadre de thérapies qui bénéficieraient d'une diminution de l'activité de l'enzyme. C'est notamment le cas pour les agents thérapeutiques qui sont inactivés par la TPase. L'arrivée très récente sur le marché européen de la spécialité TAS-102 / Lonsurf®, où le TPI empêche l'inactivation de la TFT par phosphorolyse, valide ce concept. De plus, l'utilisation de ces inhibiteurs serait également intéressante dans le cadre de traitements antitumoraux, dont l'utilisation induit une surexpression de la TPase (section II.B.1). L'inhibition de la protéine chaperon HSP90,¹²⁰ par exemple, ou l'utilisation de la fucoxanthine, un caroténoïde,¹²¹ sont deux approches qui ont permis de diminuer l'activité de la TPase et de majorer les effets cytotoxiques du cisplatine. On peut supposer que cet effet est au moins en partie dû à une réduction de la résistance à l'apoptose induite par le cisplatine (section II.B.5.c).

¹¹⁹ O. H. Temmink, M. De Bruin, A. C. Laan, A. W. Turksma, S. Cricca, A. J. Masterson, P. Noordhuid, G. J. Peters, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1759-65.

¹²⁰ S. H. Weng, S. C. Tseng, Y. C. Huang, H. J. Cheng, Y. W. Lin, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 126-36.

¹²¹ C. L. Liu, Y. P. Lim, M. L. Hu, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 50-66.

II.C. Structure moléculaire de la TPase

Les nucléosides phosphorylases peuvent être regroupées en deux familles distinctes. La première regroupe les purines nucléosides phosphorylases et l'uridine phosphorylase et la seconde toutes les autres pyrimidines phosphorylases.¹²² Ces deux familles diffèrent grandement par leurs structures tertiaire et quaternaire. Au sein de la seconde famille de nucléosides phosphorylases, le pourcentage d'homologie est de l'ordre de 40 %. Les structures tridimensionnelles de l'HuTPase et l'EcTPase n'ont été obtenues que plusieurs décennies après leur purification dans les années 1970. En 1990, Walters *et al.* ont proposé une première résolution de la structure cristalline de l'EcTPase.¹²³ Celle de la pyrimidine nucléoside phosphorylase de *Bacillus Stearothermophilus* (BsPYNPase) a été obtenue quelques années plus tard, en 1998.¹²⁴ La cristallisation de l'enzyme humaine n'a été réalisée qu'en 2004, par Norman *et al.*, après de nombreuses tentatives infructueuses.¹²⁵ Enfin, la cristallisation de la TPase de *Salmonella typhimurium* a récemment été publiée par Balaev *et al.*¹²⁶

II.C.1. Structure générale

Toutes les pyrimidines phosphorylases bactériennes ou de mammifères ont une structure quaternaire dont les sous-unités sont constituées d'un domaine α (en bleu sur le monomère, figure 12) composé d'hélices α et d'un domaine α/β de plus grande taille (en orange sur le monomère), où l'on trouve un mélange d'hélices α et de feuillets β . Trois boucles polypeptidiques relient ces deux domaines entre eux et le site actif est situé dans la large poche qui les sépare. Celle-ci contient les sites de fixation des deux substrats. Le domaine α est composé de 6 hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$, $\alpha 8$ et $\alpha 9$). Le domaine α/β , quant à lui, comprend un mélange de feuillets β (brins $\beta 1$ - $\beta 5$ et $\beta 13$) entouré d'hélices α ($\alpha 5$ - $\alpha 7$ et $\alpha 10$ - $\alpha 16$) et de deux feuillets β antiparallèles (les brins $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 9$ et $\beta 11$ d'une part, et les brins $\beta 8$, $\beta 10$ et $\beta 12$ de l'autre).

Par rapport à l'EcTPase et la BsPYNPase, l'HuTPase diffère essentiellement par des éléments du domaine α/β . Elle possède en effet une hélice supplémentaire ($\alpha 15$), un coude au niveau de l'hélice $\alpha 16$ et une région C-terminale plus longue.¹²⁵ D'autre part, le feuillet β constitué des brins $\beta 8$, $\beta 10$ et $\beta 12$ n'est présent que chez HuTPase et BsPYNPase.

La forme active de ces enzymes est un dimère dans lequel les monomères sont assemblés par l'intermédiaire d'interactions entre le domaine α d'un monomère et le domaine α/β de l'autre. On peut obtenir ce dimère par rotation de 180° d'un monomère autour de l'axe de symétrie du dimère (figure 12).¹²⁵ La TPase est ainsi un homodimère de 110 kDa chez l'homme et de 90 kDa chez *E. coli*.

¹²² M. J. Pugmire, S. E. Ealick, *Biochem. J.* **2002**, *361*, 1-25.

¹²³ M. R. Walters, W. J. Cook, L. Brent Cole, S. A. Short, G. W. Koszalka, T. A. Krenitsky, S. E. Ealick, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14016-22.

¹²⁴ M. J. Pugmire, S. E. Ealick, *Structure* **1998**, *6*, 1467-79.

¹²⁵ R. A. Norman, S. T. Barry, M. Bate, J. Breed, J. G. Colls, R. J. Ernill, R. W. Luke, C. A. Minshull, M. S. B. Mc Alister, J. A. Tucker, A. Pautpit, *Structure* **2004**, *12*, 75-84.

¹²⁶ V. V. Balaev, A. A. Lashkov, A. G. Gabdulkhakov, M. V. Dontsova, T. A. Seregine, A. S. Mironov, C. Betzel, A. M. Mikhailov, *Acta Cryst.* **2016**, *F72*, 224-33.

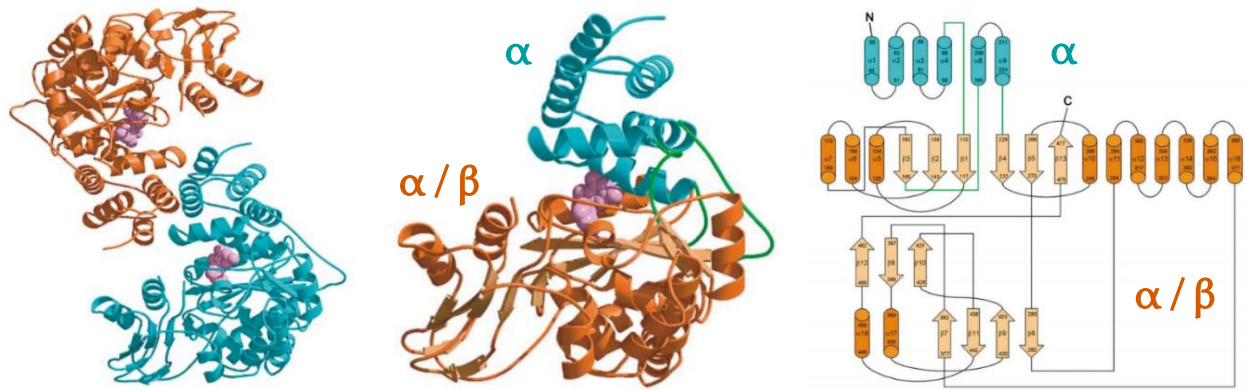


Figure 12 : Structures tridimensionnelles du dimère (gauche) et d'un monomère (centre) et représentation topologique d'un monomère (droite) de l'HuTPase (d'après Norman *et al.*¹²⁵).

II.C.2. Le site actif

Chaque sous-unité de la TPase comporte un site actif situé à la jonction entre les deux domaines α et α/β , dans lequel sont présents un site de fixation de la thymidine, au niveau du domaine α et un site de fixation pour le phosphate, localisé dans le domaine α/β . Ces deux sites sont espacés d'environ 7,4 Å dans la BsPYNPase et de 8 à 10 Å dans l'EcTPase, ce qui implique un mouvement des deux domaines afin de positionner les substrats à une plus grande proximité l'un de l'autre.^{125,127} Les trois boucles polypeptidiques reliant les deux domaines servent alors de charnière et permettent le repliement de l'enzyme en une forme fermée (figure 13). Au cours de la réaction catalytique, l'enzyme change de conformation en passant d'une forme ouverte inactive à une forme fermée où la réaction de phosphorolyse peut avoir lieu. Une fois le site catalytique refermé, les substrats sont piégés, ce qui empêche leur élimination avant la fin de la catalyse, et sont situés à une distance suffisante pour pouvoir réagir. En outre, dans cette conformation, les molécules d'eau sont exclues du site actif, ce qui augmente la concentration en phosphate et élimine toute possibilité de réaction parasite d'hydrolyse du nucléoside.¹²⁷

L'étude de la structure de la BsPYNPase par Pugmire *et al.*¹²⁷ a suggéré que la liaison du phosphate conduit à une rotation de 8° du domaine α/β par rapport au domaine α . Une rotation supplémentaire de 20° se produirait après la fixation du nucléoside dans son site de liaison, aboutissant ainsi à la forme fermée active de l'enzyme.

Dans la co-cristallisation d'un dimère de l'enzyme humaine avec le TPI effectuée par Norman *et al.*,¹²⁵ le phosphate n'est pas présent dans le site catalytique. L'étude de la superposition de l'EcTPase, de la BsPYNPase et de cette structure cristallisée de l'enzyme humaine révèle que cette dernière adopte une conformation fermée. Il semblerait donc que la présence d'un inhibiteur seul soit suffisante pour provoquer la fermeture du site actif et que la présence d'un phosphate ne soit pas indispensable à celle-ci.¹²⁵ La cristallisation de l'HuTPase avec le TPI a nécessité une légère protéolyse par la trypsine, ce qui a donné une structure où il manque les acides aminés 409 et 410, entraînant ainsi la perte de la structure secondaire de la boucle où ils sont situés, à savoir la boucle constituée des résidus 405-416.

¹²⁷ M. J. Pugmire, W. Cook, A. Jasanoff, M. R. Walter, S. E. Ealick, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 285-99.

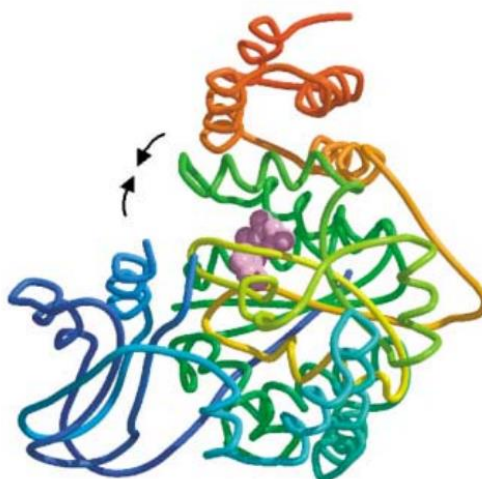


Figure 13 : Représentation du mode de fermeture du site actif (d'après Norman *et al.*¹²⁵).

La co-cristallisation de l'HuTPase avec son substrat naturel a été proposée pour la première fois en 2006. Grâce à l'emploi de conditions les moins dénaturantes possible, de l'inhibiteur KIN59 (paragraphe III.C.1) et en l'absence de protéolyse, El Omari *et al.*¹²⁸ ont obtenu un cristal contenant deux dimères d'enzyme soit quatre monomères de TPase. Dans chaque dimère, on observe les mêmes contacts inter-domaines que ceux décrits précédemment, et chaque monomère affiche 99 % de similitudes avec la structure de Norman *et al.* en termes de résidus structuralement équivalents.¹²⁵ Cependant, alors que la thymidine est le seul substrat utilisé lors de la cristallisation, c'est une molécule de thymine que l'on retrouve dans trois des quatre éléments de la structure cristalline (le quatrième site catalytique étant vide de tout substrat). Cela semble dû à une contamination par des traces de phosphates lors du processus de purification de l'enzyme.

La conformation adoptée par les monomères comportant une molécule de thymine est une forme fermée. Une structure similaire a été obtenue plus récemment par Mitsiki *et al.*¹²⁹ où la thymine est remplacée par le 5-iodouracile. Le phosphate étant absent de ces structures, El Omari *et al.* suggèrent qu'une base pyrimidique suffit à refermer l'enzyme.¹²⁸

L'absence de protéolyse a permis d'observer la structure intégrale de l'HuTPase, y compris la boucle formée par les résidus 405-416 (figure 14). Cette boucle ne semble pas indispensable à la fermeture du site actif mais pourrait en revanche contribuer à la stabilisation de la forme fermée puisque des liaisons hydrogène sont observées entre les résidus arginine 408, sérine 409 et arginine 410 de la boucle et le reste de la protéine (figure 15).

¹²⁸ K. El Omari, A. Bronckaers, S. Liekens, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, D. K. Stammers, *Biochem. J.* **2006**, 399, 199-204.

¹²⁹ E. Mitsiki, A. C. Papageorgiou, S. Iyer, N. Thiyagarajan, S. H. Prior, D. Sleep, C. Finnis, K. R. Acharya, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2009**, 386, 666-70.

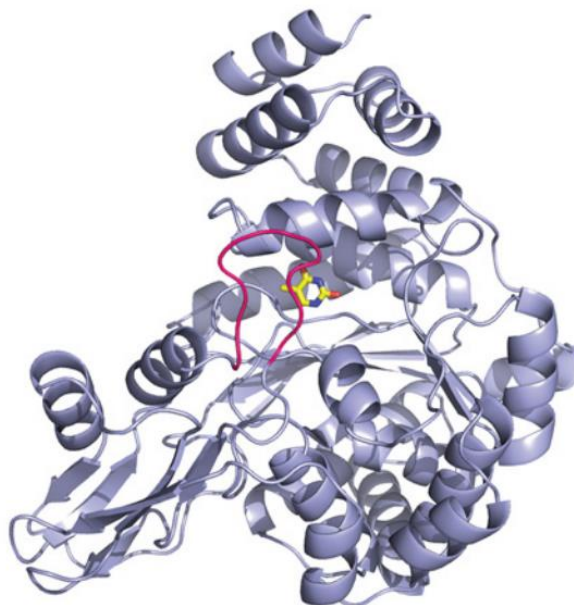


Figure 14 : Monomère de l'HuTPase dans la structure de El Omari *et al.*, la boucle supplémentaire est représentée en rose.¹²⁸

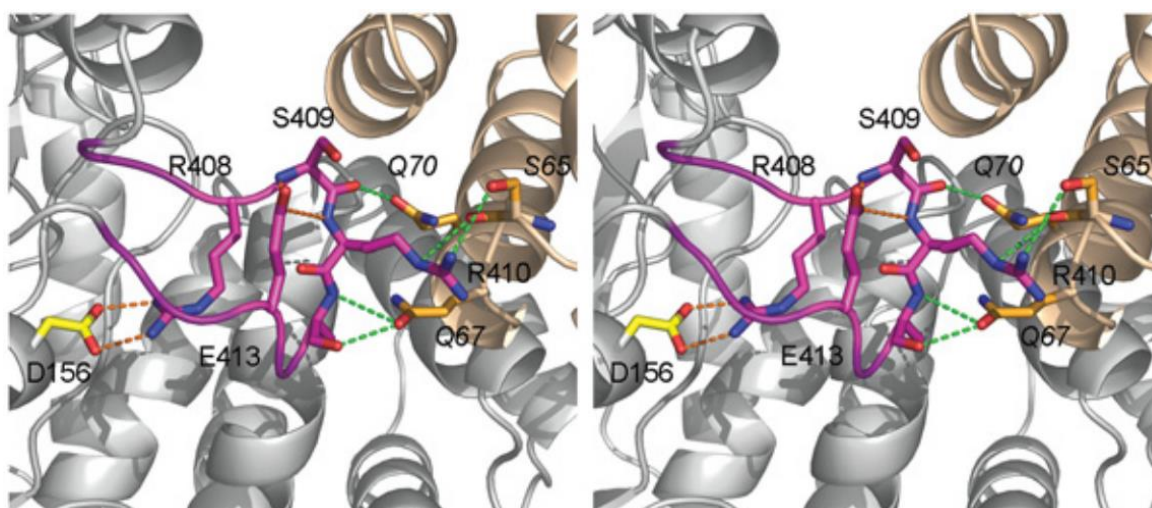


Figure 15 : Interactions entre la boucle 405-416 et les résidus du reste de la protéine.¹²⁸

II.C.3. Interaction enzyme-ligand

II.C.3.a. *EcTPase*

Le mode de fixation des substrats dans le site actif de l'enzyme a d'abord été mis en évidence grâce à la cristallisation de l'*EcTPase* dans une forme ouverte dans laquelle une molécule de sulfate prend la place du phosphate (figure 16).¹²³ L'étude de la liaison de la structure pyrimidique a été réalisée par analyse des cartes de différence de Fourier obtenues en comparant le cristal de l'enzyme seule avec ceux obtenus après ajout d'une solution de thymidine ou de thymine.

Le site de liaison de la base pyrimidique est une cavité située dans le domaine α et constituée d'une part de résidus permettant de nombreuses liaisons hydrogène et de l'autre d'acides aminés substitués par des chaînes hydrophobes. Ces derniers forment ainsi une poche hydrophobe d'un diamètre de 4 Å environ. Le carbone C^5 de la base pointe vers cette poche tandis que le carbone C^2 et l'azote N^3 font face aux hélices 8 et 9 du domaine α . Le carbonyle en position 2, le NH en position 3 et le carbonyle en position 4 forment trois liaisons hydrogène avec les résidus arginine 171, lysine 190 et sérine 186 du domaine α .

L'ion phosphate se lie au niveau du domaine α/β , plus précisément dans la partie C -terminale du feuillet β central. Il réalise un pont salin avec la lysine 84 et de nombreuses liaisons hydrogène avec les acides aminés du domaine α/β (histidine 85, sérine 86, sérine 95, sérine 113 et thréonine 123).

Enfin, le placement du ribose s'effectue au niveau du canal reliant les deux sites de liaison de la base et du phosphate. Ces derniers sont espacés de 9 Å environ. La leucine 117, un résidu hydrophobe, est présente à proximité du C^2 du ribose. La répulsion entre cette leucine et le OH en position 2' d'un ribose expliquerait la spécificité de la TPase pour les 2'-désoxyriboses. Il semblerait également que la liaison du nucléoside empêche l'accès du phosphate à son site de fixation, ce qui suggère que pour que la réaction enzymatique ait lieu, il faut que le phosphate se lie en premier au site catalytique.

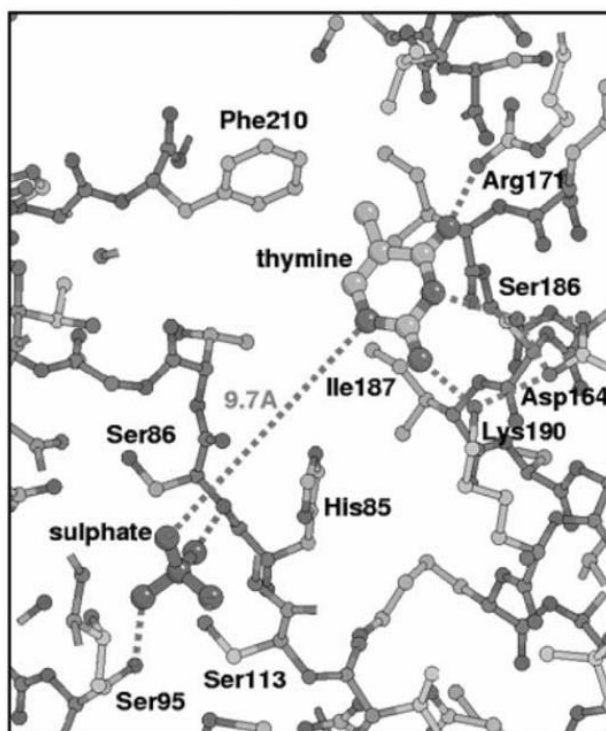


Figure 16 : Représentation de la thymine dans le site actif de l'EctPase (le phosphate est représenté par un sulfate, comme dans la structure cristalline de Norman *et al.*¹³⁰)

¹³⁰ M.-J. Pérez-Pérez, E.-M. Priego, A.-N. Hernandez, M.-J. Camarasa, J. Balzarini, S. Liekens, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, 5, 1113-23.

L'ordre d'entrée et de sortie des composants de la réaction est un élément important de la cinétique du mécanisme enzymatique. Chez *E. coli*, il s'agit d'une cinétique séquentielle ordonnée où le phosphate se lie en premier et le 2-désoxyribose-1-phosphate est le dernier à quitter le site catalytique.¹³¹ Pour l'HuTPase, des travaux récents ont montré que le mécanisme suivrait plutôt une cinétique séquentielle à équilibre rapide aléatoire où la thymidine et le phosphate peuvent aléatoirement se fixer en premier et où les deux produits de la réaction sortent du site actif également dans un ordre aléatoire (schéma 6).¹³²

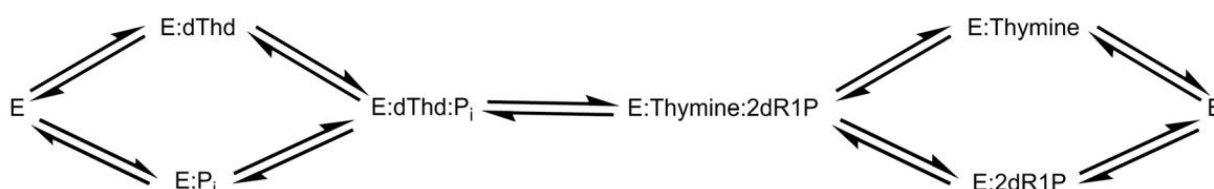


Schéma 6 : Cinétique de la phosphorylation par l'HuTPase proposée par Deves *et al.*¹³²

II.C.3.b. HuTPase-TPI

Grâce à la co-cristallisation de l'enzyme humaine avec le TPI en 2004, les interactions enzyme-substrat déjà identifiées sur la structure de l'EcTPase ont été confirmées (figure 17).¹²⁵

Le fragment 5-chlorouracile du TPI réalise des liaisons hydrogène avec les résidus arginine 202, sérine 217 et lysine 221 du domaine α et l'histidine 116 du domaine α/β . L'atome de chlore du 5-chlorouracile se positionne dans la poche hydrophobe formée par les résidus valine 208 et isoleucine 214 du domaine α et les acides aminés leucine 148 et valine 241 du domaine α/β . Cette caractéristique renforce l'affinité du TPI pour le site catalytique, les interactions entre la base et son site de liaison étant plus fortes que dans le cas de l'uracile lié à la BsPYNPase. Ainsi, le $C^{\gamma 2}$ de la valine 241 se trouve à 4,4 Å de l'atome de chlore du TPI alors qu'une distance d'environ 6 Å le séparerait du carbone en position 5 de l'uracile. Néanmoins, par analogie, le méthyle de la thymine pourrait occuper la même position et ainsi réaliser des interactions similaires avec les chaînes hydrophobes de cette poche.

La partie 2-iminopyrrolidinyle du TPI est engagée dans deux liaisons hydrogène, une avec la sérine 117 du domaine α/β et une autre avec une des molécules d'eau qui occupent le site de fixation du phosphate. Les molécules d'eau W1 et W2 miment les atomes d'oxygène du phosphate présent dans la cristallisation de BsPYNPase. La position et l'orientation du phosphate pourraient être importantes pour la réaction enzymatique.

Parmi les quatre acides aminés tapissant la poche hydrophobe située en face de la position 5 de la base, seule la valine 241 n'est pas conservée dans les enzymes bactériennes (EcTPase et BsPYNPase). A sa place on trouve une phénylalanine (F210 chez *E. coli* et F207 pour la BsPYNPase). La distance entre le carbone $C^{\epsilon 2}$ de la phénylalanine et le carbone C^5 de la

¹³¹ M. Schwartz, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 191-8.

¹³² C. Deves, D. C. Rostirolla, L. K. B. Martinelli, C. V. Bizarro, D. S. Santos, L. A. Basso, *Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 592-604.

pyrimidine n'est pas suffisante pour que le méthyle de la thymine puisse se loger dans la poche hydrophobe sans une importante répulsion stérique à moins que le noyau phényle réalise une rotation de 90° autour de la liaison $C^{\beta}-C^{\gamma}$. La flexibilité permise par cette rotation explique pourquoi l'EcTPase et la BsPYNPase peuvent accepter à la fois l'uracile et la thymine comme substrats sans que cela ne nécessite une importante restructuration du site actif.^{124,125}

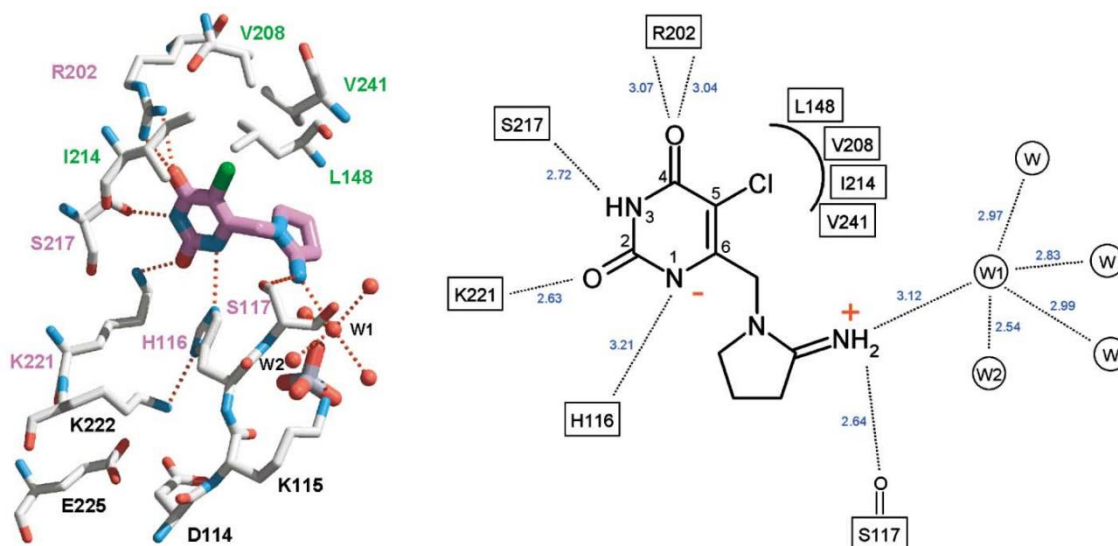


Figure 17 : Représentations du TPI dans le site actif de l'HuTPase.¹²⁵

II.C.3.c. HuTPase-thymine et 5-iodouracile

La co-cristallisation de l'HuTPase avec la thymine¹²⁸ puis le 5-iodouracile,¹²⁹ un inhibiteur de la TPase à l'activité plus faible que le TPI, appuient les observations de Norman *et al.*¹²⁵

Les structures secondaires obtenues avec la thymine et le 5-iodouracile sont sensiblement les mêmes que celle obtenue lors de la co-cristallisation avec le TPI (figure 18). Au niveau des interactions avec le site catalytique, les liaisons hydrogène présentes avec les résidus du site actif sont plus ou moins les mêmes (arginine 202, sérine 217, lysine 221 et histidine 116), sauf que la sérine 117 n'interagit pas avec le 5-iodouracile. Enfin, l'atome d'iode se place dans la même poche hydrophobe que l'atome de chlore du TPI.

Pour finir, l'étude d'El Omari *et al.*¹²⁸ a permis de mettre en évidence une densité électronique dans le site actif non observée jusqu'à présent. Elle est située à environ 3,5 Å de l'azote N^1 de la thymine, à proximité des résidus tyrosine 199, sérine 117 et glycine 152 et ne chevauche pas la position du TPI. Cette meilleure connaissance des résidus du site catalytique de l'enzyme pourra être mise à profit pour le développement d'inhibiteurs analogues de la thymine, en ajoutant des substituants susceptibles d'aller interagir avec les résidus localisés dans cette région par exemple.

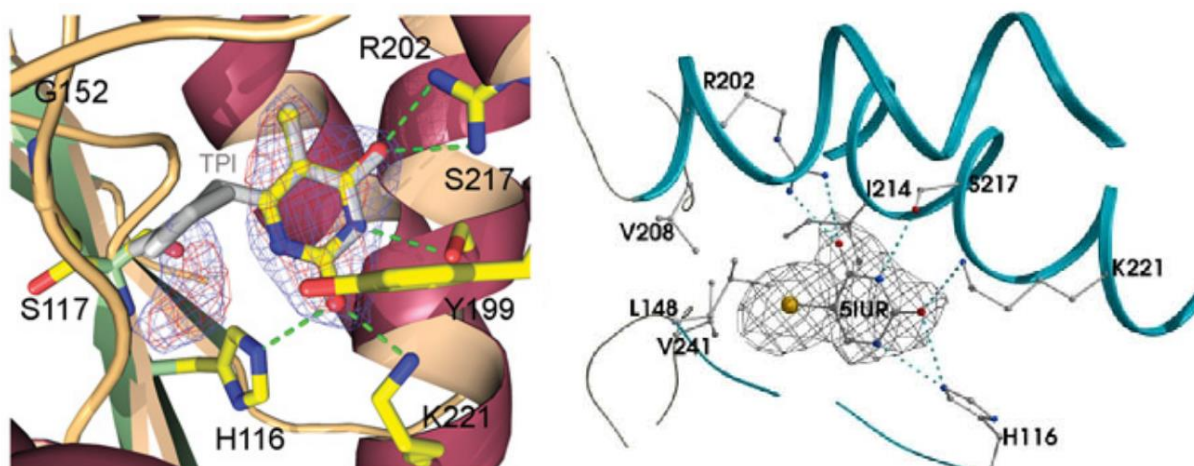


Figure 18 : Représentation de la thymine¹²⁸ (à gauche, superposée au TPI) et du 5-iodouracile¹²⁹ (à droite) dans le site actif de l'HuTPase.

II.C.4. Mécanisme de la réaction

Les réactions mettant en jeu la rupture de la liaison C-N ribosidique sont caractérisées par la présence d'une structure oxacarbenium ou assimilée, que ce soit sous la forme d'un intermédiaire réactionnel (dans le cas d'un mécanisme séquentiel), ou d'un état de transition (pour un mécanisme concerté).¹³³ La plupart de ces réactions suivent un mécanisme concerté de type S_N2 avec un état de transition très dissociatif. Toutefois, les réactions avec les 2-désoxyriboses sont l'exception et se font généralement *via* un mécanisme de type S_N1.¹³⁴ Concernant la TPase, deux théories s'opposent actuellement, celle du mécanisme S_N1 avec un passage par un intermédiaire oxacarbenium (schéma 7) et celle du mécanisme S_N2, avec un état de transition mimant un ion oxacarbenium (figure 20).

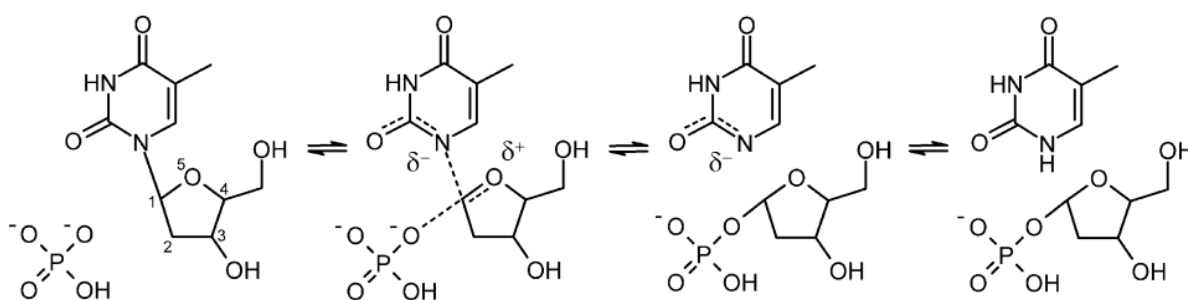


Schéma 7 : Phosphorolyse de la thymidine suivant un mécanisme de type S_N1.¹²⁵

Plusieurs auteurs soutiennent l'idée d'un mécanisme de type S_N1.^{124,135} Après avoir effectué la cristallisation de la BsPYNPase avec la pseudouridine, Pugmire *et al.* ont suggéré que la liaison de la base au site catalytique se fait dans une configuration hautement énergétique, où on observe une délocalisation d'électrons depuis le ribose vers la base. Cette délocalisation serait

¹³³ P. J. Berti, K. S. Tanaka, *Adv. Phys. Org. Chem.* **2002**, 37, 239-314.

¹³⁴ P. A. Schwartz, M. J. Vetticatt, V. L. Schramm, *Biochemistry* **2011**, 50, 1412-20.

¹³⁵ J. Mendieta, S. Martin-Santamaria, E.-M. Priego, J. Balzarini, M.-J. Camasara, M.-J. Pérez-Pérez, F. Gago, *Biochemistry* **2004**, 43, 405-14.

équilibrée par la formation d'un intermédiaire oxacarbénium chargé positivement et avec départ de la thymine chargée négativement. Le phosphate se lie ensuite à l'ion oxacarbénium tandis que la thymine est reprotonée par l'histidine 82 (schéma 7).

Le rôle de cet acide aminé, que l'on retrouve dans toutes les pyrimidines nucléosides phosphorylases, a été analysé chez *E. coli* par Mendieta *et al.*¹³⁵ Les auteurs suggèrent que cette histidine (H85 chez *E. coli*) forme une liaison hydrogène avec l'oxygène en position 2 de la base, ce qui contribue à affaiblir la liaison ribosidique, à faire de la pyrimidine un meilleur groupe partant et à stabiliser l'état de transition. Dans la structure cristallisée de l'HuTPase avec le TPI de Norman *et al.*,¹²⁵ sachant que le TPI est sous forme zwitterion au pH physiologique et donc que l'atome d'azote en position 1 du TPI est déprotoné, l'histidine (H116 chez l'homme) réalise une liaison hydrogène avec de dernier. En se basant sur ces observations, Reigan *et al.* ont proposé un état de transition de l'HuTPase (figure 19).¹³⁶

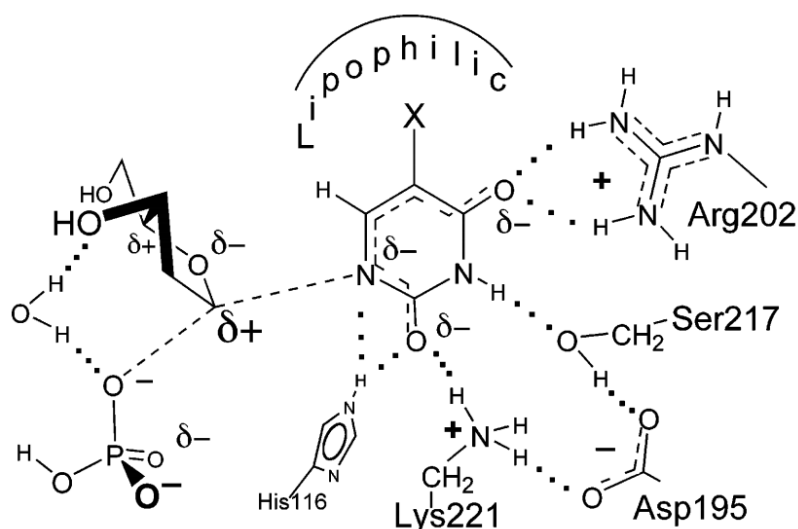


Figure 19 : Etat de transition du mécanisme de type S_N1 proposé par Reigan *et al.*¹³⁶

La théorie du passage par un mécanisme S_N2 s'appuie essentiellement sur les travaux de Schwartz *et al.* basés sur l'effet isotopique cinétique.¹³⁴ Cette méthode consiste à effectuer une réaction chimique avec différents substrats se différenciant par des modifications isotopiques. Les modifications de la cinétique de la réaction provoquées par ces variations isotopiques, quoique faibles, sont mesurables et permettent de déterminer le mécanisme de la réaction. L'analyse de Schwartz *et al.* est basée sur une arsénolyse de la thymidine par l'HuTPase car l'arsénate est un analogue du phosphate donnant un produit rapidement hydrolysé, le 2-désoxyribose-1-arsénate, ce qui permet de s'affranchir de la réaction inverse.¹³⁷ Selon cette étude, le mécanisme serait concerté avec un état de transition dissociatif mimant un oxacarbénium (figure 20) dans lequel l'histidine 116 interagit avec les deux substrats à la fois. Ces interactions permettent de stabiliser le groupement partant et l'état de transition et elles sont similaires à celles relevées chez *E. coli*.¹³⁵ Lors de l'attaque du nucléophile, la thymine est

¹³⁶ P. Reigan, P. N. Edwards, A. Ggaj, C. Cole, S. T. Barry, K. M. Page, S. E. Ashton, R. W. A. Luke, K. Y. Douglas, I. J. Stratford, M. Jaffar, R. A. Bryce, S. Freeman, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 392-402.

¹³⁷ R. E. Parks Jr., R. P. Agarwal, 3rd ed. in *The Enzymes* **1972**, *7*, 483-514.

éjectée sous forme anionique et n'est protonée qu'une fois séparée du ribose. Les interactions thymidine-phosphate étant faibles au niveau de l'état de transition proposé et les cinétiques expérimentales de la phosphorolyse et de l'arsénolyse étant très similaires, la légère différence de réactivité chimique entre les ions phosphate et arsénate ne devrait pas influencer fortement sur le mécanisme. Au contraire, la réactivité semble davantage liée à la vitesse de migration du nucléoside activé vers le nucléophile, processus que l'on retrouve chez les *N*-ribosyltransférases. Le rôle du phosphate se limiterait ainsi à faciliter la fixation de la thymidine et à stabiliser l'état de transition.

La même équipe avait précédemment proposé un état de transition de type S_N2 mais aux caractéristiques différentes.¹³⁸ Selon les auteurs, ces différences sont certainement causées par la présence de purification tags qui étaient alors présents sur la protéine purifiée. En se basant sur cette première étude mécanistique, Evans *et al.* ont proposé récemment la synthèse et l'évaluation de structures mimant un état de transition de type S_N2 mais sans caractère ribocationique.¹³⁹ En effet, dans leurs structures, le ribose est remplacé par un cyclopentane substitué par un groupement phosphonoalkyle, il n'y a donc pas délocalisation de charge positive possible sur le carbone C_1' du cyclopentane. Ces analogues se sont révélés inactifs, ce qui va dans le sens des derniers résultats de Schwartz *et al.* où l'état de transition possède un fort caractère ribocationique.

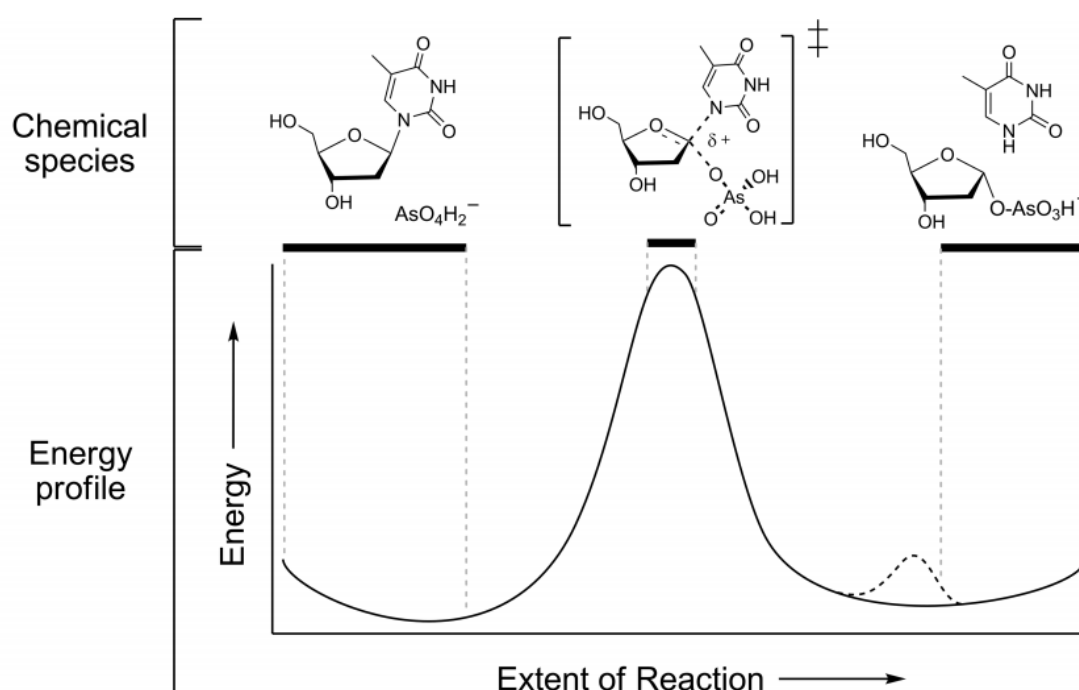


Figure 20 : Arsénolyse de la thymidine suivant un mécanisme de type S_N2 .¹³⁴

L'étude cinétique d'inhibiteurs sous forme zwitterion de la TPase par Jain *et al.* conforte la théorie du mécanisme de type S_N2 .¹⁴⁰ En effet, leurs résultats suggèrent que le phosphate se lie en premier, puis l'inhibiteur, pour former au final un complexe ternaire inactif avec l'enzyme.

¹³⁸ M. R. Birck, V. L. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2447-53.

¹³⁹ G. B. Evans, G. J. Gainsford, V. L. Schramm, P. C. Tyler, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 406-9.

¹⁴⁰ H. V. Jain, R. Rasheed, T. I. Kalman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1648-51.

Les inhibiteurs de ce type interagiraient donc avec un complexe préformé TPase-phosphate, plutôt qu'en tant que mime d'un état de transition oxacarbénium, comme cela avait été proposé pour le TPI. Le site de liaison du phosphate étant plutôt chargé positivement, le placement préalable du phosphate faciliterait l'approche d'inhibiteurs possédant un groupement latéral chargé positivement. Les inhibiteurs sous forme de zwitterion fonctionneraient alors comme des chélateurs de phosphate, idée déjà évoquée par Schwartz *et al.*¹³⁸

III. Inhibiteurs de la TPase

Les différents inhibiteurs de la TPase décrits dans la littérature vont être présentés en fonction de leur mode d'action. Les inhibiteurs mono-substrat ciblent essentiellement le site de fixation de la thymidine, tandis que les inhibiteurs bi-substrats visent à interagir à la fois avec le site de la thymidine et avec celui du phosphate. Nous aborderons en dernier les inhibiteurs qui n'entrent pas en compétition avec les substrats de l'enzyme, ou dont le mode d'action reste à déterminer.

III.A. Inhibiteurs mono-substrat

En ce qui concerne les inhibiteurs mono-substrat, destinés à interagir avec le site de liaison de la thymidine, nous évoquerons successivement ceux basés sur le motif pyrimidinedione, les analogues de la thymidine et enfin, les autres structures existantes.

III.A.1. Inhibiteurs de type pyrimidinedione

III.A.1.a. Inhibiteurs de première génération

En 1954, Friedkin et Roberts ont constaté que la thymine provenant de la phosphorylation de la thymidine est capable d'inhiber l'enzyme.¹⁴¹ Forts de ce constat, Langen *et al.* ont synthétisé et évalué les premiers inhibiteurs à la fin des années 1960.¹⁴² Ces derniers ont considéré que le motif imide (carbonyle en position 2 - NH en position 3 - carbonyle en position 4), présent sur les deux substrats thymine et thymidine, devait être important pour la reconnaissance par l'enzyme et l'ont donc conservé. Parmi les dérivés pyrimidiques synthétisés, la 6-aminothymine (6AT) et le 6-amino-5-bromouracile (6A5BrU) sont les plus actifs et se comportent comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de la thymidine mais pas vis-à-vis du phosphate (figure 21). Testés alors sur une TPase extraite du foie de cheval, leur CI_{50} (concentration inhibitrice à 50 %) est de l'ordre de 50 μ M. Le 6A5BrU a plus tard été évalué sur l'HuTPase et l'EcTPase, pour lesquelles son CI_{50} est plus proche de 10 μ M, et reste aujourd'hui un inhibiteur de référence.

Ce n'est qu'à partir des années 1990, avec la publication de la première structure cristallographique de l'EcTPase, que l'on a commencé à rationaliser le développement d'inhibiteurs de la TPase. Notamment, la présence d'une poche hydrophobe en face de la position 5 de la thymidine permet d'expliquer la bonne affinité des inhibiteurs de type 5-halouraciles vis-à-vis de la TPase.¹²³ Une autre poche a également été mise en évidence face à la position 6.¹²⁸ Depuis, la synthèse de nouveaux inhibiteurs a surtout été guidée par l'ajout de substituants sur les positions 5 et 6 afin de remplir ces diverses poches présentes dans le site actif et ainsi d'interagir avec les résidus qui les tapissent.

¹⁴¹ M. Friedkin, D. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 245-56.

¹⁴² P. Langen, G. Etzold, D. Bärwolff, B. Preussel, *Biochem. Pharmacol.* **1967**, *16*, 1833-7.

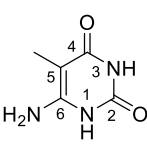
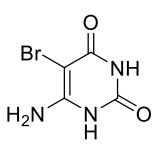
		
CI ₅₀ (μM)	6AT	6A5BrU
TPase foie de cheval	70 ¹⁴²	30 ¹⁴²
HuTPase	-	6,8 ¹³⁶ K _i = 2,6 ¹⁴⁵
EcTPase	-	1,6 ¹³⁶

Figure 21 : Structure et activité de la 6AT et du 6A5BrU.

III.A.1.b. La 7-déazaxanthine et ses analogues

Une idée intéressante pour remplir l'espace situé au niveau des positions 5 et 6 de la thymidine est d'adjoindre un second cycle sur un dérivé pyrimidique, comme c'est le cas pour la 7-déazaxanthine (7DX), dont l'activité en tant qu'inhibiteur compétitif vis-à-vis de la thymidine a été décrite par Balzarini *et al.* (figure 22).¹⁴³ Pour cet hétérocycle, le noyau pyrrole vient se placer à proximité de la phénylalanine 121 de l'EcTPase (correspondant à F207 chez BsPYNPase et à la valine 241 chez l'HuTPase). La 7DX peut alors réaliser des interactions de Van der Waals avec les résidus hydrophobes de cette région mais également une liaison hydrogène avec la thréonine T118,¹⁴⁴ ce qui lui confère une CI₅₀ légèrement plus faible que celle du 6A5BrU (40 μM selon Balzarini *et al.*, mais ré-évaluée à 6 μM dans l'étude comparative de Nencka *et al.*¹⁴⁵) ainsi que des propriétés anti-angiogéniques *ex vivo*.¹⁴³ Dans la même optique, Hirota *et al.* ont synthétisé des dérivés substitués sur la position 7 à l'activité équivalente à celle de la 7DX, en particulier la 7-(2-aminométhyl)-déazaxanthine dont la CI₅₀ est de 44 μM sur la HuTPase placentaire.¹⁴⁶

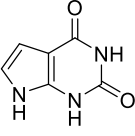
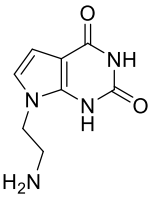
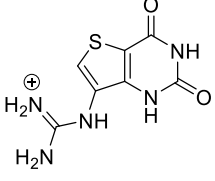
		
7-déazaxanthine (7DX) CI ₅₀ = 40 μM (EcTPase) ¹⁴³	7-(2-aminoéthyl)-déazaxanthine CI ₅₀ = 44 μM (HuTPase) ¹⁴⁶	Thiénopyrimidinyl guanidine K _i = 76 μM (HuTPase) ¹⁴⁸

Figure 22 : Structure et activité de la 7DX et de plusieurs analogues.

Avant la publication de la structure de l'HuTPase en 2004, celle de la BsPYNPase avec la pseudo-uridine dans sa forme fermée était utilisée pour les études de docking. En se basant sur

¹⁴³ J. Balzarini, A. E. Gamboa, R. Esnouf, S. Liekens, J. Neyts, E. De Clercq, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 91-5.

¹⁴⁴ H. Bera, A. V. Dolzhenko, L. Sun, S. D. Gupta, W.-K. Chui, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82*, 351-60.

¹⁴⁵ V. A. McNally, A. Gbaj, K. T. Douglas, I. J. Stratford, M. Jaffar, S. Freeman, R. A. Bryce, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3705-9.

¹⁴⁶ K. Hirota, M. Sawada, H. Sajiki, M. Sako, *Nucleic Acides Symp. Ser.* **1997**, *37*, 59-60.

l'activité du TPI alors récemment développé par Fukushima *et al.*,¹⁴⁷ des dérivés bicycliques comportant une fonction guanidine ont été synthétisés.¹⁴⁸ Bien qu'une étude préliminaire de modélisation moléculaire ait prévu une bonne activité pour ces composés, le fragment thiényropyridinyle se superposant très bien au TPI, leur évaluation biologique sur l'enzyme s'est révélée peu concluante. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence d'activité était due à une moins bonne désolvatation de leurs composés provoquée par l'hydrophilie plus importante que confère la guanidine par rapport à l'amidine du TPI.

III.A.1.c. Substitution de la position 6

Lorsque la thymidine se fixe à son site de liaison, sa position 6 fait face à un espace libre qui peut être rempli par divers modes de substitution de cette position. Les plus utilisés consistent à substituer l'amine d'un dérivé comme la 6AT (figure 21) ou bien à coupler une base pyrimidique avec un petit hétérocycle *via* un pont méthylène, comme dans le cas du TPI (schéma 8).

Aminouraciles N⁶-substitués

L'un des premiers inhibiteurs de cette série, le 6-(2-aminoéthylamino)-5-chlorouracile (AEAC), possède une activité plus de cinquante fois plus importante sur l'HuTPase que le 6A5BrU (figure 23).¹⁴⁹ La basicité du bout de chaîne greffée en position 6 semble importante pour l'activité, vu que l'analogue 6-aminoéthanol est inactif. En 2009, l'AEAC a fait l'objet d'une étude dans laquelle il a présenté des effets anti-angiogéniques seul et en combinaison avec l'aflibercept, à la fois *in vitro* et *in vivo*.¹⁵⁰ Une autre série, comportant un groupement phénylalkylamino sur la position 6, a été étudiée par Focher *et al.*¹⁵¹ Dans un criblage réalisé par les auteurs, le 6-(4-phénylbutylamino)uracile (PBAU) a présenté une activité plus forte que la 6AT sur l'HuTPase, sa CI₅₀ a été évaluée à 30 μ M (figure 23).

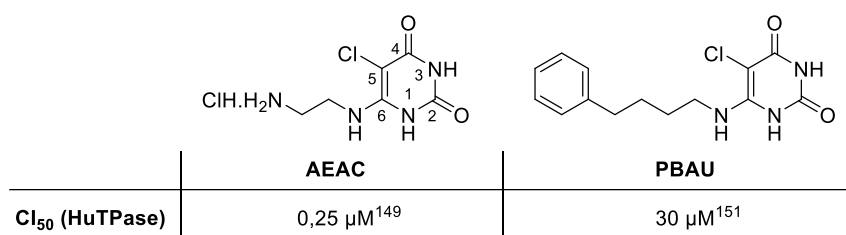


Figure 23 : Structure et activité de l'AEAC et du PBAU.

¹⁴⁷ M. Fukushima, N. Suzuki, T. Emura, S. Yano, H. Kazuno, Y. Tada, Y. Yamada, T. Asao, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1227-36.

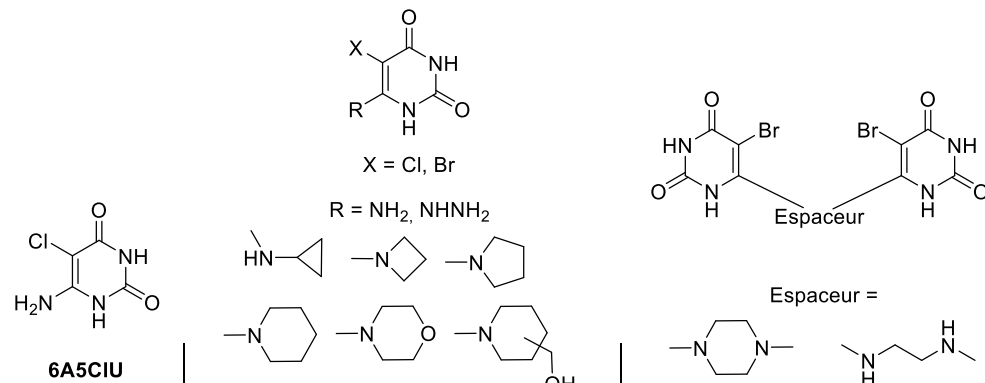
¹⁴⁸ M. L. P. Price, W. C. Guida, T. E. Jackson, J. A. Nydick, P. L. Gladstone, J. C. Juarez, F. Donate, R. J. Ternansky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 107-10.

¹⁴⁹ R. S. Klein, M. Lenzi, T. H. Lim, A. Hotchkiss, P. Wilson, E. L. Schwartz, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1257-63.

¹⁵⁰ H. Lu, R. S. Klein, E. L. Schwartz, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5136-44.

¹⁵¹ F. Focher, D. Ubiali, M. Pregnotato, C. Zhi, J. Gambino, G. E. Wright, S. Spadari, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2601-7.

Quelques années après, Nencka *et al.* ont synthétisé de nombreux analogues possédant des amines secondaires ou tertiaires en position 6 de l'uracile et les ont testés sur trois TPases différentes (l'EcTPase, l'HuTPase placentaire et une HuTPase exprimée dans les cellules de hamster chinois V79).¹⁵² Tous ces composés se sont révélés être de bons inhibiteurs, avec des activités proches de celles des composés 6A5BrU et 6-amino-5-chlorouracile (6A5ClU), au groupement amino non substitué (figure 24). Dans l'ensemble, les dérivés bromés sont plus actifs que leurs analogues chlorés. Les auteurs ont également synthétisé des dimères constitués de deux bromouraciles reliés par un espaceur pipérazine-1,4-diyle ou éthylènediamino. Leur activité est supérieure à celle du 6A5ClU et celles de la plupart des autres dérivés de l'étude, leur CI₅₀ sur l'HuTPase placentaire étant respectivement de 3,6 et 2,2 μ M (figure 24).



CI ₅₀ (μ M)	6A5ClU	R = NH ₂ , NHNH ₂		Espaceur =	
EcTPase	4	4,3 - 12,1		2,3	2,5
HuTPase (cellules V79)	11,6	3,8 - 15,7		4,0	3,4
HuTPase (placentaire)	8,3	3,5 - 11,6		3,6	2,2

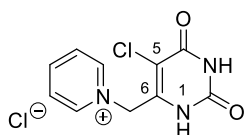
Figure 24 : Structure et activité des dérivés de Nencka *et al.*¹⁵²

Dérivés 6-aminométhyluraciles

La synthèse de structures de type 6-aminométhyluracile a constitué une approche particulièrement efficace pour remplir la poche en face de la position 6. Divers analogues du 6A5ClU ont été obtenus par substitution de l'uracile sur les positions N¹ ou C⁶ par une chaîne alkyle se terminant par un pyridinium.¹⁵³ Seuls les analogues de type 6-pyridiniumméthyle ont montré une bonne activité sur l'EcTPase, jusqu'à 5 fois supérieure à celle du 6A5BrU (figure 25).

¹⁵² R. Nencka, I. Votruba, H. Hrebabecky, E. Tloust'ova, K. Horska, M. Masojdkova, A. Holy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1335-7.

¹⁵³ P. E. Murray, V. A. McNally, S. D. Lockyer, K. J. Williams, I. J. Stratford, M. Jaffar, S. Freeman, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 525-30.



$Cl_{50} = 230 \mu M$ (EcTPase)
(1100 μM pour le 6A5BrU dans cette étude)

Figure 25 : Structure et activité du 6-pyridiniumméthyle-5-chlorouracile.¹⁵³

Le pont méthylène a été largement utilisé pour la pharmacomodulation au niveau de la position 6, car ce linker octroie une bonne flexibilité à l'inhibiteur et favorise ainsi les interactions avec les résidus tapissant le site catalytique. Comme précédemment, la présence d'un halogène en position 5 a été déterminante pour améliorer le potentiel d'inhibition. En effet, cet atome électroattracteur augmente l'acidité du NH en position 1, ce qui permet à l'azote chargé négativement d'interagir davantage avec les acides aminés donneurs de liaison hydrogène situés à proximité. En outre, un substituant adéquat en position 5 pourra réaliser des interactions de Van der Waals avec les chaînes latérales des résidus de la poche hydrophobe avoisinante. Ainsi, parmi les nombreux dérivés qui ont été synthétisés par Fukushima *et al.*, figure le plus puissant inhibiteur de la TPase décrit à ce jour, le TPI (chlorhydrate de tipiracile ou 5-chloro-6-(2-iminopyrrolidin-1-yl)méthyl-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidinedione), qui inhibe l'HuTPase placentaire avec une K_i de 0,017 μM (figure 26).^{100,147} Il n'est en revanche pas actif sur l'uridine phosphorylase.¹⁴⁷

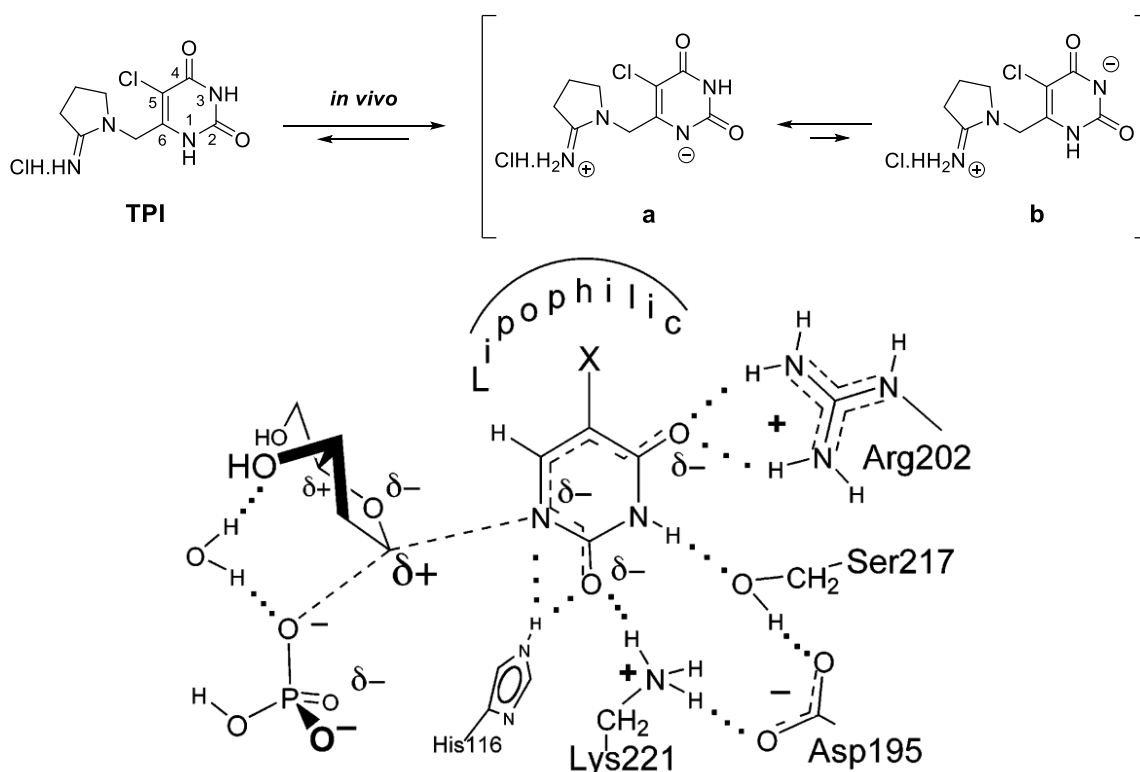


Schéma 8 : Formes zwitterion du TPI à pH physiologique (haut) et état de transition proposé de type S_N1 par Reigan *et al.*¹³⁶ (bas).

Le TPI est constitué d'un 5-chlorouracile et d'une amidine cyclique reliés par un pont méthylène. Le pKa de l'amidine est de 8,4 à température ambiante, ce qui fait qu'elle reste

protonée à pH physiologique, alors que l'uracile est déprotoné, son pKa étant de 6,05. Par conséquent, à pH physiologique, le TPI se trouve essentiellement sous forme de zwitterion, avec une charge positive sur l'amidine et une charge négative sur l'un des azotes de l'uracile (forme zwitterion **a** ou **b**, schéma 8). Cependant, la forme **a** semble plus favorable pour se lier à l'enzyme car une charge négative en position 3 serait repoussée par l'hydroxyle de la sérine 217. Au niveau de l'uracile, la forme zwitterion favorise la formation de liaisons hydrogène avec des résidus cationiques comme l'arginine 202 et la lysine 221, tandis que du côté de l'amidine, elle interagit avec le phosphate dianionique ou des molécules d'eau (schéma 8). Ces nombreuses interactions expliquent la très forte affinité du TPI pour l'enzyme. De plus, sous sa forme zwitterion, le TPI se lie à l'enzyme en mimant la structure oxacarbénium caractérisant le mécanisme de la phosphorolyse (qu'il soit plutôt de type S_N1 ou S_N2).

Plusieurs études ont montré l'activité anti-angiogénique du TPI. Un exemple d'essai *in vivo* est celui de Matsushita *et al.*,¹⁵⁴ qui ont analysé l'effet du TPI sur des cellules humaines de carcinome épidermoïde KB surexprimant la TPase. Dans leur étude, le TPI inhibe la migration et l'invasion de la membrane basale par ces cellules. D'autres travaux montrent que l'administration de doses de 50 mg/kg/jour de TPI à des souris « nude » xénogreffées permet de réduire la croissance tumorale, de favoriser la mort des cellules tumorales par apoptose et de supprimer la formation de métastases hépatiques.¹⁰⁰

Après les résultats très encourageants obtenus avec le TPI, Yano *et al.* ont réalisé la synthèse d'autres analogues portant un groupement aminométhyle en position 6 (figure 26).^{155,156} Ceux où l'azote extracyclique est inclus dans un petit hétérocycle de type azétidine, pyrrolidine ou imidazole ont une activité de l'ordre du micromolaire sur l'HuTPase placentaire. En revanche, les molécules portant une fonction guanidine linéaire ou cyclique se sont révélées beaucoup plus actives (CI₅₀ = 0,013 - 0,087 µM). Le bromhydrate comportant une fonction guanidine cyclique possède une activité légèrement plus grande que le TPI, mais malgré un bon profil pharmacocinétique, son développement n'a pas été poursuivi en raison de difficultés de synthèse. Dans cette série, seul le TPI fera l'objet de tests cliniques.

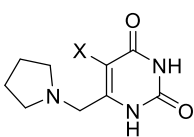
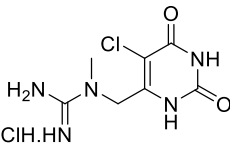
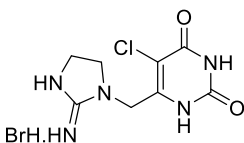
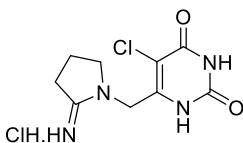
					
	X = Cl	X = Br			TPI
CI ₅₀ (µM) ¹⁵⁶	2,2	0,51	0,031	0,013	0,035 ¹⁴⁷
HuTPase					(K _i = 0,017 µM) ¹⁴⁷

Figure 26 : Structure et activité du TPI et des analogues de Yano *et al.*

¹⁵⁴ S. Matsushita, T. Nitanda, T. Furukawa, . Sumizawa, A. Tani, K. Nishimoto, S. Akiba, K. Miyadera, M. Fukushima, Y. Yamada, H. Yoshida, T. Kanzaki, S. Akiyama, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1911-6.

¹⁵⁵ S. Yano, H. Kazuno, N. Suzuki, T. Emura, K. Wierzbza, J. Yamashita, Y. Tada, Y. Yamada, M. Fukushima, T. Asao, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3431-41.

¹⁵⁶ S. Yano, H. Kazuno, N. Suzuki, T. Emura, K. Wierzbza, J. Yamashita, Y. Tada, Y. Yamada, M. Fukushima, T. Asao, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3443-50.

En 2005, des analogues de type aminoimidazoyluracile ont été évalués par Reigan *et al.*¹³⁶ Pour les plus actifs d'entre eux, où l'imidazole est substitué par un groupement amino en position 2, l'activité est comparable à celle du TPI à la fois sur l'EcTPase et l'HuTPase (figure 27). De manière similaire au TPI, leur fonction basique protonée au pH physiologique permet des interactions importantes avec le phosphate dianionique tandis que l'halogène en position 5 renforce les liaisons hydrogène entre la pyrimidine et les résidus du site catalytique (acide aspartique 209, sérine 217, lysine 221 et histidine 116). L'inhibiteur le plus puissant de cette série, le 5-bromo-6-[(2'-aminoimidazol-1'-yl)méthyl]uracile, possède une activité équivalente à celle du TPI, mais présente malheureusement un mauvais profil pharmacocinétique.

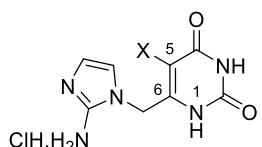
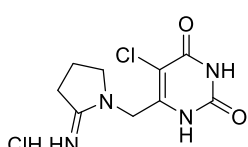
			
Cl ₅₀ (μM)	X = Cl	X = Br	TPI
EcTPase	0,021	0,019	< 0,020
HuTPase	0,049	0,019	0,023

Figure 27 : Structure et activité des composés de Reigan *et al.* et du TPI.¹³⁶

Kalman *et al.* ont également préparé des composés mimant la structure oxacarbénium caractéristique du mécanisme de la réaction de phosphorolyse.¹⁵⁷ Leurs composés sont des uraciles fluorés ou non sur la position 5 et substitués par un chaîne aminométhyle en position 6, protonée à pH physiologique (figure 28). Le composé le plus actif est le 5-fluoro-6-imidazoylméthyluracile (IFU), un uracile fluoré portant un imidazoylméthyle en position 6, avec une K_i de 0,051 μM sur l'EcTPase. Son équivalent non fluoré est cent fois moins actif. Cet effet semble dû à la différence de pK_a entre les deux composés, un pK_a plus faible favorisant la forme zwitterion qui, comme dans le cas du TPI, réalise de fortes interactions avec le site actif. Le pouvoir d'inhibition de l'IFU a encore été amélioré lors de travaux ultérieurs, en remplaçant l'imidazole par l'aminoimidazole, plus basique.¹⁴⁰ Ce nouvel analogue, le 5-fluoro-6-aminoimidazoylméthyluracile (AIFU, figure 28), est près de cinq fois plus actif que l'IFU (K_i = 0,011 et 0,017 μM pour l'EcTPase et l'HuTPase respectivement), et d'activité comparable aux équivalents chlorés et bromés de Reigan *et al.*¹³⁶

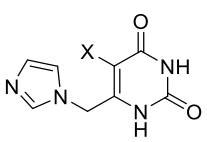
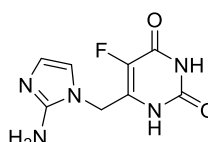
			
	X = H	X = F	AIFU
K _i (μM) EcTPase	4,7	0,051	0,011

Figure 28 : Structure et activité de l'IFU¹⁵⁷ et de l'AIFU.¹⁴⁰

¹⁵⁷ T. I. Kalman, L. Lai, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2005**, *24*, 367-73.

Toujours dans la même optique, McNally *et al.* ont testé des dérivés portant un imidazole *N*-méthylé en position 6.¹⁵⁸ Les analogues *N*-méthylimidazoyleméthyluracile sont les plus actifs, avec un pouvoir d'inhibition qui reste tout de même un peu plus faible que celui du TPI ($CI_{50} = 17 - 60 \mu M$ sur l'HuTPase, figure 29). Encore une fois, la présence d'un groupement hydrophobe et électroattracteur en position 5 induit une augmentation significative de l'activité, pour les mêmes raisons que celles évoquées pour le TPI. Le docking de ces inhibiteurs dans le site actif de l'HuTPase montre qu'ils réalisent à peu près les mêmes interactions que le TPI (liaisons hydrogène avec les acides aminés R202, K221, S217 et H116, interactions hydrophobes entre le substituant en position 5 et les résidus de la poche hydrophobe située à proximité), avec une différence notable au niveau du cycle imidazole. Effectivement, le *N*-méthylimidazole ne peut pas réaliser d'interactions ioniques avec le phosphate, mais pourrait en revanche réaliser des forces de Van der Waals avec la leucine 148 et la valine 241 du site catalytique. La différence d'activité qui est observée par rapport au TPI s'explique en grande partie par ces plus faibles interactions au niveau du cycle azoté, l'amidine cyclique du TPI positionnant sa charge positive bien plus près de la poche accueillant le phosphate dianionique que les dérivés de McNally *et al.*¹⁵⁸ En outre, l'amidine cyclique étant légèrement moins rigide que le cycle imidazole, elle permet un positionnement plus optimal dans le site catalytique.

	X = H	X = Me	X = Cl	X = Br
$CI_{50} (\mu M)$ HuTPase	42	60	18	17

Figure 29 : Structure et activité des analogues de McNally *et al.*¹⁵⁸

III.A.1.d. Substitution de la position 5

Contrairement à la substitution de la position 6 de l'uracile, celle de la position 5 a fait l'objet d'une pharmacomodulation peu intensive, avec essentiellement l'introduction d'un méthyle ou d'un halogène. Les travaux précurseurs de Baker *et al.*¹⁵⁹ à la fin des années 1960 ont montré que pour réaliser des interactions hydrophobes avec l'enzyme, la position 6 offrait plus de possibilités de substitution que la position 5. Il en ressortait aussi que la présence d'un groupement électroattracteur et, dans une moindre mesure, hydrophobe sur cette dernière position améliorait l'activité. Par conséquent, très peu d'études ont par la suite reconsidéré la substitution de la position 5 par des groupements plus variés.

En 2007, Nencka *et al.*¹⁶⁰ ont cependant travaillé sur des 6-chlorouraciles portant des groupements hydrophobes en position 5 et ont évalué leur activité sur une HuTPase exprimée dans des cellules de hamster chinois V79 et une HuTPase placentaire et en prenant comme

¹⁵⁸ V. McNally, M. Rajabi, A. Gbaj, I. J. Stratford, P. N. Edwards, K. T. Douglas, R. A. Bryce, M. Jaffar, S. Freeman, *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 537-47.

¹⁵⁹ B. R. Baker, M. Kawazu, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 304-11.

¹⁶⁰ R. Nencka, I. Votruba, H. Hrebabecky, P. Jansa, E. Tloust'ova, K. Horska, M. Masojidkova, A. Holy, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6016-23.

inhibiteur de référence le TPI (figure 30). Ils ont observé une augmentation de l'activité avec l'homologation de la chaîne carbonée en position 5 (hexyle > butyle > éthyle). L'activité est légèrement meilleure lorsque l'on diminue la flexibilité en introduisant une insaturation dans la chaîne carbonée ou qu'elle est cyclisée. La substitution par de petits cycles aromatiques donne des résultats similaires. Les meilleurs inhibiteurs ont toutefois une activité dix fois plus faible par rapport au TPI sur les deux TPases humaines. Remplacer l'atome de chlore par un fluor ou un brome n'améliore pas l'activité, et passer d'un halogène à un groupement aminé n'a pas d'effet notable.

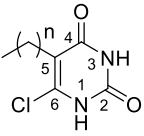
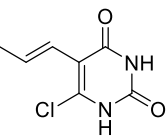
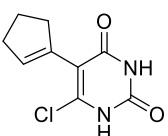
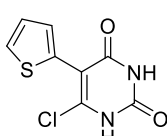
K_i (μM)	 $n = 1 - 6$			
HuTPase (cellules V79)	5,81 - 1,06	1,17	0,20	0,28
HuTPase (placentaire)	4,02 - 1,60	1,21	0,29	0,54

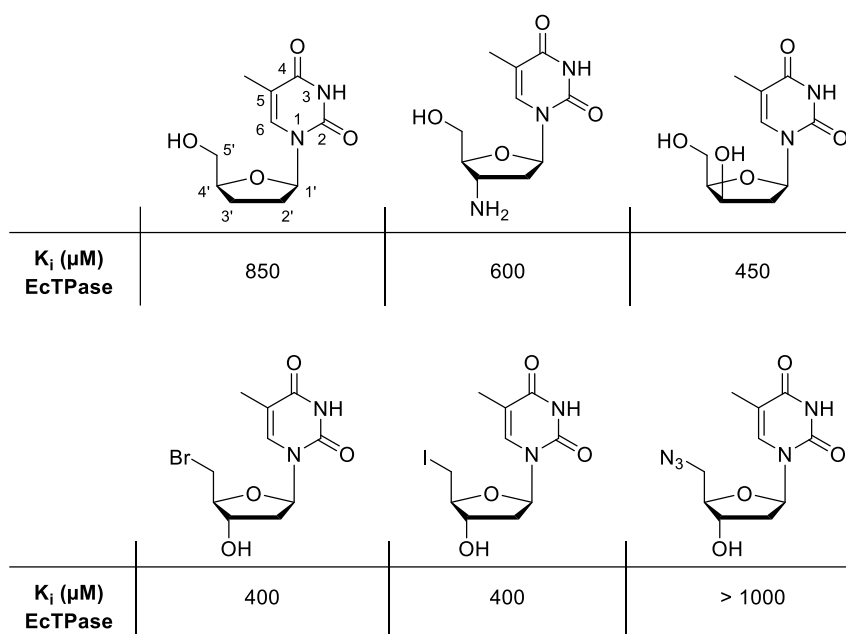
Figure 30 : Structure et activité des composés de Nencka *et al.*¹⁶⁰

III.A.2. Analogues de la thymidine

Peu d'études ont cherché à synthétiser des inhibiteurs mono-substrat de TPase en conservant le ribose du substrat naturel à cause du manque d'informations disponibles sur les interactions entre le ribose et le site actif de l'enzyme, et car la synthèse de nucléosides s'avère souvent plus délicate que celle des bases correspondantes.

Pour pallier cette lacune, Panova *et al.* ont analysé l'effet de diverses modifications du ribose sur la réaction catalytique de la TPase (figure 31).¹⁶¹ La synthèse puis l'évaluation d'analogues de la thymidine sur l'EcTPase a mis en évidence l'importance de l'hydroxyle en position 3' pour la reconnaissance par l'enzyme et pour le mécanisme de la réaction enzymatique. En effet, son remplacement par un hydrogène ou un groupement amino ou l'inversion de la configuration absolue de cette position génère des analogues qui sont des inhibiteurs de l'enzyme, avec une K_i proche de la K_M de l'enzyme pour le substrat thymidine. Sur la position 5', les modifications ne modifient que légèrement l'affinité de l'enzyme. Toutefois, l'introduction de groupements encombrants tels qu'un brome ou un iode permet d'obtenir des inhibiteurs d'activité modeste ($K_i = 400 \mu\text{M}$), tandis que l'analogue substitué par un azoture n'inhibe quasiment plus l'enzyme ($K_i > 1000$). Pour ces dérivés, l'encombrement stérique imposé par les groupements azido ou halogénure semble empêcher la fermeture du site actif et donc la réaction de phosphorolyse.

¹⁶¹ N. G. Panova, C. S. Alexeev, K. M. Polyakov, S. A. Gavryushov, A. M. Kritzyn, S. N. Mikhailov, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2008**, 27, 1211-4.

Figure 31 : Structures évaluées dans l'étude de Panova *et al.*¹⁶¹

III.A.3. Autres structures

L'utilisation de petits hétérocycles dans la construction de substances actives a mené à la synthèse de plusieurs séries d'inhibiteurs de la TPase qui ne sont pas basées sur un squelette pyrimidique.

Khan *et al.* ont ainsi développé des analogues construits autour d'un oxadiazole substitué par deux noyaux aromatiques (figure 32).¹⁶² Le plus puissant inhibiteur de cette série a une CI_{50} de 37 μM sur l'EcTPase. Des structures un peu différentes ont été évaluées peu après, sous la forme de 1,3,4-oxadiazole-2-thiones (figure 32).¹⁶³ Sur ces hétérocycles, la position 5 porte un noyau aromatique tandis que l'azote en position 3 porte une chaîne aminométhyle elle-même substituée par un autre groupement aromatique. Les molécules les plus prometteuses ont un potentiel d'inhibition légèrement plus fort que celui de la 7DX, avec une CI_{50} comprise entre 15 et 20 μM . Une étude de modélisation moléculaire dans le site catalytique de l'EcTPase a révélé que l'analogue le plus actif réalise des liaisons hydrogène avec les résidus arginine 171 et sérine 186 du site de la thymidine. En outre, son cycle oxadiazole réalise une liaison hydrogène avec la thréonine 120 ainsi que des interactions hydrophobes au niveau du site du ribose, tandis que le noyau aromatique substituant la position C^5 est orienté vers le site du phosphate et ne réalise pas d'interactions importantes.

¹⁶² K. M. Khan, M. Rani, N. Ambreen, M. Ali, S. Hussain, S. Perveen, M. I. Choudhary, *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 6022-8.

¹⁶³ S. A. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, B. Jadoon, Z. A. Khan, S. A. R. Naqvi, A. J. Shaikh, K. Hayat, A. Mahmmod, N. Mahmood, S. Filipek, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 1008-15.

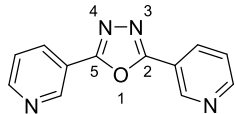
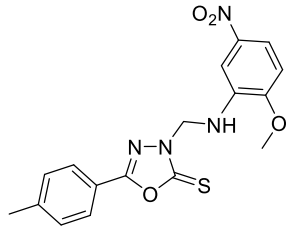
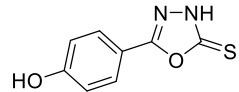
			
CI_{50} (μM) EcTPase	37 ¹⁶²	14,40 ¹⁶³	38,24 ¹⁶⁴

Figure 32 : Structure et activité des composés de Khan *et al.*

L'évaluation des composés non substitués sur l'azote en position 3 a également été effectuée, mais les activités sont au mieux équivalentes à celle de la 7DX (figure 32).¹⁶⁴ Étonnamment, le dérivé le plus actif, le 5-hydroxyphenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione ($CI_{50} = 38 \mu M$), se loge également à proximité du site de la thymidine où il réalise, entre autres interactions, une liaison hydrogène avec l'arginine 171.

De leur côté, Bensaber *et al.* ont conçu une série d'inhibiteurs dont la structure originale se base sur une pyrazole-3-one portant une base de Schiff en position 4 (figure 33).¹⁶⁵ Les deux atomes d'azote en 1 et 2 du pyrazole sont substitués respectivement par un méthyle et un phényle, deux groupements hydrophobes sensés réaliser les mêmes interactions que l'halogène des 5-halouraciles. La conception de ces inhibiteurs présupposait également que le carbonyle et la base de Schiff miment les interactions de la base avec son site de fixation. Une étude préliminaire de docking a confirmé le positionnement des substituants méthyle et phényle dans la poche hydrophobe.

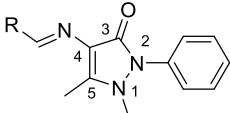
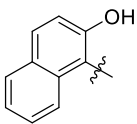
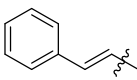
	
R =	  
CI_{50} (μM) HuTPase	22 27 29

Figure 33 : Structure et activité des analogues de Bensaber *et al.*¹⁶⁵

Plusieurs structures ont alors été synthétisées, en accrochant divers noyaux aromatiques sur le carbone de l'imine (phényle, naphthyle, furane et thiophène). Seuls trois composés sur la quinzaine testée sont actifs et leur CI_{50} sur l'HuTPase varie entre 22 et 29 μM , soit 2 à 3 fois plus que la valeur obtenue pour le 6A5BrU. La taille de l'aromatique et la présence de substituants susceptibles de former des liaisons hydrogène sur celui-ci constituent des éléments importants

¹⁶⁴ S. A. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, L. Shahzadi, Z. A. Khan, S. A. R. Naqvi, S. Mutahir, N. Mahmood, K. M. Khan, *Bioorg. Chem.* **2015**, *60*, 37-41.

¹⁶⁵ S. M. Bensaber, H. A. Allafe, N. B. Ermeli, S. B. Mohamed, A. A. Zetrini, S. G. Alsabri, M. Erhuma, A. Hermann, M. I. Jaeda, A. M. Gbaj, *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 5120-34.

pour l'activité. Au sein de cette série, le composé qui possède un groupement hydroxynaphtyle sur la base de Schiff se place de manière très semblable au 6A5BrU ou au TPI avec ce groupement dans la poche hydrophobe. Par ailleurs, ce dérivé s'est également révélé cytotoxique pour des cellules issues de tumeurs de l'œsophage et du sein.¹⁶⁵

III.A.4. Prodrogues

Une stratégie intéressante permettant d'augmenter la spécificité des inhibiteurs de TPase consiste à développer des prodrogues. Initialement inactives, elles seraient activées *in vivo* là où est surexprimée la TPase. La TPase et la xanthine oxydase (XO) sont deux enzymes surexprimées dans les zones hypoxiques caractérisant de nombreuses tumeurs solides. La XO pouvant catalyser l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, elle représente une cible intéressante pour la bioactivation de prodrogues ciblant la TPase.

Des analogues réduits de trois inhibiteurs de références (le TPI, le 6A5BrU et la 7DX) ont été développés par Reigan *et al.* (schéma 9).¹⁶⁶ Ces prodrogues ont à chaque fois un ou deux carbonyles en moins par rapport à la substance de référence. L'évaluation biologique sur l'EcTPase montre qu'elles sont inactives sur l'enzyme à des concentrations bien supérieures aux CI_{50} des inhibiteurs actifs (respectivement plus de 20, 80 et 2300 fois la CI_{50} de la 7DX, du 6A5BrU et du TPI). Cela n'est pas surprenant vu l'absence de l'un ou des deux carbonyles de la pyrimidinedione, des motifs particulièrement importants pour la liaison au site actif. Cet effet a par la suite été confirmé par des études de modélisation moléculaire.¹⁶⁷ En outre, ces prodrogues se sont révélées être de bons substrats pour la XO dans un test *in vitro*.

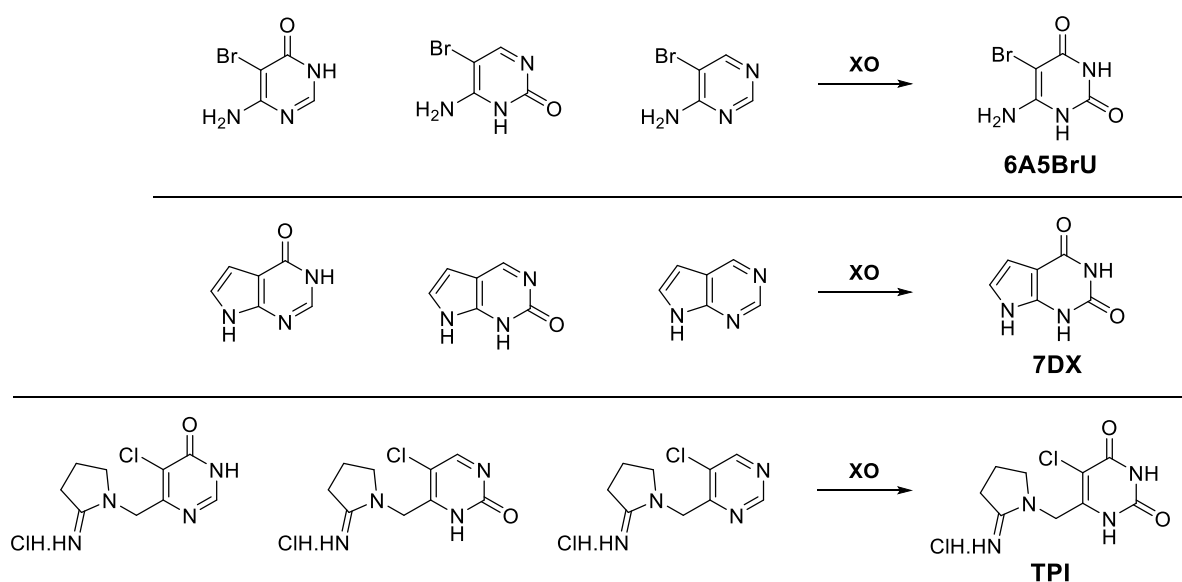


Schéma 9 : Prodrogues du 6A5BrU, de la 7DX et du TPI développées par Reigan *et al.*¹⁶⁶

¹⁶⁶ P. Reigan, A. Gbaj, E. Chinje, I. J. Stratford, K. T. Douglas, S. Freeman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5247-50.

¹⁶⁷ P. Reigan, A. Gbaj, I. J. Stratford, R. A. Bryce, S. Freeman, *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1248-60.

De manière similaire, lors du développement de leurs inhibiteurs de type aminoimidazoyméthyluracile, Reigan *et al.*¹³⁶ ont également synthétisé les analogues nitrés de ces structures (des nitroimidazoyméthyluraciles) qui pourraient subir une activation réductrice dans les zones hypoxiques tumorales (schéma 10). Cette réduction s'effectuerait *via* des enzymes bioréductrices surexprimées dans ce type de tissus, comme la cytochrome P450 réductase ou la XO. Les prodrogues nitrées ont montré une activité beaucoup plus faible sur la TPase que leurs équivalents réduits, en particulier plus de mille fois plus faible pour les dérivés 2'-nitro par rapport aux 2'-amino. Les auteurs ont également montré que les dérivés nitrés étaient facilement réduits *in vitro* par la XO en conditions anaérobiques.

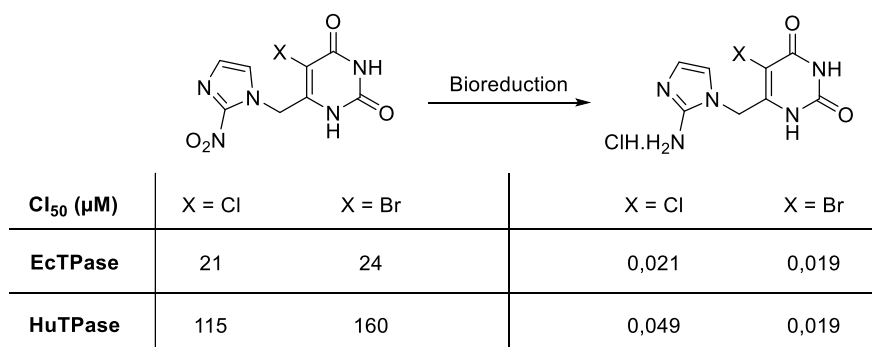


Schéma 10 : Prodrogues des dérivés aminoimidazoyméthyluracile de Reigan *et al.*¹³⁶

Ces prodrogues sont intéressantes pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elles permettraient de délivrer spécifiquement les inhibiteurs au niveau du micro-environnement tumoral, qui est caractérisé par des conditions hypoxiques et où leur bioactivation est donc possible. En outre, les dérivés réduits à qui il manque un ou plusieurs carbonyles sont nettement plus lipophiles que leurs analogues oxydés actifs. Cela devrait accroître leur biodisponibilité et leur conférer un bien meilleur profil pharmacocinétique que celui des substances actives. De plus, cette lipophilie pourrait laisser envisager une formulation orale pour ces composés. L'efficacité *in vivo* de ces molécules reste encore à déterminer.

III.B. Inhibiteurs bi-substrats

Le concept d'inhibiteurs interagissant à la fois avec le site de la thymidine et celui du phosphate a été développé initialement sur la base de la structure de l'EcTPase dans une conformation ouverte. Ces inhibiteurs dits bi-substrats consistent généralement en une base (pyrimidique ou purique) et un phosphonate connectés par un espaceur. La taille de l'espaceur est déterminante pour le potentiel d'inhibition puisque l'objectif de ces composés est de remplir au maximum le site catalytique de l'enzyme et de bloquer celle-ci dans sa conformation ouverte inactive. Tous les inhibiteurs bi-substrats fonctionnent selon ce principe mais structurellement, on peut les regrouper en deux classes : les nucléosides phosphonates acycliques (NPAs) et cycliques (NPCs).

entre les hétéroatomes de la pyrimidinedione et les résidus du site catalytique semble expliquer cette baisse d'affinité.

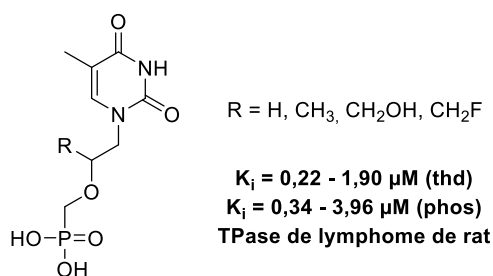


Figure 35 : Structure et activité des composés de Votruba *et al.*¹⁷¹

La même équipe a voulu s'inspirer de la bonne activité du TPI en proposant des nucléosides phosphonates couplés au niveau de la position C⁶ de la pyrimidine.¹⁷³ Le groupement phosphonométhoxy viendrait ainsi interagir avec les acides aminés du site phosphate chargés positivement. D'autre part, l'introduction d'un noyau aromatique en position 5 vise à reproduire les interactions déjà observées au niveau de la poche hydrophobe. Parmi les composés testés, seuls ceux possédant un substituant électroattracteur (fluoro et nitro) sur l'aromatique en position 5 montre une activité comparable à celle du 6A5BrU sur l'HuTPase ($K_i = 2 - 6 \mu\text{M}$ par rapport aux deux substrats, figure 36). Leur fort pouvoir d'inhibition proviendrait de l'effet électroattracteur qui renforce les interactions hydrophobes établies par la base avec le site actif.

	HuTPase	
K_i (μM , thd)	4,89	5,55
K_i (μM , phos)	3,98	2,43

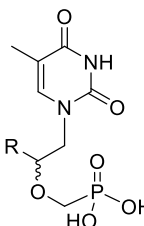
Figure 36 : Structure et activité des NPAs modifiés en position 5 de Pomeisl *et al.*¹⁷³

La conception de l'espaceur reliant la base au phosphonate est délicate dans la mesure où de nombreux paramètres entrent en jeu : nombre d'atomes de la chaîne, flexibilité, caractère hydrophile / hydrophobe et nombre, nature et configuration absolue des substituants.^{168,169} Afin d'améliorer l'activité de leurs thymines substituées sur l'azote N¹ par un groupement phosphonométhoxyéthyle, Pomeisl *et al.* ont ajouté un groupement phosphate à la chaîne latérale (figure 37).¹⁷⁴ Avec un espaceur plus long et un bout de chaîne phosphate plus hydrophile, ces analogues devraient avoir un placement plus favorable dans le site catalytique. Ils se sont effectivement révélés plus actifs que leurs équivalents non phosphatés, si on compare leur ratio (vitesse de la réaction enzymatique avec inhibiteur) / (vitesse sans inhibiteur), ou

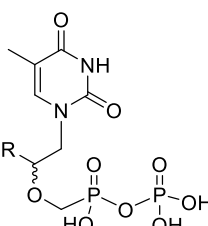
¹⁷³ K. Pomeisl, A. Holy, R. Pohl, K. Horska, *Tetrahedron* **2009**, 65, 8486-92.

¹⁷⁴ K. Pomeisl, K. Horska, R. Pohl, J. Blazek, M. Krecmerova, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2012**, 31, 159-71.

V_i / V_0 . D'ailleurs, leur K_i sur l'HuTPase vis-à-vis des deux substrats égale celle du 6A5BrU et des dérivés 5-aryl-6-phosphonométhoxy précédemment cités (figure 36).



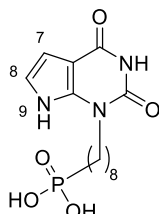
HuTPase

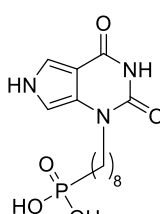


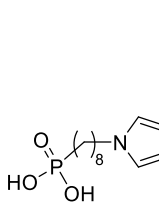
R =	V_i / V_0	V_i / V_0	K_i (thd) μM	K_i (phos) μM
CH_2OCH_3 (R)	0,96	0,49	5,78	2,71
CH_2OCH_3 (S)	0,94	0,78	-	-
CH_2F (R)	0,82	0,36	4,09	2,13
CH_2F (S)	0,91	0,66	12,60	7,41

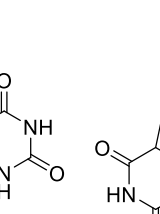
Figure 37 : Structure et activité des analogues mono- et bi-phosphate de Pomeisl *et al.*¹⁷⁴

Parallèlement, des efforts ont été fournis pour réaliser des pharmacomodulations du TP65 (figure 38).¹⁷⁵ Sur le noyau 7DX, le déplacement de l'atome d'azote du pyrrole depuis la position 9 vers la position 8 ne modifie que très légèrement l'activité. Par contre, déplacer la chaîne phosphonoctyle de la position 3 à la position 8 entraîne une perte d'activité conséquente sur l'HuTPase mais pas sur l'EcTPase. Enfin, remplacer le phosphonate par une autre base de type déazaxanthine, formant ainsi un dimère, permet d'augmenter légèrement l'inhibition sur l'EcTPase.









Cl_{50} (thd, μM)	TP 65			
EcTPase	11,4	6,8	12	3,5
HuTPase	15,1	17	-	-

Figure 38 : Structure et activité des dérivés de Marak *et al.*¹⁷⁵

Considérant que les activités modérées obtenues avec les inhibiteurs de type NPA sont principalement dues à la faible acidité du phosphonate par rapport à un phosphate, des dérivés difluorométhylphosphonates ont été envisagés afin de mimer les propriétés physicochimiques du phosphate naturel. Dans cette optique, Diab *et al.*¹⁷⁶ ont obtenu de nombreux NPAs constitués d'une base (thymine, uracile ou purine) substituée au niveau de l'azote N^1 par

¹⁷⁵ D. Marak, M. Otmar, I. Votruba, M. Dracinsky, M. Krecmerova, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 652-4.

¹⁷⁶ S. A. Diab, C. De Schutter, M. Muzard, R. Plantier-Royon, E. Pfund, T. Lequeux, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 2758-68.

un espaceur polyméthylène incluant ou non des hétéroatomes ou un cycle triazole et se terminant par un difluorométhylphosphonate. Une double analyse par cristallographie aux rayons-X et par modélisation moléculaire révèle que pour ces composés, la distance entre l'azote N^1 de la base et l'atome de phosphore varie de 6,5 Å à 16,3 Å. Les auteurs ont ainsi pu observer une augmentation de l'activité sur l'EcTPase avec la taille de l'espaceur, jusqu'à un maximum se situant aux alentours de 14 - 15 Å. Cela confirme le fait que les inhibiteurs de type NPA inactivent l'enzyme en bloquant celle-ci dans une conformation ouverte. Dans l'ensemble, les activités restent modestes par rapport aux inhibiteurs bi-substrats déjà existants. Néanmoins, le plus actif de cette série possède une activité comparable à celle du TP65, soit une K_i de 58 μM sur l'EcTPase par rapport au substrat thymidine (figure 39). Les auteurs précisent qu'ils n'ont pas réussi à remplacer la base par un 5-bromouracile, ce qui aurait pu apporter un gain en termes d'activité.

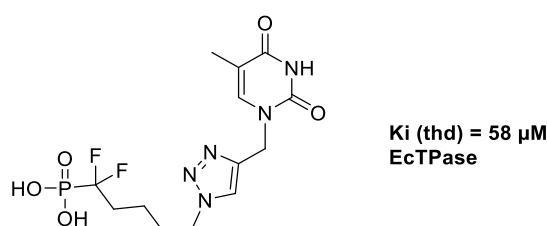


Figure 39 : Structure et activité du meilleur inhibiteur de l'étude de Diab *et al.*¹⁷⁶

III.B.2. Les nucléosides phosphonates cycliques

Le premier inhibiteur de type nucléoside phosphonate cyclique a été proposé par Li *et al.* en 2000 et c'est aussi le premier inhibiteur bi-substrat à avoir été testé sur l'HuTPase.¹⁷⁷ Ce composé est une thymidine comportant un cycle acétal accolé au ribose et substitué par un phosphonate, il inhibe l'HuTPase avec une K_i de 0,236 μM par rapport à la thymidine (figure 40). Plusieurs analogues ont alors été synthétisés par Allan *et al.*, mais se sont révélés moins actifs (figure 40).¹⁷⁸ Par exemple, l'introduction d'un autre substituant polaire à la place du phosphate, tel qu'un acide carboxylique ou un amide, fait chuter l'activité d'un facteur supérieur à 100. La suppression d'un atome d'oxygène dans l'acétal conduit aussi à une inhibition plus faible. Dans l'ensemble, on observe une différence d'activité significative entre les deux diastéréoisomères correspondant aux deux orientations possibles du phosphonate sur le cycle acétal. Une étude de docking a confirmé les résultats obtenus *in vitro* et a permis de révéler la présence d'une liaison hydrogène entre l'histidine 116 et l'oxygène 2' du ribose.

¹⁷⁷ Y. Li, Studies in Nucleoside Chemistry. Synthesis of Purine and Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors. Total Synthesis of the Sulfated Nucleoside Glycoside HF-7. Thèse de doctorat, Cornell University, Ithaca, NY, Janvier 2000.

¹⁷⁸ A. L. Allan, P. L. Gladstone, M. L. Price, S. A. Hopkins, J. C. Juarez, F. Donate, R. J. Ternansky, D. E. Shaw, B. Ganem, Y. Li, W. Wang, S. Ealick, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7807-15.

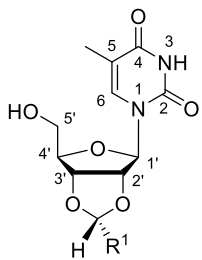
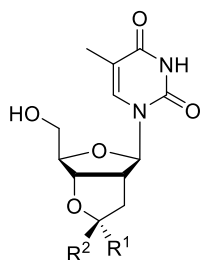
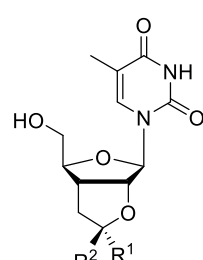
								
	R ¹ =		R ¹ = R ² =		R ¹ = R ² =			
K_i (thd, μM) HuTPase	CH ₂ PO ₃ H ₂	0,236	CH ₂ PO ₃ H ₂	H	8,03	CH ₂ PO ₃ H ₂	H	1,05
	CH ₂ CO ₂ H	45,5	H	CH ₂ PO ₃ H ₂	inactif	H	CH ₂ PO ₃ H ₂	33,4
	CH ₂ CONH ₂	inactif						

Figure 40 : Structure et activité des composés de Allan *et al.*¹⁷⁸

Des dérivés de la thymidine où le ribose est remplacé par une pyrrolidine ont également été étudiés (figure 41).¹⁷⁹ Dans ces structures, l'azote de la pyrrolidine est substitué par une chaîne phosphonométhyle. Les relations structure-activité suivantes ont été relevées :

- la présence d'un groupement hydroxy en position 2' du ribose et en conformation *cis* par rapport à la thymine est favorable à l'activité, certainement grâce à la formation d'interactions supplémentaires avec les résidus du site actif.
- une charge positive sur l'azote de la pyrrolidine à pH physiologique ne semble pas indispensable, l'activité est même meilleure lorsque cet atome est inclus dans une fonction amide ou thioamide, certainement à cause d'une capacité accrue à établir des liaisons hydrogène.
- l'ajout d'un carbone supplémentaire entre l'azote de la pyrrolidine et l'atome de phosphore mène à une perte d'activité.

Ces relations ont été obtenues après évaluation sur la TPase de lymphome de rat, pour laquelle quatre inhibiteurs ont une CI₅₀ inférieure à 0,050 μM. Comme pour les NPAs de Votruba *et al.*,¹⁷¹ tous les analogues de cette série n'ont cependant montré aucune activité sur l'HuTPase, l'EcTPase ou la TPase de foie de rat.

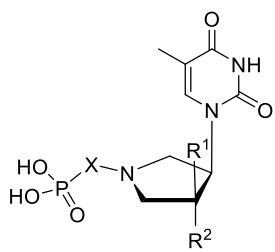
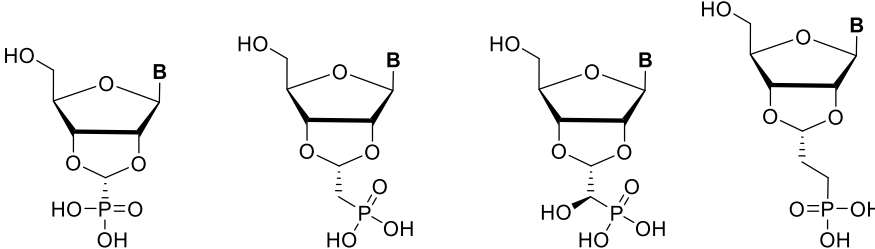
				CI ₅₀ (thd, μm) TPase de lymphome de rat
R ¹	R ²	X		
H-	H-	C=O		0,35
H-	HO-	C=O		0,22
HO-	H-	C=O		0,011
HO-	H-	CH ₂		0,045
H-	H-	CH ₂ (CO)		inactif

Figure 41 : Structure et activité des dérivés de Kocalka *et al.*¹⁷⁹

¹⁷⁹ P. Kocalka, D. Rejman, V. Vanek, M. Rinnova, I. Tomeckova, S. Kralikova, M. Petrova, O. Pav, R. Pohl, M. Budesinsky, R. Liboska, Z. Tocik, N. Panova, I. Votruba, I. Rosenberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 862-5.

A la suite de ces résultats décevants, la même équipe s'est intéressée à des structures se rapprochant de celles de Allan *et al.*,¹⁷⁸ les seules à avoir eu une activité sur l'HuTPase en série cyclique (NPC). Un large éventail d'analogues constitués d'une base (uracile, thymine ou 5-halouracile) et d'un analogue de ribose portant un groupement phosphonoalkyloxy cyclique (sous forme d'acétal accolé au ribose) ou non ont ainsi été étudiés (figure 42).¹⁸⁰ Ils ont été évalués sur plusieurs HuTPases. Dans les structure bicycliques, la configuration de l'acétal est importante pour l'activité, les épimères *exo* étant presque tous inactifs, ce qui rejoint les observations de Allan *et al.*¹⁷⁸ Les structures ouvertes ne sont pas actives à une exception près, alors qu'elles sont pourtant isostères des structures comportant un cycle acétal et plus flexibles que ces dernières. L'agrandissement du cycle acétal 1,3-dioxolane en 1,4-dioxolane conduit à des analogues inactifs et l'ajout d'un groupement hydroxyle en α du phosphonate n'est pas favorable non plus à l'activité. Finalement, les dérivés les plus actifs sont ceux reprenant la structure du chef de file de Allan *et al.*,¹⁷⁸ avec une amélioration notable de l'activité grâce à la modification de la base. En effet, le remplacement de la thymine par le 5-chlorouracile permet de diviser par trois la K_i vis-à-vis du substrat thymidine. Ce composé est le plus actif de la série et inhibe l'enzyme de manière compétitive par rapport aux deux substrats ($K_i = 0,048$ et $0,030 \mu\text{M}$ pour la thymidine et le phosphate).



Base B	5Cl-U	T	5Cl-U	5Cl-U	5Cl-U
K_i HuTPase1 (μM)	0,95	0,201	0,066	N.D.	14,5
K_i HuTPase2 (μM)	1,12	0,148	0,048 0,030 (phos)	0,306	18,2

Figure 42 : Structure et activité des dérivés de Kosiova *et al.*¹⁸⁰

La stratégie des inhibiteurs bi-substrats semble à première vue présenter un certain nombre d'avantages, notamment si l'on considère les aspects énergétiques de la liaison au site actif.¹⁷⁸ Pourtant, ces composés sont restés pendant longtemps en retrait par rapport aux inhibiteurs mono-substrat les plus actifs, tels que le TPI ou l'AIFU. Le développement des inhibiteurs bi-substrat a été freiné en particulier par les très fortes différences d'activité obtenues sur les diverses TPases (de rat, humaine et bactérienne). En outre, l'étude du mécanisme de la phosphorolyse (section II.C.4) a révélé que la fixation de la base à son site de liaison empêche celle du phosphate, ce qui pourrait constituer un facteur limitant pour ces molécules. Pour finir, le caractère compétitif vis-à-vis du phosphate pourrait constituer un désavantage pour l'activité *in vivo*, puisque les concentrations intracellulaires en orthophosphate sont de l'ordre du millimolaire, soit supérieures à la K_M de l'enzyme pour ce substrat.¹⁸¹ Néanmoins, les derniers

¹⁸⁰ I. Kosiova, O. Simak, N. Panova, M. Budesinsky, M. Petrova, D. Rejman, R. Liboska, O. Pav, I. Rosenberg, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 145-68.

¹⁸¹ L. A. Katz, J. A. Swain, M. A. Portman, R. S. Balaban, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1988**, 255, H189.

inhibiteurs synthétisés avec une K_i nanomolaire sur l'HuTPase pour les substrats thymidine et phosphate semblent plus que prometteurs.¹⁸⁰

III.C. Inhibiteurs autres que compétitifs

Contrairement aux inhibiteurs décrits jusqu'à présents, certains composés interagissent avec l'enzyme selon un mécanisme qui n'est pas **compétitif** et au niveau d'un site de fixation différent de celui des substrats de l'enzyme, soit un site allostérique. Les structures de ces dérivés sont très diverses et leur mécanisme d'action peut être incompétitif, non-compétitif ou mixte :

- un inhibiteur **incompétitif** ne se lie qu'au complexe enzyme-substrat.
- un inhibiteur **non-compétitif** peut se lier ou bien à l'enzyme seule ou bien au complexe enzyme-substrat avec des affinités similaires.
- un inhibiteur **mixte**, enfin, fonctionne comme un inhibiteur non-compétitif mais possède des affinités différentes pour l'enzyme seule et le complexe enzyme-substrat.

Parmi ces inhibiteurs, nous distinguerons ceux dont le mécanisme d'action a été au moins en partie élucidé et ceux pour lesquels il reste pour le moment inconnu.

III.C.1. Mécanisme d'inhibition autre que compétitif

Le premier inhibiteur n'ayant pas un mécanisme de type compétitif à avoir été identifié est KIN59, un analogue nucléosidique possédant une base hypoxanthine et un ribofuranose substitué en position 5' par un triphenylméthyle (trityle) (figure 43).¹⁸² L'étude de Liekens *et al.* a montré que ce nucléoside au squelette original inhibe l'HuTPase et l'EcTPase avec des CI_{50} respectives de 67 et 44 μM et que son mécanisme est de type non-compétitif. D'autre part, il possède des propriétés anti-angiogéniques *in vitro* dans le modèle CAM.

Des travaux importants de pharmacomodulation autour du KIN59 ont été entrepris par cette équipe¹⁸³ en vue d'améliorer l'activité. Les principales modifications effectuées sont les suivantes (figure 43) :

- l'ajout d'un substituant alkyle sur l'atome d'azote en position 1 de la purine augmente significativement l'activité (d'un facteur dix environ pour un substituant cyclopropylméthyle), alors que l'addition d'un groupement plus polaire la fait chuter,
- ouvrir l'hypoxanthine ou la remplacer par une purine ou une 6-chloropurine donne des activités similaires à celle de KIN59,
- le trityle est indispensable à l'inhibition, mais sa substitution par divers groupements a permis d'améliorer l'activité,

¹⁸² S. Liekens, A.-I. Hernandez, D. Ribatti, E. De Clerq, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, *J. Biol. Chem.* **2004**, *27*, 29598-605.

¹⁸³ E. Casanova, A.-I. Hernandez, E.-M. Priego, S. Liekens, M.-J. Camarasa, J. Balzarini, M.-J. Pérez-Pérez, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5562-70.

- l'ouverture du ribose entre les positions 2' et 3' entraîne une perte totale d'activité.

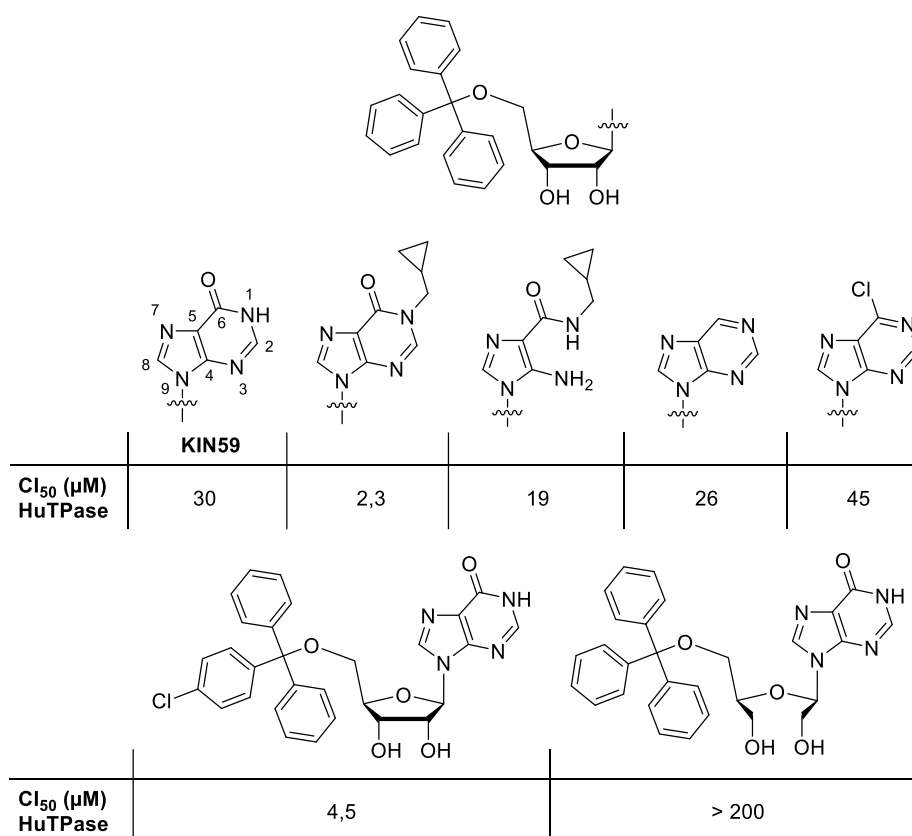


Figure 43 : Structure et activité de KIN59 et de ses analogues.¹⁸³

Plus récemment, Liekens *et al.* ont montré que KIN59 est aussi capable d'inhiber l'angiogénèse induite par le FGF dans le modèle CAM et la croissance tumorale dans un modèle murin. En revanche, KIN59 ne semble pas avoir d'effet sur l'activité du VEGF.¹⁸⁴

Isolés de l'écorce de *Symplocos racemosa*, deux analogues glycosidiques se sont révélés être des inhibiteurs de l'HuTPase (figure 44).¹⁸⁵ Bien que d'activité modeste (K_i = 63 et 232 μM vis-à-vis de la thymidine et K_i = 102 et 165 μM vis-à-vis du phosphate), ces deux composés ont un mécanisme d'inhibition bien particulier, étant chacun respectivement non-compétitif et incompétitif par rapport aux deux substrats. L'étude du docking de ces structures montre qu'elles interagissent avec des acides aminés proches du site de liaison de la thymidine, mais *a priori* davantage impliqués dans la fermeture du site catalytique que dans la fixation des substrats, confirmant ainsi les résultats d'inhibition *in vitro*. Enfin, ces analogues n'ont pas eu d'effet sur l'angiogénèse induite par le VEGF ou le FGF mais inhibent la migration et l'invasion des cellules endothéliales induite par la TPase.¹⁸⁵

¹⁸⁴ S. Liekens, A. Bronckaers, M. Belleri, A. Bugatti, R. Sienaert, D. Ribatti, B. Nico, A. Gigante, E. Casanova, G. Opdenakker, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, M. Presta, *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 817-29.

¹⁸⁵ S. Hussain, J. Gaffney, N. Ahmed, M. Slevin, M. I. Choudhary, V. U. Ahmad, Z. Qasmi, M. A. Abbasi, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2009**, *11*, 159-67.

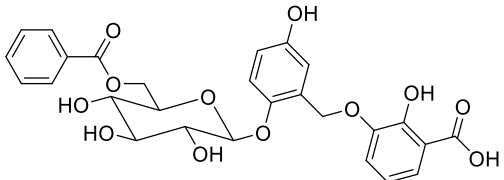
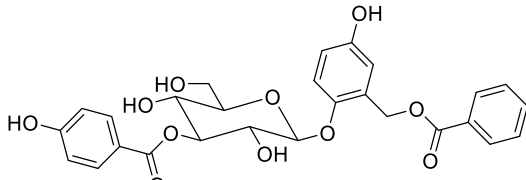
		
Ki (μM) HuTPase	62,83 (thd) / 101,95 (phos)	231,73 (thd) / 165,05 (phos)

Figure 44 : Structure et activité de l'un des dérivés glycosidiques identifiés par Hussain *et al.*¹⁸⁵

Récemment, Bera *et al.*¹⁸⁶ se sont intéressés à des structures bicycliques dérivées de la 7DX. Des pyrazolo-triazinediones diversément substituées sur les positions 7 et 8 ont été testées sur l'EcTPase. Toutefois, les composés qui conservent le motif homophthalimide CO-NH-CO de la thymidine ont une activité assez faible ($CI_{50} > 50 \mu M$) alors que ceux où le carbonyle en position 2 est remplacé par un thiocarbonyle présentent une activité bien supérieure, inférieure au micromolaire pour certains (figure 45). L'analogue le plus actif de cette série comporte un phényle en position 8 substitué en *para* par un groupement pentafluorosulfate. Sa CI_{50} est de $0,040 \mu M$ et il s'agit d'un inhibiteur non compétitif par rapport à la thymidine, ce qui suggère un mode d'interaction avec le site actif différent de celui de la 7DX. Les propriétés à la fois hydrophobes et électroattractrices du groupement pentafluorosulfate semblent expliquer la très bonne activité de cet inhibiteur. Des travaux ultérieurs ont cherché à améliorer l'activité en apportant de nouvelles modifications sur les positions 7 et 8, en particulier avec des groupements aromatiques possédant des substituants hydrophobes (figure 45).¹⁸⁷ Les activités restent faibles en comparaison de l'analogue possédant un motif pentafluorosulfate mais, fait intéressant, ces nouveaux analogues se comportent comme des inhibiteurs de type mixte. L'analyse de leur docking dans le site actif et un autre site proche de celui-ci montre qu'ils peuvent interagir avec les deux mais qu'ils ont une affinité nettement supérieure pour le second site. En outre, les composés les plus actifs inhibent l'expression de la MMP-9 et du VEGF *in vitro*.

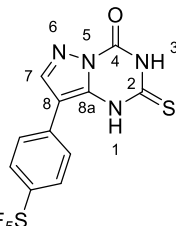
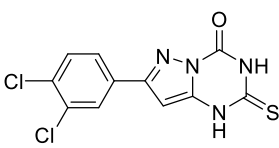
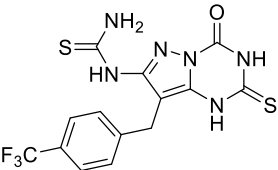
			
CI ₅₀ (μM) EcTPase	0,040 ¹⁸⁶	9,07 ¹⁸⁷	3,82 ¹⁸⁷

Figure 45 : Structure et activité des meilleurs inhibiteurs en série pyrazolo-triazinedione.

Afin d'exploiter les propriétés des inhibiteurs de type pyrazolo-triazine précédemment synthétisés, Sun *et al.*¹⁸⁸ ont proposé de les coupler à des inhibiteurs pyrimidiques tels que les

¹⁸⁶ L. Sun, H. Bera, W.-K. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 1-11.

¹⁸⁷ H. Bera, P. K. Ojha, B. J. Tan, L. Sun, A. V. Dolzhenko, W.-K. Chui, G. N. C. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *78*, 294-303.

¹⁸⁸ L. Sun, J. Li, H. Bera, A. V. Dolzhenko, G. N. C. Chui, W.-K. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 400-10.

5-halouraciles *via* un pont thiométhyle reliant la position 6 de l'uracile à la position 2 de la triazine (figure 46). Ces deux familles de composés étant respectivement des inhibiteurs compétitifs et non-compétitifs de la thymidine, on peut s'attendre à ce qu'elles interagissent avec des sites différents de l'enzyme et qu'une structure assemblant ces deux motifs devrait avoir au moins le même degré d'activité. Les résultats montrent que l'inhibition est conservée dans les pyrazolo-triazines couplées au 5-chlorouracile et qu'elle est de type mixte, suggérant ainsi une action sur deux sites différents de l'enzyme. Néanmoins, par rapport aux dérivés non couplés, l'assemblage avec le 5-chlorouracile n'a pas eu un effet réellement significatif sur l'activité. Les valeurs obtenues résultent certainement d'un compromis entre gain d'activité sur le site catalytique grâce à la partie pyrimidique d'une part, et perte d'activité sur le site allostérique au niveau de la pyrazolo-triazine de l'autre.

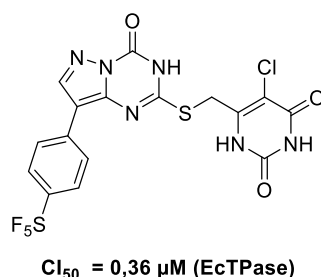


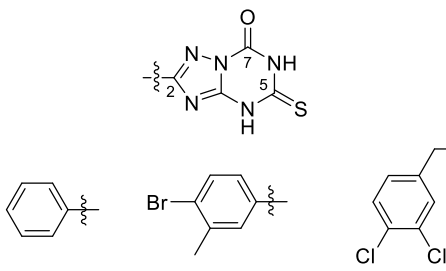
Figure 46 : Structure et activité de l'un des inhibiteurs issus de la conception par fragments de Bera *et al.*¹⁸⁹

Parallèlement, des structures basées sur un squelette triazolo-triazine ont été synthétisées et le même constat a été fait concernant la conservation du motif CO-NH-CO de la triazine.¹⁸⁹ Ainsi, le remplacement du carbonyle en position 5 par un thiocarbonyle donne des activités bien supérieures, alors qu'elles sont plus modestes avec un thiométhyle. Les meilleurs inhibiteurs de cette série ont une activité sur l'EcTPase du même ordre que celle de la 7DX. Leur docking dans le site actif de la TPase montre qu'ils réalisent diverses interactions à proximité du site de fixation de la thymidine, avec notamment un placement du thiocarbonyle dans la poche hydrophobe située en face de la position 5 de la thymidine. A l'inverse, les analogues qui conservent le motif CO-NH-CO ne sont pas capables de réaliser des interactions hydrophobes avec les acides aminés de cette poche à cause du diamètre plus faible et de la polarité plus forte du carbonyle par rapport au thiocarbonyle, d'où la moins bonne affinité de ces dérivés.

Plusieurs modifications ont ensuite été apportées sur ces triazolo-triazines, en particulier l'ajout de différents noyaux aromatiques sur la position 2 (figure 47).¹⁴⁴ Le dérivé le plus actif comporte un 4-bromo-3-méthylphényle sur cette position et est un inhibiteur de type mixte vis-à-vis de la thymidine, avec une CI_{50} de 13 μM . L'étude de son docking révèle qu'il interagit toujours avec des résidus proches du site de fixation de la thymidine et que le thiocarbonyle se positionne dans la poche hydrophobe. En revanche, son orientation est différente de celles de la 7DX et du TPI, ce qui est cohérent avec une inhibition de type mixte. Enfin, il est à noter que déplacer le thiocarbonyle de la position 5 à la position 7 entraîne une perte d'activité. Cette fonction semble ainsi indispensable au bon positionnement dans le site actif de l'enzyme.

¹⁸⁹ H. Bera, W.-K. Chui, S. D. Gupta, A. V. Dolzhenko, L. Sun, *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 6010-21.

Des composés un peu plus actifs ont été obtenus peu de temps après, en optimisant les interactions hydrophobes réalisées par les substituants du noyau aromatique porté par le cycle triazole (figure 47).¹⁹⁰ Une étude cinétique a montré que le meilleur inhibiteur de cette série ($CI_{50} = 3 \mu M$ sur l'EcTPase) affichait lui aussi une inhibition de type mixte lorsque l'on fait varier le substrat thymidine. A l'inverse, d'autres pharmacomodulations n'ont pas apporté de gain en termes d'activité sur cette série, telles que le remplacement du thiocarbonyl par un thioalkyle ou l'ajout de groupements électroattracteurs en *ortho* du phényle porté par le triazole.¹⁹¹ La plupart des analogues les plus actifs en série triazolo-triazines ont un potentiel d'inhibition légèrement supérieur à celui de la 7DX et présentent également des propriétés anti-angiogéniques *in vitro*.^{144,187,190}



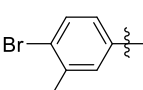
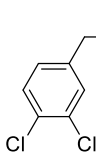
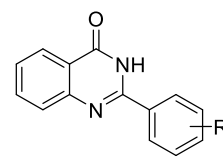
			
$CI_{50} (\mu M)$ EcTPase	39,56 ¹⁴⁴	13,09 ¹⁴⁴	2,95 ¹⁹⁰

Figure 47 : Structure et activité des meilleurs inhibiteurs en série triazolo-triazine.

Pour finir, en raison de leur ressemblance avec la 7DX, des structures de type quinazolin-4-one ont été envisagées comme inhibiteurs de la TPase (figure 48).¹⁹² Javaid *et al.* ont ainsi évalué de tels composés sur l'EcTPase et seuls ceux substitués par deux groupements hydroxyles sur l'aromatique en position 2 de la quinazoline ont présenté une activité intéressante ($40 < CI_{50} < 60 \mu M$). Ces résultats ont été reliés à la présence des groupements hydroxyles car ceux-ci, par effet électrodonneur, favorisent les interactions π - π avec des résidus aromatiques du site catalytique tout en permettant la formation de liaisons hydrogène. Les deux analogues présentant la plus forte activité ont un mécanisme d'inhibition non compétitif par rapport à la thymidine, et pourraient se fixer au niveau de la poche hydrophobe jouxtant le site de la thymidine ou dans un autre site allostérique.



R =	3-OH	4-OH	3,4-OH
$CI_{50} (\mu M)$ EcTPase	294,6	234,0	42,9

Figure 48 : Structure et activité des composés de Javaid *et al.*¹⁹²

¹⁹⁰ H. Bera, B. J. Tan, L. Sun, A. V. Dolzhenko, W.-K. Chui, G. N. C. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 325-34.

¹⁹¹ H. Bera, M. H. Lee, L. Sun, A. V. Dolzhenko, W.-K. Chui, *Bioorg. Chem.* **2013**, *50*, 34-40

¹⁹² S. Javaid, S. M. Saad, S. Perveen, K. M. Khan, *Bioorg. Chem.* **2015**, *63*, 142-51.

III.C.2. Mécanisme d'inhibition inconnu

Des stérols sulfatés isolés de l'éponge *Petrosia strongylata* ont été testés sur l'HuTPase par Aoki *et al.* (figure 49).¹⁹³ Premiers inhibiteurs de la TPase au squelette non inspirée du substrat naturel, leur CI_{50} est de l'ordre de 40 μM . Même s'il reste à déterminer le mécanisme d'action de ces stérols, au vu de leur structure, il est peu probable que celui-ci soit de type compétitif.

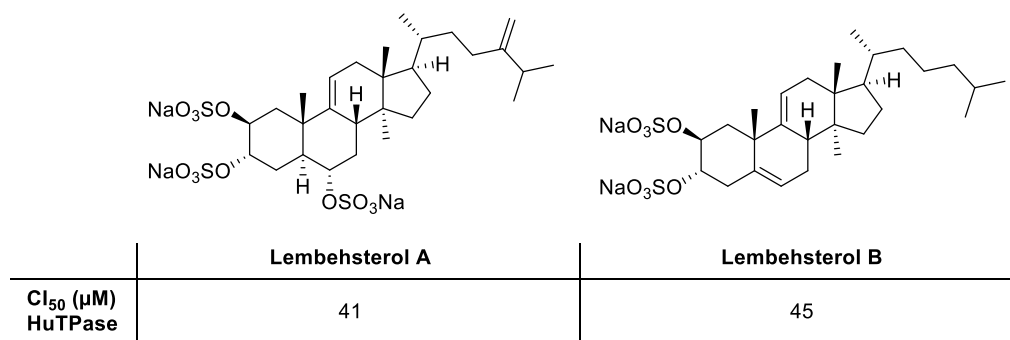


Figure 49 : Structure et activité des stérols de Aoki *et al.*¹⁹³

A partir d'un modèle basé sur la structure l'EcTPase dans sa forme ouverte, des études de docking ont cherché de nouvelles pistes pour le développement d'inhibiteurs à la structure innovante. Ainsi, en réalisant le screening *in silico* de la base de données du National Cancer Institute, McNally *et al.* ont cherché des composés actifs sur l'EcTPase qui n'auraient pas un squelette nucléosidique.¹⁴⁵ A l'issue de ce screening, les meilleures activités ont été obtenues avec des molécules de type imidazolidinedione (ou hydantoïne) et pyrimidinetrione, et elles sont comparables à celle de la 7DX (figure 51).

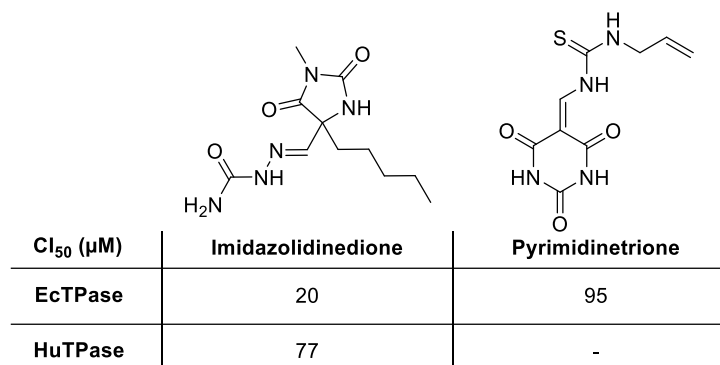


Figure 50 : Structure et activité des inhibiteurs issus du screening *in silico* de McNally *et al.*¹⁴⁵

Un screening *in silico* plus récent basé cette fois sur la structure de l'HuTPase de Norman *et al.*¹²⁵ a permis d'identifier une hydantoïne très similaire ainsi qu'un dérivé trioxoimidazolidine.¹⁹⁴ Plusieurs pharmacomodulations ont été effectuées autour de cette dernière molécule, par substitution des deux azotes de l'hétérocycle, mais les activités obtenues sont relativement faibles. L'analogue présentant la plus forte inhibition possède deux chaînes

¹⁹³ S. Aoki, Y. Naka, T. Itoh, T. Furokawa, R. Rachmat, S. Akiyama, M. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 827-30.

¹⁹⁴ M. Rajabi, D. Mansell, S. Freeman, R. A. Bryce, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1165-71.

alkyle, l'une portant un phényle et l'autre un amide (figure 51). Il est juste aussi actif que la 7DX, avec une CI_{50} de 40 μM sur l'EcTPase. Son docking dans le site catalytique montre qu'il interagit avec les résidus de la poche hydrophobe mais aussi avec le phosphate et deux résidus situés à proximité de ce dernier (asparagine 123 et thréonine 154), sa grande taille lui permettant de couvrir l'intégralité du site actif. Le mécanisme d'inhibition de ces dérivés n'a pas encore été étudié.

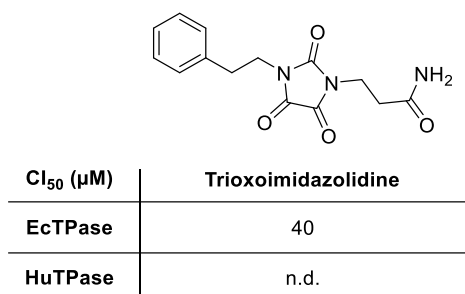


Figure 51 : Structure et activité du meilleur inhibiteur de l'étude de Rajabi *et al.*¹⁹⁴

En 2009, Khan *et al.* se sont intéressés à des bases de Schiff dérivées de la 3-formylchromone (figure 52).¹⁹⁵ Les deux composés les plus actifs sont substitués au niveau de l'imine par un 2,4-dichlorophényle et un 3-méthoxy-4-méthylphényle, avec des CI_{50} de 40 et 20 μM sur l'EcTPase. L'activité biologique semble liée à la nature des substituants de ce noyau phényle puisque, par exemple, la perte du méthoxy en *mé*ta ou du méthyle en *para* donne des analogues inactifs. Aucune étude mécanistique ou de docking n'a pour l'instant été réalisée sur cette série.

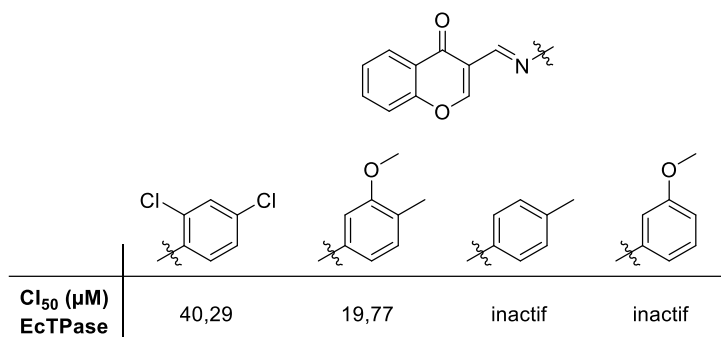


Figure 52 : Structure et activité des inhibiteurs de Khan *et al.*¹⁹⁵

III.D. Le TAS-102 / Lonsurf®

Comme on l'a vu à la section II.B.6, la trifluorothymidine est un antimétabolite prometteur dont l'exploitation en clinique dans le traitement des cancers était initialement impossible à cause d'un profil pharmacocinétique trop défavorable et des toxicités associées trop importantes. Son association avec le TPI a permis d'éliminer ces facteurs limitants et de reprendre son évaluation clinique au travers d'une formulation orale, le TAS-102 / Lonsurf®. En effet, la TFT est essentiellement métabolisée et inactivée par la TPase au niveau du foie et des intestins. Sa demi-vie plasmatique a ainsi pu être augmentée par l'ajout du TPI dans un ratio

¹⁹⁵ K. M. Khan, N. Ambreen, S. Hussain, S. Perveen, M. I. Choudhary, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2983-8.

molaire TFT/TPI de 1:0,5, ce ratio donnant les meilleurs résultats lors d'études *in vivo* en termes d'activité antitumorale et de limitation de la toxicité.¹⁹⁶ Après plusieurs études cliniques de phase I et II, 800 patients souffrant d'un cancer colorectal métastatique et présentant une résistance ou une intolérance aux traitements existants ont été pris en charge dans une étude clinique de phase III (l'étude « RECOURSE »),¹⁹⁷ dans laquelle l'efficacité et la sécurité du TAS-102 a été comparée à un placebo, puisque ces patients sont réfractaires à tous les traitements. Au terme de cette étude, un gain moyen en survie de 1,8 mois par rapport au groupe contrôle a été constaté. De plus, par rapport au placebo, le TAS-102 s'est montré plus efficace pour stabiliser et retarder l'évolution de la maladie.

Lors des essais cliniques du TAS-102 en phase I et II, les effets secondaires toxiques les plus répertoriés sont des événements associés à une myélosuppression tels que des leucopénies ou des neutropénies, une anémie, une fatigue ou encore des diarrhées. Des observations similaires ont été faites au cours de l'étude de phase III, avec toutefois une baisse du nombre de neutropénies. Le TAS-102 reste dans l'ensemble plutôt bien toléré puisque des symptômes tels que la stomatite de grade 3 ou 4, le syndrome main pied ou le spasme coronarien n'ont quasiment pas été observés (< 1 % des patients).¹⁹⁷ Dans les rares cas où ils sont apparus, ces effets secondaires ont été éliminés efficacement par un traitement symptomatique et une réduction des doses voire une interruption du TAS-102. Moins de 4 % des patients de l'étude « RECOURSE » ont été obligés d'arrêter le traitement pour des raisons de toxicité.

Le bilan positif des essais cliniques a conduit le Japon à autoriser la mise sur le marché du TAS-102 / Lonsurf[®] en mars 2014 pour le traitement du cancer colorectal métastatique non opérable sur des patients ayant déjà bénéficié d'autres chimiothérapies. La FDA (« Food and Drug Administration ») a émis une autorisation similaire aux Etats-Unis en septembre 2015, de même que l'EMA (« European Medicines Agency ») en avril 2016.

Même si le mode d'action de la TFT ressemble fort à celui des dérivés du 5-FU (figure 53), la cytotoxicité effective de la TFT qui a pu être observée lors d'essais cliniques semble basée sur un mécanisme différent de celle du 5-FU. Alors que le 5-FU exerce son action cytotoxique principalement par inhibition de la TS, la TFT semble fonctionner davantage *via* l'incorporation de la TFT-TP à l'ADN. Des études *in vitro* ont montré que la TFT était incorporée bien plus efficacement à l'ADN que le 5-FU et ce, de manière durable dans le temps.¹⁹⁸

La combinaison de la TFT au TPI permet une efficacité accrue de l'antimétabolite en limitant son inactivation par la TPase dans le tractus gastro-intestinal mais aussi au niveau des cellules tumorales elles-mêmes, la TPase y étant surexprimée. Bien que cela reste à prouver, les propriétés anti-angiogéniques du TPI pourraient aussi contribuer à l'efficacité du TAS-102.

¹⁹⁶ T. Emura, N. Suzuki, A. Fujioka, H. Ohshimo, M. Fukushima, *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 449-55.

¹⁹⁷ R. J. Mayer, E. Van Cutsem, A. Falcone, T. Yoshino, R. Garcia-Carbonero, N. Mizunuma, K. Yamazaki, Y. Shimada, J. Tabernero, Y. Komatsu, A. Sobrero, E. Boucher, M. Peeters, B. Tran, H.-J. Lenz, A. Zaniboni, H. Hochster, J. M. Cleary, H. Prenen, F. Benedetti, H. Mizuguchi, L. Makris, M. Ito, A. Ohtsu, *New Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1909-19.

¹⁹⁸ H.-J. Lenz, S. Stinzinger, F. Loupakakis, *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 777-83.

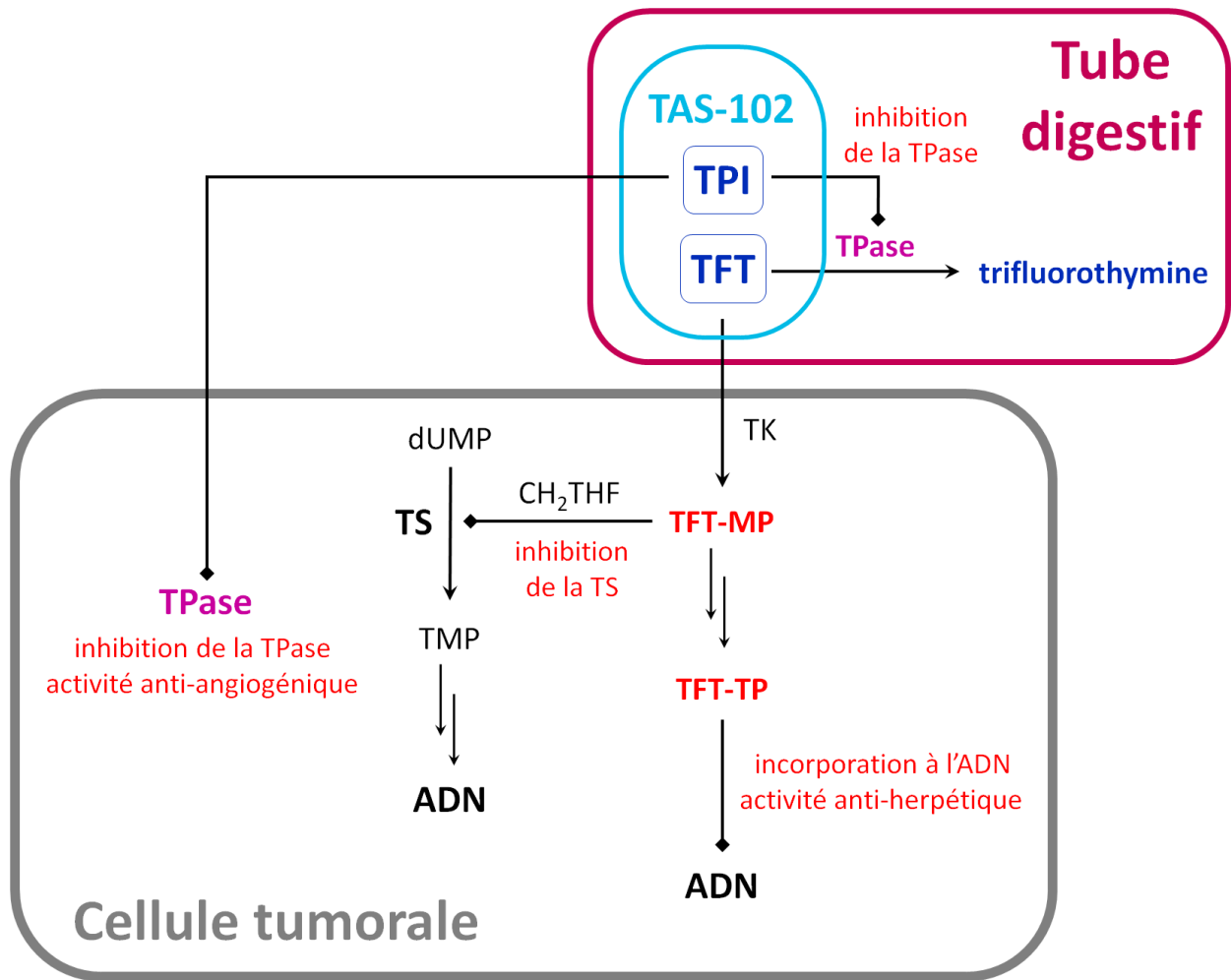


Figure 53 : Mécanisme d'action du TAS-102.

IV. Projet de recherche

Travaux antérieurs

Notre projet consiste en une conception rationnelle d'inhibiteurs de la TPase à partir des données issues de la co-cristallisation de l'enzyme et de l'étude des inhibiteurs de la littérature qui ont été présentées dans ce chapitre.

La structure des inhibiteurs que nous avons conçus est construite autour du motif pharmacophorique que représente le noyau pyrimidinedione du substrat naturel de l'enzyme (la thymidine). Ce noyau est combiné à un hétérocycle aromatique azoté par annélation ou par l'intermédiaire d'un espaceur de longueur variable afin de combler les poches présentes dans le site actif autour du site de liaison de la thymidine (figure 54).

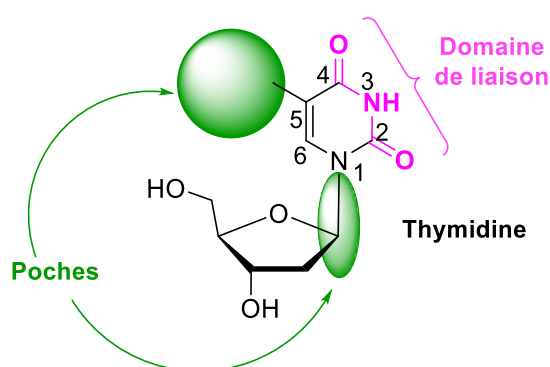


Figure 54 : Représentation de la thymidine et des poches du site actif présentes à proximité de son site de liaison.

Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire, et notamment ceux effectués pendant la thèse de Karen Akinin,¹⁰ ont permis de développer 3 séries d'inhibiteurs (figure 55) :

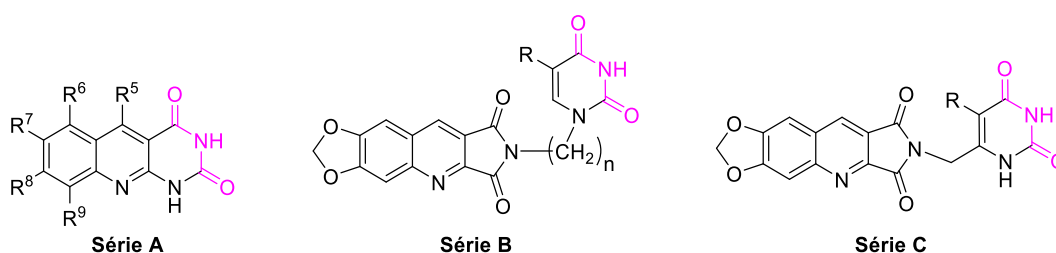


Figure 55 : Structures générales des séries d'inhibiteurs A, B et C.

- ⇒ Les pyrimido[4,5-*b*]quinoléine-2,4(1*H*,3*H*)-diones de la **série A**, hétérocycles rigides constitués qu'une quinoléine annelée au noyau pyrimidinedione,
- ⇒ Les 2*H*-pyrroloquinoléine-1,3-diones / pyrimidinediones de la **série B**, plus flexibles, comportant une pyrimidinedione connectée en position 1 à une pyrroloquinoléine par une chaîne polyméthylénique,

- ⇒ Les 2*H*-pyrroloquinoléine-1,3-diones / pyrimidinediones de la **série C**, similaires à celles de la série B, mais dans lesquelles la liaison entre les deux hétérocycles est assurée uniquement par un pont méthylène connecté à la position 5 de la pyrimidinedione.

Une étude de modélisation moléculaire a permis de valider cette approche.

Le docking des molécules de la **série A** a montré qu'elles se positionnaient bien dans le site actif, leur noyau pyrimidinedione se superposant à celui du TPI, inhibiteur de référence (en rose, figure 56). Le site actif de l'enzyme semble tolérer des molécules tricycliques substituées par des groupements volumineux ou même des molécules tétracycliques. Parmi les positions explorées sur le squelette de la **série A**, la modélisation suggère que la présence d'un substituant en position 5 n'est pas favorable au bon positionnement. En revanche, l'introduction d'un groupement en position 8 place les molécules dans une conformation compatible avec l'établissement de liaisons hydrogène avec les résidus des acides aminés du site actif.

Le docking des composés des **séries B** et **C** a donné des résultats assez inattendus. En effet, contrairement à ce qui avait été prévu, le noyau pyrimidinedione ne se positionne pas comme celui du TPI ou des inhibiteurs de la **série A**. C'est la partie pyrroloquinoléine qui prend sa place, ce qui suggère que le motif CO-NH-CO impliqué dans la liaison au site actif peut être remplacé par le motif dioxolane (en rose, figure 57). Par ailleurs, l'espaceur méthylénique vient placer la pyrimidinedione dans une région du site actif non utilisée par le TPI. Les travaux de modélisation ont mis en évidence dans le site actif de l'enzyme une large poche située en face du site de liaison de la thymidine, qui était jusqu'alors non explorée. Cette poche est constituée d'une partie gauche (en bleu), assez proche du site de liaison, où vient s'insérer la pyrimidinedione des composés de la **série C**, et d'une partie droite, plus éloignée (en vert), où se positionne le tenseur aliphatique et la pyrimidinedione des molécules de la **série B**.

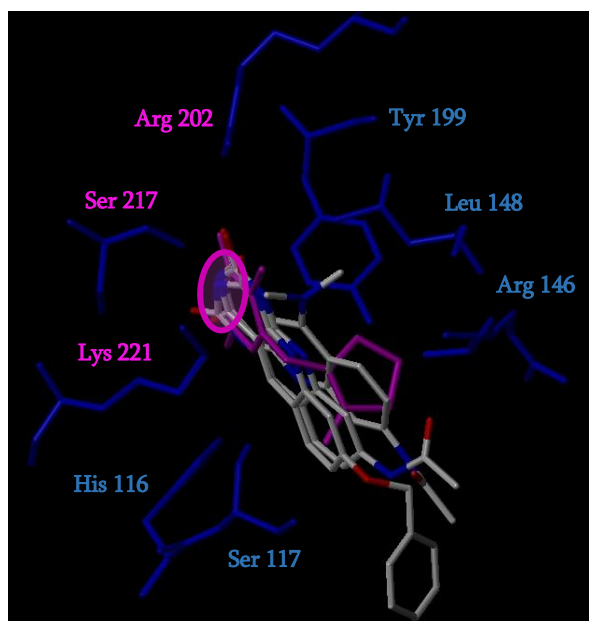


Figure 56 : Docking du TPI (en rose) et des dérivés de la série A dans le site actif.

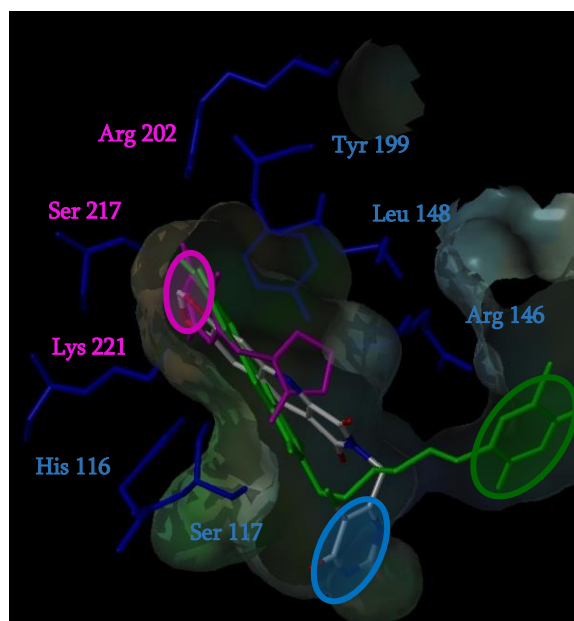


Figure 57 : Docking du TPI (en rose) et des dérivés des séries B et C dans le site actif.

Une première évaluation du pouvoir inhibiteur de ces trois familles de composés vis-à-vis de la TPase de *Escherichia Coli* (EcTPase) a été réalisée en se plaçant à 300 μM de thymidine (la valeur de la K_M de l'enzyme) et en présence de 300 μM de produit à tester. L'évaluation biologique ayant été entreprise à la fin de la thèse de Karen Aknin, les manipulations n'ont pu être reproduites plusieurs fois. Ce criblage préliminaire a néanmoins permis de mettre en évidence l'activité de certains composés dans les trois séries, corroborant ainsi les résultats de la modélisation moléculaire.

L'ensemble de ces résultats nous a encouragés à poursuivre le développement de certaines de ces séries à en mettre au point de nouvelles.

Travaux envisagés

Dans un premier temps, nous avons continué le développement de la **série A**, au sein de laquelle plus d'une quinzaine de produits avaient été synthétisés, et de la **série C**, pour laquelle un seul inhibiteur avait été obtenu (figure 55, $R = \text{Br}$).

Dans le cas de la **série A**, l'objectif a été d'introduire de nouveaux substituants sur les positions 7 à 9 afin de remplir de manière optimale la partie gauche de la « nouvelle » poche, le reste de la structure restant inchangé (figure 58).

Concernant la **série B**, nous n'avons pas prévu de synthétiser de nouvelles structures, mais les inhibiteurs déjà développés seront testés pour pouvoir les comparer aux autres séries.

Pour la **série C**, différentes modifications seront apportées au niveau du noyau substituant la pyrroloquinoléine afin de dégager des relations structure-activité à ce niveau (figure 58, $n = 0$). La partie tétracyclique pyrroloquinoléine portant un dioxolane sera en revanche conservée.

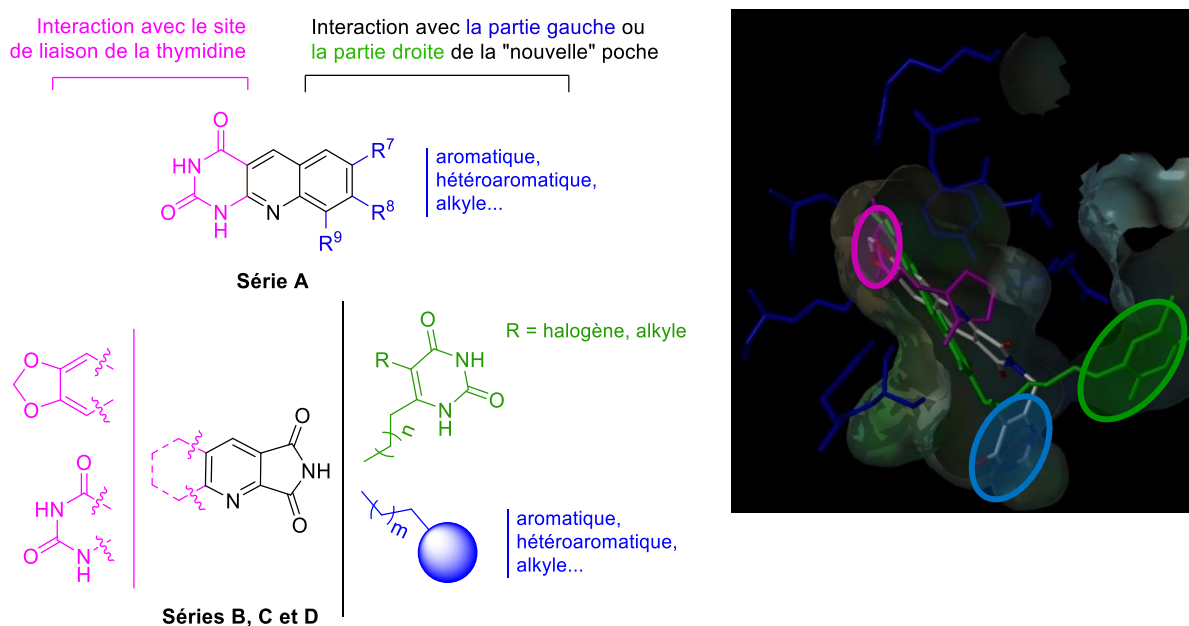


Figure 58 : Structures générales des inhibiteurs des séries A, B, C et D.

Dans un second temps, afin d'augmenter les interactions avec le site actif, nous avons projeté de synthétiser une nouvelle famille d'inhibiteurs, la **série D**, dans laquelle le noyau pyrimidinedione se substitue au fragment méthylènedioxyphényle des **séries B** et **C** (figure 58). Ces pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8-tétraones seront substituées sur l'atome d'azote du maléimide par des bras de taille et de nature variables.

Nous avons envisagé l'obtention des molécules de la **série D** par une réaction de type multicomposants, inspirée des travaux ayant permis d'accéder aux molécules des précédentes séries.

Le troisième volet de notre projet de recherche correspond au développement de nouvelles séries basées sur un squelette furo[3,4-*b*]- ou pyrano[4,3-*b*]quinoléine (les **séries E**, figure 59). L'interaction avec le site de liaison de la thymidine sera assurée par un motif dioxolane ou un noyau pyrimidinedione, tandis que l'hétérocycle oxygéné (furane ou pyrane) jouera un rôle de plateforme permettant aux divers substituants de réaliser des interactions avec des acides aminés situés du côté gauche ou droit de la « nouvelle » poche.

L'accès aux **séries E** fera appel à des réactions mises au point au laboratoire, notamment une réaction tandem de cyclofonctionnalisation catalysée à l'argent permettant de former par cycloisomérisation un noyau furane ou pyrane, qui est fonctionnalisé par l'introduction concomitante d'un substituant oxygéné (R^2). Afin d'apporter davantage de diversité moléculaire à ces structures, une étude méthodologique de la réaction tandem pour l'introduction de substituants carbonés (en R^2) sera effectuée.

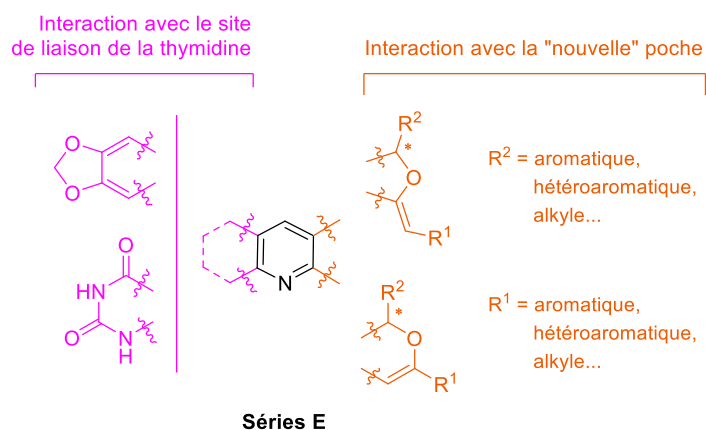


Figure 59 : Structures générales des inhibiteurs des séries E.

Publications

Les travaux décrits dans cette thèse ont fait l'objet de deux publications : une première concernant le développement de la synthèse des pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8-tétraones sélectivement substituées en position 7,¹⁹⁹ et une seconde qui a trait à la méthodologie de cyclofonctionnalisation conduisant aux pyranoquinoléines substituées par des nucléophiles carbonés aromatiques.²⁰⁰

¹⁹⁹ A. Tourteau, E. Merlet, A. Bontemps, M. Leland, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, S. Desbène-Finck, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *32*, 7028-35.

²⁰⁰ A. Bontemps, G. Mariaule, S. Desbène-Finck, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, V. Michelet, P. Belmont, *Synthesis* **2016**, *48*, 2178-90.

Chapitre 2 :

Synthèse des inhibiteurs des séries A, B, C et D

I. Synthèse des pyrimido[4,5-*b*]quinoléines-2,4(1*H*,3*H*)-diones (série A)

I.A. Contexte

Les inhibiteurs de la série A ont été conçus par annélation du noyau pyrimidinedione du substrat naturel de la TPase (la thymidine) à une quinoléine, l'idée étant de reproduire les liaisons hydrogène établies entre l'enzyme et son substrat et de remplir les poches situées à proximité par l'intermédiaire de la quinoléine et de ses substituants. L'accès à ces structures de type **1** (figure 60) a été rendu possible grâce à une réaction multicomposants en un pot développée au laboratoire au cours de la thèse de Karen Akin.¹⁰

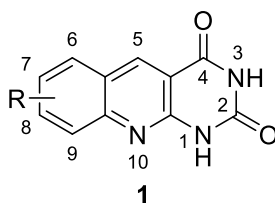


Figure 60 : Structure générale des inhibiteurs de la série A.

Par rapport à une approche synthétique linéaire classique, les réactions multicomposants offrent de nombreux avantages en termes d'économie d'atomes, de convergence, de simplicité d'exécution et les coûts de traitement et de purification associés sont également moindres.²⁰¹ Leur emploi en chimie médicinale est fréquent car elles permettent en outre de développer des voies de synthèse très polyvalentes.²⁰²

Si de nombreuses voies de synthèse ont été proposées pour l'accès aux pyrimido [4,5-*b*]quinoléine-2,4(1*H*,3*H*)-diones *N*¹,*N*³-substituées,²⁰³ la synthèse de leurs homologues non substitués, tels que le squelette **1**, est, elle, beaucoup moins décrite dans la littérature. On peut néanmoins séparer les réactions utilisées pour l'obtention du squelette **1** dans la littérature en deux catégories **A** et **B** (schéma 11). Les méthodes de la catégorie **A** consistent à créer le cycle pyridique central, tandis que celles de la catégorie **B** partent d'un noyau quinoléine déjà formé et créent le cycle pyrimidique latéral.

Les méthodes de type **A** utilisent le plus souvent la pyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (l'acide barbiturique) comme précurseur du cycle pyrimidique et celui-ci a d'abord été condensé sur des 2-aminobenzaldéhydes dans les conditions de la synthèse de Friedländer

²⁰¹ Y. Huang, A. Yazbak, A. Domling, *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*, Chichester, UK, John Wiley & Sons, **2012**, 768 p.

²⁰² P. Slobbe, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Med. Chem. Comm.* **2012**, 3, 1189-218.

²⁰³ B. Kokel, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, 31, 845-55.

(méthode **A1**).^{204,205,206,207} Cette approche polyvalente est cependant limitée par l'emploi de dérivés qui sont instables. L'hydrolyse *in situ* de l'acétal correspondant permet de s'affranchir de cette contrainte (méthode **A2**).^{208,209} tout comme l'utilisation d'un dérivé nitré (méthode **A3**).^{209,210} qui nécessite toutefois une étape supplémentaire de réduction du groupement nitro. D'autres méthodes permettent d'obtenir le squelette **1** à partir de la 6-amino pyrimidine-2,4-dione (méthode **A4**)²⁰⁶ ou de l'acide 2-amino-4,5-diméthylbenzoïque (méthode **A5**).²⁰⁹

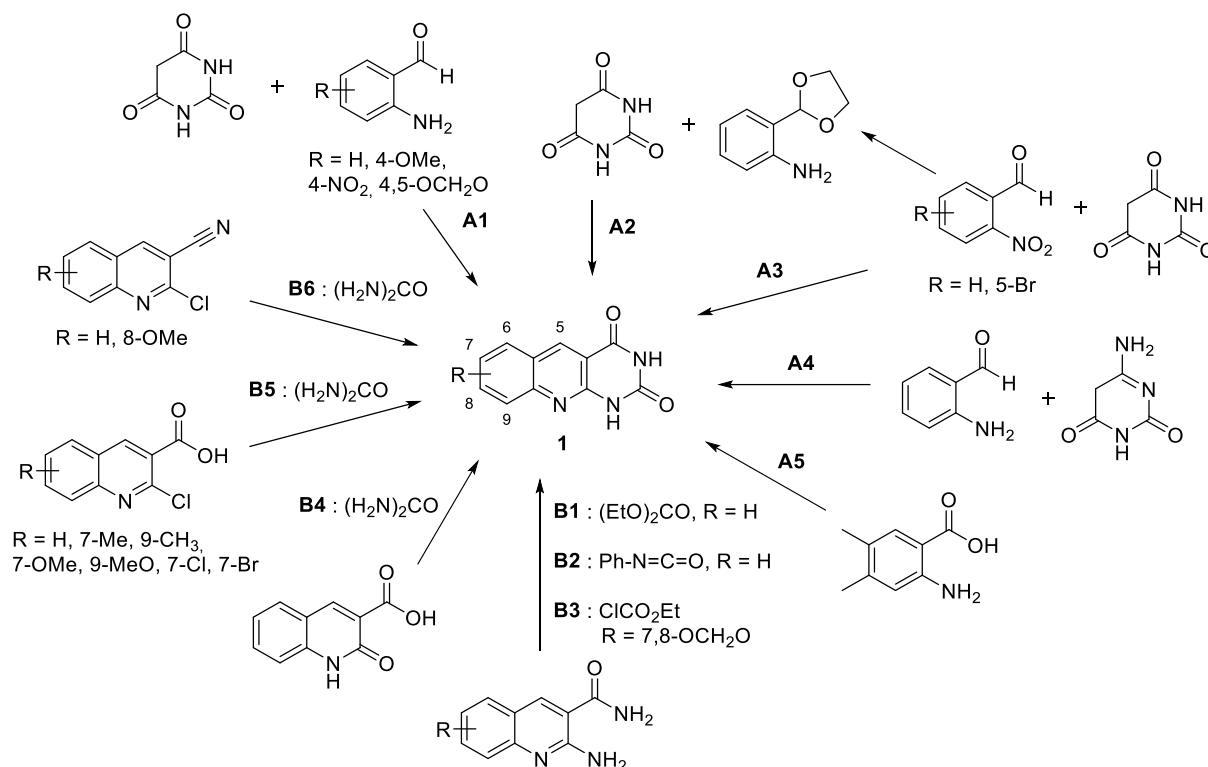


Schéma 11 : Voies d'accès au squelette **1** décrites dans la littérature.

Concernant les méthodes de type **B**, la construction de la pyrimidinedione peut se faire par condensation d'un 2-aminoquinoléinocarboxamide avec le carbonate de diéthyle (méthode **B1**), l'isocyanate de phényle (méthode **B2**)²¹¹ ou encore le chloroformiate d'éthyle (méthode **B3**).²¹² Une autre approche consiste à condenser l'urée sur un acide 2-oxo-1,2-dihydroquinoléinique²¹³ (méthode **B4**), un acide 2-chloroquinoléinique²¹⁴ (méthode **B5**) ou encore un 2-chloroquinoléinenitrile²¹⁵ (méthode **B6**).

²⁰⁴ M. Conrad, H. Reinbach, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 1339-44.

²⁰⁵ J. Tröger, C. Cohaus, *J. Prakt. Chem.* **1927**, *117*, 97-116.

²⁰⁶ F. E. King, T. J. King, *J. Chem. Soc.* **1947**, 726-34.

²⁰⁷ O. Jie, W. Jin-Jun, H. Guang-Fan, L. Yu-Tian, J. Gui-Ji, *Youji Huaxue* **1995**, *15*, 99-103.

²⁰⁸ H. Baumgarten, D. L. Pedersen, M. W. Hunt, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1977-81.

²⁰⁹ D. E. O'Brien, L. T. Wienstock, C. C. Cheng, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 99-105.

²¹⁰ H. Fenner, P. Michaelis, *Arch. Pharm.* **1972**, *305*, 751-7.

²¹¹ E. C. Taylor, N. W. Kalenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5108-15.

²¹² H. K. Gakhar, R. Kaur, A. Gupta, S. B. Gupta, *Indian J. Chem.* **1990**, *29*, 992-4.

²¹³ O. A. El Sayed, F. M. El-Bieh, S. I. El-Aqeel, B. A. Al-Bassam, M. E. Hussain, R. U. Roy, K. R. Desai, *Indian J. Heterocycl. Chem.* **1953**, *14*, 327-30.

²¹⁴ V. Nadaraj, S. T. Selvi, S. Mohan, T. D. Thangadurai, *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2911-9.

²¹⁵ A. Chandra, S. Upadhyay, B. Singh, N. Sharma, R. M. Singh, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9219-24.

Dans l'ensemble, toutes ces voies de synthèse nécessitent plusieurs étapes et ont des possibilités de substitution assez limitées, le plus souvent aux positions 7 et 8.

Il y a quelques années, au sein de notre laboratoire, une nouvelle voie d'accès aux hétérocycles de type **1**, à la fois plus directe et plus polyvalente, avait été développée. Il s'agit d'une méthode en un pot permettant d'accéder à une grande diversité de structures.

I.B. Travaux antérieurs

La voie d'accès mise au point au laboratoire consiste en une réaction multicomposants et en un pot mettant en jeu un mélange équimolaire d'une aniline, d'un aldéhyde et d'acide barbiturique dans de l'acide acétique (AcOH) au reflux ou dans un mélange 1:1 acide acétique / diméthylformamide (DMF) chauffé à 120 °C.

Avec cette méthode, les rendements sur produit brut monotache en CCM sont modérés à excellents et la substitution du squelette **1** couvre les positions 5 à 9. Elle avait ainsi permis d'obtenir de nombreux dérivés de ce type, dont les composés **2** à **15** (schéma 12).^{10,216}

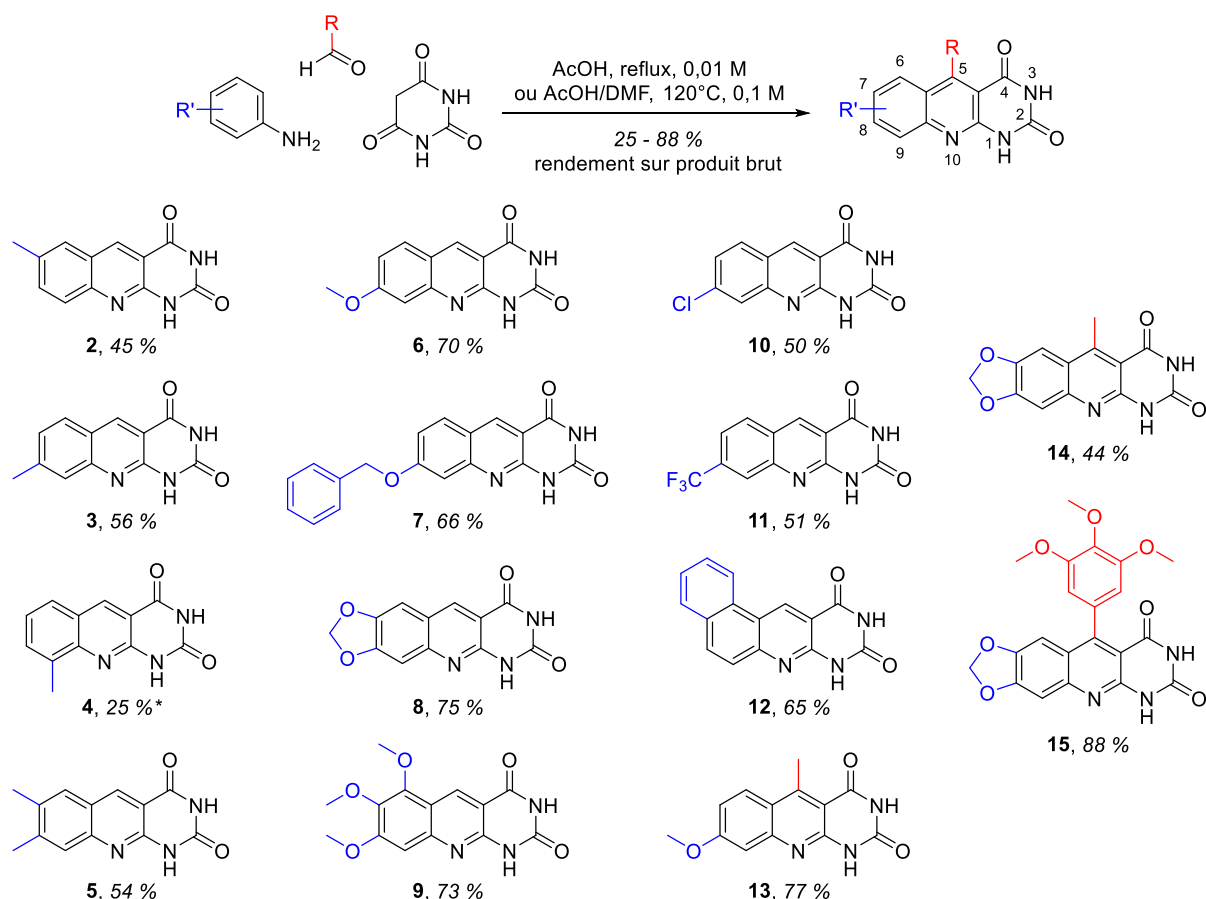


Schéma 12 : Molécules préparées grâce à la réaction multicomposants en un pot (*rendement sur produit purifié).

²¹⁶ K. Aknin, S. Desbène-Finck, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 123-30.

Bien que le brut réactionnel ne nécessite généralement pas d'étape de purification, on observe parfois une proportion plus ou moins importante d'un intermédiaire de type dihydroquinoléine **16** (schéma 13). Ces intermédiaires sont parfois insolubles dans le milieu réactionnel, ce qui freine la réaction et limite le rendement. Néanmoins, une oxydation par chauffage dans divers solvants (eau, acide trifluoroacétique (TFA), diméthylsulfoxyde (DMSO)...) ou une purification par chromatographie sur colonne de silice permet généralement d'éliminer ce type d'impureté.

Le mécanisme de la réaction est présenté sur le schéma 13. La dernière étape est une substitution électrophile sur le fragment aniline, des substituants électrodonneurs en *méta* sur ce fragment favorisent donc la réaction, avec des temps réactionnels en moyenne plus courts et de meilleurs rendements par rapport aux dérivés comportant d'autres substituants.²¹⁶

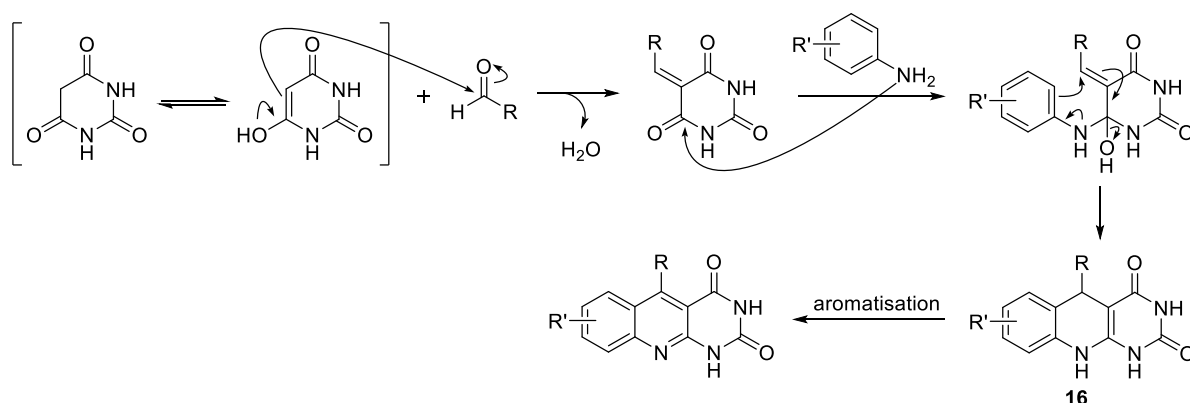


Schéma 13 : Proposition de mécanisme pour la réaction multicomposants.

Pour le composé 5-diméthylamino **18**, une approche séquentielle avait été adoptée, avec condensation de la méthylènedioxyaniline sur le 6-chlorouracile pour former l'intermédiaire **17**, puis action du chlorure de phosgène iminium (schéma 14).¹⁰

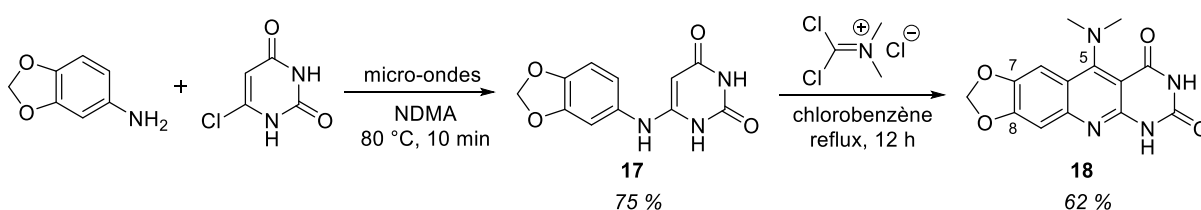


Schéma 14 : Voie de synthèse du composé diméthylamino **18**.

L'étude préliminaire de modélisation moléculaire avait montré que l'effet du substituant en position 5 (schéma 14) est moins important pour l'activité que celui du groupement en position 8. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse d'inhibiteurs portant des substituants en position 7 et 8 ou comportant un ou deux noyaux aromatiques annelés aux positions 7 à 9.

I.C. Synthèses réalisées

I.C.1. Composés déjà préparés au laboratoire

Afin de pouvoir tester en même temps l'intégralité des composés de la série A, certaines des molécules développées antérieurement au laboratoire ont dû être resynthétisées. Obtenus aisément à l'aide du protocole classique de la réaction en un pot, il s'agit des inhibiteurs **4**, **6**, **7**, **9** et **11** (schéma 12).

La synthèse d'un nouveau lot de l'analogue chloré en position 8 (**10**), à partir de la *m*-chloroaniline, a été plus délicate. Effectivement, l'utilisation du protocole classique a fourni un mélange de composés impossible à purifier par recristallisation ou par chromatographie sur colonne de silice. L'analyse du spectre RMN ^1H du brut suggère que parmi les sous-produits formés, il y a un isomère de position du produit attendu (**20**, schéma 15). En effet, l'étape de cyclisation peut se faire sur deux positions différentes. A cause de la gêne stérique apportée par l'atome de chlore, l'une d'entre elles est favorisée (en bleu) et conduit au produit attendu. Malgré cet encombrement, l'intermédiaire ouvert **19** peut aussi cycliser sur l'autre position (en rouge), donnant ainsi l'isomère minoritaire observé, où l'atome de chlore se retrouve en position 6.

Ce type de réactivité a déjà été observé pour la synthèse de Skraup des quinoléines, lorsque la matière première engagée est la *m*-chloroaniline.²¹⁷ Dans ce cas particulier, le rapport entre les quantités de 7-chloro et de 5-chloroquinoléine obtenues augmente avec la concentration et l'acidité du milieu réactionnel.

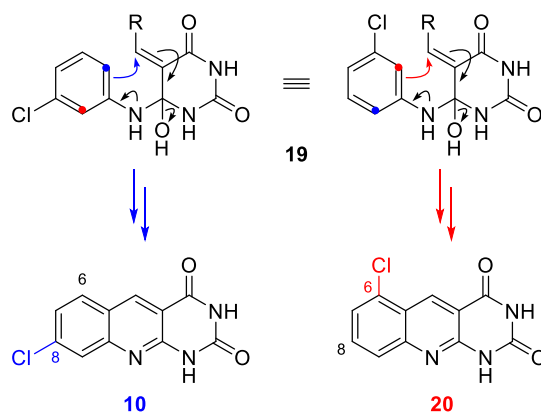


Schéma 15 : Modes de cyclisation possible avec la *m*-chloroaniline.

Nous avons donc effectué la réaction en milieu deux fois plus concentré, mais cela n'a pas permis de réduire significativement la proportion de ce sous-produit. En revanche, diluer deux fois le milieu réactionnel a permis d'obtenir un brut contenant uniquement l'isomère souhaité (**10**) et où la principale impureté restante est une petite quantité du dérivé non aromatisé correspondant (estimée à 10 % par RMN ^1H). Cette dernière est éliminée sans problème lors de

²¹⁷ L. Bradford, T. J. Elliott, F. M. Rowe, *J. Chem. Soc.* **1947**, 437-45.

la purification par chromatographie sur colonne de silice, au cours de laquelle le dérivé **10** est isolé avec 30 % de rendement (schéma 16).

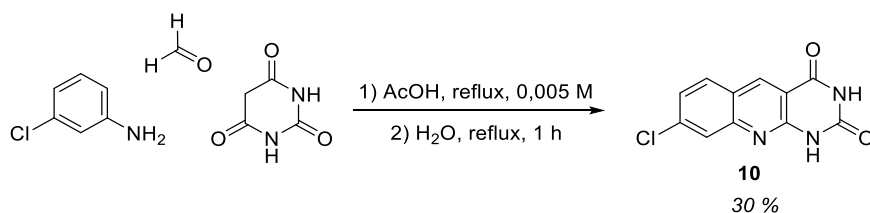


Schéma 16 : Préparation du composé A20.

I.C.2. Nouveaux composés synthétisés

En utilisant les conditions classiques de la réaction en un pot, plusieurs nouvelles structures ont été synthétisées, avec divers substituants sur les positions 7, 8 et 9 (tableau 2). Ces produits ont été purifiés par recristallisation, par chromatographie sur colonne ou par simple lavage avec divers solvants.

Comme il est difficile de suivre l'évolution de ce type de réaction par CCM ou par RMN, il est possible que la conversion ne soit pas totale au bout du temps indiqué dans le tableau 2, notamment pour les substrats donnant des intermédiaires peu solubles et/ou peu réactifs. Cela expliquerait en partie la faiblesse de certains rendements.

Les composés **22** et **23** ont été préparés en utilisant les deux types de conditions opératoires classiques de la réaction multicomposants en un pot. Par rapport à la réaction dans l'acide acétique dilué (0,01 M), celle dans le mélange 1:1 acide acétique/DMF plus concentré (0,1 M) donne un brut réactionnel plus propre et des rendements respectifs de 41 et 57 %.

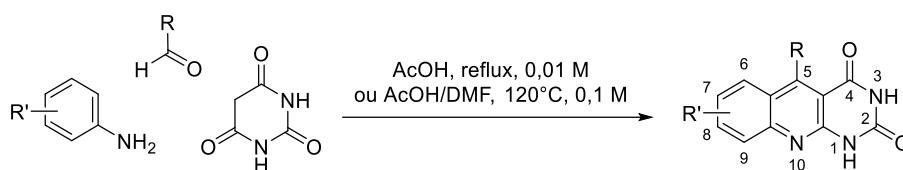
Pour les analogues **24** et **26**, en revanche, seul l'acide acétique a été testé et les rendements obtenus sont de 17 et 32 % respectivement.

Enfin, les composés **21** et **25** n'ont pas pu être obtenus avec une pureté satisfaisante, que ce soit par purification par chromatographie ou par recristallisation. Les rendements sur le produit non analytiquement pur sont de 49 et 33 %.

L'utilisation du 1-aminoanthracène produit après 19 h de réaction un mélange du produit angulaire attendu **27** et de l'intermédiaire dihydrogéné correspondant où ce dernier est très majoritaire. La dilution du milieu réactionnel (0,0028 M) a permis de réduire le temps réactionnel à 3 h car cet intermédiaire, peu soluble dans l'acide acétique, ne précipite plus. Le composé **27** est alors obtenu avec 67 % de rendement.

Avec le 2-aminoanthracène, la cyclisation pourrait théoriquement se produire sur deux positions différentes, conduisant aux produits **28** et **29** (mécanismes en bleu et en rouge sur le

schéma 17). Classiquement, ce type de cyclisation est en faveur du produit angulaire **28**.^{218,219} Toutefois, en raison de la trop faible solubilité du produit obtenu, les expériences RMN 2D réalisées (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) n'ont pas mis en évidence de couplages nous permettant d'affirmer que celui-ci correspond bien à **28**.

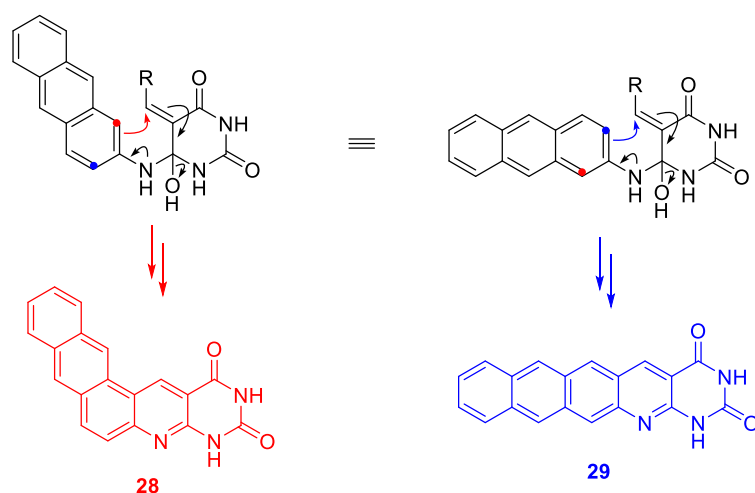


Produit	Structure	Conditions	Temps (h)	Rdt (%)
21		AcOH reflux	6	49 ^a
22		AcOH/DMF 120 °C	3	41
23		AcOH/DMF 120 °C	6	57
24		AcOH reflux	5	17
25		AcOH reflux	4	33 ^a
26		AcOH reflux	19,5	32
27		AcOH reflux ^b	3	67
28		AcOH reflux ^b	1,5	44

Tableau 2 : Nouvelles structures synthétisées en série A
(^arendement sur produit non analytiquement pur, ^b0,0028 M).

²¹⁸ S. Tu, S. Wu, S. Yan, W. Hao, X. Zhang, X. Cao, Z. Han, B. Jiang, F. Shi, M. Xia, J. Zhou, *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 239-42.

²¹⁹ M. Schulze, D. E. Scott, A. Scherer, F. Hampel, R. J. Hamilton, M. R. Gray, R. R. Tykwinski, J. M. Stryker, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5930-3.

Schéma 17 : Modes de cyclisation conduisant à **28** et **29**.

Ce composé est obtenu en 17 h avec 36 % de rendement. Comme dans le cas précédent, le temps de réaction est écourté significativement par la dilution du milieu réactionnel (1,5 h). Le rendement est également légèrement meilleur (44 %).

I.C.3. Essais avec des *o*-phénylènediamines

L'utilisation d'une *o*-phénylènediamine dans la réaction multicomposants peut conduire à des composés possédant un groupement amino en position 9, position sur laquelle nous n'avons introduit jusqu'à présent qu'un nombre limité de substituants en comparaison des positions 7 et 8. En outre, la présence d'un groupement amino rendrait possible une éventuelle post-fonctionnalisation à ce niveau.

Nous souhaitons ainsi préparer les composés **30** et **31** (figure 61) *via* la réaction en un pot, à partir de la *N*¹-méthyl-4-nitrobenzène-1,2-diamine **32** et de la *N*¹-phénylbenzène-1,2-diamine **33**, respectivement.

Comme la réaction multicomposants met en présence une *o*-phénylènediamine avec le paraformaldéhyde et l'acide acétique, on peut aussi s'attendre à ce que cette diamine se condense sur l'un ou l'autre de ces réactifs et conduise aux benzimidazoles **34** et **35** (à partir de **32**) ou **36** et **37** (à partir de **33**) (figure 61).

D'autres sous-produits pourraient également se former (**38**, **39** et **40**, figure 61) à partir de l'intermédiaire issu de la condensation de l'acide barbiturique et du formaldéhyde (schéma 18). En effet, chacun des atomes d'azote de la phénylènediamine peut jouer le rôle de nucléophile dans l'addition 1,4 sur cet intermédiaire. Ainsi, à partir d'une phénylènediamine *N*-substituée, possédant une amine primaire et une amine secondaire, la réaction peut aboutir aux deux hétérocycles **41** et **42** (en rouge et en bleu sur le schéma 18). Enfin, si le substituant de l'amine secondaire est un noyau aromatique, on peut encore envisager le produit **43**, où la cyclisation se fait sur ce substituant aromatique (en vert).

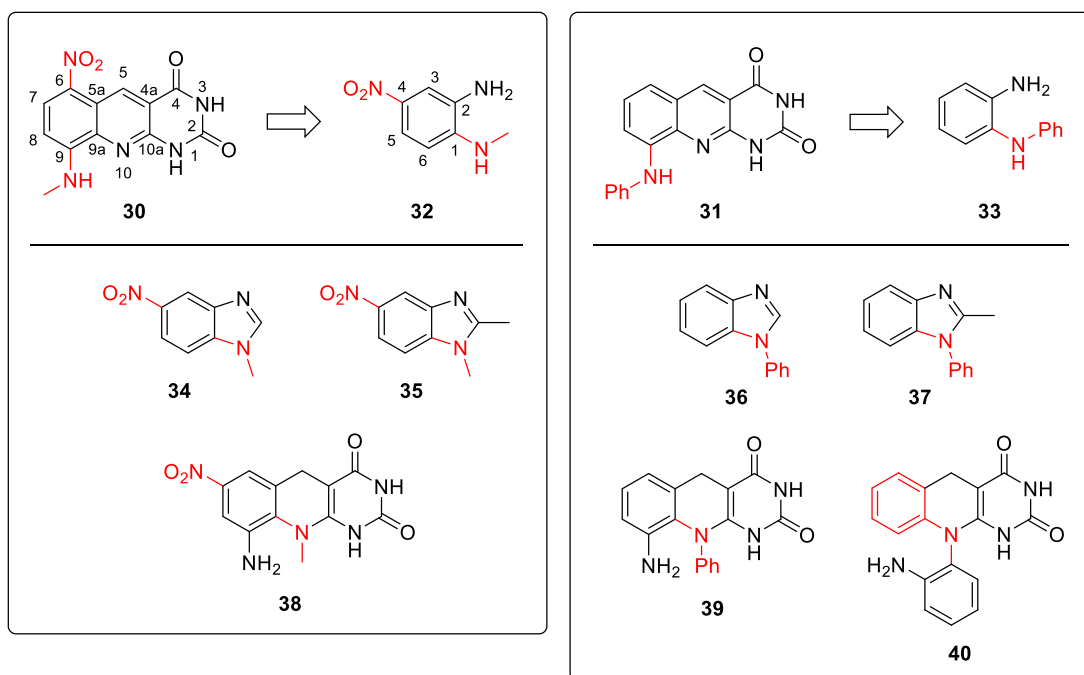


Figure 61 : Produits pouvant être obtenus en engageant les *o*-phénylènediamines **32** et **33** dans la réaction multicomposants.

Malgré la complexité de la réactivité attendue avec ce type de substrat, la réaction a tout de même été tentée avec la *N*¹-méthyl-4-nitrobenzène-1,2-diamine **32**. Avec cette matière première, les quatre hétérocycles **30**, **34**, **35** et **38** sont possiblement obtenus (figure 61). Au niveau de la première étape du mécanisme, l'attaque nucléophile, c'est le produit **30** qui est favorisé car l'atome d'azote en position 2 est le plus nucléophile.

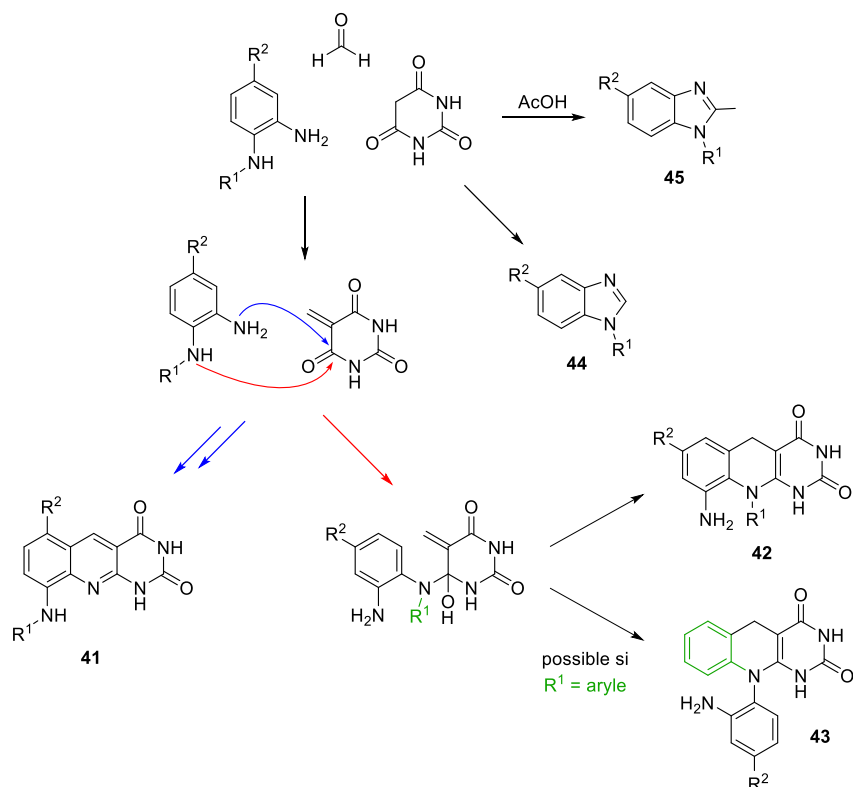


Schéma 18 : Mécanisme proposé pour la formation des produits **41** à **45**.

Dans les conditions classiques de la réaction en un pot, dans l'acide acétique à reflux, les principaux produits observés sont les deux benzimidazoles **34** et **35**, issus de la condensation de **32** sur le formaldéhyde ou l'acide acétique (schéma 19).

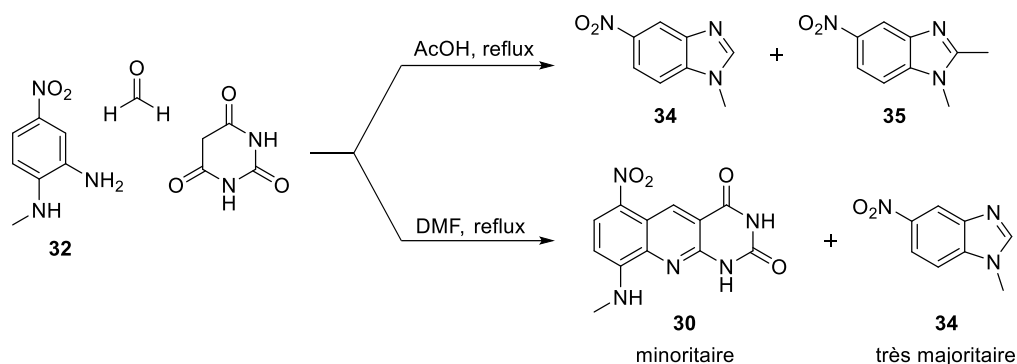


Schéma 19 : Réactions multicomposants réalisées avec le substrat 32.

Afin de s'affranchir de la formation de **35**, la réaction a été réalisée dans le DMF. De nombreux produits sont alors formés, le benzimidazole **34** étant majoritaire (schéma 19). Le produit attendu **30** se forme bien, mais reste largement minoritaire et n'a pas pu être isolé par chromatographie sur colonne de silice.

Nonobstant ces résultats peu encourageants, un essai a été effectué avec la *N*¹-phénylbenzène-1,2-diamine **33**. Bien que l'analyse du spectre RMN ¹H du brut de la réaction suggère que le produit attendu **31** est majoritaire (parmi les nombreuses impuretés présentes, nous n'avons identifié que le benzimidazole **37**), celui-ci n'a pas pu être isolé (schéma 20).

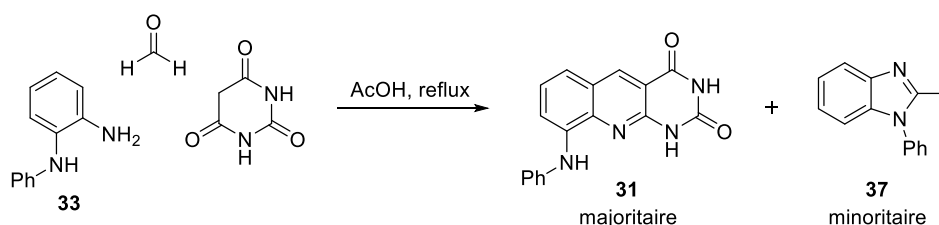


Schéma 20 : Réaction multicomposants réalisée avec le substrat 33.

Par la suite, il serait envisageable de réaliser la réaction dans le DMF et de procéder à une introduction séquencée des réactifs :

- 1) dans un premier temps, formation de l'intermédiaire issu de la condensation de l'acide barbiturique et de l'aldéhyde
- 2) ajout de l'aniline une fois cette première étape achevée

Cette stratégie permettrait de supprimer ou au moins de limiter la formation des benzimidazole **44** et **45**.

II. Synthèse des 2*H*-pyrroloquinoléine-1,3-diones / pyrimidinediones de la série B

Constitués d'une pyrimidinedione reliée à une quinoléine-imide par une chaîne polyméthylénique à 4 ou 6 chaînons, les inhibiteurs de la série B occupent un espace important et possèdent une grande flexibilité. Leur docking dans le site actif a révélé que la quinoléine-imide occupe la place du substrat thymidine, tandis que l'espaceur et la pyrimidinedione viennent se placer dans la partie droite de la « nouvelle » poche. Ces molécules sont issues de synthèses mises au point pendant la thèse de Karen Aknin.¹⁰

Pour les molécules comportant une thymine, la synthèse avait été réalisée soit par couplage d'une thymine portant une chaîne bromoalkyle sur l'azote N^1 avec la quinoléine-imide **46** (méthode A, schéma 22), soit par couplage d'une thymine portant cette fois une chaîne aminoalkyle sur l'azote N^1 avec la quinoléine-diacide **47** (méthode B, schéma 22).

Les thymines alkylées **48** à **51** étaient issues de la bromoalkylation de la thymine et d'une amination de l'intermédiaire bromé (schéma 21).

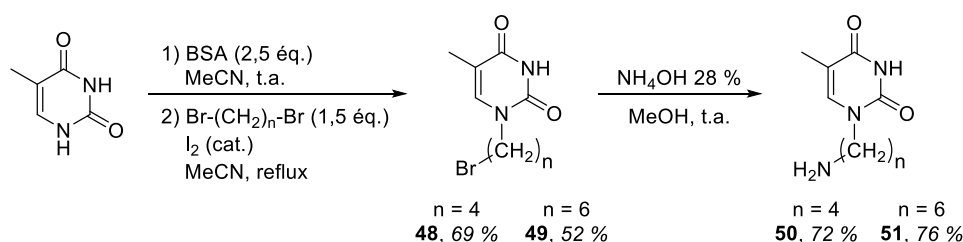


Schéma 21 : Préparation des thymidines alkylées en N^1 .

Les quinoléines **46** et **47**, quant à elles, avaient été préparées *via* une réaction multicomposants en un pot développée au laboratoire (schéma 22). Similaire à celle mise au point pour les inhibiteurs de la série A (paragraphe **I.B**), cette réaction met en jeu une aniline, le formaldéhyde et un analogue de dérivé 1,3-dicarbonylé (le bromomaléimide **52** ou l'acétylènedicarboxylate d'éthyle). Cet analogue remplace ainsi l'acide barbiturique de la synthèse en un pot des inhibiteurs de la série A.

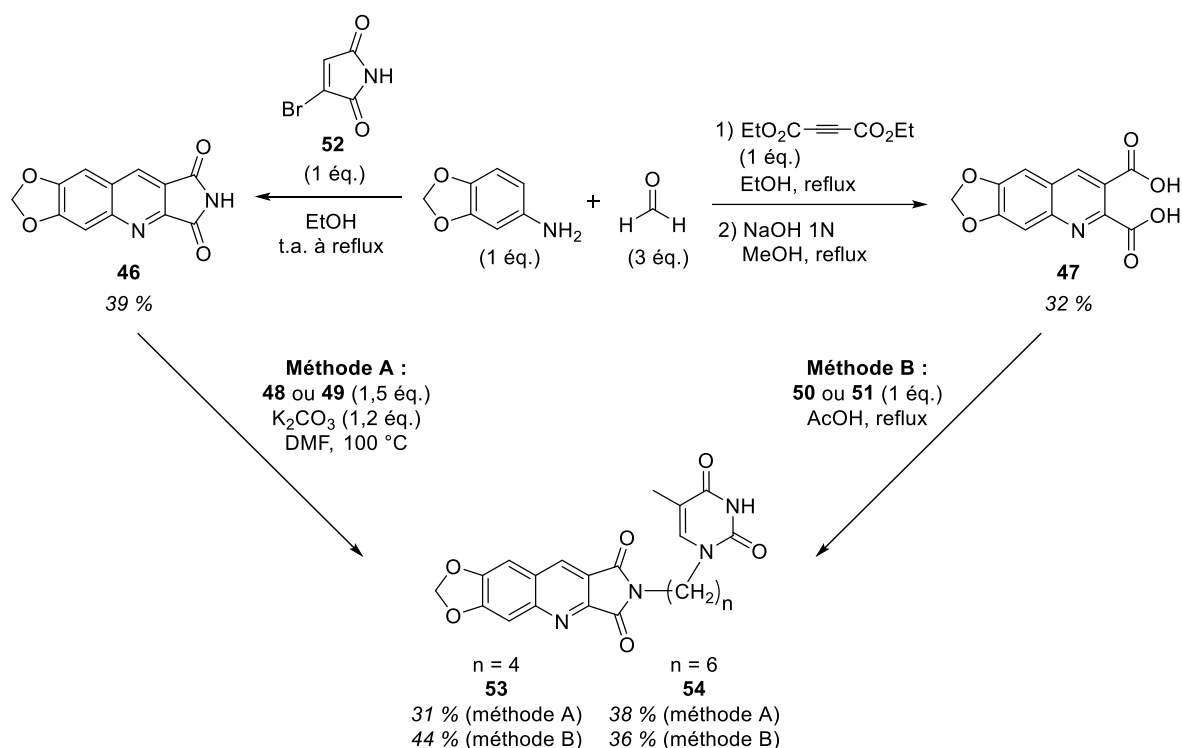


Schéma 22 : Voies d'accès aux composés 53 et 54.

Les inhibiteurs **53** et **54** avaient ainsi été synthétisés en seulement 2 ou 3 étapes à partir de la thymine avec un rendement global compris entre 14 et 28 %.

L'accès aux dérivés bromés avait nécessité l'utilisation d'un groupe protecteur en position *N*³ de la pyrimidinedione afin d'éviter la formation de produits de dialkylation. Une fois protégée puis substituée par une chaîne bromoalkyle sur l'azote *N*¹, la pyrimidinedione était couplée à la quinoléine-imide **46**. Après déprotection de la pyrimidinedione, les composés **57** et **58** avaient été obtenus avec respectivement 31 et 24 % de rendement pour 4 étapes, à partir du 5-bromouracile (schéma 23).

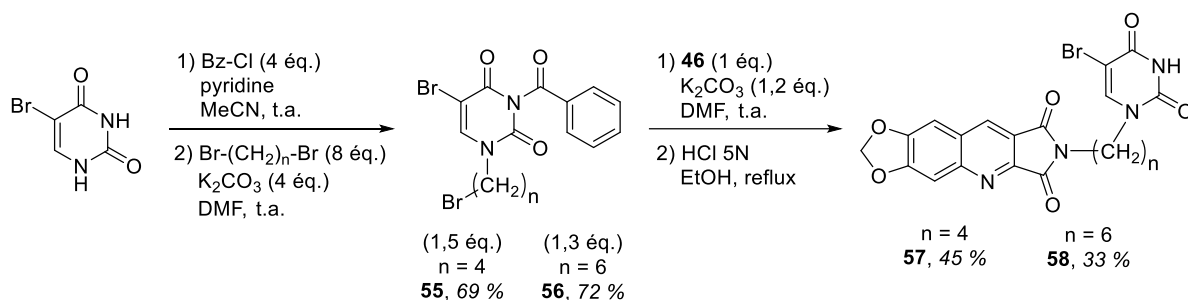


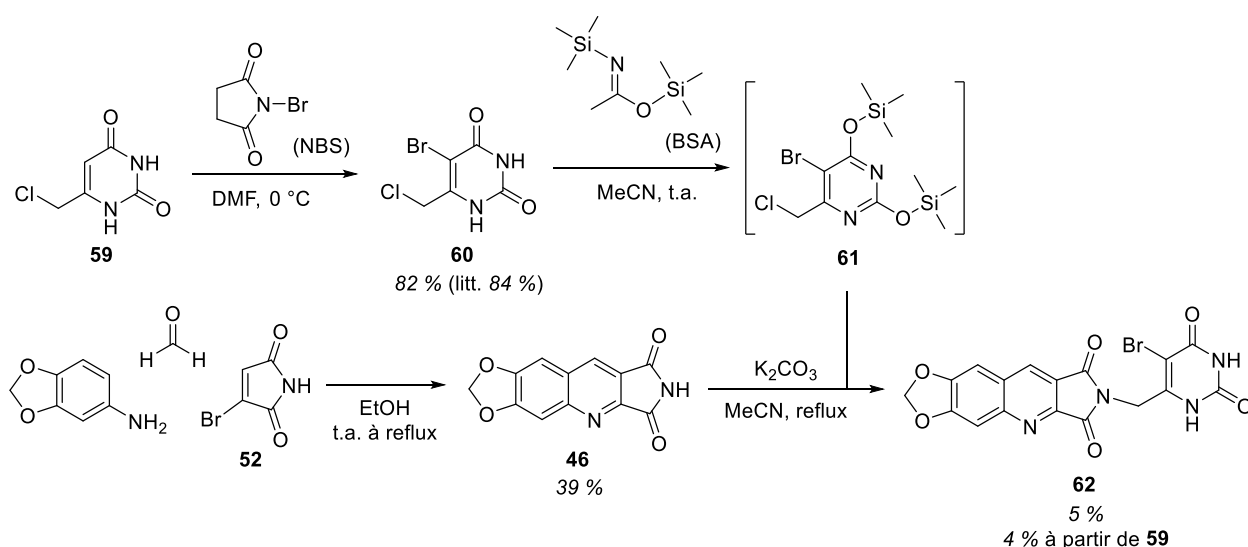
Schéma 23 : Synthèse des composés 57 et 58.

III. Synthèse des 2*H*-pyrroloquinoléine-1,3-diones / pyrimidinediones de la série C

III.A. Contexte

Lors de précédents travaux réalisés au sein de notre équipe, seul un composé de la série C avait pu être préparé. Il s'agit du dérivé **62**, qui est constitué de la quinoléine-imide **46** connectée au niveau de l'imide à la position 6 d'un 5-bromouracile *via* un pont méthylène (schéma 24). L'étude préliminaire de docking a montré que, comme pour les inhibiteurs de la série B, la quinoléine-imide se positionne à l'emplacement de la thymidine. En revanche, l'espaceur de **62** étant plus court que celui des composés de la série B, la pyrimidinedione remplit cette fois la partie gauche de la « nouvelle » poche.

La synthèse de **62** développée alors restait toutefois à optimiser, notamment au niveau de l'étape de couplage avec la quinoléine-imide **46** dont le rendement n'était que de 5 % (schéma 24).



Le dérivé **62** avait ainsi été synthétisé par *N*-alkylation de la quinoléine-imide **46** avec le 6-chlorométhyl-5-bromouracile **60**, lui-même préparé à partir du 6-chlorométhyluracile **59** et du *N*-bromosuccinimide (NBS) avec 82 % de rendement, selon un protocole décrit dans la littérature.¹⁵⁵ La quinoléine-imide **46** était obtenue grâce à la réaction à trois composants en un pot déjà présentée pour la série B (schéma 22).

L'imide de **46** ayant un p*K*_a proche de celui des NH de la pyrimidinedione **60**,²²⁰ la réaction de couplage avait nécessité la protection préalable de cette dernière pour éviter la formation de produits secondaires d'alkylation. L'emploi du bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) avait conduit à la pyrimidinedione protégée **61**, qui avait été additionnée à la quinoléine-imide **46**

²²⁰ p*K*_as estimés à l'aide du logiciel SPARC (<http://www.archemcalc.com/sparc-web/calc#/multiproperty>)

préalablement déprotonée par action du carbonate de potassium (K_2CO_3) (schéma 24). Le mélange était ensuite chauffé au reflux de l'acétonitrile.

Dix jours de réaction avaient été nécessaires pour consommer toutes les matières premières et le produit attendu **46** n'avait pu être isolé qu'avec 5 % de rendement.

Il est probable que la réaction de substitution nucléophile sur le méthylène de l'intermédiaire **61** soit ralentie par l'encombrement stérique généré par l'atome de brome. Par ailleurs, une dégradation du produit pendant le traitement et/ou la purification semble être à l'origine du faible rendement obtenu.

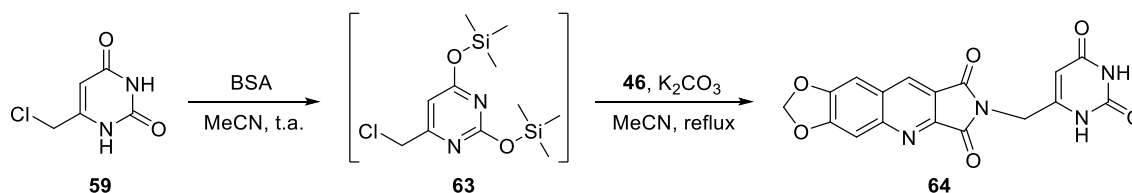
Nous avons donc choisi d'inverser les deux étapes de la synthèse, en couplant d'abord l'uracile non substitué en position 5 avec la quinoléine-imide **46** et en réalisant la bromation par le NBS ensuite. Cette approche présente aussi l'avantage d'être plus convergente, ce qui faciliterait l'introduction d'autres halogènes en position 5.

Par la suite, nous avons cherché à introduire un méthyle sur la position 5 de la pyrimidinedione, à coupler la quinoléine-imide avec la pyrimidinedione *via* la position 5 de cette dernière, et enfin, à remplacer cet hétérocycle par un phényle.

III.B. Accès aux dérivés halogénés en position 5 de la pyrimidinedione

III.B.1. Synthèse de l'intermédiaire non substitué (**64**)

Le couplage entre la quinoléine-imide **46** et le 6-chlorométhyluracile **59** a d'abord été réalisé dans des conditions proches de celles utilisées précédemment avec le composé 5-bromouracile (tableau 3, entrée 1). Le suivi de la réaction par CCM est difficile à cause de la faible solubilité des composants du milieu réactionnel dans la plupart des solvants organiques et des rapports frontaux en CCM du produit **64** et de la matière première **59** qui sont quasi-identiques quelles que soient les conditions de CCM utilisées.



Entrée	BSA (éq.)	59 (éq.)	Temps	Rdt
1	3	1,5	12 jours	60 %
2	3 + 1,5	1,5 + 0,75	7 jours	79 %

Tableau 3 : Optimisation de la réaction de couplage conduisant à **64**.

Après chauffage au reflux de l'acétonitrile pendant 6 jours, l'uracile est totalement consommé mais la réaction est poursuivie pendant encore 6 jours car des traces de la quinoléine-imide **46** persistent. La réaction ne semble pas pour autant évoluer de manière significative une fois l'uracile intégralement consommé. Au final, le produit **64** a été isolé avec 60 % de rendement.

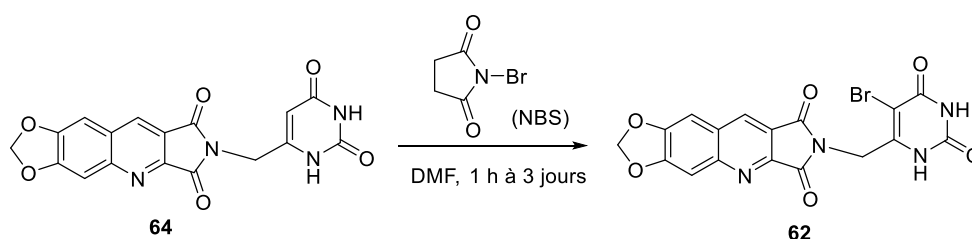
Afin d'améliorer ce rendement, nous avons suivi l'évolution de la réaction par RMN (tableau 3, entrée 2). Les quantités d'imide de départ et du produit attendu sont estimées grâce à l'analyse du spectre RMN ^1H d'un prélèvement du milieu réactionnel. Ainsi, au bout de 24h, il reste environ 54 % de quinoléine-imide. Après 5 jours de réaction, alors qu'il reste encore 41 % de **46**, 0,75 équivalent de **59** et 1,5 équivalent de BSA sont ajoutés. Cet ajout a alors permis de consommer intégralement **46**, au bout de 7 jours de réaction. Avec ce protocole expérimental, le rendement est amélioré et passe de 60 à 79 %.

III.B.2. Accès aux composés halogénés en position 5

III.B.2.a. Composé bromé (**62**)

Avec l'intermédiaire **64** en mains, nous avons effectué sa bromation en suivant le même mode opératoire que pour le 6-chlorométhyluracile (schéma 24).¹⁵⁵ A nouveau, la réaction est difficile à suivre par CCM car le produit de départ et le produit attendu ont des rapports frontaux quasi-identiques. La réaction a donc été suivie par RMN ^1H .

Un premier essai à 0 °C avec 1,1 équivalent de NBS s'est révélé peu satisfaisant puisqu'au bout de 3 jours, la conversion n'est que de 55 % (tableau 4, entrée 1). Une impureté issue de la dégradation de **64** est également observée à hauteur de 10 % (impureté **i1**). A température ambiante, une nuit suffit à atteindre 65 % de conversion (tableau 4, entrée 2). Chauffer à 80 °C n'est pas suffisant pour atteindre un plus haut degré de conversion en moins d'1h et accentue légèrement la dégradation de **64** (tableau 4, entrée 3).



Entrée	NBS (éq.)	Température	Temps	64 (%)	i1 (%)	i2 (%)	62 (%)
1	1,1	0 °C	3 jours	35	10	0	55
2	1,1	t.a.	1 nuit	25	10	0	65
3	1,1	80 °C	1 h	35	15	0	50
4	1,5	t.a.	1 nuit	0	10	10	80 (59 %*)
6	2	t.a.	1 nuit	0	15	50	35
7	3	t.a.	1 nuit	0	5	95	0

Tableau 4 : Optimisation de la réaction avec le NBS.

Conversion évaluée d'après le spectre RMN ^1H du brut (*rendement du produit isolé).

En revanche, augmenter le nombre d'équivalents de NBS à 1,5 permet d'atteindre 100 % de conversion en une nuit (tableau 4, entrée 4). Le produit **62**, présent à hauteur de 80 % environ dans le brut réactionnel, est isolé avec 59 % de rendement. Un autre produit est détecté en RMN (impureté **i2**, tableau 4), dont la formation augmente avec le nombre d'équivalents de NBS (tableau 4, entrées 6 et 7). Ces conditions semblent optimales car elles constituent un bon compromis entre taux de conversion et quantité de sous-produits formés.

Par rapport à la synthèse précédemment réalisée au laboratoire, nous avons réussi à préparer le composé **62** avec un bien meilleur rendement. De 4 % pour les deux étapes à partir de **59** (schéma 24), le rendement passe ainsi à 47 % (schéma 25).

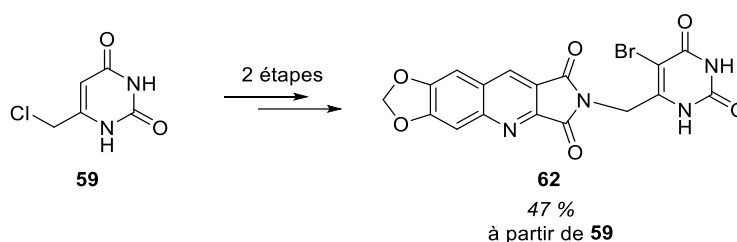
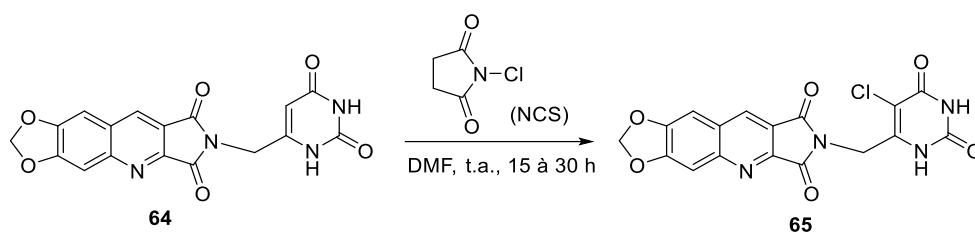


Schéma 25 : Synthèse du dérivé **62**.

III.B.2.b. Composé chloré (**65**)

La réaction de bromation ayant été optimisée, nous avons voulu préparer le dérivé chloré par action du *N*-chlorosuccinimide (NCS) dans des conditions similaires. Sur une petite quantité (50 mg, 0,14 mmol), le brut réactionnel ne contient que le produit attendu et 5 % de produit de départ **64** (tableau 5, entrée 1). De manière surprenante, augmenter la quantité de NBS à 1,6 équivalent diminue la quantité de **65** formée (tableau 5, entrée 2) tandis qu'avec 1,8 équivalent, **64** n'est plus observé mais un sous-produit **i3** similaire à **i2** est obtenu à hauteur de 10 % (tableau 5, entrée 3). La proportion de ce sous-produit augmente avec la quantité de NCS introduite (tableau 5, entrée 4). La quantité optimale de NCS semble être 1,7 équivalent : la réaction est totale et on observe à peine 5 % du sous-produit **i3** (tableau 5, entrée 5).

La réaction avec le NCS est peu reproductible et dépend de l'échelle à laquelle elle est réalisée puisque sur 1 mmol, la proportion de **i3** augmente significativement (tableau 5, entrée 6). Afin d'essayer de limiter cet effet d'échelle et d'obtenir une quantité suffisante du composé **65** pour l'évaluation biologique, nous avons réalisé à nouveau la manipulation sur 0,5 mmol cette fois et avec seulement 1,4 équivalent de NCS (tableau 5, entrée 7). La réaction est totale, mais une quantité non négligeable de **i3** se forme néanmoins. Le produit **65** n'est ainsi isolé qu'avec 44 % de rendement. Nous n'avons pas cherché à optimiser davantage la réaction.



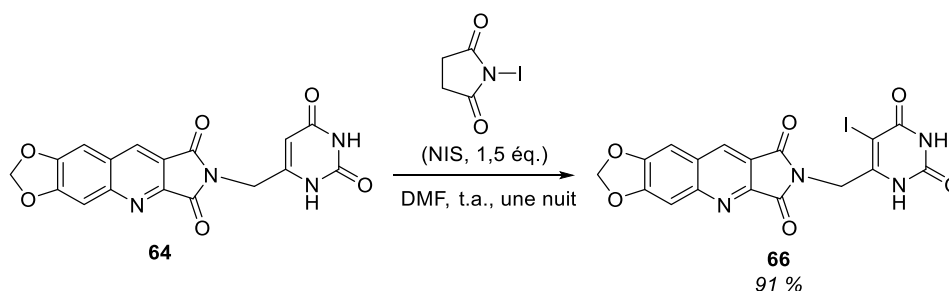
Entrée	NCS (éq.)	64 (mmol)	i1 (%)	64 (%)	65 (%)	i3 (%)	Rdt (%)
1	1,5	0,14	0	5	95	0	-
2	1,6	0,14	0	15	85	0	-
3	1,8	0,14	10	0	80	10	-
4	2	0,14	10	0	75	15	-
5	1,7	0,14	5	0	90	5	-
6	1,7	1	10	5	50	35	24
7	1,4	0,5	0	0	75	25	44

Tableau 5 : Optimisation de la réaction avec le NCS.

Conversion évaluée d'après le spectre RMN ^1H du brut (*milieu plus concentré).

III.B.2.c. Composé iodé (66)

L'accès au dérivé iodé **66** a été moins complexe. Effectivement, la réaction avec le *N*-iodosuccinimide (NIS) dans les conditions retenues pour la bromation conduit au produit attendu **66** avec un rendement de 91 % sur le produit brut mono-tache en CCM (gel de silice, dichlorométhane / méthanol 9:1). La réaction est plus reproductible qu'avec le NCS puisqu'elle a été effectuée deux fois sur 0,15 mmol de **64** et que le même résultat a été obtenu (schéma 26).

Schéma 26 : Préparation du dérivé iodé **66**.

III.C. Introduction d'un méthyle en position 5 de la pyrimidinedione

En substituant la position 5 de la pyrimidinedione des molécules de la série C par un méthyle, moins encombrant qu'un brome, la structure obtenue devrait posséder un degré de liberté plus important que celle de **62**. En outre, les effets électroniques apportés par ces deux substituants sont très différents. Il serait donc intéressant d'observer l'effet de cette modification sur l'activité biologique.

La synthèse du dérivé méthylé nous a également semblé pertinente d'un point de vue chimique afin d'étudier l'influence de l'encombrement stérique du substituant en position 5 de la pyrimidinedione sur la réaction de couplage avec la quinoléine-imide (paragraphe III.A).

III.C.1. Essais à partir du 6-chlorométhyl-5-méthyluracile (67)

III.C.1.a. Préparation du dérivé 67

Le 6-chlorométhyl-5-méthyluracile **67** n'étant pas un dérivé commercial, nous avons dû le synthétiser. Pour cela, deux approches ont été tentées :

- Une première voie d'accès passe par l'intermédiaire 5,6-diméthyluracile **70** et est inspirée des travaux de Murray *et al.* (schéma 27).¹⁵³ Le groupement chlorométhyle en position 6 proviendrait de la substitution de l'alcool correspondant **68**, ce dernier étant obtenu par réduction de l'aldéhyde **69**. Cet aldéhyde serait issu de l'oxydation sélective de l'un des deux méthyles de la pyrimidine **70**, elle-même formée par condensation de l'urée sur le β -cétoester **71**.

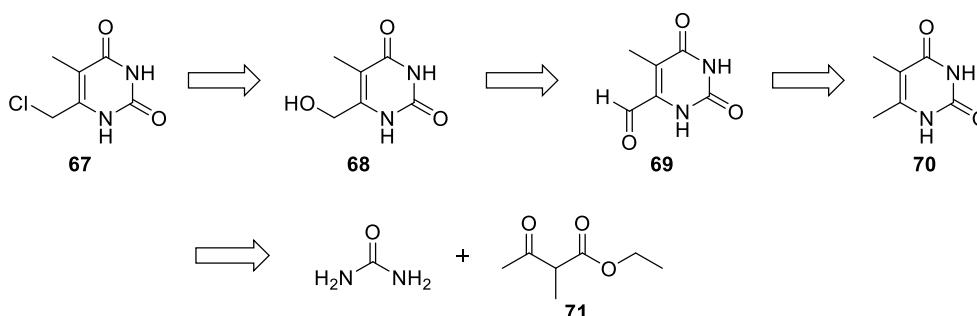


Schéma 27 : Rétrosynthèse envisagée pour la préparation de **67**.

- Une autre approche vise à cycliser le dérivé **72** provenant de l'hydroxylation sélective du β -cétoester **71** sur la position α (schéma 28). Cela permettrait d'accéder directement au composé **68** puis à **67** par chloruration, faisant ainsi l'économie d'une étape par rapport à la première approche.

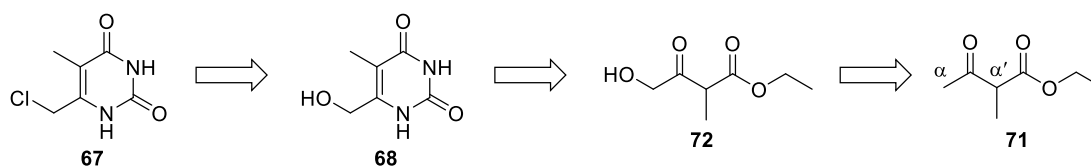


Schéma 28 : Chemin rétrosynthétique alternatif pour la préparation de **67**.

Synthèse de **67** via le 5,6-diméthyluracile **70**

La publication de Murray *et al.*¹⁵³ ne fournissant que très peu de détails concernant l'étape de cyclisation, nous nous sommes inspirés d'autres protocoles de la littérature permettant de préparer des dérivés pyrimidiques alkylés en position 5 et 6 tels que **70**. Il s'agit généralement de méthodes dérivées de la synthèse de Pinner des pyrimidines qui font réagir une urée et un

β -cétoester soit en conditions acides puis basiques^{221,222} soit, inversement, en conditions basiques puis acides.^{223,224}

Nous avons d'abord effectué la réaction en conditions acides puis basiques (schéma 29), mais lors de l'étape en milieu alcalin, aucun précipité n'est observé, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. L'analyse du spectre RMN ¹H du brut réactionnel montre que de nombreux produits sont formés, avec seulement des traces du produit attendu.

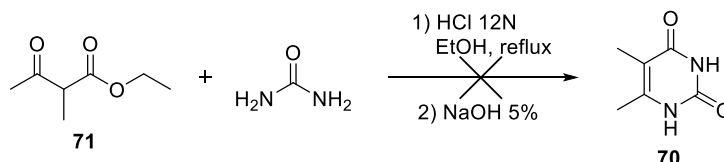


Schéma 29 : Tentative de synthèse de **70** en conditions acides puis basiques.

L'emploi du second protocole s'est révélé plus concluant. En effet, la réaction de l'urée avec **71** en présence d'éthanolate de sodium dans l'éthanol à reflux fournit un précipité qui, une fois isolé et mis en présence d'acide chlorhydrique (HCl) 6M, conduit à **70** avec 53 % de rendement (schéma 30). Le précipité intermédiaire n'a pas été identifié mais correspond certainement au produit de la condensation de l'urée sur la fonction carbonyle.

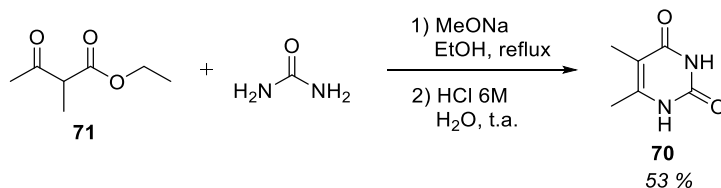


Schéma 30 : Préparation de **70**.

A partir de la pyrimidine **70**, l'accès à l'alcool **68** se fait assez aisément par oxydation sélective du méthyle en position 6 par le dioxyde de sélénium (SeO₂) puis réduction de l'aldéhyde **69** à l'aide du tétrahydruroborate de sodium (NaBH₄) (schéma 31).^{225,226} Le produit **68** est ainsi obtenu avec 81 % de rendement pour les deux étapes, **69** n'ayant pas été isolé.

²²¹ M. Scuotto, M. Persico, M. Bucci, V. Velleco, N. Borbone, E. Morelli, G. Oliviero, E. Novellino, G. Piccialli, G. Cirino, M. Varra, C. Fattorusso, L. Mayol, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5235-42.

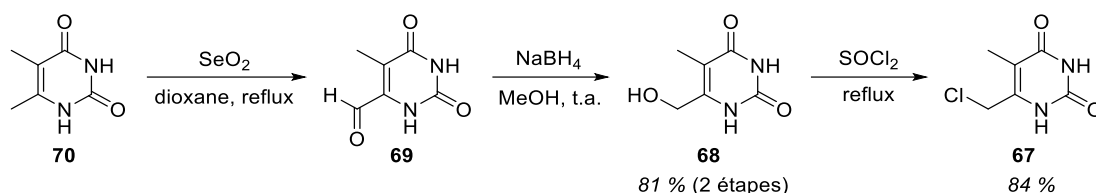
²²² T. G. Kraljevic, S. Kristafor, L. Suman, M. Kralj, S. M. Ametamey, M. Cetina, S. Raic-Malic, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2704-12.

²²³ H.-P. Sun, J.-M. Jia, F. Jiang, X.-L. Xu, F. Liu, X.-K. Guo, B. Cherfaoui, H.-Z. Huang, Y. Pan, Q.-D. You, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *79*, 399-412.

²²⁴ W. Zhu, C. Sun, S. Xu, C. Wu, J. Wu, M. Xu, H. Zhao, L. Chen, W. Zeng, P. Zheng, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6746-54.

²²⁵ D. R. Goldberg, T. Butz, M. G. Cardozo, J. Eckner, A. Hammach, J. Huang, S. Jakes, S. Kapadia, M. Kashem, S. Lukas, T. M. Morwick, M. Panzenbeck, U. Patel, S. Pav, G. W. Peet, J. D. Peterson, A. S. Prokopowicz, R. J. Snow, R. Sellati, H. Takahashi, J. Tan, M. A. Tschantz, X.-J. Wang, Y. Wang, J. Wolak, P. Xiong, N. Moss, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1337-49.

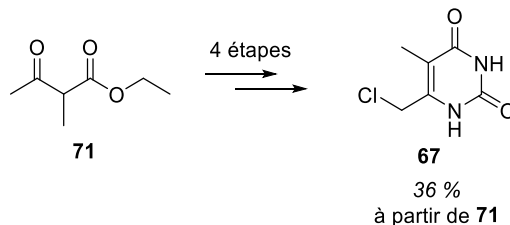
²²⁶ M. P. Groziak, D. W. Thomas, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2152-9.

Schéma 31 : Synthèse du chlorométhyluracile **67** à partir de **70**.

Pour substituer le groupement hydroxy d'une 6-hydroxyméthylpyrimidinedione par un chlore, plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature. Pour les dérivés non substitués sur les positions N^1 et N^3 , le chlorure de thionyle est le réactif le plus courant.²²⁷ La méthode utilisée dans la synthèse de Murray *et al.* diffère à ce niveau, les auteurs utilisant le trichlorure de phosphore (POCl_3) comme agent de chloruration.¹⁵³ L'inconvénient de cette méthode est que le POCl_3 introduit également des atomes de chlore sur la pyrimidinedione. La dichloropyrimidine obtenue doit ensuite être hydrolysée, par action d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique, par exemple.

Avec notre substrat, le chauffage au reflux du chlorure de thionyle a donné de bons résultats, la pyrimidinedione **67** étant alors synthétisée avec un rendement de 84 % (schéma 31).

Cette première voie d'accès à **67** s'est montrée très satisfaisante, puisque nous avons réussi à préparer ce dérivé en quatre étapes à partir du β -cétoester **71** et avec un rendement global de 36 % (schéma 32).

Schéma 32 : Synthèse de **67**.

Autre méthode d'accès à **67**

La deuxième voie de synthèse de **67** envisagée passe par l'intermédiaire hydroxylé **72**, dont la préparation a été tentée par l'intermédiaire de plusieurs techniques d'oxydation du β -cétoester **71**, sans succès toutefois.

Le passage par un éther d'énol silylé engagé ensuite dans la réaction d'oxydation de Rubottom est une méthode courante de synthèse des α -hydroxycétones.^{228,229} Dans notre cas, l'éther d'énol silylé ne se forme pas bien lorsque la base utilisée est la 2,4,6-triméthylpyridine ($\text{pK}_a = 7,3$). L'emploi d'une base plus forte n'est pas envisageable car le proton en α est plus acide que le proton en α' (schéma 33).²²⁰

²²⁷ R. S. Klein, J. J. Fox, *J. Org. Chem.* **1973**, 37, 4381-6.

²²⁸ P. S. Mainkar, K. Johny, T. P. Rao, S. Chandrasekhar, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 2519-25.

²²⁹ C. Wang, J. Liu, Y. Ji, J. Zhao, L. Li, H. Zhang, *Org. Lett.* **2006**, 8, 2479-81.

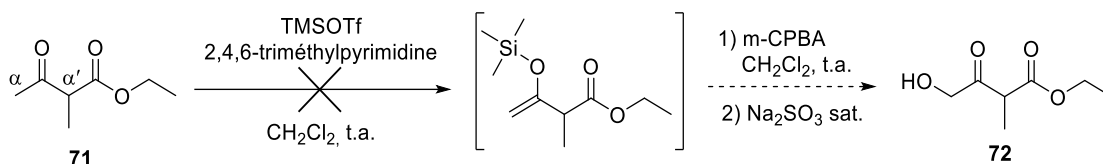


Schéma 33 : Première tentative de synthèse du dérivé hydroxylé **71**.

Une autre méthode d'oxydation envisageable est l'emploi de dérivés d'iode hypervalents. En conditions basiques, un réactif tel que le diacétoxyiodobenzène (DIB) permet de former un acétal intermédiaire qui est ensuite hydrolysé en milieu acide.²³⁰ Avec notre substrat **71**, ce protocole n'a conduit qu'à des produits de dégradation (schéma 34).

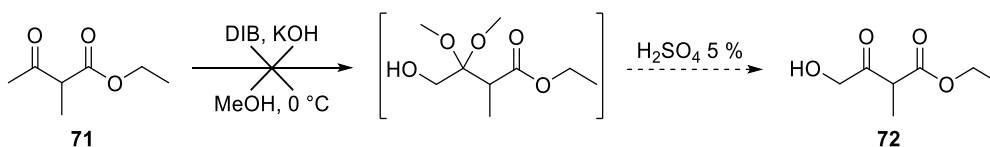


Schéma 34 : Seconde tentative de synthèse du dérivé hydroxylé **71**.

III.C.1.b. Couplage de **67** avec la quinoléine-imide **46**

Pour finaliser la synthèse du dérivé **74**, nous avons commencé par reprendre les conditions de couplage précédemment optimisées (paragraphe III.B.1), avec protection de **67** par des groupements triméthylsilyles puis attaque nucléophile par la quinoléine-imide **46** préalablement déprotonée par le K_2CO_3 (schéma 35). Inopportunistement, ces conditions n'ont abouti qu'à un mélange de **46** et de produits de dégradation de **67**.

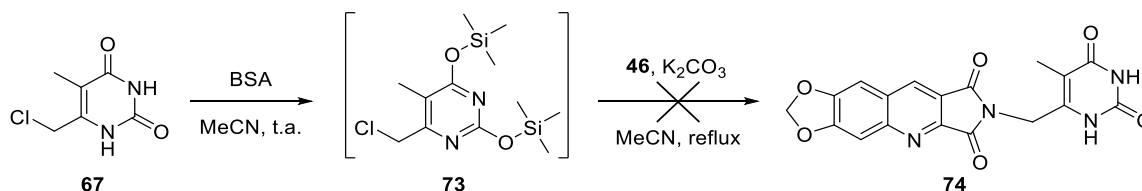


Schéma 35 : Essai de couplage entre **67** et **46** avec protection préalable de **67**.

Bien que l'absence de groupes protecteurs sur la pyrimidinedione comporte un risque d'alkylation des NH de **67** par réaction avec le chlorométhylène d'une autre molécule **67** (paragraphe III.A), un essai de couplage du composé **67** non protégé avec l'imide **46** a été effectué (schéma 36). Afin de solubiliser partiellement les matières premières, cette tentative a été menée dans le DMF à 80 °C. L'examen du spectre RMN ^1H du brut réactionnel montre que l'on forme majoritairement le produit attendu. Cependant, ce dernier étant accompagné de nombreuses impuretés, cette méthode ne constitue pas une voie d'accès satisfaisante au composé **74**.

²³⁰ V. M. T. Careiro, H. M. C. Ferraz, T. O. Vieira, E. E. Ishikawa, L. F. Silva, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2877-82.

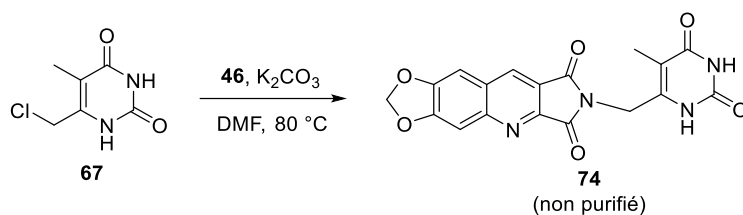


Schéma 36 : Couplage direct entre 46 et 67.

Le passage par un intermédiaire 6-chlorométhyl-5-méthyluracile n'ayant pas été concluant, nous avons dû trouver une autre stratégie de synthèse permettant d'accéder à 74.

III.C.2. Essais à partir du composé bromé 62

Dans la littérature, plusieurs méthodes existent pour introduire un groupement alkyle sur un substrat de type pyrimidinedione halogéné en position 5 : couplage croisé catalysé au palladium avec un organoaluminique²³¹ ou un organostannique²³² ou encore synthèse de l'organolithien correspondant puis réaction avec un halogénure d'alcane.²³³ Enfin, l'utilisation d'un couplage palladocatalysé de type Suzuki-Miyaura à partir d'un analogue bromé a été largement décrite dans la littérature, y compris par des équipes synthétisant des inhibiteurs de la TPase, comme Pomeisl *et al.*²³⁴ Ce couplage présente l'avantage de pouvoir être réalisé dans des solvants dans lesquels nos composés sont au moins en partie solubles, tels que le DMF ou le DMSO.

Nous avons donc tenté la réaction avec l'acide méthylboronique et le tetrakis-(triphenylphosphine)palladium(0), dont nous disposions au laboratoire (schéma 37). En partant du dérivé bromé 62, nous obtenons un mélange de produits dans lequel le produit attendu 74 ne semble pas présent. Dans un essai similaire avec le composé iodé 66, nous ne récupérons que la matière première inchangée.

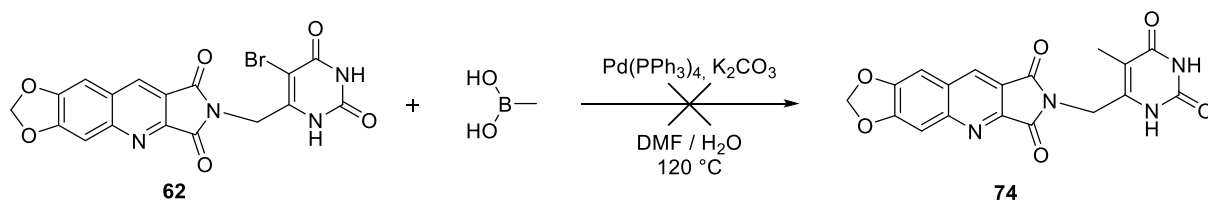


Schéma 37 : Tentative de couplage palladocatalysé entre 62 et l'acide méthylboronique.

Enfin, nous avons également essayé une approche en deux étapes, avec dans un premier temps la préparation de l'ester boronique 75 par un couplage croisé de type Suzuki-Miyaura, cette fois entre 62 et l'ester bis(pinacolato)boronique,²³⁵ puis dans un second temps, un nouveau couplage avec l'iodure de méthyle. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir 75, la réaction ayant conduit à une dégradation de la matière première (schéma 38).

²³¹ K. Hirota, Y. Kitade, Y. Kanbe, Y. Isobe, Y. Maki, *Synthesis* **1993**, 2, 213-5.

²³² J. Toyohara, M. Okada, C. Toramatsu, K. Suzuki, T. Irie, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 67-74.

²³³ M. M. Alauddin, P. S. Conti, *Tetrahedron* **1994**, 50, 1699-706.

²³⁴ K. Pomeisl, A. Holy, R. Pohl, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3065-7.

²³⁵ T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7508-10.

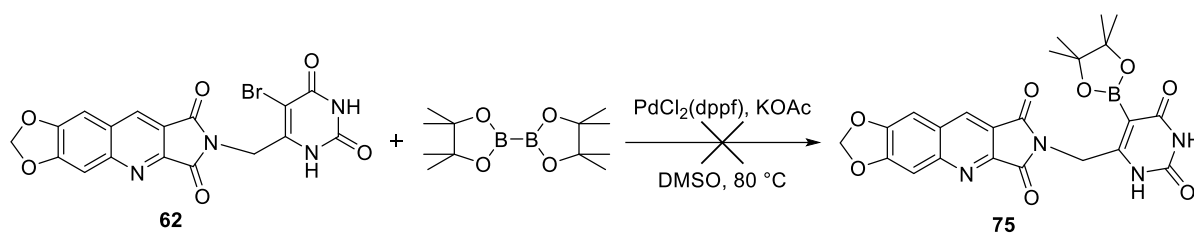


Schéma 38 : Tentative de préparation de l'ester boronique 75.

III.D. Couplage de la quinoléine-imide sur la position 5 de la pyrimidinedione

En procédant par analogie avec le couplage sur la position 6 de la pyrimidinedione (tableau 3), les dérivés de type **76** seraient obtenus par *N*-alkylation de la quinoléine-imide **46** avec un 5-chlorouracile tel que **77** (schéma 39).

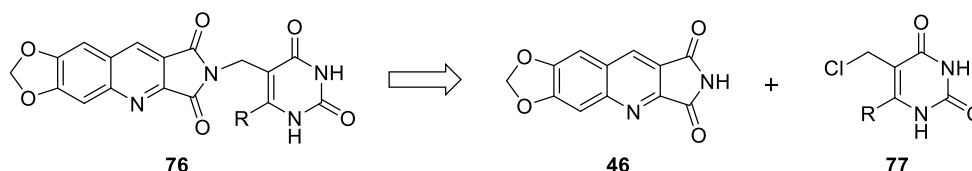


Schéma 39 : Rétrosynthèse envisagée pour accéder à 76.

Tout d'abord, nous avons travaillé avec le 5-chlorométhyluracile **79**, non substitué sur la position 6. Il s'agit d'un produit commercial, mais qui peut être également synthétisé de manière efficace par hydroxyméthylation de l'uracile puis substitution du groupement hydroxyle par un chlore. Il est également possible de réaliser la chlorométhylation de l'uracile afin d'obtenir **79** en une seule étape, mais cette méthode requiert l'emploi d'HCl gazeux.^{236,237} Nous avons préféré procéder en deux étapes, avec isolation du composé 5-hydroxyméthyle **78** issu de la réaction entre l'uracile et le formaldéhyde en conditions basiques (schéma 40).²³⁸ S'ensuit une étape de chloruration par action d'une solution concentrée d'HCl.²³⁹ Le produit **79** a ainsi été préparé avec un rendement de 77 % pour les deux étapes.

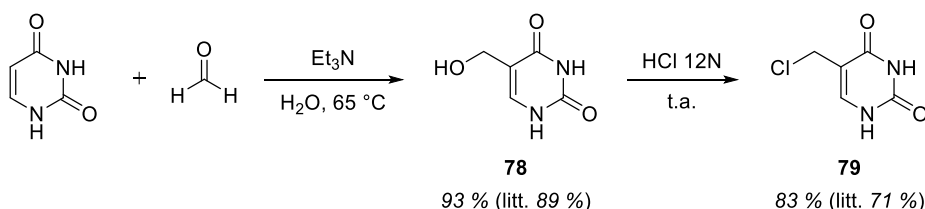


Schéma 40 : Préparation du 5-chlorométhyluracile 79.

²³⁶ W. A. Skinner, M. G. M. Schelstraete, B. R. Baker, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 149-51.

²³⁷ J. H. Burckhalter, R. J. Seiwald, H. C. Scarborough, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 991-4.

²³⁸ R. H. E. Hudson, F. Wojciechowski, *Can. J. Chem.* **2005**, *83*, 1731-40.

²³⁹ J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751-4.

III.D.1. Premières tentatives de couplage

La réaction de couplage entre **46** et **79** a d'abord été effectuée dans les conditions utilisées précédemment (tableau 3, schéma 35 et schéma 41). Avec cette méthode, seules les matières premières sont détectées dans le brut réactionnel (intacte pour l'imide **46**, partiellement dégradée pour l'uracile **79**). L'intermédiaire **80** ne semble pas bien se former, ce qui limite fortement la réaction car l'uracile non protégé **79** est insoluble dans l'acétonitrile. Effectuer la réaction dans le DMF à 80 °C permet de former le produit attendu mais, même au bout d'une semaine, la réaction n'est pas terminée.

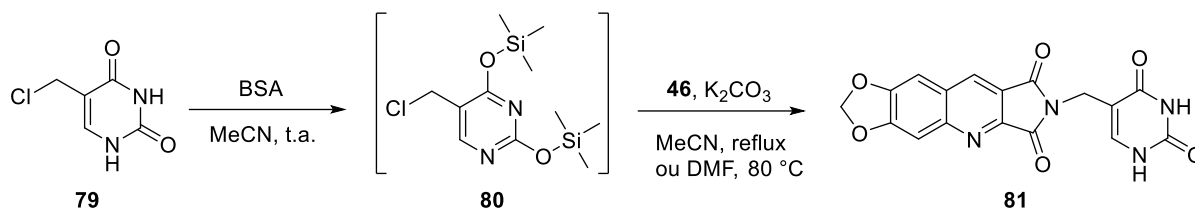


Schéma 41 : Essais de couplage entre **46** et **79**, avec protection préalable de **79**.

Nous avons alors tenté la réaction sans protection de la pyrimidinedione, comme dans le cas du dérivé méthylé **74** (schéma 42). Pour des raisons de solubilité des matières premières, nous avons conservé le DMF comme solvant. Au bout de 6 jours, la réaction est presque totale (90 % de conversion d'après le spectre RMN ^1H), mais le produit est obtenu en présence de traces de matières premières et/ou de produits de dégradation de ces dernières. Diminuer la quantité d'uracile de 1,5 à 1,1 équivalent diminue très légèrement la quantité d'impuretés formées.

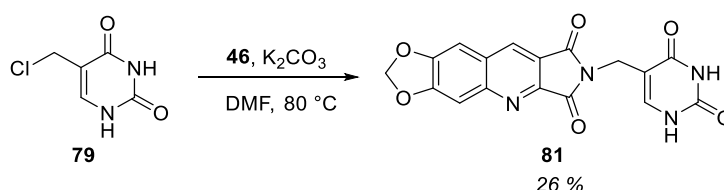


Schéma 42 : Couplage direct de **46** avec **79**.

Après purification par recristallisation, cette méthode a fourni le dérivé **81** avec 26 % de rendement, mais sous une forme non analytiquement pure.

III.D.2. Tentative avec un autre groupe protecteur

Etant donné les résultats peu satisfaisants obtenus par protection avec les groupements triméthylsilyls ou en l'absence de protection de la pyrimidinedione, nous avons réfléchi à une autre stratégie de protection de la pyrimidinedione. Une protection par des groupements benzyles nous a semblé adéquate, car celle-ci résiste aux conditions basiques du couplage et car la déprotection en conditions acides est compatible avec la présence du motif méthylènedioxy sur la quinoléine-imide.

La benzylation de dérivés de l'uracile s'effectue avec de très bons rendements avec un halogénure de paraméthoxybenzyle (PMB) dans le DMF en conditions basiques.^{240,241} Nous avons tenté la réaction directement sur le composé **79** sans succès, un mélange de nombreux produits de benzylation étant obtenus (schéma 43).

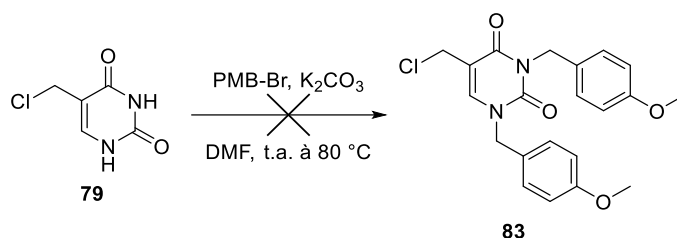


Schéma 43 : Tentative de protection de **79**.

Nous avons donc dû effectuer la réaction de protection sur l'uracile nu. Le schéma rétrosynthétique envisagé est présenté ci-dessous (schéma 44). Le couplage s'effectue cette fois entre **46** et le dérivé protégé **83**. Ce dernier provient de la fonctionnalisation de l'uracile préalablement protégé par des groupements *p*-méthoxybenzyle (**84**).

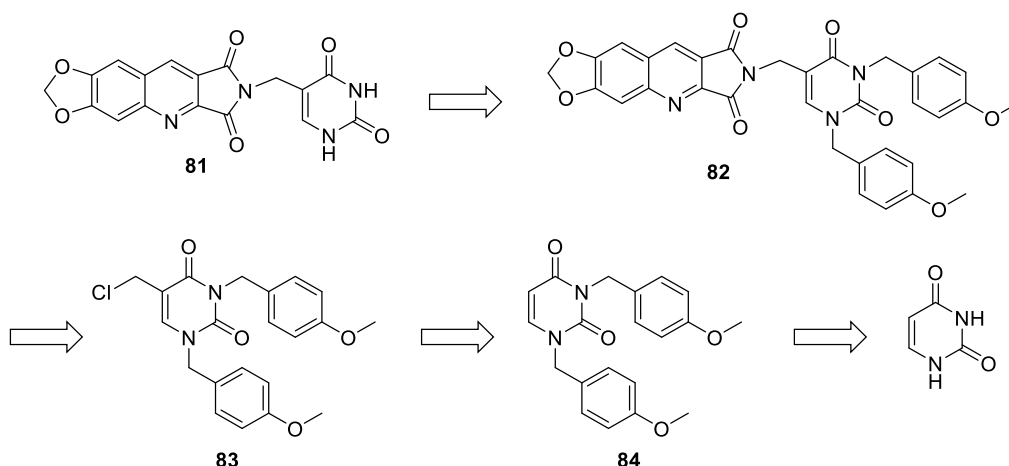


Schéma 44 : Rétrosynthèse envisagée pour la préparation de **81**.

Dans les conditions classiques de la littérature, il est aisé de réaliser la réaction de protection avec le PMB-Br ou le PMB-Cl, ce dernier permettant d'obtenir **84** avec 87 % de rendement (schéma 45). L'introduction du chlorométhylène s'est en revanche révélée plus délicate, les conditions utilisées précédemment (schéma 40) ne fonctionnant pas avec le substrat dibenzylé **84** (schéma 45). En effet, la pyrimidine protégée au niveau des deux atomes d'azote n'est plus déprotonable et par conséquent, elle n'est plus assez nucléophile pour que la réaction d'addition sur le formaldéhyde se produise.

Comme nous l'avons évoqué au début du paragraphe III.D, la réaction directe de chlorométhylation d'un uracile est possible, mais nécessite l'utilisation d'HCl gazeux. Nous avons testé la réaction avec une solution aqueuse d'HCl. Le choix du solvant s'est porté sur le

²⁴⁰ D. Jakubiec, K. Z. Walczak, *Monatsh. Chem.* **2011**, *142*, 1155-61.

²⁴¹ J. Maes, T. R. M. Rauws, B. U. W. Maes, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9137-41.

dioxane pour des raisons de solubilité des réactifs et à cause du point d'ébullition élevé de ce solvant. Après optimisation des conditions opératoires, le produit **83** est obtenu sous la forme d'un résidu pâteux qui n'a pas été purifié pour des raisons de stabilité (schéma 45).

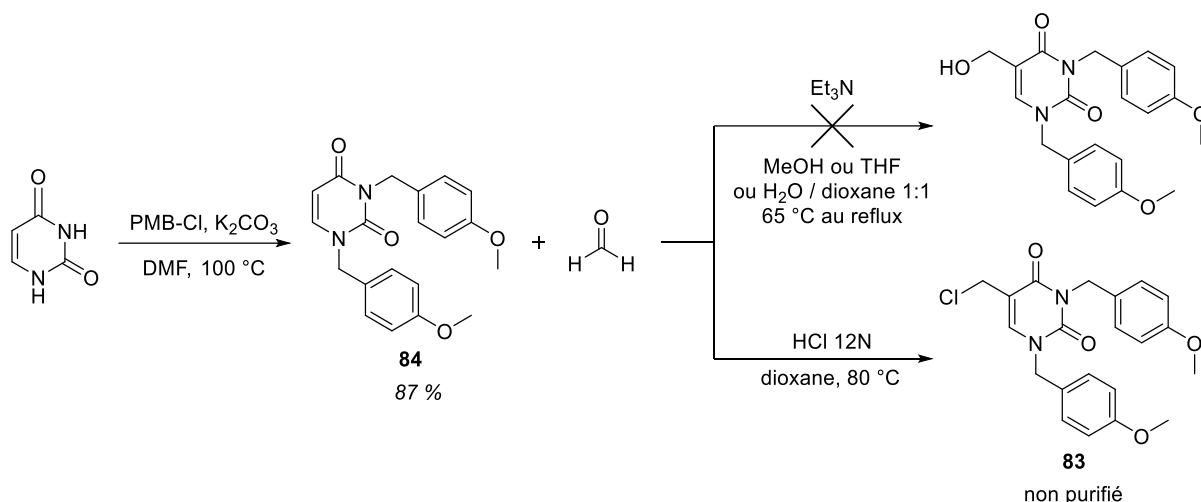


Schéma 45 : Préparation de l'intermédiaire **83**.

Le brut réactionnel a ainsi été directement engagé dans la réaction de couplage avec **46**. Nous n'avons pas eu besoin de chauffer, la réaction étant totale au bout d'une nuit à température ambiante (schéma 46). Le brut réactionnel est purifié par simple lavage au méthanol, pour donner le produit **82** avec 88 % de rendement.

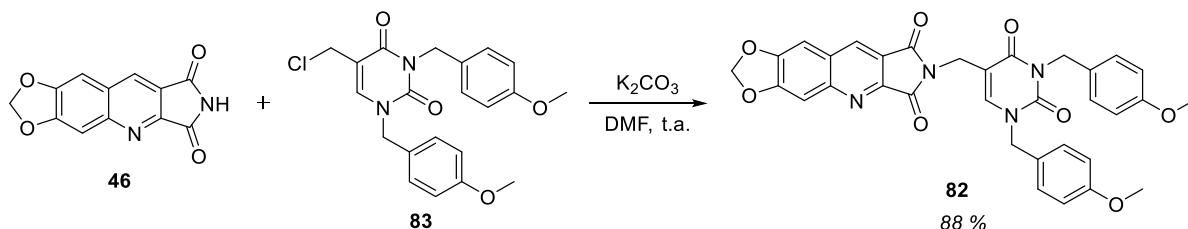


Schéma 46 : Couplage entre **46** et **83**.

Pour obtenir le produit final **81**, il reste à déprotéger le dérivé **82**. La déprotection en conditions acides n'a pas fonctionné (TFA, 50 °C),²⁴² par conséquent nous avons essayé la réaction de déprotection au nitrate de cérium et d'ammonium (CAN) en se basant sur un protocole décrit dans la littérature (schéma 47).²⁴³ Le produit attendu est bien présent dans le brut réactionnel mais ce dernier n'est pas plus propre que celui de la réaction de couplage en version non protégée (schéma 42). La purification de la réaction n'a donc pas été réalisée.

²⁴² J. S. Larsen, E. B. Pedersen, C. Nielsen, *Synthesis* **2004**, 11, 1874-8.

²⁴³ I. Nowak, J. F. Cannon, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 532-7.

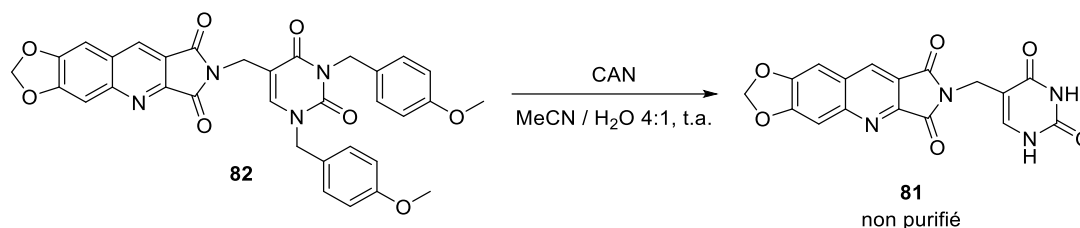


Schéma 47 : Réaction de déprotection de **82**.

III.E. Synthèse du composé **85**

Afin d'observer l'influence du substituant porté par l'imide sur l'activité des composés de la série C, nous avons voulu synthétiser le composé **85** où cette dernière est remplacée par un noyau phényle.

L'accès à cette structure est bien plus aisé car le dérivé benzylique utilisé est bien plus soluble que son équivalent de type pyrimidinedione et ne nécessite pas d'être protégé avant d'être engagé dans la réaction de couplage.

Nous avons donc fait réagir la quinoléine-imide **46** avec le bromure de benzyle dans des conditions similaires à celles utilisées pour le noyau pyrimidinedione. Après plusieurs lavages du brut réactionnel avec de l'éther diéthylique, le produit **85** est obtenu avec 65 % de rendement (schéma 48).

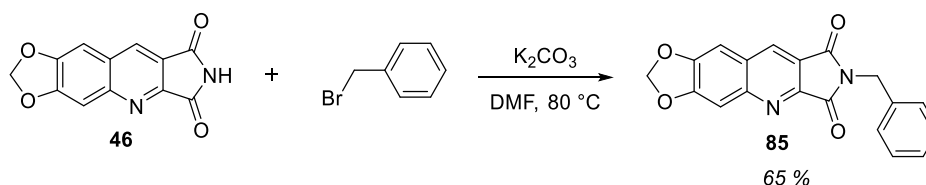


Schéma 48 : Synthèse du composé **85**.

IV. Synthèse des pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8-tétraones (série D)

IV.A. Contexte

Les dérivés que nous voulons synthétiser correspondent au squelette **86** substitué uniquement sur la position N^7 (figure 62). Avec ce type de structure, l'interaction avec le site thymidine devrait être réalisée par le noyau pyrimidinedione, tandis que le substituant en N^7 irait interagir avec la partie gauche de la « nouvelle » poche.

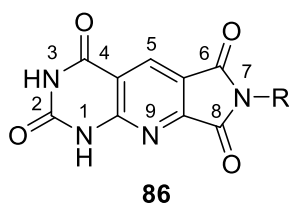


Figure 62 : Structure générale des composés de la série D.

Dans la littérature, l'accès à ce type d'hétérocycles tricycliques n'a été décrit que dans une seule publication, pour des composés substitués sur les trois positions N^1 , N^3 et N^7 .²⁴⁴ Devi *et al.* proposent une méthode de synthèse du composé 7-phényl-1,3-diméthyle **89** en deux étapes à partir du 6-amino-1,3-diméthyluracile **87** (schéma 49). Ce dernier est d'abord formylé par une réaction de Vilsmeier, puis le produit obtenu **88** est mis à réagir avec le *N*-phénylmaléimide pour former l'hétérocycle **89**. La seconde étape peut se faire soit par chauffage aux micro-ondes, soit dans le chloroforme par chauffage thermique classique.

Cette voie de synthèse fonctionne très bien pour le composé **89**, mais semble limitée aux composés substitués sur les atomes d'azote de la pyrimidinedione. En effet, la synthèse de molécules uniquement substituées sur N^7 , telles que le squelette **86**, requiert l'utilisation de matières premières peu solubles dans la plupart des solvants organiques.

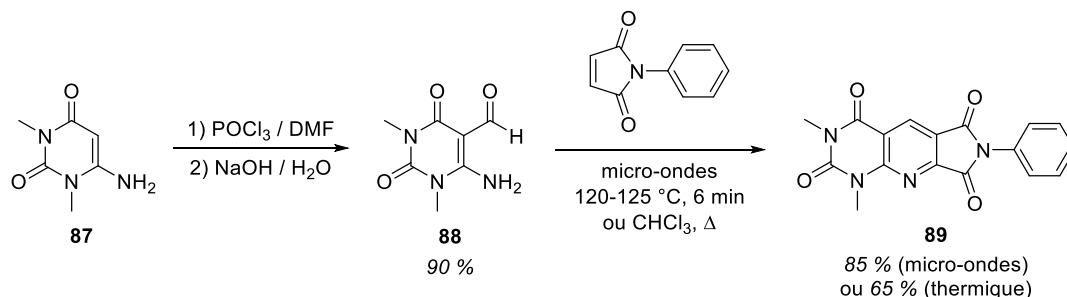


Schéma 49 : Voie d'accès à l'hétérocycle **89** décrite par Devi *et al.*²⁴⁴

Nous avons donc élaboré une nouvelle méthode de synthèse qui permet l'obtention des dérivés sélectivement substitués en position 7.¹⁹⁹ Dans un premier temps, celle-ci a été mise au point

²⁴⁴ I. Devi, N. H. Borah, P. J. Bhuyan, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2405-8.

avec un composé modèle portant un benzyle sur la position 7, puis généralisée à l'introduction d'autres substituants sur cette position et à l'obtention des molécules polysubstituées sur les positions 1, 3 et 7.

IV.B. Synthèse du composé benzylé en N^7 (90)

L'accès à l'hétérocycle benzylé sur l'atome d'azote N^7 (90) a été effectué selon deux approches. La première voie de synthèse (en rouge, schéma 50) consiste à substituer l'hétérocycle intermédiaire 91 alors que la seconde (en bleu) est basée sur la construction du cycle pyrimidine à partir du benzylmaléimide.

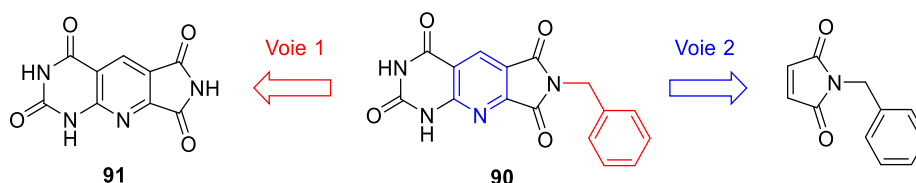


Schéma 50 : Voies de rétrosynthèse conduisant à 90.

IV.B.1. Synthèse de 90 via l'intermédiaire 91

IV.B.1.a. Synthèse de 91

Tentatives de synthèse de 91 par réaction multicomposants

Dans un premier temps, nous avons essayé d'obtenir le dérivé 91 par une approche similaire à celle que nous avons développée précédemment au laboratoire pour la série A, à savoir une réaction multicomposants mettant en jeu une aniline, un aldéhyde et un composé 1,3-dicarbonylé (paragraphe I.B).

Par analogie, nous avons donc envisagé les deux voies rétrosynthétiques A et B faisant appel à ce type de réaction (schéma 51). Dans la voie A, le composé 1,3-dicarbonylé est le même que pour les composés de la série A (l'acide barbiturique) et l'aniline est remplacée par l'aminomaléimide 92, un analogue de substrat 1,3-dicarbonylé. Pour la voie B, nous avons inversé les rôles, le groupement amino étant porté par le 6-aminouracile et le bromomaléimide 52 servant, comme dans le cas des séries B et C (schéma 22 et schéma 24), d'analogue de composé 1,3-dicarbonylé. L'aldéhyde utilisé est à chaque fois le formaldéhyde.

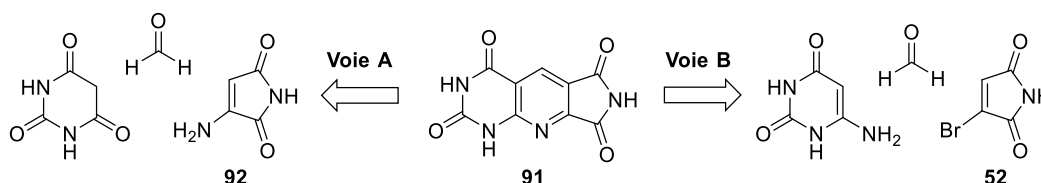


Schéma 51 : Voies de rétrosynthèse envisagées pour accéder à l'intermédiaire 91.

A l'exception de l'aminomaléimide **92**, les matières premières listées ci-dessus sont toutes commerciales. Elles sont relativement peu coûteuses (< 5 €/g), hormis le bromomaléimide **52** (200 €/g, Apollo Scientific). Toutefois, l'accès à **52** se fait relativement facilement à partir du maléimide selon une méthode adaptée du protocole décrit par Tedaldi *et al.*²⁴⁵ Le maléimide est ainsi dibromé par action du brome, puis l'élimination d'acide bromhydrique donne le dérivé **52** avec 86 % de rendement (schéma 52). Ensuite, la substitution du brome par un azoture puis une étape d'hydrogénation catalytique au palladium sur charbon permet d'accéder à **92**, avec un rendement de 61 % pour les deux étapes (schéma 52).

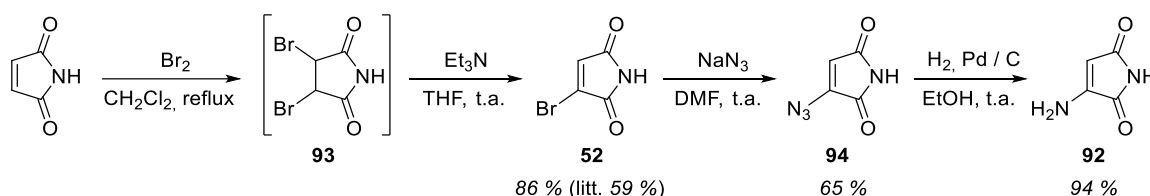


Schéma 52 : Préparation de l'aminomaléimide **92**.

Une fois l'aminomaléimide obtenu, nous l'avons engagé dans la réaction multicomposants avec le formaldéhyde et l'acide barbiturique. Nous avons tenté la réaction dans divers solvants chauffés au reflux (AcOH, DMF et DMSO), et remplacé l'acide barbiturique par un substrat équivalent tel que le 6-chlorouracile, mais malgré nos efforts, l'accès à **91** s'est révélé impossible par cette méthode puisque nous obtenons à chaque fois un mélange inséparable de composés (schéma 53).

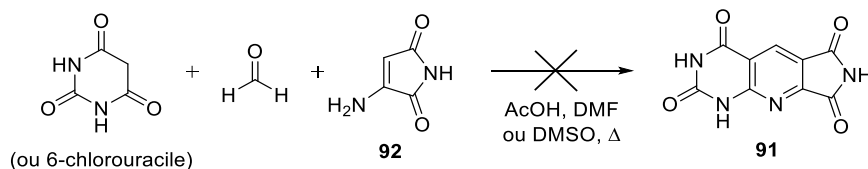


Schéma 53 : Tentatives d'accès à **91** par réaction multicomposants (Voie A).

Nous nous sommes alors tournés vers la voie B. La réaction en un pot du 6-aminouracile, de **52** et du formaldéhyde au reflux de l'acide acétique n'a pas donné le produit attendu mais plusieurs sous-produits dont le dérivé **95** (schéma 54). Celui-ci provient de la condensation du 6-aminouracile sur le formaldéhyde par une réactivité de type énamine. En effet, le 6-aminouracile peut aussi bien réagir comme une amine *via* son groupement amino en position 6 que comme une énamine, *via* sa position C⁵.²⁴⁶ Dans notre cas, nous espérions que la réactivité de l'atome d'azote l'emporterait et que celui-ci viendrait substituer l'atome de brome de **52**, ce qui n'a pas été le cas.

²⁴⁵ L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Chem. Comm.* **2009**, 48, 6583-5.

²⁴⁶ B. Zaleska, S. Lis, *Synthesis* **2001**, 6, 811-27.

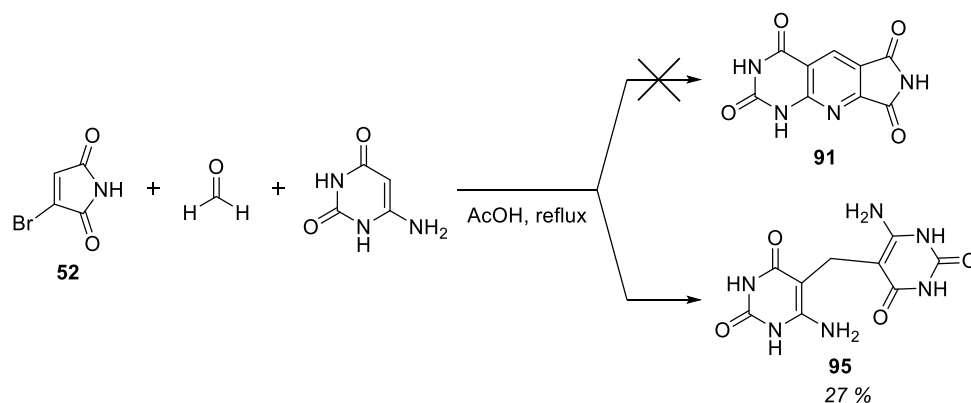


Schéma 54 : Tentative d'accès à **91** par réaction multicomposants (Voie B).

Afin de favoriser cette réaction de substitution, nous avons envisagé un protocole en deux étapes, en commençant par faire réagir uniquement le 6-aminouracile avec **52** (schéma 55). Cette tentative n'a pas été concluante et a conduit à un mélange de produits dont seul le sous-produit **96** a pu être isolé, avec 15 % de rendement.

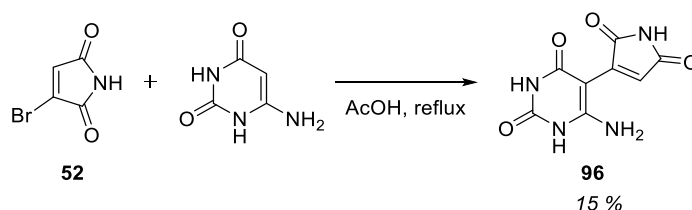


Schéma 55 : Réaction de couplage entre **52** et le 6-aminouracile.

Devant ces résultats décevants, nous avons dû chercher une méthode de synthèse alternative de l'intermédiaire **91**.

Approche utilisant un nouveau synthon

Afin de faciliter la réaction de cyclisation conduisant à **91**, nous avons choisi de greffer le groupement aldéhyde sur le fragment maléimide, sous la forme d'un synthon de type **98**. Ainsi, une fois la fonction énamine du 6-aminouracile condensée sur cet aldéhyde, formant l'intermédiaire **97**, la cyclisation intramoléculaire de l'amine du fragment uracile sur l'accepteur de Michael du fragment maléimide devrait être grandement facilitée (schéma 56).

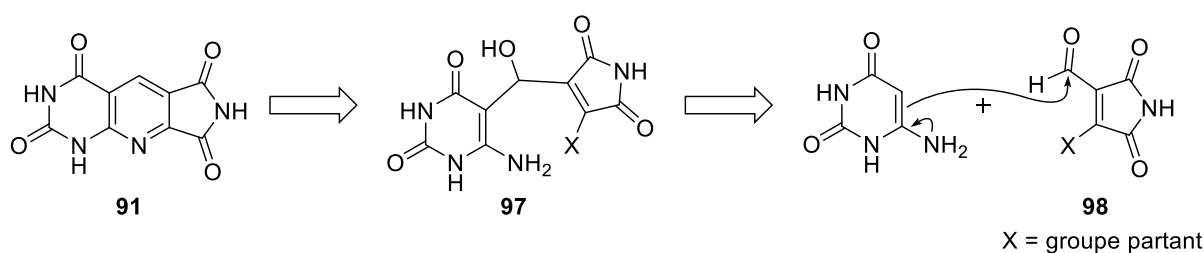


Schéma 56 : Rétrosynthèse utilisant le synthon **98**.

La réaction de Vilsmeier directement sur le composé **52** ne nous a pas permis d'introduire la fonction aldéhyde. Par conséquent, nous avons dû augmenter la réactivité de ce dernier

vis-à-vis de la réaction de substitution électrophile. Pour cela, le brome a été remplacé par une morpholine, formant ainsi le composé **99** avec un rendement quantitatif (schéma 57). Ce nouveau substrat réagit très bien avec le réactif de Vilsmeier et donne, après traitement basique du milieu réactionnel, l'énolate **100** avec 85 % de rendement. Au cours du traitement, la fonction vinylamide formée par la morpholine de l'iminium intermédiaire a également été hydrolysée (schéma 57).

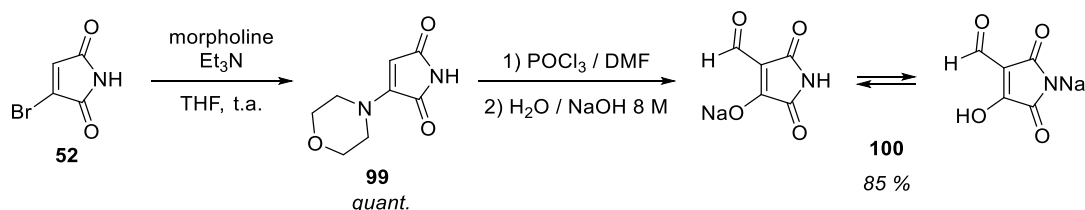


Schéma 57 : Préparation du synthon **100**.

La structure du sel **100** a été difficile à confirmer, ce type d'hétérocycle pouvant coexister sous plusieurs formes isomères et l'analyse du spectre RMN ^{13}C se révélant souvent difficile (schéma 57 et figure 63).²⁴⁶

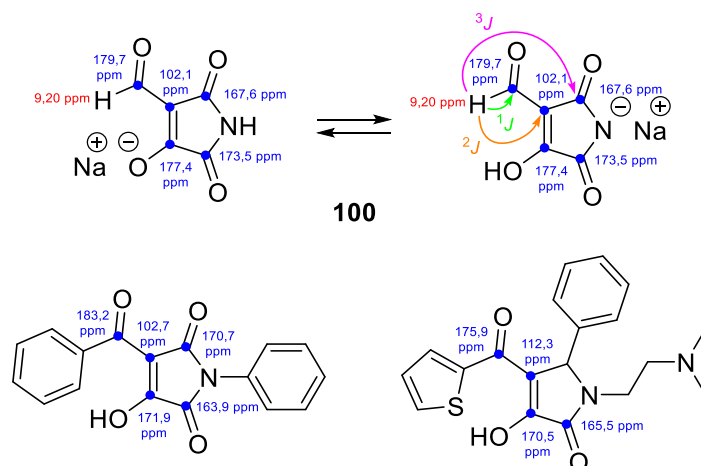


Figure 63 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **100** et de deux composés de la littérature.

Effectivement, les signaux en RMN ^{13}C correspondant aux carbonyles quaternaires de **100** sont très faibles. Toutefois, la réalisation des spectres RMN 2D HSQC et HMBC a permis d'attribuer un certain nombre de signaux, notamment grâce aux couplages observés entre le proton de l'aldéhyde ($\delta = 9,20$ ppm sur la figure 63) et les trois carbones aux déplacements $\delta = 179,7$ ppm (couplage ^1J , en vert), $\delta = 102,1$ ppm (couplage ^2J , en orange) et $\delta = 167,6$ ppm (couplage ^3J , en rose). Les autres signaux ont été attribués par analogie avec les spectres de structures similaires décrites dans la littérature (figure 63).^{247,248} La structure de **100** a été confirmée après réalisation de l'analyse élémentaire et du spectre de masse.

²⁴⁷ K. Ostrowska, M. Ciechanowicz-Rutkowska, T. Pilati, G. Zuchowski, *Monatsh. Chem.* **1999**, *130*, 555-62.

²⁴⁸ S. V. Ryabukhin, D. M. Panov, A. S. Plaskon, O. O. Grygorenko, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 631-5.

Ce nouveau synthon a été mis à réagir avec le 6-aminouracile dans le TFA à température ambiante. De manière satisfaisante, l'hétérocycle désiré **91** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif (schéma 58).

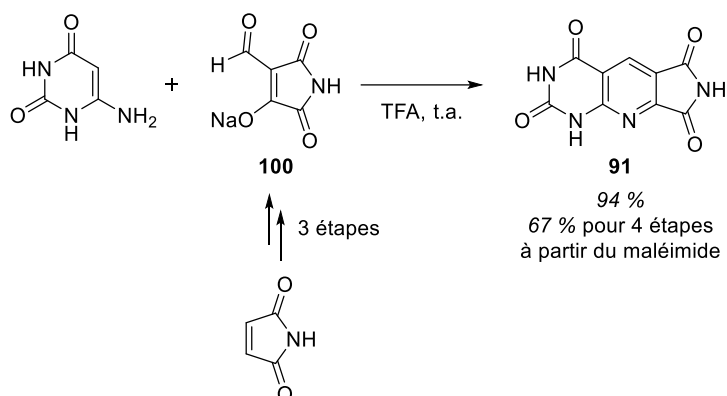


Schéma 58 : Voie d'accès à l'intermédiaire **91.**

Pour cette réaction, nous avons proposé un mécanisme dans lequel on observe d'abord l'addition de l'énamine sur l'aldéhyde, puis l'attaque du groupement amino sur l'énolate et enfin l'aromatisation du cycle formé pour conduire à **91** (schéma 59).

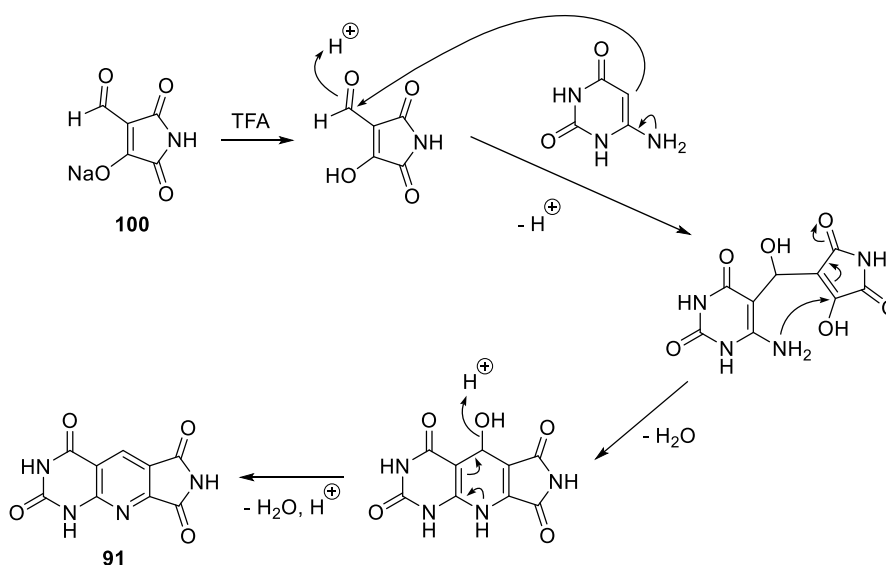
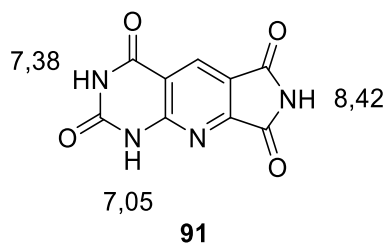


Schéma 59 : Proposition de mécanisme pour l'obtention de **91.**

Cette nouvelle méthode de synthèse permet donc de préparer l'intermédiaire **91** en quatre étapes à partir du maléimide, avec un rendement global de 67 % (schéma 58).

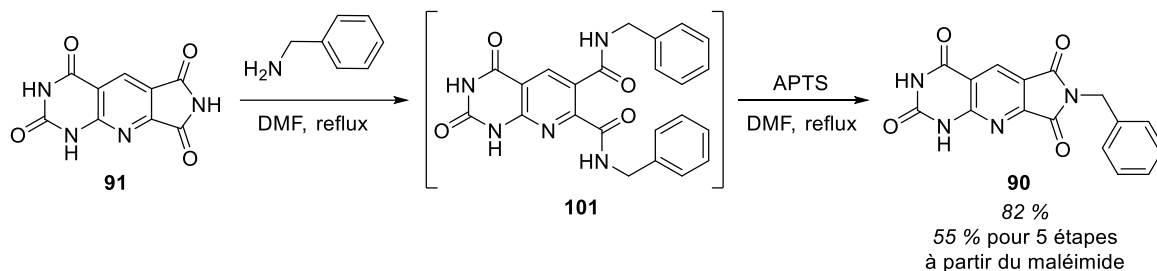
IV.B.1.b. Accès au produit **90** par substitution de la position 7

Comme nous souhaitons conserver un noyau pyrimidinedione non substitué sur les inhibiteurs de la série D, il est nécessaire d'utiliser une méthode de substitution de l'hétérocycle **91** qui soit sélective sur la position *N*⁷. L'estimation des pK_as des trois NH de **91** montre que ceux-ci sont très proches (figure 64), ce qui exclue de réaliser la fonctionnalisation de cet hétérocycle en milieu basique.²²⁰

Figure 64 : Estimations des pKas de l'intermédiaire **91**.²²⁰

Nous avons donc envisagé une réaction d'ouverture de l'imide en un dérivé de type bis-amide puis refermeture de ce dernier en conditions acides.

Le composé **90** a pu ainsi être obtenu avec 82 % de rendement par réaction en un pot avec deux équivalents de benzylamine puis cyclisation du diamide intermédiaire **101** par ajout de deux équivalents d'acide paratoluènesulfonique (APTS) (schéma 60). L'accès à **90** a ainsi été élaboré avec un rendement global de 55 % en 5 étapes.

Schéma 60 : Synthèse du composé **90** à partir de **91**.

IV.B.2. Synthèse de **90** à partir du *N*-benzylmaléimide

La seconde voie de synthèse de **90** consiste à partir du maléimide benzylé qui est un produit commercial, mais qui peut également être préparé selon une version modifiée de la réaction de Mistunobu développée par Walker pour ce type de substrat.^{249,250}

Dans le cadre de notre synthèse, nous avons utilisé le produit commercial pour préparer le composé **103** en suivant un protocole semblable à celui employé précédemment pour la préparation de son homologue non substitué **52**.²⁵¹ Nous accédons ainsi à **103** en deux étapes à partir du *N*-benzylmaléimide avec 82 % de rendement (schéma 61)

²⁴⁹ M. A. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 665-8.

²⁵⁰ M. A. Walker, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5352-5.

²⁵¹ L. J. Jiang, H. Q. Lan, J F. Zheng, J. L. Ye, P. Q. Huang, *Synlett* **2009**, 2, 297-301.

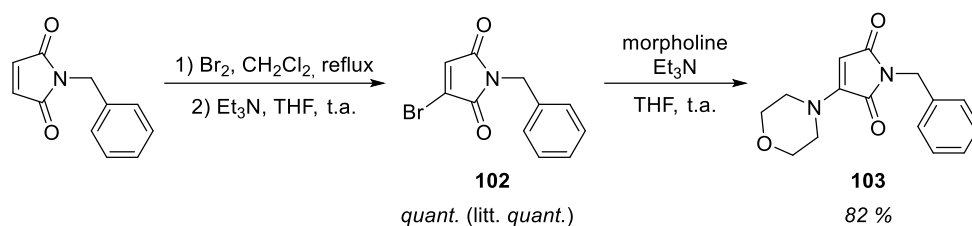


Schéma 61 : Préparation de 103.

La stratégie décrite précédemment (formylation et hydrolyse en milieu alcalin) conduit au synthon **104** qui est engagé sans purification préalable dans la réaction avec le 6-aminouracile pour donner **90**. Le rendement est alors de 72 % à partir du dérivé morphinique **103**, soit un rendement global de 59 % en 3 étapes (schéma 62).

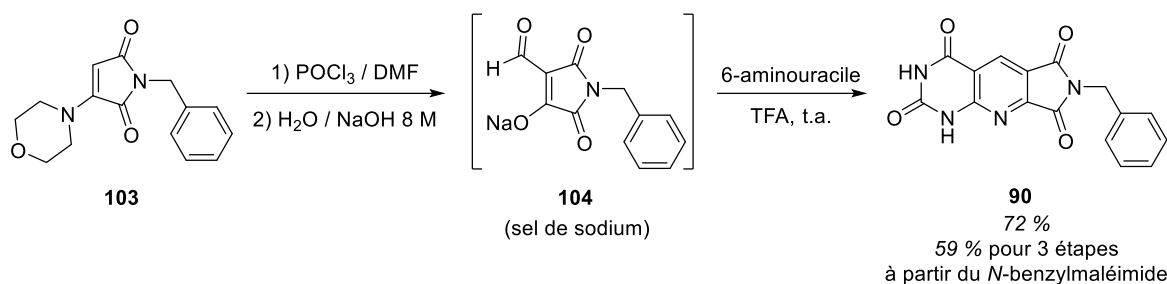
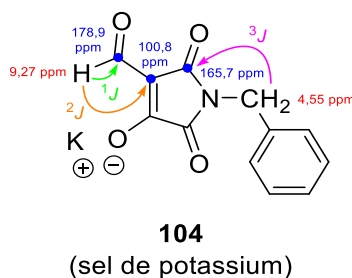


Schéma 62 : Synthèse du composé 90 à partir de 103.

La caractérisation du synthon benzylé **104** a été faite sur le sel potassique (figure 65), obtenu par hydrolyse de l'intermédiaire iminium à l'aide d'une solution de potasse dans le méthanol.

Contrairement à celui du dérivé non benzylé **100**, le spectre RMN ^{13}C de **104** ne comporte aucun signal pour le carbone de l'énolate et un des carbonyles de l'imide, même lorsqu'il est réalisé avec un spectromètre RMN de 600 MHz (figure 65). Comme pour **100**, les couplages proton-carbone relevés sur les spectres RMN 2D ont permis l'attribution des signaux présents sur le spectre ^{13}C , et la structure de **104** a été confirmée par analyse élémentaire et spectrométrie de masse.

Figure 65 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **104** (sel de potassium).

Nous avons donc mis au point deux méthodes permettant de préparer des molécules tricycliques sélectivement substituées en position 7. Le produit **90** est ainsi synthétisé en 5 étapes à partir du maléimide avec 55 % de rendement, ou bien en 3 étapes à partir du *N*-benzylmaléimide avec 59 % de rendement (schéma 63).

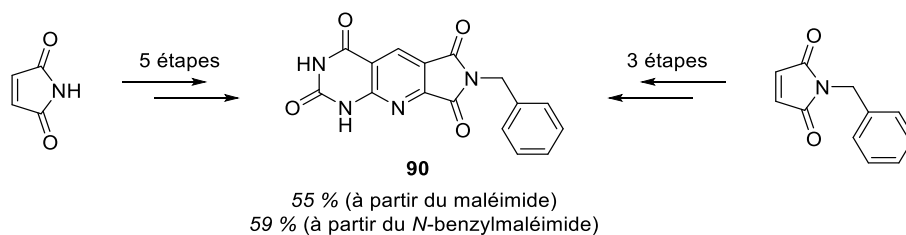


Schéma 63 : Récapitulatif des deux voies d'accès à **90** qui ont été développées.

Même si ces deux approches sont équivalentes en termes de rendement, il est plus facile d'introduire de la diversité en position 7 avec la méthode passant par l'intermédiaire **91** (obtenu à partir du maléimide). C'est cette dernière que nous avons retenue pour l'extension de notre méthodologie à des molécules diversement substituées en *N*⁷.

IV.C. Extension aux molécules substituées en *N*⁷

IV.C.1. Introduction de substituants aromatiques et aliphatiques

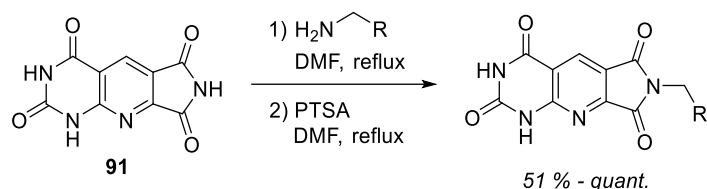
En utilisant des benzylamines substituées par des groupements électrodonneurs (**105** à **108**) ou électroattracteurs (**109**), la 3-picolylamine (**110**), la phényléthylamine (**111**), ou encore des amines aliphatiques telles que la cyclohexylméthylamine (**112**) et la 3-diméthylamino-1-propylamine (**113**), cette méthode nous a permis d'introduire une grande variété de substituants sur la position *N*⁷ (tableau 6). Elle s'est avérée particulièrement efficace pour une large majorité de ces composés, avec des rendements modérés à quantitatifs. En revanche, le dérivé aminé **113** n'a pas été obtenu avec une pureté satisfaisante, nous avons donc préparé le chlorhydrate correspondant **114**.

IV.C.2. Introduction d'une pyrimidinedione

Comme cela a été évoqué dans le projet de recherche, afin de se rapprocher des structures des séries B et C, nous avons envisagé de remplacer le substituant phényle de l'hétérocycle **90** par une pyrimidinedione.

L'introduction d'une pyrimidinedione en *N*⁷ nécessite la préparation de l'amine **115**, qui est obtenue par action de l'ammoniaque sur le 6-chlorométhyluracile **59**.²⁵² La réaction donne cependant un produit qui semble être la forme zwitterion **116**, avec 60 % de rendement (schéma 64). Nous avons donc utilisé une version modifiée du protocole de Yano *et al.*,¹⁵⁵ avec un traitement acide permettant d'obtenir le chlorhydrate **115** avec 83 % de rendement (schéma 64).

²⁵² J. J. Wade, *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 981-7.



Produit	Structure	Rdt (%)	Produit	Structure	Rdt (%)
90		82	110		74
105		89	111		75
106		51	112		Quant.
107		79	113		63
108		66	114		-
109		84			

Tableau 6 : Molécules sélectivement substituées sur la position 7 obtenues en série D.

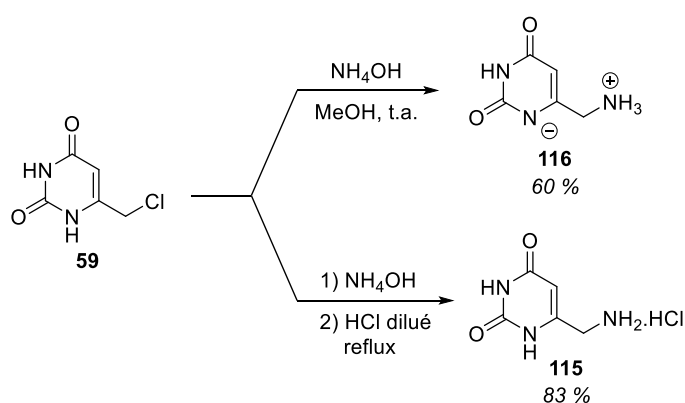


Schéma 64 : Préparation de 115.

La réaction avec l'amine en présence de triéthylamine (Et_3N) dans le DMF donne bien l'intermédiaire ouvert 117, mais l'ajout de l'APTS ne permet pas de recycliser l'imide (schéma 65).

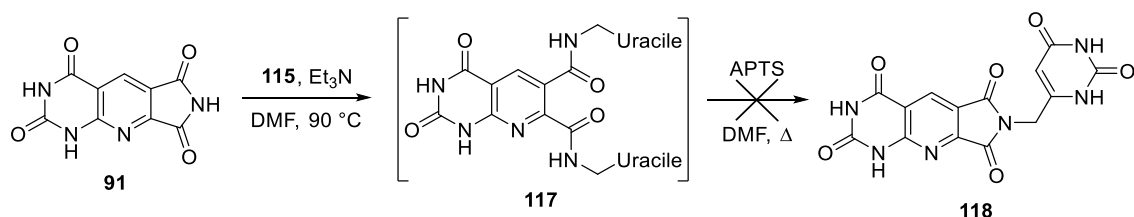


Schéma 65 : Tentative de synthèse de 118.

Nous avons alors procédé en deux temps, en préparant d'abord **117**, isolé avec un rendement quantitatif (schéma 66), puis en essayant de le cycliser par chauffage dans le DMF. Cela n'a pas eu plus de succès, de même que l'emploi du chauffage aux micro-ondes. Diverses conditions acides plus ou moins fortes ont alors été testées afin de cycliser le diamide intermédiaire, telles que l'HCl concentré, le TFA ou encore l'acide phosphorique. Une petite quantité du produit attendu semble se former mais on obtient généralement un mélange de produits duquel nous n'avons pu isoler **118** (schéma 66).

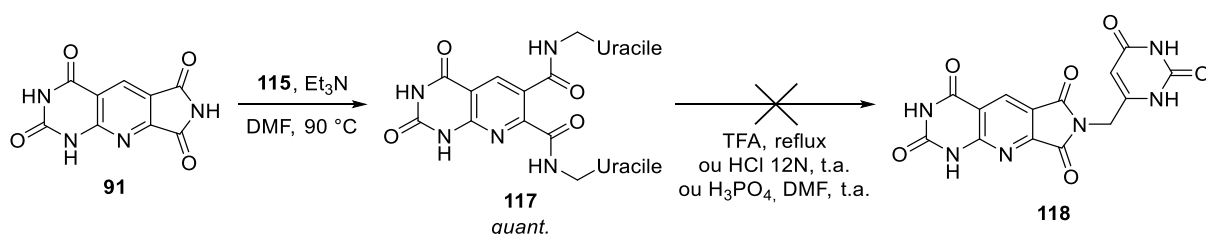


Schéma 66 : Essais de cyclisation de l'intermédiaire bis-amide 117.

D'autres méthodes permettant la cyclisation de structures semblables à un phthalimide sont décrites dans la littérature. Ce type de cyclisation intervient notamment dans les réactions de transamidation sur cet hétérocycle, lesquelles sont décrites dans des conditions très variées. Il est ainsi possible d'utiliser un catalyseur organique,²⁵³ un métal de transition²⁵⁴ ou encore un acide de Lewis.^{255,256} Par manque de temps, nous n'avons pu faire que quelques essais sur un protocole à base d'acide borique, sans succès toutefois (schéma 67).

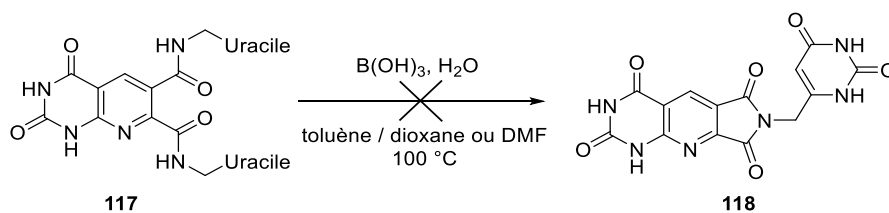


Schéma 67 : Tentative de cyclisation du bis-amide 117 à l'aide d'acide borique.

²⁵³ S. N. Rao, D. C. Mohan, S. Adimurthy, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1496-9.

²⁵⁴ L. Becerra-Figueroa, A. Ojeda-Porras, D. Gamba-Sanchez, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4544-52.

²⁵⁵ T. B. Nguyen, J. Sorres, M. Q. Tran, L. Ermolenko, A. Al-Mourabit, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3202-5.

²⁵⁶ E. Bon, R. Réau, G. Bertrand, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1217-20.

IV.D. Extension aux dérivés polysubstitués

Afin d'évaluer la robustesse des voies de synthèse développées, nous nous sommes intéressés à l'extension de notre méthode aux composés tricycliques di- ou trisubstitués sur les positions 1, 3 et 7. Pour ces molécules polysubstituées, les deux voies d'accès mises au point avec le modèle benzylique ont été testées, à savoir *via* la préparation du synthon **100** ou celle de son homologue benzylé **104**.

La synthèse des hétérocycles 1-méthyle et 1,3-diméthyle **120** et **121** a donc été effectuée à partir des maléimides *N*-H et *N*-benzylé et des uraciles **119** et **87**. Les deux méthodes ont donné de très bons résultats et ont permis d'obtenir **120** et **121** avec des rendements respectifs de 20 et 25 % en 5 étapes pour la première méthode, et de 41 et 36 % en 3 étapes pour la seconde (schéma 68).

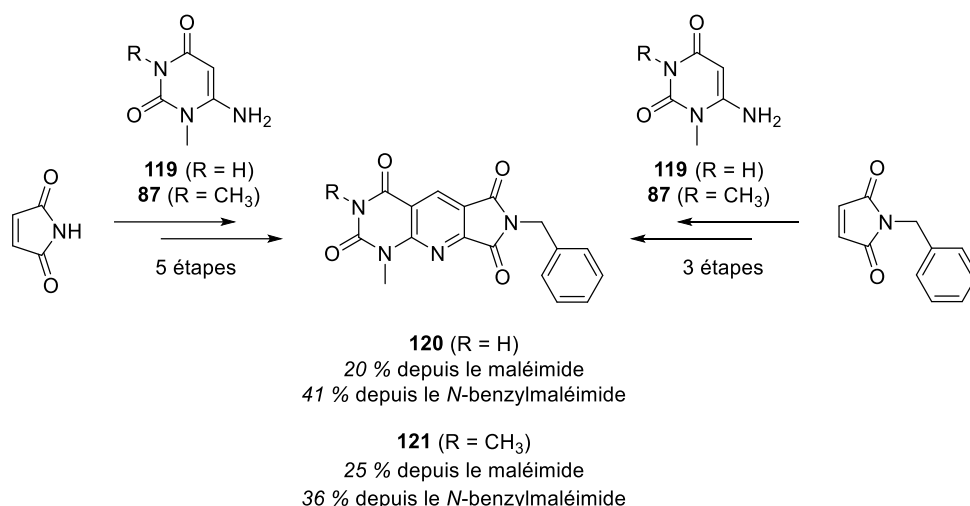


Schéma 68 : Obtention des dérivés polysubstitués **120 et **121**.**

V. Conclusion

Série A

- ✓ A l'aide de la réaction multicomposants développée par notre groupe ou de versions légèrement modifiées de ce protocole, nous avons pu réaliser la synthèse de huit nouvelles structures pour la **série A** (**21** à **28**, 17 à 67 % de rendement).
- ✗ Plusieurs essais de la réaction multicomposants avec des *o*-phénylènediamines se sont révélés vains, en raison des nombreux produits secondaires qui se forment avec ce type de substrat.

Série C

- ✓ Une modification de la méthode d'accès au dérivé **62** a permis d'améliorer grandement le rendement avec lequel celui-ci était préparé (de 4 à 47 % pour les deux étapes à partir du 6-chlorométhyluracile), mais également d'accéder à ses homologues chlorés et iodés **65** et **66** (35 et 72 % de rendement, respectivement).
- ✗ Malgré les nombreux efforts qui ont été fournis, le composé substitué par un méthyle sur la position 5 de la pyrimidinedione (**74**) n'a pas pu être obtenu, que ce soit à partir du 6-chlorométhyl-5-méthyluracile **67** ou du dérivé bromé **62**.
- ✗ Nous avons cependant réussi à coupler la quinoléine-imide **46** avec le 5-chlorométhyluracile, accédant ainsi à la structure **81**, bien que sous une forme non analytiquement pure.
- ✓ Le composé **85**, où un noyau phényle remplace la pyrimidinedione, a également été synthétisé. Au total, nous avons obtenu 6 molécules possédant le squelette de la **série C**.

Série D

- ✓ Après plusieurs tentatives infructueuses par réaction multicomposants, nous sommes parvenus à mettre au point la synthèse des pyridopyrimidine-imides de la série D grâce au développement des synthons originaux **100** et **104**.
- ✓ Avec cette méthode, dix composés sélectivement substitués sur l'imide ont pu être préparés (**90** et **105** à **113**), ainsi que deux dérivés polysubstitués (**120** et **121**), soit douze molécules préparées en **série D**.
- ✗ En revanche, l'introduction d'une pyrimidinedione sur l'imide n'a pas été possible, l'intermédiaire bis-amide **117** n'ayant pu être recyclisé malgré de nombreuses tentatives.

Chapitre 3 :

Synthèse des inhibiteurs des séries E1, E2 et E3

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à trois nouvelles séries de composés conçus de manière à interagir avec le site de fixation de la thymidine et en même temps remplir de manière optimale la poche récemment mise en évidence dans le site actif (figure 66) :

- La série E1, basée sur un squelette furoquinoléine ou pyranoquinoléine, conserve le motif dioxolane pour interagir avec le site de la thymidine et comporte divers substituants sur le cycle oxygéné (dihydrofurane ou dihydropyrane) afin de remplir les parties gauche et droite de la « nouvelle » poche.
- La série E2, qui possède une structure pyranoquinoléine similaire à celle de la série E1. Elle a servi à optimiser l'introduction de nucléophiles (Nu) carbonés sur ce type de structure. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur un fragment R² en série aliphatique car ce type de substrat, moins stable et réactif que son équivalent aromatique, est peu décrit dans la littérature, ce qui représente une voie de synthèse plus ambitieuse.
- La série E3, dont la structure est constituée d'une pyrimidinedione, d'une pyridine et d'un dihydrofurane accolés. Cette dernière série combine ainsi le motif pyrimidinedione, utilisé dans nos précédentes séries d'inhibiteurs, avec un dihydropyrane semblable à celui utilisé pour les séries E1 ou E2.

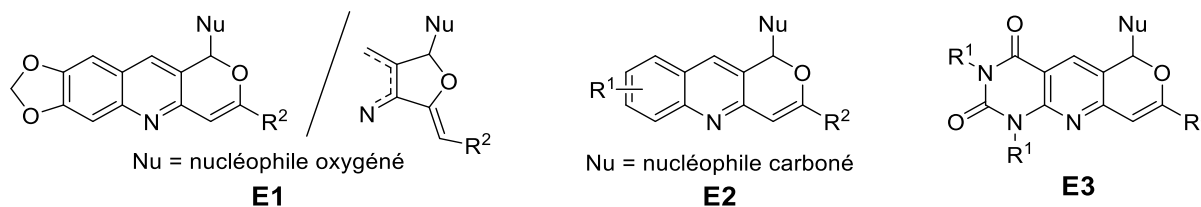


Figure 66 : Structures générales des séries E1, E2 et E3.

L'accès à ces trois séries de composés repose sur une réaction de cyclofonctionnalisation catalysée avec des sels d'argent mettant en jeu un substrat de type aldéhyde-yne. Nous décrirons dans un premier temps la synthèse des inhibiteurs des séries E1 et E2, puis l'accès au squelette de la série E3.

II. Synthèse des furoquinoléines et pyranoquinoléines (séries E1 et E2)

L'accès aux pyrano- et furoquinoléines des séries E1 et E2 (squelettes **122** et **123**, schéma 69) serait réalisée suivant une méthodologie de synthèse utilisée au laboratoire qui comporte quatre ou cinq étapes à partir d'une aniline commerciale. Le cycle oxygéné à 5 ou 6 atomes serait obtenu par une réaction de cyclofonctionnalisation catalysée à l'argent faisant intervenir un nucléophile (Nu) et un substrat de type aldéhyde-yne **124**.

Les substrats **124** seraient préparés par un couplage palladocatalysé de Sonogashira entre la chloroquinoléine **125** et un groupement alcyne. Pour certaines quinoléines, un échange d'halogène chlore/iode préalable pourrait être nécessaire et c'est la 2-iodoquinoléine **126** qui serait alors engagée dans la réaction de couplage.

Enfin, les 2-chloroquinoléine-3-carbaldéhydes seraient obtenus selon une réaction de Vilsmeier-Haack-Arnold, aussi appelée synthèse de Meth-Cohn des quinoléines,²⁵⁷ à partir des acétanilides correspondants **127**, eux-mêmes provenant de l'acylation d'anilines commerciales **128**.

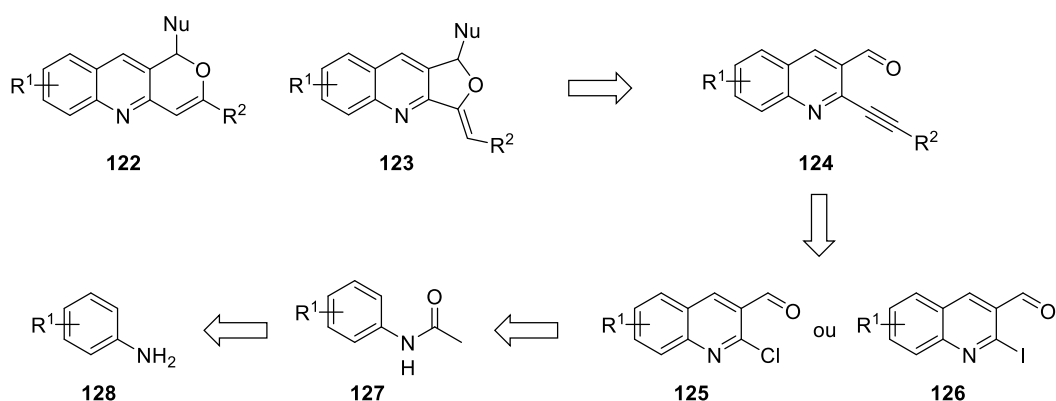


Schéma 69 : Rétrosynthèse envisagée pour les séries E1 et E2.

Dans cette partie, une courte analyse bibliographique de la réaction tandem sur les substrats aldéhyde-yne va être présentée, d'abord avec des nucléophiles oxygénés puis avec des nucléophiles carbonés. Les réactions faisant intervenir d'autres catégories de nucléophiles, azotés notamment, ne seront pas présentées. Ensuite, nous aborderons les travaux antérieurs de notre équipe qui ont conduit à l'élaboration des séries d'inhibiteurs E1 et E2, avant de décrire les synthèses en question.

²⁵⁷ O. Meth-Cohn, B. Narine, B. Tarnowski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 1520-30.

II.A. Contexte bibliographique

II.A.1. Les réactions tandem d'addition/cycloisomérisation

Les réactions tandem d'addition/cycloisomérisation (ou cyclofonctionnalisation) permettent d'accéder en une seule étape à des structures complexes et ont été largement employées pour la synthèse d'hétérocycles^{258,259,260} et de dérivés d'intérêt biologique.^{261,262,263} Elles présentent l'avantage de proposer une parfaite économie d'atomes, l'intégralité des atomes engagés dans la réaction se retrouvant dans le produit obtenu, ainsi que de très bonnes sélectivités.^{264,265}

Le substrat type d'une réaction de cycloisomérisation se compose en général d'une insaturation, classiquement un groupement alcyne ou un allène, et d'une autre fonction chimique, insaturée ou non et pouvant inclure un hétéroatome.²⁶⁶ Ce second partenaire peut correspondre entre autres à un groupement alcyne,^{267,268,269,270,271} un allène,^{267,269,270} un alcène,^{267,269-272,273,274} une fonction oxygénée,^{267,271,274,275} ou encore une fonction azotée (schéma 70).^{267,270,271,274,276} Ces deux entités sont reliées par un espaceur plus ou moins long, la réaction considérée étant intramoléculaire. Elle peut être catalysée par de nombreux métaux de transition²⁶⁷⁻²⁷⁶ ou électrophiles non métalliques²⁷⁷ et peut se faire avec ou sans l'insertion d'un nucléophile^{272,273} (alcène, alcyne, noyau aromatique, allylmétal, dérivé 1,3-dicarbonylé, alcool, cétone énolisable, acide carboxylique, amide ou amine). Dans le cas où un nucléophile est introduit, on parle de réaction de cyclofonctionnalisation.

Le catalyseur va généralement activer l'un des deux partenaires, abaissant ainsi sa densité électronique, ce qui favorise l'attaque nucléophile par l'autre partenaire. Le schéma 70 illustre le cas de figure où une fonction alcyne est activée par un catalyseur métallique puis est attaquée

²⁵⁸ J. Keilitz, H. A. Malik, M. Lautens, *Top Heterocycl. Chem.* **2013**, *32*, 187-224.

²⁵⁹ H. C. Shen, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3885-903.

²⁶⁰ K. Stefan, *Synthesis* **2008**, *20*, 3183-204.

²⁶¹ B. Alcaide, P. Almendros, J. M. Alonso, *Molecules* **2011**, *16*, 7815-43.

²⁶² C. I. Stathakis, P. L. Gkizis, A. L. Zografos, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1093-117.

²⁶³ A. Furstner, *Accounts Chem. Res.* **2014**, *47*, 925-38.

²⁶⁴ B. M. Trost, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 695-705.

²⁶⁵ F. Alonso, I. P. Beletskaya, M. Yus, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3079-160.

²⁶⁶ B. H. Lipshutz, Y. Yamamoto, *Coinage Metals in Organic Chemistry*, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2793-3442.

²⁶⁷ G. Fang, X. Bi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8124-73.

²⁶⁸ D. P. Day, P. W. H. Chan, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1368-84.

²⁶⁹ C. Aubert, L. Fensterbank, P. Garcia, M. Malacria, A. Simonneau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1954-93.

²⁷⁰ F. Inagaki, S. Kitagaki, C. Mukai, *Synlett* **2011**, *5*, 594-614.

²⁷¹ P. Belmont, E. Parker, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *35*, 6075-89.

²⁷² V. Michelet, *5.30 Noble Metal-Catalyzed Enyne Cycloisomerizations and Related Reactions*, *Comprehensive Organic Synthesis II, Second Edition*, Amsterdam, Pays-Bas, Elsevier, **2014**, 1483-536.

²⁷³ P. Y. Toullec, V. Michelet, *Top Curr. Chem.* **2011**, *302*, 31-80.

²⁷⁴ R. Dorel, A. M. Echavarren, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9028-72.

²⁷⁵ B. Alcaide, P. Almendros, J. M. Alonso, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4405-16.

²⁷⁶ B. Alcaide, P. Almendros, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2561-76.

²⁷⁷ T. Aggarwal, S. Kumar, A. K. Verma, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7639-53.

par le second fragment sur sa position la plus déficiente en électrons (en rouge ou en bleu sur le schéma), avec ou non introduction d'un nucléophile (Nu).

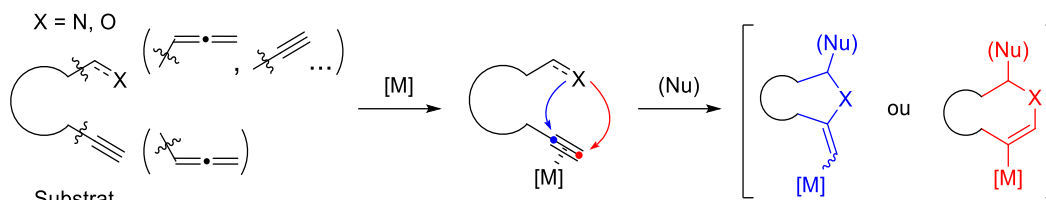


Schéma 70 : Schéma de principe d'une réaction de cycloisomérisation avec ou sans introduction d'un nucléophile.

Nous aborderons uniquement la réactivité des systèmes comportant un aldéhyde en position β par rapport à un alcyne (ou aldéhyde-yne 1,4), sur lesquels notre équipe de recherche travaille depuis de nombreuses années. Selon la nature du catalyseur employé, la réaction domino de cycloisomérisation d'un tel substrat peut s'effectuer suivant deux voies mécanistiques distinctes que nous proposons (schéma 71) :

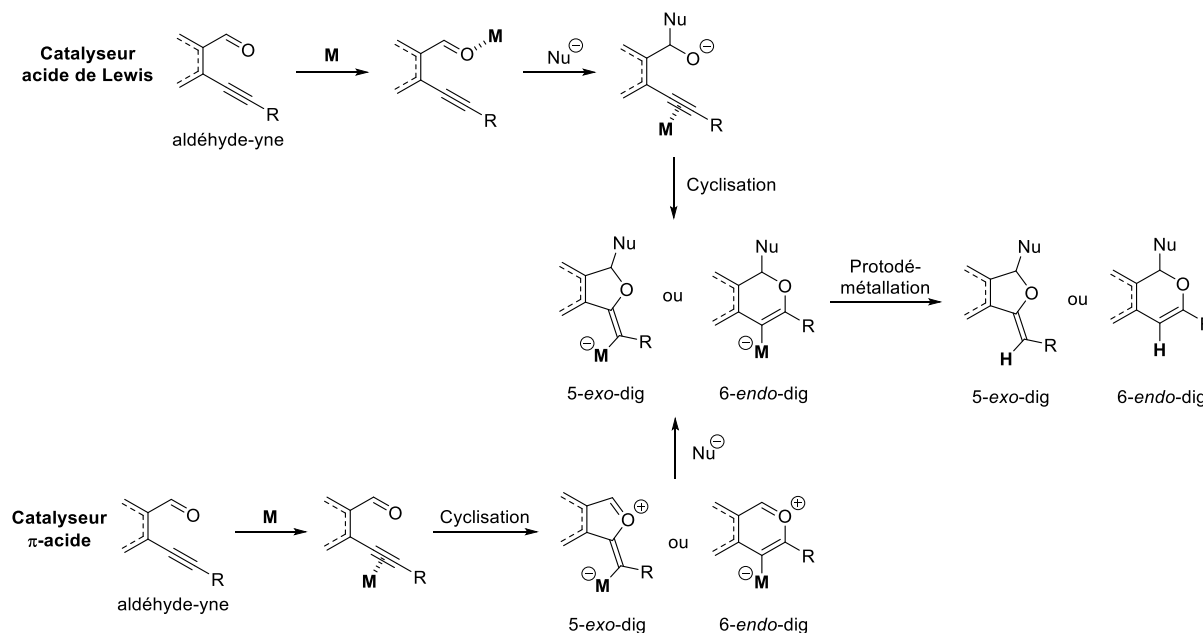


Schéma 71 : Propositions de mécanismes pour la cycloisomérisation des aldéhydes-yne.

- Dans le cas où le métal a plutôt un caractère oxophile, il va en priorité se coordonner à l'atome d'oxygène du carbonyle, ce qui favorise l'attaque du nucléophile sur l'atome de carbone adjacent appauvri en électrons. Le métal se coordine alors à la triple liaison, induisant un déficit d'électrons sur l'un des carbones de cette liaison et conduisant ainsi à la réaction de cyclisation sur cette position déficitaire en électrons *via* un mécanisme de type 5-*exo-dig* ou 6-*endo-dig*. Dans ce mécanisme, le catalyseur se comporte à la fois comme un métal de transition (un π -acide) et un acide de Lewis.
- Si en revanche le métal a davantage un caractère carbophile, il va se comporter préférentiellement comme un π -acide et va d'abord se coordonner à la triple liaison. Encore une fois, la cyclisation s'effectue sur la position la plus déficiente en électrons de

celle-ci, et le nucléophile vient finalement attaquer l'intermédiaire formé pour donner le produit final après protodémétallation.

II.A.2. Les réactions de cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile oxygéné

Le groupe de Yamamoto a été le premier à décrire une réaction d'acétalisation/cyclisation à partir de substrats aldéhyde-yne.²⁷⁸ Cette réaction, catalysée par des sels de palladium (II), a été effectuée avec un nucléophile de type alcool, sur des substrats en série aliphatique ou aromatique (schéma 72). Les premiers mènent à des produits de cyclisation de type 5-*exo*-dig tandis que les seconds conduisent préférentiellement aux composés issus de la cyclisation de type 6-*endo*-dig.

Des produits similaires ont ensuite été préparés par la même équipe en remplaçant le catalyseur au palladium par divers sels de cuivre (I) ou (II).²⁷⁹ Les travaux précurseurs de Yamamoto *et coll.* ont éveillé un intérêt important pour ce type de réactions, et de nombreux travaux ont suivi afin d'étudier la réactivité des substrats aldéhyde-yne en présence de catalyseurs au palladium,^{280,281} celle d'autres métaux de transition comme l'or^{282,283} ou l'argent^{284,285} ainsi que celle d'acides de Lewis.²⁸⁶

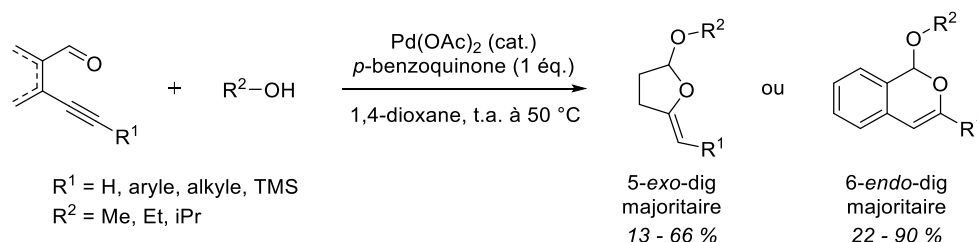


Schéma 72 : Cyclofonctionnalisation d'aldéhyde-yne en série aliphatique et aromatique catalysée au palladium de Asao *et al.*²⁷⁸

L'activation de la triple liaison peut également être réalisée par un agent électrophile. Le groupe de Barluenga a ainsi mis au point une réaction domino d'addition/iodocyclisation catalysée par un agent d'iodation hautement électrophile, le IPy₂BF₄, conduisant à de nombreux dérivés d'isochromènes (schéma 73).²⁸⁷ Cette réaction fonctionne avec les nucléophiles oxygénés, mais également avec divers nucléophiles carbonés tels que des noyaux aromatiques, des éthers d'énol

²⁷⁸ N. Asao, T. Nogami, K. Takahashi, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 764-5.

²⁷⁹ N. T. Patil, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5139-42.

²⁸⁰ A. Bacchi, M. Costa, N. Della Ca, M. Fabbricatore, A. Fazio, B. Gabriele, C. Nasi, G. Salerno, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *3*, 574-85.

²⁸¹ L.-L. Wei, L.-M. Wei, W.-B. Pan, M.-J. Wu, *Synlett* **2004**, *9*, 1497-502.

²⁸² A. Kotera, J. I. Uenishi, M. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *8*, 1166-9.

²⁸³ L.-P. Liu, G. B. Hammond, *Org. Lett.* **2010**, *20*, 4640-3.

²⁸⁴ T. Godet, C. Vaxelaire, C. Michel, A. Milet, P. Belmont, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5632-41.

²⁸⁵ M. Dell'Acqua, B. Castano, C. Cecchini, T. Pedrazzini, V. Pirovano, E. Rossi, A. Caselli, G. Abbiati, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3494-505.

²⁸⁶ S. Obika, H. Kono, Y. Yasui, R. Yanada, Y. Takemoto, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4462-8.

²⁸⁷ J. Barluenga, H. Vazquez-Villa, A. Ballesteros, J. M. Gonzalez, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9028-9.

silylés et des allylsilanes. Elle présente en outre l'avantage d'introduire un atome d'iode sur la position 3 du cycle dihydropyrane, laissant ainsi la possibilité de fonctionnaliser par la suite cette position.

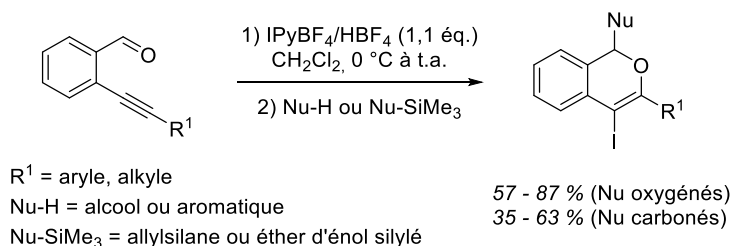


Schéma 73 : Cyclofonctionnalisation d'aldéhyde-ynes à l'aide d'un catalyseur électrophile non métallique de Barluenga *et al.*²⁸⁷

Peu après, Larock *et al.*²⁸⁸ se sont aussi intéressés à l'activation électrophile des substrats aldéhyde-ynes. La réaction qu'ils ont développée fait cette fois intervenir un catalyseur électrophile à base d'iode, de brome, de soufre ou de sélénium, et reste compatible avec des nucléophiles oxygénés et carbonés.

Enfin, une autre technique utilisée pour la réaction d'acétalisation/cyclisation est la catalyse basique. Celle-ci a été initialement développée par notre groupe à l'aide d'une base inorganique (le K_2CO_3) sur un substrat possédant un noyau quinoléine (schéma 74).²⁸⁹ Elle a conduit majoritairement à des produits de cyclisation 5-*exo*-dig, sauf si l'alcyne porte un groupement aromatique. Il est à noter que si le groupement alcyne est substitué par un triméthylsilyle (TMS), celui-ci est éliminé pendant la réaction.

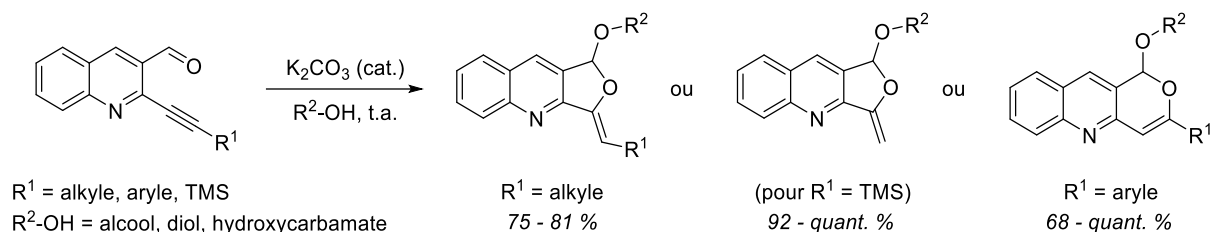


Schéma 74 : Cyclofonctionnalisation d'aldéhyde-ynes par catalyse basique de Godet *et al.*²⁸⁹

D'autres équipes ont ensuite rapporté le même type de réaction mais sur des substrats différents et avec des bases organiques, comme un alcoolate^{290,291} ou un phosphazène.²⁹²

²⁸⁸ D. Yue, N. Della Ca, R. C. Larock, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1581-4.

²⁸⁹ T. Godet, J. Bosson, P. Belmont, *Synlett* **2005**, 18, 2786-90.

²⁹⁰ I. Cikotiene, M. Morkunas, D. Motiejaitis, S. Rudys, A. Bruskstus, *Synlett* **2008**, 11, 1693-7.

²⁹¹ M. Dell'Acqua, D. Facoetti, G. Abbiati, E. Rossi, *Synthesis* **2010**, 14, 2367-78.

²⁹² C. Kanazawa, A. Ito, M. Terada, *Synlett* **2009**, 4, 638-42.

II.A.3. Les réactions de cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile carboné

De nombreux composés ont été étudiés comme de potentiels nucléophiles carbonés dans la réaction tandem d'addition/cyclisation. Nous en avons déjà évoqué certains dans le cadre de la catalyse électrophile, mais une grande diversité de nucléophiles a aussi été introduite à l'aide de métaux de transition.

L'équipe de Yamamoto a encore une fois été précurseur en proposant en 2005 une synthèse d'isochromènes utilisant une catalyse bimétallique au palladium (II) et au cuivre (II) et permettant d'introduire, par l'intermédiaire de nucléophiles de type allylsilanes, des groupements allyliques (schéma 75).²⁹³ Peu après, Obika *et al.* ont obtenu des produits similaires grâce à un catalyseur d'indium (III) et un allylstannane comme nucléophile.²⁸⁶

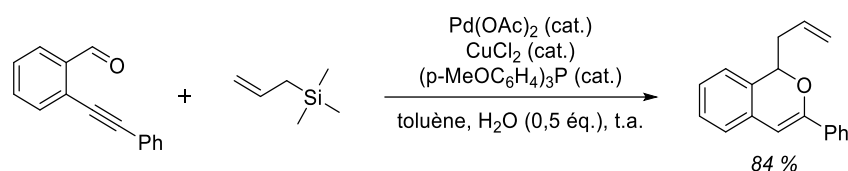


Schéma 75 : Cyclofonctionnalisation d'aldéhyde-ynes par catalyse bimétallique Pd/Cu avec introduction de groupements allyliques de Asao *et al.*²⁹³

En 2006, le groupe de Li a mis au point une réaction tandem basée sur une catalyse à l'or (I) introduisant cette fois un nucléophile de type alcyne.²⁹⁴ D'autres équipes ont ensuite étudié des nucléophiles comme les méthylènes activés,²⁹⁵ les phosphites²⁹⁶ ou, plus récemment, l'éther de vinyle.²⁹⁷

Pour finir, les noyaux aromatiques riches en électrons se sont également révélés être de bons nucléophiles pour la réaction tandem. En 2003, l'équipe de Dyker réalise plusieurs essais avec des nucléophiles de type indole et en présence d'un catalyseur d'or (III), mais seul un dérivé de l'indène est observé (schéma 76, gauche).²⁹⁸ Les auteurs suggèrent que l'isochromène attendu se forme bien mais qu'il réagit à nouveau avec le catalyseur pour donner ce sous-produit. Ce n'est qu'en 2010 que Tang *et al.* réussissent à isoler un dérivé de l'isochromène issu de la réaction tandem avec introduction d'un nucléophile aromatique carboné (l'indole) (schéma 76, droite).²⁹⁹ Le catalyseur au palladium (II) utilisé permet de se placer dans des conditions plus douces que celles décrites par Dyker *et al.* et d'éviter la formation du sous-produit de type indène.

²⁹³ N. Asao, C. S. Chan, K. Takahashi, Y. Yamamoto, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11322-6.

²⁹⁴ X. Yao, C.-J. Li, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1953-5.

²⁹⁵ A. B. Beeler, S. Su, C. A. Singleton, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1413-9.

²⁹⁶ X. Yu, Q. Ding, W. Wang, J. Wu, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4390-3.

²⁹⁷ D. Malhotra, L.-P. Liu, M. S. Mashuta, G. B. Hammond, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4043-50.

²⁹⁸ G. Dyker, D. Hildebrandt, J. Liu, K. Merz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4399-402.

²⁹⁹ R.-Y. Tang, J.-H. Li, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4733-8.

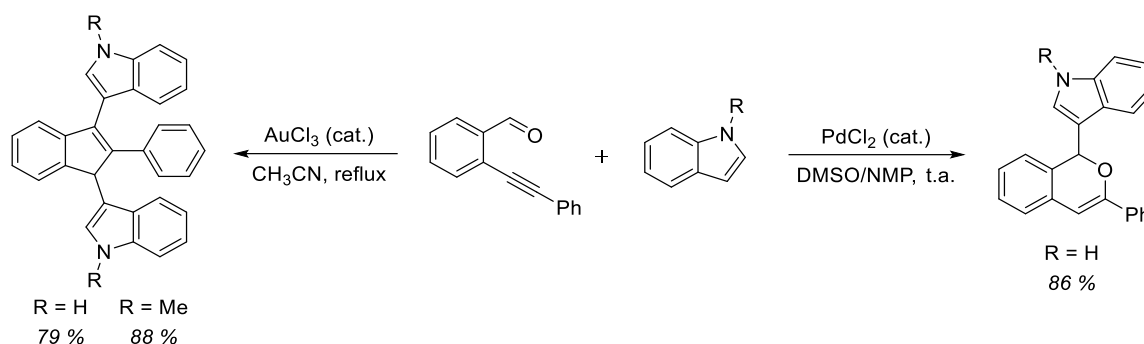


Schéma 76 : Travaux de Dyker *et al.*²⁹⁸ (gauche) et de Tang *et al.*²⁹⁹ (droite).

L'année suivante, des isochromènes très semblables ont été préparés par l'équipe de Peng et Wu à l'aide du triflate d'argent (AgOTf) (schéma 77).³⁰⁰ On remarquera que les auteurs ont exemplifié la réaction uniquement avec des substrats dont l'alcyne est substitué par un fragment aromatique. Hormis les travaux publiés récemment par notre groupe,³⁰¹ il s'agit du seul exemple décrit concernant la réaction d'addition/cyclisation d'aldéhyde-yne avec des nucléophiles carbonés par catalyse à l'argent.

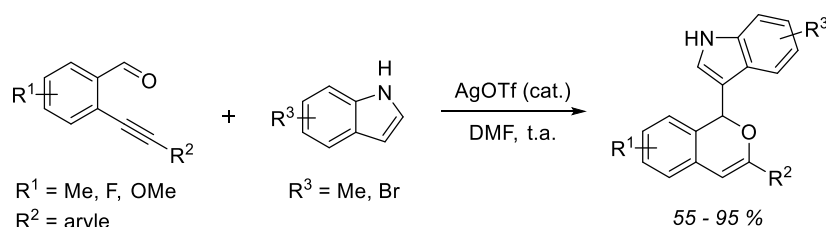


Schéma 77 : Cyclofonctionnalisation d'aldéhyde-ynes par catalyse à l'argent avec introduction de groupements aromatiques de Ouyang *et al.*³⁰⁰

II.B. Travaux antérieurs du groupe

Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années aux réactions de cyclofonctionnalisation de substrats de type aldéhyde-yne avec introduction de nucléophiles oxygénés.^{271,284,302,303,304} Ainsi, à partir de substrats 3-aldéhyde-2-alkynylquinoléines **129**, notre groupe a développé une réaction tandem de cyclofonctionnalisation catalysée par des sels d'argent permettant d'accéder à des furoquinoléines **130** ou des pyranoquinoléines **131**, selon que le mode de cyclisation est de type 5-*exo*-dig ou 6-*endo*-dig (schéma 78).

³⁰⁰ B. Ouyang, J. Yuan, Q. Yang, Q. Ding, Y. Peng, J. Wu, *Heterocycles* **2011**, 82, 1239-49.

³⁰¹ G. Mariaule, G. Newsome, P. Y. Toullec, P. Belmont, V. Michelet, *Org. Lett.* **2014**, 16, 4570-3.

³⁰² C. Michel, T. Godet, M.-L. DheuAndries, P. Belmont, A. Milet, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2007**, 811, 175-82.

³⁰³ E. Parker, N. Leconte, T. Godet, P. Belmont, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 343-5.

³⁰⁴ X. Bantreil, C. Vaxelaire, T. Godet, E. Parker, C. Sauer, P. Belmont, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 4831-41.

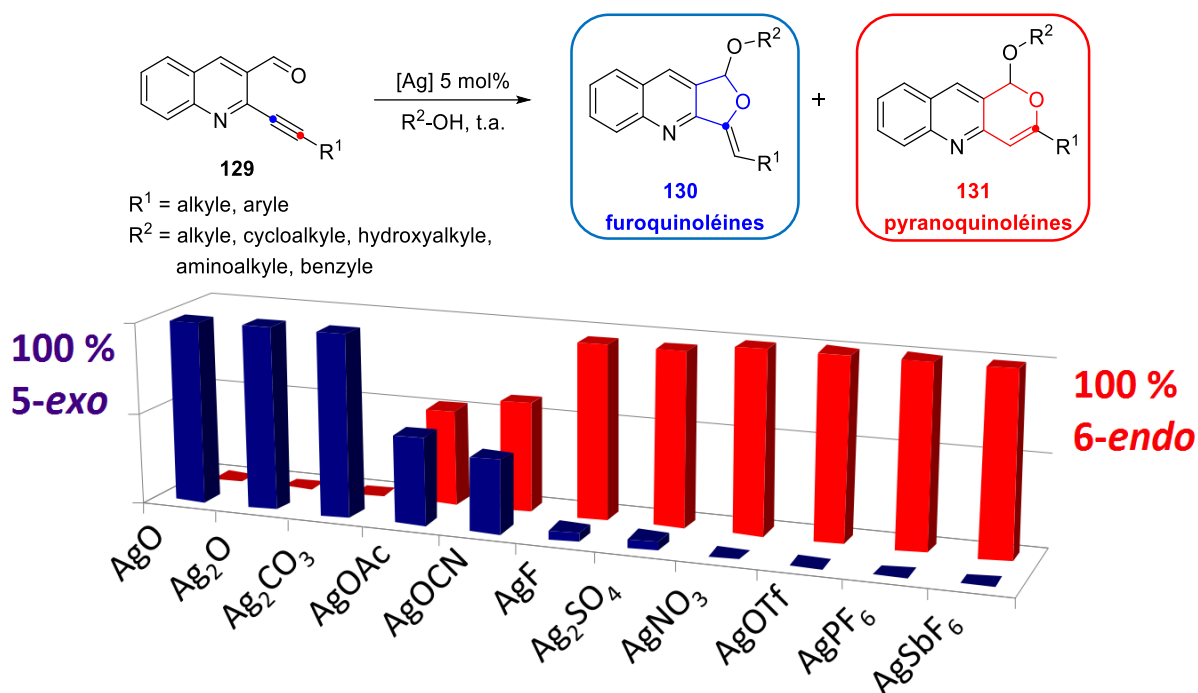


Schéma 78 : Etude de la réactivité de différents catalyseurs à l'argent sur la cyclofonctionnalisation d'aldéhyde-ynes basés sur un noyau quinoléine.

Dans le cas de la catalyse à l'argent, le mécanisme de cyclisation proposé dépend directement de la nature du catalyseur.²⁸⁴ Les sels d'argent qui se comportent plus comme des acides de Lewis (en bleu, schéma 78) donnent essentiellement des produits de cyclisation 5-*exo*-dig, les furoquinoléines, tandis que les catalyseurs dont les propriétés π -acide prédominent (en rouge, schéma 78) favorisent majoritairement un mécanisme de cyclisation de type 6-*endo*-dig et conduisent donc aux pyranoquinoléines. Le détail du mécanisme est présenté sur le schéma 79 :

- Un catalyseur qui se comporte comme un π -acide va se coordonner en priorité à l'alcyne (mécanisme en rouge). La triple liaison du complexe **6A** est alors appauvrie en électrons, ce qui favorise l'attaque nucléophile par le carbonyle selon une cyclisation de type 6-*endo*-dig. On obtient un intermédiaire benzopyrilium **6B** hautement réactif sur lequel va s'additionner le nucléophile.³⁰⁵ Pour finir, une étape de protodémétallation régénère le catalyseur et conduit à la pyranoquinoléine **6D**.
- Si le catalyseur se comporte comme un acide de Lewis, il se coordine à l'atome d'oxygène du carbonyle, formant ainsi le complexe **5A** (mécanisme en bleu). Après attaque par le nucléophile sur le carbonyle activé, l'intermédiaire organométallique **5B** cyclise sur l'alcyne selon un mode de cyclisation 5-*exo*-dig. Enfin, une protodémétallation mène à la furoquinoléine **5D**.

³⁰⁵ J. Zhu, A. R. Germain, J. A. Porco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1239-43.

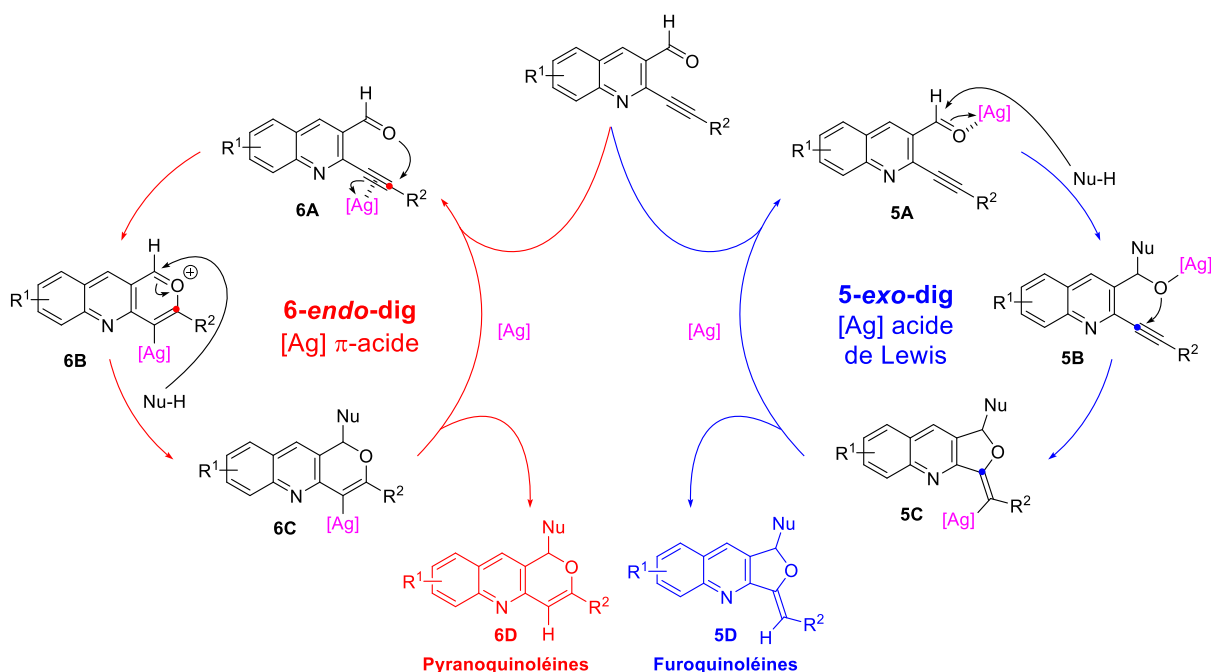


Schéma 79 : Mécanisme proposé pour la formation des furo- et pyranoquinoléines.³⁰⁵

Plus récemment, notre groupe s'est intéressé à l'emploi de nucléophiles carbonés aromatiques, des nucléophiles relativement peu exploités dans les réactions tandem d'addition/cyclisation. En utilisant principalement le 1,3,5-triméthoxybenzène, nous avons accédé aux 1-aryl-1*H*-isochromènes **133** à partir des *o*-alkynylbenzaldéhydes **132** (schéma 80).³⁰¹ Au cours de la réaction, une liaison carbone-carbone et une liaison carbone-oxygène sont formées. La méthode développée est compatible avec des noyaux benzéniques diversement substitués (**132**), en particulier avec un groupement alcyne portant un substituant (R^2) aussi bien aliphatique qu'aromatique.



Schéma 80 : Synthèse des 1-aryl-1*H*-isochromènes **133** grâce à l'introduction du motif 1,3,5-triméthoxybenzène.³⁰¹

II.C. Synthèse des précurseurs aldéhyde-ynes

II.C.1. Préparation des quinoléines de départ

La synthèse de Meth-Cohn des quinoléines est une voie de synthèse permettant d'accéder à des quinoléines diversement substituées en chauffant les acétanilides correspondants avec du trichlorure de phosphore dans le DMF.²⁵⁷ Les acétanilides **127** sont généralement

commerciaux mais relativement chers, nous avons donc préféré les préparer au laboratoire, ce qui s'effectue aisément par acétylation des anilines correspondantes **128**, avec un rendement quantitatif (schéma 81).

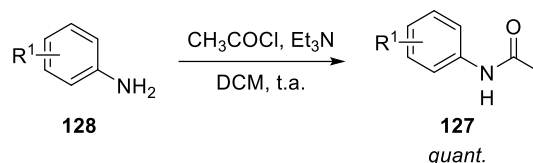


Schéma 81 : Préparation des acétanilides **127.**

Les acétanilides sont ensuite engagés dans la réaction de Meth-Cohn, et dans la plupart des cas, nous avons obtenu les quinoléines voulues **125** avec un rendement satisfaisant (schéma 82, figure 67). Les produits étant isolés par précipitation et filtration, ils ne nécessitent généralement pas de purification complémentaire et peuvent être utilisés tels quels pour la suite de la synthèse.

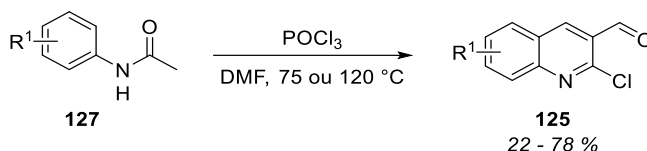
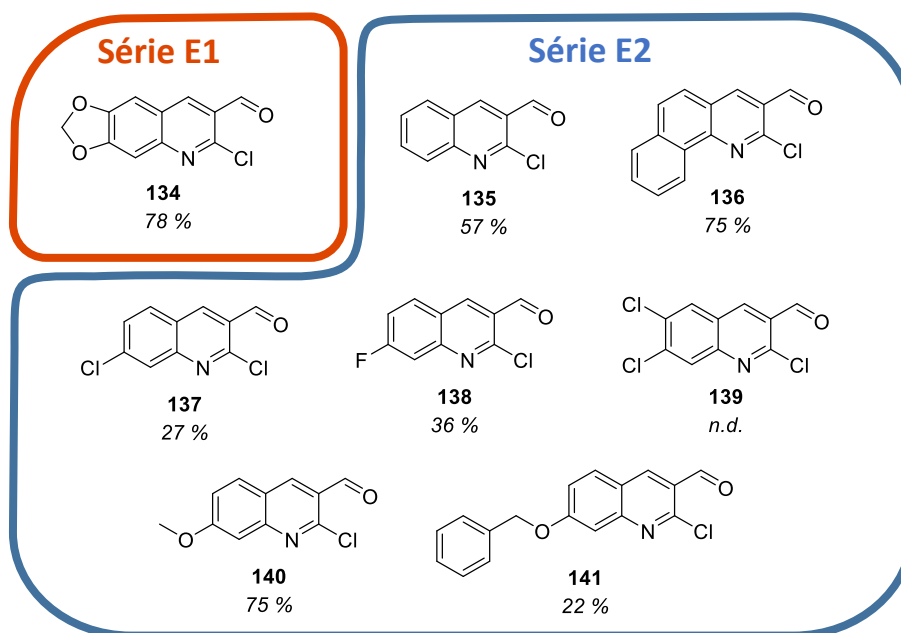


Schéma 82 : Préparation des quinoléines **125 par la réaction de Meth-Cohn.**

En plus de la quinoléine **134** (figure 67), substrat de départ des analogues de la série E1, nous avons souhaité synthétiser la quinoléine non substituée sur le cycle benzénique **135** et celle annelée à un cycle aromatique **136**, ainsi que diverses quinoléines portant des groupements électroattracteurs (**137**, **138** et **139**) ou électrodonneurs (**140** et **141**). Ces quinoléines sont les précurseurs des composés de la série E2, elles serviront, après introduction d'un groupement alcyne, à la mise au point de la méthodologie de cyclofonctionnalisation avec des nucléophiles carbonés.

La réaction fonctionne très bien avec l'acétanilide non substitué, possédant un cycle supplémentaire ou des substituants électrodonneurs, avec un rendement compris entre 57 et 78 % (**134**, **135** et **140**). La quinoléine **141**, substituée par un benzyloxy, fait exception. En effet, le solide isolé par filtration contenant une quantité non négligeable d'impuretés, une purification par chromatographie a été réalisée, mais celle-ci n'a permis d'isoler **141** qu'avec 22 % de rendement.

Les rendements sont nettement plus faibles pour les quinoléines dotées de groupements électroattracteurs **137** et **138** (27 et 36 % respectivement), comme cela est mentionné dans les travaux de Meth-Conh.²⁵⁷ En outre, la quinoléine dichlorée **139** n'a pas pu être isolée, le précipité collecté au terme de la réaction étant principalement constitué de la formamidine **142** (schéma 83), résultant de la déacétylation du produit issu de la réaction entre l'acétanilide et le réactif de Vilsmeier.



Notre attention s'est alors portée sur deux alternatives à la méthode de Meth-Cohn qui ont été proposées par Ali *et al.*^{306,307} La première consiste à réaliser la réaction dans l'acétonitrile à reflux et d'ajouter un surfactant permettant de catalyser la réaction par formation de micelles. La seconde propose des conditions plus douces, avec chauffage à 40 °C dans le 1,2-dichloroéthane (DCE) et sonication aux ultrasons. Ni l'une ni l'autre de ces méthodes ne nous a permis d'accéder à la quinoléine **139**.

Au vu de ces différents résultats, pour le développement de la méthodologie de cyclofonctionnalisation catalysée à l'argent, nous avons décidé d'abandonner la synthèse des quinoléines **139** et **141** et de nous concentrer sur les autres structures, pour lesquelles la réaction de Meth-Cohn fonctionne de manière plus satisfaisante.

II.C.2. Couplage de Sonogashira

La réaction de Sonogashira permet de coupler un halogénure d'aryle avec un alcyne terminal à l'aide d'un catalyseur au palladium et d'un sel de cuivre jouant le rôle de co-catalyseur.³⁰⁸ Si le plus souvent l'halogénure est un atome d'iode ou de brome, certains protocoles permettent aussi d'utiliser un analogue chloré, pourtant moins réactif. C'est notamment le cas dans la méthode décrite par Toyota *et al.*,³⁰⁹ où le substrat de départ est une 2-chloroquinoléine assez similaire à nos composés.

Pour la série E1, les substrats aldéhyde-yne de type **124** que nous souhaitons préparer (figure 68) possèdent tous le motif 6,7-méthylènedioxy sur la quinoléine. Ils sont fonctionnalisés sur l'alcyne par un groupement de nature aromatique (R^2 = phényle (Ph)) ou aliphatique (R^2 = propyle et méthoxyméthyle (MOM)). Un motif TMS a également été introduit, afin d'obtenir l'alcyne terminal après déprotection et *in fine* un pyrane non substitué sur cette position.

Pour la série E2, la quinoléine porte divers groupements et les substituants de l'alcyne (R^2 , figure 68) sont pour la plupart aliphatiques car ceux-ci sont plus difficiles à obtenir et sont peu répertoriés dans la littérature. La méthodologie sur la réaction tandem a par conséquent été réalisée sur ce type de substrat.

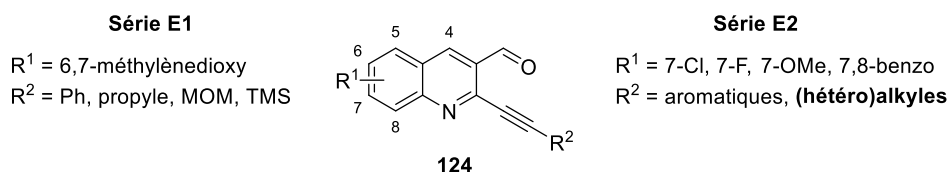


Figure 68 : Structure générale des substrats aldéhyde-yne utilisés en série E1 et E2.

³⁰⁶ M. M. Ali, Tasneem, K. C. Rajanna, P. K. Saiprakash, *Synlett* **2001**, 2, 251-3.

³⁰⁷ M. M. Ali, S. Sana, Tasneem, K. C. Rajanna, P. K. Saiprakash, *Synthetic Commun.* **2002**, 32, 1351-6.

³⁰⁸ K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 4467-70.

³⁰⁹ M. Toyota, C. Komori, M. Ihara, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7110-3.

II.C.2.a. Cas général des 2-chloroquinolines

Au sein de notre groupe, dans le cadre de la thèse de Gaëlle Mariaule,¹¹ il a été montré que les conditions de Toyota *et al.*³⁰⁹ sont très efficaces pour accéder aux aldéhydes-yne **124**, mais uniquement si les quinolines de départ ne portent pas de substituants électrodonneurs ou électroattracteurs.

Dans un premier temps, nous avons effectué la réaction avec ce protocole sur le noyau quinoléine non substitué sur le cycle benzénique (**135**) et, comme prévu, les résultats sont très satisfaisants, les alcynes **144** à **152** étant synthétisés avec 46 à 95 % de rendement (schéma 84). Pour l'alkyne **148**, le rendement modéré observé est sans doute la conséquence d'une dégradation partielle du produit pendant le traitement et/ou la purification de la réaction.

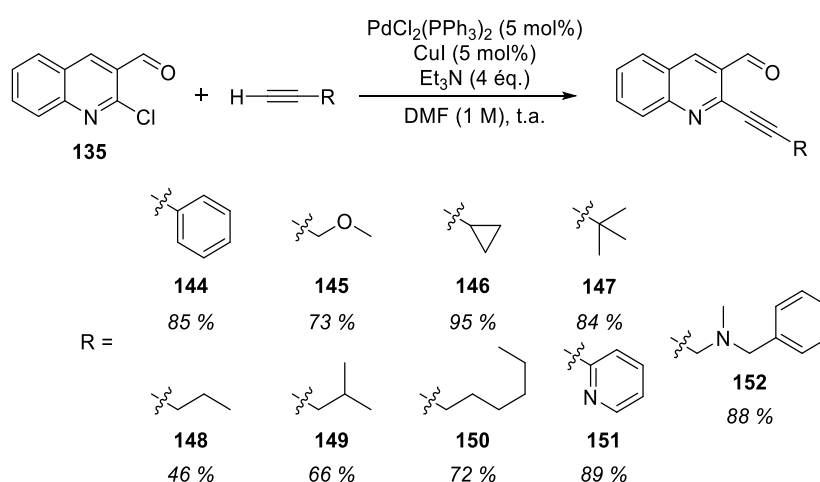


Schéma 84 : Synthèse des aldéhyde-yne **144** à **152**.

Nous savons toutefois qu'avec ce protocole, les quinolines trop riches en électrons ne réagissent quasiment pas, tandis que celles appauvries en électrons, bien plus réactives, conduisent essentiellement à des produits de dégradation. Deux protocoles alternatifs ont donc été mis au point afin d'adapter les conditions expérimentales à ces deux types de matières premières.

II.C.2.b. Quinolines avec des substituants mésomères donneurs (-OR)

Avec un halogénure d'aryle enrichi en électrons par des substituants donneurs, l'addition oxydante du palladium n'est pas facilitée, mais une solution consiste à remplacer l'atome de chlore par un autre halogène plus réactif, comme l'iode. En suivant un protocole développé par l'équipe de Meth-Cohn, les quinolines **134** et **140** conduisent aux analogues iodés **153** et **154** avec 70 et 80 % de rendement respectivement (schéma 85).³¹⁰

³¹⁰ O. Meth-Cohn, B. Narine, B. Tarnowski, R. Hayes, A. Keyzad, S. Rhouati, A. Robinson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. A* **1981**, 2509-17.

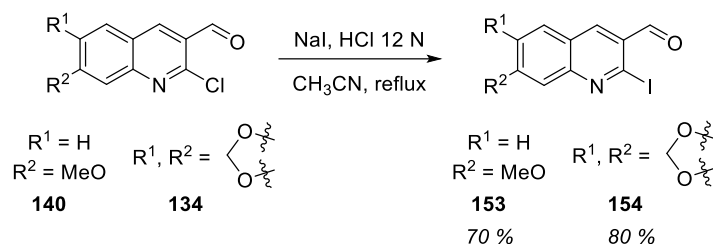


Schéma 85 : Préparation des quinoléines iodées 153 et 154.

Cette réaction d'échange d'halogène n'est pas totale et il reste toujours un peu de matière première chlorée dans le brut réactionnel. Toutefois, il n'est pas nécessaire d'isoler le produit iodé et le mélange des dérivés iodé et chloré peut être directement engagé dans la réaction de couplage où des conditions expérimentales plus douces que celles de Toyota *et al.*³⁰⁹ sont utilisées.³¹¹ Ces conditions sont bien adaptées au substrat 153, et permettent d'accéder aux dérivés aldéhyde-alcynes 155 à 158 avec des rendements bons à quasi-quantitatifs (schéma 86).

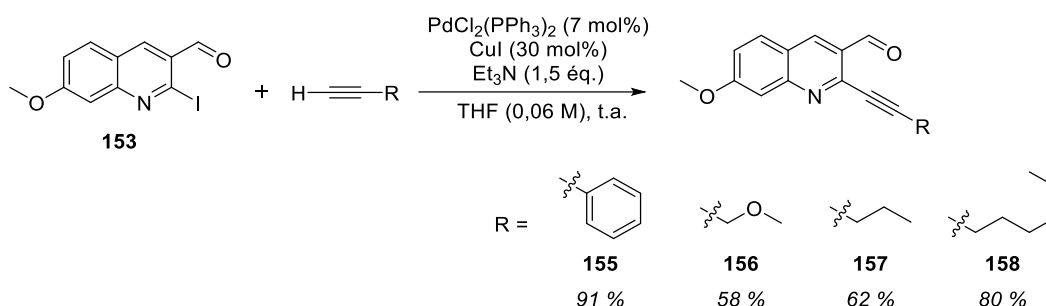


Schéma 86 : Synthèse des aldéhyde-ynes 155 à 158.

Le couplage de la quinoléine 154 avait déjà fait l'objet d'une étude détaillée dans notre laboratoire, dans le cadre du stage de Master 2 de Marion Delobea.³¹² Cette étude a montré que même dans les conditions de Toyota *et al.*,³⁰⁹ la conversion n'est pas totale, certainement à cause de la faible solubilité de ce type de substrat, et qu'il est difficile de séparer le dérivé alcynyl désiré de la matière première chlorée ou iodée résiduelle. En s'inspirant d'un protocole employant le chauffage aux micro-ondes,³¹³ il a finalement été possible d'obtenir l'alcynyl aromatique 159 avec un assez bon rendement (62 %, schéma 87).

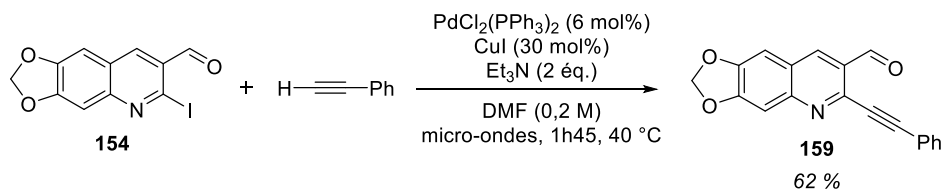


Schéma 87 : Synthèse de l'aldéhyde-yne 159.

Pour les alcynes aliphatiques, sachant qu'ils sont davantage susceptibles de se dégrader par chauffage, nous avons d'abord testé les conditions de Toyota *et al.*³⁰⁹ Cela a mieux fonctionné

³¹¹ P. Belmont, J.-C. Andrez, C. S. M. Allan, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2783-6.

³¹² M. Delobea, Synthèse de composés anti-angiogéniques par inhibition de la thymidine phosphorylase. Stage de Master 2^{ème} année, Université Paris Descartes, Paris, France, 2013.

³¹³ E. Petricci, M. Radi, F. Corelli, M. Botta, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 9181-4.

qu'avec le phénylacétylène, puisque les produits **160** à **162** sont obtenus avec d'excellents rendements (schéma 88).

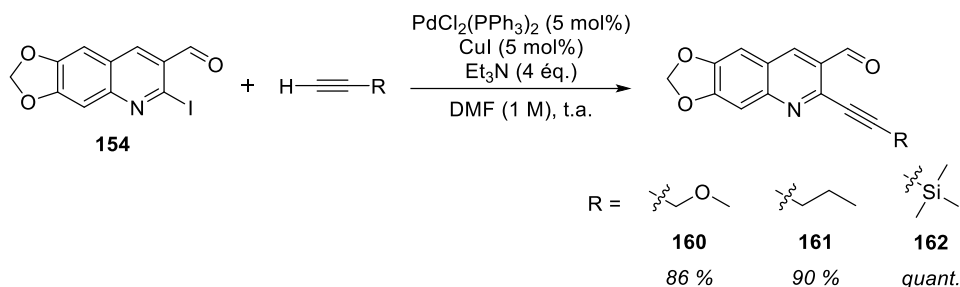


Schéma 88 : Synthèse des aldéhyde-yne **160 à **162**.**

II.C.2.c. Quinoléines avec des substituants à effet inductif attracteur (-Cl, -F)

Lorsque la quinoléine est activée par la présence de groupements électroattracteurs sur le cycle benzénique, les conditions de Toyota *et al.*³⁰⁹ sont trop drastiques et conduisent généralement à une dégradation de la matière première. Pour les quinoléines chlorée **137** et fluorée **138**, nous avons donc testé la réaction dans les conditions classiques plus douces déjà employées pour les composés iodés possédant des groupements donneurs (schéma 86).

Cette approche se montre satisfaisante, mais seulement avec le phénylacétylène (**163** et **165**, schéma 89). Avec un alcyne portant une chaîne alkyle comme un MOM par exemple, le rendement chute sensiblement (**164**, schéma 89). Le produit **166** n'a d'ailleurs pas été isolé avec cette méthode (conversion incomplète), et le chauffage du milieu réactionnel entraîne une dégradation des matières premières.

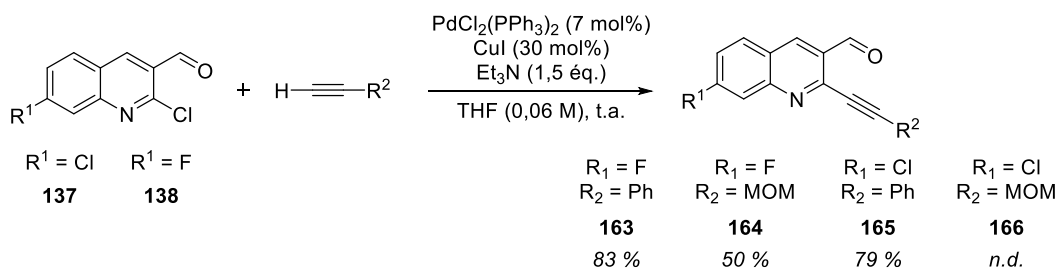


Schéma 89 : Synthèse des aldéhyde-yne **163 à **165**.**

Contre toute attente, ce sont finalement les conditions de Toyota *et al.*³⁰⁹ qui se sont révélées les plus efficaces pour introduire des alcynes aliphatiques sur ce type de quinoléines et ainsi accéder aux composés **166**, **167** et **168** (schéma 90).

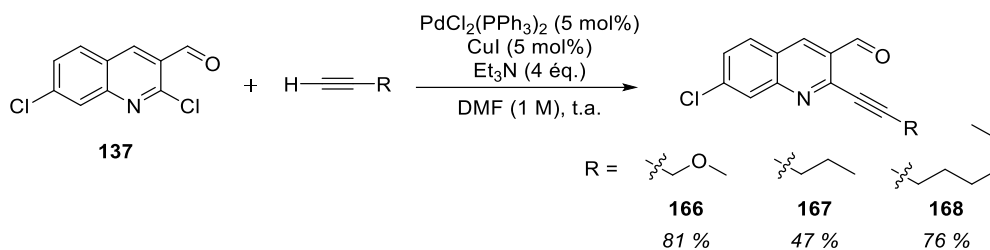


Schéma 90 : Synthèse des aldéhyde-yne 166 à 168.

II.C.2.d. Cas de la quinoléine 136

La quinoléine **136** est un substrat possédant, comme **154** (schéma 87), une faible solubilité dans le DMF à température ambiante. Par conséquent, l'introduction d'un alcyne sur ce squelette a d'abord été tentée avec chauffage aux micro-ondes, dans des conditions proches de celles décrites par Petricci *et al.* (schéma 91).³¹³

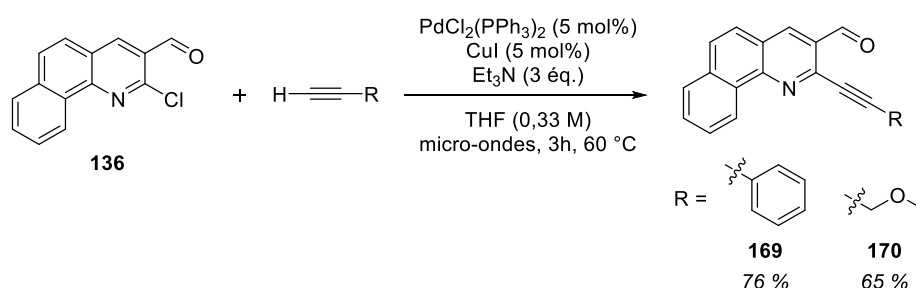


Schéma 91 : Synthèse des aldéhyde-yne 169 et 170.

Les rendements de la réaction conduisant à **169** et **170** sont bons, mais, pour les substituants suivants, nous avons tout de même voulu tester les conditions classiques qui jusqu'à présent se sont révélées être les plus efficaces, tous substrats confondus. Cela a bien fonctionné, le couplage permettant de préparer **171** et **172** avec 82 et 83 % de rendement respectivement (schéma 92).

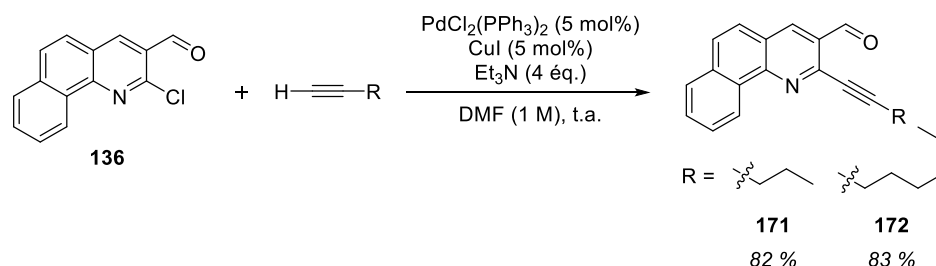


Schéma 92 : Synthèse des aldéhyde-yne 171 et 172.

II.D. Réactions tandem de cyclofonctionnalisation

II.D.1. Cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile oxygéné (série E1)

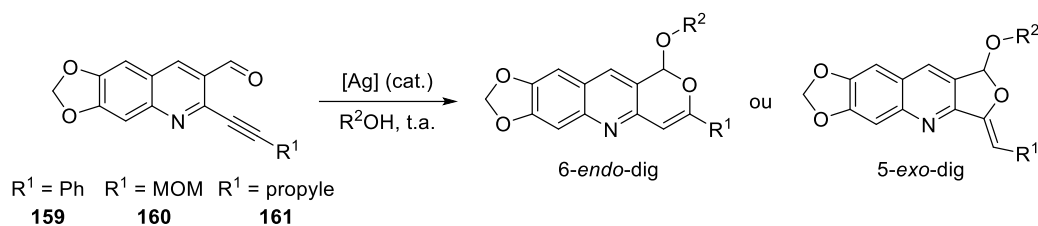
La dernière étape de la synthèse des inhibiteurs de la série E1 est une réaction tandem d'acétalisation/cyclisation développée au sein de notre équipe faisant intervenir un catalyseur à l'argent et un nucléophile oxygéné, classiquement un groupement alcool.^{284,302} Comme nous l'avons déjà vu, avec ce type de réaction tandem, le mode de cyclisation dépend directement de la nature plutôt acide de Lewis ou π -acide du sel d'argent employé.

Le triflate d'argent (AgOTf) a été choisi pour accéder aux pyranoquinoléines et l'oxyde d'argent (I) (Ag₂O), pour les furoquinoléines. Pour ces dernières, nous avons également voulu tester l'imidazolate d'argent [Ag(Im)]_n, un polymère dont les propriétés catalytiques ont été développées par notre groupe.^{303,314} Il est utilisé en combinaison avec la triphénylphosphine (PPh₃) afin de permettre sa dépolymérisation et sa solubilisation et favorise la cyclisation de type 5-*exo*-dig. Toutes ces réactions sont effectuées dans un alcool (le méthanol ou l'alcool benzylique) qui joue à la fois le rôle de solvant et de nucléophile. Les résultats obtenus avec ces différents catalyseurs sont présentés dans le tableau 7.

En série 6-*endo*-dig, la réaction dans le méthanol (solvant et nucléophile) se fait avec d'excellents rendements pour les substrats possédant une chaîne aliphatique (**175** et **176**, 90 et 93 %). En série aromatique en revanche, la préparation de **173** et **174**, dans le méthanol et l'alcool benzylique, respectivement, a nécessité des temps réactionnels plus longs ainsi que des quantités plus importantes de catalyseur (15 et 30 mol% respectivement). Les rendements obtenus sont également moins bons (34 et 22 %), ce qui peut provenir de la faible solubilité de l'alcyne de départ **159**, mais aussi du lot de catalyseur utilisé. Pour **174**, la faiblesse du rendement est également due à des problèmes de purification, celle-ci étant rendue difficile par la présence de l'alcool benzylique résiduel.

En série 5-*exo*-dig, la réaction tandem a posé moins de problèmes, que ce soit en série aromatique (**177** et **178**), avec [Ag(Im)]_n, ou aliphatique (**179** et **180**), avec Ag₂O. Les rendements sont bons à quasi-quantitatifs (58 - 95 %). Pour **178**, la purification est là encore le facteur limitant, la réaction étant effectuée dans l'alcool benzylique, difficile à éliminer.

³¹⁴ E. Parker, Réactions de cycloisomérisation catalysées par des complexes d'argent ou de rhodium pour accéder à des dérivés de Furoquinoléine, Pyranoquinoléine et Dibenzofurane. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Décembre 2010.

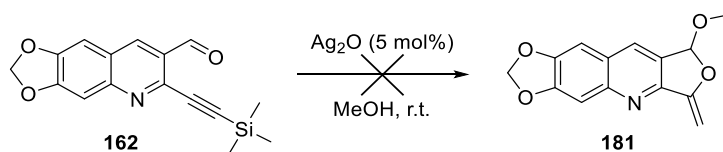


Composé	R1	R2	Catalyseur	Cyclisation	Temps	Rendement
173	Phényle	Me	AgOTf (15 mol%)	6- <i>endo</i> -dig	24 h	34 %
174	Phényle	Bn	AgOTf (30 mol%)		4 jours	22 %
175	MOM	Me	AgOTf (5 mol%)		1 nuit	90 %
176	Propyle	Me	AgOTf (5 mol%)		1 nuit	93 %
177	Phényle	Me	[Ag(Im)] _n /PPh ₃ (5 mol%)	5- <i>exo</i> -dig	1 nuit	95 %
178	Phényle	Bn	[Ag(Im)] _n /PPh ₃ (5 mol%)		1 h	58 %
179	MOM	Me	Ag ₂ O (5 mol%)		1 nuit	78 %
180	Propyle	Me	Ag ₂ O (5 mol%)		1 nuit	93 %

Tableau 7 : Produits obtenus en série E1 à partir des alcynes **159**, **160** et **161**.

Nous avons ensuite voulu préparer les composés **181** et **182**, dont les structures comportent respectivement un cycle furane possédant un motif éthylène et un cycle pyrane non substitué (schéma 93 et schéma 94). Nous avons choisi d'utiliser l'aldéhyde-yne **162** substitué par un groupement TMS sur la triple liaison car nous pensions que le groupement TMS s'éliminerait lors de la réaction de cyclofonctionnalisation.³¹⁵

En présence d'Ag₂O, le produit attendu **181** se forme bien au bout d'une nuit de réaction, mais celui-ci n'a pas pu être isolé pour des raisons de stabilité (schéma 93).

Schéma 93 : Tentative de synthèse du composé **181**.

Avec AgOTf, au bout d'une nuit de réaction, nous ne récupérons que de la matière première (82 %) et un peu d'un sous-produit où il semble y avoir eu une double addition de l'alcool (schéma 94).

L'encombrement du TMS pouvant être un facteur limitant pour la réaction tandem, nous avons préparé l'alcyne terminal **183** par déprotection de **162** à l'aide du fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) (80% de rendement, schéma 94). Dans les conditions classiques, nous obtenons au bout de 6 jours un mélange du produit désiré **182** et d'un sous-produit similaire au précédent, dans des proportions 0,4:0,6 (schéma 94). Lorsque que l'on chauffe au reflux du solvant, la réaction est totale en 5 h et ce ratio passe à 0,2:0,8.

³¹⁵ A. Orsini, A. Vitérissi, A. Bodlenner, J.-M. Weibel, P. Pale, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2259.

Afin de limiter la formation de ce sous-produit, nous avons diminué le nombre d'équivalents de méthanol en effectuant la réaction dans le DCE (schéma 94). Après plusieurs essais, **182** a finalement pu être isolé avec 73 % de rendement en réalisant la réaction à 50 °C et à l'aide d'un ajout séquentiel de catalyseur (2 x 5 mol%) et de nucléophile (2 x 10 éq.).

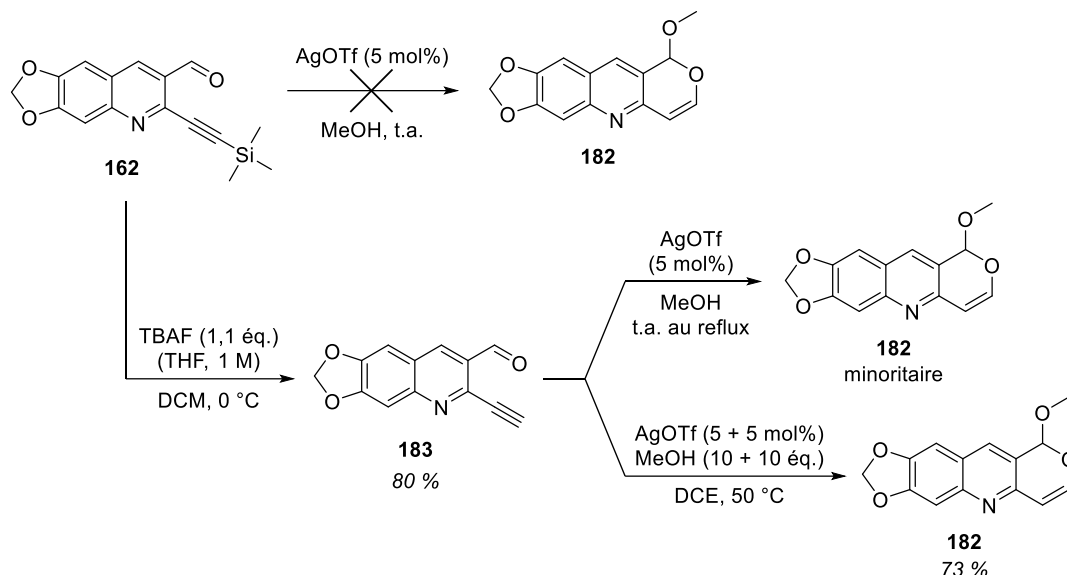


Schéma 94 : Voies d'accès au composé **182**.

Nous avons par la suite envisagé de remplacer l'alcool par un aminoalcool dans la réaction tandem. Cette initiative a été motivée par des travaux réalisés dans le cadre de la thèse d'Evelyn Parker avec le *N,N*-diéthylaminoéthanol.^{303,314} Avec ce nucléophile particulier, la régiosélectivité est en faveur du produit 5-*exo*-dig et ce, quel que soit le sel d'argent utilisé. D'un point de vue « drug design », une chaîne aliphatique portant un groupement amino pourrait réaliser des interactions supplémentaires au niveau du site actif de l'enzyme et conférer une meilleure solubilité en phase aqueuse à cette série d'inhibiteurs.

Le *N,N*-diméthylaminoéthanol a été préféré à son homologue portant des fragments *éthyles* pour ne pas introduire de groupement trop encombrant ni hydrophobe sur la furoquinoléine. Différentes conditions ont été d'abord testées à température ambiante à partir de **160**, mais à chaque fois on n'observe quasiment aucune conversion de la matière première (schéma 95). Une augmentation de la température ne favorise que la formation de sous-produits ou la dégradation de l'alcyne **160**. La réaction fonctionnant avec la quinoléine non substituée **145**, la mauvaise réactivité observée avec **160** semble principalement liée à un problème de solubilité dû au motif dioxolane, malgré la présence du fragment MOM sur l'alcyne.

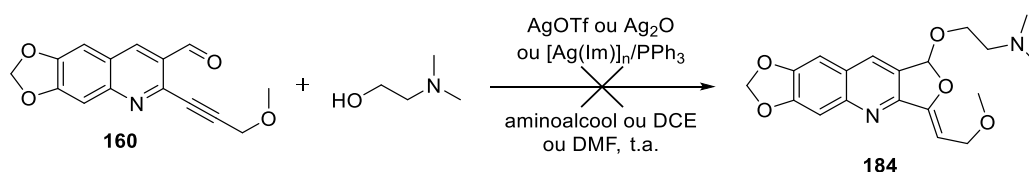


Schéma 95 : Essais d'introduction d'un nucléophile de type aminoalcool sur le substrat **160**.

II.D.2. Cyclofonctionnalisation avec addition d'un nucléophile carboné (série E2)

Pour la mise au point de la réaction de cyclofonctionnalisation avec addition de nucléophiles carbonés, nous nous sommes basés sur des résultats récemment publiés par notre groupe décrivant un accès à des dérivés 1-aryl-1*H*-isochromènes.³⁰¹

L'application de ce protocole à nos pyrano- et furoquinoléines permettrait d'obtenir des composés possédant une structure originale combinant un fragment quinoléine et un autre noyau aromatique reliés par un cycle oxygéné insaturé. En une seule étape, une liaison C-C et une liaison C-O seraient ainsi créées. Cette réaction pourrait toutefois se révéler assez complexe, nos dérivés quinoléiques étant moins solubles et réactifs qu'en série benzénique.

Dans un premier temps, la réaction a été tentée avec le 1,3,5-triméthoxybenzène sur la quinoléine **145** portant une chaîne MOM sur l'alcyne car, comme nous l'avons déjà vu, cela représentait une approche moins triviale que l'emploi d'un alcyne aromatique. Toutefois, malgré plusieurs tentatives dans différents solvants et à différentes températures, seules des traces du produit attendu sont détectées (schéma 96). Ces résultats contrastent fortement avec ceux issus de la synthèse d'isochromènes déjà réalisée au laboratoire.³⁰¹

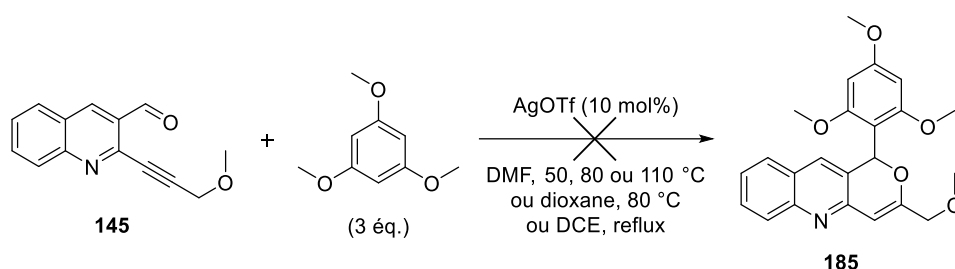


Schéma 96 : Tentatives de cyclofonctionnalisation avec le 1,3,5-triméthoxybenzène.

Le triméthoxybenzène est un noyau aromatique particulièrement riche en électrons, mais sa réactivité en tant que nucléophile peut être limitée par l'encombrement stérique imposé par les trois groupements méthoxy. Nous avons donc testé d'autres nucléophiles aromatiques sur la même quinoléine et dans des conditions similaires, la température étant cependant maintenue à un maximum de 50 °C pour limiter la formation de sous-produits (schéma 97).

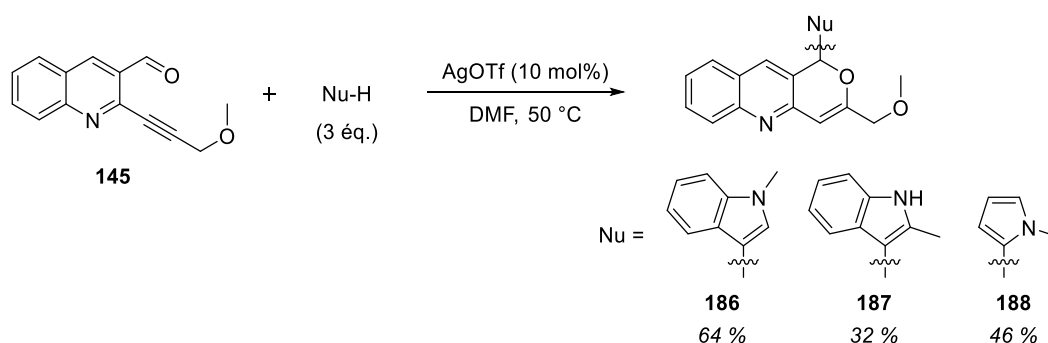


Schéma 97 : Tests de cyclofonctionnalisation avec divers nucléophiles.

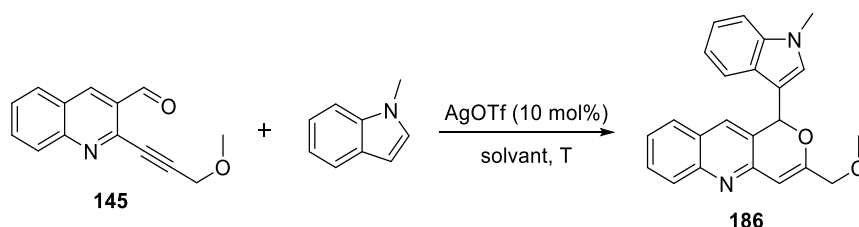
Cette fois, le produit attendu est isolé pour chacun des nucléophiles testés, le *N*-méthylindole donnant les meilleurs résultats, avec un rendement de 64 % pour le produit **186**. Le 2-méthylindole et le *N*-méthylpyrrole conduisent aux composés **187** et **188** avec des rendements plus modestes. La réaction avec le *N*-méthylindole a également été tentée sur l'aldéhyde-yne **147** (avec un groupement *tert*-butyle), mais avec ce substrat, la réaction est beaucoup plus lente et plusieurs sous-produits se forment, rendant la réaction difficile à suivre. L'encombrement du fragment *tert*-butyle semble être à l'origine de cette mauvaise réactivité.

Au vu de ces résultats, il semble que la nature benzénique ou quinoléique du noyau du substrat aldéhyde-yne ait une influence non négligeable sur la réaction tandem et que les conditions opératoires mises au point précédemment pour la synthèse d'isochromènes ne soient pas adaptées à nos composés pyranoquinoléines. Une nouvelle optimisation de la réaction a donc été effectuée pour ce type de substrat.

II.D.2.a. Mise au point de la réaction

Le *N*-méthylindole ayant donné de bons résultats lors des essais préliminaires (tableau 8, entrée 1), nous avons retenu ce nucléophile pour l'étape d'optimisation, sachant qu'à ce jour, relativement peu de travaux ont été publiés concernant la réactivité de ce nucléophile.^{298,299,300}

Lorsque la réaction est réalisée à température ambiante (tableau 8, entrée 2), au bout de 24 h, la réaction n'est toujours pas terminée. A l'inverse, à 80 °C et en milieu légèrement plus dilué (0,2 M, entrée 3), afin de limiter la formation de sous-produits, la réaction ne nécessite que deux heures pour conduire au produit désiré, mais le rendement est sensiblement le même que pour la réaction de référence à 50 °C (68 vs. 64 %).



Entrée	Solvant	T (°C)	Conc. (M)	Nu (équiv.)	Temps (h)	Rdt (%)
1	DMF	50	0,5	3	2	64
2	DMF	t.a.	0,5	3	24	n.d.
3	DMF	80	0,2	3	2	68
4	Dioxane	50	0,1	3	2	73
5	Dioxane	50	0,2	3	1	76
6	Dioxane	50	0,4	3	1	75
7	Dioxane	80	0,2	3	1	80
8	Dioxane	80	0,2	1,5	1	77
9	Dioxane	80	0,2	10	1	86
10	DCE	50	0,2	3	2	75
11	DCE	reflux	0,2	3	1	83

Tableau 8 : Optimisation des conditions expérimentales avec le *N*-méthylindole.

Le remplacement du DMF par le 1,4-dioxane et la dilution du milieu réactionnel (0,1 M, entrée 4) permet d'améliorer légèrement le rendement (73 %) et d'écourter le temps de réaction. Avec ce solvant, la concentration du milieu réactionnel n'a aucune influence sur le rendement (0,1 à 0,4 M, entrées 4 à 6). En revanche, celui-ci a pu être amélioré à la fois par une élévation de la température à 80 °C (80 %, entrée 7) puis une augmentation du nombre d'équivalents de nucléophile à 10 (86 %, entrée 9). Notons toutefois qu'une diminution de ce nombre d'équivalents n'entraîne quasiment aucune baisse de rendement (77 %, entrée 8).

Pour finir, la cyclofonctionnalisation donne des résultats très similaires dans le DCE, que ce soit à 50 ou à 80 °C (75 et 83 % de rendement, entrées 10 et 11). Notre choix pour la généralisation de la méthode s'est donc porté sur ce solvant, qui nous a paru plus intéressant que le dioxane en termes de simplicité de traitement de la réaction (car plus volatile) et de solubilisation de nos substrats.

Lors de la précédente étude du laboratoire portant sur la synthèse d'isochromènes, le *N*-méthylindole avait également été étudié.^{11,301} Avec ce nucléophile, les conditions optimisées pour le triméthoxybenzène conduisaient majoritairement au produit **190** résultant de la double addition de l'indole (schéma 98). Néanmoins, l'utilisation d'un seul équivalent d'indole avait ensuite permis de former l'isochromène voulu **191** avec un très bon rendement (83 %, schéma 98).

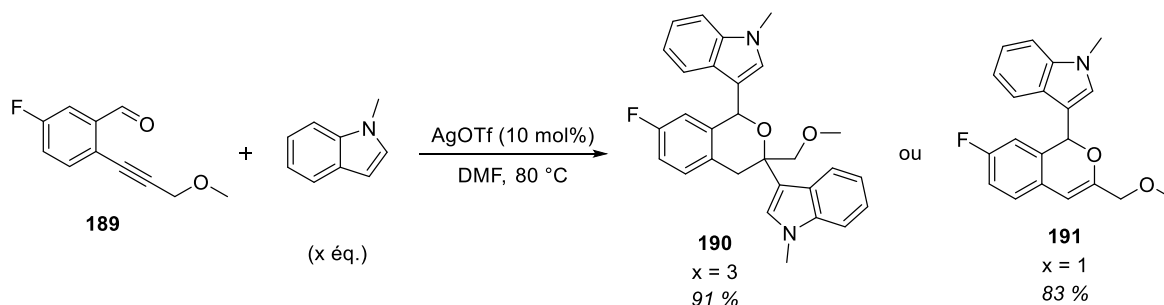


Schéma 98 : Travaux antérieurs sur la cyclofonctionnalisation du substrat 189.

Au cours de notre étape d'optimisation avec le *N*-méthylindole, nous n'avons pas observé la formation d'un produit similaire à **190**, sans doute à cause de la plus faible réactivité de nos pyranoquinoléines par comparaison aux *o*-alkynylbenzaldéhydes.

II.D.2.b. Proposition de mécanisme de cyclofonctionnalisation

La cyclofonctionnalisation avec un nucléophile carboné suit un mécanisme similaire à celui décrit pour les nucléophiles oxygénés (paragraphe II.B). Avec un sel d'argent connu comme étant un π -acide tel que AgOTf,^{284,316,317,318} le catalyseur active en priorité la triple liaison, ce qui aboutit à une cyclisation de type 6-*endo*-dig et à la formation de l'intermédiaire pyranoquinolinium **6B** (schéma 99).³⁰⁵ Cet intermédiaire très réactif est tout de suite piégé par

³¹⁶ G. S. Lewandos, D. K. Gregston, F. R. Nelson, *J. Organomet. Chem.* **1976**, 118, 363-74.

³¹⁷ N. Asao, S. Yudha S., T. Nogami, Y. Yamamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5526-8.

³¹⁸ J. U. Rhee, M. J. Krische, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2493-5.

le nucléophile pour conduire au complexe d'argent **6C** qui subit alors une protodémétallation pour conduire au produit désiré **6D** et également régénérer le catalyseur.

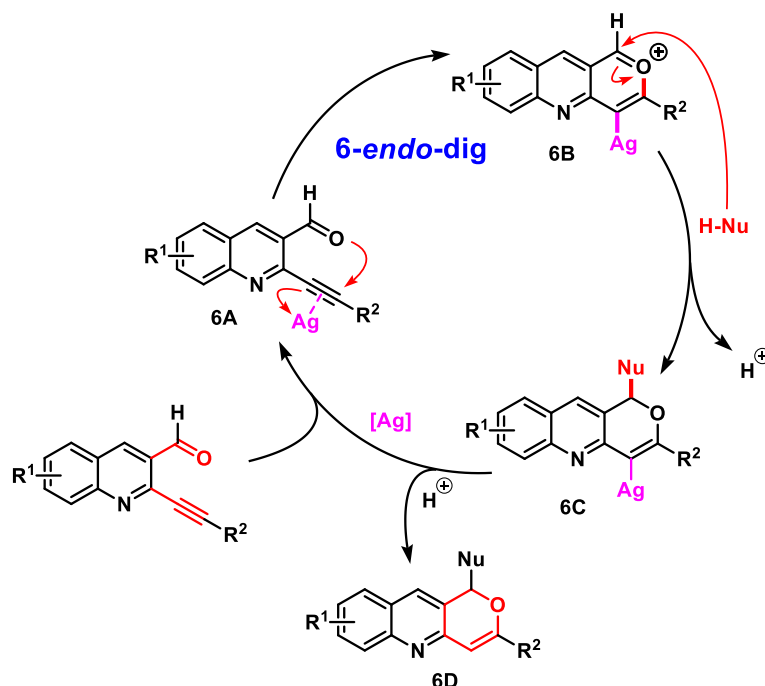


Schéma 99 : Proposition de mécanisme pour la cyclisation de type 6-endo-dig.³⁰⁵

Lorsque l'espèce nucléophile utilisée n'est pas assez réactive, comme dans le cas du triméthoxybenzène, les traces d'eau présentes dans le milieu réactionnel peuvent jouer le rôle de nucléophile, ce qui mène à l'hémiacétal cyclique **193** (schéma 100). Celui-ci peut alors s'ouvrir, ce qui donne l'aldéhyde **194**, ou dimériser, produisant ainsi l'espèce **195** (schéma 100).

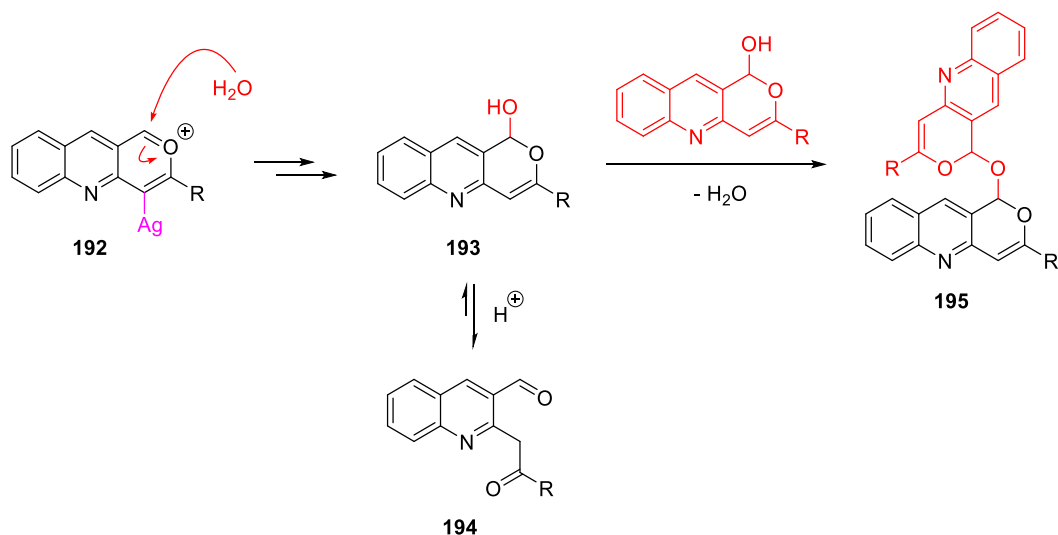


Schéma 100 : Mécanisme de formation des sous-produits **193** à **195**.

Nota bene : Afin d'améliorer la réaction avec le substrat aldéhyde-yne possédant un fragment tert-butyle **147**, nous avons cherché à éliminer les traces d'eau pouvant être à l'origine de la

formation des sous-produits observés avec ce substrat. Malheureusement, l'introduction de tamis moléculaire 4Å ou de sulfate de sodium anhydre dans le milieu réactionnel n'a pas eu d'influence notable sur la réactivité.

II.D.2.c. Généralisation de la méthode

Modification de l'alcyne et de la quinoléine

Les conditions expérimentales retenues à l'issue de la phase d'optimisation ont été appliquées à la synthèse de nombreuses pyranoquinoléines à partir de matières premières portant des substituants électrodonneurs ou électroattracteurs sur le noyau quinoléine et avec à chaque fois un alcyne de nature aromatique et divers autres en série aliphatique (linéaire, ramifié, cyclique ou comportant un hétéroatome).²⁰⁰

La plupart de ces substrats se prêtent particulièrement bien à ces conditions optimisées, les rendements étant bons à quantitatifs (**186**, **196** à **200** et **203** à **214**, schéma 101). La présence d'un substituant électroattracteur sur la quinoléine ($R^1 = \text{Cl}$) donne d'excellents rendements (**203** à **206**, 93 % à quantitatif), tandis qu'un substituant mésomère donneur ($R^1 = \text{OMe}$) rend la réaction bien moins efficace (**207** à **210**, 67 à 79 % de rendement). Par contre, il semblerait que la nature aliphatique ou aromatique de l'alcyne n'ait pas d'effet notable sur la réaction. Nos conditions ont même permis d'obtenir les dérivés comportant un noyau aromatique annelé à la quinoléine, avec des rendements très satisfaisants (**211** à **214**, 74 à 94 %).

Notre méthode s'est tout de même heurtée à certaines limites, comme en témoigne l'absence de produit isolé pour les structures comportant une pyridine (**201**) ou *N*-méthylbenzylamine (**202**). Pour ces dernières, la cyclofonctionnalisation n'a fourni qu'un mélange de matière première et de nombreux produits après plus de 24 h de réaction. Enfin, les quinoléines fluorées **163** et **164** ont conduit majoritairement aux composés attendus **215** et **216**, mais en présence de plusieurs sous-produits difficiles à éliminer, ce qui a rendu la réaction difficile à suivre et explique la faiblesse des rendements obtenus (25 et 37 %).

Modification du nucléophile

Nous avons ensuite modifié l'espèce nucléophile introduite afin d'évaluer la robustesse de notre méthode.²⁰⁰ Les nucléophiles testés sont des noyaux aromatiques oxygénés ou azotés dont la réactivité peut être estimée à l'aide d'une échelle de pouvoir nucléophile comme celle issue des travaux de Mayr (figure 69).³¹⁹ Sur cette échelle, la réactivité d'un couple électrophile/nucléophile est représentée par la constante k , qui s'exprime en fonction du paramètre E , spécifique à l'électrophile, et de deux paramètres N et s_N , caractérisant le nucléophile. D'après ce classement, par exemple, le *N*-méthylindole et le *N*-méthylpyrrole ont une réactivité similaire, mais inférieure à celle du 1,2,5-triméthylpyrrole.

³¹⁹ H. Mayr, *Tetrahedron* **2015**, 71, 5095-111.

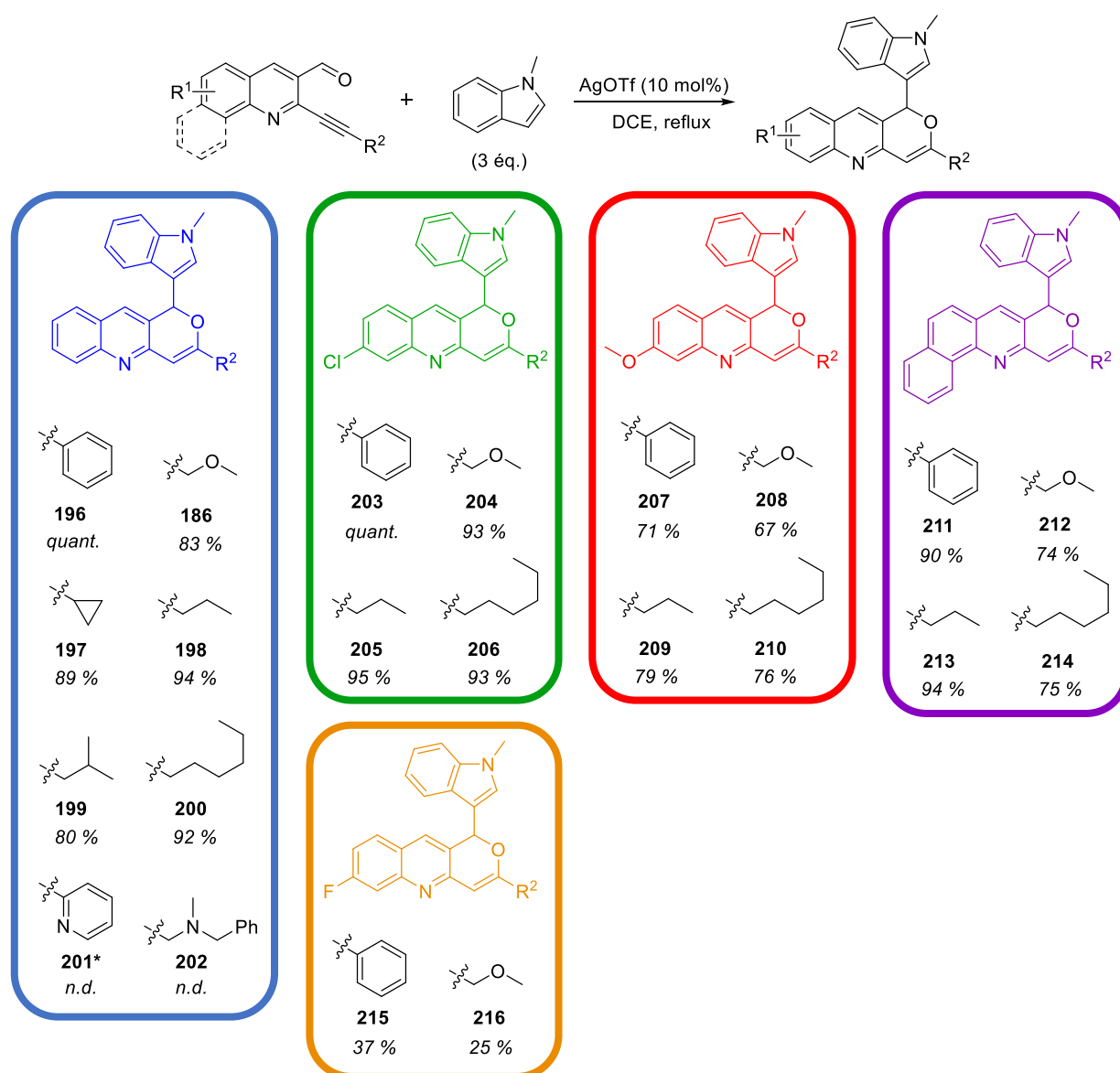


Schéma 101 : Pyranoquinolines synthétisées avec le *N*-méthylindole comme nucléophile (*réaction effectuée dans le DMF).

Divers nucléophiles ont ainsi été testés sur les trois quinoléines **144**, **145** et **169** (schéma 102) et, dans l'ensemble, ils donnent de moins bons résultats que le *N*-méthylindole. Dans certains cas, la réaction a été faite dans le DMF car le brut réactionnel s'est avéré plus propre que celui obtenu dans le DCE.

En se basant sur l'échelle de Mayr, on pouvait s'attendre à de meilleurs rendements pour le *N*-méthylpyrrole (**188** et **217**, 55 et 43 %), un hétérocycle peu encombré par rapport au *N*-méthylindole et au pouvoir nucléophile similaire. Cela s'explique en partie par la formation de divers sous-produits, comme le produit de cyclisation 5-*exo*-dig, observé pour **188**. Le pyrrole non substitué, dont la réactivité est plus d'un ordre de grandeur inférieure à celle du *N*-méthylindole, donne un résultat relativement modeste mais en accord avec l'échelle de Mayr (**218**, 48 %). En revanche, le 1,2,5-triméthylpyrrole, classé deux ordres de grandeurs de réactivité au-dessus du *N*-méthylindole, donne des résultats légèrement moins bons qu'avec ce dernier (**219** et **220**, 90 et 66 %).

$$\log k_{20^{\circ}\text{C}} = s_{\text{N}}(N + E)$$

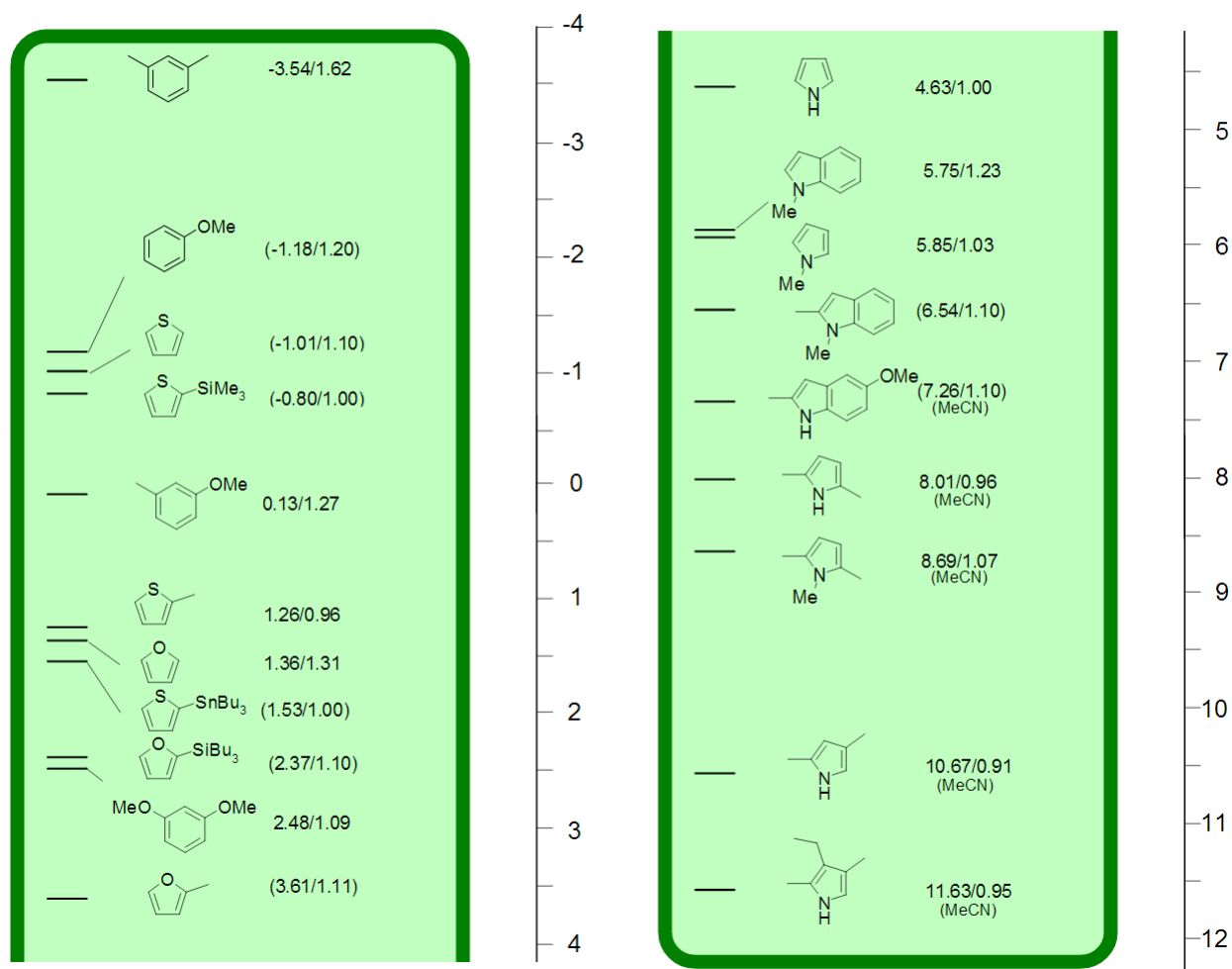


Figure 69 : Classement des nucléophiles carbonés aromatiques (valeurs données dans le DCM à 20 °C sauf indication contraire, d'après Mayr *et al.*³¹⁹).

Les résultats avec les autres dérivés de l'indole sont plus facilement rationalisables. En effet, par rapport au *N*-méthylindole, l'indole nu, un peu moins riche en électrons, donne des rendements un peu plus faibles (**221** et **222**, 89 et 63 %), et la réaction avec le 2-méthylindole, plus encombré, est encore moins efficace (**223** et **187**, 62 et 36 %).

Il a également été possible d'accéder aux dérivés **224** et **225** comportant un motif triméthoxybenzène, avec des rendements modestes toutefois (36 et 54 %). L'encombrement stérique semble être le facteur limitant de ce nucléophile. Pour finir, en utilisant le 2-benzofurane comme nucléophile, le composé **226** a été préparé avec 23 % de rendement. Cela est cohérent avec l'encombrement stérique et le faible pouvoir nucléophile caractérisant le 2-benzofurane.

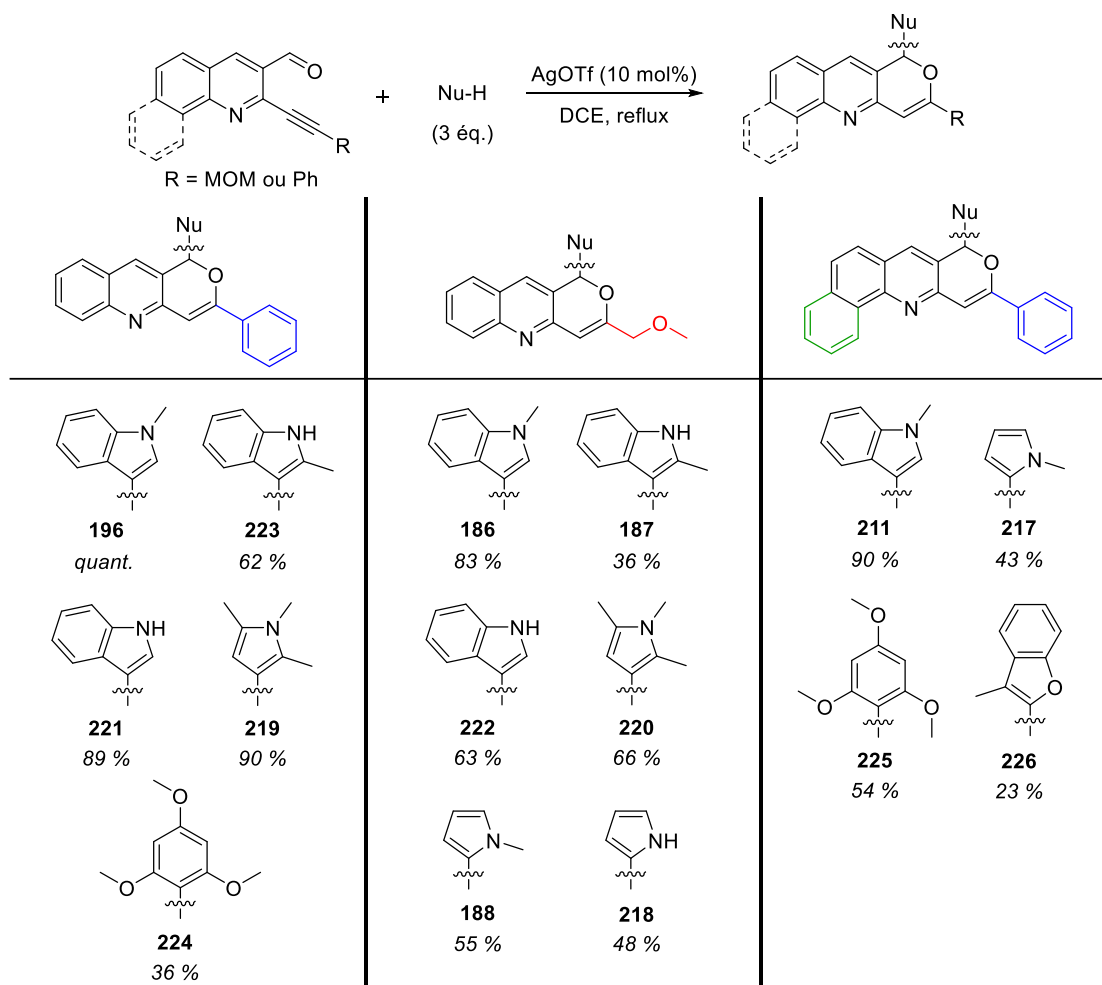


Schéma 102 : Pyranoquinoléines obtenues avec divers nucléophiles aromatiques (**187**, **217** et **224** à **226** : réaction réalisée dans le DMF, **188** : produit 5-*exo*-dig observé).

III. Synthèse du motif pyrano-pyrido-pyrimidinedione (série E3)

Pour cette dernière série d'inhibiteurs, notre approche rétrosynthétique est représentée sur le schéma 103. Comme pour les séries E1 et E2, le cycle dihydropyrane du squelette **227** serait construit lors de l'étape finale de cyclofonctionnalisation à partir d'un substrat aldéhyde-yne tel que **228**, avec addition du nucléophile souhaité (oxygéné ou carboné).

L'aldéhyde-yne **228** se préparerait comme précédemment *via* un couplage de Sonogashira à partir d'une pyridopyrimidinedione telle que **229**. L'accès à cette dernière molécule a été envisagé selon trois approches, la première (voie en orange) consistant à nouveau en une synthèse de type Meth-Cohn, où l'acétanilide utilisé classiquement serait ici remplacé par le 6-acétamidouracile **230**. Les deux autres approches (voie en bleu) nécessiteraient plus d'étapes car elles sont basées sur l'obtention de l'intermédiaire **231**, un précurseur de **229**. Cet intermédiaire serait préparé à partir de plusieurs dérivés de l'uracile (**232**) selon la stratégie employée. Ces deux méthodes s'appuient sur plusieurs protocoles décrits dans la littérature tandis que la première n'a, à notre connaissance, jamais été tentée.

Les dérivés de type pyridopyrimidinedione non protégés ($R^1 = H$, schéma 103) étant peu solubles dans les solvants organiques, et afin de s'émanciper d'une nouvelle mise au point du couplage de Sonogashira et de la réaction tandem, nous avons jugé préférable de réaliser au préalable la synthèse des analogues protégés par des groupements adéquats. A cette fin, le motif MOM nous a semblé être un choix judicieux car il apporterait un gain significatif en termes de solubilité et que sa chimie est bien maîtrisée au laboratoire. Les groupes protecteurs seraient enlevés ultérieurement afin d'accéder aux composés **227** ($R^1 = H$) ciblés initialement. La déprotection pourrait être effectuée à l'aide de conditions acides fortes ou d'un acide de Lewis.³²⁰

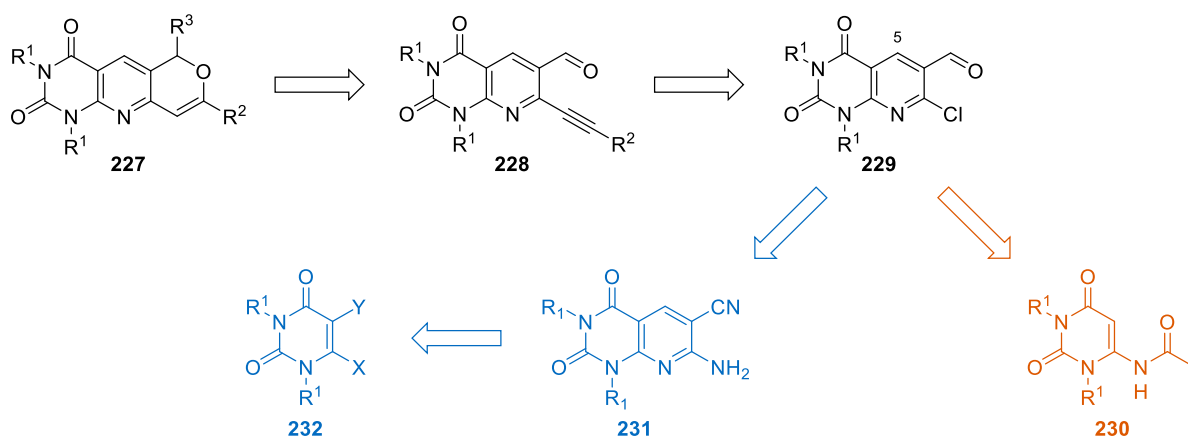


Schéma 103 : Rétrosynthèse envisagée pour l'accès au squelette de la série E3.

³²⁰ P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Edition*, Hoboken, New Jersey, USA, John Wiley & Sons, **2006**, 1082 p.

III.A. Accès au squelette pyridopyrimidine

III.A.1. Via une réaction de Meth-Cohn

Outre la préparation de quinoléines, la synthèse de Meth-Cohn est également compatible avec la préparation d'autres hétérocycles tels que des pyridines, des thiénopyridines ou encore des quinoxalines.³²¹ Forts de ce constat, nous avons envisagé de l'appliquer à nos pyridopyrimidines, bien que cela n'ait jamais été décrit auparavant. Concernant l'introduction des groupements protecteurs de la pyrimidinedione, deux possibilités s'offrent à nous (schéma 104) :

- soit on tente la réaction sur le dérivé non protégé **233**, ce qui conduit à la pyridopyrimidine trichlorée **234**, celle-ci pouvant être convertie en **235** par action d'une solution d'HCl, puis une étape de protection pour aboutir à **236**.
- soit on engage l'acétamidouracile **237** déjà protégé dans la cyclisation de Meth-Cohn, sachant que les groupes protecteurs peuvent être clivés par les conditions très acides de cette réaction, afin d'obtenir directement **236**.

Nous avons testé les deux méthodes.

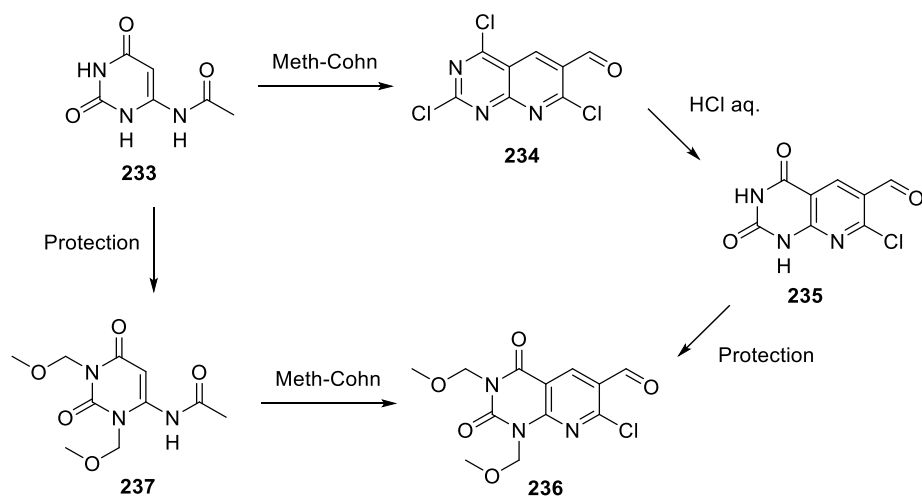
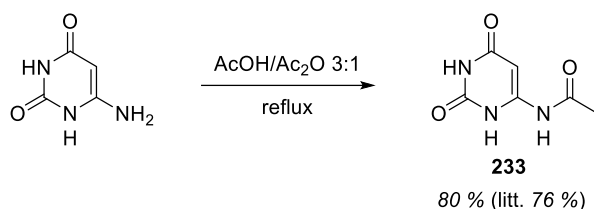


Schéma 104 : Voies de synthèse permettant d'accéder à l'intermédiaire 236.

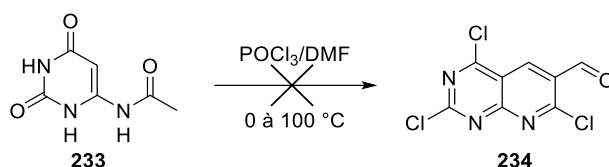
Le 6-acétamidouracile n'étant pas commercial, nous l'avons préparé selon le protocole décrit par Shim *et al.*³²² En chauffant le 6-aminouracile avec un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique, le composé acétylé **233** est ainsi isolé avec 80 % de rendement (schéma 105). Notons toutefois qu'une modification du traitement de la réaction a été nécessaire pour parvenir à un rendement équivalent à celui de Shim *et al.* (76 %).

³²¹ O. Meth-Cohn, *Heterocycles* **1993**, *35*, 539-57.

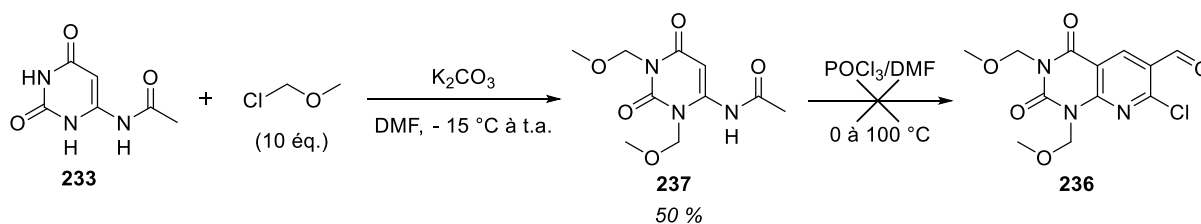
³²² J. L. Shim, R. Niess, A. D. Broom, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 578-81.

Schéma 105 : Préparation du composé **233**.

Le dérivé **233** a ensuite été engagé dans la réaction de Meth-Cohn (schéma 106). L'analyse du solide récupéré après filtration suggère qu'il est majoritairement composé de sels inorganiques, avec seulement des traces du composé attendu **234**. L'extraction du brut réactionnel n'a pas permis de l'isoler d'avantage.

Schéma 106 : Tentative de réaction de type Meth-Cohn à partir de **233**.

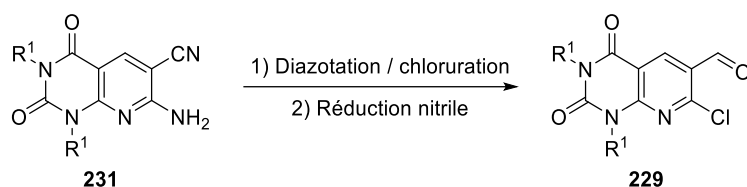
La seconde approche, où l'on introduit d'abord les groupements protecteurs, a alors été tentée. La pyrimidine **233** a ainsi été protégée par des groupements méthoxyméthyles selon un protocole décrit par Su *et al.*³²³ Pour notre substrat, un rendement satisfaisant de 50 % (schéma 107) n'a pu être atteint qu'avec l'emploi de 10 équivalents de chlorure de méthoxyméthyle (par rapport à 3 dans le protocole standard). Malheureusement, l'utilisation de ce nouveau substrat dans la réaction de Meth-Cohn n'a conduit qu'à un mélange de composés qui n'ont pas pu être identifiés, mais qui visiblement ne portent plus les groupements protecteurs.

Schéma 107 : Tentative de réaction de type Meth-Cohn à partir du dérivé protégé **237**.

La réactivité particulière de la pyrimidinedione fait qu'elle n'est pas adaptée à la synthèse de Meth-Cohn, nous nous sommes donc tournés vers d'autres stratégies de synthèses.

Parmi les protocoles de la bibliographie permettant d'accéder au squelette pyrido-pyrimidinedione, deux d'entre eux ont retenu notre attention. Ces derniers aboutissent au composé **231** à partir duquel il est relativement aisé d'obtenir la structure **229** par réaction de diazotation / chloruration puis réduction de nitrile en aldéhyde (schéma 108).

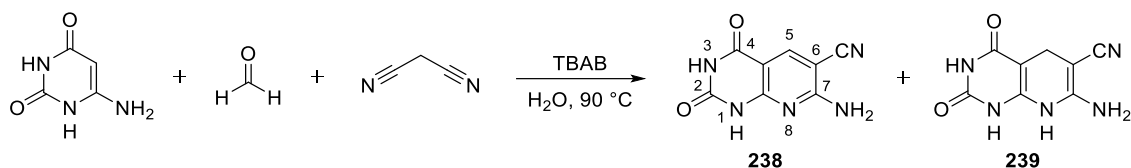
³²³ T.-L. Su, J.-T. Huang, J. H. Burchenal, K. A. Watanabe, J. J. Fox, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 709-15.

Schéma 108 : Voie d'accès à **229** à partir de **231**.

III.A.2. Via une réaction multicomposants

La première méthode est une réaction multicomposants effectuée en milieu aqueux et catalysée par un agent de transfert de phase développée par Shi *et al.*³²⁴ Elle met en jeu un aldéhyde, le malonitrile et le 6-aminouracile (sous forme NH ou N-méthyle), et permet de synthétiser de nombreuses pyridopyrimidinediones substituées en position 5 par un groupement aromatique ou aliphatique apporté par l'aldéhyde.

Bien que l'hétérocycle que nous souhaitons préparer ne comporte pas de substituant sur cette position, nous avons tout de même tenté la réaction à partir du 6-aminouracile (schéma 109). Comme nous ne disposions pas du chlorure de triéthylbenzylammonium (TEBAC) utilisé par Shi *et al.*,³²⁴ nous nous sommes reportés sur le bromure de tétrabutylammonium (TBAB), un autre agent de transfert de phase.

Schéma 109 : Synthèse de **238** par réaction multicomposants.

L'analyse du spectre RMN ¹H du brut réactionnel montre qu'on forme bien le produit **238**, mais accompagné d'un intermédiaire de synthèse en proportions variables (sans doute le composé dihydrogéné non aromatisé **239**). Cependant, même au bout de 48 h de réaction, cet intermédiaire est toujours présent. Plusieurs tentatives d'oxydation de **239** en **238** n'ayant rien donné, nous avons abandonné cette approche.

III.A.3. Via une réaction de « réarrangement/cyclisation »

La méthode de Shi *et al.*³²⁴ ne semblant pas adaptée à notre substrat, nous avons préféré l'abandonner au profit d'une autre réaction mise au point par Su *et al.*³²³ Ce troisième protocole nous a paru prometteur car il a été décrit entre autres avec la structure que nous recherchions, non substituée sur la position 5 de l'hétérocycle **229** (schéma 103). Il est issu des travaux antérieurs de cette équipe sur les réarrangements de pyrimidinediones *via* un mécanisme de type ANRORC (« Addition of the Nucleophile, Ring Opening, and Ring Closure », schéma 110).^{325,326}

³²⁴ D. Shi, L. Niu, J. Shi, X. Wang, S. Ji, *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 1083-90.

³²⁵ T.-L. Su, K. A. Watanabe, *J. Heterocyclic Chem.* **1982**, *19*, 1261-2.

³²⁶ T.-L. Su, K. A. Watanabe, *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, *21*, 1543-7.

Su *et al.*^{325,326} ont en effet observé qu'en milieu basique, lors de l'attaque par un nucléophile faible tel qu'une cétone énolisable sur la position 6 d'un 5-cyanouracile, il s'ensuit la formation d'un adduit de Michael puis d'un intermédiaire ouvert (schéma 110). A partir de là, la cyclisation attendue avec départ d'une urée conduisant à **240** n'a pas eu lieu (mécanisme en rouge). Au lieu de cela, la chaîne portant l'urée recyclise sur la fonction nitrile puis l'amine formée se condense intramoléculairement sur la fonction cétone, formant l'unité pyridine du produit **241** (mécanisme en bleu).

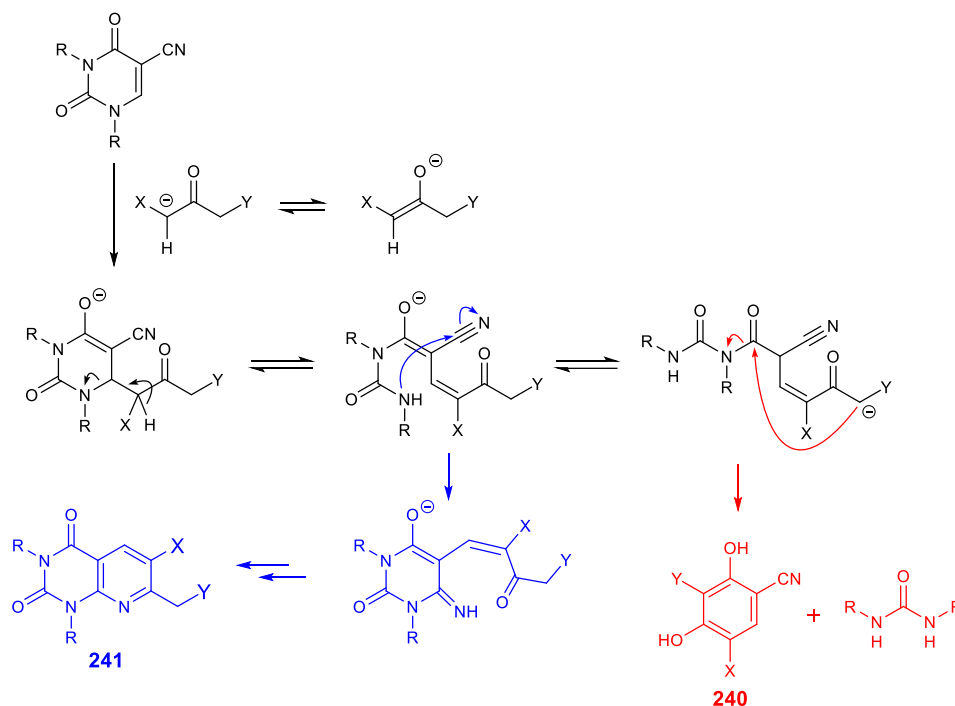


Schéma 110 : Mécanisme de type ANRORC permettant d'obtenir **240** ou **241**.^{325,326}

Ces résultats ont conduit Su *et al.* à proposer une réaction où la cétone est remplacée par un bien meilleur nucléophile, le malonitrile. Ils l'ont par la suite appliquée à la synthèse d'analogues de l'aminoptérine et de l'acide folique.³²³ La réaction en question met en jeu le 5-cyano-1,3-bis-(méthoxyméthyl)uracile **242** et le malonitrile en présence d'une base, l'éthanolate de sodium, dans l'éthanol à température ambiante (schéma 111). Les auteurs proposent ainsi une synthèse du dérivé **243** en quatre étapes à partir de l'uracile et avec 30 % de rendement (schéma 111).

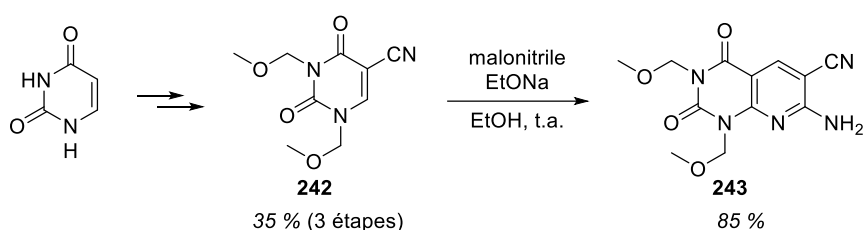


Schéma 111 : Synthèse de **243** décrite par Su *et al.*³²³

Le 5-cyanouracile est un composé commercial mais la méthode décrite par Su *et al.*³²³ permet de le synthétiser simplement par bromuration puis substitution de l'atome de brome par un

groupement cyano (70 % de rendement sur les deux étapes). Comme nous disposions à la fois du dérivé 5-cyano et de l'uracile nu, nous avons pu travailler à partir des deux substrats.

L'introduction des fragments MOM sur l'uracile avec le protocole standard employé au laboratoire fournit **244** avec 80 % de rendement (schéma 112). L'introduction de l'atome de brome a ensuite été tentée avec le dibrome (réactif utilisé par Su *et al.*,³²³ 71 % de rendement) et le NBS,³²⁷ afin de préparer le composé bromé **245**, celui-ci étant isolé avec 87 et 58 % de rendement respectivement. Enfin, nous avons accédé à **242** par action du cyanure de sodium et chauffage dans le DMF (93 % contre 97 % pour Su *et al.*).³²³ En parallèle, la protection du 5-cynouracile commercial a également fourni **242** avec 80 % de rendement.

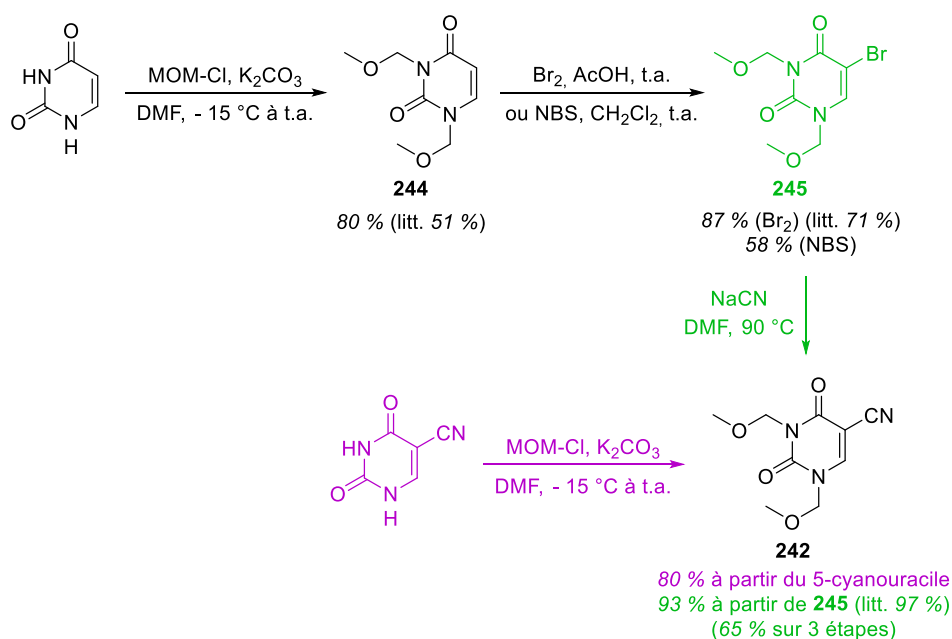


Schéma 112 : Voies d'accès au cyanouracile protégé **242**.

En suivant le protocole décrit par les auteurs, nous sommes finalement parvenus à synthétiser **243** avec 85 % de rendement (idem Su *et al.*)³²³ puis l'analogue chloré **246** par une réaction de diazotation mettant en jeu du nitrite de sodium et de l'acide chlorhydrique 12 M également réalisée par les auteurs dans le cadre de leur synthèse de composés bioactifs (schéma 113).³²³ Notre rendement est alors plus modeste que celui obtenu par Su *et al.*³²³ (54 % contre 71 %). Cela s'explique par le fait que nous n'avons pas réussi à obtenir 100 % de conversion pour cette chloruration, une fraction de la matière première étant récupérée lors de l'étape de purification (environ 25 %). Nous n'avons pas cherché à optimiser outre mesure cette étape.

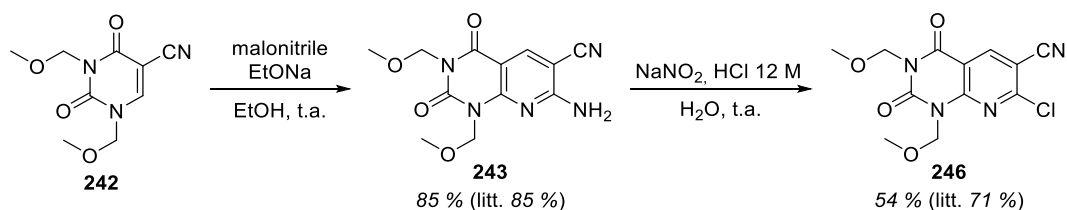


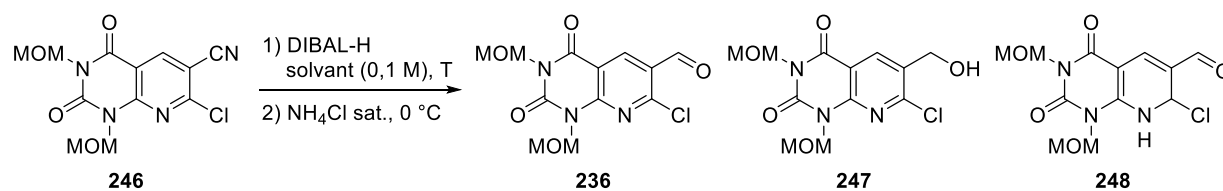
Schéma 113 : Préparation de l'intermédiaire **246**.

³²⁷ M. J. Gonzalez-Moa, P. Besada, M. Teijeira, C. Teran, E. Uriarte, *Synthesis* **2004**, 4, 543-8.

La dernière étape pour accéder au substrat du couplage de Sonogashira est la transformation du nitrile de **246** en un aldéhyde. Il s'agit classiquement de réduire partiellement la triple liaison C-N en une imine puis d'hydrolyser celle-ci en l'aldéhyde correspondant. Les deux méthodes les plus courantes sont l'utilisation d'un hydrure d'aluminium et la réaction de Stephen.^{328,329} Cette dernière faisant intervenir un sel d'étain en conditions acides, elle nous a semblé peu compatible avec la présence de nos groupements protecteurs MOM.³³⁰

Bien que de nombreux autres complexes d'aluminium aient été développés, l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) reste un réactif de référence largement usité pour la réduction de nitriles en aldéhydes. Des efforts ont toutefois été fournis afin de mettre au point des réactifs pouvant être utilisés à température ambiante et donnant de meilleurs rendements, tels que des analogues *iso*-propoxy du DIBAL-H.³³¹

Nous avons entrepris la réduction de **246** par le DIBAL-H et avons testé plusieurs conditions opératoires (tableau 9). Un premier essai a été réalisé dans le THF à -78 °C avec ajout progressif de deux équivalents de DIBAL-H (entrée 1). Nous n'avons pas réussi à consommer intégralement la matière première **246**, même au bout de 48 h et en augmentant progressivement la température jusqu'au reflux du solvant. Un mélange de divers produits accompagnant **246** est obtenu. Une nouvelle tentative conduit à un mélange similaire dont une petite quantité du produit doublement réduit **247** a pu être isolée (entrée 2).



Entrée	DIBAL-H	Solvant	T	Temps	Conv.	Produit	Rdt
1	1 + 1 éq.*	THF	-78 °C au reflux	48 h	< 100 %	-	-
2	1,3 éq.	THF	-78 °C au reflux	6 jours	< 100 %	247	-
3	2 + 1,5 éq.*	DCM	-78 °C	1 h 30	100 %	248	49 %
4	3 éq.	DCM	-78 °C	1 h	100 %	248	62 %**

Tableau 9 : Optimisation de la réduction du nitrile à l'aide du DIBAL-H
(*ajout séquentiel, **rendement brut estimé aux alentours de 80 %).

Face à ces résultats décevants, nous avons remplacé le THF par le DCM. Un produit majoritaire se forme sans que l'on ait besoin de réchauffer le milieu réactionnel au-dessus de -78 °C (entrée 3). L'introduction séquentielle de 2 puis 1,5 équivalents de DIBAL-H consomme la totalité du substrat de départ mais le produit isolé s'avère être **248**, où la pyridine a également été réduite par le DIBAL-H. Le produit attendu (**236**) n'a pas pu être isolé dans ces conditions, même en diminuant la quantité de DIBAL-H ou en diluant le milieu réactionnel. En revanche,

³²⁸ J. Malek, *Org. React.* **1988**, 36, 249.

³²⁹ J. S. Cha, *Org. Prep. Proced. Int.* **1989**, 21, 451.

³³⁰ H. Stephen, *J. Chem. Soc., Trans.* **1925**, 127, 1874-7.

³³¹ Y. M. Choi, M. Yoo, D. K. An, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, 31, 473-4.

ajouter directement 3 équivalents de DIBAL-H permet d'écourter au maximum le temps réactionnel et d'accéder à **248** avec 62 % de rendement (entrée 4), ce qui est comparable avec les résultats usuellement trouvés dans la littérature pour ce type de réduction.^{332,333}

L'obtention du dérivé **248** au lieu du produit attendu **236** ne nous a pas paru trop problématique, sachant que les dihydropyridines s'aromatisent relativement bien en présence de nombreux oxydants. Parmi ces derniers, le dioxyde de manganèse (MnO₂), éventuellement assisté d'une sonication³³⁴ ou d'un chauffage aux micro-ondes³³⁵ du milieu réactionnel, et la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ)³³⁵ se montrent particulièrement efficaces.

Nous avons testé l'oxydation avec la DDQ, mais nous n'avons pas observé la formation du produit attendu **236**. En outre, la séparation des composants du brut réactionnel par colonne chromatographique s'est révélée délicate du fait de la présence de la benzoquinone.

Avec MnO₂, notre substrat dihydrogéné est converti avec succès en **236**, la réaction nécessitant toutefois d'être chauffée au reflux du chloroforme (T_{éb} = 62 °C) pendant deux heures et en présence d'un large excès d'oxydant (20 équivalents) (schéma 114). Le rendement obtenu à partir de la dihydropyridine purifiée est alors de 54 %, soit seulement 33 % sur deux étapes à partir de **246**. Nous avons pu cependant améliorer l'efficacité de notre synthèse en aromatisant directement le brut réactionnel de l'étape précédente, sans isolement de **248**, ce qui mène à un rendement de 50 % sur deux étapes (schéma 114).

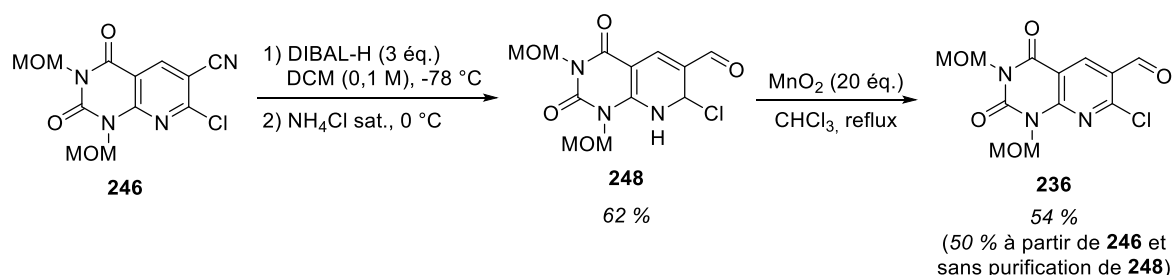


Schéma 114 : Préparation de l'aldéhyde **236**.

III.B. Obtention de la structure finale

Par manque de temps, seule la synthèse d'un composé de la série E3 a pu être menée jusqu'au bout. Il s'agit de l'analogue **250**, substitué par un groupement phényle et un méthoxy sur le cycle dihydropyrane. Les deux dernières étapes de couplage avec un fragment alcyne et de cyclofonctionnalisation, déjà mises au point au laboratoire, n'ont pas posé de sérieuse difficulté.

Le couplage de Sonogashira a d'abord été tenté dans les conditions de Toyota *et al.*,³⁰⁹ mais celles-ci se sont montrées trop drastiques pour ce nouveau substrat. En effet, au bout d'une nuit

³³² G. Borzsonyi, A. Alsbaiee, R. L. Beingessner, H. Fenniri, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7233-9.

³³³ A. P. Van Sickle, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 895-901.

³³⁴ M. C. Bagley, M. C. Lubinu, *Synthesis* **2006**, *8*, 1283-8.

³³⁵ J. J. Vanden Eynde, F. Delfosse, A. Mayence, Y. Van Haverbeke, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6511-6.

de réaction, de nombreux sous-produits sont formés et l'alcyne souhaité **249** n'est isolé qu'avec 29 % de rendement (méthode A, schéma 115). Les résultats sont en revanche bien plus satisfaisants avec des conditions de couplage plus douces, qui conduisent à **249** avec cette fois 68 % de rendement (méthode B, schéma 115).

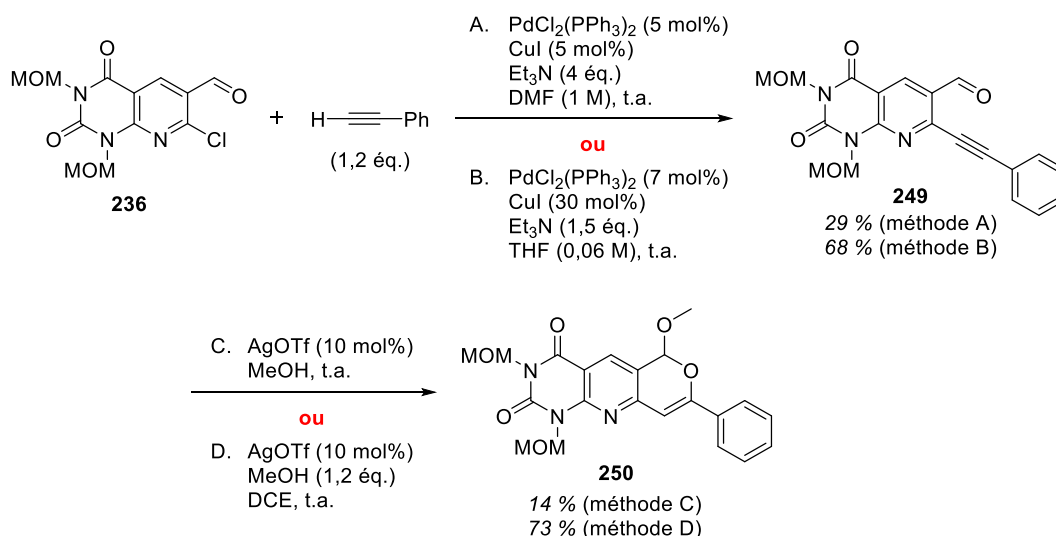


Schéma 115 : Couplage de Sonogashira et réaction tandem permettant d'accéder à **250.**

Pour finir, l'acétalisation/cyclisation de **249** a été tentée à l'aide du triflate d'argent dans le méthanol (le nucléophile) et dans le DCE avec 1,2 équivalents de méthanol (schéma 115). La première tentative n'a conduit qu'à une conversion partielle de la matière première et à la formation de plusieurs produits accompagnant **250** (isolé avec un faible rendement de 14 %). Augmenter la température ou la charge catalytique n'a pas permis d'améliorer la réactivité.

La seconde tentative, dans le DCE avec 1,2 équivalents de MeOH, a été nettement plus efficace. En effet, **250** est alors isolé avec 73 % de rendement (schéma 115).

IV. Conclusion

Série E1

- ✓ Grâce à une méthodologie de synthèse maîtrisée au laboratoire, 9 nouveaux composés (**173** à **180** et **182**) ont été préparés en **série E1** en quatre ou cinq étapes à partir d'anilines commerciales. Ces furoquinoléines et pyranoquinoléines portent des groupements variés (alkyles et aryles) sur leur cycle oxygéné, où plusieurs nucléophiles de type alcool ont également été introduits.
- ✗ L'utilisation d'un aminoalcool comme nucléophile en **série E1** a été également tentée mais sans succès, sans doute à cause de la faible solubilité du substrat de départ.

Série E2

- ✓ La mise au point d'une nouvelle réaction tandem de cyclofonctionnalisation sur des substrats de type aldéhyde-yne a conduit à la synthèse de 32 structures originales en série pyranoquinoléine (**série E2**, **186** à **188**, **196** à **200** et **203** à **226**). Cette réaction est compatible avec de nombreux substituants sur le cycle benzénique ou le groupement alcyne, ainsi qu'avec divers nucléophiles aromatiques (indoles, pyrroles, triméthoxybenzène et benzofurane).

Série E3

- ✓ Après plusieurs tentatives infructueuses *via* une réaction de Meth-Cohn ou une réaction multicomposants, l'hétérocycle **243** a finalement été préparé grâce à une réaction mettant en jeu le dérivé pyrimidique **242** et impliquant un mécanisme de type ANRORC. Bien que la réduction du nitrile par le DIBAL-H se soit révélée délicate, l'intermédiaire **236** a ensuite été obtenu, puis engagé avec succès dans un couplage de Sonogashira et une dernière étape de cyclofonctionnalisation catalysée à l'argent, pour aboutir à **250**, premier composé de la **série E3**.

Chapitre 4 :

Evaluation biologique

I. Introduction

Notre projet consiste en la synthèse d'inhibiteurs de la TPase, nous avons donc dans un premier temps évalué leur capacité à inhiber l'activité enzymatique de l'EcTPase, une enzyme commerciale moins onéreuse que l'HuTPase, dans un test sur cible isolée. Notre objectif est d'avoir un test enzymatique permettant d'évaluer un grand nombre de composés de manière rapide et fiable. Par ailleurs, il nous faut prendre en compte les propriétés physicochimiques des inhibiteurs, en particulier leur structure aromatique et leur faible hydrosolubilité.

L'évaluation biologique a été réalisée en collaboration avec le Professeur Marie-Agnès Sari, du laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques (UMR CNRS 8601, Faculté Biomédicale des Saints-Pères, Université Paris Descartes).

En parallèle, le docking des inhibiteurs dans le site actif de l'enzyme a été effectué à l'aide d'une structure cristallographique de l'HuTPase dont la référence est 1UOU dans la RSCB Protein Data Bank.^{129,336}

Bien que nous ayons testé nos composés sur l'EcTPase, une structure cristalline de l'HuTPase a été utilisée pour le docking, dans l'optique d'un développement plus poussé des inhibiteurs dans lequel nous serions amenés à les tester sur l'HuTPase. Malgré leurs similitudes structurales (chapitre 1, paragraphe II.D.2), les deux enzymes diffèrent au niveau du site actif par une valine, chez l'Homme, qui est remplacée par une phénylalanine chez *E. coli*. Ce résidu aromatique peut éventuellement modifier le positionnement d'un inhibiteur dans le site actif.

Ces études de modélisation moléculaire ont été effectuées avec le logiciel GOLD (version 5.1),^{337,338} par le Professeur Philippe Chavatte et le Docteur Amaury Farce de l'unité Inserm U995 Inflammation : Régulation, interaction avec la nutrition et innovations thérapeutiques (Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lille 2).

Les ligands ont été construits en utilisant les fragments standards de la librairie de Sybyl 6.9.1.³³⁹ Leur géométrie a été optimisée à l'aide du champ de forces Tripos³⁴⁰ en attribuant les charges partielles calculées par la méthode de Gasteiger-Hückel, jusqu'à un gradient de 0,0001 Kcal/mol/Å.

Les conformations obtenues pour chaque composé ont été classées par une fonction de scoring consensus puis les groupes de conformations ont été observés visuellement pour évaluer leur cohérence et leur complémentarité avec le site actif. Seules les conformations les plus représentatives de chaque groupe ont été retenues.

³³⁶ H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *The Protein Data Bank Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235-42.

³³⁷ G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.

³³⁸ G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-48.

³³⁹ Tripos Associates, Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144.

³⁴⁰ M. Clark, R. D. III Cramer, N. Van Opdenbosch, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.

Afin de contrôler la validité des résultats, l'inhibiteur de référence TPI a été remplacé dans le site de liaison de la TPase suivant le même protocole que pour les inhibiteurs. La meilleure solution présente un RMS sur les atomes lourds de 0,654 Å par rapport à la structure cristallographique 1UOU.

II. Evaluation d'inhibiteurs de la TPase

Les tests enzymatiques décrits dans la littérature pour évaluer l'activité d'inhibiteurs de la TPase consistent à mettre en présence l'enzyme (généralement l'EcTPase ou l'HuTPase) avec ses substrats, la thymidine et le phosphate (schéma 116), dans un milieu d'incubation en présence ou non d'un inhibiteur.

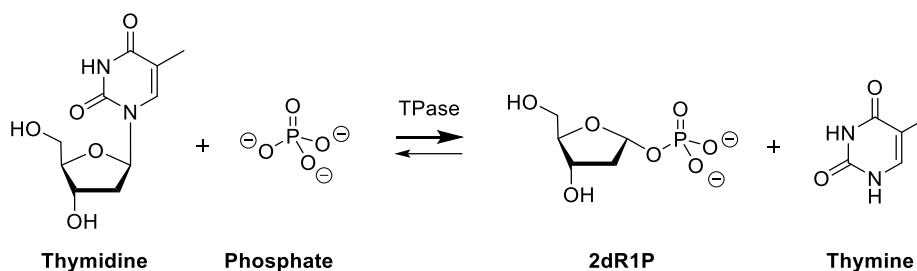


Schéma 116 : Réaction enzymatique catalysée par la TPase.

Le milieu d'incubation dans lequel est réalisée la réaction enzymatique est une solution aqueuse tamponnée contenant divers additifs servant à stabiliser la protéine en solution. Les tampons les plus utilisés sont le tampon trishydroxyméthylaminométhane-acide chlorhydrique (Tris-HCl, pH = 7,6 à 37 °C) et le tampon phosphate (pH = 7,4). Lorsque les inhibiteurs ne sont pas assez solubles dans le tampon utilisé, leurs solutions mères sont préparées dans le DMSO. Le milieu d'incubation contient alors quelques pourcents de DMSO (au maximum 3 %).

L'incubation est effectuée à 25 °C ou à température physiologique (37 °C). Comme la TPase est une enzyme à deux substrats, dans le cadre d'un développement d'inhibiteurs interagissant uniquement avec un seul des deux, il est souvent utile de travailler en présence d'une concentration saturante de l'autre substrat. La quantité d'enzyme introduite est ajustée à celle des substrats de manière à ce que, sur l'intervalle de temps de la mesure, la quantité de produit formé (thymine) reste faible par rapport à la quantité de substrat restant. On effectue alors des mesures de vitesse initiale et c'est à cette condition que l'on reste dans le domaine de fonctionnement linéaire de l'enzyme.

Plusieurs approches sont possibles pour mesurer le taux de conversion de la réaction enzymatique. Une première technique est basée sur l'emploi d'un substrat radioactif, les autres, sur une mesure d'absorption UV, avec ou sans séparation préalable de la thymine et de la thymidine par CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance).

II.A. Etude bibliographique

II.A.1. Tests utilisant un substrat radioactif

Dans ce type de test, une petite fraction du substrat utilisé dans la réaction catalytique est radiomarquée (généralement de la thymidine trois fois tritiée sur le méthyle en position 5).^{147,}

^{160,341} Au terme de l'incubation avec l'enzyme, une fraction du milieu est déposée sur une plaque CCM et la thymidine et la thymine sont séparées par élution de la plaque. Afin de pouvoir visualiser en UV les taches correspondant à la thymine et à la thymidine, un pré-dépôt d'une solution plus concentrée en thymidine et en thymine froides est effectué au préalable.

Après migration, les morceaux de plaque correspondant aux taches de thymine sont découpés et placés dans des fioles de comptage, en suspension dans un liquide de scintillation, avec éventuellement un co-solvant facilitant la désorption de la plaque CCM. Pour évaluer la radioactivité totale, on utilise un prélèvement du milieu réactionnel équivalent à celui réalisé pour le dépôt sur la CCM, auquel on ajoute les mêmes quantités de liquide de scintillation et de co-solvant. Les fioles sont ensuite placées dans un compteur à scintillation où la fluorescence émise par l'échantillon est mesurée pendant un temps donné.

Avec cette technique, l'activité de l'enzyme (A) correspond au rapport entre la radioactivité mesurée (exprimée en coups par minute, ou Cpm) pour le spot de thymine et la radioactivité totale dans le milieu d'incubation. Le pourcentage d'inhibition (I) se calcule par le ratio entre l'activité en présence d'inhibiteur et celle sans inhibiteur.

$$A = \frac{Cpm \text{ thymine}}{Cpm \text{ totaux}}$$

$$I = \left(1 - \frac{A \text{ inhibiteur}}{A \text{ enzyme seule}}\right) \times 100$$

Le liquide de scintillation est essentiellement composé d'un solvant contenant un scintillateur, une espèce possédant des propriétés de fluorescence. Le rôle de ce liquide est de permettre un transfert d'énergie efficace entre la source radioactive et le détecteur. Le solvant doit être capable de collecter l'énergie émise par la source radioactive et non la dissiper, tout en solubilisant le scintillateur et en ne quénchant pas la fluorescence de ce dernier. Ensuite, le scintillateur récupère l'énergie stockée par les molécules de solvant excitées, ce qui le fait passer à un état excité singulet à partir duquel il se désexcite par voie radiative. Un scintillateur doit posséder un rendement de désexcitation radiative élevé et émettre à une longueur d'onde compatible avec les photodétecteurs de l'appareil de comptage utilisé. Les liquides de scintillation les plus courants sont constitués de solvants aromatiques (toluène, xylène, pseudocumène...) dans lesquels sont solubilisés des structures polyaromatiques correspondant aux scintillateurs, tels que le 2,5-diphényloxazole ou le *p*-terphényle.

Ce type de test présente l'avantage d'être relativement polyvalent car, lors de l'étape de séparation par CCM, l'inhibiteur est éliminé, ce qui permet de s'affranchir de la nature de ce dernier. En revanche, il n'est pas adapté à un criblage à haut débit, puisqu'on ne peut mettre qu'une petite dizaine d'échantillons par plaque CCM, soit 2 à 3 milieux d'incubation différents si les manipulations sont tripliquées. Par ailleurs, dans la littérature, peu de détails sont donnés

³⁴¹ M. De Bruin, T. Van Capel, K. Smid, M. Fukushima, K. Hoekman, H. M. Pinedo, G. J. Peters *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 2, 93-9.

quant à la désorption des produits de la silice, ce qui ne facilite pas la mise au point d'un protocole expérimental basé sur cette technique.

II.A.2. Tests basés sur la séparation CLHP

Une alternative aux tests employant un substrat radioactif consiste à séparer le substrat et le produit de la réaction enzymatique par CLHP et à mesurer le taux de conversion par lecture de l'absorption UV de la thymine formée et la thymidine résiduelle.^{182,342}

Typiquement, après incubation pendant un temps donné et avant l'injection dans une chaîne de chromatographie, un prélèvement est chauffé à 90 - 95 °C pendant quelques minutes afin d'arrêter la réaction. La séparation s'effectue sur des colonnes de silice greffée en phase inverse, avec une phase mobile constituée d'acétonitrile ou de méthanol combiné à un ou plusieurs tampons aqueux en proportions variables.

Avec cette technique, l'activité (A) de l'enzyme se calcule par comparaison des quantités de thymidine résiduelle et de thymine formée. En présence d'un inhibiteur, le pourcentage d'inhibition (I) se calcule comme précédemment (paragraphe II.A.1).

$$A = \frac{\text{Quantité thymine formée}}{\text{Quantité de thymidine résiduelle}}$$

Comme pour le test utilisant un substrat radioactif, l'emploi de la CLHP permet de s'affranchir de la nature des inhibiteurs testés. Toutefois, la mise au point d'une séparation par CLHP est un processus long et complexe qui nécessite d'être effectué pour chaque famille d'inhibiteurs que l'on souhaite tester.

II.A.3. Tests basés sur la mesure UV *in situ*

L'autre alternative à l'utilisation d'un substrat radioactif est la mesure de l'absorption UV directement sur le milieu d'incubation, sans effectuer de prélèvement ni de séparation de ses constituants.^{180,195,343} En l'absence de séparation, le choix de la longueur d'onde de détection doit correspondre à une différence d'absorption suffisante entre le substrat et le produit de la réaction enzymatique. Il faut également sélectionner une longueur d'onde à laquelle les inhibiteurs n'absorbent pas ou peu.

Concrètement, il est possible de faire un dosage à 290 nm, longueur d'onde à laquelle les coefficients d'extinction molaire de la thymine et la thymidine sont suffisamment différents ($\epsilon_{\text{thymidine}} = 1493$ et $\epsilon_{\text{thymine}} = 1013 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).³⁴⁴ Celui de la thymidine étant plus grand que celui de la thymine, l'absorbance diminue au fur et à mesure que la réaction enzymatique se produit. Avec cette approche, l'activité enzymatique mesurée (A) ne correspond pas à un taux

³⁴² F. Corelli, M. Botta, A. Lossani, S. Pasquini, S. Spadari, F. Fochoer, *Il Farmaco* **2004**, 59, 987-92.

³⁴³ T. Kita, H. Takahashi, Y. Hashimoto, *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, 24, 860-2.

³⁴⁴ T. A. Krenitsky, S. R. M. Bushby, *Stabilized Thymidine Phosphorylase Formulation*. US4178212A, **1979**.

de conversion mais à la vitesse de la réaction. Il s'agit de la vitesse à laquelle diminue l'absorbance, soit la pente de la droite modélisant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

$$Abs = A \times t + B$$

En présence d'un inhibiteur, le pourcentage d'inhibition (I) se calcule comme précédemment (paragraphe II.A.1).

La mesure UV *in situ* présente un avantage certain en termes de temps et de coût de mise au point du protocole par rapport aux deux techniques précédentes. Grâce à l'utilisation de plaques multipuits, elle permet aussi un criblage bien plus rapide. Cependant, elle peut s'avérer inadéquate pour l'évaluation d'inhibiteurs absorbant sur une gamme de longueurs d'onde semblable à celle du substrat et du produit de la réaction enzymatique.

Dans le cadre de notre étude, nos inhibiteurs absorbant dans l'UV sur une gamme de longueurs d'onde proche de celles où absorbent la thymidine et la thymine, nous avons d'abord adopté une méthode basée sur un substrat radioactif.

II.B. Méthodes utilisées pour l'évaluation biologique

II.B.1. Test utilisant un substrat radioactif

II.B.1.a. Test initial

Le test enzymatique initialement mis au point au laboratoire est une version modifiée de celui décrit par Nencka *et al.*¹⁶⁰ Contrairement au test de référence, l'enzyme utilisée n'est pas l'HuTPase mais l'EcTPase, dont le coût est bien moindre. De plus, le système d'éluant pour la séparation par CCM a dû être modifié pour assurer une bonne séparation de la thymidine, de la thymine et des inhibiteurs. Pour finir, un mélange méthanol/eau 1:1 a été ajouté dans les fioles de comptage afin de faciliter la désorption de la silice, élément que les auteurs ne précisent pas dans leur protocole.

Les quantités d'enzyme (0,006 U) et de thymidine (300 µM, soit la K_M de l'enzyme pour ce substrat³⁴⁵) ont été choisies afin de se placer dans le domaine de fonctionnement linéaire de l'enzyme. Bien que les inhibiteurs que nous avons développés ciblent le site de fixation de la thymidine, le tampon utilisé est le Tris-HCl (pH = 7,6 à 37 °C), tampon dans lequel il est possible de faire varier les concentrations des deux substrats, contrairement au tampon phosphate. Il sera ainsi plus facile de vérifier que les inhibiteurs n'interagissent pas avec le phosphate. Pour un premier criblage, les inhibiteurs à évaluer, ainsi que des inhibiteurs de référence (7DX et 6A5BrU), ont été testés à une concentration de 300 µM. Les caractéristiques détaillées de ce test sont données dans la partie expérimentale.

³⁴⁵ N. G. Panova, C. S. Alexeev, A. S. Kuzmichov, E. V. Shcheveleva, S. A. Gavryushov, K. M. Polyakov, A. M. Kritzyn, S. N. Mikhailov, R. S. Esipov, A. I. Miroshnikov, *Biochemistry (Moscow)* **2007**, 72, 21-8.

Les premiers essais effectués avec ce test ont donné des écarts-type élevés ainsi que des résultats non reproductibles sur les mesures tripliquées. Plusieurs hypothèses ont alors été émises quant à l'origine de ces problèmes :

- la faible taille des volumes utilisés
- une désorption insuffisante de la thymidine et de la thymine de la plaque CCM
- un ratio signal/bruit trop faible au niveau des valeurs de comptage de la fluorescence
- une extinction de la fluorescence par phénomène de « quenching ».

Concernant le dernier point, le quenching, il peut être provoqué par plusieurs phénomènes. Le premier type de quenching est dit chimique et correspond à l'absorption d'une partie de l'énergie radioactive avant qu'elle ne soit convertie en lumière. Le second, le quenching colorimétrique, correspond à l'absorption d'une partie de la lumière émise par le scintillateur avant qu'elle n'atteigne les photodétecteurs. Dans les deux cas, le quenching conduit à une sous-estimation de l'activité radioactive de l'échantillon.

II.B.1.b. Tentatives d'amélioration du test

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet d'une modification de la quantité d'enzyme et de thymidine radiomarquée introduites. Doubler la quantité d'enzyme permet d'obtenir des valeurs de comptage de la thymine plus élevées et donc d'améliorer le ratio signal/bruit pour ces mesures. Cependant, cela n'a pas été suffisant pour régler nos problèmes de reproductibilité, avec en plus le risque de sortir de la zone de fonctionnement linéaire de l'enzyme. De même, augmenter la quantité de thymidine tritiée n'a pas apporté d'amélioration. Nous avons donc dû revoir en profondeur notre protocole.

La technique par CCM présente plusieurs inconvénients. En effet, pour un même inhibiteur, les résultats obtenus varient parfois beaucoup d'une plaque à l'autre. Pour s'assurer de la cohérence de l'ensemble des résultats, nous avons donc dû effectuer plusieurs dépôts du milieu d'incubation blanc (sans enzyme) et du milieu d'incubation de référence (sans inhibiteur) sur chaque plaque CCM. Par ailleurs, les morceaux de plaque CCM découpés sont placés dans des fioles de comptage où sont ajoutés un mélange eau/méthanol 1:1 et le liquide de scintillation. Le mélange ainsi obtenu est hétérogène à cause de la présence du morceau de plaque CCM, ce qui peut éventuellement influencer sur la détection de la fluorescence émise par le scintillateur.

Nous nous sommes donc orientés vers une séparation de la thymine et de la thymidine par chromatographie sur colonne de silice, ce qui permet de s'affranchir des contraintes citées précédemment.

La mise au point de la séparation a été réalisée sur un mélange non radiomarqué, l'idée étant de récupérer l'intégralité de la thymine dans les premières fractions et de faire en sorte que la thymidine, plus polaire, reste sur la colonne. Le choix des solvants d'élution s'est porté sur des solvants qui quenchent peu la luminescence. Etant donnée les faibles quantités de substrat utilisées (< 1 mg), le caractère quantitatif de la séparation a été vérifié par mesure de l'absorption UV des fractions collectées.

Cette approche ayant été validée en conditions non radioactives, nous l'avons appliquée à notre test, avec de la thymidine radiomarquée. Le détail de ce nouveau test enzymatique est donné dans la partie expérimentale. En résumé, une fois le prélèvement du milieu réactionnel déposé sur la colonne, il est élué avec un volume donné de solvants qui est récupéré directement dans une fiole de comptage, dans laquelle le liquide de scintillation est ajouté. La radioactivité mesurée correspond à la thymine tritiée formée durant l'essai. En parallèle, la radioactivité totale (thymidine + thymine) est mesurée sur un prélèvement du milieu d'incubation mélangé au même volume d'éluant et de liquide de scintillation.

Malheureusement, la séparation sur colonne n'a pas permis de fournir des résultats plus reproductibles qu'avec le protocole utilisant la CCM. Pour un même inhibiteur, les écarts entre les différentes valeurs obtenues peuvent être supérieurs à 50 %. De plus, pour certains inhibiteurs, nous avons rencontré un problème fréquent d'extinction complète de la radioactivité que nous n'avons pas été en mesure d'expliquer.

Bien que ce nouveau protocole présente plusieurs avantages par rapport à la technique de séparation précédente, la présence de l'éluant dans les fioles de comptage requiert l'utilisation d'un volume conséquent de liquide de scintillation. Ainsi, au-delà d'un manque de reproductibilité, les consommables utilisés mais aussi l'élimination des déchets radioactifs rendent ce test très coûteux. Nous n'avons donc pas mené d'expériences supplémentaires pour tenter de résoudre les problèmes de reproductibilité rencontrés.

Le manque de solubilité des inhibiteurs dans le milieu d'incubation pourrait expliquer le manque de reproductibilité de notre test. Pour valider cette hypothèse, il faudrait tester nos composés dans une gamme de concentrations de l'ordre de 0 à 300 μM , ce qui n'est pas envisageable avec ce test pour les raisons évoquées ci-dessus.

Nous nous sommes également interrogés sur la stabilité des composés testés dans le milieu d'incubation. En effet, le suivi de la stabilité des inhibiteurs est important pour avoir une évaluation biologique fiable, or cela est difficilement réalisable avec ce test.

Nous avons donc choisi de poursuivre l'évaluation biologique de nos composés avec un test basé sur la détection UV *in situ*. En plus de permettre un débit de mesures bien plus élevé, nécessaire à un criblage sur une large gamme de concentrations, la mesure UV *in situ* permet de suivre la stabilité de nos composés, puisque ces derniers absorbent dans l'UV.

II.B.2. Test utilisant la mesure UV *in situ*

Nous avons réalisé quelques expériences préliminaires sur un lecteur UV standard (spectrophotomètre UV / Visible 6705, Jenway). Cela nous a permis de nous assurer que la conversion enzymatique dans des conditions similaires à celles du protocole décrit par Khan *et al.*¹⁹⁵ induit une variation de l'absorbance significative nous permettant de calculer l'activité enzymatique, que ce soit pour l'enzyme seule ou en présence des inhibiteurs.

Nous avons alors utilisé un lecteur UV compatible avec des plaques 96 puits (spectrophotomètre pour microplaques PowerWave HT, Biotek). Quelques essais préliminaires nous ont permis de retenir le protocole détaillé dans la partie expérimentale, qui est une version légèrement modifiée de celui décrit par Khan *et al.*¹⁹⁵

Comme précédemment, les quantités d'enzyme (0,006 U) et de thymidine (300 μ M, soit la K_M de l'enzyme pour ce substrat) ont été choisies afin de se placer dans le domaine de fonctionnement linéaire de l'enzyme. Nous avons testé le tampon Tris-HCl (pH = 7,4 à 25 °C) et le tampon phosphate (pH = 7,4). Les résultats ont été plus reproductibles avec ce dernier, qui présente l'avantage de garder le substrat phosphate en excès et de s'affranchir de l'effet potentiel des inhibiteurs sur ce substrat. En revanche, ce tampon ne permet pas d'évaluer l'activité d'un inhibiteur par rapport au phosphate.

Afin de s'assurer de la validité de notre évaluation, toutes les analyses décrites ci-dessous ont été tripliquées.

II.B.2.a. Premier criblage

Un premier criblage de nos inhibiteurs potentiels a été réalisé à la concentration maximale permise par la solubilité de ces derniers dans le milieu d'incubation (10 à 100 μ M). Malgré cette précaution, nous avons parfois observé la formation d'un précipité au cours de l'expérience. Sur chaque plaque multipuits, nous avons réalisé la mesure de l'activité de l'enzyme sans inhibiteur, en présence d'un inhibiteur de référence (la 7DX) et en présence des composés à tester. Nous avons également mesuré l'absorbance UV de chaque composé à tester dans un milieu d'incubation sans substrat afin de suivre son évolution en solution. Enfin, d'autres puits contenant uniquement les inhibiteurs en solution dans le tampon ont permis de réaliser leurs spectres d'absorption UV entre 250 et 450 nm. Le détail du protocole utilisé pour ces essais est donné dans la partie expérimentale.

II.B.2.b. Calcul des CI_{50}

Pour les composés ayant présenté un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % à la concentration maximale à laquelle ils ont pu être testés lors du premier criblage, nous avons déterminé la concentration associée à une diminution de 50 % de l'activité enzymatique (CI_{50}). Les mesures ont été réalisées de la même façon que pour le premier criblage, mais avec des concentrations variables en inhibiteur.

II.B.2.c. Compétition vis-à-vis du phosphate

Bien que nos composés aient été conçus comme des inhibiteurs visant à interagir avec le site de fixation de la thymidine, nous avons vérifié, pour les plus actifs d'entre eux, qu'ils n'interagissent pas avec le site de fixation du phosphate.

Pour ce faire, des mesures d'activité de l'enzyme en présence d'une concentration saturante en thymidine, dans l'idéal 10 fois la K_M , soit 3 mM, et de quantités variables en phosphate devaient

être réalisées. Néanmoins, afin de ne pas sortir de la zone de linéarité du lecteur UV, la quantité de thymidine maximale utilisable avec ce test ne peut excéder 1 mM.

Nous avons dû changer de tampon et utiliser un tampon de type Tris-HCl (pH = 7,4 à 25 °C). Les composés ont été testés à une concentration de l'ordre de leur CI_{50} et en présence de deux concentrations de thymidine (300 μ M et 1 mM). La mesure de l'activité a alors été effectuée en présence d'une concentration variable en phosphate (2 - 30 mM). Le détail du protocole utilisé pour ces essais est donné dans la partie expérimentale.

II.B.2.d. Etude mécanistique

Afin de déterminer si les inhibiteurs ont un mécanisme d'action compétitif, incompétitif ou mixte, nous avons effectué une étude mécanistique sur les 2 composés les plus actifs. Dans ce but, nous avons mesuré le pourcentage d'inhibition pour des concentrations variables en inhibiteur et en thymidine dans des conditions similaires à celles employées lors du premier criblage.

La nature du mécanisme a été identifiée après tracé du diagramme double inverse (ou diagramme Lineweaver-Burk) à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 6.01).

III. Résultats et discussion

III.A. Considérations générales

Pour un certain nombre d'inhibiteurs, des problèmes d'hydrosolubilité ont eu un caractère limitant sur leur évaluation biologique. Ainsi, dans les tableaux de résultats, une limite de solubilité ($S_{\max}$) peut être indiquée, l'inhibiteur n'ayant pas été testé au-delà de cette limite. Pour d'autres, une absence de relation dose-effet à partir d'une certaine concentration a été observée, bien que l'inhibiteur n'ait pas précipité dans le milieu. Cela nous a empêché de calculer une CI_{50} pour ces inhibiteurs.

La 7DX a été retenue comme inhibiteur de référence. Son pourcentage d'inhibition à 50 μ M est de l'ordre de 60 à 80 %, pour une CI_{50} calculée de $28 \pm 6 \mu$ M.

La concentration en phosphate n'a pas eu d'influence significative sur le pourcentage d'inhibition. Les inhibiteurs ne se lient donc pas au site phosphate.

Pour tous les composés testés, l'enregistrement et l'analyse de leurs spectres d'absorption UV dans le tampon pendant l'intervalle de temps de mesure nous a permis de conclure qu'ils ne subissaient aucune dégradation.

Les résultats de l'évaluation biologique ainsi que ceux des différentes études de modélisation moléculaire vont être présentés par série d'inhibiteurs.

III.B. Série A

L'étude préliminaire de modélisation moléculaire avait montré que les molécules de la série A se positionnaient dans le site actif, leur noyau pyrimidinedione se superposant bien à celui du TPI, à proximité du site de liaison de la thymidine (en rose, figure 70).

En plus des nombreux composés précédemment synthétisés au sein de notre laboratoire, nous avons préparé de nouvelles molécules, substituées sur les positions 7 à 9 du squelette de cette série, afin d'interagir avec des acides aminés de la partie gauche de la poche mise en évidence lors des travaux préliminaires de docking (rond bleu, figure 70).

L'ensemble des molécules de cette série a été évalué sur l'EcTPase et a également été modélisé à nouveau dans le site actif. Les résultats sont présentés par type de substitution et sont regroupés dans les tableaux 10 à 14.

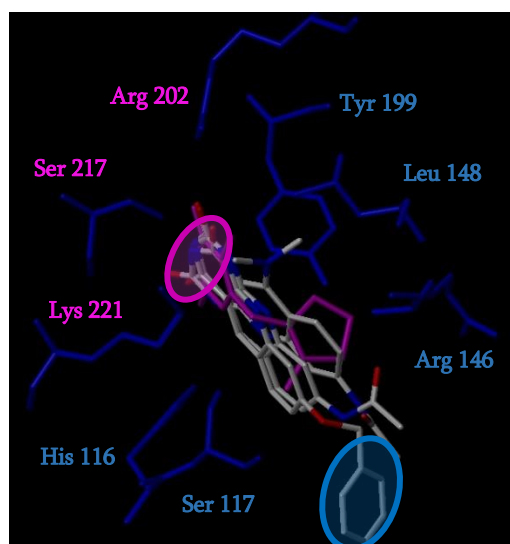
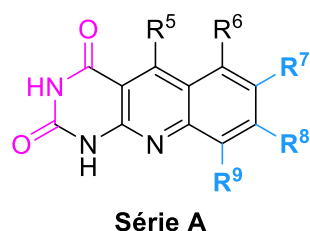


Figure 70 : Résultats du docking préliminaire des composés de la série A.

III.B.1. Dérivés avec des substituants alkyles

Les inhibiteurs substitués par un méthyle en position 7 ou 8 sont inactifs (**2** et **3**), alors que celui possédant un méthyle en position 9 (**4**) présente une bonne activité (tableau 10). Cependant, la modélisation moléculaire révèle que parmi ces trois inhibiteurs, c'est le composé **3** qui se place le mieux, avec formation de liaisons hydrogène avec les résidus arginine 202, sérine 217 et lysine 221 (figure 71). Les positionnements majoritaires adoptés par **2** et **4** ne permettent pas de conserver ces interactions (figure 71 et figure 72).

Bien que son positionnement dans le site actif soit similaire à celui de la molécule **3**, l'analogue 7,8-diméthyle (**5**) ne se solubilise pas complètement même à faible dose (15 μM) et n'a donc pas pu être testé (figure 72).

Référence	Structure	Inhibition
2		Inactif à 100 μM
3		Inactif à 100 μM
4		$\text{CI}_{50} = 59 \pm 4 \mu\text{M}$
5		$S_{\text{max}} < 15 \mu\text{M}$

Tableau 10 : Evaluation des inhibiteurs de la série A avec des substituants aliphatiques.

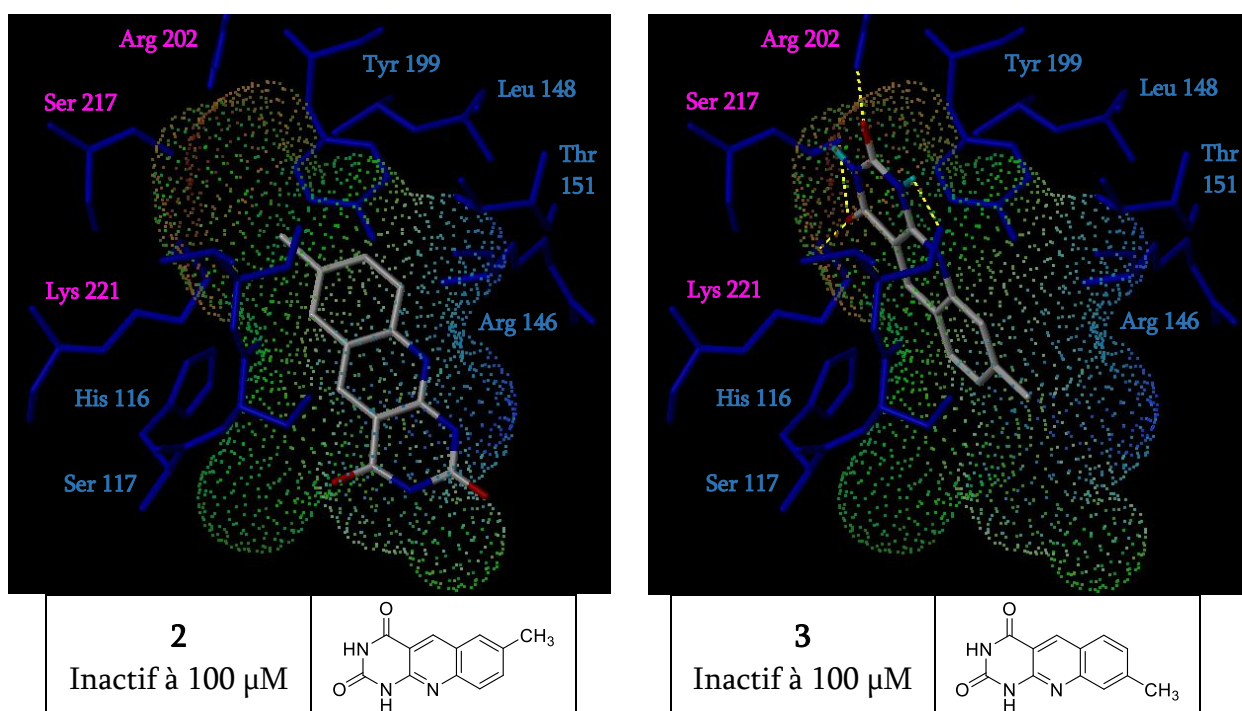


Figure 71 : Docking des composés 2 et 3.

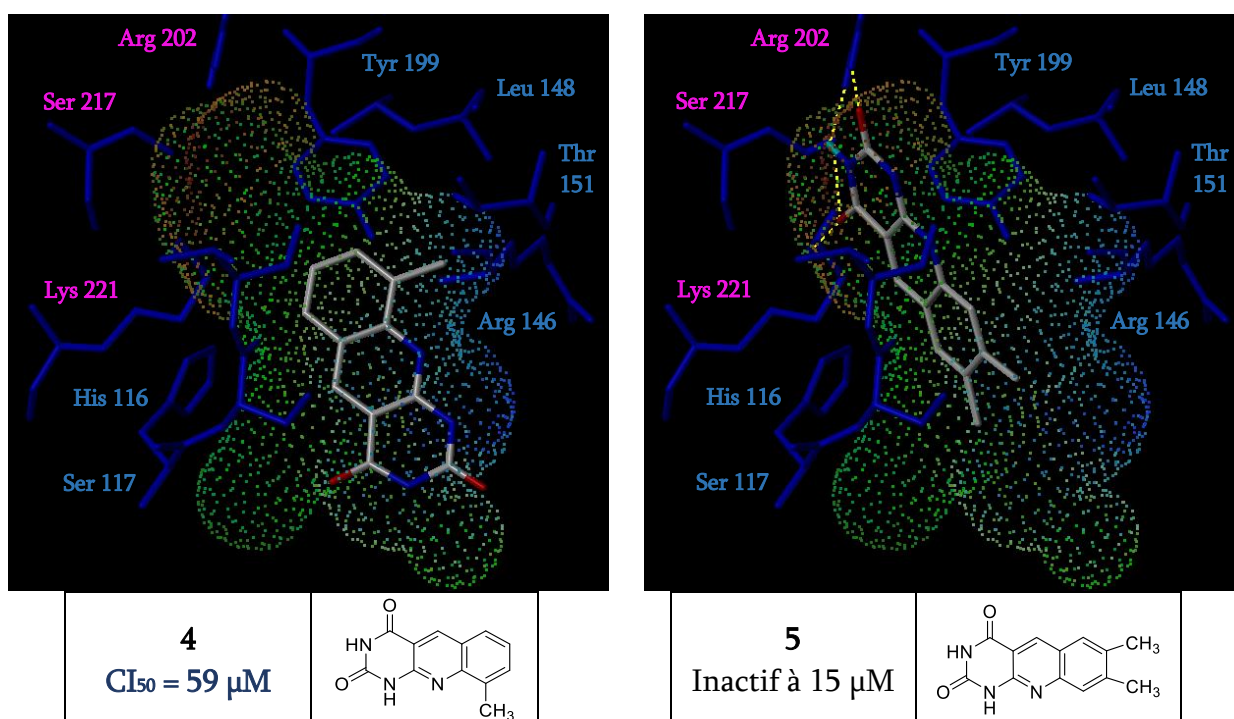


Figure 72 : Docking des composés 4 et 5.

III.B.2. Dérivés avec des substituants éther-oxydes

En position 8, la présence d'un groupement méthoxy (**6**) ou phénoxy (**23**) est particulièrement favorable à l'activité, tandis que l'insertion d'un CH₂ entre l'atome d'oxygène et le noyau benzénique de **23** entraîne une perte d'activité (**7**) (tableau 11). La modélisation moléculaire va dans le même sens, puisque **6** et **23** adoptent une orientation majoritaire dans laquelle sont conservées les liaisons hydrogène évoquées précédemment (figure 73), alors que, même s'il se place dans le même sens, aucun positionnement majoritaire ne se dégage nettement pour **7**.

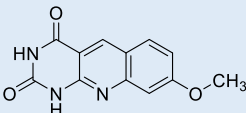
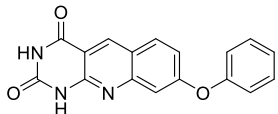
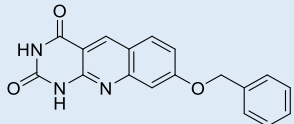
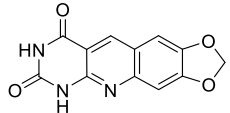
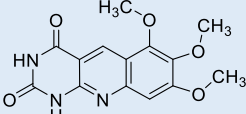
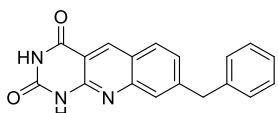
Référence	Structure	Inhibition
6		CI ₅₀ = 45 ± 3 μM
23		30 % à 15 μM (pas de relation dose-effet au-delà, S _{max} > 75 μM)
7		Inactif à 45 μM (S _{max})
8		Inactif à 15 μM (S _{max})
9		Inactif à 15 μM (S _{max})
22		30 % à 15 μM (pas de relation dose-effet au-delà, S _{max} = 45 μM)

Tableau 11 : Evaluation des inhibiteurs de la série A avec des substituants éther-oxydes.

La présence de substituants 6,7-méthylènedioxy (**8**) ou 6,7,8-triméthoxy (**9**) fournit des composés peu solubles pour lesquels il est difficile de conclure. Le docking montre toutefois que le placement de **8** est un peu moins satisfaisant car environ un tiers des positionnements est légèrement plus éloigné du site de liaison de la thymidine (figure 74). Par ailleurs, celui de **9** est nettement moins bon, avec une majorité de solutions placées à l'envers, avec les groupements méthoxy logés du côté du site de liaison de la thymidine, probablement en raison du fort encombrement stérique imposé ces groupements.

Enfin, raccorder un phényle par un pont méthylène (**22**) permet de retrouver une activité proche de celle de **23**. Son placement est d'ailleurs similaire à celui de son homologue oxygéné (figure 73), avec des conformations qui se superposent bien entre elles.

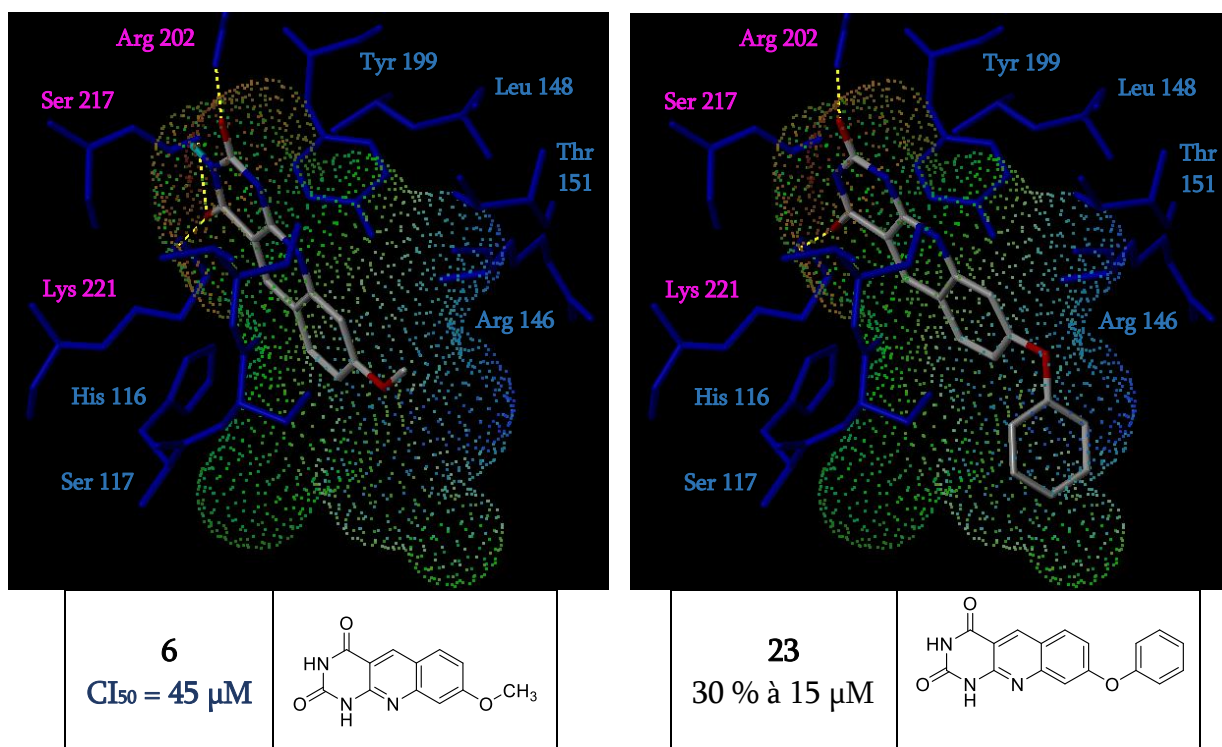


Figure 73 : Docking des composés 6 et 23.

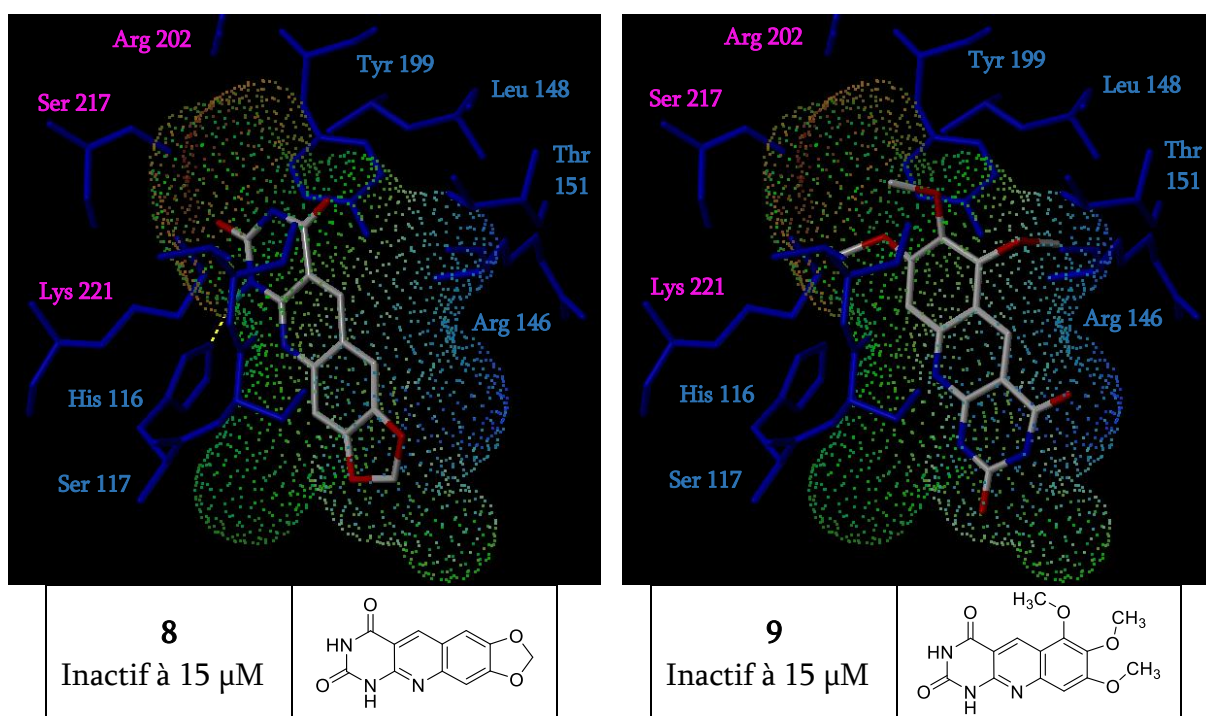


Figure 74 : Docking des composés 8 et 9.

III.B.3. Dérivés avec des substituants halogénés

Le dérivé 7,8-dichloré (**24**) est actif alors que celui uniquement chloré en position 8 (**10**) ne l'est pas. Sur cette même position, remplacer le méthyle (composé **3**, tableau 10) par un trifluorométhyle (**11**) n'apporte pas de gain en termes d'activité (tableau 12).

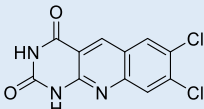
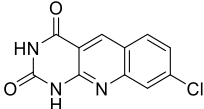
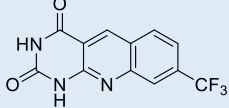
Référence	Structure	Inhibition
24		$CI_{50} = 46 \pm 7 \mu M$
10		Inactif à 45 μM (S_{max})
11		Inactif à 100 μM $S_{max} > 100 \mu M$

Tableau 12 : Evaluation des inhibiteurs de la série A avec des substituants halogénés.

Le docking de ces structures corrobore les résultats de l'évaluation biologique, les liaisons hydrogène avec les résidus arginine 202, sérine 217 et lysine 221 étant plus facilement établies avec **24** qu'avec **10** et **11**, qui sont quasiment superposés (figure 75).

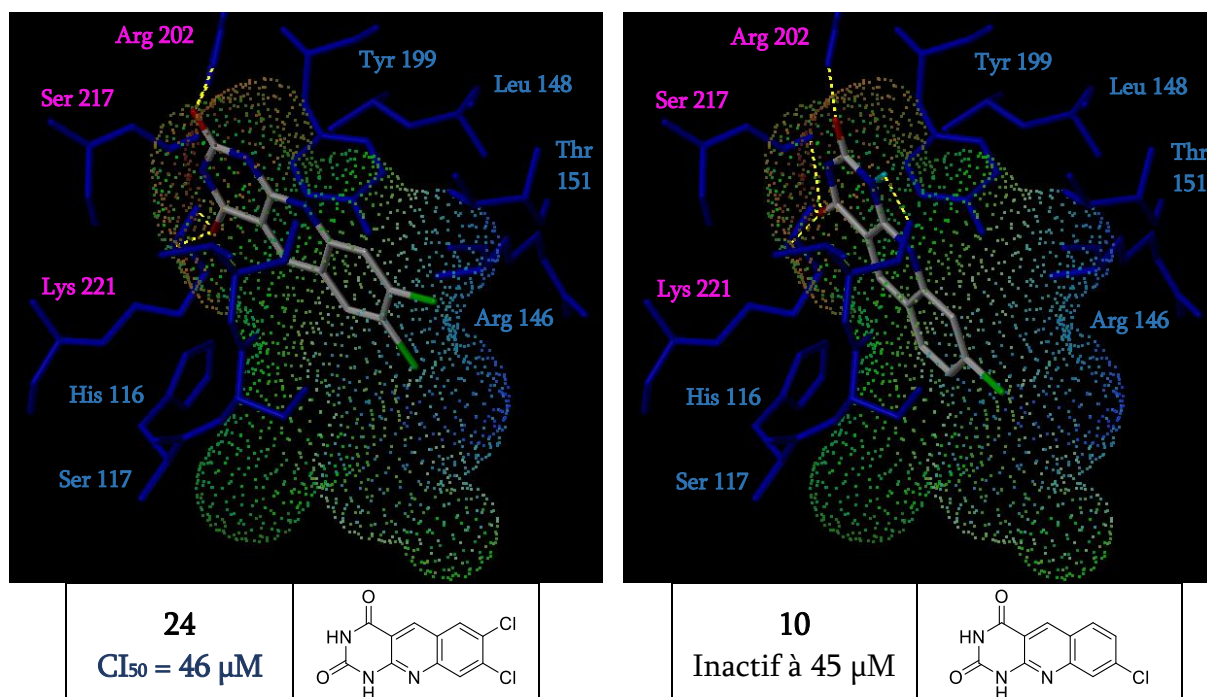


Figure 75 : Docking des composés **24** et **10**.

III.B.4. Dérivés avec annélation de cycles aromatiques

L'annélation d'un cycle aromatique à la quinoléine en positions 6 et 7 (**12**) est favorable à l'activité, tandis qu'avec une annélation en 8 et 9 (**26**), on obtient un composé très peu soluble qui n'a pas montré d'activité à sa solubilité maximale (tableau 13). Le docking montre que ces deux isomères adoptent globalement la même orientation mais que les différents positionnements de **26** se superposent moins bien entre eux que ceux de **12** (figure 76).

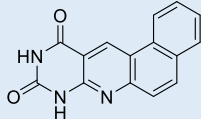
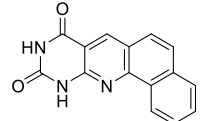
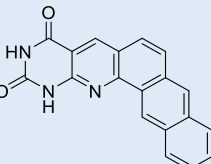
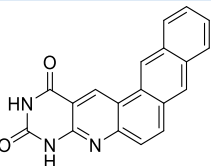
Référence	Structure	Inhibition
12		$CI_{50} = 39 \pm 7 \mu M$
26		Inactif à 15 μM (S_{max})
27		Inactif à 25 μM (S_{max})
28		Inactif à 50 μM (S_{max})

Tableau 13 : Evaluation des inhibiteurs de la série A annelés à des noyaux aromatiques.

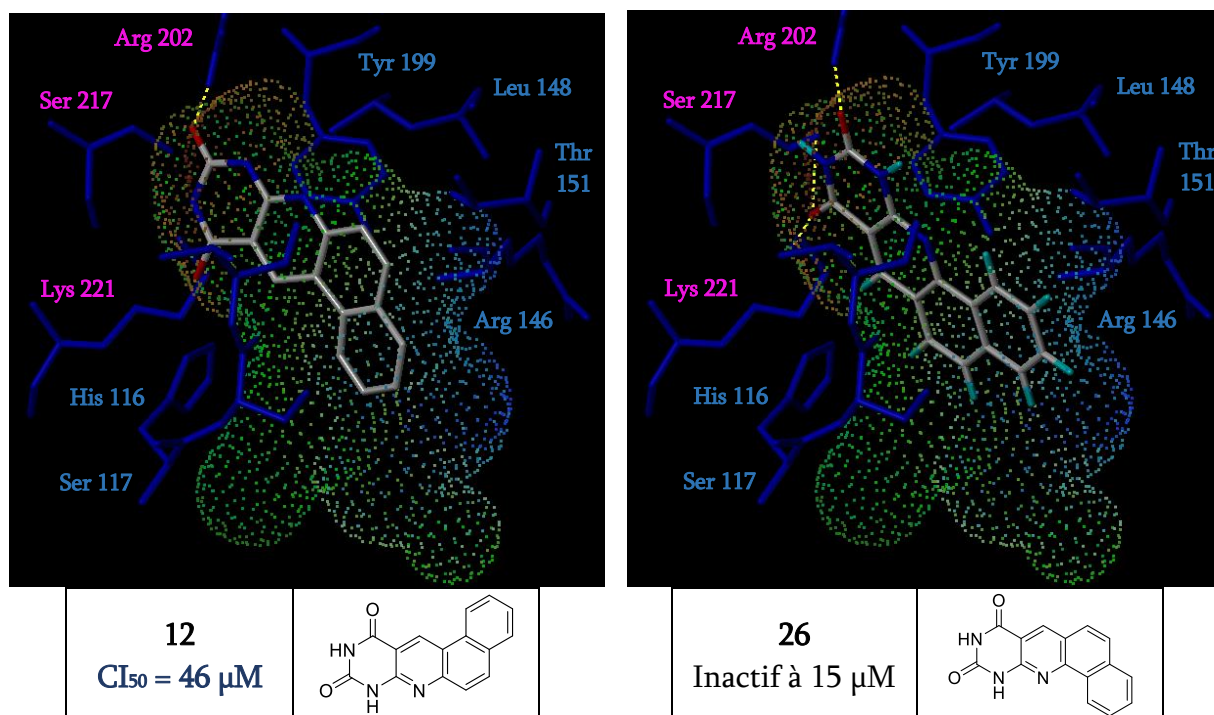


Figure 76 : Docking des composés **12** et **26**.

L'introduction d'un cycle benzénique supplémentaire dans une structure coudée fournit des composés peu solubles et inactifs (**28** et **29**). La modélisation moléculaire confirme ces résultats, ces deux inhibiteurs ayant beaucoup de mal à se positionner dans le site actif.

III.B.5. Molécules substituées sur la position 5

Au niveau de la position 5, l'introduction d'un triméthoxybenzène (**15**) ou d'un *N*-diméthyle (**18**) donne des composés inactifs mais surtout peu solubles dans le milieu d'incubation (tableau 14). Il est ainsi difficile de connaître l'effet exact de ces substituants sur l'activité enzymatique. Presque trop volumineux pour rentrer dans le site actif, **15** adopte un positionnement dans lequel il ne parvient pas à former de liaisons hydrogène.

Introduire un méthyle sur la position 5 ne semble pas avoir une réelle influence sur l'activité si on compare **13** à **6** (tableau 11) et **14** à **8** (tableau 11). Le docking de **13** et **14** dans le site actif contraste avec ces résultats, leur placement étant nettement moins bon que celui des analogues non méthylés. L'inhibiteur **13** peut ainsi adopter deux orientations majoritaires et non superposables à celle de **6**, tandis que pour **14**, la présence du méthyle semble ne plus permettre à la molécule de retrouver le placement relativement stable de **8**.

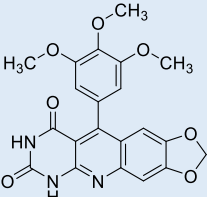
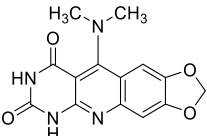
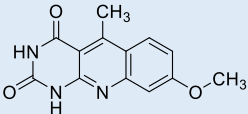
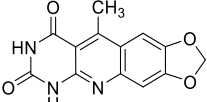
Référence	Structure	Inhibition
15		Inactif à 25 μM (S_{max})
18		Inactif à 15 μM (S_{max})
13		$\text{CI}_{50} = 19 \pm 2 \mu\text{M}$
14		Inactif à 60 μM (S_{max})

Tableau 14 : Evaluation des inhibiteurs de la série A avec des substituants en position 5.

Finalement, le composé **13** étant l'un des plus actifs de cette série, nous avons effectué une étude mécanistique afin de déterminer son mécanisme d'inhibition. Celle-ci a montré que **13** se comporte comme un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la thymidine (figure 77).

Diagramme Lineweaver-Burk

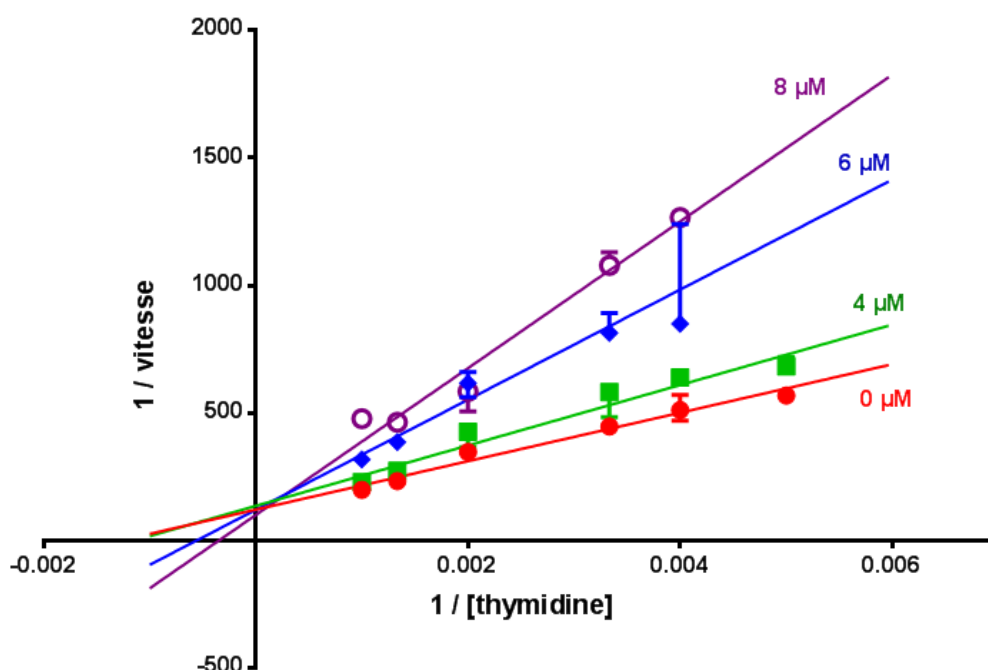


Figure 77 : Diagramme double inverse (ou Lineweaver-Burk) de 13.

L'introduction de divers substituants sur la position 8 des inhibiteurs de la série A visait à interagir avec les résidus de la partie gauche de la poche. Cette approche s'est montrée efficace, même si la nature des interactions réalisées reste à déterminer, car certains composés se sont montrés peu actifs malgré un mode de substitution similaire. Le volume disponible au niveau de cette position semble limité puisque remplacer un méthoxy par un phénoxy provoque une légère diminution de l'activité. Enfin, la présence d'un groupement méthyle en position 5 semble être très légèrement favorable à l'activité, bien que cela n'ait pas été confirmé par la modélisation moléculaire.

III.C. Série B

Lors de l'étude précédente de modélisation moléculaire, **58** (en vert, figure 78) était le seul inhibiteur de cette série à avoir été modélisé. Contrairement à ce qui avait été observé pour les molécules de la série A, ce n'est pas la pyrimidinedione mais la partie pyrroloquinoléine qui venait prendre la place du noyau pyrimidinedione du TPI (inhibiteur de référence, en rose, figure 78). Le dioxolane jouait le rôle du motif CO-NH-CO du TPI et interagissait avec le site de liaison de la thymidine en réalisant des liaisons hydrogène avec les résidus arginine 202, sérine 217, thréonine 154 et sérine 144 (ces deux derniers acides aminés ne sont pas visibles sur la figure 78). Le tenseur méthylénique plaçait la partie 5-bromouracile dans une zone non occupée par le TPI qui constitue une large poche jusqu'alors non explorée. Localisée dans la partie droite de cette « nouvelle » poche (en vert, figure 78), la pyrimidinedione était engagée dans deux liaisons hydrogène avec la lysine 157 et la glycine 282 (non visibles sur la figure 78).

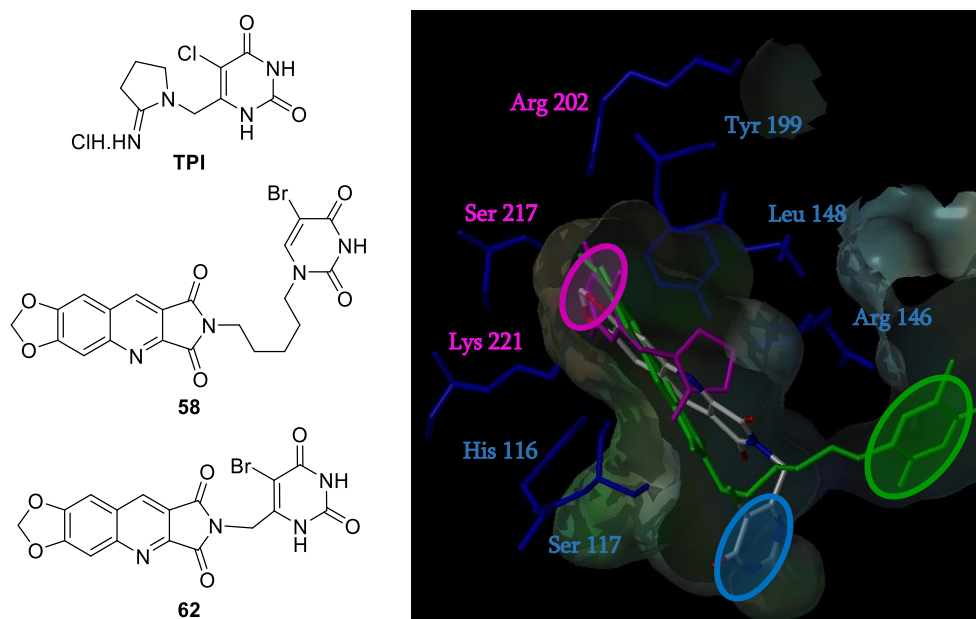


Figure 78 : Placement du TPI (en rose), de 58 (en vert) et de 62.

Le développement de cette série d'inhibiteurs avait été guidé par l'optimisation des interactions entre la pyrimidinedione portée par l'espaceur aliphatique et la partie droite de la poche. Pour cela la longueur du tenseur avait été modifiée et l'atome de brome de la pyrimidinedione avait été remplacé par un méthyle.

Référence	Structure	Inhibition
53		25 % à 100 μ M (S_{max} > 100 μ M)
54		Inactif à 75 μ M (S_{max})
57		30 % à 12,5 μ M (pas de relation dose-effet au-delà, S_{max} = 37,5 μ M)
58		30 % à 12,5 μ M (S_{max})

Tableau 15 : Evaluation biologique des composés de la série B.

Nous avons évalué les quatre molécules de cette série dans les mêmes conditions que celles des autres séries afin de pouvoir les comparer. Les résultats sont donnés dans le tableau 15. Les dérivés portant un méthyle en position 5 de la pyrimidinedione (**53** et **54**) sont moins actifs que ceux portant un brome (**57** et **58**). Pour les premiers seulement, l'espaceur à 4 carbones (**53**) semble un peu plus favorable à l'activité que celui à 6 carbones (**54**).

Ces résultats semblent indiquer que l'atome de brome réalise des interactions importantes au niveau de la partie droite de la « nouvelle » poche.

III.D. Série C

Dans la précédente étude de docking, le seul inhibiteur de la série C alors synthétisé, **62**, avait été modélisé (figure 78). Il avait été observé que le fragment quinoléine-imide se positionnait au niveau du noyau pyrimidinedione du TPI, de manière similaire à **58**. Cependant, la pyrimidinedione de **62** venait se placer dans la partie gauche de la « nouvelle » poche (en bleu, figure 78), occupant presque intégralement l'espace disponible dans cette zone.

III.D.1. Evaluation biologique

L'objectif du travail que nous avons fourni pour cette série d'inhibiteurs était d'explorer la partie gauche de la nouvelle poche, afin de déterminer quels éléments étaient importants pour l'interaction avec l'enzyme, quels étaient les substituants les plus adaptés pour réaliser un maximum d'interactions avec les résidus présents au niveau de cette poche. La bromo-pyrimidinedione de **62** a ainsi été remplacée par une pyrimidinedione non substituée ou portant un autre halogène ou encore par un autre cycle aromatique. Nous avons également modifié la position d'attache sur la pyrimidinedione du bras espaceur porté par la quinoléine-imide.

Les résultats de l'évaluation sur l'enzyme sont présentés dans le tableau 16.

L'inhibiteur le plus actif de la série C semble être celui comportant une pyrimidinedione bromée en position 5 (**62**). Malheureusement, en raison de problèmes de reproductibilité des manipulations biologiques, nous n'avons pas pu calculer sa CI_{50} .

La taille de l'atome d'halogène est déterminante pour l'activité puisque les analogues chlorés (**65**) ou iodé (**66**) sont beaucoup moins actifs que le composé bromé.

Le dérivé non substitué (**64**), en revanche, est un peu moins actif.

Un taux d'inhibition similaire est obtenu en remplaçant la pyrimidinedione par un phényle (**85**).

Enfin, relier la quinoléine-imide à la position 5 de la pyrimidinedione (**81**) plutôt qu'à la position 6 (**64**) a fourni un composé peu soluble mais qui semble être moins actif que **64**.

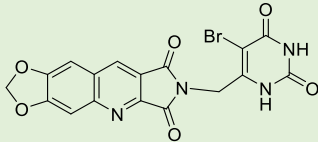
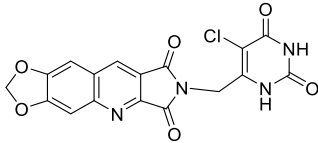
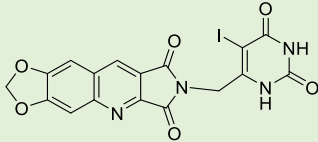
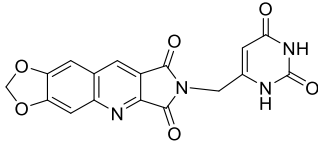
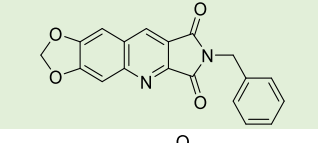
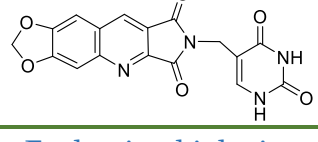
Référence	Structure	Inhibition
62		45 % à 15 μ M (non reproductible, $S_{\max} > 100 \mu\text{M}$)
65		Inactif à 75 μ M ($S_{\max} > 75 \mu\text{M}$)
66		Inactif à 75 μ M ($S_{\max} > 75 \mu\text{M}$)
64		25 % à 15 μ M ($S_{\max}$)
85		30 % à 15 μ M (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{\max} > 60 \mu\text{M}$)
81		Inactif à 30 μ M ($S_{\max}$)

Tableau 16 : Evaluation biologique des composés de la série C.

III.D.2. Etude de docking

Les résultats de l'évaluation biologique de **85** nous ont incités à modéliser à nouveau **62** mais également **85**, afin d'observer les interactions réalisées dans le site actif par le noyau aromatique (phényle ou pyrimidinedione) porté par l'imide.

On observe que le remplacement de la pyrimidinedione par un phényle permet de conserver la liaison hydrogène avec la sérine 217 mais entraîne la perte de celle établie avec la sérine 126 (non visible sur la figure 79). Le dérivé **85** se place néanmoins de manière assez stable dans le site actif, de manière similaire à **62**. Ces résultats expliquent que l'activité de **85** soit du même ordre que celle de **62**.

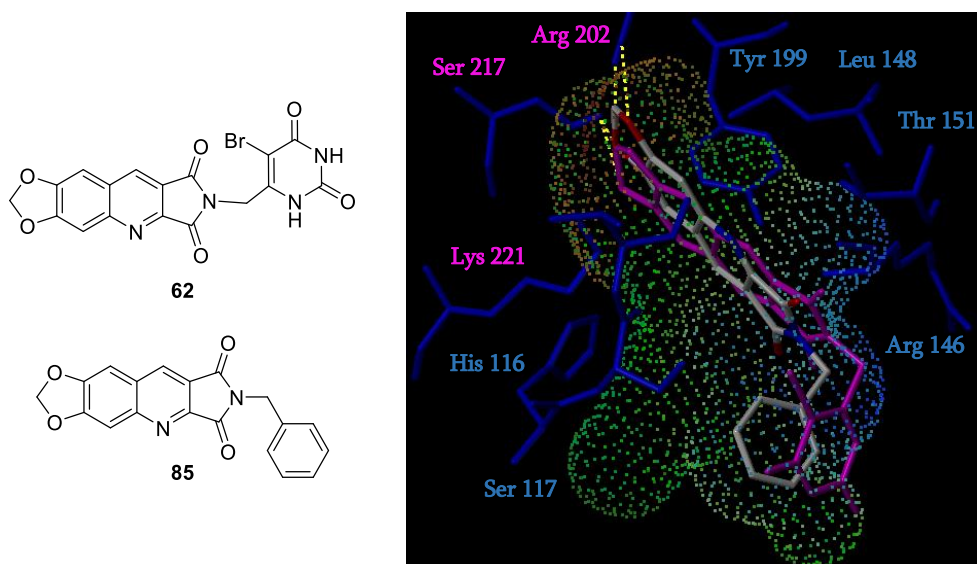


Figure 79 : Placement des composés 62 (en rose) et 85.

En conclusion, par rapport à un chlore ou un iode, l'atome de brome semble être un bon compromis entre les interactions avec les résidus de la poche et la gêne stérique. Bien que la pyrimidinédione de 62 ne semble pas indispensable à l'activité, elle réalise certainement des interactions qui sont perdues si on change son mode de liaison à la quinoléine-imide.

III.E. Série D

Dans la structure de cette nouvelle série d'inhibiteurs, une pyrimidinédione remplace le fragment méthylènedioxyphényle des séries B et C afin d'interagir de manière optimale avec le site de fixation de la thymidine. Par ailleurs, la substitution de l'atome d'azote de l'imide vise à aller interagir avec les résidus de la partie gauche de la « nouvelle » poche.

Etant donnés les résultats prometteurs obtenus avec 85 et pour des raisons de facilité de synthèse, l'imide a été d'abord substitué par un groupement benzylique puis divers substituants en série aromatique ou aliphatique.

III.E.1. **Evaluation biologique**

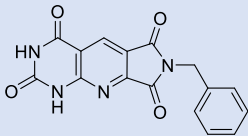
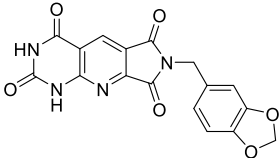
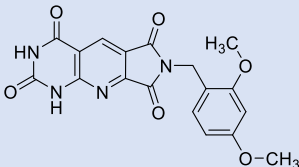
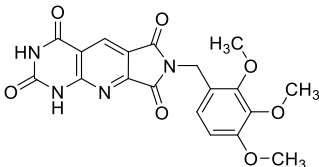
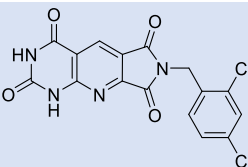
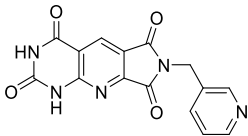
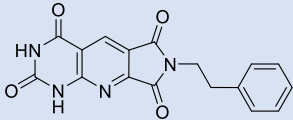
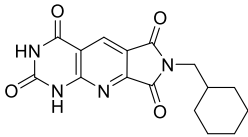
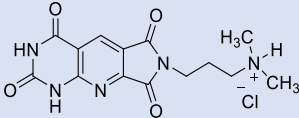
Pour l'évaluation biologique des produits de la série D (tableau 17), nous avons été fortement limités par la solubilité des inhibiteurs dans le milieu d'incubation.

Parmi ceux présentant le moins de problèmes de solubilité, les plus actifs sont les imides comportant un benzyle non substitué (90) ou un benzyle substitué sur les positions 3 et 4 par un méthylènedioxy (107). Introduire d'autres substituants sur le benzyle (105, 108 et 109), allonger le lien (111), ou remplacer le phényle par un groupement hétéroaromatique (110) ou aliphatique (112 et 114) conduit à des composés nettement moins actifs, la faible solubilité de certains d'entre eux étant un facteur limitant pour l'évaluation biologique (109 et 112).

Sans grande surprise, l'intermédiaire de synthèse 91 n'a montré aucune activité.

Les composés méthylés sur l'un ou les deux azotes de la pyrimidinedione (**120** et **121**), ainsi que l'intermédiaire de synthèse associé **251**, issus de l'extension de la méthodologie de synthèse aux dérivés polysubstitués, sont également inactifs. **251** n'a toutefois pas pu être testé au-delà de 15 μM car trop peu soluble.

Pour finir, les tentatives infructueuses pour remplacer le benzyle par une pyrimidinedione ont permis d'isoler le dérivé ouvert comportant deux amides substitués par une pyrimidinedione (**117**), qui s'est révélé bien plus soluble que le reste de la série D. Son activité est un peu plus faible que celle de **90**.

Référence	Structure	Inhibition
90		$\text{CI}_{50} = 62 \pm 7 \mu\text{M}$
107		45 % à 15 μM (non reproductible, $S_{\text{max}} > 80 \mu\text{M}$)
105		Inactif à 100 μM $S_{\text{max}} > 100 \mu\text{M}$
108		Inactif à 100 μM $S_{\text{max}} > 100 \mu\text{M}$
109		Inactif à 30 μM (S_{max})
110		Inactif à 60 μM $S_{\text{max}} > 60 \mu\text{M}$
111		Inactif à 100 μM $S_{\text{max}} > 100 \mu\text{M}$
112		Inactif à 30 μM (S_{max})
114		Inactif à 75 μM $S_{\text{max}} > 75 \mu\text{M}$

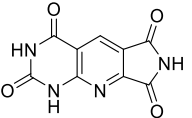
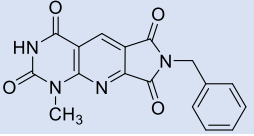
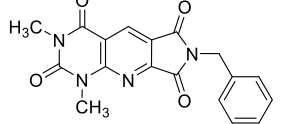
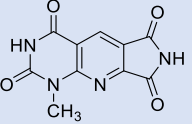
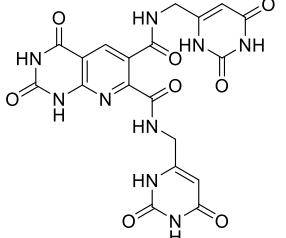
91		Inactif à 60 μM ($S_{\text{max}} > 60 \mu\text{M}$)
120		Inactif à 100 μM $S_{\text{max}} > 100 \mu\text{M}$
121		Inactif à 75 μM (S_{max})
251		Inactif à 15 μM (S_{max})
117		$\text{CI}_{50} = 87 \pm 4 \mu\text{M}$

Tableau 17 : Evaluation biologique des composés de la série D.

Dans l'ensemble, on peut observer que l'interaction avec les résidus situés dans la partie gauche de la poche n'est pas améliorée de manière significative avec les différents modes de substitution de l'imide. Enfin, la méthylation de l'un ou des deux azotes de la pyrimidinedione fait chuter l'activité, sans doute à cause de la perte des interactions entre cet hétérocycle et le site de fixation de la thymidine.

III.E.2. Etude de docking

Plusieurs composés de cette série ont été modélisés. Leur placement a été comparé à celui de **62** (figure 80). Par rapport au dioxolane de **62**, la pyrimidinedione de **90** se place de manière assez similaire, conservant la liaison hydrogène avec la sérine 217, et réalise deux liaisons supplémentaires avec la lysine 221 et l'arginine 202 au niveau du site thymidine. Ce placement particulièrement stable laisse envisager une activité au moins aussi bonne que **62**.

Les molécules **110** et **112** ont un placement très similaire à celui de **90**, tandis que celui de **105**, **107** et **109** est légèrement moins bon. De même, le tenseur à deux carbones de **111** et la chaîne aminoalkyle de **114** ne permettent pas à ces inhibiteurs d'adopter un positionnement plus favorable.

Les résultats de la modélisation s'accordent globalement assez bien avec ceux de l'évaluation biologique.

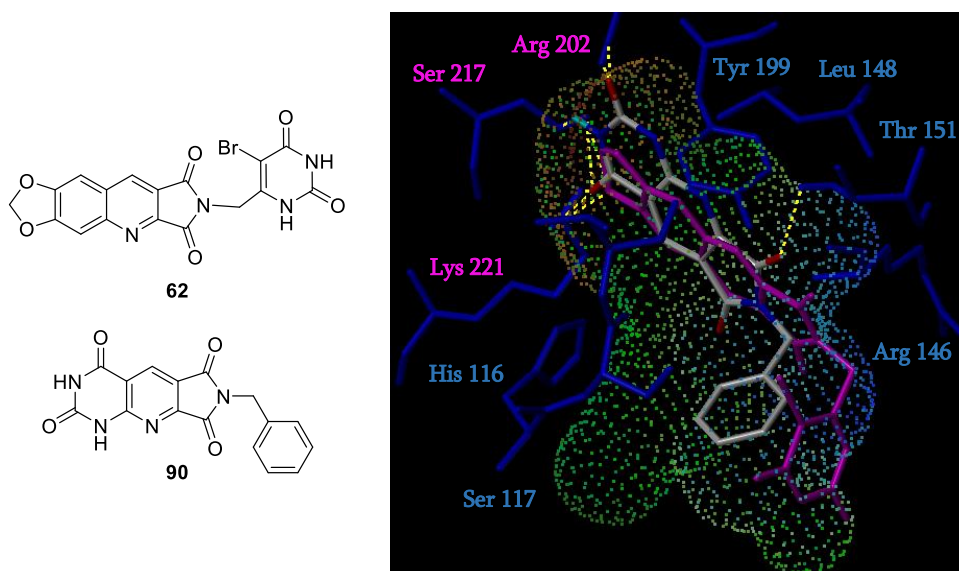


Figure 80 : Placement des composés 62 (en rose) et 90.

III.F. Séries E

III.F.1. Série E1

Les produits de la série E1 ont été conçus pour interagir avec les deux parties de la poche, le substituant de l'acétal étant d'un côté de la poche et celui du dihydropyran de l'autre. Comme dans le cas des séries B et C, le dioxolane accolé à la quinoléine devrait aller interagir avec le site de fixation de la thymidine.

III.F.1.a. Premiers inhibiteurs

Pour cette série, nous avons synthétisé dans un premier temps des inhibiteurs portant un phényle (en série pyrano, **173** et **174**) ou un benzylidène (en série furo, **177** et **178**), composés plus facilement accessibles que leurs analogues dotés de substituants aliphatiques. Cependant, leur évaluation biologique s'est révélée décevante (tableau 18), notamment à cause de problèmes de solubilité.

La modélisation de ces inhibiteurs a permis d'apporter des informations supplémentaires. Etant donné qu'ils possèdent un centre asymétrique, chacun des énantiomères *R* et *S* ont été modélisés, toujours par superposition à **62**.

L'énantiomère *R* de **177** se place assez bien, toutefois le phényle se positionne au niveau de la triade d'acides aminés du site de fixation de la thymidine. La liaison hydrogène avec la sérine 217 est perdue, mais une nouvelle est formée avec la thréonine 151 (par le groupement méthoxy). En revanche, l'énantiomère *S* peut se placer de la même façon mais aussi dans l'autre sens, ce qui suggère une moins bonne activité que pour l'énantiomère *R*.

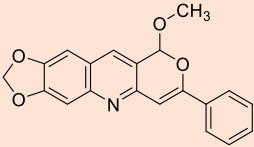
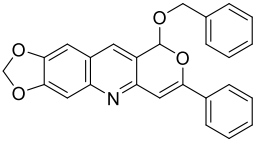
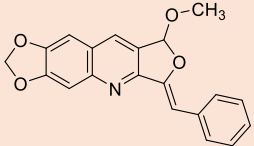
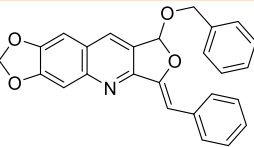
Référence	Structure	Inhibition
173		Inactif à 60 μM (S_{max})
174		Inactif à 30 μM (S_{max})
177		Inactif à 15 μM ($S_{\text{max}} < 15 \mu\text{M}$)
178		Inactif à 15 μM ($S_{\text{max}} < 15 \mu\text{M}$)

Tableau 18 : Evaluation biologique des inhibiteurs de la série E1 (substituents aromatiques)

Avec un encombrement plus important du fait de la présence du benzyloxy, **178** et **174** ont un placement moins favorable.

Pour finir, les deux énantiomères de **173** se positionnent à peu près comme **177-R**, la principale différence entre les deux énantiomères étant que seul **173-R** peut former la liaison hydrogène avec la thréonine 151 (figure 81).

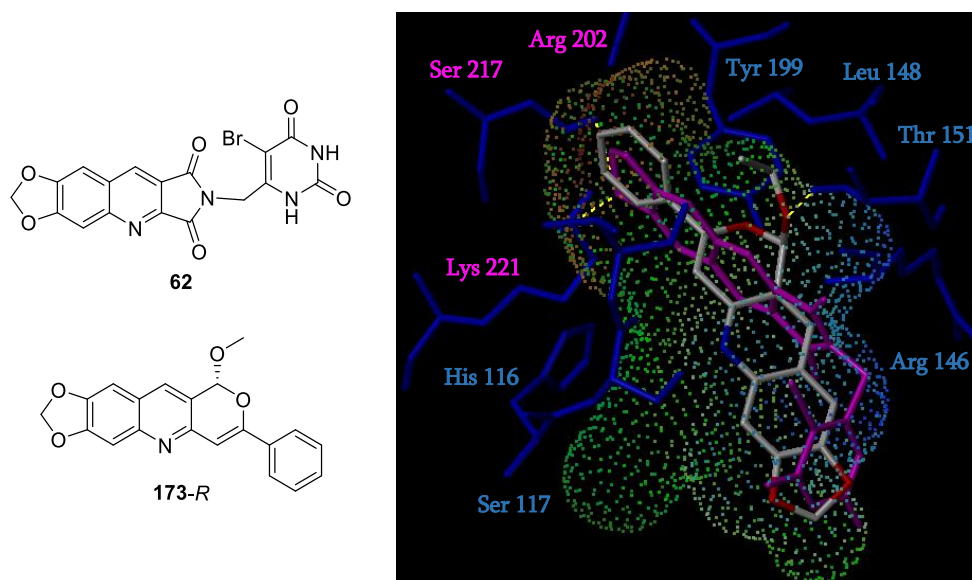


Figure 81 : Placement des composés **62** (en rose) et **173-R**.

La simulation prédit donc une assez bonne affinité pour **173**, légèrement inférieure pour **177** et vraiment plus faible pour les deux autres. On peut difficilement relier ces résultats à l'évaluation biologique, du fait du manque de solubilité de ces molécules.

III.F.1.b. Introduction de chaînes alkyles

D'autres substituants ont alors été introduits sur le pyrane ou le furane afin d'améliorer la solubilité. Il s'agit de chaînes alkyles comportant ou non un hétéroatome. Les résultats de leur évaluation sur l'enzyme sont regroupés dans le tableau 19.

Le dérivé pyrane substitué par un méthoxy et une chaîne alkyle (**176**) est un des plus actifs. L'analogue au noyau furane (**180**) est moins soluble et ne semble pas présenter de meilleure activité. Le remplacement de la chaîne propyle par une chaîne méthoxyméthyle aboutit à des inhibiteurs dont l'activité est proche, peut-être légèrement supérieure à **176**, que ce soit sur un noyau pyranoquinoléine (**175**) ou furoquinoléine (**179**). La présence d'un hétéroatome dans la chaîne substituant la double liaison du dihydropyrane ou du dihydrofurane améliore légèrement l'activité, cet atome pouvant potentiellement réaliser des liaisons hydrogène supplémentaires avec les résidus du site actif.

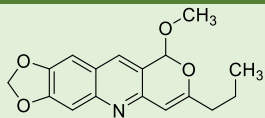
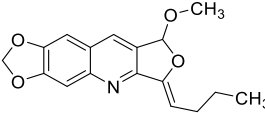
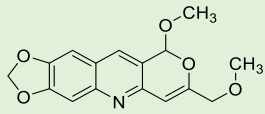
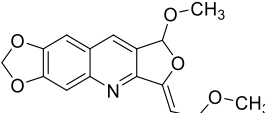
Référence	Structure	Inhibition
176		$CI_{50} = 84 \pm 13 \mu M$
180		Inactif à 30 μM (S_{max})
175		30 % à 45 μM (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{max} > 75 \mu M$)
179		40 % à 30 μM (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{max} > 75 \mu M$)

Tableau 19 : Evaluation biologique des composés de la série E1 (substituants aliphatiques).

III.F.2. Série E2

Bien que synthétisés dans le cadre de l'étude méthodologique de la réaction de cyclofonctionnalisation à l'argent, les dérivés de la série E2 qui possèdent une liaison carbone-carbone reliant la pyranoquinoléine à un hétérocycle azoté pentagonal ont été testés et les résultats sont regroupés dans le tableau 20.

De manière assez semblable à **173** et **174** (série E1), la pyranoquinoléine portant un indole en position 1 et un phényle en position 3 (**221**) n'est pas très soluble et n'a pas présenté d'activité.

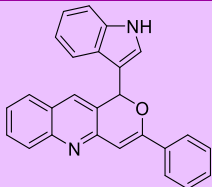
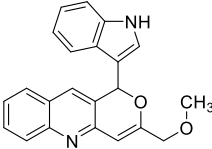
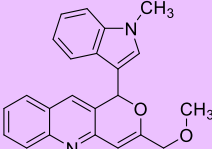
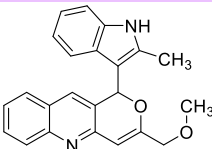
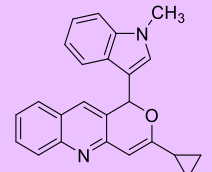
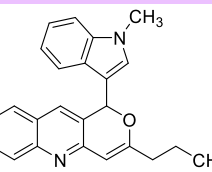
Remplacer le phényle par une chaîne méthoxyméthyle améliore nettement l'activité (**222**), certainement en partie grâce à une meilleure solubilité. La substitution de l'indole par un méthyle, qu'il soit en position 1 ou 2, n'influe que très peu sur l'activité (**186** et **187**). Les dérivés

N-H sont cependant plus solubles que le dérivé *N*-méthyle, ce qui est un point important pour un développement ultérieur.

Le remplacement du méthoxyméthyle par un cyclopropyle (**197**), un propyle (**198**), un isobutyle (**199**) ou un hexyle (**200**) permet de conserver à peu près l'activité. Cependant, l'évaluation est rendue difficile car la solubilité diminue avec la longueur de la chaîne carbonée.

La substitution du noyau quinoléique n'a pas d'effet manifeste sur l'activité, que ce soit pour la structure comportant une chaîne méthoxyméthyle (**204** et **208**) ou celle avec une chaîne propyle (**209**). Le composé **212**, avec un noyau aromatique supplémentaire annelé à la quinoléine, est lui moins actif. On notera que ces différentes molécules sont moins solubles que les analogues non substitués sur la quinoléine **186** et **198**.

Le remplacement de l'indole par un noyau *N*-méthylpyrrole (**188**) fournit un inhibiteur aussi actif que **187**. En revanche, le remplacement par un triméthylpyrrole (**220**) ou un pyrrole (**218**) donne des dérivés nettement moins actifs.

Référence	Structure	Inhibition
221		Inactif à 45 μ M ($S_{\max}$)
222		$CI_{50} = 28 \pm 2 \mu$ M
186		$CI_{50} = 23 \pm 1 \mu$ M
187		$CI_{50} = 15 \pm 2 \mu$ M
197		40 % à 30 μ M (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{\max} = 45 \mu$ M)
198		25 % à 15 μ M (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{\max} = 45 \mu$ M)

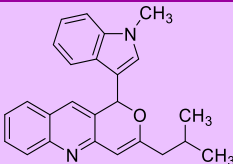
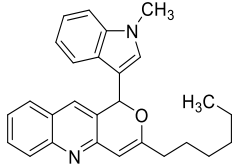
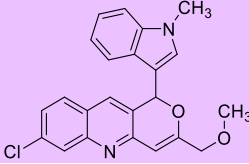
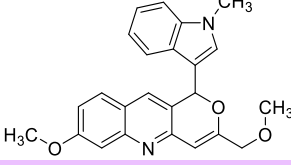
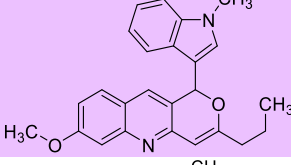
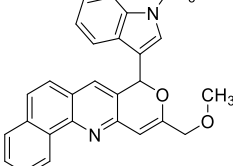
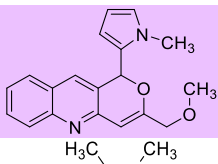
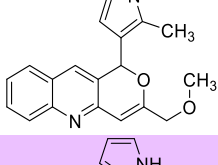
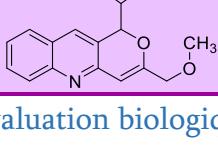
199		25 % à 10 μ M ($S_{\max}$)
200		25 % à 10 μ M ($S_{\max}$)
204		30 % à 15 μ M (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{\max}$ = 30 μ M)
208		30 % à 15 μ M (pas de relation dose-effet au-delà, $S_{\max}$ = 50 μ M)
209		35 % à 10 μ M (non reproductible, $S_{\max}$ = 40 μ M)
212		Inactif à 10 μ M ($S_{\max}$)
188		40 % à 10 μ M (non reproductible, $S_{\max}$ > 50 μ M)
220		Inactif à 50 μ M $S_{\max}$ > 50 μ M
218		Inactif à 45 μ M ($S_{\max}$)

Tableau 20 : Evaluation biologique des composés de la série E2.

Le mode d'action de l'un des inhibiteurs les plus actifs de cette série, **187**, a fait l'objet d'une étude mécanistique. Le diagramme double inverse obtenu à l'issue de cette étude révèle que **187** se comporte comme un inhibiteur de type mixte et n'entre donc pas en compétition avec le substrat thymidine (figure 82).

Diagramme Lineweaver-Burk

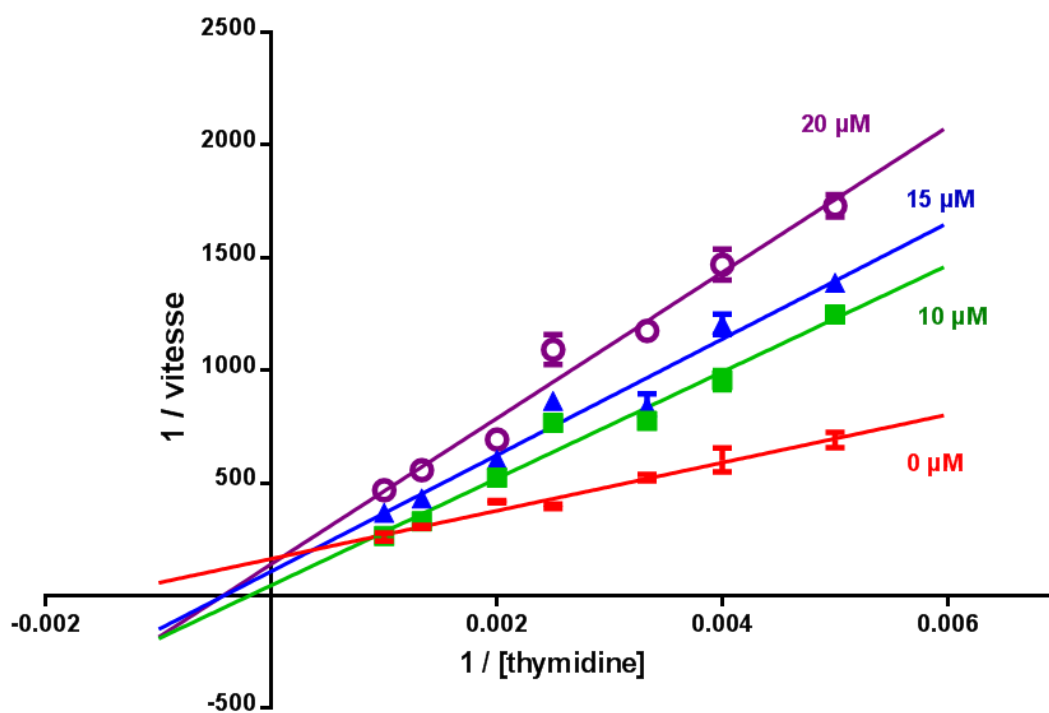


Figure 82 : Diagramme double inverse (ou Lineweaver-Burk) de 187.

Les sites d'interaction de **187** restent à déterminer.

Conclusion & perspectives

Conclusion & perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet de recherche qui a trait à la conception rationnelle, la synthèse et l'évaluation biologique d'inhibiteurs de la TPase. Des inhibiteurs de première génération **A**, **B** et **C** avaient été conçus en combinant le noyau pyrimidinedione du substrat naturel de l'enzyme (la thymidine), à un hétérocycle aromatique azoté par annélation ou par l'intermédiaire d'un espaceur de longueur variable. L'objectif était de combler les poches présentes dans le site actif de l'enzyme autour du site de liaison de la thymidine. Des travaux préliminaires de docking dans le site actif de la TPase ont permis de mettre en évidence une spécificité des premiers inhibiteurs qui interagissent avec une large poche qui était jusqu'alors inexplorée par les inhibiteurs décrits dans la bibliographie. De plus, ce docking a montré que pour les composés des **séries B et C**, la partie pyrroloquinoléine prend la place du noyau pyrimidinedione de la thymidine, ce qui suggère que le motif CO-NH-CO impliqué dans la liaison au site actif peut être remplacé par le motif dioxolane (en rose, schéma 117).

La poursuite de ces travaux a visé à améliorer les composés de première génération et à développer de nouvelles **séries D et E** afin d'optimiser les interactions avec le site de fixation de la thymidine ainsi que celles établies avec les acides aminés d'une poche mise en évidence par la modélisation moléculaire.

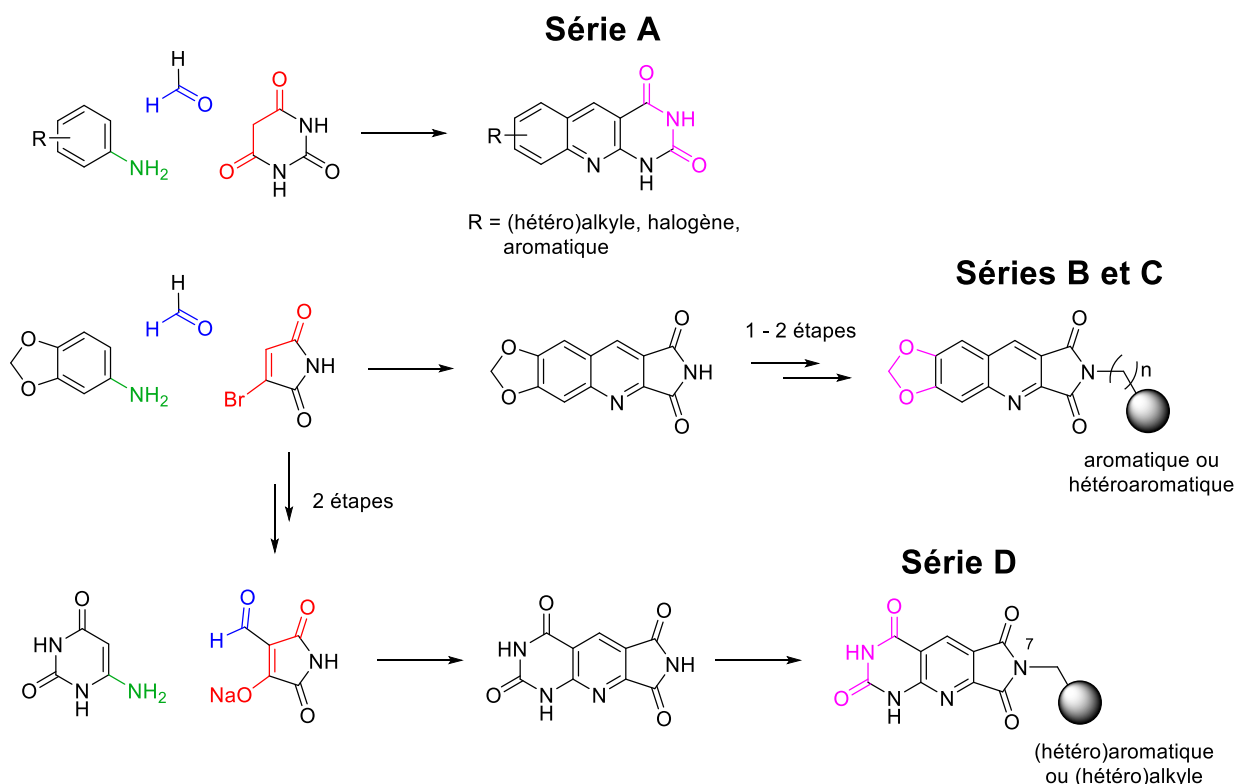
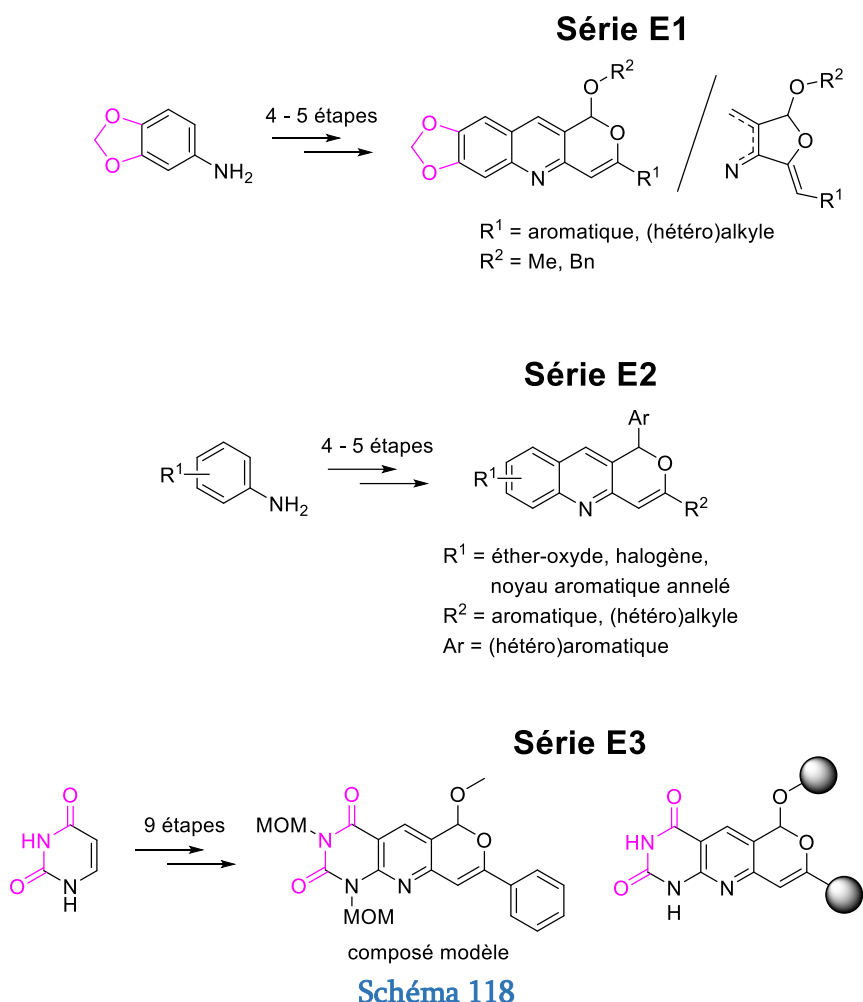


Schéma 117

Selon cette approche, huit nouveaux composés de type pyrimidinedione-quinoléine (**série A**), six dérivés possédant une structure pyrroloquinoléine / pyrimidinedione (**série C**) et douze molécules au squelette pyrrolo-pyrido-pyrimidinedione (**série D**) ont été préparés

(schéma 117). Des réactions multicomposants en un pot déjà maîtrisées au laboratoire ont été optimisées pour l'obtention de ces nouvelles molécules et de nouvelles voies de synthèse ont été développées, en particulier pour l'accès au squelette tricyclique de la **série D**. Pour cette dernière, un synthon original a été élaboré afin d'accéder à un intermédiaire tricyclique non substitué puis aux composés sélectivement substitués sur la position 7 (schéma 117).

Par ailleurs, en nous appuyant sur des méthodes de synthèse en catalyse organométallique développées antérieurement au sein de notre groupe, nous avons préparé neuf nouvelles structures de type furo- ou pyranoquinoléine (**série E1**, schéma 118). Une étude méthodologique nous a également permis d'introduire des nucléophiles aromatiques carbonés dans la réaction de cyclofonctionnalisation catalysée par des sels d'argent et ainsi d'accéder aux trente-deux molécules originales de la **série E2** (schéma 118). Enfin, la voie d'accès au squelette pyrano-pyrido-pyrimidinedione des dérivés de la **série E3** a été mise au point sur un composé modèle encore *N*-protégé (schéma 118).



A l'aide des protocoles décrits dans la littérature, nous avons mis au point un test enzymatique reproductible et à débit élevé, permettant de mesurer le potentiel d'inhibition vis-à-vis de l'EcTPase par détection UV *in situ* en plaque 96 puits. Néanmoins, une faible solubilité dans le milieu d'incubation a été un facteur limitant pour l'évaluation de certains de nos composés.

Un premier criblage a permis de mettre en évidence de bonnes activités (du même ordre que celle d'un inhibiteur de référence, la 7DX) pour plusieurs inhibiteurs au sein des différentes séries. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les **séries A et E2**.

La TPase étant une enzyme à deux substrats (la thymidine et le phosphate), nous avons vérifié que les inhibiteurs, conçus pour cibler le site de fixation de la thymidine, n'interagissaient pas avec le site de liaison du phosphate.

Une étude de modélisation moléculaire nous a aidés à rationaliser les résultats de l'évaluation biologique.

En **série A**, la présence d'un groupement en position 8 sur le squelette pyrimidoquinoléine est particulièrement favorable à l'activité, notamment un méthoxy, un phénoxy ou un benzyle. Une étude mécanistique a confirmé que le mode d'action de **13** (figure 83), le plus puissant inhibiteur de cette série, était bien de type compétitif. Il serait intéressant d'explorer davantage les possibilités de substitution de la position 8. On pourrait ainsi envisager d'introduire des chaînes hétéroalkyles de taille restreinte ou des groupements (hétéro)aromatiques reliés par un méthylène ou un hétéroatome à la pyrimidoquinoléine. Ces structures seraient obtenues aisément à l'aide de la réaction multicomposants en un pot.

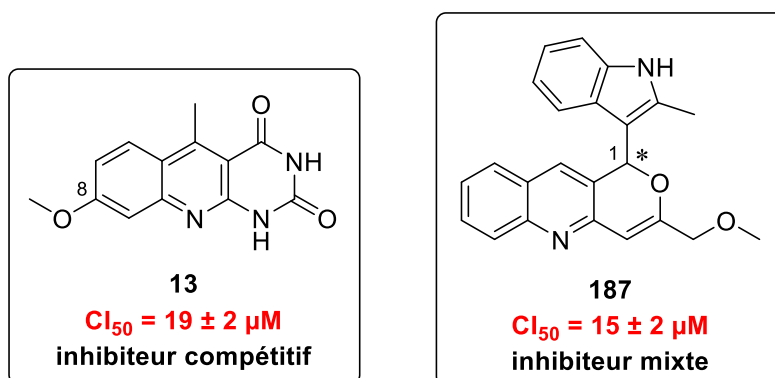


Figure 83 : Les composés **13** et **187**, inhibiteurs les plus puissants des séries A et E2.

Parmi les dérivés de la **série E2**, les meilleures activités ont été obtenues avec ceux comportant un noyau de type indole et une chaîne méthoxyméthyle sur le cycle pyrane. L'étude du mécanisme d'inhibition du composé le plus actif de cette série (**187**, figure 83), a mis en évidence une inhibition de type mixte.

Pour les **séries E**, les possibilités de substitutions sont nombreuses, à la fois sur le noyau quinoléine et le furane ou le pyrane. Il sera intéressant de contrôler la stéréosélectivité (au niveau de la position 1 de l'hétérocycle, figure 83) au cours de la réaction de cyclofonctionnalisation des substrats aldéhyde-ynes afin d'obtenir, puis d'évaluer séparément les deux énantiomères *R* et *S*. A ce jour, peu de travaux ont été publiés concernant ce type de réaction en version asymétrique, et aucun exemple de synthèse énantiosélective avec introduction de nucléophiles carbonés n'a encore été décrit.

Même si l'activité biologique des molécules de la [série E1](#) semble plus modeste, il serait intéressant de mener une étude mécanistique sur cette série, étude que nous n'avons pas pu effectuer par manque de temps.

Enfin, les résultats encourageants obtenus lors de l'évaluation sur l'EcTPase seraient à confirmer sur l'enzyme humaine. En effet, même si les deux sites actifs de ces enzymes sont très voisins, ce n'est pas le cas du reste de leurs structures. Cela est particulièrement important pour les inhibiteurs de la [série E2](#) qui semblent posséder un mécanisme d'action autre que compétitif et interagir avec un site allostérique de l'EcTPase.

Si ces composés sont également actifs sur l'HuTPase, leur site d'interaction sera identifié par exemple à l'aide d'une co-cristallisation. Les données topologiques de ce nouveau site de liaison permettront alors de rationaliser les choix de synthèse.

Experimental part

Materials and methods

Solvents and reagents

Solvents were distilled and stored under argon atmosphere with an appropriate desiccant before use. Commercial reagents were used as received without further purification. Reactions under microwave irradiation were carried out with a Biotage Initiator 2.0 apparatus.

Analyses

Reactions were followed with thin-layer chromatography (TLC) (using 0.20 mm silica or alumina gel 60 F₂₅₄ aluminum plates, Merck) and visualization was achieved with UV light (254 and 365 nm). Purifications were achieved through recrystallization, flash chromatography (using 40-63 μ M silica, Merck) or analytical TLC (using pre-coated 60 F₂₅₄ silica gel plates, Merck).

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 or 400 spectrometer by using chloroform-*d* or DMSO-*d*₆ as both solvent and internal standard.

Unless otherwise indicated, melting points were measured on a Stuart SMP3 melting point apparatus and are uncorrected. When specified, a Kofler bench or a Maquenne block was used instead. IR spectra were obtained on Perkin-Elmer 1600 spectrophotometer.

MS and HRMS were performed on a Q-TOF Waters spectrometer (UMR-8638, Paris, France) and on an ESI-MicroTOFQ-II Bruker spectrometer (UMR-5246, Lyon, France), under chemical ionization (CI), electronic impact (EI) or electron spray ionization (ESI) mode.

Elemental analyses were performed at the CNRS Analysis Laboratory, Gif-sur-Yvette, France.

NMR spectra description

Chemical shifts are reported in ppm relative to TMS and coupling constants (*J*) are given in Hertz. Spin multiplicities are reported as follows: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublet, ddd = doublet of doublet of doublets, dt = doublet of triplets, td = triplet of doublets, q = quadruplet, p = quintuplet, h = hexuplet, m = multiplet. In ¹³C spectra, C refers to quaternary carbon atoms. Peak assignment was performed thanks to 2D NMR experiments such as COSY, HSQC and HMBC.

Index of molecules

Molecule	Page number
10	227
21	228
22	228
23	229
24	230
25	230
26	231
27	231
28	232
46	235
52	235
60	237
62	241
64	241
65	242
66	243
67	238
68	238
70	237
78	239
79	239
81	243
82	244
84	239
85	245
90	256
91	254
92	249
94	249
95	249
96	250
99	251
100	251
102	252
103	252
104	253
105	257
106	257
107	258
108	258
109	259
110	260
111	260
112	261
113	261
114	261
115	265

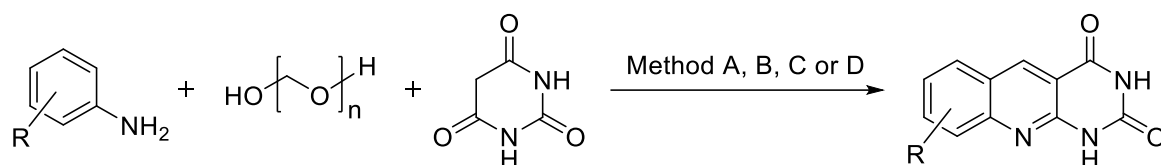
Molecule	Page number
117	265
120	262
121	263
134	270
135	270
136	271
137	271
138	272
140	272
141	273
144	275
145	276
146	277
147	277
148	277
149	278
150	279
151	279
151	280
153	273
154	274
155	280
156	281
157	281
158	282
159	282
160	283
161	284
162	284
163	285
164	285
165	286
166	286
167	287
168	288
169	288
170	289
171	289
172	290
173	292
174	292
175	293
176	294
177	295
178	295
179	296
180	297

Molecule	Page number
182	297
183	290
186	299
187	300
188	300
196	301
197	302
198	302
199	303
200	304
203	304
204	305
205	306
205	306
207	307
208	308
209	308
210	309
211	310
212	310
213	311
214	312
215	312
216	313
217	314
218	314
219	315
220	316
221	316
222	317
223	318
224	318
225	319
226	320
233	321
236	324
237	321
242	323
243	323
244	322
245	322
246	324
249	325
250	326
251	254
252	255

Series A

Pyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4-(1*H*,3*H*)-diones

One-pot synthesis - General procedures



Method A

A suspension of the requisite aniline (1.00 mmol, 1.0 eq.), barbituric acid (128 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and paraformaldehyde (30.0 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in acetic acid (200 mL) was refluxed during a time T.

Method B

A suspension of the requisite aniline (1.00 mmol, 1.0 eq.), barbituric acid (128 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and paraformaldehyde (30.0 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in acetic acid (100 mL) is refluxed during a time T.

Method C

A suspension of the requisite aniline (0.280 mmol, 1.0 eq.), barbituric acid (35.9 mg, 0.280 mmol, 1.0 eq.) and paraformaldehyde (8.4 mg, 0.280 mmol, 1.0 eq.) in acetic acid (100 mL) is refluxed during a time T.

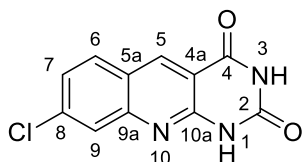
Method D

A suspension of the requisite aniline (1.00 mmol, 1.0 eq.), barbituric acid (128 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and paraformaldehyde (30.0 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in an acetic acid/DMF mixture (1:1 volumetric ratio, 10 mL) is heated to 120 °C during a time T.

8-Chloropyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4-(1*H*,3*H*)-dione

10

Following the [method A](#) with 3-chloroaniline (T = 24 h), the crude product was concentrated to dryness and the obtained suspension was filtered and the solid was washed with water, ethanol. Purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 1:0 to 9:1) afforded pure compound **10** as a pale grey powder.



Formula: C₁₁H₆ClN₃O₂

M_w: 247.64 g.mol⁻¹

Aspect: pale grey solid

R_f(DCM/MeOH, 98:2): 0.31

Yield: 30 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.81 (s, 1H, NH), 11.56 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, H⁵), 8.20 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H⁶), 7.86 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H⁹), 7.58 (dd, *J* = 2, 9 Hz, 1H, H⁷) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.5 (C, CO²), 151.5 (C), 151.0 (C, CO⁴), 150.2 (C), 139.6 (CH, C⁵), 138.3 (C), 132.2 (CH, C⁶), 126.3 (CH, C⁷), 125.9 (CH, C⁹), 123.7 (C, C^{5a}), 112.0 (C, C^{4a}) ppm.

IR (KBr): ν 3360, 3157, 2838, 1701, 1616, 1493, 1458, 1335, 1287, 1242, 1072, 1029, 974, 935, 876, 811, 789, 751, 738, 682, 642, 606, 542 cm^{-1} .

Mp: > 360 °C.

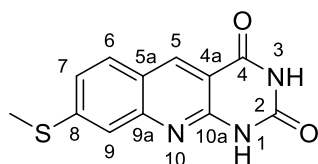
HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 270.0046, found: 270.0051.

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}_2 \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$: % C = 48.10, % H = 3.30, % N = 15.30; found: % C = 48.07, % H = 2.68, % N = 14.63.

8-Methylthiopyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

21

Following the **method B** with 3-methylthioaniline (T = 6 h), the crude product was evaporated to dryness and refluxed with 10 mL of water for 1 h. The obtained suspension was filtered and the solid was washed with water, ethanol and diethyl ether and then dried over P_2O_5 . Recrystallization in DMF afforded compound **21** as a yellowish solid.



Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

Mw: 259.28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: yellowish solid

Rf(DCM/MeOH, 9:1): 0.52

Yield: 49 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.64 (s, 1H, NH), 11.45 (s, 1H, NH), 8.90 (s, 1H, H⁵), 8.00 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H⁶), 7.47 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H⁹), 7.38 (dd, J = 8.7, 1.9 Hz, 1H, H⁷), 2.62 (s, 3H).ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.2 (C, CO⁴), 150.7 (C, CO² or C^{10a}), 150.6 (C, CO² or C^{10a}), 149.9 (C, C^{9a}), 145.9 (C, C⁸), 138.6 (CH, C⁵), 129.6 (CH, C⁶), 123.9 (CH, C⁷), 122.1 (C, C^{5a}), 119.6 (CH, C⁹), 109.8 (C, C^{4a}), 14.0 (CH₃, S-CH₃) ppm.

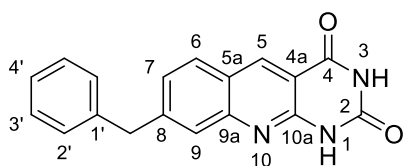
IR (neat): ν 3036, 2924, 2818, 1675, 1605, 1571, 1507, 1457, 1421, 1392, 1339, 1285, 1249, 1186, 1072, 1045, 936, 871, 803, 785, 745 cm^{-1} .

Mp: 299 - 301 °C (decomposition).

8-Benzylpyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

22

Following the **method D** with 3-benzylaniline (T = 3 h), the crude product was evaporated to dryness and refluxed with 10 mL of water for 1 h. The obtained suspension was filtered and the solid was washed with water, ethanol and diethyl ether and then dried over P_2O_5 . Recrystallization in DMF afforded pure compound **22** as a yellowish solid.



Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$

Mw: 303.32 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: yellowish solid

Rf(DCM/MeOH, 95:5): 0.33

Yield: 41 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.65 (s, 1H, NH), 11.47 (s, 1H, NH), 8.92 (s, 1H, H⁵), 8.04 (d, J = 8.4, H⁶), 7.64 (s, 1H, H⁹), 7.41 (dd, J = 8.4, 1.3, 1H, H⁷), 7.35 – 7.28 (m, 4H, H^{2'}+H^{3'}), 7.26 – 7.18 (m, 1H, H^{4'}), 4.16 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.3 (C, CO⁴), 150.7 (C), 150.2 (C, CO), 149.8 (C), 147.2 (C), 140.2 (C), 138.7 (CH), 129.8 (CH), 129.0 (2xCH), 128.6 (2xCH), 126.8 (CH), 126.3 (CH), 125.7 (CH), 123.1 (C), 110.5 (C), 41.3 (CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3135, 3045, 2909, 2833, 1731, 1703, 1679, 1611, 1580, 1513, 1490, 1451, 1397, 1344, 1315, 1285, 1268, 1027, 829, 789, 749, 705, 677 cm⁻¹.

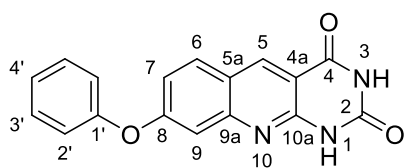
Mp: 297 – 299 °C (decomposition).

Microanalysis: calculated for C₁₈H₁₃N₃O₂ · 0.25 H₂O: % C = 70.23, % H = 4.42, % N = 13.65; found: % C = 70.00, % H = 4.54, % N = 13.72.

8-Phenoxypyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

23

Following the **method D** with 3-phenoxylaniline (T = 6 h), the crude product was evaporated to dryness and refluxed with 10 mL of water for 1 h. The obtained suspension was filtered and the solid was washed with water, ethanol and diethyl ether and then dried over P₂O₅. Recrystallization in DMF afforded pure compound **23** as a yellowish solid.



Formula: C₁₇H₁₁N₃O₃

M_w: 305.29 g.mol⁻¹

Aspect: yellowish solid

R_f(DCM/MeOH, 95:5): 0.40

Yield: 57 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.61 (s, 1H, NH), 11.46 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, H⁵), 8.16 (d, J = 9.0, 1H, H⁶), 7.5 (t, J = 7.8, 2H, H^{3'}), 7.34 – 7.28 (m, 2H, H⁷+H^{4'}), 7.22 (d, J = 7.8, 2H, H²) 6.98 (d, J = 2.0, 1H, H⁹) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.2 (C), 161.6 (C), 154.6 (C), 151.1 (C), 150.7 (C), 150.7 (C), 138.7 (CH, C⁵), 132.1 (CH, C⁶), 130.4 (2xCH, C^{3'}), 125.2 (CH, C⁷), 120.9 (C), 120.5 (2xCH, C²), 118.2 (CH, C^{4'}), 110.4 (CH, C⁹), 109.5 (C) ppm.

IR (neat): ν 3136, 3057, 3041, 2904, 2839, 1733, 1678, 1613, 1591, 1509, 1487, 1464, 1425, 1403, 1377, 1340, 1287, 1264, 1222, 1127, 970, 840, 817, 790, 775, 749, 707, 684 cm⁻¹.

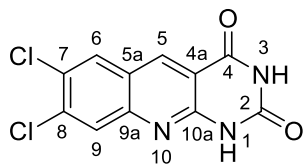
Mp: 334 – 336 °C (decomposition).

Microanalysis: calculated for C₁₇H₁₁N₃O₃ · 0.25 H₂O: % C = 65.91, % H = 3.74, % N = 13.56; found: % C = 65.93, % H = 3.87, % N = 13.77.

7,8-Dichloropyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

24

Following the **method B** with 3,4-dichloroaniline (T = 5 h), the suspension was filtered and the obtained solid was washed with water and diethyl ether and then dried over P₂O₅ to afford pure compound **24** as a yellow solid.

**Formula:** C₁₁H₅Cl₂N₃O₂**M_w:** 282.08 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow solid**R_f**(DCM/MeOH, 95:5): 0.53**Yield:** 17 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.88 (s, 1H, NH), 11.61 (s, 1H, NH), 9.04 (s, 1H, H⁵), 8.54 (s, 1H, H⁹), 8.09 (s, 1H, H⁶) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.8 (C, CO), 151.2, 150.6, 149.0, 138.4, 135.2, 130.2, 129.8, 127.5, 126.4, 126.4, 125.2, 122.8, 111.0 ppm.

IR (neat): ν 3179, 3053, 3024, 2837, 1690, 1655, 1624, 1578, 1560, 1481, 1450, 1418, 1369, 1335, 1265, 1182, 1126, 1034 cm⁻¹.

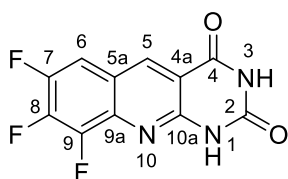
Mp: > 360 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₁H₅Cl₂N₃O₂ · CH₃COOH: % C = 45.64, % H = 2.65, % N = 12.28; found: % C = 45.40, % H = 2.39, % N = 12.23.

7,8,9-Trifluoropyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

25

Following the **method B** with 2,3,4-trifluoroaniline (T = 4 h), the crude product was evaporated to dryness and stirred with 10 mL of water for 1 h at r.t. The solid was isolated by filtration and purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 95:5) to afford compound **25** as a beige solid.

**Formula:** C₁₁H₄F₃N₃O₂**M_w:** 267.17 g.mol⁻¹**Aspect:** beige solid**R_f**(DCM/MeOH, 95:5): 0.23**Yield:** 33 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.01 (s, 1H, NH), 11.64 (s, 1H, NH), 9.08 (s, 1H, H⁵), 8.15 (s, 1H, H⁶) ppm.

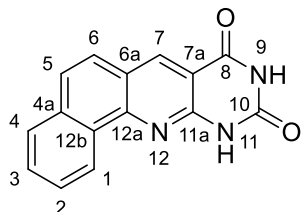
IR (neat): ν 3271, 3055, 2988, 2972, 2901, 1748, 1688, 1655, 1630, 1514, 1489, 1476, 1456, 1437, 1360, 1292, 1275, 1254, 1057, 1028 cm⁻¹.

Mp: 336 - 338 °C.

Benzo[*h*]pyrimido[4,5-*b*]quinoline-8,10(9*H*,11*H*)-dione

26

Following the **method B** with 1-naphthylamine ($T = 19.5$ h), the suspension was filtered and the obtained solid was washed with water and diethyl ether and then dried over P_2O_5 to afford pure compound **26** as a pink solid.

**Formula:** $C_{15}H_9N_3O_2$ **M_w:** 263.26 g.mol⁻¹**Aspect:** pink solid**R_f(DCM/MeOH, 95:5):** 0.31**Yield:** 32 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.88$ (s, 1H, NH), 11.57 (s, 1H, NH), 9.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H¹), 9.00 (s, 1H, H⁷), 8.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H⁴ or H⁵ or H⁶), 8.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H⁴ or H⁵ or H⁶), 7.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H⁴ or H⁵ or H⁶), 7.84 – 7.74 (m, 2H, H²+H³) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 162.4$ (C, CO), 150.7, 150.1, 148.5, 137.9, 134.8, 129.8, 129.4, 128.2, 127.1, 126.0, 125.9, 124.7, 122.4, 110.4 ppm.

IR (neat): ν 3063, 3038, 3022, 3007, 2841, 1688, 1645, 1618, 1601, 1578, 1559, 1541, 1508, 1473, 1437, 1419, 1394, 1327, 1281, 1271, 1225, 1213, 1196, 1146 cm⁻¹.

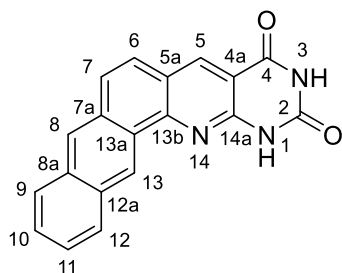
Mp: 326 – 328 °C.

Microanalysis: calculated for $C_{15}H_9N_3O_2 \cdot 1.25 H_2O$: % C = 63.04, % H = 4.06, % N = 14.70; found: % C = 62.93, % H = 3.58, % N = 14.97.

Naphtho[2,3-*h*]pyrimido[4,5-*b*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

27

Following the **method C** with 1-aminoanthracene ($T = 3$ h), the crude product was evaporated to dryness and stirred with 10 mL of water for 1 h at r.t. The obtained suspension was filtered and the solid was washed with water, ethanol and diethyl ether and then dried over P_2O_5 . Recrystallization in DMF afforded pure compound **27** as a green-brownish solid.

**Formula:** $C_{19}H_{11}N_3O_2$ **M_w:** 313.32 g.mol⁻¹**Aspect:** green-brownish solid**R_f(DCM/MeOH, 9:1):** 0.68**Yield:** 67 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.96$ (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, NH), 9.66 (s, 1H, H⁵), 8.93 (s, 1H, H⁸ or H¹³), 8.62 (s, 1H, H⁸ or H¹³), 8.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H¹⁰ or H¹¹), 8.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H¹⁰ or H¹¹), 7.91 (q, 2H, H⁶+H⁷), 7.70 (m, 2H, H⁹+H¹²) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.8 (C, CO), 151.1 (C), 150.9 (C), 150.5 (C), 137.6 (CH), 133.7 (C), 132.4 (C), 131.7 (C), 129.4 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (C), 127.9 (CH), 127.2 (CH), 127.0 (CH), 126.8 (CH), 125.9 (CH), 125.2 (CH), 122.9 (C), 110.8 (C) ppm.

IR (neat): ν 3042, 3028, 3011, 2992, 2974, 1713, 1682, 1609, 1585, 1566, 1541, 1506, 1489, 1454, 1393, 1337, 1277, 1206, 1038 cm^{-1} .

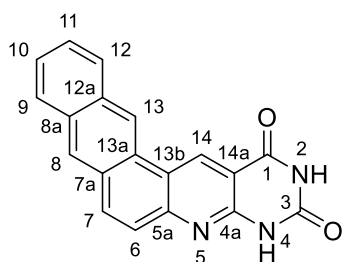
Mp: > 360 °C.

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 0.75 \text{ H}_2\text{O}$: % C = 70.15, % H = 3.82, % N = 12.92; found: % C = 69.98, % H = 3.38, % N = 12.95.

Naphtho[2,3-*f*]pyrimido[4,5-*b*]quinoline-1,3(2*H*,4*H*)-dione

28

Following the [method C](#) with 0.14 mmol of 2-aminoanthracene (T = 1.5 h), the crude product was evaporated to dryness and stirred with 10 mL of water for 1 h at r.t. The obtained suspension was filtered and the solid was washed with water, ethanol and diethyl ether and then dried over P_2O_5 . Recrystallization in DMF afforded pure compound **28** as a green-brownish solid.



Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$

Mw: 313.32 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: green-brownish solid

R_f(DCM/MeOH, 95:5): 0.71

Yield: 44 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.88 (s, 1H, N), 11.60 (s, 1H, NH), 9.74 (s, 1H, H¹⁴), 9.56 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.39 – 8.28 (m, 2H), 8.17 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.74 – 7.61 (m, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.4 (C, CO), 151.5 (C), 151.0 (C), 150.6 (C), 135.4 (CH), 132.3 (CH), 131.5 (C), 128.5 (C), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.2 (C), 126.7 (CH), 126.4 (CH), 126.3 (CH), 122.2 (CH), 121.5 (C), 114.5 (C), 109.5 (C) ppm.

IR (neat): ν 3190, 3161, 3078, 3053, 2992, 2941, 2932, 2822, 1703, 1678, 1611, 1568, 1541, 1489, 1456, 1435, 1391, 1362, 1342, 1323, 1306, 1271, 1032 cm^{-1} .

Mp: > 360 °C.

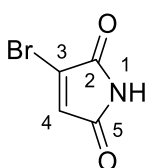
Microanalysis: calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 0.25 \text{ H}_2\text{O}$: % C = 71.80, % H = 3.65, % N = 13.22; found: % C = 71.80, % H = 3.36, % N = 13.16.

Series C

Bromomaleimide

52

To maleimide (5.00 g, 51.5 mmol) in DCM (80 mL) was added bromine (3.2 mL, 61.8 mmol, 1.2 eq.) in DCM (20 mL) dropwise. The reaction mixture was heated to reflux for 3 h and left to cool to r.t. over 1 h. The solvent was removed under reduced pressure. To eliminate the last traces of bromine, the resulting solid was stirred in DCM and the solvent was removed under reduced pressure (three times). The crude 2,3-dibromosuccinimide was dissolved in THF (80 mL) and Et₃N (7.2 mL, 51.5 mmol, 1.0 eq.) in THF (15 mL) was added over a 5 min period at 0 °C. The reaction mixture was warmed to r.t. and stirred for 18 h. The solid was removed by filtration and the solvent removed under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2) to afford **52** a pale yellow powder.

**Formula:** C₄H₂BrNO₂**M_w:** 175.97 g.mol⁻¹**Aspect:** yellowish solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.25**Yield:** 94 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.29 (s, 1H, NH), 7.32 (s, 1H, H⁴) ppm.

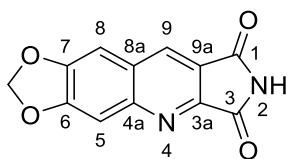
Mp: 151 - 153 °C (lit. 148 - 151 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁴⁵

1H-6,7-Methylenedioxyppyrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2H)-dione

46

3,4-methylenedioxyaniline (411 mg, 3.00 mmol, 1 eq.), paraformaldehyde (270 mg, 9.00 mmol, 3 eq.) and 3-bromomaleimide **52** (528 mg, 3.00 mmol, 1 eq.) were stirred in EtOH at r.t. for 1 night. The reaction mixture was then heated at 60 °C for 6 h. The resulting suspension was filtered off and the solid was washed with EtOH and water and dried over P₂O₅. The afforded product (ochre solid) was used with no further purification but recrystallisation in DMF gave an analytical sample of **46** (yellow solid).

**Formula:** C₁₂H₆N₂O₄**M_w:** 242.19 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow solid**R_f(DCM/EtOAc, 9:1):** 0.30**Yield:** 39 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.50 (s, 1H, NH), 9.01 (s, 1H, H⁹), 7.88 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.57 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 6.35 (s, 2H, O-CH₂-O) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.2 (C, CO), 169.3 (C, CO), 153.6 (C), 151.2 (C), 151.0 (C), 141.3 (C), 134.6 (CH, C⁹), 123.2 (C), 119.0 (C), 106.3 (C, C⁵ or C⁸), 103.8 (CH, C⁵ or C⁸), 98.7 (O-CH₂-O) ppm.

IR (KBr): ν 3449, 2956, 2723, 1771, 1720, 1623, 1573, 1471, 1411, 1330, 1265, 1100, 1030, 935, 872, 790, 748 cm⁻¹.

Mp: 366 - 368 °C (DMF, decomposition).

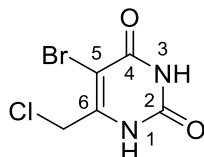
Microanalysis: calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 0.25 \text{ H}_2\text{O}$: % C = 58.42, % H = 2.66, % N = 11.36; found: % C = 58.35, % H = 2.49, % N = 11.35.

Pyrimidine-2,4-(1H,3H)-diones

5-Bromo-6-(chloromethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

60

To a solution of 6-(chloromethyl)uracile **59** (803 mg, 5.00 mmol) in DMF (10 mL) at 0 °C was added NBS (979 mg, 5.50 mmol, 1.1 eq.). After 40 min at 0 °C, the reaction mixture is poured into 30 mL of water. The formed precipitate was recovered by filtration, washed with water and dried over P₂O₅ to afford **60** as a white solid.



Formula: C₅H₄BrClN₂O₂

M_w: 239.45 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.39

Yield: 82 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.68 (s, 1H, NH), 11.63 (s, 1H, NH), 4.47 (s, 2H, CH₂) ppm.

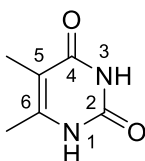
Mp: 244 - 248 °C (decomposition, lit. 244 - 246 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.¹⁵⁵

5,6-Dimethylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

70

To a solution of sodium methoxide, freshly prepared with sodium (3.50 g, 150 mmol, 3.0 eq.) and MeOH, in EtOH (225 mL) were added **71** (7.1 mL, 50.0 mmol) and urea (12.0 g, 200 mmol, 4 eq.) and the mixture was heated to reflux for 24 h. Then, the crude was concentrated under reduced pressure and water was then added (25 mL). Neutralization with HCl 6N, filtration and drying over P₂O₅ afforded **70** as a white solid which was used without further purification.



Formula: C₆H₈N₂O₂

M_w: 140.14 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.38

Yield: 53 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.84 (s, 1H, NH), 10.64 (s, 1H, NH), 2.02 (s, 3H, CH₃), 1.70 (s, 3H, CH₃) ppm.

Mp: 274 - 276 °C (decomposition, lit. 295 - 297 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁴⁶

³⁴⁶ A. Shamshad, R. Lofthouse, G. Shaw, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1976**, 18, 1969-75.

6-(Hydroxymethyl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

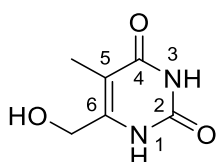
68

Oxydation

To a solution of **70** (701 mg, 5.00 mmol) in 1,4-dioxane (75 mL) was added selenium dioxide (1.66 g, 15.0 mmol, 3 eq.) and the mixture was heated at reflux overnight. Then, the mixture was filtered through a short pad of Celite, eluted with a DCM/MeOH 7:3 mixture and concentrated under reduced pressure. This afforded aldehyde **69** as a white solid, which was used for the next step without further purification.

Reduction of the aldehyde

To a solution of the product obtained in the oxydation step **69** (771 mg, 5.00 mmol) in MeOH cooled at 0 °C was added sodium borohydride (416 mg, 11.0 mmol, 2.2 eq.). After 1h, the reaction mixture was allowed to reach r.t. and ammonium chloride (2.70 g) was added. The crude was concentrated under reduced pressure and then purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 9:1 to 75:25) to afford **68** as a white solid.



Formula : C₆H₈N₂O₃

M_w: 156.14 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.24

Yield: 81 % (from **70**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.97 (s, 1H, NH), 10.16 (s, 1H, NH), 5.43 (s, 1H, OH), 4.24 (s, 2H, CH₂), 1.74 (s, 3H, CH₃) ppm.

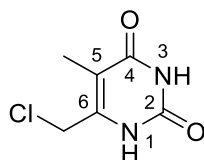
Mp: 226 - 228 °C (decomposition, lit. 225 - 226 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.¹⁵³

6-(Chloromethyl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

67

A solution of **68** (78.1 mg, 0.500 mmol) in thionyl chloride (1 mL) was heated at reflux for 2 h. EtOH (3 mL) was added and the mixture was concentrated under reduced pressure. The procedure was repeated 3 times with 5 mL of EtOH to eliminate the residual thionyl chloride. Purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 1:0 to 9:0) afforded **67** as a white solid.



Formula: C₆H₇ClN₂O₂

M_w: 174.58 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.52

Yield: 84 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.17 (s, 1H, NH), 10.88 (s, 1H, NH), 4.43 (s, 2H, CH₂), 1.82 (s, 3H, CH₃) ppm.

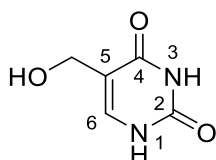
Mp: 237 - 239 °C (lit. 244 - 245 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.¹⁵³

5-(Hydroxymethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

78

To a suspension of uracil (5.61 g, 50.0 mmol) and paraformaldehyde (4.51 g, 150 mmol, 3.0 eq.) in water (150 mL) was added Et₃N (10.5 mL, 75.0 mmol, 1.5 eq.) and the mixture was heated at 65 °C overnight. Then, the solvent was evaporated to its tenth and EtOH (15 mL) was added. The crude was cooled at 4 °C for 2 h and the precipitate was isolated by filtration, washed with EtOH and dried over P₂O₅. **78** was obtained as a white solid and was used without further purification.

**Formula:** C₅H₆N₂O₃**M_w:** 142.11 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(DCM/MeOH, 8:2):** 0.45**Yield:** 93 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.04 (s, 1H, NH), 10.74 (s, 1H, NH), 7.24 (s, 1H, H⁶), 4.85 (s, 1H, OH), 4.10 (s, 2H, CH₂) ppm.

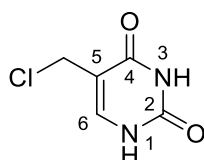
Mp: 279 - 281 °C (decomposition, lit. > 300 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²³⁷

5-(Chloromethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

79

A suspension of **78** (1.42 g, 10.0 mmol) in HCl 12N (20 mL) was stirred at r.t. for 2 h. The solid was isolated by filtration and dried over P₂O₅ to afford pure **79** as a white solid.

**Formula:** C₅H₅ClN₂O₂**M_w:** 160.56 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(DCM/MeOH, 9:1):** 0.43**Yield:** 83 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.27 (s, 1H, NH), 11.03 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.74 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H⁶), 4.41 (s, 2H, CH₂) ppm.

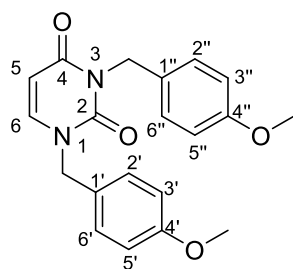
Mp: > 360 °C (lit. decomposition at 355 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²³⁷

1,3-Bis(4-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

84

To a suspension of uracil (673 mg, 6.00 mmol) and K₂CO₃ (2.49 g, 18.0 mmol, 3.0 eq.) in anhydrous DMF (15 mL) was added a solution of 4-methoxybenzyl chloride (2.44 mL, 10.0 mmol, 3.0 eq.) in anhydrous DMF (5 mL) and the mixture was heated at 100 °C for 2 h. After filtration, the crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 1:0 to 99:1). The obtained residue was stirred in Et₂O to afford **84** as a white precipitate.



Formula: C₂₀H₂₀N₂O₄

M_w: 352.39 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 99:1): 0.38

Yield: 87 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H^{2'} or H^{3'} or H^{2''} or H^{3''}), 7.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H^{2'} or H^{3'} or H^{2''} or H^{3''}), 7.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H^{6'}), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H^{2'} or H^{3'} or H^{2''} or H^{3''}), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H^{2'} or H^{3'} or H^{2''} or H^{3''}), 5.71 (d, *J* = 7.9, 1H, H^{5'}), 5.07 (s, 2H, N¹-CH₂ or N³-CH₂), 4.83 (s, 2H, N¹-CH₂ or N³-CH₂), 3.80 (s, 3H, O-CH₃), 3.78 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

Mp: 91 - 93 °C (lit. 96 - 97 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁴⁷

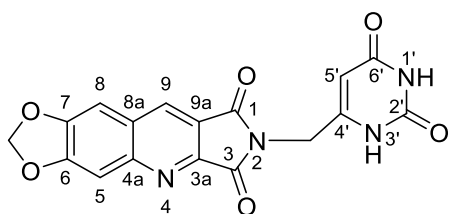
³⁴⁷ M. Cernova, I. Cerna, R. Pohl, M. Hocek, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5309-19.

Pyrimidine-2,4-(1*H*,3*H*)-diones / 1*H*-6,7-methylenedioxy pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2*H*)-diones

2-[(2,6-Dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)methyl]-6,7-methylenedioxy-1*H*-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2*H*)-dione

64

To a suspension of the chlorinated derivative **59** (482 mg, 3.00 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous acetonitrile (10 mL) was added the BSA (1.5 mL, 6.00 mmol, 3.0 eq.) at r.t. When the reaction mixture became clear (15 min), it was added to a suspension of imide **46** (484 mg, 2.00 mmole, 1 eq.) and K₂CO₃ (415 mg, 3.00 mmol, 1.5 eq.) in distilled anhydrous acetonitrile (10 mL) and the mixture was heated at reflux for 5 days. Then, a solution of **59** (241 mg, 1.50 mmol, 0.75 eq.) and BSA (0.85 mL, 3.48 mmol, 1.74 eq.) in acetonitrile (5 mL) was added and the reflux was maintained during 2 more days. After having removed the solvent by evaporation under vacuum, the residue was stirred with water (10 mL) and HCl 1N was added until pH = 3. The resulting solid was isolated by filtration, washed with water and EtOH and dried over P₂O₅. Recrystallisation in DMF afforded **64** as a yellow solid.



Formula: C₁₇H₁₀N₄O₆

M_w: 366.29 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.40

Yield: 79 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.07 (s, 1H, NH), 11.03 (s, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, H⁹), 7.89 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.60 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 6.37 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.55 (s, 1H, H⁵), 4.51 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.8 (C, CO), 167.0 (C, CO), 163.8 (C, CO), 153.4 (C), 151.3 (C), 150.9 (C), 150.9 (C), 150.7 (C), 140.8 (CH), 133.8 (C), 122.1 (C), 118.5 (C), 105.9 (CH, C⁵ or C⁸), 103.4 (CH₂, O-CH₂-O), 98.2 (CH, C⁵ or C⁸), 97.1 (CH, C⁵), 37.4 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3185, 3106, 3056, 3001, 2817, 1772, 1702, 1650, 1494, 1455, 1414, 1392, 1341, 1322, 1307, 1264, 1230, 1177, 1104, 1030, 1014, 930, 866, 847, 828, 794, 752 cm⁻¹.

Mp: 407 - 409 °C (Maquenne, decomposition).

Microanalysis: calculated for C₁₇H₁₀N₄O₆ · 0.5 H₂O: % C = 54.41, % H = 2.95, % N = 14.93; found: % C = 54.10, % H = 3.05, % N = 14.94.

2-[(5-Bromo-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)methyl]-6,7-methylenedioxy-1*H*-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2*H*)-dione

62

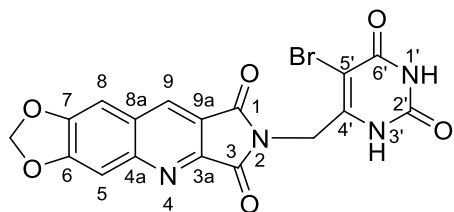
From **46**

To a suspension of the chlorinated derivative **60** (359 mg, 1.50 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous acetonitrile (5 mL) was added the BSA (0.62 mL, 2.50 mmol, 2.5 eq.) at r.t. When the reaction mixture became clear (15 min), it was added to a suspension of imide **46** (242 mg, 1.00 mmole, 1 eq.) and K₂CO₃ (207 mg, 1.50 mmole, 1.5 eq.) in distilled anhydrous acetonitrile (5 mL) and the mixture was heated at reflux for 10 days. After having removed the solvent by evaporation under vacuum, the residue was stirred with

water (10 mL) and 1N chlorhydric acid was added until pH = 3. The resulting solid was isolated by filtration and washed with EtOH. Purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 100:0 to 9:1) afforded **62** as a yellow solid.

From **64**

To a suspension of **64** (293 mg, 0.800 mmol) in anhydrous DMF (8 mL), NBS (214 mg, 1.20 mmol, 1.5 eq.) was added and mixture was stirred overnight at r.t. Then, the reaction was cooled at 0 °C and water (8 mL) was added. The resulting precipitate was isolated by filtration and washed with water and EtOH. Recrystallisation in DMF afforded **62** as a yellow solid.



Formula: C₁₇H₉BrN₄O₆

M_w: 445.19 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.45

Yield: 5 % (from **46**) 59 % (from **64**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.64 (s, 1H, NH), 11.37 (s, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, H⁹), 7.92 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.63 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 6.39 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.74 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.3 (C, CO), 167.0 (C, CO), 160.2 (C, CO), 154.0 (C), 151.6 (C), 151.2 (C), 150.7 (C), 148.8 (C), 141.3 (CH, C⁹), 134.4 (C), 122.7 (C), 118.9 (C), 106.4 (CH, C⁵ or C⁸), 103.9 (CH₂, O-CH₂-O), 98.6 (CH, C⁵ or C⁸), 94.8 (C), 39.7 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (KBr): ν 3002, 2957, 2912, 2820, 1786, 1707, 1650, 1619, 1492, 1457, 1427, 1385, 1340, 1314, 1263, 1233, 1032, 930, 873, 861, 802, 757, 743, 733, 684, 662 cm⁻¹.

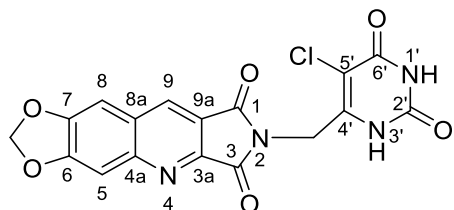
Mp: 370 - 372 °C (Maquenne, decomposition).

Microanalysis: calculated for C₁₇H₉BrN₄O₆ · 0.75 H₂O: % C = 44.51, % H = 2.31, % N = 12.21; found: % C = 44.64, % H = 2.22, % N = 12.00.

2-[(5-Chloro-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)methyl]-6,7-methylenedioxy-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2H)-dione

65

To a suspension of **64** (183 mg, 0.500 mmol) in anhydrous DMF (5 mL), NCS (93.5 mg, 0.700 mmol, 1.4 eq.) was added and mixture was stirred overnight at r.t. Then, the reaction was cooled at 0 °C and water (5 mL) was added. The resulting precipitate was isolated by filtration and washed with water and EtOH. Recrystallisation in DMF afforded **65** as a yellow solid.



Formula: C₁₇H₉ClN₄O₆

M_w: 400.73 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.55

Yield: 44 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.65 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 9.12 (s, 1H, H⁹), 7.91 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.61 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 6.38 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.77 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.7 (C, CO), 166.9 (C, CO), 159.4 (C, CO), 153.5 (C), 151.1 (C), 150.7 (C), 149.9 (C), 146.7 (C), 140.8 (CH, C⁹), 133.8 (C), 122.1 (C), 118.4 (C), 105.9 (CH, C⁵ or C⁸), 104.3 (C), 103.4 (CH₂, O-CH₂-O), 98.1 (CH, C⁵ or C⁸), 36.9 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3256, 3180, 3143, 3051, 3005, 2808, 1773, 1702, 1668, 1618, 1501, 1462, 1420, 1386, 1344, 1316, 1259, 1224, 1105, 1035, 925, 892, 876, 796, 762, 750 cm⁻¹.

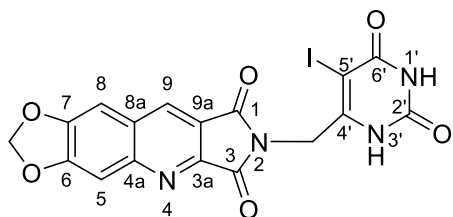
Mp: 352 - 354 °C (Maquenne, decomposition).

Microanalysis: calculated for C₁₇H₉ClN₄O₆ · 0.5 H₂O: % C = 49.83, % H = 2.46, % N = 13.67; found: % C = 49.87, % H = 2.22, % N = 13.48.

2-[(5-Iodo-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)methyl]-6,7-methylenedioxy-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2H)-dione

66

To a suspension of **64** (147 mg, 0.400 mmol) in anhydrous DMF (4 mL), NIS (135 mg, 0.600 mmol, 1.5 eq.) was added and mixture was stirred overnight at r.t. Then, the reaction was cooled at 0 °C and water (4 mL) was added. The resulting precipitate was isolated by filtration and washed with water and EtOH to afford pure **66** as a white solid.



Formula: C₁₇H₉IN₄O₆

M_w: 492.19 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.56

Yield: 91 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.49 (s, 1H, NH), 11.27 (s, 1H, NH), 9.12 (s, 1H, H⁹), 7.92 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.62 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 6.38 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.70 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.9 (C, CO), 167.1 (C, CO), 161.2 (C, CO), 153.5 (C), 151.1 (C), 150.8 (C), 150.7 (C), 150.7 (C), 140.8 (CH, C⁹), 134.0 (C), 122.3 (C), 118.4 (C), 105.9 (CH, C⁵ or C⁸), 103.4 (CH₂, O-CH₂-O), 98.1 (CH, C⁵ or C⁸), 70.4 (C), 43.5 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3040, 2948, 2912, 2814, 1785, 1725, 1703, 1649, 1614, 1492, 1458, 1437, 1387, 1338, 1314, 1264, 1233, 1032, 931, 873, 862, 803, 760, 743, 733 cm⁻¹.

Mp: 365 - 367 °C (Maquenne, decomposition).

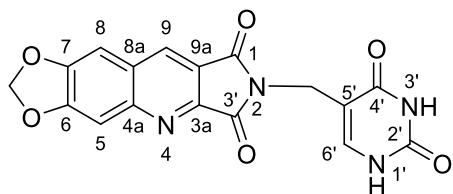
Microanalysis: calculated for C₁₇H₉IN₄O₆: % C = 41.49, % H = 1.84, % N = 11.38; found: % C = 41.10, % H = 1.51, % N = 11.08.

2-[(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)methyl]-6,7-methylenedioxy-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2H)-dione

81

To a suspension of the imide **46** (72.7 mg, 0.300 mmol) and K₂CO₃ (124 mg, 0.900 mmol, 3 éq.) in anhydrous DMF (3 mL) was added **79** (48.2 mg, 0.300 mmol, 1 eq.) and the mixture was heated at reflux overnight. The crude was concentrated under reduced pressure, water (3 mL) was added and

acidification was performed with HCl 1N until pH = 3. The suspension was filtered and the solid was washed with water and EtOH and dried over P₂O₅. Recrystallization in DMSO afforded **81** as a brownish solid.



Formula: C₁₇H₁₀N₄O₆

M_w: 366.29 g.mol⁻¹

Aspect: brownish solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.43

Yield: 24 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.18 (s, 1H, NH), 10.92 (s, 1H, NH), 9.05 (s, 1H, H⁴), 7.89 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.57 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.52 (s, 1H, H⁶), 6.35 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.41 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.0 (C, CO), 167.2 (C, CO), 163.4 (C, CO), 153.3 (C), 151.2 (C), 150.9 (C), 150.7 (C), 140.7 (CH, C⁹), 140.3 (CH, C⁶), 133.6 (C), 122.0 (C), 118.5 (C), 106.5 (C), 105.9 (CH, C⁵ or C⁸), 103.4 (CH₂, O-CH₂-O), 98.2 (CH, C⁵ or C⁸), 34.2 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3054, 2980, 2919, 2807, 1770, 1698, 1666, 1622, 1489, 1455, 1422, 1400, 1385, 1348, 1269, 1229, 1179, 1034, 1019, 940, 876, 795, 745 cm⁻¹.

Mp: 297 - 299 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₇H₁₀N₄O₆Na [M+Na]⁺: 389.0498, found: 389.0508.

2-[(1,3-Bis(4-methoxybenzyl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)methyl]-6,7-methylenedioxy-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3(2*H*)-dione

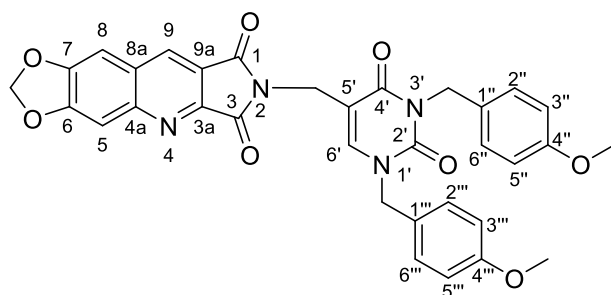
82

Chloromethylation of **84**

To a solution of **84** (176 mg, 0.500 mmol) in 1,4-dioxane (5 mL) was added paraformaldehyde (75.1 mg, 2.50 mmol, 5 eq.) and HCl 12N (0.25 mL) and the mixture was heated at 80 °C for 3 h. Then saturated sodium bicarbonate solution (5 mL) and DCM (20 mL) were added. The aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL) then the organic layer was washed with saturated NaCl solution (10 mL) and dried with anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The obtained intermediate **83** was used for the coupling reaction without further purification.

Coupling with imide **46**

To a suspension of imide **46** (202 mg, 0.833 mmol) and K₂CO₃ (173 mg, 1.25 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous DMF (4 mL) was added a solution of derivative **83** (401 mg, approx. 1.00 mmol, 1.2 eq.) in anhydrous DMF (4 mL) and the mixture was stirred at r.t. overnight. The crude was concentrated under reduced pressure, water (15 mL) was added and acidification was performed with HCl 1N until pH = 3. The suspension was filtered and the solid was washed with water and MeOH to afford pure **82** as a yellowish solid.

**Formula:** C₃₃H₂₆ClN₄O₈**M_w:** 606.59 g.mol⁻¹**Aspect:** yellowish solid**R_f(DCM/MeOH, 99:1):** 0.18**Yield:** 88 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.10 (s, 1H, H⁹), 7.95 (s, 1H, H^{6'} or H⁵ or H⁸), 7.92 (s, 1H, H^{6'} or H⁵ or H⁸), 7.60 (s, 1H, H^{6'} or H⁵ or H⁸), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H^{2''} or H^{3''} or H^{2'''} or H^{3'''}), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H^{2''} or H^{3''} or H^{2'''} or H^{3'''}), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H^{2''} or H^{3''} or H^{2'''} or H^{3'''}), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H^{2''} or H^{3''} or H^{2'''} or H^{3'''}), 6.37 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.89 (s, 2H, N^{1'}-CH₂ or N^{3'}-CH₂), 4.82 (s, 2H, N^{1'}-CH₂ or N^{3'}-CH₂), 4.48 (s, 2H, N²-CH₂), 3.72 (s, 3H, O-CH₃), 3.70 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.3 (C, CO), 167.6 (C, CO), 162.1 (C, CO), 159.3 (C), 159.0 (C), 153.9 (C), 151.4 (C), 151.2 (C), 151.1 (C), 142.1 (CH), 141.2 (CH), 134.0 (C), 129.9 (2xCH), 129.5 (2xCH), 129.4 (C), 128.8 (C), 122.4 (C), 119.0 (C), 114.4 (2xCH), 114.1 (2xCH), 107.3 (C), 106.4 (CH), 103.9 (CH₂, O-CH₂-O), 98.7 (CH), 55.6 (O-CH₃), 55.5 (O-CH₃), 51.7 (N-CH₂), 43.6 (CH₂, N-CH₂), 35.3 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3108, 3036, 2910, 2836, 1765, 1696, 1668, 1638, 1612, 1512, 1489, 1457, 1397, 1333, 1247, 1231, 1175, 1106, 1033, 939, 799, 774, 745 cm⁻¹.

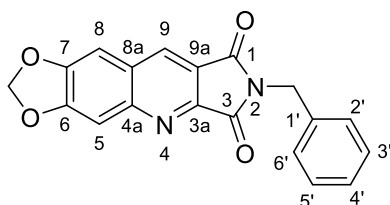
Mp: 218 - 220 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₃₃H₂₆ClN₄O₈Na [M+Na]⁺: 629.1648, found: 629.1650.

6,7-Methylenedioxy-2-benzylpyrrolo[3,4-*b*]quinoline-1,3-dione

85

A suspension of imide **46** (121 mg, 0.500 mmol) and K₂CO₃ (207 mg, 1.50 mmol, 3.0 eq.) in anhydrous DMF (7 mL) was stirred at r.t. After solubilisation of **46**, benzyl bromide (0.293 mL, 2.50 mmol, 5.0 eq.) was added, and after 5 min, the crude was filtered and water (40 mL) was added. The precipitate was isolated by filtration and solubilized in DCM. The organic phase was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure and the residual solid was washed 4 times with diethyl ether to afford pure **85** as a yellowish solid.

**Formula:** C₁₉H₁₂N₂O₄**M_w:** 332.32 g.mol⁻¹**Aspect:** yellowish solid**R_f(DCM/EtOAc, 9:1):** 0.54**Yield:** 65 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.05 (s, 1H, H⁹), 7.85 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.54 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.42 – 7.23 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'} + H^{5'} + H^{6'}), 6.35 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.79 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.1 (C, CO), 167.4 (C, CO), 153.4 (C), 150.9 (C), 150.8 (C), 140.8 (C + CH), 136.5 (CH), 133.3 (C), 128.6 (2xCH), 127.5 (2xCH), 121.7 (C), 118.5 (C), 105.9 (CH), 103.4 (CH), 98.2 (O-CH₂-O), 41.0 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3107, 3048, 2914, 1765, 1704, 1617, 1495, 1454, 1427, 1390, 1343, 1316, 1258, 1228, 1175, 1033, 938, 886, 860, 796, 757, 747, 703, 696 cm^{-1} .

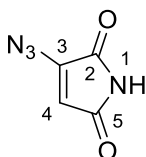
Mp: 191 - 193 °C.

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 0.25 \text{H}_2\text{O}$: % C = 67.75, % H = 3.74, % N = 8.32; found: % C = 67.46, % H = 3.71, % N = 8.06.

Series D

3-Azido-1H-pyrrole-2,5-dione**94**

A solution of 3-bromomaleimide **52** (1.00 g, 5.70 mmol) and sodium azide (2.22 g, 34.2 mmol, 6.0 eq.) in DMF (5 mL) was stirred for 3 h at r.t. After addition of water (50 mL) to the reaction mixture and extraction with DCM, the organic layers were dried with anhydrous Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with ligroin to give a crude brown solid **94** which was used without further purification.

**Formula:** C₄H₂N₄O₂**M_w:** 138.09 g.mol⁻¹**Aspect:** brown solid**R_f(DCM/MeOH, 95:5):** 0.58**Yield:** 65 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.02 (s, 1H, NH), 6.14 (s, 1H, H⁴) ppm.

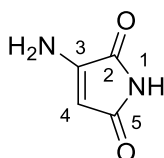
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.0 (C, CO), 167.8 (C, CO), 144.2 (C, C³), 109.3 (CH, C⁴) ppm.

IR (neat): ν 3215, 3124, 2294, 2133, 2094, 1774, 1697, 1605, 1370, 1330, 1303, 1247, 1133, 1043 cm⁻¹.

Mp: 119 - 121 °C (Kofler).

3-Amino-1H-pyrrole-2,5-dione**92**

A solution of azide **94** (240 mg, 1.74 mmol) in EtOH (20 mL) was hydrogenated for 2 h at r.t. in the presence of Pd/C (10 %, 56 mg) under a hydrogen atmosphere. After filtration through a pad of Celite, concentration under reduced pressure afforded quite pure compound **92** as an orange powder which was used without further purification in the next step.

**Formula:** C₄H₄N₂O₂**M_w:** 112.09 g.mol⁻¹**Aspect:** orange solid**R_f(DCM/MeOH, 90:10):** 0.58**Yield:** 94 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.02 (s, 1H, NH), 7.10 (s, 2H, NH₂), 4.71 (s, 1H, H⁴) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.1 (C, CO), 169.7 (C, CO), 151.3 (C, C³), 86.1 (CH, C⁴) ppm.

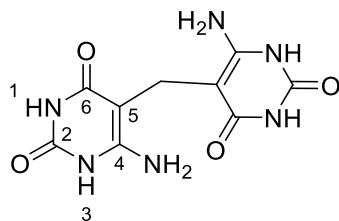
IR (neat): ν 3380, 3171, 3101, 2736, 1761, 1705, 1629, 1603, 1400, 1345, 1271, 1186, 1116 cm⁻¹.

Mp: 245 - 247 °C (Kofler).

Bis(4-amino-2,6-dioxo-5-tetrahydropyrimidinyl)methane**95**

A solution of paraformaldehyde (15.0 mg, 0.500 mmol), 3-bromomaleimide **52** (88.0 mg, 0.500 mmol), and 6-aminouracil (64.0 mg, 0.5 mmol) was heated to reflux in glacial AcOH (5 mL) for 18 h. After filtration of the hot solution, after cooling to r.t., the purple precipitate was purified by sequential

heating to reflux in AcOH and in water. The resulting precipitate was filtered off to give compound **95** as a white powder.



Formula: C₉H₁₀N₆O₄

M_w: 266.22 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

Yield: 27 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.48 (s, 2H, 2xNH), 10.24 (s, 2H, 2xNH), 6.73 (s, 4H, 2xNH₂), 3.02 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.2 (2xC, CO), 154.1 (2xC, C⁴), 150.3 (2xC, CO), 85.3 (2xC, C⁵), 16.30 (CH₂) ppm.

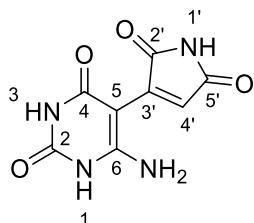
IR (neat): ν 3343, 3160, 2985, 2787, 1707, 1592, 1527, 1456, 1387, 1161, 1092, 1018 cm⁻¹.

Mp: 351 - 353 °C (decomposition).

6-Amino-5-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

96

A solution of 3-bromomaleimide **52** (88.0 mg, 0.500 mmol) and 6-aminouracil (64.0 mg, 0.500 mmol) in DMF (5 mL) was stirred at 120 °C for 48 h. After concentration under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (Silica gel, DCM/MeOH, 9:1) to afford compound **96** as a yellow powder.



Formula: C₈H₆N₄O₄

M_w: 222.16 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.16

Yield: 15 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.80 (s, 2H, 2xNH), 10.67 (s, 1H, NH), 7.35 (s, 2H, NH₂), 6.85 (s, 1H, H^{4'}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.1 (C, CO), 173.0 (C, CO), 163.2 (C, CO), 154.4 (C, CO), 150.0 (C, C^{3'}), 141.7 (C, C⁶), 125.1 (CH, C^{4'}), 79.8 (C, C⁵) ppm.

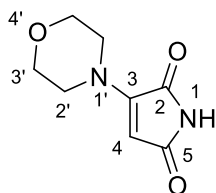
IR (neat): ν 3407, 3239, 3024, 2921, 1762, 1698, 1612, 1541, 1512, 1453, 1400, 1339, 1287, 1225, 1125, 1028 cm⁻¹.

Mp: 363 - 365 °C (Maquenne).

MS (ESI): m/z = 221 [M-H]⁻.

3-Morpholino-1H-pyrrole-2,5-dione

To a solution of 3-bromomaleimide **52** (780 mg, 4.44 mmol) in THF (29 mL), Et₃N (682 μ L, 4.88 mmol, 1.1 eq.) and morpholine (427 μ L, 4.88 mmol, 1.1 eq.) were added dropwise. After 1 h of stirring at r.t., the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was washed with EtOH (13 mL) and filtered off to give **99** as a yellow powder.



Formula: C₈H₁₀N₂O₃

M_w: 182.18 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 75:25): 0.10

Yield: quant.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.30 (s, 1H, NH), 5.11 (s, 1H, H⁴), 3.64 (m, 8H, H² + H³) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.8 (C, CO), 169.0 (C, CO), 150.8 (C, C³), 91.0 (CH, C⁴), 66.1 (2xCH₂, C³), 47.3 (2xCH₂, C²) ppm.

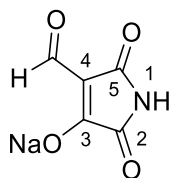
IR (neat): ν 3117, 3036, 2994, 2925, 2871, 2747, 1710, 1621, 1597, 1466, 1452, 1432, 1348, 1303, 1261, 1238, 1111, 1065, 1034 cm⁻¹.

Mp: 238 - 240 °C (Kofler).

Microanalysis: calculated for C₈H₁₀N₂O₃ · 0.25 H₂O: % C = 51.47, % H = 5.67, % N = 15.01; found: % C = 51.39, % H = 5.49, % N = 14.75.

4-Formyl-3-hydroxy-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrole, Sodium Salt

Under vigorous stirring, POCl₃ (0.4 mL, 4.30 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise to a suspension of compound **99** (400 mg, 2.15 mmol) in DMF (0.7 mL) over a 4 min period to avoid the temperature of the reaction mixture rising above 20 °C. The reaction mixture was stirred at r.t. for 2 h. After cooling and addition of water (2 mL), the suspension was basified with an aqueous 8N NaOH solution until pH = 9-10. The mixture was then stirred at 40 °C overnight. The precipitate was filtered off, washed with a 1:1 water/EtOH mixture (10 mL) and vacuum-dried with P₂O₅ to give salt **100** as a light yellow powder.



Formula: C₅H₂NO₄Na

M_w: 163.06 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

Yield: 85 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.07 (s, 1H, NH or OH), 9.20 (s, 1H, CHO) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 179.7 (CH, CHO strong signal), 177.4 (C, C³), 173.5 (C, CO), 167.6 (C, CO), 102.1 (C, C⁴) ppm.

IR (neat): ν 3404, 3181, 3077, 2695, 1790, 1744, 1720, 1676, 1653, 1626, 1590, 1468, 1401, 1365, 1329, 1231, 1095 cm⁻¹.

Mp: 312 - 314 °C (decomposition).

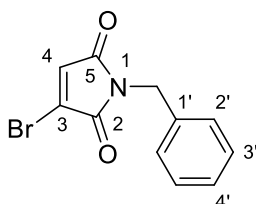
MS(ESI): $m/z = 140$ $[M-Na]^-$

Microanalysis: calculated for $C_5H_2NNaO_4 \cdot H_2O$: % C = 33.16, % H = 2.23, % N = 7.74; found: % C = 33.18, % H = 2.00, % N = 7.74.

1-Benzyl-3-bromo-1H-pyrrole-2,5-dione

102

To a solution of benzylmaleimide (2.78 g, 14.8 mmol), in DCM (20 mL) was added dropwise a solution of bromine (1.10 mL, 21.4 mmol, 1.45 eq.) in DCM (20 mL) at r.t. Then, the mixture was refluxed for 2 h and the organic phase was washed with water (3 x 20 mL), dried with Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The resulting an orange oil was solubilized in THF (60 mL), a solution of Et_3N (2.2 mL, 15.8 mmol, 1.07 eq.) in THF (8 mL) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred at r.t. overnight. After filtration of the crude and washing of the Et_3N salts with THF (3 x 10 mL), concentration under reduced pressure and purification by column chromatography (silica gel, DCM/cyclohexane, 8:2) afforded **102** as a beige solid.



Formula: $C_{11}H_8BrNO_2$

M_w: 266.09 g.mol⁻¹

Aspect: beige solid

R_f(DCM/cyclohexane, 8:2): 0.67

Yield: quant.

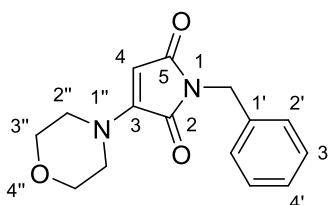
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.51$ (s, 1H, H⁴), 7.37 – 7.22 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 4.63 (s, 2H, Ph-CH₂) ppm.

Mp: 50 - 52 °C (lit. 51 - 52 °C).³⁴⁸

1-Benzyl-3-morpholino-1H-pyrrole-2,5-dione

103

To a solution of 1-benzyl-3-bromomaleimide **102** (3.41 g, 12.8 mmol) in DCM (50 mL), Et_3N (1.79 mL, 12.8 mmol, 1.0 eq.) and morpholine (1.23 mL, 14.1 mmol, 1.1 eq.) were added dropwise. After 3 h of stirring at r.t., the organic layer was washed with water (3 x 30 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was washed with MeOH (40 mL) to give **103** as a yellow powder.



Formula: $C_{15}H_{16}N_2O_3$

M_w: 272.30 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM): 0.46

Yield: 82 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.35 - 7.20$ (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 5.26 (s, 1H, H⁴), 4.53 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.67 (m, 8H, H^{2''} + H^{3''}) ppm.

³⁴⁸ M. Dubernet, V. Caubert, J. Guillard, M.-C. Viaud-Massuard, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4585-93.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.4 (C, CO), 167.0 (C, CO), 150.6 (C, C³), 137.7 (C, C¹), 129.0 (2xCH, C^{2'} or C^{3'}), 127.8 (CH, C^{4'}), 127.7 (2xCH, C^{2'} or C^{3'}), 89.1 (CH, C⁴), 66.0 (2xCH₂, C^{2''} or C^{3''}), 47.4 (2xCH₂, C^{2''} or C^{3''}), 40.5 (CH₂, Ph-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 2994, 2877, 1747, 1698, 1617, 1587, 1497, 1454, 1432, 1406, 1390, 1346, 1304, 1282, 1255, 1240, 1209, 1133, 1120, 1100, 1077, 1043, 1028 cm⁻¹.

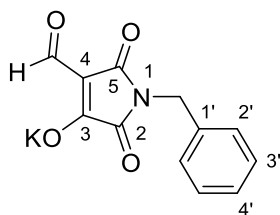
Mp: 132 - 134 °C (Kofler).

Microanalysis: calculated for C₁₅H₁₆N₂O₃: % C = 66.16, % H = 5.92, % N = 10.29; found: % C = 66.01, % H = 5.96, % N = 10.35.

1-Benzyl-4-formyl-3-hydroxy-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrole, Potassium Salt

104

Under vigorous stirring, POCl₃ (2 mL, 21.5 mmol, 5.8 eq.) was added dropwise to a suspension of compound **103** (1.0 g, 3.68 mmol) in DMF (8 mL) over a period of 4 min to avoid the temperature of the reaction mixture rising above 20 °C. The reaction mixture was stirred at r.t. for 1 h. After removal of the solvent under reduced pressure, water (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. for 20 h. The resulting precipitate was filtered off and dried over P₂O₅. To a suspension of iminium salt in MeOH (3 mL) a methanolic KOH solution (536 mg in 15 mL, 9.50 mmol) was added. The mixture was then stirred at r.t. overnight. The precipitate was filtered off, washed with cold MeOH (2 mL) and dried over P₂O₅ to give **104** potassium salt as a white powder.



Formula: C₁₂H₈KNO₄

M_w: 269.30 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

Yield: 45 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.27 (s, 1H, CHO), 7.25 – 7.20 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 4.55 (s, 2H, Ph-CH₂) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 178.9 (CH, CHO strong signal), 165.7 (C, CO), 138.3 (C, C¹), 128.9 (2xCH, C^{2'} or C^{3'}), 127.7 (2xCH, C^{2'} or C^{3'}), 127.5 (CH, C^{4'}), 100.8 (C, C⁴), 39.8 (CH₂, Ph-CH₂) ppm. (C² and C³ or C⁵ are not visible)

IR (neat): ν 3030, 2797, 2728, 1766, 1709, 1661, 1569, 1542, 1495, 1455, 1428, 1398, 1342, 1273, 1108, 925 cm⁻¹.

Mp: 238 - 240 °C.

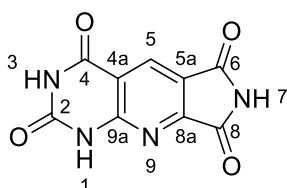
Microanalysis: calculated for C₁₂H₈KNO₄: % C = 53.52, % H = 2.99, % N = 5.20; found: % C = 53.20, % H = 2.96, % N = 4.99.

Pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8-(3H,7H)-tetraones

1H-Pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

91

To a solution of 6-aminouracil (221 mg, 1.74 mmol, 1.1 eq.) in TFA (11 mL) was added synthon **100** sodium salt (315 mg, 1.58 mmol). After stirring overnight at r.t., the resulting precipitate was filtered off, washed with EtOH (5 x 1 mL) and diethyl ether (5 x 2 mL). To eliminate the last traces of TFA, the resulting solid was stirred in EtOH and the solvent was removed under reduced pressure (five times) to give pure compound **91** as a yellow powder.



Formula: C₉H₄N₄O₄

M_w: 232.16 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 85:15): 0.17

Yield: 94 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.44 (s, 1H, NH), 11.82 (s, 1H, NH), 11.84 (s, 1H, NH), 8.45 (s, 1H, H⁵) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.0 (C, CO), 166.9 (C, CO), 162.0 (C, CO), 157.4 (C, C^{9a}), 157.1 (C, C^{8a}), 150.5 (C, CO), 131.9 (CH, C⁵), 122.5 (C, C^{5a}), 113.2 (C, C^{4a}) ppm.

IR (neat): ν 3300, 3067, 3003, 2916, 2800, 1782, 1729, 1706, 1671, 1606, 1534, 1470, 1407, 1372, 1300, 1279, 1106, 1042, 1010, 890, 850, 817, 790, 740, 726 cm⁻¹.

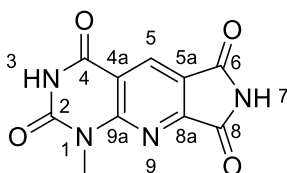
Mp: > 410 °C (Maquenne).

Microanalysis: calculated for C₉H₄N₄O₄ · 0.25 H₂O: % C = 45.68, % H = 1.92, % N = 23.67; found: % C = 45.47, % H = 1.85, % N = 23.39.

1-Methyl-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

251

Compound **251** was prepared in accordance with the same procedure and work-up as described for compound **91** by using 6-amino-1-methyluracile **119** (117 mg, 0.829 mmol, 1.1 eq.) in TFA (6 mL), and synthon **100** (150 mg, 0.723 mmol). After 24 h at r.t., the reaction afforded **251** as a yellow powder.



Formula: C₁₀H₆N₄O₄

M_w: 246.18 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.39

Yield: 57 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.12 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH), 8.52 (s, 1H, H⁵), 3.57 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.9 (C, CO), 166.8 (C, CO), 160.9 (C, CO), 157.0 (C, C^{9a}), 156.4 (C, C^{8a}), 150.7 (C, CO), 132.0 (CH, C⁵), 122.3 (C, C^{5a}), 114.5 (C, C^{4a}), 29.6 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3515, 3304, 3187, 3061, 2803, 1786, 1754, 1738, 1692, 1615, 1602, 1505, 1472, 1416, 1397, 1381, 1346, 1313, 1292, 1181, 1121, 1074, 993, 947, 849, 818 cm⁻¹.

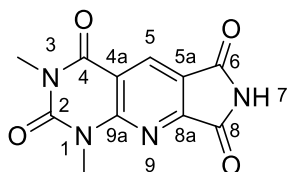
Mp: 311 - 313 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₀H₆N₄O₄ · H₂O: % C = 45.46, % H = 3.05, % N = 21.21; found: % C = 45.09, % H = 2.63, % N = 20.80.

1,3-Dimethyl-1*H*-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8(3*H*,7*H*)-tetraone

252

Compound **252** was prepared in accordance with the same procedure and work-up as described for compound **91** by using 6-amino-1,3-dimethyluracile **87** (144 mg, 0.928 mmol, 1.1 eq.) in TFA (6 mL), and synthon **100** (160 mg, 0.844 mmol). After 72 h at r.t., the reaction afforded **252** as a yellow powder.



Formula: C₁₁H₈N₄O₄

M_w: 260.21 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 95:5): 0.44

Yield: 73 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.87 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, H⁵), 3.65 (s, 3H, N-CH₃), 3.34 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.8 (C, CO), 166.7 (C, CO), 160.6 (C, CO), 156.4 (C, C^{9a}), 155.6 (C, C^{8a}), 151.1 (C, CO), 132.4 (CH, C⁵), 122.5 (C, C^{5a}), 113.6 (C, C^{4a}), 30.5 (CH₃, N¹-CH₃), 28.9 (CH₃, N³-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3365, 3171, 3056, 2755, 1778, 1711, 1651, 1612, 1599, 1507, 1464, 1414, 1399, 1386, 357, 1317, 1290, 1190, 1159, 1140, 1105, 1067, 1041, 991, 962, 818 cm⁻¹.

Mp: 326 - 328 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₁H₈N₄O₄ · 0.25 H₂O: % C = 49.91, % H = 3.24, % N = 21.17; found: % C = 50.04, % H = 3.18, % N = 21.14.

N⁷-substituted heterocycles - General procedures

Method A (from **91**)

To a suspension of **91** (70.0 mg, 0.300 mmol) in DMF (444 μL), the requisite amine (0.600 mmol, 2 eq.) was added. The reaction mixture was heated to reflux temperature during a time T₁. To the solution, PTSA (115 mg, 0.6 mmol) was added and reflux temperatures were maintained during a time T₂. The resulting precipitate was filtered off and washed with different solvents to give the desired compound.

Method B (from 103)

Step 1: POCl₃ (0.2 mL, 2.15 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise under vigorous stirring to a suspension of compound **103** (500 mg, 1.83 mmol) in DMF (6 mL) over a period of 4 min to avoid the temperature of the reaction mixture rising above 20 °C. The reaction mixture was stirred at r.t. for 30 min. After concentration under reduced pressure, water (40 mL) was added. The resulting suspension was basified with an aqueous 8N NaOH solution until pH = 9-10. The mixture was then stirred at r.t. for 48 h. The solvent was removed under reduced pressure and crude product **104** was used in the next step without further purification.

Step 2: A solution of crude compound **104** and the requisite uracil derivative in TFA was stirred for a time T at r.t. The solvent was removed under reduced pressure. Addition of EtOH (25 mL) to the oily residue gave a precipitate, which was filtered and washed with EtOH (5 x 1 mL) and then with diethyl ether (5 x 2 mL). To eliminate the last traces of TFA, the resulting solid was stirred in EtOH and the solvent was removed under reduced pressure (five times) to give the desired pure compound.

7-Benzyl-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8-(3H,7H)-tetraone

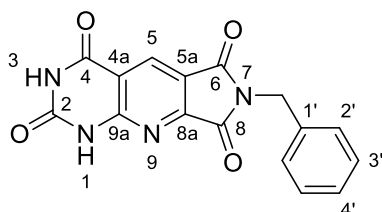
90

From 91

Following the **method A** with benzylamine, T₁ = 2 h and T₂ = 10 min, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **90** as a white solid.

From 103

Following the **method B** with 6-aminouracile (234 mg, 1.83 mmol) and TFA (12 mL), T = 48 h, the reaction afforded the product **90** as a white solid.

**Formula:** C₁₆H₁₀N₄O₄**M_w:** 322.28 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(DCM/MeOH, 9:1):** 0.67**Yield:** 82 % (from **91**) or 72 % (from **103**)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.51 (s, 1H, NH), 11.88 (s, 1H, NH), 8.52 (s, 1H, H⁵), 7.35 – 7.29 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 4.81 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.7 (C, CO), 165.6 (C, CO), 161.9 (C, CO), 157.5 (C, C^{9a}), 156.5 (C, C^{8a}), 150.5 (C, CO), 136.7 (C, C^{1'}), 132.0 (CH, C⁵), 129.0 (2xCH, C^{2'}), 128.0 (CH, C^{4'}), 127.9 (2xCH, C^{3'}), 121.6 (C, C^{5a}), 113.2 (C, C^{4a}), 41.6 (CH₂, N-CH₂) ppm.

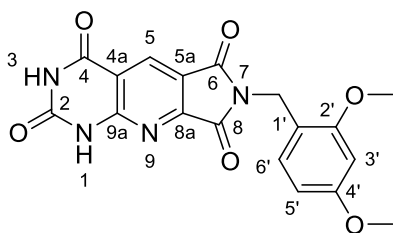
IR (neat): ν 3207, 3033, 1709, 1661, 1626, 1609, 1533, 1496, 1471, 1457, 1433, 1414, 1391, 1355, 1339, 1303, 1283, 1249, 1208, 1186, 1153, 1117, 1102, 1077, 1039, 1030, 1002 cm⁻¹.

Mp: 351 – 353 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₆H₁₀N₄O₄ · 0.5 H₂O: % C = 58.01, % H = 3.35, % N = 16.91; found: % C = 58.39, % H = 3.11, % N = 16.92.

1H-7-(2,4-Dimethoxybenzyl)pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

Following the [method A](#) with 2,4-dimethoxybenzylamine, $T_1 = 2$ h and $T_2 = 15$ h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **105** as a white solid.



Formula: $C_{18}H_{14}N_4O_6$

M_w: 382.33 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 97:3): 0.20

Yield: 89 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 12.50$ (s, 1H, NH), 11.87 (s, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, H⁵), 7.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H⁶), 6.55 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H³), 6.43 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H, H⁵), 4.69 (s, 2H, N-CH₂), 3.78 (s, 3H, O-CH₃), 3.73 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 165.1$ (C, CO), 165.0 (C, CO), 161.5 (C, CO), 160.1 (C), 157.5 (C), 157.0 (C), 156.0 (C), 150.0 (C, CO), 131.4 (CH, C⁵), 128.8 (CH), 121.2 (C), 115.7 (C), 112.8 (C), 104.5 (CH), 98.3 (CH), 55.6 (CH₃, O-CH₃), 55.3 (CH₃, O-CH₃), 36.5 (CH₂, N-CH₂) ppm.

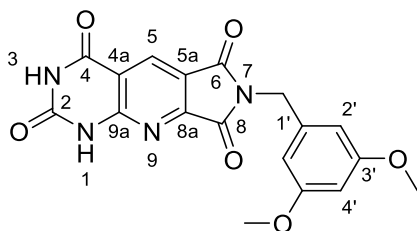
IR (neat): ν 3232, 3101, 3030, 2813, 1775, 1735, 1708, 1689, 1606, 1589, 1528, 1511, 1450, 1435, 1369, 1382, 1335, 1272, 1295, 1211, 1185, 1161, 1136, 1062, 1035, 1027, 966, 943, 933, 918, 853, 817 cm⁻¹.

Mp: 294 - 296 °C.

Microanalysis: calculated for $C_{18}H_{14}N_4O_6 \cdot 0.5 H_2O$: % C = 55.24, % H = 3.86, % N = 14.32; found: % C = 55.14, % H = 3.79, % N = 14.24.

1H-7-(3,5-Dimethoxybenzyl)pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

Following the [method A](#) with 3,5-dimethoxybenzylamine, $T_1 = 1$ h and $T_2 = 3$ h, the resulting precipitate was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 98:2 to 97:3) to afford pure **106** as a white solid.



Formula: $C_{18}H_{14}N_4O_6$

M_w: 382.33 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 97:3): 0.51

Yield: 51 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 12.51$ (s, 1H, NH), 11.88 (s, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, H⁵), 6.47 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, H²), 6.40 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H⁴), 4.73 (s, 2H, N-CH₂), 3.70 (s, 6H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 165.2$ (C, CO), 165.1 (C, CO), 161.5 (C, CO), 160.6 (2xC, C³), 157.0 (C, C^{9a}), 156.1 (C, C^{8a}), 150.0 (C, CO), 138.5 (C, C¹), 131.5 (CH, C⁵), 121.2 (C, C^{5a}), 112.7 (C, C^{4a}), 105.5 (2xCH, C²), 99.0 (CH, C⁴), 55.2 (2xCH₃, O-CH₃), 41.2 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3218, 3031, 2926, 2841, 1780, 1707, 1662, 1625, 1609, 1598, 1536, 1470, 1437, 1426, 1417, 1390, 1351, 1338, 1301, 1282, 1250, 1204, 1190, 1161, 1145, 1117, 1065, 1052, 1039, 990, 966, 944, 914, 860, 827, 815, 783, 748, 726, 695, 687 cm^{-1} .

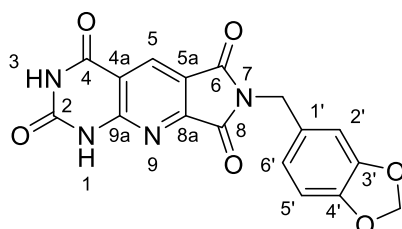
Mp: 291 – 293 $^{\circ}\text{C}$.

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 0.5 \text{ H}_2\text{O}$: % C = 55.24, % H = 3.86, % N = 14.32; found: % C = 55.20, % H = 3.84, % N = 14.11.

7-(3,4-Methylenedioxybenzyl)-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

107

Following the **method A** with 3,4-methylenedioxybenzylamine, $T_1 = 1 \text{ h}$ and $T_2 = 42 \text{ h}$, the resulting precipitate was washed with DMF and water to afford pure **107** as a yellow solid.



Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_6$

M_w: 366.29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.56

Yield: 79 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.41 (s, 1H, NH), 11.93 (s, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, H⁵), 6.91 (s, 1H, H²), 6.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H⁵), 6.83 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H⁶), 5.98 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.70 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.2 (C, CO), 165.1 (C, CO), 161.5 (C, CO), 157.1 (C, C^{9a}), 156.1 (C, C^{8a}), 150.1 (C, CO), 147.4 (C, C⁴), 146.6 (C, C³), 131.5 (CH, C⁵), 130.0 (C, C¹), 121.2 (CH + C, C⁶ + C^{5a}), 112.7 (C, C^{4a}), 108.3 (2xCH, C² + C⁵), 101.1 (CH₂, O-CH₂-O), 41.0 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3204, 3045, 2895, 2859, 1947, 1804, 1742, 1707, 1678, 1618, 1533, 1500, 1491, 1442, 1428, 1384, 1366, 1337, 1320, 1282, 1244, 1196, 1152, 1111, 1097, 1032, 976, 947, 934, 924, 848, 839, 808 cm^{-1} .

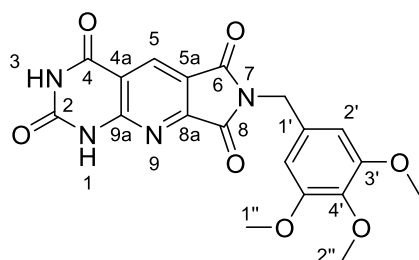
Mp: 351 – 353 $^{\circ}\text{C}$.

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 0.25 \text{ H}_2\text{O}$: % C = 55.07, % H = 2.85, % N = 14.24; found: % C = 55.84, % H = 3.00, % N = 15.45.

1H-7-(3,4,5-Trimethoxybenzyl)-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

108

Following the **method A** with 3,4,5-trimethoxybenzylamine, $T_1 = 1 \text{ h}$ and $T_2 = 17 \text{ h}$, another 0.5 eq. of APTS was added and the reaction was heated at 120 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The resulting precipitate was washed with DMF and water to afford pure **108** as a yellow solid.



Formula: C₁₉H₁₆N₄O₇

M_w: 412.36 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.62

Yield: 66 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.50 (s, 1H, NH), 11.88 (s, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, H⁵), 6.64 (s, 2H, H^{2'}), 4.73 (s, 2H, N-CH₂), 3.73 (s, 6H, H^{1''}), 3.61 (s, 3H, H^{2''}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.3 (C, CO), 165.2 (C, CO), 161.5 (C, CO), 157.0 (C, C^{9a}), 156.1 (C, C^{8a}), 152.9 (2xC, C^{3'}), 150.0 (C, CO), 136.8 (C, C^{1'} or C^{4'}), 131.9 (C, C^{1'} or C^{4'}), 131.5 (CH, C⁵), 121.3 (C, C^{5a}), 112.7 (C, C^{4a}), 104.9 (2xCH, C^{2'}), 60.0 (CH₃, C^{2''}), 55.9 (2xCH₃, C^{1''}), 41.5 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3439, 3182, 3075, 2838, 1743, 1707, 1676, 1614, 1589, 1550, 1511, 1458, 1424, 1394, 1382, 1346, 1331, 1281, 1242, 1191, 1127, 1105, 1038, 995, 966, 942, 835, 812, 795, 777, 752, 733, 697, 667 cm⁻¹.

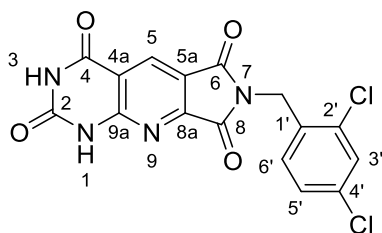
Mp: 316 - 318 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₉H₁₆N₄O₇ · H₂O: % C = 53.02, % H = 4.22, % N = 13.02; found: % C = 53.09, % H = 4.25, % N = 13.23.

7-(2,4-Dichlorobenzyl)-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

109

Following the **method A** with 2,4-dichlorobenzylamine, T₁ = 2 h and T₂ = 17 h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **109** as a white solid.



Formula: C₁₆H₈Cl₂N₄O₄

M_w: 391.16 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.50

Yield: 84 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.52 (s, 1H, NH), 11.82 (s, 1H, NH), 8.52 (s, 1H, H⁵), 7.68 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H^{3'}), 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H^{6'}), 7.39 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H^{5'}), 4.85 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.1 (C, CO), 165.0 (C, CO), 161.5 (C, CO), 157.1 (C, C^{9a}), 156.1 (C, CO), 150.1 (C, C^{8a}), 133.0 (C, C^{4'}), 132.7 (C, C^{2'}), 132.4 (C, C^{1'}), 131.6 (CH, C⁵), 130.5 (CH, C^{6'}), 128.9 (CH, C^{3'}), 127.5 (CH, C^{5'}), 121.2 (C, C^{5a}), 112.8 (C, C^{4a}), 55.0 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3049, 2930, 2786, 1784, 1722, 1682, 1646, 1605, 1566, 1535, 1474, 1450, 1414, 1398, 1378, 1340, 1318, 1287, 1254, 1197, 1187, 1151, 1119, 1102, 1072, 1045, 998, 989, 959, 934, 858, 831, 813 cm⁻¹.

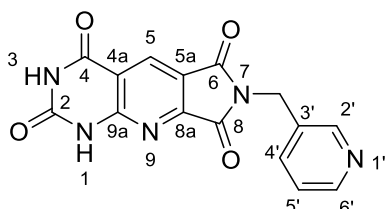
Mp: 366 - 368 °C.

Microanalysis: calculated for $C_{16}H_8Cl_2N_4O_4 \cdot DMF$: % C = 49.15, % H = 3.26, % N = 15.09; found: % C = 48.72, % H = 3.30, % N = 14.85.

7-(Pyridin-3-ylmethyl)-1*H*-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8(3*H*,7*H*)-tetraone

110

Following the **method A** with 2-picolyamine, $T_1 = 24$ h and $T_2 = 24$ h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **110** as a white solid.



Formula: $C_{15}H_9N_5O_4$

M_w: 323.27 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 9:1): 0.30

Yield: 74 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.50 (s, 1H, NH), 11.87 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H), 8.55 – 8.44 (m, 2H), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.2 (C, CO), 165.1 (C, CO), 161.5 (C, CO), 157.0 (C, C^{9a}), 156.1 (C, C^{8a}), 150.0 (C, CO), 149.0 (CH), 148.7 (CH), 135.6 (CH, C⁵), 131.9 (C), 131.5 (CH), 123.6 (CH), 121.3 (C), 112.7 (C), 38.9 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3232, 3101, 3030, 2905, 2795, 1777, 1715, 1606, 1584, 1478, 1462, 1424, 1381, 1356, 1343, 1306, 1287, 1248, 1187, 1112, 1098, 1066, 1043, 985, 964, 932, 853, 837, 818, 795, 748, 723, 678 cm⁻¹.

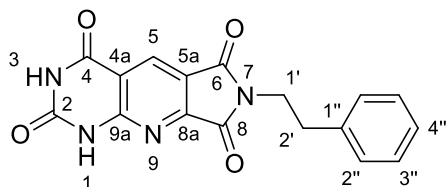
Mp: > 360 °C.

Microanalysis: calculated for $C_{15}H_9N_5O_4 \cdot 0.5 H_2O$: % C = 54.22, % H = 3.03, % N = 21.08; found: % C = 54.18, % H = 3.00, % N = 20.99.

7-Phenylethyl-1*H*-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8(3*H*,7*H*)-tetraone

111

Following the **method A** with phenylethylamine, $T_1 = 5$ h and $T_2 = 17$ h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **111** as a white solid.



Formula: $C_{17}H_{12}N_4O_4$

M_w: 336.31 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 95:5): 0.20

Yield: 75 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.47 (s, 1H, NH), 11.85 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H⁵), 7.15 – 7.32 (m, 5H, H^{2''} + H^{3''} + H^{4''}), 3.84 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H^{1'}), 2.92 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H^{2'}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.1 (C, CO), 165.0 (C, CO), 161.5 (C, CO), 157.0 (C, C^{9a}), 155.8 (C, C^{8a}), 150.0 (C, CO), 138.2 (C, C^{1''}), 131.3 (CH, C⁵), 128.7 (2xCH, C^{2''} or C^{3''}), 128.5 (2xCH, C^{2''} or C^{3''}), 126.5 (CH, C^{4''}), 121.0 (C, C^{5a}), 112.8 (C^{4a}), 39.0 (CH₂, C^{1'}), 33.6 (CH₂, C^{2'}) ppm.

IR (neat): ν 3604, 3478, 3164, 3028, 3055, 2817, 1778, 1740, 1697, 1674, 1604, 1540, 1497, 1466, 1455, 1437, 1398, 1383, 1338, 1287, 1241, 1188, 1150, 1116, 1107, 1040, 1028, 987, 905, 866, 807 cm⁻¹.

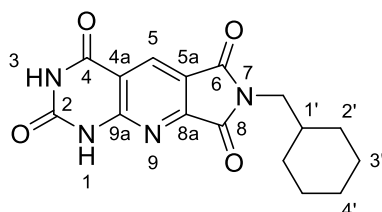
Mp: 359 – 361 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₇H₁₂N₄O₄ · 0.75 H₂O: % C = 58.62, % H = 3.86, % N = 16.09; found: % C = 58.48, % H = 3.89, % N = 16.13.

7-Cyclohexylmethyl-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

112

Following the **method A** with cyclohexylmethylamine, T₁ = 2 h and T₂ = 17 h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **112** as a white solid.



Formula: C₁₆H₁₆N₄O₄

M_w: 328.33 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 90:10): 0.40

Yield: quant.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.46 (s, 1H, NH), 11.84 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H⁵), 3.43 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, N-CH₂), 1.74 – 1.55 (m, 6H, 3xCH₂), 1.23 – 1.07 (m, 3H, H^{1'} + CH₂), 1.00 – 0.87 (m, 2H, CH₂) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.6 (C, CO), 165.4 (C, CO), 161.5 (C, CO), 157.0 (C, C^{9a}), 155.9 (C, C^{8a}), 150.0 (C, CO), 131.3 (CH, C⁵), 121.1 (C, C^{5a}), 112.6 (C, C^{4a}), 43.9 (CH₂, N-CH₂), 36.6 (CH₂, C^{4'}), 30.3 (2xCH₂, C^{2'} or C^{3'}), 25.8 (CH, C^{1'}), 25.2 (2xCH₂, C^{2'} or C^{3'}) ppm.

IR (neat): ν 3208, 2925, 2849, 1775, 1703, 1660, 1625, 1610, 1533, 1468, 1449, 1387, 1362, 1336, 1304, 1282, 1242, 1187, 1164, 1078, 1041, 1012, 955, 936, 916, 866, 836, 813 cm⁻¹.

Mp: 390 – 392 °C (Maquenne).

Microanalysis: calculated for C₁₆H₁₆N₄O₄ · 0.5 H₂O: % C = 56.97, % H = 5.09, % N = 16.61; found: % C = 57.30, % H = 4.78, % N = 16.61.

7-(3-(Dimethylamino)propyl)-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4,6,8(3H,7H)-tetraone

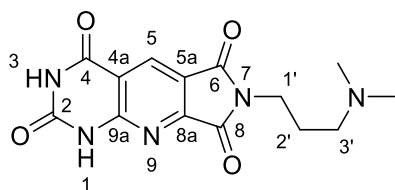
113

and Hydrochloride salt

114

Following the **method A** with 3-(dimethylamino)-1-propylamine XX, T₁ = 2 h and T₂ = overnight, the resulting precipitate was washed with EtOH to afford **113** as a white solid. **113** was then stirred in EtOH

(10 mL) with bubbling HCl during a few seconds and the resulting precipitate was isolated by filtration, washed with EtOH and diethyl ether to afford pure **114** as a white solid.



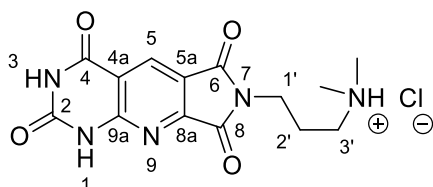
Formula: C₁₄H₁₅N₅O₄

M_w: 317.31 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(MeCN/H₂O, 8:2): 0.28

Yield: 63 %



Formula: C₁₄H₁₆ClN₅O₄

M_w: 353.76 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

Hydrochloride salt (**114**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.47 (s, 1H, NH), 11.85 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, NH⁺), 8.50 (s, 1H, H⁵), 3.69 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H^{1'}), 3.15 – 3.05 (m, 2H, H^{3'}), 2.71 (s, 6H, 2xN-CH₃), 2.08 – 1.96 (m, 2H, H^{2'}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.3 (C, CO), 165.2 (C, CO), 161.4 (C, CO), 156.9 (C, C^{9a}), 156.1 (C, C^{8a}), 149.9 (C, CO), 131.2 (CH, C⁵), 121.2 (C, C^{5a}), 112.5 (C, C^{4a}), 54.1 (CH₂, C^{3'}), 42.0 (2xCH₃, N-CH₃), 35.1 (CH₂, C^{1'}), 23.0 (CH₂, C^{2'}) ppm.

IR (neat): ν 3184, 3134, 3034, 2910, 2694, 1785, 1713, 1680, 1607, 1527, 1435, 1396, 1366, 1355, 1285, 1185, 1114, 1000, 886, 778, 768, 742, 692 cm⁻¹.

Mp: 309 – 311 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₄H₁₅ClN₅O₄ · 0.75 H₂O: % C = 45.91, % H = 4.54, % N = 19.12; found: % C = 46.28, % H = 4.49, % N = 18.83.

7-Benzyl-1-methyl-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8-(3H,7H)-tetraone

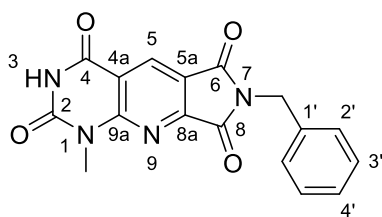
120

From **91**

Following the **method A** with heterocycle **91** (50.0 mg, 0.203 mmol), DMF (1 mL), benzylamine (0.045 mL, 0.406 mmol, 2.0 eq.) and PTSA (77.0 mg, 0.406 mmol, 2.0 eq.), T₁ = 2 h and T₂ = 21 h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **120** as a white solid.

From **103**

Following the **method B** with 6-amino-1-methyluracile **119** (258 mg, 1.80 mmol) and TFA (18 mL), T = 18 h, the reaction afforded the product **120** as a white solid.

**Formula:** C₁₇H₁₂N₄O₄**M_w:** 336.31 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(DCM/MeOH, 95:5):** 0.56**Yield:** 47 % (from **91**) or 50 % (from **103**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.16 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, H⁵), 7.35 – 7.29 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 4.83 (s, 2H, N-CH₂), 3.56 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.6 (C, CO), 165.5 (C, CO), 160.9 (C, CO), 157.0 (C, C^{9a}), 155.8 (C, C^{8a}), 150.7 (C, CO), 136.6 (CH), 132.0 (CH), 129.0 (2xCH), 128.0 (2xCH + C), 121.4 (C, C^{5a}), 114.5 (C, C^{4a}), 41.7 (CH₂, N-CH₂), 29.6 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3182, 3128, 3068, 2838, 1775, 1698, 1614, 1599, 1508, 1494, 1473, 1456, 1431, 1390, 1373, 1350, 1307, 1273, 1210, 1197, 1158, 1122, 1111, 1101, 1072, 1039, 1027, 995, 981, 952, 920, 903, 826, 817 cm⁻¹.

Mp: 293 – 295 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₇H₁₂N₄O₄: % C = 60.71, % H = 3.60, % N = 16.66; found: % C = 60.26, % H = 3.64, % N = 16.59.

1,3-Dimethyl-7-benzyl-1H-pyrrolo[3',4':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6,8-(3H,7H)-tetraone

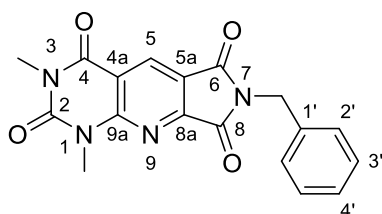
121

From **91**

Following the **method A** with heterocycle **91** (50.0 mg, 0.192 mmol), DMF (1 mL), benzylamine (0.041 mL, 0.384 mmol, 2.0 eq.) and PTSA (77.0 mg, 0.406 mmol, 2.1 eq.), T₁ = 2 h and T₂ = 46 h, the resulting precipitate was washed with water to afford pure **121** as a white solid.

From **103**

Following the **method B** with 6-amino-1,3-dimethyluracile **87** (284 mg, 1.83 mmol) and TFA (12 mL), T = 48 h, the reaction afforded the product **121** as a white solid.

**Formula:** C₁₈H₁₄N₄O₄**M_w:** 350.33 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(DCM/AcOEt, 95:5):** 0.26**Yield:** 47 % (from **91**) or 44 % (from **103**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.65 (s, 1H, H⁵), 7.36 – 7.28 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 4.84 (s, 2H, N-CH₂), 3.66 (s, 3H, N-CH₃), 3.34 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.6 (C, CO), 165.5 (C, CO), 160.6 (C, CO), 155.8 (C, C^{9a}), 155.6 (C, C^{8a}), 151.1 (C, CO), 136.7 (CH), 132.4 (CH), 129.0 (2xCH), 128.0 (2xCH + C), 121.6 (C, C^{5a}), 113.6 (C, C^{4a}), 41.7 (CH₂, N-CH₂), 30.6 (CH₃, N-CH₃), 28.9 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3061, 3036, 2960, 1780, 1717, 1661, 1615, 1602, 1514, 1497, 1471, 1456, 1427, 1415, 1385, 1364, 1349, 1337, 1313, 1286, 1208, 1108, 1094, 1074, 1055, 1027, 990, 970, 934, 923, 906, 843, 818, 805 cm^{-1} .

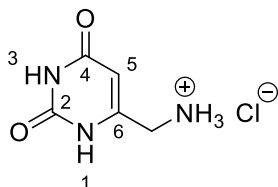
Mp: 242 - 244 °C (Kofler).

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$: % C = 61.71, % H = 4.03, % N = 15.99; found: % C = 61.41, % H = 4.05, % N = 16.02.

6-(Aminomethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione, Hydrochloride salt

115

To a suspension of **59** (642 mg, 4.00 mmol) in MeOH (8 mL), ammonia (30 %, 16 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at r.t. overnight. After concentration under reduced pressure, a 0.33 N HCl solution (10 mL) was added and the suspension was heated at reflux for 10 min. The hot solution was filtered to eliminate insoluble particules and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford pure **115** as a white solid.

**Formula:** C₅H₈ClN₃O₂**M_w:** 177.59 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**Yield:** 83 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.16 (s, 1H, NH), 11.07 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 3H, NH₃⁺), 5.66 (s, 1H, H⁵), 3.79 (s, 2H, N-CH₂) ppm.

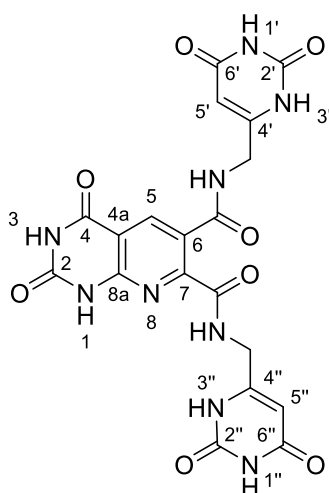
Mp: 300 - 302 °C (decomposition, lit. 295 - 297 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁵²

N⁶,N⁷-Bis((2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)methyl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrido[2,3-*d*]pyrimidine-6,7-dicarboxamide

117

To a suspension of heterocycle **91** (116 mg, 0.500 mmol) in DMF (5 mL), Et₃N (0.348 mL, 2.50 mmol, 5 eq.) and compound **115** (266 mg, 1.50 mmol, 3 eq.) were added and the mixture was heated at 90 °C overnight. Once cooled at r.t., the crude was poured in diethyl ether (10 mL) and cooled at 4 °C for 2 h. The solid was isolated by filtration and stirred in water (12 mL) where a 1N HCl solution was added until pH < 3. Subsequent filtration, washing with water and EtOH and drying over P₂O₅ afforded pure **117** as a white solid.

**Formula:** C₁₉H₁₅N₉O₈**M_w:** 497.38 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(DCM/MeOH, 85:15):** 0.33**Yield:** quant.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.10 (s, 1H, NH), 11.70 (s, 1H, NH), 10.97 (s, 2H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 10.82 (s, 1H, NH), 9.10 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.96 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, H⁵), 5.53 (s, 1H, H^{5'} or H^{5''}), 5.48 (s, 1H, H^{5'} or H^{5''}), 4.18 – 4.07 (m, 4H, N-CH₂) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.0 (C, CO), 165.3 (C, CO), 164.0 (2xC, CO), 161.6 (C, CO), 156.9 (C), 153.4 (C), 153.3 (C), 152.4 (C), 151.4 (C), 151.3 (C), 150.3 (C), 136.8 (CH, C⁵), 124.6 (C), 109.8 (C), 96.8 (CH, C^{5'} or C^{5''}), 96.6 (CH, C^{5'} or C^{5''}), 39.3 (CH₂, N-CH₂), 38.7 (CH₂, N-CH₂) ppm.

IR (neat): ν 3563, 3489, 3247, 3118, 2988, 2819, 1689, 1657, 1609, 1583, 1527, 1502, 1419, 1357, 1321, 1284, 1233, 1020, 841, 819, 766, 743, 703 cm⁻¹.

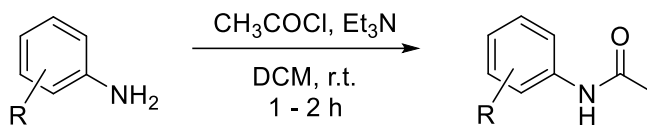
Mp: 259 - 261 °C (decomposition).

Microanalysis: calculated for C₁₉H₁₅N₉O₈ · 3.5 H₂O: % C = 40.72, % H = 3.96, % N = 22.49; found: % C = 40.97, % H = 3.73, % N = 22.02.

Series E

Acetanilides

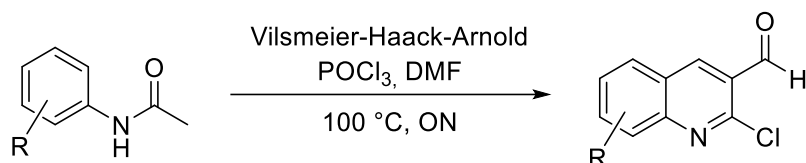
Acetylation - General procedure



To a stirred solution of the requisite aniline (80.0 mmol) in distilled DCM (80 mL), under argon, Et_3N (19 mL, 136 mmol, 1.7 eq.) was introduced. Then, a solution of 45 % (v/v) of acetyl chloride (8.6 mL, 120 mmol, 1.5 eq) in DCM (80 mL) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred from 0 °C to r.t. during 1 to 2 h. The reaction was monitored by TLC analysis and, after completion, water was added. The aqueous layer was extracted with DCM (4 x 40 mL) and the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure to give the desired product which was used in the next step without further purification.

Quinolines

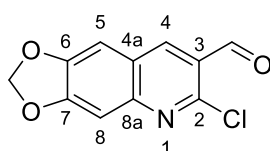
Meth-Cohn Cyclisation - General procedure



To anhydrous DMF (9.1 mL, 118 mmol, 3.0 eq.) in a sealed tube under argon at $0\text{ }^\circ\text{C}$, was added dropwise POCl_3 (25.8 mL, 276 mmol, 7.0 eq.). Then, the acetanilide derivative (39.4 mmol) was added portionwise and the reaction mixture was stirred at $100\text{ }^\circ\text{C}$ overnight. Afterwards, the reaction mixture was cooled to r.t., poured into ice and, under vigorous stirring, neutralised with 30 % ammonia. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried over $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{P}_2\text{O}_5$ to afford the desired product.

2-Chloro-6,7-methylenedioxyquinoline-3-carbaldehyde

134



Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{ClNO}_3$

M_w: 235.62 g.mol⁻¹

Aspect: light brown solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.37

Yield: 78 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.31 (s, 1H, CHO), 8.70 (s, 1H, H⁴), 7.60 (s, 1H, H⁵), 7.41 (s, 1H, H⁸), 6.31 (s, 2H, O-CH₂-O) ppm.

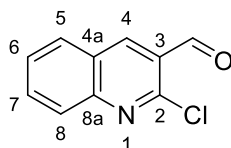
IR (neat): ν 3050, 2921, 2852, 1680, 1575, 1461, 1446, 1399, 1357, 1343, 1251, 1168, 1103, 1055, 1031, 938, 862, 844, 824, 739 cm⁻¹.

Mp: 219 - 221 $^\circ\text{C}$ (lit. 211 - 213 $^\circ\text{C}$).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁴⁹

2-Chloroquinoline-3-carbaldehyde

135



Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{ClNO}$

M_w: 191.61 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.28

Yield: 57 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.38 (s, 1H, CHO), 8.99 (s, 1H, H⁴), 8.29 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 8.09 - 7.95 (m, 2H, H⁷+H⁸), 7.82 - 7.72 (m, 1H, H⁶) ppm.

³⁴⁹ M. A. Elban, W. Sun, B. M. Eisenhauer, R. Gao, S. M. Hecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3513-6.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.4 (CH, CHO), 149.0 (C, C²), 148.5 (C, C^{8a}), 141.4 (CH, C⁴), 133.9 (CH, C⁷), 130.2 (CH, C⁵), 128.3 (CH, C⁶), 127.8 (CH, C⁸), 126.4 (C, C³), 126.3 (C, C^{4a}) ppm.

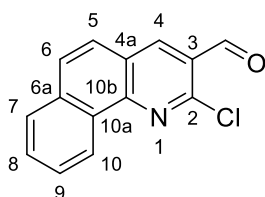
IR (neat): ν 3000, 2940, 2870, 2831, 1683, 1661, 1616, 1576, 1553, 1489, 1435, 1369, 1333, 1045, 898, 762, 750, 700 cm⁻¹.

Mp: 145 - 147 °C (lit. 148 - 150 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁵⁷

2-Chlorobenzo[*h*]quinoline-3-carbaldehyde

136



Formula: C₁₄H₈ClNO

M_w: 241.67 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.36

Yield: 75 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.45 (s, 1H, CHO), 9.09 – 9.04 (m, 1H, H¹⁰), 9.00 (s, 1H, H⁴), 8.12 (m, 3H, H⁵+H⁶+H⁷), 7.87 (tt, J = 7.2, 5.4 Hz, 2H, H⁸+H⁹) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.5 (CH, CHO), 149.1 (C, C²), 147.8 (C, C^{10b}), 140.1 (CH, C⁴), 134.7 (C, C^{6a}), 130.4 (CH, C⁸), 129.1 (CH, C⁶), 129.0 (C, C^{4a} or C^{10a}), 128.4 (CH, C⁷), 128.0 (CH, C⁹), 126.9 (C, C³), 125.7 (CH, C⁵), 125.0 (C, C^{4a} or C^{10a}), 124.6 (CH, C¹⁰) ppm.

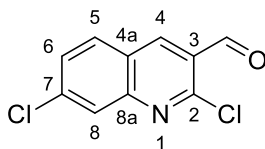
IR (neat): ν 3349, 3039, 2866, 1684, 1577, 1507, 1477, 1405, 1364, 1329, 1175, 1110, 1053, 1000, 940, 822, 800, 755, 747, 723, 713 cm⁻¹.

Mp: 205 - 207 °C (lit. 210 - 212 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁵⁰

2,7-Dichloroquinoline-3-carbaldehyde

137



Formula: C₁₀H₅Cl₂NO

M_w: 226.06 g.mol⁻¹

Aspect: light orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.52

Yield: 27 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.35 (s, 1H, CHO), 8.99 (s, 1H, H⁴), 8.30 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H⁵), 8.10 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H⁸), 7.79 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H, H⁶) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.1 (CH, CHO), 150.3 (C), 148.7 (C), 141.2 (CH), 138.5 (C), 132.0 (CH), 128.9 (CH), 126.6 (CH), 126.6 (C), 125.0 (C) ppm.

³⁵⁰ M. A. Kerry, G. W. Boyd, S. P. Mackay, O. Meth-Cohn, L. Platt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2315-21.

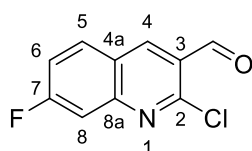
IR (neat): ν 3054, 2895, 1687, 1607, 1579, 1553, 1472, 1368, 1331, 1291, 1171, 1141, 1049, 941, 890, 846, 809, 767, 750 cm^{-1} .

Mp: 161 - 163 °C (lit. 158 - 160 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁵⁷

2-Chloro-7-fluoroquinoline-3-carbaldehyde

138



Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{ClFNO}$

M_w: 209.60 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.66

Yield: 36 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.54 (s, 1H, CHO), 8.75 (s, 1H, H⁴), 8.01 (dd, J = 9.0, 5.9 Hz, 1H, H⁵), 7.70 (dd, J = 9.5, 2.5 Hz, 1H, H⁸), 7.45 (ddd, J = 9.0, 8.3, 2.5 Hz, 1H, H⁶) ppm.

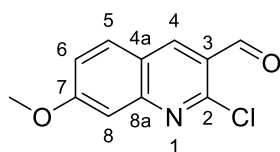
IR (neat): ν 3059, 3047, 2915, 1682, 1621, 1584, 1568, 1488, 1447, 1388, 1372, 1338, 1224, 1139, 1117, 1051, 939, 889, 871, 817, 760, 727, 681 cm^{-1} .

Mp: 221 - 225 °C (lit. 223 - 224 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁵¹

2-Chloro-7-methoxyquinoline-3-carbaldehyde

140



Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClNO}_2$

M_w: 221.64 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.31

Yield: 75 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.49 (s, 1H, CHO), 8.64 (s, 1H, H⁴), 7.83 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.36 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H⁸), 7.25 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H, H⁶), 3.97 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.2 (CH, CHO), 164.3 (C, C⁷), 152.1 (C, C^{8a}), 151.2 (C, C²), 139.6 (CH, C⁴), 130.9 (CH, C⁵), 124.5 (C, C³), 121.9 (C, C^{4a}), 121.6 (CH, C⁶), 107.0 (CH, C⁸), 56.0 (O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3054, 2975, 2883, 2836, 1689, 1617, 1584, 1568, 1489, 1449, 1422, 1387, 1369, 1344, 1238, 1157, 1127, 1047, 1018, 877, 853, 813, 760, 723 cm^{-1} .

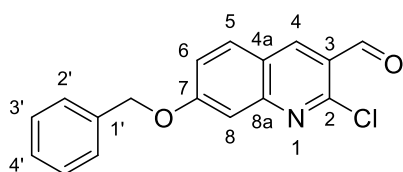
Mp: 193 - 195 °C (lit. 197 - 198 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁵⁷

³⁵¹ I. Sato, T. Nakao, R. Sugie, T. Kawasaki, K. Soai, *Synthesis* **2004**, 9, 1419-28.

7-Benzyloxyquinoline-2-chloro-3-carbaldehyde

141

**Formula:** C₁₇H₁₂ClNO₂**Mw:** 297.74 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.36**Yield:** 22 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.33 (s, 1H, CHO), 8.87 (s, 1H, H⁴), 8.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.59 – 7.49 (m, 3H, H⁸ + H² or H³), 7.49 – 7.32 (m, 4H, H⁶ + H⁴ + H² or H³), 5.34 (s, 2H, CH₂) ppm.

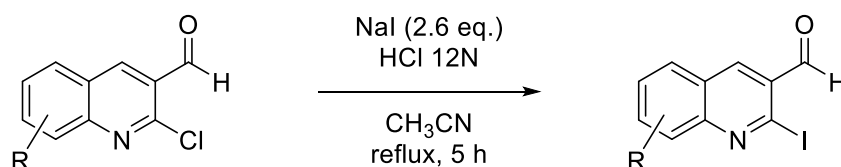
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.1 (CH, CHO), 162.8 (C), 150.9 (C), 149.8 (C), 140.6 (CH, C⁴), 136.1 (C), 131.6 (CH, C⁵), 128.5 (2xCH, C² or C³), 128.2 (CH, C⁴), 128.0 (2xCH, C² or C³), 124.2 (C), 121.5 (C), 121.3 (CH, C⁶), 107.8 (CH, C⁸), 70.1 (CH₂), ppm.

IR (neat): ν 3070, 2936, 2867, 1677, 1616, 1582, 1490, 1378, 1338, 1302, 1229, 1150, 1133, 1046, 997, 922, 883, 838, 821, 773, 730, 701 cm⁻¹.

Mp: 174 - 176 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₇H₁₂ClNO₂Na [M+Na]⁺: 320.0454, found: 320.0445.

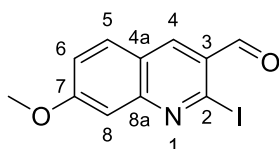
Halide Exchange - General procedure



The corresponding chloroquinoline (6.77 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (26 mL), then sodium iodide (17.6 mmol, 2.6 eq.) and 12 N hydrochloric acid (0.290 mL, 0.5 eq.) were added. The mixture was stirred under reflux for 5 h, then cooled and evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with DCM and a small portion of water. The organic layer was washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3x), Na₂S₂O₃, brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to give the desired product.

2-Iodo-7-methoxyquinoline-3-carbaldehyde

153

**Formula:** C₁₁H₈INO₂**Mw:** 313.09 g.mol⁻¹**Aspect:** brown solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4):** 0.74**Yield:** 70 %

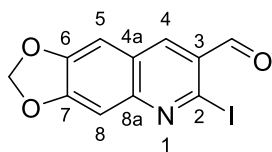
¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.20 (s, 1H, CHO), 8.46 (s, 1H, H⁴), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.40 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H⁸), 7.27 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H, H⁶), 3.98 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 194.7 (CH, CHO), 164.0 (C, C⁷), 153.8 (C, C^{8a}), 138.1 (CH, C⁴), 130.8 (CH, C⁵), 130.8 (C, C³), 127.0 (C, C^{4a}), 121.9 (CH, C⁶), 121.8 (C, C²), 107.0 (CH, C⁸), 56.0 (O-CH₃) ppm.

HRMS (CI): m/z calculated for C₁₁H₉INO₂ [M+H]⁺: 313.9672, found: 313.9680.

2-Iodo-6,7-methylenedioxyquinoline-3-carbaldehyde

154



Formula: C₁₁H₆INO₃

Mw: 327.08 g.mol⁻¹

Aspect: brown solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.46

Yield: 80 %

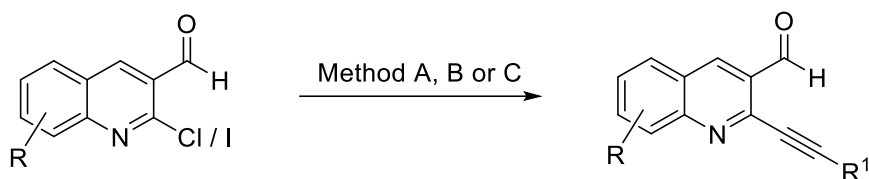
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.04 (s, 1H, CHO), 8.50 (s, 1H, H⁴), 7.58 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.44 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 6.30 (s, 2H, O-CH₂-O) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 194.4 (CH, CHO), 153.8, 149.9, 148.8, 137.1, 127.1, 123.6, 119.0, 104.3, 104.1, 103.1 ppm.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₁₁H₆INO₃Na [M+Na]⁺: 349.9290, found: 349.9305.

Alkynes

Sonogashira Coupling - General procedures



Method A

To a flask containing the corresponding chlorinated or iodinated quinoline (1.00 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (35.1 mg, 0.050 mmol, 0.05 eq.) and CuI (9.5 mg, 0.050 mmol, 0.05 eq.) under argon atmosphere, was added dry DMF (1 mL) and Et_3N (0.56 mL, 4.00 mmol, 4 eq.), which were both previously degassed by bubbling argon for 10 min. Lastly, the alkyne derivative (1.20 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise to the reaction and the mixture was stirred overnight at r.t. After completion (attested by TLC analysis), the reaction mixture was filtered through a short pad of silica and celite® and washed with EtOAc. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel with various solvent mixtures.

Method B

To a flask containing the corresponding chlorinated or iodinated quinoline (1.00 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (49.1 mg, 0.070 mmol, 0.07 eq.) and CuI (57.1 mg, 0.300 mmol, 0.3 eq.) under argon atmosphere, was added dry THF (15 mL) and Et_3N (0.21 mL, 1.50 mmol, 1.5 eq.), which were both previously degassed by bubbling argon for 10 min. Lastly, the alkyne derivative (1.20 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise to the reaction and the mixture was stirred overnight at r.t. After completion (attested by TLC analysis), the reaction mixture was filtered through a short pad of silica and celite® and washed with ethyl acetate. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel with various solvent mixtures.

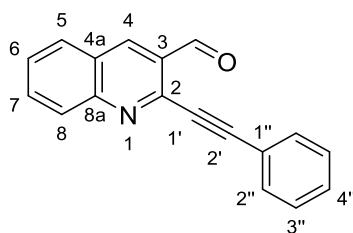
Method C

To a sealed tube containing the corresponding chlorinated or iodinated quinoline (4.00 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (140 mg, 0.200 mmol, 0.05 eq.) and CuI (38.1 mg, 0.200 mmol, 0.05 eq.) under argon atmosphere, was added dry THF (12 mL) and Et_3N (7.0 mL, 12.0 mmol, 3 eq.), which were both previously degassed by bubbling argon for 10 min. Lastly, the alkyne derivative (6.00 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise to the reaction and the mixture was heated at 60 °C for 3 h under microwave irradiation. After completion (attested by TLC analysis), the reaction mixture was filtered through a short pad of basic alumina and celite® and washed with DCM. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel with various solvent mixtures.

2-(Phenylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

144

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (1 % Et_3N), 1:0 to 9:1) to afford **144** as a white solid.

**Formula:** C₁₈H₁₁NO**M_w:** 257.29 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f**(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.53**Yield:** 85 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.82 (s, 1H, CHO), 8.76 (s, 1H, H⁴), 8.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H⁵), 7.88 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H⁷), 7.71 (d, J = 5.3 Hz, 2H, H^{2''}), 7.64 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H⁶), 7.48 – 7.39 (m, 3H, H^{3''}+H^{4''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.9 (CH, CHO), 150.4 (C, C^{8a}), 144.1 (C, C²), 137.3 (CH, C⁴), 133.2 (CH, C⁷), 132.5 (2xCH, C^{2''}), 130.0 (CH, C^{4''}), 129.8 (CH, C⁵), 129.5 (CH, C⁸), 129.0 (C, C³), 128.8 (2xCH, C^{3''}), 128.4 (CH, C⁶), 126.6 (C, C^{4a}), 121.5 (C, C^{1''}), 95.7 (C, C²), 85.7 (C, C^{1'}) ppm.

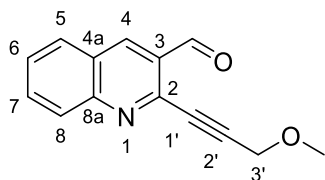
Mp: 124 - 126 °C (lit. 124 - 126 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁵²

2-(3-Methoxyprop-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

145

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (1 % Et₃N), 1:0 to 8:2) to afford **145** as a light yellow solid.

**Formula:** C₁₄H₁₁NO₂**M_w:** 225.24 g.mol⁻¹**Aspect:** light yellow solid**R_f**(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.31**Yield:** 73 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.69 (s, 1H, CHO), 8.74 (s, 1H, H⁴), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H⁵), 7.87 (ddd, J = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H⁷), 7.64 (ddd, J = 8.0, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H⁶), 4.49 (s, 2H, H^{3'}), 3.53 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.7 (CH, CHO), 150.2 (C, C^{8a}), 143.3 (C, C²), 137.3 (CH, C⁴), 133.2 (CH, C⁷), 129.8 (CH, C⁵), 129.5 (CH, C⁸), 128.9 (C, C³), 128.6 (CH, C⁶), 126.7 (C, C^{4a}), 91.7 (C, C^{2'}), 82.8 (C, C^{1'}), 60.5 (CH₂, C^{3'}), 58.4 (CH₃, O-CH₃) ppm.

Mp: 94 - 96 °C (lit. 101 - 103 °C).

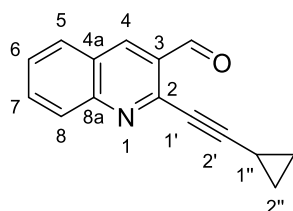
Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁸⁴

2-(Cyclopropylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

146

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 9:1) to afford **146** as a beige solid.

³⁵² A. Patin, P. Belmont, *Synthesis* **2005**, 14, 2400-6.

**Formula:** C₁₅H₁₁NO**M_w:** 221.26 g.mol⁻¹**Aspect:** beige solid**R_f** (cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.66**Yield:** 95 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.65 (s, 1H, CHO), 8.68 (s, 1H, H⁴), 8.10 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H⁸), 7.92 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 7.83 (ddd, J = 8.6, 7.0, 1.4 Hz, 1H, H⁷), 7.59 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H, H⁶), 1.67 – 1.58 (m, 1H, H^{1''}), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 4H, H^{2''}) ppm.

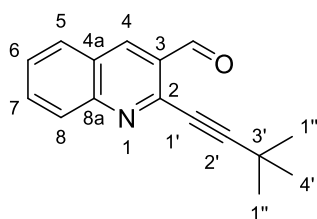
Mp: 104 – 106 °C (lit. 108 – 110 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁸⁴

2-(3,3-Dimethylbut-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

147

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (1 % Et₃N), 1:0 to 50:50) to afford **147** as a beige solid.

**Formula:** C₁₆H₁₅NO**M_w:** 237.30 g.mol⁻¹**Aspect:** beige solid**R_f** (cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.65**Yield:** 84 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.68 (s, 1H, CHO), 8.70 (s, 1H, H⁴), 8.15 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 7.84 (ddd, J = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H⁷), 7.60 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H⁶), 1.43 (s, 9H, 2xH^{1'''} + H^{4''}) ppm.

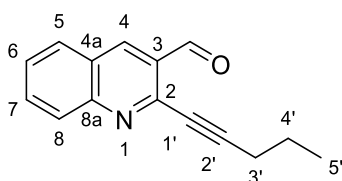
Mp: 135 – 137 °C (lit. 143 – 144 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁸⁴

2-(Pent-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

148

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 8:2) to afford **148** as a light yellow solid.

**Formula:** C₁₅H₁₃NO**M_w:** 223.28 g.mol⁻¹**Aspect:** light yellow solid**R_f** (cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.35**Yield:** 46 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.70 (s, 1H, CHO), 8.70 (s, 1H, H⁴), 8.12 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 7.84 (ddd, J = 8.5, 6.8, 1.5 Hz, 1H, H⁷), 7.60 (ddd, J = 8.2, 6.8, 1.2 Hz, 1H, H⁶), 2.57 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H³), 1.75 (h, J = 7.3 Hz, 2H, H⁴), 1.11 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H⁵) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.4 (CH, CHO), 150.3 (C, C^{8a}), 144.6 (C, C²), 136.9 (CH, C⁴), 133.0 (CH, C⁷), 129.7 (CH, C⁵), 129.4 (CH, C⁸), 128.9 (C, C³), 128.1 (CH, C⁶), 126.4 (C, C^{4a}), 98.1 (C, C^{2'}), 77.8 (C, C^{1'}), 21.9 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 21.8 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 13.9 (CH₃, C^{5'}) ppm.

IR (neat): ν 3057, 2958, 2850, 2215, 1688, 1583, 1551, 1489, 1454, 1370, 1155, 1111, 917, 786, 754, 710 cm⁻¹.

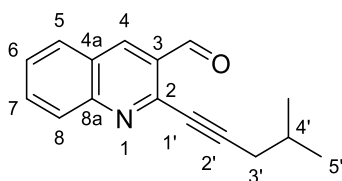
Mp: 50 - 52 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₁₅H₁₄NO [M+H]⁺: 224.1075, found: 224.1076.

2-(4-Methylpent-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

149

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 9:1) to afford **149** as a brown solid.



Formula: C₁₆H₁₅NO

M_w: 237.30 g.mol⁻¹

Aspect: brown solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.20

Yield: 80 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.70 (s, 1H, CHO), 8.69 (s, 1H, H⁴), 8.12 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H⁸), 7.93 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H⁵), 7.83 (ddd, J = 8.6, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H⁷), 7.59 (ddd, J = 7.9, 6.9, 0.7 Hz, 1H, H⁶), 2.49 (d, J = 6.6 Hz, 2H, H³), 2.12 – 1.98 (m, 1H, H⁴), 1.10 (d, J = 6.7 Hz, 6H, CH₃+H⁵) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.4 (CH, CHO), 150.2 (C, C^{8a}), 144.6 (C, C²), 137.0 (CH, C⁴), 133.0 (CH, C⁷), 129.7 (CH, C⁵), 129.3 (CH, C⁸), 128.9 (C, C³), 128.1 (CH, C⁶), 126.4 (C, C^{4a}), 97.3 (C, C^{2'}), 78.5 (C, C^{1'}), 29.0 (CH₂, C^{3'}), 28.1 (CH, C^{4'}), 22.4 (2xCH₃, CH₃ + C^{5'}) ppm.

IR (neat): ν 3054, 2957, 2929, 2849, 2220, 1693, 1654, 1612, 1581, 1550, 1489, 1453, 1383, 1369, 1153, 1112, 915, 786, 760, 753, 712 cm⁻¹.

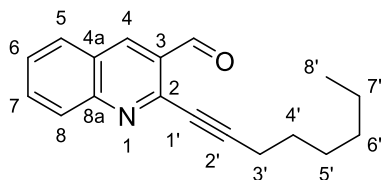
Mp: 120-125 °C.

HRMS (CI): m/z calculated for C₁₆H₁₆NO [M+H]⁺: 238.1226, found: 238.1236.

2-(Oct-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

150

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 6:4) to afford **150** as a light yellow solid.

**Formula:** C₁₈H₁₉NO**M_w:** 265.36 g.mol⁻¹**Aspect:** light yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.43**Yield:** 72 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.69 (s, 1H, CHO), 8.69 (s, 1H, H⁴), 8.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 7.83 (ddd, J = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H⁷), 7.59 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H⁶), 2.58 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H^{3'}), 1.71 (p, J = 7.3 Hz, 2H, H^{4'}), 1.55 – 1.45 (m, 2H, H^{5'}), 1.38 – 1.29 (m, 4H, H^{6'} + H^{7'}), 0.90 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H^{8'}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.4 (CH, CHO), 150.3 (C, C^{8a}), 144.7 (C, C²), 136.9 (CH, C⁴), 133.0 (CH, C⁷), 129.7 (CH, C⁵), 129.3 (CH, C⁸), 128.9 (C, C³), 128.0 (CH, C⁶), 126.4 (C, C^{4a}), 98.4 (C, C^{2'}), 77.6 (C, C^{1'}), 31.5 (CH₂, C^{7'} or C^{6'}), 28.9 (CH₂, C^{5'}), 28.3 (CH₂, C^{4'}), 22.7 (CH₂, C^{7'} or C^{6'}), 19.8 (CH₂, C^{3'}), 14.2 (CH₃, C^{8'}) ppm.

IR (neat): ν 3073, 2930, 2854, 2234, 1691, 1584, 1552, 1491, 1469, 1452, 1372, 1157, 1112, 960, 915, 783, 745, 711 cm⁻¹.

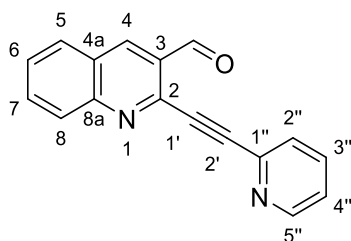
Mp: 54 – 56 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₁₈H₁₉NONa [M+Na]⁺: 288.1364, found: 288.1363.

2-(Pyridin-2-ylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

151

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 6:4) to afford **151** as a brownish solid.

**Formula:** C₁₇H₁₀N₂O**M_w:** 258.27 g.mol⁻¹**Aspect:** brownish solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 1:1):** 0.25**Yield:** 89 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.78 (s, 1H, CHO), 8.71 (s, 1H, H⁴), 8.65 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H^{5''}), 8.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 7.82 (ddd, J = 8.5, 6.9, 1.4 Hz, 1H, H⁷), 7.70 (m, 2H, H^{2''} + H^{3''}), 7.60 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H⁶), 7.30 (ddd, J = 6.8, 4.8, 1.9 Hz, 1H, H^{4''}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.5 (CH, CHO), 150.5 (C, C^{1''}), 150.2 (C, C^{8a}), 143.2 (C, C²), 142.1 (CH, C^{5''}), 137.2 (CH, C⁴), 136.5 (CH, C^{3''}), 135.1 (CH, C⁷), 129.8 (CH, C⁵), 129.5 (CH, C⁸), 129.2 (C, C³), 128.7 (CH, C⁶), 128.2 (CH, C^{2''}), 126.7 (C, C^{4a}), 124.2 (CH, C^{4''}), 93.7 (C, C^{2'}), 84.5 (C, C^{1'}) ppm.

IR (neat): ν 3049, 2859, 2215, 1692, 1580, 1554, 1489, 1465, 1429, 1373, 1117, 1050, 887, 784, 750 cm⁻¹.

Mp: 167 – 168 °C (lit. 167 – 168 °C).

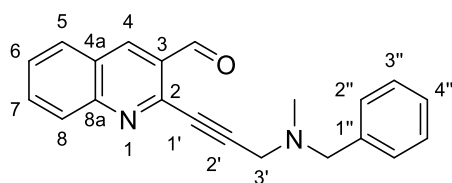
HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₁₇H₁₁N₂O [M+H]⁺: 259.0871, found: 259.0872.

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁵³

2-(3-(Benzyl(methyl)amino)prop-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

152

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **135** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 6:4) to afford **152** as an orange solid.



Formula: C₂₁H₁₈N₂O

M_w: 314.38 g.mol⁻¹

Aspect: orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.37

Yield: 88 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.76 (s, 1H, CHO), 8.73 (s, 1H, H⁴), 8.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H⁸), 7.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H⁵), 7.86 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H⁷), 7.62 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H⁶), 7.40 – 7.24 (m, 5H, H^{1''} + H^{2''} + H^{3''}), 3.73 (s, 2H, H^{3'}), 3.72 (s, 2H, N-CH₂-Ph), 2.49 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.6 (CH, CHO), 150.0 (C, C^{8a}), 143.6 (C, C²), 138.1 (C, C^{1''}), 137.1 (CH, C⁴), 133.0 (CH, C⁷), 129.6 (CH, C⁵), 129.2 (CH, C⁸), 129.1 (2xCH, C^{2''}), 128.7 (C, C³), 128.4 (2xCH, C^{3''}), 128.2 (CH, C⁶), 127.4 (CH, C^{4''}), 126.4 (C, C^{4a}), 91.9 (C, C^{2'}), 82.3 (C, C^{1'}), 60.5 (CH₂, N-CH₂-Ph), 45.9 (CH₂, C^{3'}), 42.2 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3049, 2945, 2845, 2826, 2226, 1693, 1610, 1581, 1551, 1490, 1453, 1369, 1321, 1151, 1107, 1018, 915, 787, 755, 738, 698 cm⁻¹.

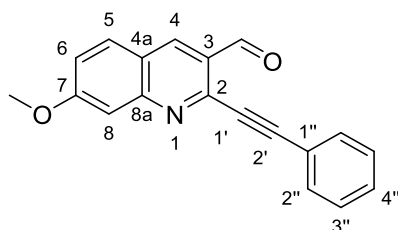
Mp: 81 – 83 °C.

HRMS (CI): *m/z* calculated for C₂₁H₁₉N₂O [M+H]⁺: 315.1497, found: 315.1497.

7-Methoxy-2-(phenylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

155

The crude product obtained by **method B** with the iodinated quinoline **153** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 85:15) to afford **155** as an orange solid.



Formula: C₁₉H₁₃NO₂

M_w: 287.32 g.mol⁻¹

Aspect: orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.45

Yield: 91 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.76 (s, 1H, CHO), 8.66 (s, 1H, H⁴), 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.70 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, H^{2''}), 7.48 (s, 1H, H⁸), 7.46 – 7.39 (m, 3H, H^{3''} + H^{4''}), 7.31 – 7.26 (m, 1H, H⁶), 3.99 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

Mp: 173 – 175 °C.

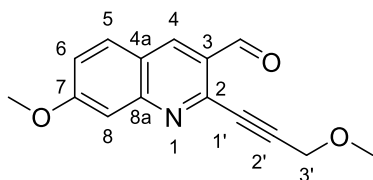
³⁵³ P. Belmont, T. Belhadj, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1793–5.

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³⁵⁴

7-Methoxy-2-(3-methoxyprop-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

156

The crude product obtained by **method B** with the iodinated quinoline **153** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 6:4) to afford **156** as an orange solid.



Formula: C₁₅H₁₃NO₃

M_w: 255.27 g.mol⁻¹

Aspect: orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.19

Yield: 58 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.63 (s, 1H, CHO), 8.63 (s, 1H, H⁴), 7.82 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.43 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H⁸), 7.26 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H, H⁶), 4.47 (s, 2H, H^{3'}), 3.97 (s, 3H, O⁷-CH₃), 3.52 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.5 (CH, CHO), 163.9 (C, C⁷), 152.4 (C, C^{8a}), 144.0 (C, C²), 136.5 (CH, C⁴), 130.8 (CH, C⁵), 127.4 (C, C³), 122.2 (CH, C⁶), 122.1 (C, C^{4a}), 107.2 (CH, C⁸), 91.5 (C, C^{2'}), 82.8 (C, C^{1'}), 60.4 (CH₂, C^{3'}), 58.3 (CH₃, O-CH₃), 56.0 (CH₃, O-CH₃) ppm.

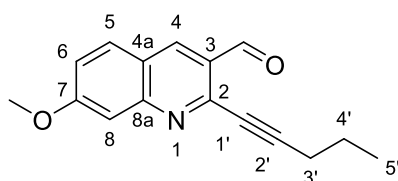
Mp: 117 - 119 °C (lit. 124 - 126 °C).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.²⁸⁴

7-Methoxy-2-(pent-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

157

The crude product obtained by **method B** with the iodinated quinoline **153** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 75:25) to afford **157** as a yellow solid.



Formula: C₁₆H₁₅NO₂

M_w: 253.30 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.37

Yield: 62 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.63 (s, 1H, CHO), 8.59 (s, 1H, H⁴), 7.79 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H⁸), 7.22 (dd, J = 9.0, 2.3 Hz, 1H, H⁶), 3.96 (s, 3H, O-CH₃), 2.55 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H^{3'}), 1.74 (h, J = 7.3 Hz, 2H, H^{4'}), 1.10 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H^{5'}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.24 (CH, CHO), 163.7 (C, C⁷), 152.4 (C, C^{8a}), 145.3 (C, C²), 136.2 (CH, C⁴), 130.8 (CH, C⁵), 127.4 (C, C³), 121.8 (C, C^{4a}), 121.7 (CH, C⁶), 107.1 (CH, C⁸), 97.8 (C, C^{2'}), 77.8 (C, C^{1'}), 55.9 (CH₃, O-CH₃), 21.9 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 21.8 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 13.9 (CH₃, C^{5'}) ppm.

³⁵⁴ A. Chandra, B. Singh, S. Upadhyay, R. M. Singh, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11680-5.

IR (neat): ν 3016, 2960, 2860, 2231, 1685, 1614, 1585, 1496, 1446, 1388, 1374, 1310, 1219, 1134, 1021, 917, 839, 827, 762, 706 cm^{-1} .

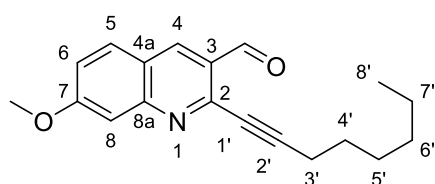
Mp: 104 – 106 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 276.1000, found: 276.0990.

7-Methoxy-2-(oct-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

158

The crude product obtained by **method B** with the iodinated quinoline **153** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et_3N), 1:0 to 8:2) to afford **158** as an ochre solid.



Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_2$

M_w: 295.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: ochre solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.39

Yield: 80 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.63 (s, 1H, CHO), 8.60 (s, 1H, H⁴), 7.80 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁵), 7.42 (s, 1H, H⁸), 7.23 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁶), 3.96 (s, 3H, O-CH₃), 2.57 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H³), 1.71 (p, J = 7.1 Hz, 2H, H⁴), 1.55 – 1.44 (m, 2H, H⁵), 1.39 – 1.29 (m, 4H, H⁶ + H⁷), 0.97 – 0.87 (m, 3H, H⁸) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.3 (CH, CHO), 163.7 (C, C⁷), 152.5 (C, C^{8a}), 145.4 (C, C²), 136.2 (CH, C⁴), 130.8 (CH, C⁵), 127.5 (C, C³), 121.8 (C, C^{4a}), 121.7 (CH, C⁶), 107.2 (CH, C⁸), 98.1 (C, C^{2'}), 77.7 (C, C^{1'}), 55.9 (CH₃, O-CH₃), 31.5 (CH₂, C^{6'} or C^{7'}), 28.9 (CH₂, C^{5'}), 28.4 (CH₂, C^{4'}), 22.7 (CH₂, C^{6'} or C^{7'}), 19.8 (CH₂, C^{3'}), 14.2 (CH₃, C^{8'}) ppm.

IR (neat): ν 2933, 2855, 2225, 1689, 1620, 1582, 1495, 1445, 1388, 1375, 1309, 1227, 1134, 1014, 875, 842, 814, 763, 708 cm^{-1} .

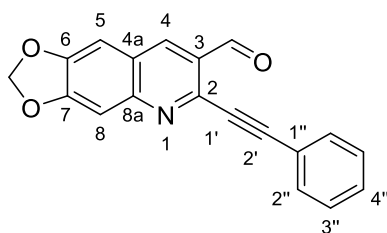
Mp: 61 – 63 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 318.1470, found: 318.1465.

6,7-Methylenedioxy-2-(phenylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

159

To a flask containing the corresponding iodinated quinoline **154** (174 mg, 0.600 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (42.0 mg, 0.0600 mmol, 0.1 eq.) and CuI (35.0 mg, 0.180 mmol, 0.3 eq.) under argon atmosphere, was added dry DMF (3 mL) and Et_3N (0.167 mL, 1.20 mmol, 2.0 eq.), which were both previously degassed by bubbling argon for 10 min. Lastly, phenylacetylene (0.198 mL, 1.80 mmol, 3.0 eq.) was added dropwise to the reaction and the mixture was heated at 40 °C under microwave irradiation for 1,75 h. After completion (attested by TLC analysis), the reaction mixture was filtered through a short pad of alumina and celite® and washed with EtOAc. The crude was concentrated under reduced pressure to afford pure **159** as a beige solid.

**Formula:** C₁₉H₁₁NO₃**M_w:** 301.30 g.mol⁻¹**Aspect:** beige solid**R_f**(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.19**Yield:** 62 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.74 (s, 1H, CHO), 8.52 (s, 1H, H⁴), 7.76 – 7.61 (m, 2H, H^{2''}), 7.51 – 7.37 (m, 4H, H⁸ + H^{3''} + H^{4''}), 7.16 (s, 1H, H⁵), 6.18 (s, 2H, O-CH₂-O) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.0 (CH, CHO), 154.0 (C, C⁷), 149.7 (C, C⁶ or C^{8a}), 149.5 (C, C⁶ or C^{8a}), 142.5 (C, C²), 135.0 (CH, C⁴), 132.4 (2xCH, C^{2''}), 129.8 (CH, C^{4''}), 128.7 (2xCH, C^{3''}), 127.9 (C, C³), 124.2 (C, C^{4a}), 121.7 (C, C^{1''}), 105.9 (CH, C⁸), 104.1 (CH, C⁵), 102.7 (CH₂, O-CH₂-O), 95.0 (C, C^{2'}), 85.6 (C, C^{1'}) ppm.

IR (neat): ν 3046, 2922, 2845, 2742, 2215, 1948, 1738, 1687, 1640, 1609, 1573, 1508, 1493, 1482, 1463, 1435, 1396, 1379, 1243, 1192, 1182, 1168, 1117, 1087, 1024, 939, 895, 851, 824, 773, 753, 739, 720, 684 cm⁻¹.

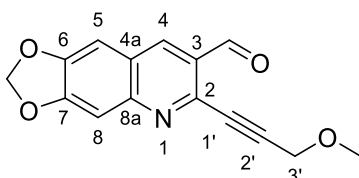
Mp: 247 – 249 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₉H₁₂NO₃ [M+H]⁺: 302.0812, found: 302.0803.

2-(3-Methoxyprop-1-yn-1-yl)-6,7-methylenedioxy-quinoline-3-carbaldehyde

160

The crude product obtained by **method A** with the iodinated quinoline **154** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 7:3) to afford **160** as a white solid.

**Formula:** C₁₅H₁₁NO₄**M_w:** 269.26 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f**(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.19**Yield:** 86 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.60 (s, 1H, CHO), 8.47 (s, 1H, H⁴), 7.38 (s, 1H, H⁸), 7.13 (s, 1H, H⁵), 6.17 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.45 (s, 2H, H^{3'}), 3.51 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.6 (CH, CHO), 154.0 (C, C⁷), 149.6 (C, C⁶ or C^{8a}), 149.5 (C, C⁶ or C^{8a}), 141.7 (C, C²), 135.0 (CH, C⁴), 127.9 (C, C³), 124.4 (C, C^{4a}), 105.8 (CH, C⁸), 104.0 (CH, C⁵), 102.7 (CH₂, O-CH₂-O), 91.1 (C, C^{2'}), 82.6 (C, C^{1'}), 60.5 (CH₂, C^{3'}), 58.3 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3060, 2990, 2925, 2852, 2824, 218, 1688, 1611, 1575, 1467, 1439, 1397, 1374, 1356, 1266, 1221, 1181, 1171, 1147, 1094, 1030, 937, 915, 899, 849, 823, 747 cm⁻¹.

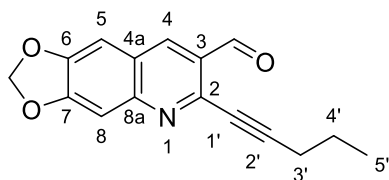
Mp: 167 – 169 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₅H₁₁NO₄Na [M+Na]⁺: 292.0586, found: 292.0579.

6,7-Methylenedioxy-2-(pent-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

161

The crude product obtained by **method A** with the iodinated quinoline **154** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 7:3) to afford **161** as a pale yellow solid.



Formula: C₁₆H₁₃NO₃

M_w: 267.28 g.mol⁻¹

Aspect: pale yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.40

Yield: 90 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.61 (s, 1H, CHO), 8.45 (s, 1H, H⁴), 7.38 (s, 1H, H⁸), 7.11 (s, 1H, H⁵), 6.15 (s, 2H, O-CH₂-O), 2.54 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H^{3'}), 1.73 (h, J = 7.3 Hz, 2H, H^{4'}), 1.09 (t, J = 7.6, 3H, H^{5'}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.4 (CH, CHO), 153.8 (C, C⁷), 149.5 (C, C⁶), 149.1 (C, C^{8a}), 143.1 (C, C²), 134.7 (CH, C⁴), 127.8 (C, C³), 123.9 (C, C^{4a}), 105.7 (CH, C⁸), 104.0 (CH, C⁵), 102.5 (CH₂, O-CH₂-O), 97.3 (C, C²), 77.5 (C, C^{1'}), 21.9 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 21.8 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 13.9 (CH₃, C^{5'}), ppm.

IR (neat): ν 3046, 2970, 2902, 2844, 2737, 2227, 1692, 1611, 1578, 1460, 1438, 1396, 1376, 1256, 1230, 1218, 1172, 1143, 1096, 1027, 990, 938, 862, 841, 823 cm⁻¹.

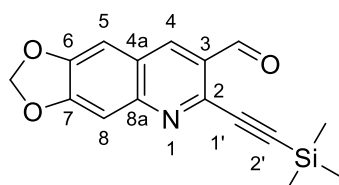
Mp: 155 - 157 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₁₆H₁₄NO₃ [M+H]⁺: 268.0974, found: 268.0969.

6,7-Methylenedioxy-2-(3-trimethylsilyl-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

162

The crude product obtained by **method A** with the iodinated quinoline **154** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 8:2) to afford **162** as a beige solid.



Formula: C₁₆H₁₅NO₃Si

M_w: 297.39 g.mol⁻¹

Aspect: beige solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.23

Yield: quant.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.62 (s, 1H, CHO), 8.47 (s, 1H, H⁴), 7.41 (s, 1H, H⁸), 7.13 (s, 1H, H⁵), 6.17 (s, 2H, O-CH₂-O), 0.32 (s, 9H, Si-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.2 (CH, CHO), 153.9 (C, C⁷), 149.5 (C, C⁶ + C^{8a}), 142.2 (C, C²), 134.7 (CH, C⁴), 128.0 (C, C³), 124.4 (C, C^{4a}), 105.9 (CH, C⁸), 104.1 (CH, C⁵), 102.7 (CH₂, O-CH₂-O), 101.7 (C, C²), 100.2 (C, C^{1'}), -0.19 (3xCH₃, Si-CH₃), ppm.

IR (neat): ν 3050, 3009, 2961, 2909, 2851, 2783, 2162, 1686, 1575, 1484, 1456, 1435, 1392, 1367, 1251, 1208, 1132, 1087, 1037, 949, 940, 837, 758, 724 cm⁻¹.

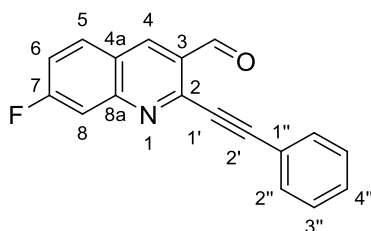
Mp: 168 - 170 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₆H₁₅NO₃NaSi [M+Na]⁺: 320.0719, found: 320.0715.

7-Fluoro-2-(phenylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

163

The crude product obtained by **method B** with the chlorinated quinoline **138** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 6:4) to afford **163** as a yellow solid.



Formula: C₁₈H₁₀FNO

M_w: 275.28 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.4

Yield: 83 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.78 (s, 1H, CHO), 8.75 (s, 1H, H⁴), 7.99 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 1H, H⁵), 7.82 (dd, *J* = 9.7, 2.0 Hz, 1H, H⁸), 7.71 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 2H, H^{2''}), 7.53 – 7.37 (m, 4H, H⁶ + H^{3''} + H^{4''}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.4 (s, CH, CHO), 165.4 (d, *J* = 256.6 Hz, C, C⁷), 151.3 (d, *J* = 13.6 Hz, C, C^{8a}), 145.0 (s, C, C²), 137.3 (s, CH, C⁴), 132.5 (s, 2xCH, C^{2''}), 132.1 (d, *J* = 10.5 Hz, CH, C⁵), 130.3 (s, CH, C^{4''}), 128.8 (s, 2xCH, C^{3''}), 128.5 (d, *J* = 2.4 Hz, C, C^{4a}), 123.7 (s, C, C³), 121.2 (s, C, C^{1''}), 119.3 (d, *J* = 25.9 Hz, CH, C⁶), 113.1 (d, *J* = 21.0 Hz, CH, C⁸), 96.9 (s, C, C²), 85.2 (s, C, C¹) ppm.

IR (neat): ν 3050, 2922, 2213, 1688, 1622, 1585, 1563, 1497, 1428, 1389, 1374, 1296, 1215, 1118, 1088, 885, 864, 814, 763, 748, 684 cm⁻¹.

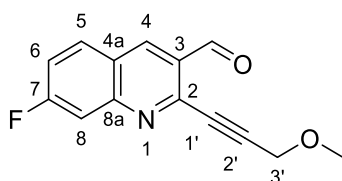
Mp: 159 - 161 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₈H₁₀FNONa [M+Na]⁺: 298.0644, found: 298.0648.

7-Fluoro-2-(3-methoxyprop-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

164

The crude product obtained by **method B** with the chlorinated quinoline **138** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 8:2) to afford **164** as a yellow solid.



Formula: C₁₄H₁₀FNO₂

M_w: 243,24 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.38

Yield: 50 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.65 (s, 1H, CHO), 8.72 (s, 1H, H⁴), 7.97 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 1H, H⁵), 7.75 (dd, *J* = 9.7, 2.2 Hz, 1H, H⁸), 7.42 (td, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H⁶), 4.48 (s, 2H, H^{3'}), 3.52 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.3 (s, CH, CHO), 165.3 (d, *J* = 256.5 Hz, C, C⁷), 151.4 (d, *J* = 13.6 Hz, C, C^{8a}), 144.4 (s, C, C²), 137.1 (s, CH, C⁴), 132.1 (d, *J* = 10.4 Hz, CH, C⁵), 128.5 (d, *J* = 2.5 Hz, C, C^{4a}), 123.7 (s, C, C³), 121.2 (s, C, C^{1''}), 119.3 (d, *J* = 25.9 Hz, CH, C⁶), 113.1 (d, *J* = 21.0 Hz, CH, C⁸), 96.9 (s, C, C²), 85.2 (s, C, C¹) ppm.

285

C^{4a}), 123.8 (s, C, C^3), 119.4 (d, $J = 25.9$ Hz, CH, C^6), 113.3 (d, $J = 20.9$ Hz, CH, C^8), 92.5 (s, C, $C^{2'}$), 82.5 (s, C, $C^{1'}$), 60.4 (s, CH_2 , C^3), 58.4 (s, CH_3 , O- CH_3) ppm.

IR (neat): ν 3048, 2942, 2832, 2223, 1688, 1622, 1585, 1563, 1492, 1429, 1374, 1362, 1208, 1121, 1094, 984, 901, 868, 812, 765 cm^{-1} .

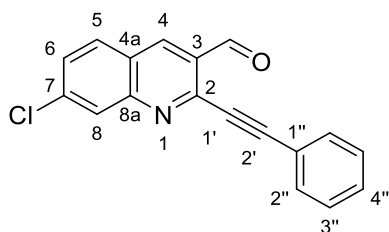
Mp: 95 – 97 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $C_{14}H_{10}FNO_2Na$ $[M+Na]^+$: 266.0593, found: 266.0587.

7-Chloro-2-(phenylethynyl)quinoline-3-carbaldehyde

165

The crude product obtained by **method B** with the chlorinated quinoline **137** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et_3N), 1:0 to 9:1) to afford **165** as a white solid.



Formula: $C_{18}H_{10}ClNO$

M_w: 291.73 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect: white solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.29

Yield: 79 %

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d): δ = 10.78 (s, 1H, CHO), 8.72 (s, 1H, H^4), 8.16 (s, 1H, H^8), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H^5), 7.70 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $H^{2'}$), 7.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H^6), 7.52 – 7.38 (m, 3H, $H^{3''} + H^{4''}$) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform- d): δ = 190.5 (CH, CHO), 150.6 (C, C^{8a}), 145.1 (C, C^2), 139.5 (C, C^7), 137.0 (CH, C^4), 132.5 (2xCH, $C^{2''}$), 130.9 (CH, C^5), 130.2 (CH, $C^{4''}$), 129.5 (CH, C^6), 129.1 (C, C^3), 128.8 (2xCH, $C^{3''}$), 128.5 (CH, C^8), 124.9 (C, C^{4a}), 121.3 (C, $C^{1''}$), 96.5 (C, $C^{2'}$), 85.4 (C, $C^{1'}$) ppm.

IR (neat): ν 3049, 2860, 2207, 1692, 1609, 1585, 1545, 1480, 1382, 1370, 1289, 1146, 1065, 933, 881, 867, 806, 753, 744, 681 cm^{-1} .

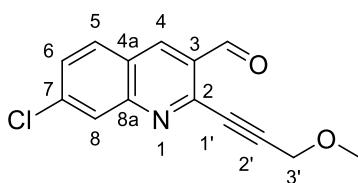
Mp: 178 – 180 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $C_{18}H_{11}ClNO$ $[M+H]^+$: 292.0524, found: 292.0523.

7-Chloro-2-(3-methoxyprop-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

166

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **137** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et_3N), 1:0 to 6:4) to afford **166** as a beige solid.



Formula: $C_{14}H_{10}ClNO_2$

M_w: 259.69 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect: beige solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.30

Yield: 81 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.66 (s, 1H, CHO), 8.70 (s, 1H, H⁴), 8.13 (s, 1H, H⁸), 7.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H⁵), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H⁶), 4.48 (s, 2H, H³), 3.53 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.1 (CH, CHO), 150.2 (C, C^{8a}), 144.2 (C, C²), 139.4 (C, C⁷), 136.9 (CH, C⁴), 130.7 (CH, C⁵), 129.5 (CH, C⁶), 128.9 (C, C³), 128.3 (CH, C⁸), 124.9 (C, C^{4a}), 92.4 (C, C²), 82.3 (C, C¹), 60.3 (CH₂, C³), 58.3 (O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3049, 2949, 2853, 2233, 1693, 1608, 1583, 1548, 1479, 1365, 1095, 1069, 897, 846, 756 cm⁻¹.

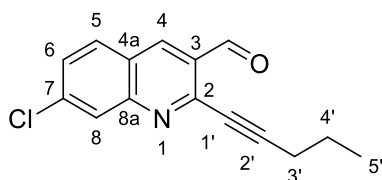
Mp: 127 - 129 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₄H₁₀ClNO₂Na [M+Na]⁺: 282.0298, found: 282.0293.

7-Chloro-2-(pent-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

167

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **137** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 8:2) to afford **167** as a pale yellow solid.



Formula: C₁₅H₁₂ClNO

M_w: 257.72 g.mol⁻¹

Aspect: pale yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.33

Yield: 47 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.65 (s, 1H, CHO), 8.65 (s, 1H, H⁴), 8.10 (s, 1H, H⁸), 7.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H⁵), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H⁶), 2.57 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H³), 1.75 (h, *J* = 7.2 Hz, 2H, H⁴), 1.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H⁵) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.9 (CH, CHO), 150.4 (C, C^{8a}), 145.6 (C²), 139.3 (C⁷), 136.7 (CH, C⁴), 130.8 (CH, C⁵), 129.2 (CH, C⁶), 129.0 (C, C³), 128.3 (CH, C⁸), 124.8 (C, C^{4a}), 99.2 (C, C²), 77.4 (C, C¹), 21.8 (CH₂, C³ or C⁴), 21.8 (CH₂, C³ or C⁴), 13.9 (CH₃, C⁵) ppm.

IR (neat): ν 3050, 2965, 2860, 2216, 1686, 1608, 1583, 1547, 1482, 1467, 1368, 1066, 871, 845, 807, 754 cm⁻¹.

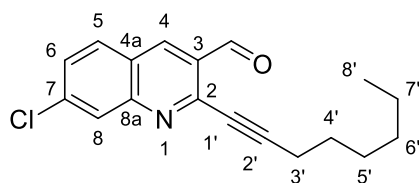
Mp: 109 - 111 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₅H₁₂ClNONa [M+Na]⁺: 280.0505, found: 280.0509.

7-Chloro-2-(oct-1-yn-1-yl)quinoline-3-carbaldehyde

168

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **137** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 95:5) to afford **168** as a pale yellow solid.

**Formula:** C₁₈H₁₈ClNO**M_w:** 299.80 g.mol⁻¹**Aspect:** pale yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1):** 0.45**Yield:** 76 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.66 (s, 1H, CHO), 8.66 (s, 1H, H⁴), 8.10 (s, 1H, H⁸), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H⁵), 7.54 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H, H⁶), 2.59 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H³), 1.72 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H, H⁴), 1.57 – 1.45 (m, 2H, H⁵), 1.41 – 1.29 (m, 4H, H⁶ + H⁷), 1.00 – 0.85 (m, 3H, H⁸) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.0 (CH, CHO), 150.5 (C, C^{8a}), 145.7 (C, C²), 139.3 (C, C⁷), 136.7 (CH, C⁴), 130.9 (CH, C⁵), 129.2 (CH, C⁶), 129.0 (C, C³), 128.3 (CH, C⁸), 124.8 (C, C^{4a}), 99.4 (C, C^{2'}), 77.4 (C, C^{1'}), 31.4 (CH₂, C⁶ or C⁷), 28.9 (CH₂, C⁵), 28.3 (CH₂, C⁴), 22.7 (CH₂, C⁶ or C⁷), 19.9 (CH₂, C³), 14.2 (CH₃, C⁸) ppm.

IR (neat): ν 3046, 2929, 2857, 2229, 1686, 1606, 1582, 1547, 1471, 1368, 1065, 932, 875, 847, 810, 756, 708 cm⁻¹.

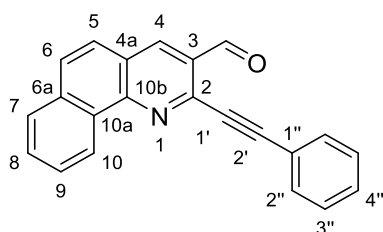
Mp: 77 – 79 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₈H₁₈ClNONa [M+Na]⁺: 322.0975, found: 322.0977.

2-(Phenylethynyl)benzo[*h*]quinoline-3-carbaldehyde

169

The crude product obtained by **method C** with the chlorinated quinoline **136** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (1 % Et₃N), 95:5 to 8:2) to afford **169** as a light yellow solid.

**Formula:** C₂₂H₁₃NO**M_w:** 307.35 g.mol⁻¹**Aspect:** light yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.59**Yield:** 76 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.84 (s, 1H, CHO), 9.43 – 9.35 (m, 1H, H¹⁰), 8.69 (s, 1H, H⁴), 7.94 – 7.89 (m, 1H, H⁷), 7.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H⁶), 7.82 – 7.69 (m, 5H, H⁵ + H⁸ + H⁹ + H^{2''}), 7.51 – 7.39 (m, 3H, H^{3''} + H^{4''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.2 (CH, CHO), 149.7 (C, C^{10b}), 143.3 (C, C²), 135.7 (CH, C⁴), 135.0 (C, C^{6a}), 132.4 (2xCH, C^{2''}), 130.6 (C, C^{10a}), 130.1 (CH, C⁸), 129.9 (CH, C⁶ or C^{4''}), 129.8 (CH, C⁶ or C^{4''}), 129.7 (C, C³), 128.8 (2xCH, C^{3''}), 128.1 (CH, C⁷), 127.9 (CH, C⁹), 126.1 (CH, C¹⁰), 125.7 (CH, C⁵), 125.2 (C, C^{4a}), 121.8 (C, C^{1''}), 95.4 (C, C^{2'}), 86.2 (C, C^{1'}) ppm.

IR (neat): ν 3056, 2850, 2209, 1686, 1578, 1556, 1493, 1443, 1381, 1334, 1168, 995, 925, 817, 802, 743, 680 cm⁻¹.

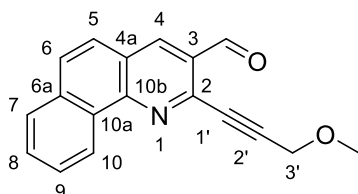
Mp: 121 – 123 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{22}H_{13}NONa$ $[M+Na]^+$: 330.0895, found: 330.0889.

2-(3-Methoxyprop-1-yn-1-yl)benzo[h]quinoline-3-carbaldehyde

170

The crude product obtained by **method C** with the chlorinated quinoline **136** was purified by column chromatography (basic alumina gel, DCM/MeOH, 1:0 to 9:1) to afford **170** as a light yellow solid.



Formula: $C_{18}H_{13}NO_2$

M_w: 275.31 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(alumina, cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.4

Yield: 65 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.74 (s, 1H, CHO), 9.40 – 9.29 (m, 1H, H¹⁰), 8.68 (s, 1H, H⁴), 7.96 – 7.89 (m, 1H, H⁷), 7.87 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H⁶), 7.83 – 7.71 (m, 3H, H⁵ + H⁸ + H⁹), 4.53 (s, 2H, H^{3'}), 3.57 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.9 (CH, CHO), 149.6 (C, C^{10b}), 142.6 (C, C²), 135.7 (CH, C⁴), 135.0 (C, C^{6a}), 130.5 (C, C^{10a}), 130.1 (CH, C⁸), 129.9 (CH, C⁶), 129.7 (C, C³), 128.1 (CH, C⁷), 127.9 (CH, C⁹), 126.0 (CH, C¹⁰), 125.6 (CH, C⁵), 125.4 (C, C^{4a}), 91.4 (C, C^{2'}), 83.2 (C, C^{1'}), 60.6 (CH₂, C^{3'}), 58.4 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3056, 2930, 2823, 2223, 1687, 1578, 1558, 1488, 1442, 1402, 1382, 1363, 1328, 1132, 1096, 917, 897, 817, 803, 748 cm⁻¹.

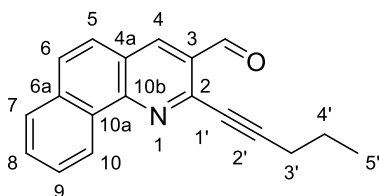
Mp: 147 – 149 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{18}H_{13}NO_2Na$ $[M+Na]^+$: 298.0844, found: 298.0830.

2-(Pent-1-yn-1-yl)benzo[h]quinoline-3-carbaldehyde

171

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **136** was purified by column chromatography (silica gel, DCM/petroleum ether (0.5 % Et₃N), 3:7 to 6:4) to afford **171** as a beige solid.



Formula: $C_{19}H_{15}NO$

M_w: 273.34 g.mol⁻¹

Aspect: beige solid

R_f(DCM/EP, 1:1): 0.45

Yield: 82 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.74 (s, 1H, CHO), 9.39 – 9.30 (m, 1H, H¹⁰), 8.64 (s, 1H, H⁴), 7.92 – 7.86 (m, 1H, H⁷), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H⁶), 7.79 – 7.69 (m, 3H, H⁵ + H⁸ + H⁹), 2.61 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H^{3'}), 1.79 (h, J = 7.2 Hz, 2H, H^{4'}), 1.14 (t, J = 7.3 Hz, 3H, H^{5'}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.6 (CH, CHO), 149.6 (C, C^{10b}), 144.0 (C, C²), 135.5 (CH, C⁴), 135.0 (C, C^{6a}), 130.6 (C, C^{10a}), 130.0 (CH, C⁸), 129.7 (C, C³), 129.4 (CH, C⁶), 128.0 (CH, C⁷), 127.7 (CH, C⁹), 126.0 (CH, C¹⁰), 125.7 (CH, C⁵), 125.0 (C, C^{4a}), 97.8 (C, C^{2'}), 78.2 (C, C^{1'}), 22.0 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 21.9 (CH₂, C^{3'} or C^{4'}), 13.9 (CH₃, C^{5'}) ppm.

IR (neat): ν 3051, 2960, 2847, 2230, 1686, 1580, 1558, 1499, 1486, 1402, 1377, 1327, 1136, 984, 934, 823, 800, 749, 739, 714 cm^{-1} .

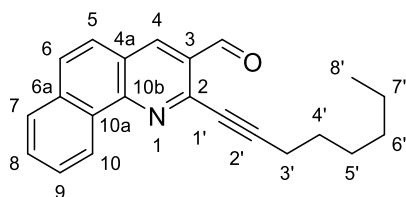
Mp: 105 – 107 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 274.1232, found: 274.1224.

2-(Oct-1-yn-1-yl)benzo[*h*]quinoline-3-carbaldehyde

172

The crude product obtained by **method A** with the chlorinated quinoline **136** was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 95:5) to afford **172** as a beige solid.



Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}$

M_w: 315.42 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: beige solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 99:1): 0.28

Yield: 83 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.74 (s, 1H, CHO), 9.39 – 9.30 (m, 1H, H¹⁰), 8.65 (s, 1H, H⁴), 7.93 – 7.87 (m, 1H, H⁷), 7.84 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H⁶), 7.79 – 7.70 (m, 3H, H⁵ + H⁸ + H⁹), 2.63 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H³), 1.75 (p, J = 7.2 Hz, 2H, H⁴), 1.63 – 1.49 (m, 2H, H⁵), 1.37 (m, 4H, H⁶ + H⁷), 0.98 – 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H⁸) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 191.7 (CH, CHO), 149.7 (C, C^{10b}), 144.0 (C, C²), 135.5 (CH, C⁴), 135.0 (C, C^{6a}), 130.6 (C, C^{10a}), 130.0 (CH, C⁸), 129.7 (C, C³), 129.4 (CH, C⁶), 128.1 (CH, C⁷), 127.7 (CH, C⁹), 126.0 (CH, C¹⁰), 125.7 (CH, C⁵), 125.0 (C, C^{4a}), 98.1 (C, C²), 78.0 (C, C¹), 31.5 (CH₂, C⁷ or C⁶), 29.0 (CH₂, C⁵), 28.5 (CH₂, C⁴), 22.7 (CH₂, C⁷ or C⁶), 20.0 (CH₂, C³), 14.2 (CH₃, C⁸) ppm.

IR (neat): ν 3051, 2930, 2849, 2227, 1687, 1579, 1558, 1486, 1402, 1377, 1327, 1137, 993, 935, 823, 800, 749, 715 cm^{-1} .

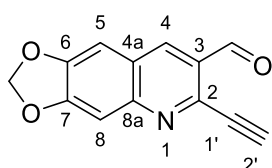
Mp: 72 – 74 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NONa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 338.1521, found: 338.1515.

2-Ethynyl-6,7-methylenedioxyquinoline-7-carbaldehyde

183

To a solution of **162** in DCM at 0 °C was added dropwise a 1 N tetra-*n*-butylammonium fluoride solution in THF. After 30 min, the crude was filtered through a short pad of silica and celite® and washed with a DCM/MeOH 9:1 mixture. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 6:4) to afford **183** as a yellow solid.



Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{NO}_3$

M_w: 225.20 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.33

Yield: 80 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.61 (s, 1H, CHO), 8.50 (s, 1H, H⁴), 7.41 (s, 1H, H⁸), 7.15 (s, 1H, H⁵), 6.18 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.53 (s, 1H, H²) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 190.7 (CH, CHO), 154.0 (C, C⁷), 149.7 (C⁶), 149.5 (C⁸), 141.2 (C, C²), 134.9 (CH, C⁴), 128.1 (C, C³), 124.6 (C, C^{4a}), 105.9 (CH, C⁸), 104.0 (CH, C⁵), 102.7 (CH₂, O-CH₂-O), 82.7 (CH, C²), 79.8 (C, C¹) ppm.

IR (neat): ν 3300, 2922, 2852, 2110, 1686, 1575, 1461, 1439, 1395, 1369, 1251, 1194, 1167, 1127, 1086, 1037, 946, 927, 887, 859, 826, 774 cm⁻¹.

Mp: 181 - 183 °C (decomposition).

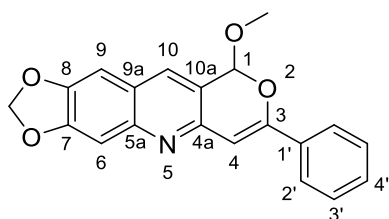
HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₃H₈NO₃ [M+H]⁺: 226.0504, found: 226.0501.

Pyrano- and furoquinolines – Series E1

1-Methoxy-7,8-methylenedioxy-3-phenyl-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

173

To a suspension of alkyne **159** (100 mg, 0.330 mmol) in anhydrous MeOH (6 mL) was added silver triflate (13.0 mg, 0.0500 mmol, 15 mol%) and the mixture was stirred at r.t. for 24 h. At that time, silver triflate (13.0 mg, 0.0500 mmol, 15 mol%) was added again and agitation was maintained overnight. Then, the reaction mixture was filtered through a short pad of celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, DCM (40 mL) was added and the organic layer was washed with saturated NaHCO₃ (3x30 mL) and brine (30 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified with preparative TLC (silica gel, DSM/EtOAc, 98:2) to afford **173** as a yellow solid.



Formula: C₂₀H₁₅NO₄

M_w: 333.34 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/EtOAc, 98:2): 0.12

Yield: 34 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.12 (s, 1H, H¹⁰), 7.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, H^{2'}), 7.55 – 7.42 (m, 3H, H^{3'}), 7.38 (s, 1H, H⁹), 7.31 (s, 1H, H⁶), 6.98 (s, 1H, H⁴), 6.49 (s, 1H, H¹), 6.22 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.59 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 153.7 (C, C³), 151.1 (C, C⁷), 147.1 (C, C^{4a} or C⁸), 147.0 (C, C^{4a} or C⁸), 146.7 (C, C^{5a}), 133.5 (C, C^{1'}), 132.3 (CH, C¹⁰), 129.7 (CH, C⁴), 128.8 (2xCH, C^{3'}), 125.1 (2xCH, C^{2'}), 123.4 (C, C^{9a}), 120.5 (C, C^{10a}), 104.4 (CH, C⁶), 103.2 (CH, C⁹), 102.0 (CH₂, O-CH₂-O), 101.7 (CH, C⁴), 99.4 (CH, C¹), 55.2 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3437, 3038, 2909, 2833, 2519, 1889, 1620, 1576, 1539, 1497, 1464, 1410, 1388, 1332, 1289, 1263, 1231, 1217, 1175, 1122, 1099, 1072, 1033, 1021, 981, 959, 944, 922, 912, 890, 866, 838, 823, 792, 765, 734, 720, 688 cm⁻¹.

Mp: 213 – 215 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₂₀H₁₆NO₄ [M+H]⁺: 334.1074, found: 334.1060.

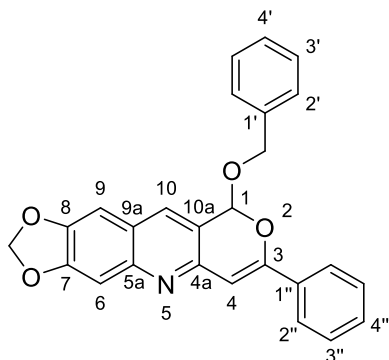
Microanalysis: calculated for C₂₀H₁₅NO₄: % C = 72.06, % H = 4.54, % N = 4.20; found: % C = 71.86, % H = 4.78, % N = 4.04.

1-Benzyloxy-7,8-methylenedioxy-3-phenyl-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

174

To a suspension of alkyne **159** (100 mg, 0.330 mmol) in anhydrous benzylic alcohol (1.2 mL) was added silver triflate (13.0 mg, 0.0500 mmol, 15 mol%) and the mixture was stirred at r.t. for 4 days. Then, the reaction mixture was filtered through a short pad of celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, DCM (40 mL) was added and the organic layer was washed with saturated NaHCO₃ (3x30 mL) and brine (30 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under

reduced pressure. The resulting suspension was filtered and washed with diethyl ether to afford pure **174** as a yellow solid.



Formula: C₂₆H₁₉NO₄

M_w: 409.44 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(DCM/EtOAc, 97:3): 0.34

Yield: 22 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.12 (s, 1H, H¹⁰), 7.94 (d, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2H, H^{2''}), 7.55 – 7.41 (m, 3H, H^{3''} + H^{4''}), 7.40 (s, 1H, H⁶), 7.33 (s, 1H, H⁹), 7.34 – 7.19 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 6.99 (s, 1H, H¹ or H⁴), 6.71 (s, 1H, H¹ or H⁴), 6.22 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, O-CH₂-O), 4.99 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, O-CH₂-Ph), 4.94 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, O-CH₂-Ph) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 153.8 (C), 151.1 (C), 147.2 (C), 147.1 (C), 146.7 (C), 137.4 (C), 133.5 (C), 132.3 (CH), 129.8 (CH), 128.8 (2xCH), 128.4 (2xCH), 127.9 (2xCH), 127.8 (CH or C), 125.2 (2xCH), 123.5 (CH or C), 120.6 (CH or C), 104.4 (CH), 103.3 (CH), 102.1 (CH₂, O-CH₂-O), 101.8 (CH), 98.1 (CH), 69.6 (CH₂, O-CH₂-Ph) ppm.

IR (neat): ν 3060, 3034, 2875, 2791, 2189, 1951, 1890, 1640, 1619, 1574, 1508, 1496, 1465, 1452, 1443, 1408, 1381, 1355, 1332, 1286, 1258, 1244, 1219, 1174, 1123, 1095, 1066, 1033, 1011, 970, 945, 924, 913, 894, 860, 824, 776, 762, 740, 693, 684 cm⁻¹.

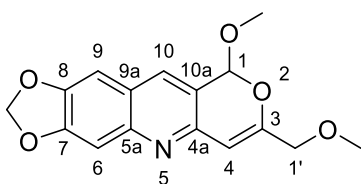
Mp: 185 – 187 °C.

Microanalysis: calculated for C₂₆H₁₉NO₄: % C = 76.27, % H = 4.68, % N = 3.42; found: % C = 76.39, % H = 4.69, % N = 3.34.

1-Methoxy-3-methoxymethyl-7,8-methylenedioxy-1H-pyrano[4,3-*b*]quinoline

175

To a suspension of alkyne **160** (53.9 mg, 0.200 mmol) in MeOH (4 mL), silver triflate (2.60 mg, 0.0100 mmol, 5 mol%) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. The crude was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 4:6) afforded pure **175** as a pale orange solid.



Formula: C₁₆H₁₅NO₅

M_w: 301.30 g.mol⁻¹

Aspect: pale orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.33

Yield: 93 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.78 (s, 1H, H¹⁰), 7.30 (s, 1H, H⁶), 7.01 (s, 1H, H⁹), 6.34 (s, 1H, H⁴), 6.14 (s, 1H, H¹), 6.08 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.18 (d, J = 13.4 Hz, 1H, H^{1'}), 4.08 (d, J = 13.4 Hz, 1H, H^{1'}), 3.59 (s, 3H, O¹-CH₃), 3.44 (s, 3H, O^{1'}-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 155.0 (C, C³), 151.4 (C, C⁷), 147.5 (C, C⁸), 147.3 (C, C^{5a}), 147.1 (C, C^{4a}), 132.4 (CH, C¹⁰), 124.1 (C, C^{9a}), 120.6 (C, C^{10a}), 105.5 (CH, C⁶), 105.0 (CH, C⁴), 103.1 (CH, C⁹), 101.9 (CH₂, O-CH₂-O), 100.2 (CH, C¹), 72.0 (CH₂, C^{1'}), 58.4 (CH₃, O^{1'}-CH₃), 55.6 (CH₃, O¹-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 2996, 2916, 2826, 1650, 1619, 1494, 1459, 1417, 1388, 1249, 1227, 1149, 1085, 1062, 1039, 1017, 993, 952, 906, 862, 840, 822, 782, 770 cm⁻¹.

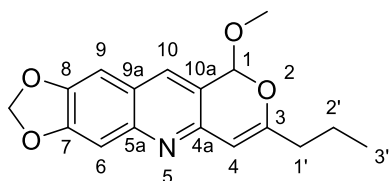
Mp: 98 - 100 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₆H₁₅NO₅: % C = 63.78, % H = 5.02, % N = 4.65; found: % C = 63.48, % H = 4.98, % N = 4.77.

1-Methoxy-7,8-methylenedioxy-3-propyl-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

176

To a suspension of **161** (53.5 mg, 0.200 mmol) in MeOH (4 mL), silver triflate (2.60 mg, 0.0100 mmol, 5 mol%) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. The crude was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 8:2) afforded pure **176** as a pale yellow solid.



Formula: C₁₇H₁₇NO₄

Mw: 299.33 g.mol⁻¹

Aspect: pale yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.35

Yield: 90 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.76 (s, 1H, H¹⁰), 7.30 (s, 1H, H⁶), 7.01 (s, 1H, H⁹), 6.12 – 6.06 (m, 4H, H¹ + H⁴ + O-CH₂-O), 3.58 (s, 3H, O-CH₃), 2.44 – 2.28 (m, 2H, H^{1'}), 1.70 (h, J = 7.4 Hz, 2H, H^{2'}), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H^{3'}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 160.5 (C, C³), 151.3 (C, C⁷), 148.1 (C, C⁸), 147.2 (2xC, C^{4a} + C^{5a}), 132.3 (CH, C¹⁰), 123.7 (C, C^{9a}), 120.2 (C, C^{10a}), 105.4 (CH, C⁶), 103.2 (CH, C⁹), 102.5 (CH, C⁴), 101.8 (CH₂, O-CH₂-O), 100.2 (CH, C¹), 55.5 (CH₃, O-CH₃), 36.4 (CH₂, C^{1'}), 20.2 (CH₂, C^{2'}), 13.7 (CH₃, C^{3'}) ppm.

IR (neat): ν 3027, 2960, 2911, 2834, 1642, 1622, 1498, 1464, 1447, 1412, 1382, 1246, 1220, 1176, 1076, 1037, 997, 948, 909, 861, 826, 780 cm⁻¹.

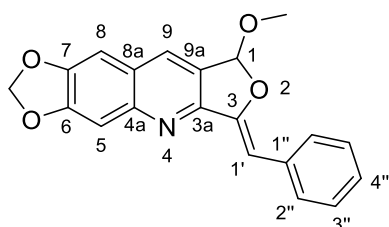
Mp: 97 - 99 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₇H₁₇NO₄: % C = 68.22, % H = 5.72, % N = 4.68; found: % C = 68.01, % H = 6.00, % N = 4.95.

1-Methoxy-7,8-methylenedioxy-3-phenyl-1H-furo[3,4-b]quinoline

177

A suspension of silver imidazolate (3.40 mg, 0.0200 mmol, 5 mol%) and triphenylphosphine (5.20 mg, 0.0200 mmol, 5 mol%) in MeOH (6 mL) was stirred at r.t. for 30 min. Then, alkyne **159** (120 mg, 0.400 mmol) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. DCM (2 mL) was added to the crude and the resulting suspension was filtered through a short pad of celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, column chromatography (basic alumina, cyclohexane/EtOAc, 9:1) afforded **177** as a yellow solid.

**Formula:** C₂₀H₁₅NO₄**M_w:** 333.34 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.25**Yield:** 95 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.36 (s, 1H, H⁹), 7.84 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H^{2''}), 7.49 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.45 (s, 1H, H⁵ or H⁸), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H^{3''}), 7.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H^{4''}), 6.80 (s, 1H, H^{1'}), 6.51 (s, 1H, H¹), 6.27 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.56 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 151.8 (C), 151.4 (C), 150.9 (C), 148.1 (C), 148.0 (C), 135.0 (C), 130.6 (CH, C⁹), 128.6 (2xCH, C^{2''} or C^{3''}), 128.5 (2xCH, C^{2''} or C^{3''}), 126.9 (CH, C^{4''}), 126.5 (C), 124.9 (C), 105.6 (CH, C^{1'}), 104.7 (CH, C⁵ or C⁸), 103.5 (CH, C⁵ or C⁸), 102.5 (CH₂, O-CH₂-O), 98.5 (CH, C¹), 55.0 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3089, 3055, 3023, 2919, 2851, 2044, 1738, 1668, 1647, 1625, 1604, 1501, 1474, 1446, 1401, 1371, 1345, 1313, 1260, 1242, 1193, 1158, 1104, 1081, 1033, 961, 940, 916, 910, 881, 856, 846, 834, 821, 775, 756, 740, 721, 681 cm⁻¹.

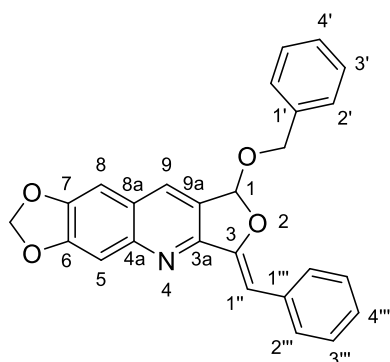
Mp: 183 - 185 °C.**HRMS (ES⁺):** *m/z* calculated for C₂₀H₁₆NO₄ [M+H]⁺: 334.1074, found: 334.1065.

Microanalysis: calculated for C₂₀H₁₅NO₄: % C = 72.06, % H = 4.54, % N = 4.20; found: % C = 72.04, % H = 4.66, % N = 4.10.

1-Benzyloxy-7,8-methylenedioxy-3-phenyl-1H-furo[3,4-b]quinoline

178

A suspension of silver imidazolate (1.70 mg, 0.00970 mmol, 5 mol%) and triphenylphosphine (2.60 mg, 0.00970 mmol, 5 mol%) in benzylic alcohol (0.6 mL) was stirred at r.t. for 30 min. Then, alkyne **159** (60 mg, 0.200 mmol) was added and the mixture was stirred at r.t. for 1 h. The crude was filtered through a short pad of celite® which was washed with DCM. Concentration under reduced pressure afforded pure **177** as a yellow solid.

**Formula:** C₂₆H₁₉NO₄**M_w:** 409.44 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.37**Yield:** 59 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.39 (s, 1H, H⁹), 7.77 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H^{2'''}), 7.49 (s, 1H, H⁵), 7.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H^{3'''}), 7.45 (s, 1H, H⁸), 7.54 – 7.28 (m, 5H, H^{2'} + H^{3'} + H^{4'}), 7.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H^{4'''}), 6.99 (s, 1H, H¹ or H^{1'}), 6.51 (s, 1H, H¹ or H^{1'}), 6.27 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.96 (s, 2H, O-CH₂-Ph) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 151.8 (C), 151.4 (C), 150.9 (C), 148.1 (C), 148.0 (C), 137.4 (C), 135.0 (C), 130.6 (CH), 128.6 (2xCH), 128.5 (2xCH), 128.4 (2xCH), 128.1 (2xCH), 127.9 (CH), 127.2 (C), 126.5 (CH), 124.9 (C), 105.0 (CH), 104.7 (CH), 103.6 (CH), 102.5 (CH₂, O-CH₂-O), 98.6 (CH), 70.4 (CH₂, O-CH₂-Ph) ppm.

IR (neat): ν 3062, 3023, 2913, 2793, 2187, 1955, 1888, 1733, 1664, 1648, 1625, 1605, 1511, 1494, 1461, 1409, 1382, 1368, 1340, 1304, 1254, 1229, 1192, 1155, 1101, 1072, 1036, 990, 947, 922, 879, 867, 857, 839, 822, 783, 751, 725, 692 cm⁻¹.

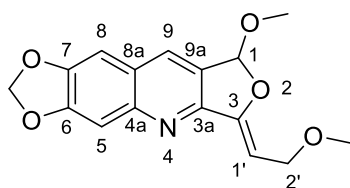
Mp: 190 - 192 °C.**HRMS (ES⁺):** *m/z* calculated for C₂₆H₂₀NO₄ [M+H]⁺: 410.1387, found: 410.1368.

Microanalysis: calculated for C₂₆H₁₉NO₄: % C = 76.27, % H = 4.68, % N = 3.42; found: % C = 75.91, % H = 5.04, % N = 3.09.

1-Methoxy-3-methoxymethyl-7,8-methylenedioxy-1H-furo[3,4-*b*]quinoline

179

To a suspension of **160** (53.9 mg, 0.200 mmol) in MeOH (4 mL), silver (II) oxide (2.30 mg, 0.0100 mmol, 5 mol%) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. The crude was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 1:1) afforded pure **179** as a pale yellow solid.

**Formula:** C₁₆H₁₅NO₅**M_w:** 301.30 g.mol⁻¹**Aspect:** pale yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3):** 0.23**Yield:** 93 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.97 (s, 1H, H⁹), 7.40 (s, 1H, H⁵), 7.07 (s, 1H, H⁸), 6.45 (s, 1H, H¹), 6.12 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H^{1'}), 4.37 (dd, *J* = 12.2, 7.5 Hz, 1H, H²), 4.30 (dd, *J* = 12.2, 7.4 Hz, 1H, H^{2'}), 3.51 (s, 3H, O¹-CH₃), 3.41 (s, 3H, O²-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 153.4 (C, C³), 151.9 (C, C⁶), 151.5 (C, C^{4a}), 148.8 (C, C^{3a}), 148.5 (C, C⁷), 130.0 (CH, C⁹), 127.7 (C, C^{9a}), 125.3 (C, C^{8a}), 106.0 (CH, C⁵), 104.7 (CH, C¹), 103.4 (CH, C⁸), 102.2 (CH₂, O-CH₂-O), 96.2 (CH, C¹), 66.3 (CH₂, C²), 57.9 (CH₃, O²-CH₃), 55.0 (CH₃, O¹-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 2961, 2910, 2820, 1688, 1625, 1500, 1461, 1366, 1245, 1224, 1199, 1186, 1153, 1099, 1079, 1028, 993, 977, 939, 907, 855, 799, 764 cm⁻¹.

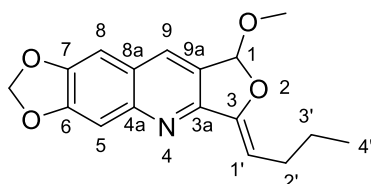
Mp: 137 - 139 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₆H₁₅NO₅: % C = 63.78, % H = 5.02, % N = 4.65; found: % C = 64.12, % H = 5.36, % N = 4.25.

1-Methoxy-7,8-methylenedioxy-3-propyl-1*H*-furo[3,4-*b*]quinoline

180

To a suspension of **161** (53.5 mg, 0.200 mmol) in MeOH (4 mL), silver (II) oxide (2.30 mg, 0.0100 mmol, 5 mol%) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. The crude was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with DCM. After concentration under reduced pressure, column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 9:1) afforded pure **180** as a white solid.



Formula: C₁₇H₁₇NO₄

M_w: 299.33 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.57

Yield: 78 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.96 (s, 1H, H⁹), 7.40 (s, 1H, H⁵), 7.07 (s, 1H, H⁸), 6.44 (s, 1H, H¹), 6.12 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.69 (t, *J* = 7.70 Hz, 1H, H¹), 3.50 (s, 3H, O-CH₃), 2.42 – 2.30 (m, 2H, H²), 1.56 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, H³), 1.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H⁴) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 152.2 (C), 151.8 (C), 150.9 (C), 148.6 (C), 148.2 (C), 130.2 (CH, C⁹), 127.6 (C), 124.9 (C), 105.8 (CH, C⁵), 104.1 (CH, C¹), 103.5 (CH, C⁸), 102.2 (CH₂, O-CH₂-O), 101.4 (CH, C¹), 54.5 (CH₃, O-CH₃), 27.5 (CH₂, C²), 22.9 (CH₂, C³), 14.1 (CH₃, C⁴) ppm.

IR (neat): ν 2952, 2924, 2873, 1688, 1625, 1500, 1463, 1401, 1368, 1247, 1231, 1217, 1193, 1155, 1087, 1025, 969, 935, 909, 841, 749, 711 cm⁻¹.

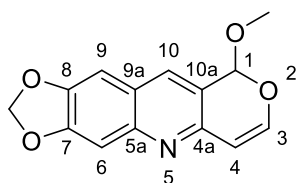
Mp: 121 - 123 °C.

Microanalysis: calculated for C₁₇H₁₇NO₄ · 1.25 H₂O: % C = 68.22, % H = 5.72, % N = 4.68; found: % C = 63.80 % H = 5.55, % N = 4.62.

1-Methoxy-7,8-methylenedioxy-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

182

To a suspension of **183** (45.0 mg, 0.200 mmol) in DCE (2 mL), silver triflate (2.60 mg, 0.0100 mmol, 5 mol%) and MeOH (0.081 mL, 2.00 mmol, 10 eq.) were added and the mixture was stirred at 50 °C overnight. Then, 10 eq. of MeOH were added and, after five more days, 5 mol% of AgOTf were added. After two more days of reaction, the crude was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with a DCM/MeOH 9:1 mixture. After concentration under reduced pressure, column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 7:3) afforded pure **182** as a pale yellow solid.



Formula: C₁₄H₁₁NO₄

M_w: 257.25 g.mol⁻¹

Aspect: pale yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.25

Yield: 73 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.81 (s, 1H, H¹⁰), 7.37 (s, 1H, H⁶), 7.03 (s, 1H, H⁹), 6.93 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H³), 6.30 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H⁴), 6.13 (s, 1H, H¹), 6.10 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.58 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 152.0 (C, C⁷), 148.6 (CH + C, C³ + C⁸), 147.9 (C, C^{4a} or C^{5a}), 146.1 (C, C^{4a} or C^{5a}), 133.5 (CH, C¹⁰), 124.2 (C, C^{9a}), 120.9 (C, C^{10a}), 105.6 (CH, C⁴), 104.7 (CH, C⁶), 103.2 (CH, C⁹), 102.1 (CH₂, O-CH₂-O), 99.7 (CH, C¹), 56.0 (CH₃, O-CH₃) ppm.

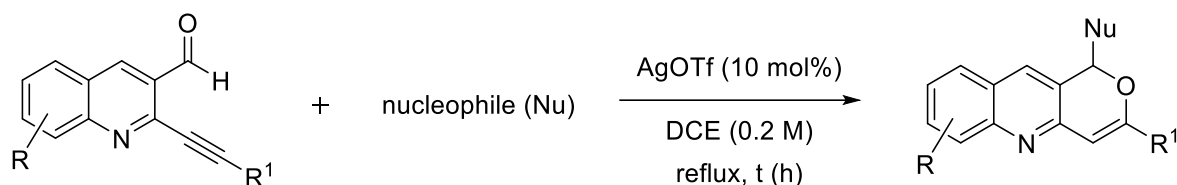
IR (neat): ν 3052, 2995, 2918, 2834, 1630, 1621, 1499, 1465, 1454, 1425, 1385, 1332, 1256, 1240, 1223, 1186, 1170, 1156, 1071, 1018, 962, 932, 915, 899, 842, 780, 760 cm⁻¹.

Mp: 161 - 163 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₄H₁₂NO₄ [M+H]⁺: 258.0766, found: 258.0759.

Pyranoquinolines – Series E2

Cyclofunctionalization with aromatic nucleophiles - General procedure

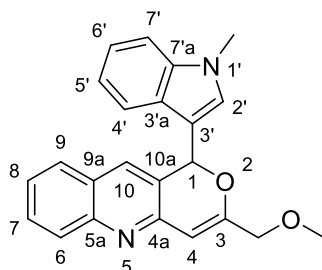


To a solution or suspension of the corresponding *ortho*-alkynylquinoline (x mmol, 1.0 eq.) in dry distilled DCE (1 mL), under argon, was introduced the nucleophilic moiety (3.0 eq.) and the silver catalyst (10 mol%). The mixture was stirred at reflux temperature and the reaction was monitored by TLC analysis until completion (1 - 24 h). Then, the reaction mixture was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with a DCM/MeOH 90/10 mixture. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel with various solvent mixtures.

3-(Methoxymethyl)-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

186

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **145** (x = 0.200 mmol, 45.0 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2 to 6:4) to afford **186** as an orange solid (61 mg, 86 %).



Formula: C₂₃H₂₀N₂O₂

Mw: 356.43 g.mol⁻¹

Aspect: orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4): 0.27

Yield: 86 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H⁶), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H⁹), 7.70 (s, 1H, H¹⁰), 7.65 (tt, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H, H⁷), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H⁴), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H⁷), 7.40 (tt, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, H⁸), 7.25 (s, 1H, H²), 7.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H⁶), 7.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H⁵), 6.85 (s, 1H, H¹), 6.22 (s, 1H, H⁴), 3.99 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, O-CH₂), 3.92 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, O-CH₂), 3.77 (s, 3H, N-CH₃), 3.24 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 160.5 (C, C³), 150.6 (C, C^{4a}), 147.5 (C, C^{5a}), 137.1 (C, C^{7'a}), 131.3 (CH, C¹⁰), 130.3 (CH, C²), 129.5 (CH, C⁷), 128.0 (CH, C⁶ or C⁹), 127.9 (CH, C⁶ or C⁹), 127.0 (C, C^{9a}), 125.9 (C, C^{10a} or C^{3'a}), 125.8 (C, C^{10a} or C^{3'a}), 125.3 (CH, C⁸), 121.6 (CH, C⁶), 119.7 (CH, C⁴), 119.3 (CH, C⁵), 111.8 (C, C³), 110.2 (CH, C⁷), 103.2 (CH, C⁴), 74.3 (CH, C¹), 70.7 (CH₂, O-CH₂), 57.8 (CH₃, O-CH₃), 32.5 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3051, 2932, 2823, 1638, 1615, 1559, 1476, 1463, 1424, 1303, 1197, 1107, 993, 968, 818, 754, 736 cm⁻¹.

Mp: 81 - 83 °C (decomposition).

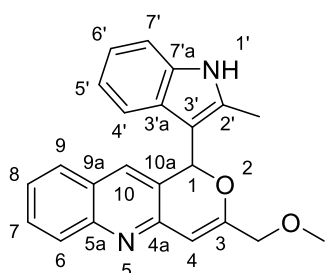
HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{23}H_{20}N_2O_2Na$ $[M+Na]^+$: 379.1422, found: 379.1430.

Microanalysis: calculated for $C_{23}H_{20}N_2O_2 \cdot 0.5 H_2O$: % C = 75.60, % H = 5.79, % N = 7.67; found: % C = 75.66, % H = 5.66, % N = 7.51.

3-(Methoxymethyl)-1-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

187

The reaction was carried out at 50 °C in DMF instead of DCE. After 2 h, the crude product obtained with alkyne **145** ($x = 0.665$ mmol, 150 mg) and 2-methylindole (262 mg, 2.00 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2 to 1:1) to afford **187** as a light yellow solid (85 mg, 36 %).



Formula: $C_{23}H_{20}N_2O_2$

M_w: 356.43 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4): 0.26

Yield: 36 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.29 (s, 1H, NH), 7.89 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H⁶), 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H⁹), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H⁷), 7.40 (s, 1H, H¹⁰), 7.38 – 7.32 (m, 2H, H⁸ + H^{7'}), 7.15 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H⁴), 7.02 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H^{6'}), 6.84 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H⁵), 6.76 (s, 1H, H¹), 6.26 (s, 1H, H⁴), 4.09 (d, J = 14.1 Hz, 1H, O-CH₂), 3.98 (d, J = 14.1 Hz, 1H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 2.44 (s, 3H, C^{2'}-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.7 (C, C³), 151.2 (C, C^{4a}), 147.4 (C, C^{5a}), 136.0 (C, C^{2'}), 135.6 (C, C^{7'a}), 131.1 (CH, C¹⁰), 129.4 (CH, C⁷), 127.9 (CH, C⁶ or C⁹), 127.9 (CH, C⁶ or C⁹), 127.1 (C, C^{9a} or C^{3'a}), 126.7 (C, C^{9a} or C^{3'a}), 126.4 (C, C^{10a}), 125.2 (CH, C⁸), 120.5 (CH, C⁶), 118.9 (CH, C⁴), 118.9 (CH, C⁵), 110.9 (CH, C⁷), 107.4 (C, C³), 103.0 (CH, C⁴), 74.6 (CH, C¹), 70.7 (CH₂, O-CH₂), 57.9 (CH₃, O-CH₃), 11.6 (CH₃, C^{2'}-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3142, 3034, 2920, 2841, 2759, 1645, 1617, 1566, 1496, 1464, 1426, 1397, 1311, 1198, 1105, 1010, 904, 816, 753, 740 cm⁻¹.

Mp: 226 – 228 °C (decomposition).

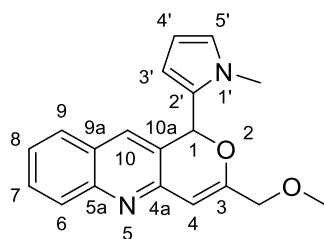
HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{23}H_{21}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 357.1598, found: 357.1589.

Microanalysis: calculated for $C_{23}H_{20}N_2O_2 \cdot 0.5 H_2O$: % C = 75.97, % H = 5.81, % N = 7.15; found: % C = 75.97, % H = 5.81, % N = 7.15.

3-(Methoxymethyl)-1-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

188

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **145** ($x = 0.400$ mmol, 90.1 mg) and *N*-methylpyrrole (0.106 mL, 1.20 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 75:25) to afford **188** as a beige solid (67 mg, 55 %).

**Formula:** C₁₉H₁₈N₂O₂**M_w:** 306.37 g.mol⁻¹**Aspect:** beige solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3):** 0.23**Yield:** 55 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 1.2 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 2.6, 1.8 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.05 (dd, *J* = 3.7, 2.6 Hz, 1H), 5.91 (dd, *J* = 3.7, 1.8 Hz, 1H), 4.04 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, O-CH₂), 3.99 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, O-CH₂), 3.69 (s, 3H, N-CH₃), 3.28 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 159.2 (C, C³), 150.9 (C), 148.3 (C), 131.8 (CH), 129.8 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (C), 127.8 (CH), 127.5 (C), 125.7 (CH), 125.0 (CH), 124.8 (C), 112.3 (CH), 106.9 (CH), 105.0 (CH), 74.1 (CH, C¹), 71.7 (CH₂, O-CH₂), 58.3 (CH₃, O-CH₃), 35.0 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3037, 3000, 2933, 2878, 2812, 1648, 1637, 1620, 1611, 1494, 1401, 1293, 1204, 1115, 1016, 1003, 944, 902, 848, 818, 751, 723 cm⁻¹.

Mp: 101 – 103 °C.

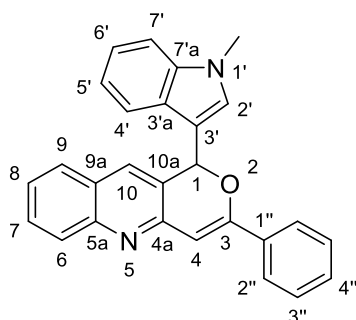
HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₉H₁₉N₂O₂ [M+H]⁺: 307.1441, found: 307.1429.

Microanalysis: calculated for C₁₉H₁₈N₂O₂ · 0.25 H₂O: % C = 73.41, % H = 6.00, % N = 9.01; found: % C = 73.70, % H = 5.83, % N = 8.85.

1-(1-Methyl-1H-indol-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrano[4,3-*b*]quinoline

196

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **144** (*x* = 0.200 mmol, 51.5 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 9:1 to 6:4) to afford **196** an orange oil (78 mg, quant.).

**Formula:** C₂₇H₂₀N₂O**M_w:** 388.47 g.mol⁻¹**Aspect:** orange oil**R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1):** 0.21**Yield:** quant.

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.83 – 7.74 (m, 3H), 7.70 – 7.56 (m, 3H), 7.42 – 7.26 (m, 6H), 7.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 3.74 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 159.9 (C, C³), 152.2 (C), 148.1 (C), 137.6 (C), 134.1 (C), 131.8 (CH), 130.0 (CH), 129.9 (CH), 129.8 (CH), 128.5 (2xCH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.5 (C), 126.7 (C),

126.2 (C), 126.1 (2xCH), 125.4 (CH), 122.4 (CH), 120.3 (CH), 120.0 (CH), 112.5 (C), 109.8 (CH), 102.1 (CH), 74.9 (CH, C¹), 33.0 (N-CH₃) ppm.

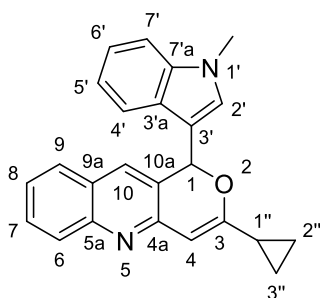
IR (neat): ν 3057, 2932, 1708, 1675, 1609, 1576, 1553, 1492, 1468, 1448, 1364, 1235, 1221, 1047, 907, 729, 690 cm⁻¹.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₂₇H₂₁N₂O [M+H]⁺: 389.1654, found: 389.1667.

3-Cyclopropyl-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

197

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **146** ($x = 0.200$ mmol, 44.3 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 7:3) to afford **197** as a pale yellow solid (62 mg, 89 %).



Formula: C₂₄H₂₀N₂O

M_w: 352.44 g.mol⁻¹

Aspect: pale yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.30

Yield: 89 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.61 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.34 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 7.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.73 (s, 3H, N-CH₃), 1.68 – 1.57 (m, 1H, C^{1''}), 1.01 – 0.91 (m, 1H, C^{2''} or C^{3''}), 0.81 – 0.70 (m, 2H, C^{2''} or C^{3''}), 0.70 – 0.59 (m, 1H, C^{2''} or C^{3''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 165.8 (C, C³), 152.3 (C), 148.3 (C), 137.6 (C), 131.4 (CH), 129.5 (2xCH), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 127.2 (C), 126.7 (C), 125.6 (C), 124.8 (CH), 122.4 (CH), 120.2 (CH), 120.0 (CH), 112.9 (C), 109.7 (CH), 101.2 (CH), 74.7 (CH, C¹), 33.0 (CH₃, N-CH₃), 14.8 (CH, C^{1''}), 6.5 (2xCH₂, C^{2''} + C^{3''}) ppm.

IR (neat): ν 3047, 2923, 2851, 1611, 1603, 1557, 1493, 1477, 1418, 1304, 1286, 1053, 1028, 965, 949, 809, 798, 752, 740 cm⁻¹.

Mp: 189 – 191 °C.

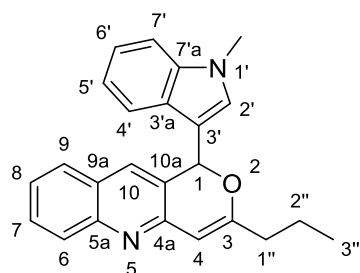
HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₂₄H₂₁N₂O [M+H]⁺: 353.1654, found: 353.1642.

Microanalysis: calculated for C₂₄H₂₀N₂O · 1 H₂O: % C = 77.81, % H = 5.99, % N = 7.56; found: % C = 78.00, % H = 5.71, % N = 7.28.

1-(1-Methyl-1H-indol-3-yl)-3-propyl-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

198

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **148** ($x = 0.200$ mmol, 44.7 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 7:3) to afford **198** as an orange oil (67 mg, 94 %).

**Formula:** C₂₄H₂₂N₂O**M_w:** 354.45 g.mol⁻¹**Aspect:** orange oil**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.15**Yield:** 94 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.61 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.5 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.38 – 7.27 (m, 3H), 7.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 3.77 (s, 3H, N-CH₃), 2.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C^{1''}), 1.64 – 1.50 (m, 7.1 Hz, 2H, C^{2''}), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, C^{3''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 167.7 (C, C³), 151.7 (C), 146.3 (C), 137.7 (C), 132.7 (CH), 130.2 (CH), 129.6 (CH), 127.8 (CH), 127.2 (CH), 127.1 (C), 126.6 (C), 125.7 (C), 125.5 (CH), 122.5 (CH), 120.4 (CH), 120.1 (CH), 112.4 (C), 109.8 (CH), 101.7 (CH), 74.9 (CH, C¹), 36.7 (CH₂, C^{1''}), 33.1 (CH₃, N-CH₃), 20.1 (CH₂, C^{2''}), 13.7 (CH₃, C^{3''}) ppm.

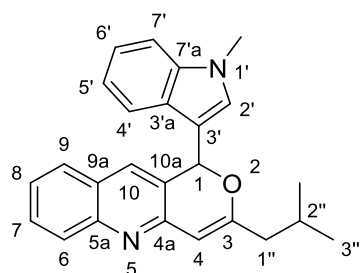
IR (neat): ν 3058, 2961, 2931, 2873, 1713, 1612, 1557, 1465, 1424, 1371, 1152, 976, 907, 727 cm⁻¹.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₂₄H₂₃N₂O [M+H]⁺: 355.1810, found: 355.1809.

3-(2-Methylpropan-1-yl)-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

199

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **149** (*x* = 0.200 mmol, 47.5 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 6:4) to afford **199** as a yellow oil (59 mg, 80 %).

**Formula:** C₂₅H₂₄N₂O**M_w:** 368.48 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow oil**R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3):** 0.39**Yield:** 80 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.69 – 7.48 (m, 4H), 7.40 – 7.27 (m, 3H), 7.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 3.77 (s, 3H, N-CH₃), 2.23 – 2.07 (m, 2H, C^{1''}), 2.00 – 1.85 (m, 1H, C^{2''}), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, C^{3''} or CH₃), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, C^{3''} or CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 165.1 (C, C³), 152.3 (C), 148.1 (C), 137.6 (C), 131.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (CH), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 127.4 (C), 126.6 (C), 125.7 (C), 125.0 (CH), 122.3 (CH), 120.5 (CH), 120.0 (CH), 112.6 (C), 109.7 (CH), 103.9 (CH), 74.8 (CH, C¹), 44.0 (CH₂, C^{1''}), 33.0 (CH₃, N-CH₃), 26.5 (CH, C^{2''}), 22.6 (CH₃, C^{3''} or CH₃), 22.3 (CH₃, C^{3''} or CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3052, 2955, 2927, 2868, 1632, 1615, 1558, 1495, 1463, 1422, 1304, 1152, 980, 907, 852, 816, 803, 752, 739, 729 cm⁻¹.

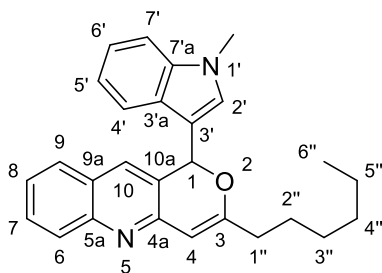
HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{25}H_{25}N_2O$ $[M+H]^+$: 369.1967, found: 369.1961.

Microanalysis: calculated for $C_{25}H_{24}N_2O \cdot 0.5 H_2O$: % C = 79.55, % H = 6.68, % N = 7.42; found: % C = 79.73, % H = 6.93, % N = 7.08.

3-Hexyl-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

200

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **150** ($x = 0.200$ mmol, 53.1 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 6:4) to afford **200** as a brownish oil (73 mg, 92 %).



Formula: $C_{27}H_{28}N_2O$

M_w: 396.53 g.mol⁻¹

Aspect: brownish oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.41

Yield: 92 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.62 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 2H), 7.35 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.13 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.75 (s, 3H, N-CH₃), 2.33 – 2.19 (m, 2H, C^{1''}), 1.50 (p, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.29 – 1.04 (m, 6H, 3xCH₂), 0.82 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H^{6''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 166.3 (C, C³), 152.1 (C), 147.7 (C), 137.7 (C), 131.9 (CH), 129.7 (CH), 129.6 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.3 (C), 126.6 (C), 125.7 (C), 125.1 (CH), 122.4 (CH), 120.5 (CH), 120.0 (CH), 112.8 (C), 109.7 (CH), 102.6 (CH), 74.8 (CH, C¹), 34.6 (CH₂, C^{1''}), 33.0 (CH₃, N-CH₃), 31.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 26.6 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.2 (CH₃, C^{6''}) ppm.

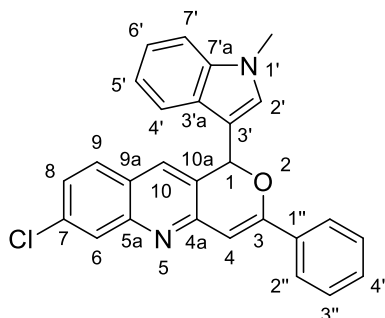
IR (neat): ν 3059, 2954, 2926, 2856, 1611, 1466, 1371, 1152, 1093, 980, 908, 730 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{27}H_{29}N_2O$ $[M+H]^+$: 397.2280, found: 397.2272.

7-Chloro-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

203

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **165** ($x = 0.200$ mmol, 58.3 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 85:15) to afford **203** as an orange oil (83 mg, quant.).



Formula: $C_{27}H_{19}ClN_2O$

M_w: 422.91 g.mol⁻¹

Aspect: orange oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.34

Yield: quant.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.08 (s, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 2H), 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.41 – 7.27 (m, 6H), 7.16 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.81 (s, 1H), 3.75 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 161.2 (C, C³), 152.9 (C), 147.7 (C), 137.6 (C), 135.8 (C), 133.7 (C), 132.0 (CH), 130.4 (CH), 129.8 (CH), 129.0 (CH), 128.6 (2xCH), 126.8 (CH), 126.6 (C), 126.4 (C), 126.4 (CH), 126.3 (2xCH), 125.7 (C), 122.5 (CH), 120.2 (CH), 120.2 (CH), 112.0 (C), 109.8 (CH), 101.2 (CH), 75.0 (CH, C¹), 33.0 (CH₃, N-CH₃) ppm.

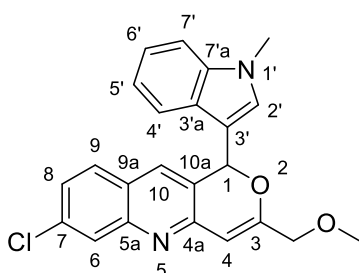
IR (neat): ν 3056, 2933, 1607, 1595, 1574, 1489, 1475, 1450, 1416, 1216, 1067, 1044, 1025, 942, 739, 688 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₇H₂₀ClN₂O [M+H]⁺: 423.1259, found: 423.1241.

7-Chloro-3-(methoxymethyl)-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

204

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **166** (x = 0.200 mmol, 51.3 mg) and *N*-methyldindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 75:25) to afford **204** as a brownish oil (73 mg, 93 %).



Formula: C₂₃H₁₉ClN₂O₂

M_w: 390.87 g.mol⁻¹

Aspect: brownish oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.15

Yield: 93 %

¹H NMR (400 MHz Chloroform-*d*): δ = 8.18 (s, 1H), 7.64 – 7.54 (m, 2H), 7.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 9.9 Hz, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.12 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 4.08 (d, J = 14.6 Hz, 1H, O-CH₂), 3.98 (d, J = 14.5 Hz, 1H, O-CH₂), 3.79 (s, 3H, O-CH₃ or N-CH₃), 3.37 (s, 3H, O-CH₃ or N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 165.2 (C, C³), 151.3 (C), 145.3 (C), 137.7 (C), 137.0 (C), 133.8 (CH), 130.1 (CH), 129.1 (CH), 127.2 (CH), 126.2 (C), 126.0 (C), 125.6 (CH), 125.4 (C), 122.7 (CH), 120.3 (CH), 120.3 (CH), 111.2 (C), 109.9 (CH), 101.1 (CH), 75.4 (CH, C¹), 71.5 (CH₂, O-CH₂), 59.1 (CH₃, O-CH₃), 33.2 (CH₃, N-CH₃) ppm.

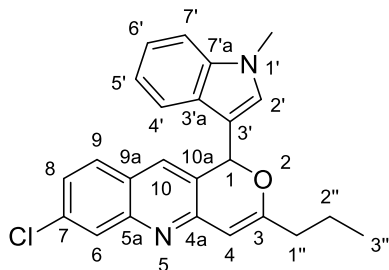
IR (neat): ν 3057, 2915, 2805, 1641, 1610, 1596, 1558, 1479, 1466, 1374, 1107, 1067, 983, 927, 922, 807, 750, 738, 720 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₃H₂₀ClN₂O₂ [M+H]⁺: 391.1208, found: 391.1198.

7-Chloro-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-3-propyl-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

205

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **167** ($x = 0.200$ mmol, 51.5 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 9:1) to afford **205** as a yellow solid (70 mg, 95 %).



Formula: C₂₄H₂₁ClN₂O

M_w: 388.90 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.18

Yield: 95 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.03 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.45 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.31 – 7.27 (m, 2H), 7.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.79 (s, 3H, N-CH₃), 2.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, C^{1''}), 1.58 (h, $J = 7.1$ Hz, 2H, C^{2''}), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, C^{3''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 168.3 (C), 152.6 (C), 146.9 (C), 137.7 (C), 136.0 (C), 132.4 (CH), 129.7 (CH), 129.0 (CH), 126.4 (C), 126.3 (2xCH), 125.9 (C), 125.5 (C), 122.5 (CH), 120.4 (CH), 120.1 (CH), 112.0 (C), 109.8 (CH), 101.6 (CH), 75.0 (CH), 36.7 (CH₂, C^{1''}), 33.1 (CH₃, N-CH₃), 20.1 (CH₂, C^{2''}), 13.7 (CH₃, C^{3''}) ppm.

IR (neat): ν 3048, 2959, 2929, 2869, 1630, 1614, 1596, 1557, 1478, 1464, 1336, 1066, 970, 919, 891, 809, 741, 720 cm⁻¹.

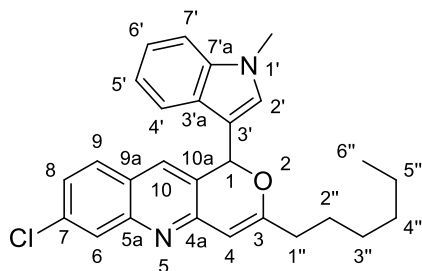
Mp: 164 – 166 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₂₄H₂₂ClN₂O [M+H]⁺: 389.1415, found: 389.1409.

7-Chloro-3-hexyl-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

206

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **168** ($x = 0.200$ mmol, 60.0 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 9:1) to afford **206** as a white solid (80 mg, 93 %).



Formula: C₂₇H₂₇ClN₂O

M_w: 430.98 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.33

Yield: 93 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.94 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 2H), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.05 (s, 1H),

3.73 (s, 3H, N-CH₃), 2.30 – 2.16 (m, 2H, C^{1''}), 1.47 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.27 – 1.08 (m, 6H, 3xCH₂), 0.79 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, C^{6''}) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 166.9$ (C), 153.2 (C), 148.5 (C), 137.7 (C), 135.3 (C), 131.4 (CH), 129.5 (CH), 128.9 (CH), 127.4 (CH), 126.6 (C), 125.9 (CH), 125.9 (C), 125.7 (C), 122.5 (CH), 120.4 (CH), 120.0 (CH), 112.6 (C), 109.7 (CH), 102.6 (CH), 74.8 (CH), 34.7 (CH₂, C^{1''}), 33.0 (CH₃, N-CH₃), 31.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 26.6 (CH₂), 22.6 (CH₂), 14.1 (CH₃, C^{6''}) ppm.

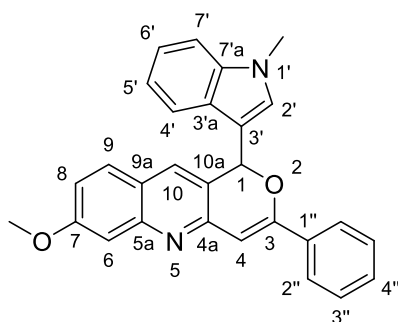
IR (neat): ν 3052, 2949, 2927, 2860, 1615, 1596, 1545, 1464, 1442, 1413, 1369, 1334, 1234, 1069, 1000, 987, 929, 893, 805, 772, 735 cm⁻¹.

Mp: 116 – 118 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₇H₂₈ClN₂O [M+H]⁺: 431.1885, found: 431.1872.

7-Methoxy-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-3-phenyl-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline **207**

After 2 h, the crude product obtained with alkyne **155** ($x = 0.200$ mmol, 57.5 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 9:1 to 1:1) to afford **207** as an orange oil (60 mg, 71 %).



Formula: C₂₈H₂₂N₂O₂

M_w: 418.50 g.mol⁻¹

Aspect: orange oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.16

Yield: 71 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 7.83 - 7.71$ (m, 3H), 7.60 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.41 – 7.27 (m, 5H), 7.16 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 3.97 (s, 3H, O-CH₃), 3.76 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

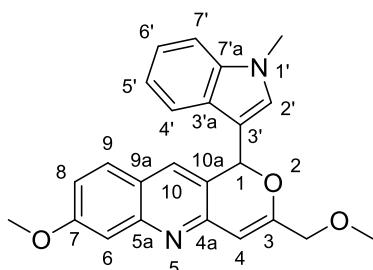
¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 161.1$ (C), 159.6 (C), 152.4 (C), 149.9 (C), 137.6 (C), 134.3 (C), 131.5 (CH), 129.8 (CH), 129.7 (CH), 128.8 (CH), 128.5 (2xCH), 126.9 (C), 126.1 (2xCH), 123.9 (C), 122.5 (C), 122.4 (CH), 120.3 (CH), 120.0 (CH), 118.2 (CH), 113.0 (C), 109.7 (CH), 107.0 (CH), 102.2 (CH), 75.0 (CH, C¹), 55.6 (CH₃, O-CH₃), 33.0 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3057, 2929, 2850, 1605, 1575, 1542, 1501, 1447, 1421, 1377, 1344, 1234, 1207, 1152, 1130, 1044, 1024, 811, 739, 691 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₈H₂₃N₂O₂ [M+H]⁺: 419.1754, found: 419.1739.

7-Methoxy-3-(methoxymethyl)-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **156** ($x = 0.300$ mmol, 76.6 mg) and *N*-methylindole (0.112 mL, 0.900 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2 to 4:6) to afford **208** as a light yellow solid (81 mg, 67 %).



Formula: C₂₄H₂₂N₂O₃

M_w: 386.45 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.21

Yield: 67 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.65 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H⁴), 7.46 (s, 1H, H¹⁰), 7.44 – 7.36 (m, 2H, H⁹ + H⁶), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H⁷), 7.30 – 7.23 (m, 1H, H⁶), 7.10 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H⁵), 7.01 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H⁸), 6.89 (s, 1H, H²), 6.66 (s, 1H, H¹), 6.35 (s, 1H, H⁴), 4.05 (d, J = 14.2 Hz, 1H, O-CH₂), 3.99 – 3.88 (m, 4H, O-CH₂ + O⁷-CH₃), 3.72 (s, 3H, N-CH₃), 3.36 (s, 3H, CH₂-O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 160.9 (C, C⁷), 160.5 (C, C³), 151.5 (C, C^{4a}), 149.7 (C, C^{5a}), 137.6 (C, C^{7a}), 131.6 (CH, C¹⁰), 129.7 (CH, C²), 128.7 (CH, C⁹), 126.5 (C, C^{3a}), 123.5 (C, C^{10a}), 122.5 (C, C^{9a}), 122.3 (CH, C⁶), 120.4 (CH, C⁴), 119.9 (CH, C⁵), 118.1 (CH, C⁸), 112.5 (C, C³), 109.6 (CH, C⁷), 107.0 (CH, C⁶), 103.9 (CH, C⁴), 75.2 (CH, C¹), 71.7 (CH₂, O-CH₂), 58.7 (CH₃, CH₂-O-CH₃), 55.5 (CH₃, O⁷-CH₃), 32.9 (CH₃, N-CH₃) ppm.

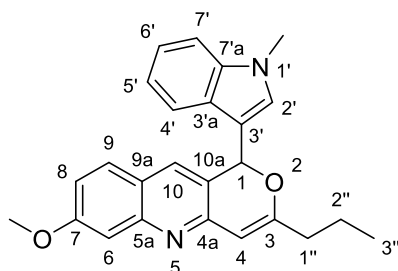
IR (neat): ν 3075, 2932, 2826, 1645, 1615, 1553, 1504, 1476, 1445, 1364, 1235, 1218, 1193, 1130, 1111, 1027, 840, 811, 744, 721 cm⁻¹.

Mp: 68 – 70 °C.

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₂₄H₂₃N₂O₃ [M+H]⁺: 387.1703, found: 387.1697.

7-Methoxy-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-3-propyl-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

After 2 h, the crude product obtained with alkyne **157** ($x = 0.200$ mmol, 50.7 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 6:4) to afford **209** as an orange oil (61 mg, 79 %).



Formula: C₂₅H₂₄N₂O₂

M_w: 384.48 g.mol⁻¹

Aspect: orange oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.21

Yield: 79 %

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.66 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H^{4'}), 7.42 – 7.30 (m, 4H, H⁶ + H⁹ + H¹⁰ + H^{7'}), 7.29 – 7.22 (m, 1H, H^{6'}), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H^{5'}), 6.98 (dd, J = 8.8, 1.9 Hz, 1H, H⁸), 6.87 (s, 1H, H^{2'}), 6.58 (s, 1H, H¹), 6.11 (s, 1H, H⁴), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 3.70 (s, 3H, N-CH₃), 2.25 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H^{1''}), 1.66 – 1.49 (m, 2H, H^{2''}), 0.88 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H^{3''}) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 165.5 (C, C³), 160.8 (C, C⁷), 152.3 (C, C^{4a}), 149.6 (C, C^{5a}), 137.5 (C, C^{7a}), 131.3 (CH, C¹⁰), 129.4 (CH, C²), 128.6 (CH, C⁹), 126.5 (C, C^{3'a}), 123.2 (C, C^{10a}), 122.2 (C + CH, C^{9a} + C^{6'}), 120.4 (CH, C^{4'}), 119.7 (CH, C^{5'}), 117.5 (CH, C⁸), 112.7 (C, C³), 109.5 (CH, C⁷), 106.8 (CH, C⁶), 102.6 (CH, C⁴), 74.8 (CH, C¹), 55.4 (CH₃, O-CH₃), 36.4 (CH₂, C^{1''}), 32.8 (CH₃, N-CH₃), 19.9 (CH₂, C^{2''}), 13.6 (CH₃, C^{3''}) ppm.

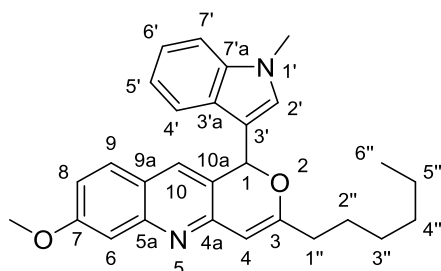
IR (neat): ν 3055, 3006, 2960, 2932, 2872, 2831, 1611, 1558, 1503, 1465, 1447, 1237, 1218, 1140, 1028, 983, 810, 739 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₅H₂₅N₂O₂ [M+H]⁺: 385.1911, found: 385.1896.

3-Hexyl-7-methoxy-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

210

After 3 h, the crude product obtained with alkyne **158** (x = 0.200 mmol, 59.1 mg) and *N*-methyldindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 7:3) to afford **210** as an orange oil (65 mg, 76 %).



Formula: C₂₈H₃₀N₂O₂

M_w: 426.56 g.mol⁻¹

Aspect: orange oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.19

Yield: 76 %

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.67 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.50 – 7.40 (m, 2H), 7.41 – 7.31 (m, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 1H), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 3.73 (s, 3H, N-CH₃), 2.25 (hept, J = 7.3 Hz, 2H, C^{1''}), 1.49 (p, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.33 – 1.01 (m, 6H, 3xCH₂), 0.82 (t, J = 6.4 Hz, 3H, C^{6''}) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 165.9 (C), 160.9 (C), 152.3 (C), 149.5 (C), 137.6 (C), 131.5 (CH), 129.5 (CH), 128.7 (CH), 126.6 (C), 123.1 (C), 122.3 (CH), 122.2 (C), 120.5 (CH), 119.9 (CH), 117.7 (CH), 113.0 (C), 109.6 (CH), 106.7 (CH), 102.5 (CH), 74.7 (CH), 55.6 (CH₃, O-CH₃), 34.6 (CH₂, C^{1''}), 32.9 (CH₃, N-CH₃), 31.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 26.6 (CH₂), 22.6 (CH₂), 14.1 (CH₃, C^{6''}) ppm.

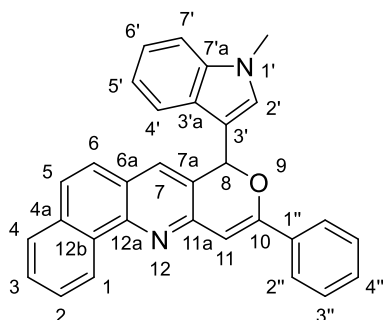
IR (neat): ν 3059, 3007, 2953, 2928, 2856, 1612, 1557, 1504, 1465, 1446, 1235, 1216, 1140, 1027, 810, 738 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₈H₃₁N₂O₂ [M+H]⁺: 427.2380, found: 427.2368.

8-(1-Methyl-1*H*-indol-3-yl)-10-phenyl-8*H*-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinoline

211

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **169** ($x = 0.200$ mmol, 61.5 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 9:1) to afford **211** as a light brown solid (79 mg, 90 %).



Formula: C₃₁H₂₂N₂O

M_w: 438.53 g.mol⁻¹

Aspect: light brown solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.27

Yield: 90 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 9.24$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.85 – 7.71 (m, 7H), 7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.43 – 7.36 (m, 3H), 7.20 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.12 – 7.07 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.72 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 157.4$ (C, C¹⁰), 150.1 (C), 145.4 (C), 137.1 (C), 133.6 (C), 133.4 (C), 131.7 (CH), 130.5 (C), 130.3 (CH), 129.8 (CH), 128.5 (2xCH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 126.8 (CH), 126.1 (C), 126.1 (CH), 125.8 (C), 125.7 (CH), 125.4 (2xCH), 124.8 (C), 123.9 (CH), 121.7 (CH), 119.5 (CH), 119.5 (CH), 112.4 (C), 110.2 (CH), 102.2 (CH), 73.8 (CH, C⁸), 32.4 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3049, 2930, 1615, 1598, 1575, 1490, 1450, 1427, 1392, 1334, 1258, 1045, 1025, 813, 766, 739, 688 cm⁻¹.

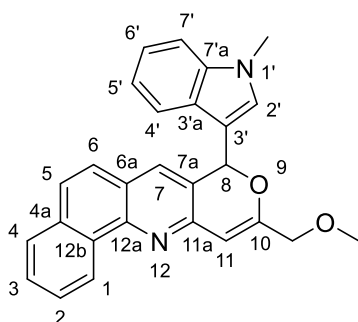
Mp: 118 – 120 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₃₁H₂₃N₂O [M+H]⁺: 439.1810, found: 439.1794.

10-(Methoxymethyl)-8-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-8*H*-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinoline

212

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **170** ($x = 0.200$ mmol, 55.1 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 8:2) to afford **212** as a light yellow solid (60 mg, 74 %).



Formula: C₂₇H₂₂N₂O₂

M_w: 406.49 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 85:15): 0.19

Yield: 74 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.18 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.81 – 7.64 (m, 5H), 7.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.19 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.01 (d, J = 14.1 Hz, 1H, O-CH₂), 3.95 (d, J = 14.1 Hz, 1H, O-CH₂), 3.75 (s, 3H, O-CH₃ or N-CH₃), 3.25 (s, 3H, O-CH₃ or N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159.8 (C, C¹⁰), 149.4 (C), 145.0 (C), 137.1 (C), 133.3 (C), 131.6 (CH), 130.5 (C), 130.2 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 126.6 (CH), 125.9 (CH), 125.9 (C), 125.7 (C), 125.5 (CH), 124.7 (C), 123.8 (CH), 121.6 (CH), 119.6 (CH), 119.3 (CH), 112.1 (C), 110.0 (CH), 103.4 (CH), 74.1 (CH, C⁸), 70.7 (CH₂, O-CH₂), 57.8 (CH₃, O-CH₃), 32.4 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3073, 2929, 2850, 1652, 1600, 1560, 1476, 1446, 1399, 1388, 1202, 1115, 997, 818, 804, 753, 741 cm⁻¹.

Mp: 170 – 172 °C.

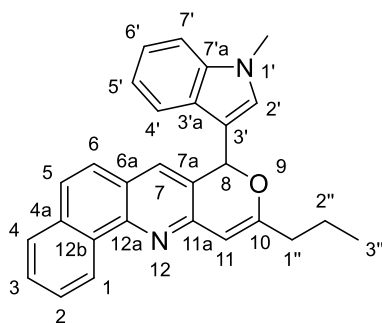
HRMS (ES⁺): m/z calculated for C₂₇H₂₃N₂O₂ [M+H]⁺: 407.1754, found: 407.1740.

Microanalysis: calculated for C₂₇H₂₂N₂O₂ · 0.5 H₂O: % C = 78.05, % H = 5.58, % N = 6.74; found: % C = 77.85, % H = 5.49, % N = 6.63.

8-(1-Methyl-1H-indol-3-yl)-10-propyl-8H-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinoline

213

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **171** (x = 0.200 mmol, 54.7 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 95:5) to afford **213** as an orange solid (76 mg, 94 %).



Formula: C₂₈H₂₄N₂O

M_w: 404.51 g.mol⁻¹

Aspect: orange solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 95:5): 0.26

Yield: 94 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 9.31 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.75 – 7.60 (m, 4H), 7.56 (s, 1H), 7.46 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.32 – 7.26 (m, 1H), 7.13 (ddd, J = 8.0, 6.9, 1.2 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 3.76 (s, 3H, N-CH₃), 2.26 (dd, J = 8.4, 6.6 Hz, 2H, C^{1''}), 1.65 – 1.51 (m, 2H, C^{2''}), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H, C^{3''}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 164.7 (C, C¹⁰), 151.0 (C), 146.1 (C), 137.7 (C), 134.0 (C), 131.7 (CH), 129.7 (C+CH), 127.9 (2xCH), 126.9 (CH), 126.6 (C), 126.1 (CH), 125.4 (C+CH), 124.9 (C), 124.7 (CH), 122.4 (CH), 120.5 (CH), 120.0 (CH), 112.9 (C), 109.7 (CH), 103.3 (CH), 74.7 (CH, C⁸), 36.6 (CH₂, C^{1''}), 33.0 (CH₃, N-CH₃), 20.1 (CH₂, C^{2''}), 13.7 (CH₃, C^{3''}) ppm.

IR (neat): ν 3056, 2957, 2928, 2871, 1638, 1603, 1557, 1478, 1464, 1446, 1393, 1374, 1335, 1301, 1141, 1067, 975, 816, 804, 753, 741 cm⁻¹.

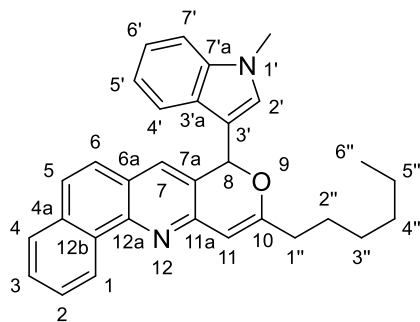
Mp: 138 – 140 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{28}H_{25}N_2O$ $[M+H]^+$: 405.1961, found: 405.1949.

10-Hexyl-8-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-8*H*-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinoline

214

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **172** ($x = 0.200$ mmol, 63.1 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 98:2) to afford **214** as a light yellow solid (67 mg, 75 %).



Formula: $C_{31}H_{30}N_2O$

M_w: 446.59 g.mol⁻¹

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 98:2): 0.27

Yield: 75 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 9.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.86 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.76 – 7.61 (m, 4H), 7.57 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 7.14 (ddd, $J = 8.0, 6.9, 1.2$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 3.74 (s, 3H, N-CH₃), 2.39 – 2.17 (m, 2H, C^{1''}), 1.51 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.25 – 1.00 (m, 6H, 3xCH₂), 0.83 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, C^{6''}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 164.7 (C, C¹⁰), 151.1 (C), 146.2 (C), 137.7 (C), 133.9 (C), 131.7 (CH), 131.4 (C), 129.6 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 126.8 (CH), 126.7 (C), 125.9 (CH), 125.6 (CH), 125.2 (C), 124.9 (C), 124.6 (CH), 122.3 (CH), 120.5 (CH), 119.9 (CH), 113.3 (C), 109.6 (CH), 103.3 (CH), 74.6 (CH, C⁸), 34.6 (CH₂, C^{1''}), 33.0 (CH₃, N-CH₃), 31.7 (CH₂), 28.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.2 (CH₃, C^{6''}) ppm.

IR (neat): ν 3047, 2954, 2924, 2889, 2855, 1634, 1600, 1543, 1476, 1446, 1424, 1388, 1375, 1334, 1237, 1153, 978, 959, 899, 813, 786, 747, 678 cm⁻¹.

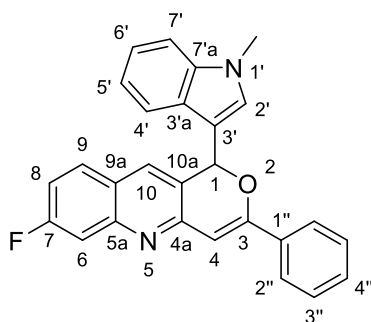
Mp: 134 – 136 °C.

HRMS (ES+): m/z calculated for $C_{31}H_{31}N_2O$ $[M+H]^+$: 447.2431, found: 447.2413.

7-Fluoro-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-3-phenyl-1*H*-pyrano[4,3-*b*]quinoline

215

After 7 h, the crude product obtained with alkyne **163** ($x = 0.200$ mmol, 55.1 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 6:4) and recrystallisation (DCM/petroleum ether) to afford **215** as a yellow solid (30 mg, 37 %).



Formula: C₂₇H₁₉FN₂O

M_w: 406.46 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.47

Yield: 37 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.80 – 7.74 (m, 3H), 7.66 (dd, *J* = 10.4, 2.5 Hz, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.39 – 7.27 (m, 5H), 7.19 – 7.12 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 3.77 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 163.4 (d, *J* = 249.1 Hz, C), 160.4 (s, C), 153.3 (s, C), 149.4 (d, *J* = 12.6 Hz, C), 137.6 (s, C), 134.0 (s, C), 131.6 (s, CH), 130.1 (s, CH), 129.7 (s + d, *J* = 10.0 Hz, 2xCH), 128.6 (s, 2xCH), 126.8 (s, C), 126.2 (s, 2xCH), 125.6 (d, *J* = 2.8 Hz, C), 124.5 (s, C), 122.5 (s, CH), 120.3 (s, CH), 120.1 (s, CH), 115.4 (d, *J* = 25.1 Hz, CH), 112.5 (s, C), 112.4 (d, *J* = 20.5 Hz, CH), 109.8 (s, CH), 102.1 (s, CH), 75.0 (s, CH), 33.1 (s, CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3091, 3042, 2922, 2823, 1629, 1602, 1575, 1541, 1504, 1494, 1454, 1431, 1423, 1341, 1331, 1230, 1204, 1143, 1116, 1042, 979, 902, 805, 768, 739, 692 cm⁻¹.

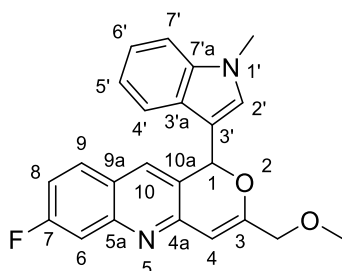
Mp: 196 – 198 °C.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₂₇H₁₉FN₂ONa [M+Na]⁺: 429.1379, found: 429.1375.

7-Fluoro-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-3-(methoxymethyl)-1H-pyrano[4,3-*b*]quinoline

216

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **164** (*x* = 0.200 mmol, 48.6 mg) and *N*-methylindole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified twice by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 7:3) to afford **216** as an orange oil (19 mg, 25 %).



Formula: C₂₃H₁₉FN₂O₂

M_w: 374.42 g.mol⁻¹

Aspect: orange oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.23

Yield: 25 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.95 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 4.09 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 3.99 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.37 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 164.0 (d, *J* = 252.7 Hz, C), 159.5 (s, C), 151.1 (s, C), 149.5 (s, C), 137.8 (s, C), 134.3 (broad s, CH), 130.1 (s, CH), 130.0 (s, CH), 126.2 (s, C), 125.1 (d, *J* = 2.8 Hz, C), 124.2

(s, C), 122.7 (s, CH), 120.4 (s, CH), 120.3 (s, CH), 116.6 (d, $J = 26.5$ Hz, CH), 111.2 (s, C), 110.3 (broad s, CH), 110.0 (s, CH), 100.7 (s, CH), 75.4 (s, CH), 71.5 (s, CH₂, O-CH₂), 59.1 (s, CH₃, O-CH₃), 33.2 (s, CH₃, N-CH₃) ppm.

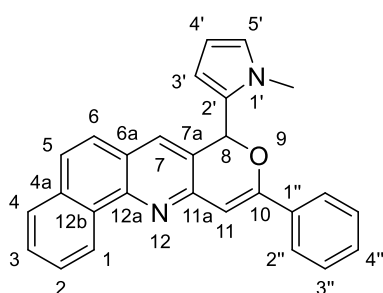
IR (neat): ν 3060, 2929, 2824, 1647, 1613, 1542, 1505, 1466, 1448, 1429, 1361, 1335, 1233, 1200, 1119, 1066, 986, 963, 916, 865, 811, 741 cm⁻¹.

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₃H₂₀FN₂O₂ [M+H]⁺: 375.1509, found: 375.1508.

8-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-10-phenyl-8H-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinolone

217

The reaction was carried out in DMF instead of DCE. After 1 h, the crude product obtained with alkyne **169** ($x = 0.500$ mmol, 154 mg) and *N*-methylpyrrole (1.50 mmol, 0.133 mL) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 9:1) to afford **217** as an ochre solid (83 mg, 43 %).



Formula: C₂₇H₂₀N₂O

M_w: 388.47 g.mol⁻¹

Aspect: ochre solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.52

Yield: 43 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.23 (dd, $J = 7.3, 2.1$ Hz, 1H), 8.02 (dd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.89 – 7.82 (m, 3H), 7.82 – 7.71 (m, 3H), 7.49 – 7.42 (m, 3H), 7.05 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.86 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.86 (t, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.55 (dd, $J = 3.7, 1.8$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H, N-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 156.2 (C, C¹⁰), 149.9 (C), 145.5 (C), 133.5 (2xC), 132.0 (CH), 130.6 (C), 130.0 (CH), 129.5 (C), 128.8 (2xCH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 126.9 (CH), 126.3 (CH), 125.7 (CH), 125.2 (2xCH), 124.8 (C), 124.7 (CH), 124.6 (C), 123.9 (CH), 111.2 (CH), 106.4 (CH), 102.4 (CH), 71.9 (CH, C⁸), 34.2 (CH₃, N-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3095, 2923, 2854, 1618, 1597, 1575, 1489, 1450, 1442, 1428, 1409, 1394, 1318, 1255, 1055, 1050, 998, 816, 770, 757, 731, 689 cm⁻¹.

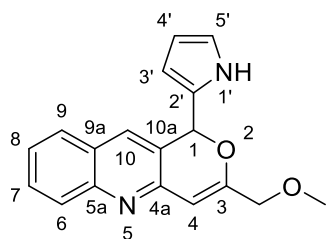
Mp: 209–211 °C

HRMS (ES+): m/z calculated for C₂₇H₂₁N₂O [M+H]⁺: 389.1654, found: 389.1646.

3-(Methoxymethyl)-1-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-pyrano[4,3-*b*]quinoline

218

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **145** ($x = 0.200$ mmol, 45.0 mg) and pyrrole (0.600 mmol, 0.042 mL) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 1:9) to afford **218** as a white solid (28 mg, 48 %).

**Formula:** C₁₈H₁₆N₂O₂**Mw:** 292.34 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4):** 0.22**Yield:** 48 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.79 (s, 1H, NH), 7.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.71 – 7.56 (m, 3H), 7.42 (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 6.87 (td, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.18 (q, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.04 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, O-CH₂), 3.98 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, O-CH₂), 3.35 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 159.4 (C, C³), 150.4 (C), 148.2 (C), 132.0 (CH), 129.9 (CH), 128.8 (C), 128.6 (CH), 127.9 (CH), 127.5 (C), 125.8 (CH), 125.1 (C), 119.5 (CH), 109.8 (CH), 108.5 (CH), 104.9 (CH), 74.9 (CH, C¹), 71.8 (CH₂, O-CH₂), 58.7 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3174, 3131, 3090, 2997, 2924, 2871, 2815, 1654, 1614, 1604, 1564, 1497, 1429, 1400, 1311, 1286, 1207, 1154, 1117, 1095, 1015, 941, 813, 756, 718 cm⁻¹.

Mp: 180 – 182 °C.

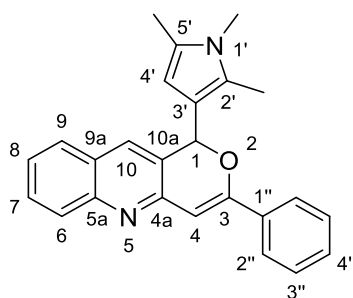
HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₈H₁₆N₂O₂Na [M+Na]⁺: 315.1109, found: 315.1103.

Microanalysis: calculated for C₁₈H₁₆N₂O₂ · 0.75 H₂O: % C = 70.69, % H = 5.77, % N = 9.16; found: % C = 71.28, % H = 5.23, % N = 8.69.

3-Phenyl-1-(1,2,5-trimethyl-1H-pyrrol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-*b*]quinoline

219

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **144** (*x* = 0.200 mmol, 51.5 mg) and 1,2,5-trimethylpyrrole (0.081 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 9:1 to 85:15) to afford **219** as an ochre solid (66 mg, 90 %).

**Formula:** C₂₅H₂₂N₂O**Mw:** 366.46 g.mol⁻¹**Aspect:** ochre solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 8:2):** 0.24**Yield:** 90 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.88 – 7.79 (m, 2H), 7.68 – 7.58 (m, 3H), 7.43 – 7.34 (m, 4H), 6.88 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 3.46 (s, 3H, N-CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 160.5 (C, C³), 152.7 (C), 147.9 (C), 134.2 (C), 131.9 (CH), 129.9 (CH), 129.5 (CH), 128.5 (2xCH), 128.2 (CH), 127.9 (C+CH), 127.7 (C), 127.6 (C), 127.4 (C), 126.1 (2xCH), 125.2 (CH), 115.4 (C), 105.9 (CH), 102.1 (CH), 75.9 (CH, C¹), 30.4 (N-CH₃), 12.7 (CH₃), 10.8 (CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3055, 2912, 2851, 1606, 1575, 1536, 1492, 1415, 1396, 1312, 1042, 1024, 929, 903, 755, 725, 717, 689 cm^{-1} .

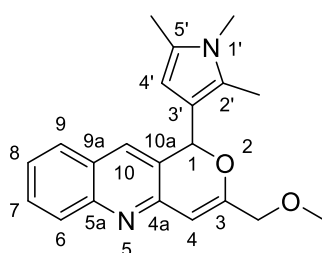
Mp: 122 - 124 $^{\circ}\text{C}$ (decomposition).

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 367.1810, found: 367.1805.

3-(Methoxymethyl)-1-(1,2,5-trimethyl-1H-pyrrol-3-yl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

220

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **145** ($x = 0.200$ mmol, 45.0 mg) and 1,2,5-trimethylpyrrole (0.075 mL, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2 to 5:5) to afford **220** as a light yellow solid (59 mg, 66 %).



Formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$

M_w: 334.42 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: light yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4): 0.28

Yield: 66 %

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.98 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.66 – 7.53 (m, 3H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.12 (d, J = 14.3 Hz, 1H, O-CH₂), 3.98 (d, J = 14.3 Hz, 1H, O-CH₂), 3.44 (s, 3H, O-CH₃ or N-CH₃), 3.43 (s, 3H, O-CH₃ or N-CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 161.5 (C, C³), 151.9 (C), 147.9 (C), 132.0 (CH), 129.4 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (C), 127.8 (CH), 127.7 (C), 127.6 (C), 127.3 (C), 125.2 (CH), 115.1 (C), 105.6 (CH), 103.6 (CH), 75.9 (CH, C¹), 71.7 (CH₂, O-CH₂), 58.9 (CH₃, O-CH₃), 30.4 (CH₃, N-CH₃), 12.7 (CH₃), 10.8 (CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3057, 2916, 2818, 1642, 1616, 1495, 1427, 1398, 1382, 1311, 1115, 1096, 986, 823, 745, 716, 661 cm^{-1} .

Mp: 48 - 50 $^{\circ}\text{C}$ (decomposition).

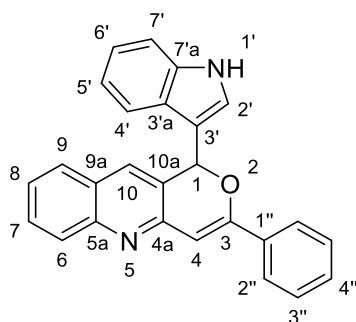
HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 335.1754, found: 335.1751.

Microanalysis: calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.75 \text{ H}_2\text{O}$: % C = 72.49, % H = 6.81, % N = 8.05; found: % C = 72.18, % H = 6.49, % N = 7.88.

1-(1H-Indol-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

221

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **144** ($x = 0.200$ mmol, 51.5 mg) and indole (70.3 mg, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 7:3) to afford **221** as a light yellow solid (67 mg, 89 %).

**Formula:** C₂₆H₁₈N₂O**M_w:** 374.44 g.mol⁻¹**Aspect:** light yellow solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3):** 0.23**Yield:** 89 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.26 (s, 1H, NH), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.84 – 7.74 (m, 4H), 7.71 – 7.61 (m, 2H), 7.47 – 7.35 (m, 5H), 7.21 (s, 1H), 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.06 – 6.98 (m, 2H), 6.97 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 158.3 (C, C³), 151.4 (C), 147.7 (C), 136.7 (C), 133.6 (C), 131.2 (CH), 129.9 (CH), 129.5 (CH), 128.5 (2xCH), 128.0 (CH), 128.0 (CH), 127.0 (C), 126.3 (CH), 126.1 (C), 125.7 (C), 125.5 (2xCH), 125.3 (CH), 121.6 (CH), 119.5 (CH), 119.3 (CH), 112.8 (C), 112.0 (CH), 101.9 (CH), 74.5 (CH, C¹) ppm.

IR (neat): ν 3134, 3057, 2981, 2918, 2855, 1606, 1577, 1553, 1493, 1457, 1445, 1420, 1340, 1319, 1250, 1052, 906, 739, 683 cm⁻¹.

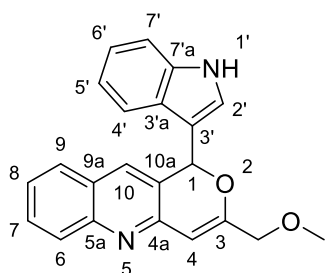
Mp: 200 – 202 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₂₆H₁₉N₂O [M+H]⁺: 375.1497, found: 375.1501.

1-(1H-Indol-3-yl)-3-(methoxymethyl)-1H-pyrano[4,3-*b*]quinoline

222

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **145** (*x* = 0.200 mmol, 45.0 mg) and indole (70.3 mg, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2 to 6:4) to afford **222** as an orange solid (43 mg, 63 %).

**Formula:** C₂₂H₁₈N₂O₂**M_w:** 342.40 g.mol⁻¹**Aspect:** orange solid**R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4):** 0.18**Yield:** 63 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.32 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.70 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H), 7.48 – 7.41 (m, 3H), 7.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.12 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 6.97 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.05 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, O-CH₂), 3.96 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, O-CH₂), 3.27 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.6 (C, C³), 150.0 (C), 145.4 (C), 136.7 (C), 132.6 (CH), 130.1 (CH), 128.0 (CH), 126.9 (C), 126.3 (2xCH), 125.9 (C), 125.6 (CH), 125.4 (C), 121.5 (CH), 119.4 (CH), 119.1 (CH), 112.1 (C), 111.8 (CH), 101.3 (CH), 74.7 (CH, C¹), 70.6 (CH₂, O-CH₂), 57.9 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3145, 3060, 2920, 2850, 1644, 1614, 1550, 1496, 1457, 1426, 1354, 1199, 1108, 973, 901, 824, 743 cm^{-1} .

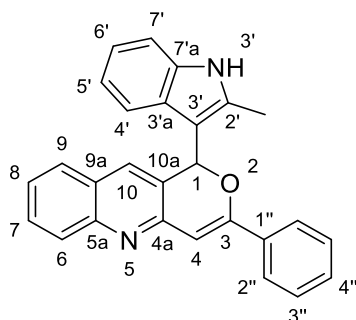
Mp: 117 - 119 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 365.1266, found: 365.1265.

1-(2-Methyl-1H-indol-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

223

After 1 h, the crude product obtained with alkyne **144** ($x = 0.200$ mmol, 51.5 mg) and 2-methylindole (78.7 mg, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 0:1) and then washed with EtOAc to afford **223** as a yellow solid (42 mg, 62 %).



Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$

M_w: 388.47 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.20

Yield: 62 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.33 (s, 1H), 7.92 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.84 – 7.77 (m, 2H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.46 – 7.32 (m, 5H), 7.17 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.05 – 6.96 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.82 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159.7 (C, C³), 152.1 (C), 147.6 (C), 136.2 (C), 135.7 (C), 133.5 (C), 131.0 (CH), 130.0 (CH), 129.5 (CH), 128.6 (2xCH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.2 (C), 126.9 (C), 126.7 (C), 125.5 (2xCH), 125.3 (CH), 120.6 (CH), 119.0 (2xCH), 111.0 (CH), 107.3 (C), 101.9 (CH), 74.8 (CH, C¹), 11.7 (CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3143, 3056, 2920, 2843, 2758, 1607, 1576, 1494, 1460, 1444, 1419, 1339, 1049, 1028, 904, 753, 741, 685 cm^{-1} .

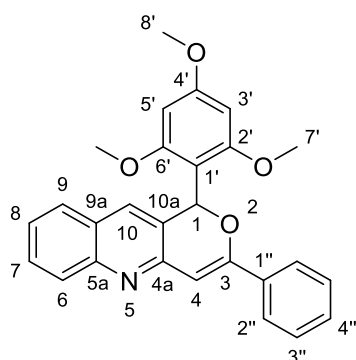
Mp: 246 - 248 °C (decomposition).

HRMS (ES⁺): m/z calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 389.1648, found: 389.1636.

3-Phenyl-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-1H-pyrano[4,3-b]quinoline

224

The reaction was carried out at 50 °C in DMF instead of DCE. After 24 h, the crude product obtained with alkyne **144** ($x = 0.200$ mmol, 51.5 mg) and 1,3,5-trimethoxybenzene (101 mg, 0.600 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 8:2) to afford **224** as a yellow solid (31 mg, 36 %).

**Formula:** C₂₇H₂₃NO₄**M_w:** 425.48 g.mol⁻¹**Aspect:** yellow solid**R_f**(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.31**Yield:** 36 %

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H⁹), 7.83 – 7.78 (m, 2H, H^{2''} or H^{3''}), 7.61 – 7.51 (m, 2H, H⁶ + H⁷ or H⁸), 7.40 – 7.26 (m, 5H, H⁷ or H⁸, H¹⁰, H^{2''} or H^{3''} + H^{4''}), 7.10 (s, 1H, H¹), 6.74 (s, 1H, H⁴), 6.25 (s, 2H, H^{3'} + H^{5'}), 3.89 (s, 3H, H⁸), 3.71 (s, 6H, 2xH^{7'}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*): δ = 162.1 (C, C^{4'}), 160.7 (C, C³), 160.4 (2xC, C^{2'} + C^{6'}), 152.5 (C, C^{4a}), 147.8 (C, C^{5a}), 134.4 (C, C^{1''}), 129.6 (CH, C¹⁰), 129.2 (CH, C^{4''}), 128.9 (CH, C⁷ or C⁸), 128.3 (2xCH, C^{2''} or C^{3''}), 128.2 (CH, C⁹), 127.9 (C, C^{9a} or C^{10a}), 127.7 (C, C^{9a} or C^{10a}), 127.4 (CH, C⁶), 125.8 (2xCH, C^{2''} or C^{3''}), 124.8 (CH, C⁷ or C⁸), 107.8 (C, C¹), 101.0 (CH, C⁴), 91.2 (2xCH, C^{3'} + C^{5'}), 72.9 (CH, C¹), 56.0 (2xCH₃, C^{7'}), 55.4 (CH₃, C⁸) ppm.

IR (neat): ν 2970, 2899, 1608, 1417, 1226, 1123 cm⁻¹.

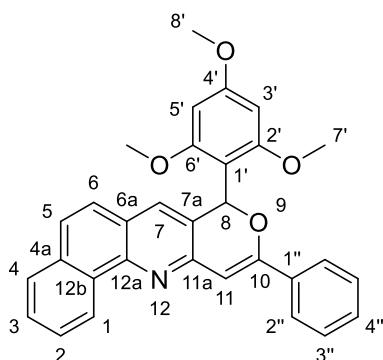
Mp: 191 – 193 °C.

HRMS (CI): *m/z* calculated for C₂₇H₂₄NO₄ [M+H]⁺: 426.1700, found: 426.1689.

10-Phenyl-8-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-8H-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinolone

225

The reaction was carried out in DMF instead of DCE. After 1 h, the crude product obtained with alkyne **169** (*x* = 0.500 mmol, 154 mg) and 1,3,5-trimethoxybenzene (252 mg, 1.50 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 1:1) to afford **225** as an orange solid (128 mg, 54 %).

**Formula:** C₃₁H₂₅NO₄**M_w:** 475.54 g.mol⁻¹**Aspect:** orange solid**R_f**(cyclohexane/EtOAc, 8:2): 0.31**Yield:** 54 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.85 – 7.77 (m, 2H), 7.78 – 7.65 (m, 4H), 7.49 – 7.40 (m, 4H), 7.06 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.41 (s, 2H), 3.87 (s, 3H, H⁸), 3.69 (s, 6H, H^{7'}) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.1 (C), 160.0 (C), 159.1 (2xC), 150.5 (C), 144.7 (C), 133.6 (C), 133.3 (C), 130.5 (C), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 128.6 (2xCH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.3 (C), 126.6 (CH), 125.8 (CH), 125.7 (CH), 125.3 (2xCH), 124.7 (C), 123.8 (CH), 106.4 (C), 101.3 (CH), 91.7 (2xCH), 72.5 (CH), 56.0 (2xCH₃, C⁷), 55.4 (CH₃, C⁸) ppm.

IR (neat): ν 3048, 2940, 2841, 1592, 1490, 1451, 1419, 1407, 1215, 1201, 1156, 1150, 1121, 1040, 1025, 810, 767, 746, 687 cm⁻¹.

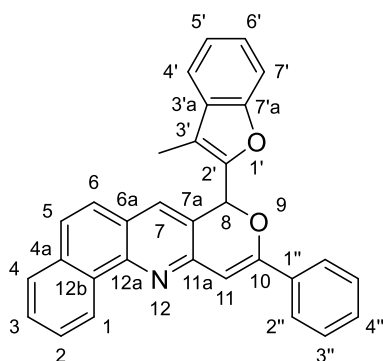
Mp: 227 - 229 °C.

HRMS (ES+): *m/z* calculated for C₃₁H₂₆NO₄ [M+H]⁺: 476.1862, found: 476.1855.

8-(3-Methylbenzofuran-2-yl)-10-phenyl-8*H*-benzo[*h*]pyrano[4,3-*b*]quinoline

226

The reaction was carried out in DMF instead of DCE. After 2 h, the crude product obtained with alkyne **169** (*x* = 0.500 mmol, 154 mg) and 3-benzofuran (0.190 mL, 1.50 mmol) was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 9:1) to afford **226** as a yellow solid (51 mg, 23 %).



Formula: C₃₁H₂₁NO₂

M_w: 439.51 g.mol⁻¹

Aspect: yellow solid

R_f(cyclohexane/EtOAc 9:1): 0.43

Yield: 23 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.23 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.93 – 7.71 (m, 7H), 7.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.48 – 7.43 (m, 3H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 2.35 (s, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 157.6 (C), 153.7 (C), 149.7 (C), 148.8 (C), 145.5 (C), 133.5 (C), 133.1 (C), 131.8 (CH), 130.3 (C), 130.0 (CH), 128.9 (C), 128.6 (2xCH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 126.8 (CH), 126.4 (CH), 125.5 (CH), 125.4 (2xCH), 125.4 (CH), 124.9 (C), 123.9 (CH), 123.3 (C), 122.7 (CH), 120.2 (CH), 115.6 (C), 111.3 (CH), 102.3 (CH), 71.9 (CH, C⁸), 7.6 (CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3061, 2920, 1618, 1599, 1574, 1492, 1450, 1318, 1257, 1196, 1051, 1005, 911, 811, 765, 748, 689 cm⁻¹.

Mp: 227 - 229 °C.

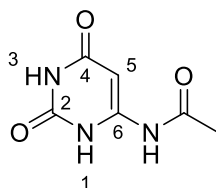
HRMS (ES+): *m/z* calculated for C₃₁H₂₂NO₂ [M+H]⁺: 440.1651, found: 440.1644.

Series E3

N-Acetyl-6-aminopyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

233

To a suspension of 6-aminouracile (1.27 g, 10.0 mmol) in AcOH (150 mL) was added dropwise acetic anhydride (50 mL) and the mixture was heated stirred at reflux temperature for 2 h. After evaporation under reduced pressure of the three quarters of the volume of the crude, which was filtered and the residual solid was washed with EtOH (5 x 30 mL) to afford **233** as a white solid which was used without further purification.

**Formula:** C₆H₇N₃O₃**M_w:** 169.14 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f**(DCM/MeOH, 9:1): 0.30**Yield:** 80 %

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.93 (s, 1H, NH), 10.49 (s, 2H, NH), 5.34 (s, 1H, H⁵), 2.09 (s, 3H, CH₃) ppm.

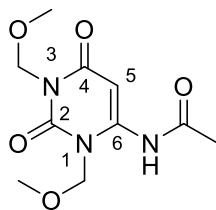
Mp: 279 - 281 °C (decomposition).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³²²

N-Acetyl-6-amino-1,3-bis(methoxymethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

237

To a suspension of derivative **233** (169 mg, 1.00 mmol) and K₂CO₃ (691 mg, 5 mmol, 5.0 eq.) in DMF (5 mL) at -15 °C was added dropwise chloromethyl methyl ether (0.76 mL, 10.0 mmol, 10 eq.) and the mixture was stirred at r.t. overnight. After filtration of the crude and concentration under reduced pressure, purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH (0.5 % Et₃N), 1:0 to 99:1) afforded **237** as a yellowish oil.

**Formula:** C₁₀H₁₅N₃O₅**M_w:** 257.25 g.mol⁻¹**Aspect:** yellowish oil**R_f**(DCM/MeOH, 98:2): 0.23**Yield:** 50 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.74 (s, 1H, NH), 7.15 (s, 1H, H⁵), 5.45 (s, 2H, N-CH₂), 5.44 (s, H, N-CH₂), 3.42 (s, 3H, O-CH₃), 3.41 (s, 3H, O-CH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.1 (C), 170.4 (C), 162.7 (C), 160.3 (C), 92.3 (CH₂, N-CH₂), 92.0 (CH₂, N-CH₂), 88.4 (CH, C⁵), 56.8 (CH₃, O-CH₃), 56.7 (CH₃, O-CH₃), 24.1 (CH₃) ppm.

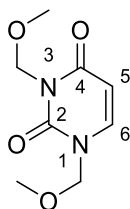
IR (neat): ν 3203, 2940, 2832, 1711, 1644, 1609, 1582, 1512, 1421, 1370, 1344, 1264, 1234, 1215, 1152, 1088, 1039, 1000, 973, 906, 835, 763 cm⁻¹.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₀H₁₅N₃O₅Na [M+Na]⁺: 280.0909, found: 280.0908.

1,3-Bis(methoxymethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

244

To a suspension of uracil (4.48 g, 40.0 mmol) and K_2CO_3 (27.6 g, 200 mmol, 5.0 eq.) in DMF (200 mL) at $-15\text{ }^\circ\text{C}$ was added dropwise chloromethyl methyl ether (12.2 mL, 160 mmol, 4.0 eq.) and the mixture was stirred at r.t. overnight. After filtration of the crude, washing with DCM and concentration under reduced pressure, purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH (0.1 % Et_3N), 1:0 to 99.5:0.5) afforded **244** as a colorless oil.

**Formula:** $C_8H_{12}N_2O_4$ **M_w:** 200.19 g.mol⁻¹**Aspect:** colorless oil**R_f(DCM/MeOH, 99:1):** 0.19**Yield:** 80 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H⁶), 5.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H⁵), 5.39 (s, 2H, N-CH₂), 5.13 (s, 2H, N-CH₂), 3.45 (s, 3H, O-CH₃), 3.41 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³²³

5-Bromo-1,3-bis(methoxymethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

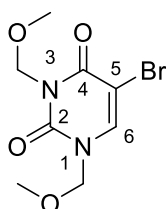
245

Method A (with NBS)

To a solution of **244** (2.70 g, 13.5 mmol) in anhydrous DCM (150 mL) was added NBS (2.64 g, 14.8 mmol, 1.1 eq.) and the mixture was stirred at reflux temperature for 8 h. The crude was concentrated under reduced pressure and column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 1:0 to 97:3) afforded **245** as a yellowish oil.

Method B (with Br₂)

To a solution of **244** (400 mg, 2.00 mmol) in AcOH (5 mL) was added a solution of bromine (0.124 mL, 2.40 mmol, 1.2 eq.) in AcOH (5 mL) and the mixture was stirred at r.t. for 1.5 h. After concentration under reduced pressure, DCM (20 mL) and water (10 mL) were added, the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL) and the organic layer was washed with a 20 % sodium thiosulfate solution (5 x 10 mL) and brine (10 mL), dried with Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford **245** as a yellowish oil which was used without further purification.

**Formula:** $C_8H_{11}BrN_2O_4$ **M_w:** 279.09 g.mol⁻¹**Aspect:** yellowish oil**R_f(DCM/MeOH, 99:1):** 0.40**Yield:** 58 % (method A), 87 % (method B)

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.65 (s, 1H, H⁶), 5.43 (s, 2H, N-CH₂), 5.14 (s, 2H, N-CH₂), 3.46 (s, 3H, O-CH₃), 3.42 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³²³

5-Cyano-1,3-bis(methoxymethyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

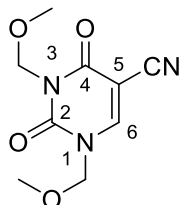
242

From 245

To a solution of **245** (140 mg, 0.500 mmol) in DMF (2 mL) was added sodium cyanide (36.8 mg, 0.750 mmol, 1.5 eq.) and the mixture was heated at 90 °C for 2 h. After concentration under reduced pressure, EtOAc (10 mL) and water (10 mL) were added, the aqueous layer was extracted with EtOAc (4 x 10 mL) and the organic layer was dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **242** as an orange oil which was used with no further purification.

From 5-cyanouracil

To a suspension of 5-cyanouracil (685 mg, 5.00 mmol) and K₂CO₃ (3.45 g, 25.0 mmol, 5.0 eq.) in DMF (25 mL) at -15 °C was added dropwise chloromethyl methyl ether (1.14 mL, 15.0 mmol, 3.0 eq.) and the mixture was stirred at r.t. overnight. After filtration of the crude, washing with DCM and concentration under reduced pressure, purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH (0.1 % Et₃N), 1:0 to 98:2) afforded **242** as an orange oil.

**Formula:** C₉H₁₁N₃O₄**M_w:** 225.20 g.mol⁻¹**Aspect:** orange oil**R_f**(DCM/MeOH, 99:1): 0.31**Yield:** 93 % (from **245**), 80 % (from 5-cyanouracil)

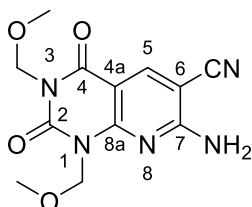
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 7.96 (s, 1H, H⁶), 5.38 (s, 2H, N-CH₂), 5.20 (s, 2H, N-CH₂), 3.46 (s, 6H, O-CH₃) ppm.

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³²³

6-Cyano-7-amino-1,3-bis(methoxymethyl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

243

To a solution of Na (255 mg, 11.1 mmol, 2 eq.) in anhydrous EtOH (30 mL) at 0 °C was added a solution of **242** (1.25 g, 5.55 mmol) and malonitrile (550 mg, 8.33 mmol, 1.5 eq.) in EtOH (12 mL) and the mixture was stirred at r.t. for 3 h. The resulting suspension was filtered and the isolated solid was washed with EtOH and dried over P₂O₅ to afford pure **243** as a white solid.

**Formula:** C₁₂H₁₃N₅O₄**M_w:** 291.27 g.mol⁻¹**Aspect:** white solid**R_f**(DCM/MeOH, 98:2): 0.45**Yield:** 85 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.39 (s, 1H, H⁵), 7.98 (s, 2H, NH₂), 5.51 (s, 2H, N¹-CH₂), 5.26 (s, 2H, N³-CH₂), 3.29 (s, 6H, O-CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.3 (C, C⁴O), 159.2 (C), 153.0 (C), 151.1 (C), 144.6 (CH, C⁵), 115.8 (C), 99.8 (C), 86.9 (C), 72.4 (CH₂, N¹-CH₂), 71.8 (CH₂, N³-CH₂), 56.9 (CH₃, O-CH₃), 56.8 (CH₃, O-CH₃) ppm.

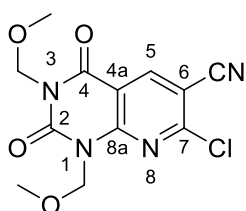
IR (neat): ν 3450, 3287, 3210, 3196, 3078, 2968, 2941, 2832, 2224, 1717, 1674, 1629, 1599, 1567, 1458, 1445, 1404, 1365, 1338, 1318, 1199, 1105, 1071, 964, 946, 917, 786 cm^{-1} .

Mp: 268 - 270 $^{\circ}\text{C}$ (decomposition, lit. 274 - 275 $^{\circ}\text{C}$).³²³

6-Cyano-7-chloro-1,3-bis(methoxymethyl)pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione

246

To a suspension of **243** (1.37 g, 4.70 mmol) in a 12 N HCl solution (30 mL), a solution of sodium nitrite (4.05 g, 58.8 mmol, 12.5 eq.) in water (10 mL) was added dropwise at r.t. over a 45 min period. Then, the mixture was stirred at r.t. for 24 h. The crude was poured in ice (50 g) and, after filtration, the isolated solid was washed with water. Purification by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, 1:0 to 98.5:1.5) afforded **246** as a white solid.



Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}_4$

Mw: 310.69 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: white solid

R_f(DCM/MeOH, 99:1): 0.58

Yield: 54 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.00 (s, 1H, H⁵), 5.56 (s, 2H, N¹-CH₂), 5.32 (s, 2H, N³-CH₂), 3.37 (s, 3H, O-CH₃), 3.33 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159.2 (C, C⁴O), 155.1 (C), 152.2 (C), 150.6 (C, C), 144.9 (CH, C⁵), 114.5 (C), 110.3 (C), 104.6 (C), 73.6 (CH₂, N¹-CH₂), 72.5 (CH₂, N³-CH₂), 57.2 (CH₃, O-CH₃), 57.1 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3071, 2943, 2826, 2235, 1726, 1672, 1600, 1566, 1479, 1458, 1388, 1335, 1311, 1278, 1199, 1179, 1163, 1084, 1061, 1015, 966, 949, 910, 791, 758, 715 cm^{-1} .

Mp: 175 - 177 $^{\circ}\text{C}$ (lit. 178 - 179 $^{\circ}\text{C}$).

Experimental data were consistent with data reported in the literature.³²³

7-Chloro-1,3-bis(methoxymethyl)pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione-6-carbaldehyde

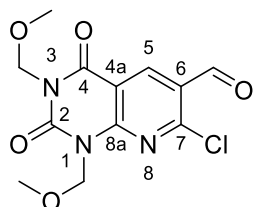
236

Nitrile reduction

To a solution of **246** (621 mg, 2.00 mmol) in anhydrous DCM (30 mL) at -78 $^{\circ}\text{C}$ was added dropwise a 1 N solution of DIBAL-H in DCM (6.00 mL, 6.00 mmol, 3.0 eq.) and the mixture was stirred at -78 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. A saturated ammonium chloride solution (20 mL) was added and the reaction was warmed to 0 $^{\circ}\text{C}$. Then, a 3 N HCl solution was added until pH < 3 and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 15 mL). The organic layer was washed with a saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give the intermediate **248** as an oily residue which was engaged in the next step without purification.

Dihydropyridine aromatisation

To a solution of intermediate **248** (631 mg, approx 2.00 mmol) in anhydrous chloroform (40 mL) was added MnO₂ (3.50 g, 40.0 mmol, 20 eq.) and the mixture was refluxed for 2 h. The crude was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with EtOAc. After concentration under reduced pressure, purification by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 1:0 to 0:1) afforded **236** as a yellowish oil.



Formula: C₁₂H₁₂ClN₃O₅

M_w: 313.69 g.mol⁻¹

Aspect: yellowish oil

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.23

Yield: 50 % (from **246**)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.37 (s, 1H, CHO), 8.96 (s, 1H, H⁵), 5.77 (s, 2H, N¹-CH₂), 5.50 (s, 2H, N³-CH₂), 3.54 (s, 3H, O-CH₃), 3.48 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

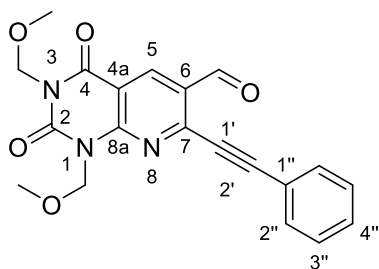
¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 186.8 (CH, CHO), 159.8 (C, C⁴O), 158.1 (C, C⁷ or C^{8a}), 152.8 (C, C⁷ or C^{8a}), 150.9 (C, C²O), 141.2 (CH, C⁵), 125.4 (C, C⁶), 110.3 (C, C^{4a}), 74.1 (CH₂, N¹-CH₂), 73.1 (CH₂, N³-CH₂), 58.4 (2xCH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 2939, 2832, 1732, 1678, 1591, 1569, 1481, 1454, 1319, 1287, 1089, 1068, 1015, 907, 792, 758, 744 cm⁻¹.

HRMS (ES⁺): *m/z* calculated for C₁₂H₁₂ClN₃O₅Na [M+Na]⁺: 336.0363, found: 336.0359.

**1,3-Bis(methoxymethyl)-7-(phenylethynyl)pyrido[2,3-*d*]
pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione-6-carbaldehyde**
249

To a flask containing the chlorinated quinoline **236** (94.1 mg, 0.300 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (14.7 mg, 0.0210 mmol, 0.07 eq.) and CuI (17.1 mg, 0.0900 mmol, 0.3 eq.) under argon atmosphere, was added dry THF (4,5 mL) and Et₃N (0.063 mL, 0.450 mmol, 1.5 eq.), which were both previously degassed by bubbling argon for 10 min. Lastly, the alkyne derivative (0.040 mL, 0.360 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise to the reaction and the mixture was stirred at r.t. for 1 h. The reaction mixture was filtered through a short pad of silica and celite® and washed with EtOAc. The crude was concentrated under reduced pressure and purification by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc (0.5 % Et₃N), 1:0 to 6:4) afforded **249** as a white solid.



Formula: C₂₀H₁₇N₃O₅

M_w: 379.37 g.mol⁻¹

Aspect: white solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 6:4): 0.43

Yield: 68 %

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 10.59 (s, 1H, CHO), 8.96 (s, 1H, H⁵), 7.67 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H^{2''}), 7.54 – 7.39 (m, 3H, H^{3''} + H^{4''}), 5.87 (s, 2H, CH₂, N¹-CH₂), 5.52 (s, 2H, CH₂, N³-CH₂), 3.57 (s, 3H, O-CH₃), 3.50 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 188.5 (CH, CHO), 160.2 (C, C⁴O), 153.1 (C, C⁷ or C^{8a}), 151.2 (C, C²O), 149.9 (C, C⁷ or C^{8a}), 138.5 (CH, C⁵), 132.7 (2xCH, C^{2'}), 130.8 (CH, C^{4'}), 128.9 (2xCH, C^{3'}), 128.7 (C, C⁶), 120.6 (C, C^{1'}), 110.1 (C, C^{4a}), 100.1 (C, C²), 84.9 (C, C^{1'}), 73.7 (CH₂, N¹-CH₂), 73.0 (CH₂, N³-CH₂), 58.4 (CH₃, O-CH₃), 58.3 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3054, 2995, 2941, 2867, 2835, 2216, 1727, 168, 1591, 1569, 1474, 1451, 1434, 1411, 1384, 1362, 1337, 1298, 1278, 1090, 1070, 961, 909, 794, 758, 742, 687 cm⁻¹.

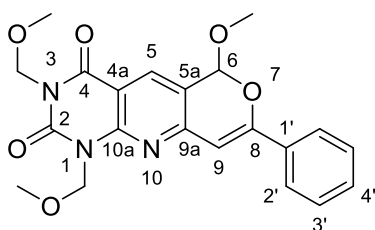
Mp: 142 – 144 °C.

HRMS (ES+): *m/z* calculated for C₂₀H₁₇N₃O₅Na [M+Na]⁺: 402.1069, found: 402.1066.

1,3-Bis(methoxymethyl)-7-(phenylethynyl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione-6-carbaldehyde

250

To a solution of the alkyne **249** (56.9 mg, 0.150 mmol) in anhydrous DCE (3 mL) were added silver triflate (3.90 mg, 0.0150 mmol, 10 %mol) and MeOH (0.0070 mL, 0.180 mmol, 1.2 eq.) and the mixture was stirred at r.t. for 1 h. After addition of DCM (20 mL) to solubilize the obtained precipitate, the reaction mixture was filtered through a short pad of silica and celite® which was washed with a DCM/MeOH 9:1 mixture. After concentration under reduced pressure, purification by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 1:0 to EtOAc/MeOH 85:15) afforded **250** as a yellowish solid.



Formula: C₂₁H₂₁N₃O₆

M_w: 411.41 g.mol⁻¹

Aspect: yellowish solid

R_f(cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.29

Yield: 73 %

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ = 8.32 (s, 1H, H⁵), 7.91 – 7.85 (m, 2H, H^{2'}), 7.51 – 7.43 (m, 3H, H^{3'} + H^{4'}), 6.83 (s, 1H, H⁹), 6.30 (s, 1H, H⁶), 5.85 (s, 2H, CH₂, N¹-CH₂), 5.53 (s, 2H, CH₂, N³-CH₂), 3.66 (s, 3H, O⁶-CH₃), 3.55 (s, 3H, O-CH₃) 3.49 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*): δ = 161.1 (C, C⁴O), 158.8 (C, C⁸), 154.9 (C, C^{9a} or C^{10a}), 151.9 (C, C²O), 151.6 (C, C^{9a} or C^{10a}), 135.6 (CH, C⁵), 133.2 (C, C^{1'}), 130.9 (CH, C^{4'}), 128.9 (2xCH, C^{2'}), 125.9 (2xCH, C^{3'}), 119.0 (C, C^{5a}), 108.0 (C, C^{4a}), 101.3 (CH, C⁹), 99.8 (CH, C⁶), 73.3 (CH₂, N¹-CH₂), 72.7 (CH₂, N³-CH₂), 58.2 (CH₃, O-CH₃), 58.1 (CH₃, O-CH₃), 56.0 (CH₃, O-CH₃) ppm.

IR (neat): ν 3055, 2935, 2835, 1705, 1657, 1597, 1569, 1445, 1416, 1389, 1358, 1185, 1086, 1038, 1021, 943, 929, 910, 897, 791, 764, 684 cm⁻¹.

Mp: 213 – 215 °C (decomposition).

HRMS (ES+): *m/z* calculated for C₂₁H₂₁N₃O₆Na [M+Na]⁺: 434.1328, found: 434.1310.

Biological evaluation

Biological evaluation

The recombinant EcTPase (T2807-1KU, Sigma Aldrich) activity was determined using thymidine as a substrate, where the conversion to thymine is directly proportional to the activity of thymidine phosphorylase.

Radiolabeled thymidine-based test

Blank reaction mixtures, with no enzyme, were used to estimate the background noise level. All assays were performed in triplicate.

Thin-layer chromatography protocol

The standard reaction mixture (50 μ L) contained 10 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.6 at 37 °C), 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 2 mM potassium dihydrogenophosphate, 300 μ M thymidine, 0.2 μ M (^{3} H-methyl)-thymidine (CEA, specific activity 1.66 TBq/mmol or 45 Ci/mmol, TMM-79C) and 300 μ M tested compounds. According to the concentration of stock solutions of tested compounds in DMSO, the proportion of DMSO in reaction mixture ranged from 1 to 3% and was set to 1% for the reaction mixtures without tested derivative. The reaction was initiated by addition of 0.006 U of EcTPase and incubated at 37°C for 8 min.

The enzymatic reaction was stopped by spotting a 5 μ L aliquot onto a silica gel plate (0.20 mm silica gel 60 F₂₅₄ aluminum plates, Merck) that had been prespotted with 0.004 μ mol of thymine. The plate was developed in a non-aqueous solvent system (chloroform / methanol / acetic acid, 17:3:1). Once the plate was dried, the spots were visualized under UV light (254 nm) and cut out for radioactivity determination by liquid scintillation counting.

The spots were suspended in dedicated plastic vials with 0.1 mL of a water / methanol mixture (1:1) for 30 min, then 5 mL of a pseudocumene-based scintillation cocktail (Pico-Fluor 40, Perkin Elmer) were added. After 30 min, the vials were counted during 2 min twice (TRI-CARB 2300TR, Packard).

The enzyme activity corresponded to the difference between the measured radioactivity for the thymine spot and the one measured for the residual thymidine spot. The inhibitory potential of a compound was given by the ratio between the activity in presence of the inhibitor and the activity without it.

Column chromatography protocol

The standard reaction mixture (200 μ L) contained 10 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.6 at 37 °C), 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 2 mM potassium dihydrogenophosphate, 300 μ M thymidine, 0.2 μ M (^{3} H-methyl)-thymidine (CEA, specific activity 1.66 TBq/mmol or 45 Ci/mmol, TMM-79C) and 300 μ M tested compounds in DMSO. According to the concentration of stock solutions of tested derivatives, the proportion of DMSO in reaction mixture ranged from 1 to 3% and was set to 1% for the reaction mixtures without tested derivative. The reaction was initiated by addition of 0.012 U of EcTPase and incubated at 37°C for 8 min.

The enzymatic reaction was stopped by depositing a 50 μ L fraction of the reaction mixture onto a silica gel column (using 40-63 μ m silica, Merck) along with 50 μ L of a 20 mM thymidine + thymine solution. The column was eluted with 10 mL of a non-aqueous solvent system (ethyl acetate / cyclohexane / acetic acid, 65:30:5), which were collected in a dedicated plastic vial for radioactivity determination by liquid

scintillation counting. In a second vial, another 50 μ L sample of the reaction mixture was added to 10 mL of the same eluent.

Afterwards, 10 mL of a pseudocumene-based scintillation cocktail (Pico-Fluor 40, Perkin Elmer) were added and after 30 min, the vials were counted during 2 min twice (TRI-CARB 2300TR, Packard).

The enzyme activity corresponded to the difference between the measured radioactivity for the column fraction containing the thymine and the one measured for the reaction mixture sample. The inhibitory potential of a compound was given by the ratio between the activity in presence of the inhibitor and the activity without it.

UV-based test

All assays were performed in triplicate.

First screening protocol

The standard reaction mixture (200 μ L well, UV-Star® 96-well microplate, Greiner) contained 50 mM potassium dihydrogenophosphate buffer (pH = 7.4), 0.006 U of EcTPase and various concentrations of tested compounds. With the stock solutions of the tested derivatives prepared in DMSO, the final DMSO content in the reaction mixture was 2.5%, including in the reaction mixtures without tested compound. After 10 min of pre-incubation, the reaction was initiated by addition of the thymidine substrate (20 μ L, 3 mM). The decrease in absorbance due to conversion of thymidine to thymine was followed during 30 min (PowerWave HT Microplate Reader, Biotek), with one measure every 2 minutes and a 30 sec shaking before each measure. Data were collected with Biotek KC4 software.

The enzyme activity corresponded to the slope of the change in absorbance, and the residual activity for a given inhibitor was given by the ratio between the activity in presence of the inhibitor and the activity without it.

Phosphate competition protocol

The standard reaction mixture (200 μ L well, UV-Star® 96-well microplate, Greiner) contained 10 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.4 at 25 °C), 150 mM sodium chloride, 2 mM EDTA, 0.006 U of EcTPase, various concentrations of potassium dihydrogenophosphate (2, 5, 10 and 30 mM) and various concentrations of tested compounds. With the stock solutions of the tested derivatives prepared in DMSO, the final DMSO content in the reaction mixture was 2.5%, including in the reaction mixtures without tested compound. After 10 min of pre-incubation, the reaction was initiated by addition of the thymidine substrate (20 μ L, 3 or 10 mM). The decrease in absorbance due to conversion of thymidine to thymine was followed during 30 min (PowerWave HT Microplate Reader, Biotek), with one measure every 2 minutes and a 30 sec shaking before each measure. Data were collected with Biotek KC4 software.

The enzyme activity corresponded to the slope of the change in absorbance, and the residual activity for a given inhibitor was given by the ratio between the activity in presence of the inhibitor and the activity without it.

Table des références

Table des références

- 1) Données épidémiologiques de l'Institut National du Cancer (INCa), <http://www.e-cancer.fr/> (site internet consulté le 14/09/2016).
- 2) Situation de la chimiothérapie des cancers, état des lieux et des connaissances, INCa, juillet 2015.
- 3) D. S. Dizon, L. Krilov, E. Cohen, T. Gangadhar, P. A. Ganz, T. A. Hensing, S. Hunger, S. S. Krishnamurthi, A. B. Lassman, M. J. Markham, E. Mayer, M. Neuss, S. K. Pal, L. C. Richardson, E. Schilsky, G. K. Schwartz, D. R. Spriggs, M. A. Villalona-Calero, G. Villani, G. Masters, *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 987-1011.
- 4) S. E. Jackson, J. D. Chester, *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 262-6.
- 5) V. Prasad, T. Fojo, M. Brada, *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 81-6.
- 6) G. C. Jayson, R. Kerbel, L. M. Ellis, A. L. Harris, *The Lancet* **2016**, *388*, 518-29.
- 7) M. Abdelrahim, S. Konduri, M. R. Basha, P. A. Philip, C. H. Baker, *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 5-18.
- 8) Y. Y. Elamin, S. Rafee, N. Osman, K. J. O'Byrne, K. Gately, *Cancer Microenv.* **2016**, *9*, 33-43.
- 9) S. Liekens, E. De Clercq, J. Neyts, *Biochem Pharmacol.* **2001**, *61*, 253-70.
- 10) K. Aknin, Conception et synthèse de composés anti-angiogéniques par inhibition de la thymidine phosphorylase, enzyme surexprimée dans les tumeurs solides. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris, France, Juin 2009.
- 11) G. Mariaule, Accès original aux hétérocycles par la catalyse organométallique. Développement de nouveaux inhibiteurs de kinases. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris, France, Novembre 2014.
- 12) S. North, M. Moenner, A. Bikfalvi, *Cancer Lett.* **2005**, *218*, 1-14.
- 13) S. Y. Yoo, S. M. Kwon, *Mediat. Inflamm.* **2013**, Article ID 127170.
- 14) M. Papetti, I. M. Herman, *J. Physiol. Cell Physiol.* **2002**, *282*, C947-70.
- 15) L. Persano, M. Crescenzi, S. Indraccolo, *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 87-114.
- 16) G. Bergers, L. E. Benjamin, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401-10.
- 17) J. M. Butler, H. Kobayashi, S. Rafii, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 138-46.
- 18) J. Folkman, *New Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-6.
- 19) N. Ferrara, W. J. Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, *161*, 851-8.
- 20) A. E. El-Kenawi, A. B. El-Remessy, *Brit. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 712-29.
- 21) Y. Zhao, A. A. Adjei, *The Oncologist* **2015**, *20*, 1-14.
- 22) I. Marech, C. Leporini, M. Ammendola, M. Porcelli, C. D. Gadaleta, E. Russo, G. De Sarro, G. Ranieri, *Cancer Lett.* **2015**, *380*, 216-26.
- 23) A. W. Holle, J. L. Young, J. P. Spatz, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2016**, *97*, 270-9.
- 24) O. W. Blaschuk, *Phil. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370*, 20140039.
- 25) R. J. D'Amato, M. S. Loughman, E. Flynn, J. Folkman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4082-5.
- 26) F. Hilberg, G. J. Roth, M. Krssak, S. Kautschitsch, W. Sommergruber, U. Tontsch-Grunt, P. Garin-Chesa, G. Bader, A. Zoephel, J. Quant, A. Heckel, W. J. Rettig, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4774-82.
- 27) J. A. Nagy, H. F. Dvorak, *Clin. Exp. Metastasis* **2012**, *29*, 657-62.
- 28) F. Pezzella, A. Di Bacco, S. Andreola, A. G. Nicholson, U. Pastorino, A. L. Harris, *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2494-500.
- 29) L. Moserle, G. Jiménez-Valerio, O. Casanovas, *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 31-41.
- 30) H. Gharwan, H. Groninger, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *13*, 209-27.
- 31) M. Friedkin, D. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 245-56.

- 32) K. Miyazono, T. Okabe, A. Urabe, F. Takaku, C.-H. Heldin, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4098-103.
- 33) F. Ishikawa, K. Miyazono, U. Hellman, H. Drexler, C. Wernstedt, K. Hagiwara, K. Usuki, F. Takaku, W. Risau, C. H. Heldin, *Nature* **1989**, *338*, 557-62.
- 34) W. E. Razzell, H. G. Khorana, *Biochem. Biophys. Acta* **1958**, *28*, 562-6.
- 35) K. Usuki, J. Saras, J. Waltenberger, K. Miyazono, G. Pierce, A. Thomason, C.-H. Heldin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 1311-6.
- 36) A. Moghaddam, R. Bicknell, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12141-6.
- 37) T. Furukawa, A. Yoshimura, T. Sumizawa, M. Haragushi, S. Akiyama, K. Fukui, M. Ishizawa, Y. Yamada, *Nature* **1992**, *356*, 668.
- 38) G. Spraggon, D. Stuart, C. Ponting, C. Finnis, D. Sleep, Y. Jones, *J. Biol. Chem.* **1993**, *234*, 879-80.
- 39) A. Bronckaers, F. Gago, J. Balzarini, S. Liekens, *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 903-53.
- 40) M. R. Jackson, E. W. Carney, S. J. Lye, J. W. Ritchie, *Placenta* **1994**, *15*, 341-53.
- 41) K. Usuki, L. Norberg, E. Larsson, K. Miyazono, U. Hellman, C. Wernstedt, K. Rubin, C. H. Heldin, *Cell Reg.* **1990**, *1*, 577-84.
- 42) D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnson, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *35*, 330-8.
- 43) M. Zimmerman, J. Seidenberg, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2618-21.
- 44) U. Hübscher, S. Spadari, *Physiol. Rev.* **1994**, *74*, 259-304.
- 45) G. Pula, E. Garonna, W. B. Dunn, M. Hirano, G. Pizzorno, M. Campanella, E. L. Schwartz, M. H. el Kouni, C. P.D. Wheeler-Jones, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 2631-8.
- 46) L. Zhang, I. Z. MacKenzie, M. C. Rees, R. Bicknell, *Endocrinology* **1997**, *138*, 4921-30.
- 47) J. Fujimoto, S. Ichigo, H. Sakagushi, R. Hirose, T. Tamaya, *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 509-13.
- 48) K. Asai, K. Nakanishi, I. Isobe, I. Eksiglu, A. Hirano, K. Hama, T. Miyamoto, T. Kato, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20311-6.
- 49) K. Szigetti, N. Sule, A. M. Adesina, D. L. Armstrong, G. M. Saifi, E. Bonilla, M. Hirano, J. R. Lupski, *Ann. Neurol.* **2004**, *56*, 881-6.
- 50) R. Cabrera-Pérez, J. Torres-Torronteras, F. Vila-Julià, F. J. Ortega, Y. Cámara, J. Barquinero, R. Martí, *Expert Opin. Orph. Drugs* **2015**, *3*, 1167-82.
- 51) C. Garone, S. Tadesse, M. Hirano, *Brain* **2011**, *134*, 3326-32.
- 52) M. L. Valentino, R. Martí, S. Tadesse, L. C. Lopez, J. L. Manes, J. Lyzak, A. Hahn, V. Carelli, M. Hirano, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3410-4.
- 53) A. Benureau, P. Meyer, O. Maillet, N. Leboucq, S. Legra, E. Jeziorski, S. Fournier-Favre, C. Jeandel, P. Gaignard, A. Slama, F. Rivier, A. Roubertie, M. Carneiro, *Arch. Pédiatrie* **2014**, *21*, 1370-4.
- 54) Y. Kumagai, Y. Sugiura, H. Sugeno, Y. Takebayashi, S. Takenoshita, T. Yamamoto, *Intern. Med.* **2006**, *45*, 443-6.
- 55) A. Yoshimura, Y. Kuwazuru, T. Furukawa, H. Yoshida, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1034*, 107-13.
- 56) M. Hirano, R. Martí, J. J. G. M. Verschuuren, A. Buchman, I. Hirano, S. Tadesse, A. B. van Kuilenburg, A. H. van Gennip, B. J. H. M. Poorthuis, *Ann. Neurol.* **2005**, *58*, 649-52.
- 57) M. Hirano, C. Lagier-Tourenne, M. L. Valentino, R. Martí, Y. Nishigaki, *Gene* **2005**, *354*, 152-6.
- 58) E. L. Schwartz, E. Wan, F. S. Wang, N. Baptiste, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1551-7.
- 59) H. Goto, K. Kohno, S. Sone, S. Akiyama, M. Kuwano, M. Ono, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 469-73.
- 60) I. V. Bijnsdorp, M. de Bruin, A. C. Laan, M. Fukushima, G. J. Peters, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2008**, *27*, 681-91.
- 61) L. Griffiths, G. U. Dachs, R. Bicknell, A. L. Harris, I. J. Stratford, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 570-2.

- 62) K. Ikuta, Y. Waguri-Nagaya, K. Kikuchi, T. Yamagami, M. Nozaki, M. Aoyama, K. Asai, T. Otsuka, *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14*, R87.
- 63) Y. Toyoda, S. Tabata, J. Kishi, T. Kuramoto, A. Mitsuhashi, A. Saijo, H. Kawano, H. Goto, Y. Aono, M. Hanibuchi, H. Horikawa, T. Nakajima, T. Furukawa, S. Sone, S. Akiyama, Y. Nishioka, *Arthritis & Rheum.* **2014**, *66*, 560-8.
- 64) S. Saito, N. Tsuno, H. Nagawa, E. Sunami, J. Zhengxi, T. Osada, J. Kitayama, Y. Shibata, T. Tsuruo, T. Muto, *Cancer* **2000**, *88*, 42-9.
- 65) T. Hagemann, J. Wilson, F. Burke, H. Kulbe, N. F. Li, A. Pluddemann, K. Charles, S. Gordon, F. R. Balkwill, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 5023-32.
- 66) J. W. Pollard, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 71-8.
- 67) J. Folkman, *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1091-2.
- 68) M. Haragushi, K. Miyadera, K. Uemura, T. Sumizawa, T. Furukawa, K. Yamada, S. Akiyama, Y. Yamada, *Nature* **1994**, *368*, 198.
- 69) S. Liekens, A. Bronckaers, M. J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1555-67.
- 70) M. De Bruin, O. H. Temmink, K. Hoekman, H. M. Pinedo, G. J. Peters, *Cancer Ther.* **2006**, *4*, 99-124.
- 71) I. V. Bijnsdorp, F. Capriotti, F. A. E. Kruij, N. Losekoot, M. Fukushima, A. W. Griffioen, V. L. Thijssen, G. J. Peters, *Brit. J. Cancer* **2011**, *104*, 1185-92.
- 72) E. K. Rofstad, E. F. Halsor, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4932-8.
- 73) K. A. Hotchkiss, A. W. Ashton, E. L. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19272-9.
- 74) N. S. Brown, E. H. Streeter, A. Jones, A. L. Harris, R. Bicknell, *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 1696-701.
- 75) X. H. Wu, C. Quian, K. Yuan, *Chin. Med. J.* **2011**, *124*, 11-8.
- 76) I. Syrový, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1994**, *28*, 115-21.
- 77) N. S. Brown, A. Jones, C. Fujiyama, A. L. Harris, R. Bicknell, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6298-302.
- 78) R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, B. N. Ames, *Science* **1987**, *235*, 1043-6.
- 79) J. Xie, J. D. Méndez, V. Méndez-Valenzuela, M. Montserrat Aguilar-Hernández, *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2185-97.
- 80) S.-Y. Ko, H.-A. Ko, T.-M. Shieh, W.-C. Chang, H.-I. Chen, S.-S. Chang, I.-H. Lin, *Plos One* **2014**, *9*, e110542.
- 81) M. M. Schmidt, H. Greb, H. Koliwer-Brandl, S. Kelm, R. Dringen, *Neurochem. Res.* **2010**, *35*, 1848-56.
- 82) C. C. Franklin, D. S. Backos, I. Mohar, C. C. White, H. J. Forman, T. J. Kavanagh, *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 86-98.
- 83) D. S. Backos, K. S. Fritz, D. G. McArthur, J. K. Kepa, A. M. Donson, D. R. Petersen, N. K. Foreman, C. C. Franklin, P. Reigan, *Neurochem. Res.* **2013**, *38*, 1838-49.
- 84) C. Januel, L. B. Fay, D. Ruggiero, M. Lagarde, E. Vericel, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1620*, 125-32.
- 85) M. D. Linetsky, E. V. Shipova, R. D. Legrand, O. O. Argirov, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1724*, 181-93.
- 86) G.-Y. Liou, P. Storz, *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 479-96.
- 87) C. Sanhueza, S. Wehinger, J. C. Bennett, M. Valenzuela, G. I. Owen, A. K. G. Quest, *Molecular Cancer* **2015**, *14*:198.
- 88) Y.-W. Kim, T. V. Byzova, *Blood* **2016**, *123*, 625-31.
- 89) S. Tabata, R. Ikeda, M. Yamamoto, T. Furukawa, T. Kuramoto, Y. Takeda, K. Yamada, M. Haragushi, Y. Nishioka, S. Sone, *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 895-902.

- 90) S. Tabata, R. Ikeda, M. Yamamoto, S. Shimaoka, N. Mukaida, Y. Takeda, K. Yamada, T. Soga, T. Furukawa, S. Akiyama, *Oncotarget* **2014**, *5*, 10473-85.
- 91) S. Sengupta, L. A. Sellers, H. B. Matheson, T. D. Fan, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 219-31.
- 92) T. Vogel, D. A. Blake, D. R. Wilkhart, N.-H. Guo, V. S. Zabrenetzhy, D. W. Roberts, *J. Cell Physiol.* **1993**, *157*, 359-66.
- 93) F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028-32.
- 94) H. Seeliger, M. Guba, G. E. Koehl, A. Doenecke, M. Steinbauer, C. J. Bruns, C. Wagner, E. Frank, K. W. Jauch, E. K. Geissler, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1843-52.
- 95) Y. Nakajima, R. Madhyastha, M. Maruyama, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 239-45.
- 96) L. Morbidelli, L. Brogelli, H. J. Granger, M. Ziche, *Life Sci.* **1998**, *62*, PL7-11.
- 97) B. Nieswandt, M. Hafner, B. Echtenacher, D. N. Mannel, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1295-300.
- 98) S. P. Gunningham, M. J. Currie, H. R. Morrin, E. Y. Tan, H. Turley, G. U. Dachs, A. I. Watson, C. Frampton, B. A. Robinson, S. B. Fox, *J. Pathol.* **2007**, *212*, 335-44.
- 99) C. Lemieux, R. Maliba, J. Favier, J. F. Theoret, Y. Merhi, M. G. Sirois, *Blood* **2005**, *105*, 1523-30.
- 100) S. Takao, S. I. Akiyama, A. Nakajo, H. Yoh, M. Kitazono, S. Natsugoe, K. Miyadera, M. Fukushima, Y. Yamada, T. Aikou, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5345-8.
- 101) T. Gotanda, M. Haraguchi, T. Tachiwada, R. Shinkura, C. Koriyama, S. Akiba, M. Kawahara, K. Nishiyama, T. Sumizawa, T. Furukawa, H. Mimata, Y. Nomura, S.-I. Akiyama, M. Nakagawa, *Int. J. Mol. Med.* **2006**, *17*, 1085-91.
- 102) Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, *Traité de Chimie Thérapeutique, Volume 6, TEC et DOC* **2003**.
- 103) A. Moghaddam, H. T. Zhang, T. P. Fan, D. E. Hu, V. C. Lees, H. Turley, S. B. Fox, K. C. Gatter, A. L. Harris, R. Bicknell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 998-1002.
- 104) M. Kitazono, Y. Takebayashi, K. Ishitsuka, S. Takao, A. Tani, T. Furukawa, K. Miyadera, Y. Yamada, T. Aikou, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *253*, 797-803.
- 105) R. Ikeda, T. Furukawa, M. Kitazono, K. Ishitsuka, H. Okumura, A. Tani, T. Sumizawa, M. Haraguchi, M. Komatsu, H. Uchimiya, X. Q. Ren, T. Motoya, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, *291*, 806-12.
- 106) R. Ikeda, X. F. Che, M. Ushiyama, T. Yamaguchi, H. Okumura, Y. Nakajima, Y. Takeda, Y. Shibayama, T. Furukawa, M. Yamamoto, M. Haraguchi, T. Sumizawa, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2006**, *342*, 280-5.
- 107) R. Ikeda, Y. Tajitsu, K. Iwashita, X.-F. Che, K. Yoshida, M. Ushiyama, T. Furukawa, M. Komatsu, T. Yamaguchi, Y. Shibayama, M. Yamamoto, H.-Y. Zhao, J. Arima, Y. Takeda, S.-I. Akiyama, K. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2008**, *370*, 220-4.
- 108) H. M. Sowter, P. J. Ratcliffe, P. Watson, A. H. Greenberg, A. L. Harris, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6669-73.
- 109) S. Mori, S. Takao, R. Ikeda, H. Noma, Y. Mataka, X. Wang, S. Akiyama, T. Aikou, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, *295*, 300-5.
- 110) R. Ikeda, T. Furukawa, R. Mitsuo, T. Noguchi, M. Kitazono, H. Okumura, T. Sumizawa, M. Haraguchi, X. F. Che, H. Uchimiya, Y. Nakajima, X. Q. Ren, S. Oiso, I. Inoue, K. Yamada, S. Akiyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, *301*, 358-63.
- 111) H. C. Jeung, X. F. Che, M. Haraguchi, H. Y. Zhao, T. Furukawa, T. Gotanda, C. L. Zheng, K. Tsuneyoshi, T. Sumizawa, J. K. Rho, S. Akiyama, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1294-302.
- 112) H. C. Jeung, X. F. Che, M. Haraguchi, T. Furukawa, C. L. Zheng, T. Sumizawa, S. Y. Rha, J. K. Rho, S. Akiyama, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 13-21.

- 113) C. Heidelberger, N. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duchinsky, R. Schnitzer, E. Pleven, J. Scheiner, *Nature* **1957**, *179*, 663-6.
- 114) M. Malet-Martino, R. Martino, *Oncologist* **2002**, *7*, 288-323.
- 115) C. M. Walko, C. Lindley, *Clin. Ther.* **2005**, *27*, 23-44.
- 116) O. H. Temmink, M. de Bruin, A. W. Turksma, S. Cricca, A. C. Laan, G. J. Peters, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 565-75.
- 117) O. H. Temmink, T. Emura, M. de Bruin, M. Fukushima, G. J. Peters, *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 779-89.
- 118) G. J. Peters, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2014**, *33*, 358-74.
- 119) O. H. Temmink, M. De Bruin, A. C. Laan, A. W. Turksma, S. Cricca, A. J. Masterson, P. Noordhuid, G. J. Peters, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1759-65.
- 120) S. H. Weng, S. C. Tseng, Y. C. Huang, H. J. Cheng, Y. W. Lin, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 126-36.
- 121) C. L. Liu, Y. P. Lim, M. L. Hu, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 50-66.
- 122) M. J. Pugmire, S. E. Ealick, *Biochem. J.* **2002**, *361*, 1-25.
- 123) M. R. Walters, W. J. Cook, L. Brent Cole, S. A. Short, G. W. Koszalka, T. A. Krenitsky, S. E. Ealick, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14016-22.
- 124) M. J. Pugmire, S. E. Ealick, *Structure* **1998**, *6*, 1467-79.
- 125) R. A. Norman, S. T. Barry, M. Bate, J. Breed, J. G. Colls, R. J. Ernill, R. W. Luke, C. A. Minshull, M. S. B. Mc Alister, J. A. Tucker, A. Pautpit, *Structure* **2004**, *12*, 75-84.
- 126) V. V. Balaev, A. A. Lashkov, A. G. Gabdulkhakov, M. V. Dontsova, T. A. Seregine, A. S. Mironov, C. Betzel, A. M. Mikhailov, *Acta Cryst.* **2016**, *F72*, 224-33.
- 127) M. J. Pugmire, W. Cook, A. Jasanoff, M. R. Walter, S. E. Ealick, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 285-99.
- 128) K. El Omari, A. Bronckaers, S. Liekens, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, D. K. Stammers, *Biochem. J.* **2006**, *399*, 199-204.
- 129) E. Mitsiki, A. C. Papageorgiou, S. Iyer, N. Thiyagarajan, S. H. Prior, D. Sleep, C. Finnis, K. R. Acharya, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2009**, *386*, 666-70.
- 130) M.-J. Pérez-Pérez, E.-M. Priego, A.-N. Hernandez, M.-J. Camarasa, J. Balzarini, S. Liekens, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1113-23.
- 131) M. Schwartz, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 191-8.
- 132) C. Deves, D. C. Rostirolla, L. K. B. Martinelli, C. V. Bizarro, D. S. Santos, L. A. Basso, *Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 592-604.
- 133) P. J. Berti, K. S. Tanaka, *Adv. Phys. Org. Chem.* **2002**, *37*, 239-314.
- 134) P. A. Schwartz, M. J. Vetticatt, V. L. Schramm, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1412-20.
- 135) J. Mendieta, S. Martin-Santamaria, E.-M. Priego, J. Balzarini, M.-J. Camasara, M.-J. Pérez-Pérez, F. Gago, *Biochemistry* **2004**, *43*, 405-14.
- 136) P. Reigan, P. N. Edwards, A. Ggaj, C. Cole, S. T. Barry, K. M. Page, S. E. Ashton, R. W. A. Luke, K. Y. Douglas, I. J. Stratford, M. Jaffar, R. A. Bryce, S. Freeman, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 392-402.
- 137) R. E. Parks Jr., R. P. Agarwal, 3rd ed. in *The Enzymes* **1972**, *7*, 483-514.
- 138) M. R. Birck, V. L. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2447-53.
- 139) G. B. Evans, G. J. Gainsford, V. L. Schramm, P. C. Tyler, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 406-9.
- 140) H. V. Jain, R. Rasheed, T. I. Kalman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1648-51.
- 141) M. Friedkin, D. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 245-56.
- 142) P. Langen, G. Etzold, D. Bärwolff, B. Preussel, *Biochem. Pharmacol.* **1967**, *16*, 1833-7.
- 143) J. Balzarini, A. E. Gamboa, R. Esnouf, S. Liekens, J. Neyts, E. De Clercq, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 91-5.

- 144) H. Bera, A. V. Dolzhenko, L. Sun, S. D. Gupta, W.-K. Chui, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82*, 351-60.
- 145) V. A. McNally, A. Gbaj, K. T. Douglas, I. J. Stratford, M. Jaffar, S. Freeman, R. A. Bryce, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3705-9.
- 146) K. Hirota, M. Sawada, H. Sajiki, M. Sako, *Nucleic Acides Symp. Ser.* **1997**, *37*, 59-60.
- 147) M. Fukushima, N. Suzuki, T. Emura, S. Yano, H. Kazuno, Y. Tada, Y. Yamada, T. Asao, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1227-36.
- 148) M. L. P. Price, W. C. Guida, T. E. Jackson, J. A. Nydick, P. L. Gladstone, J. C. Juarez, F. Donate, R. J. Ternansky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 107-10.
- 149) R. S. Klein, M. Lenzi, T. H. Lim, A. Hotchkiss, P. Wilson, E. L. Schwartz, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1257-63.
- 150) H. Lu, R. S. Klein, E. L. Schwartz, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5136-44.
- 151) F. Focher, D. Ubiali, M. Pregnolato, C. Zhi, J. Gambino, G. E. Wright, S. Spadari, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2601-7.
- 152) R. Nencka, I. Votruba, H. Hrebabecky, E. Tloust'ova, K. Horska, M. Masojidkova, A. Holy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1335-7.
- 153) P. E. Murray, V. A. McNally, S. D. Lockyer, K. J. Williams, I. J. Stratford, M. Jaffar, S. Freeman, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 525-30.
- 154) S. Matsuhita, T. Nitanda, T. Furukawa, . Sumizawa, A. Tani, K. Nishimito, S. Akiba, K. Miyadera, M. Fukushima, Y. Yamada, H. Yoshida, T. Kanzaki, S. Akiyama, *Cancer Res.* **1999**, *50*, 1911-6.
- 155) S. Yano, H. Kazuno, N. Suzuki, T. Emura, K. Wierzba, J. Yamashita, Y. Tada, Y. Yamada, M. Fukushima, T. Asao, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3431-41.
- 156) S. Yano, H. Kazuno, N. Suzuki, T. Emura, K. Wierzba, J. Yamashita, Y. Tada, Y. Yamada, M. Fukushima, T. Asao, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3443-50.
- 157) T. I. Kalman, L. Lai, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2005**, *24*, 367-73.
- 158) V. McNally, M. Rajabi, A. Gbaj, I. J. Stratford, P. N. Edwards, K. T. Douglas, R. A. Bryce, M. Jaffar, S. Freeman, *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 537-47.
- 159) B. R. Baker, M. Kawazu, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 304-11.
- 160) R. Nencka, I. Votruba, H. Hrebabecky, P. Jansa, E. Tloust'ova, K. Horska, M. Masojidkova, A. Holy, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6016-23.
- 161) N. G. Panova, C. S. Alexeev, K. M. Polyakov, S. A. Gavryushov, A. M. Kritzyn, S. N. Mikhailov, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2008**, *27*, 1211-4.
- 162) K. M. Khan, M. Rani, N. Ambreen, M. Ali, S. Hussain, S. Perveen, M. I. Choudhary, *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 6022-8.
- 163) S. A. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, B. Jadoon, Z. A. Khan, S. A. R. Naqvi, A. J. Shaikh, K. Hayat, A. Mahmmod, N. Mahmood, S. Filipek, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1008-15.
- 164) S. A. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, L. Shahzadi, Z. A. Khan, S. A. R. Naqvi, S. Mutahir, N. Mahmood, K. M. Khan, *Bioorg. Chem.* **2015**, *60*, 37-41.
- 165) S. M. Bensaber, H. A. Allafe, N. B. Ermeli, S. B. Mohamed, A. A. Zetrini, S. G. Alsabri, M. Erhuma, A. Hermann, M. I. Jaeda, A. M. Gbaj, *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 5120-34.
- 166) P. Reigan, A. Gbaj, E. Chinje, I. J. Stratford, K. T. Douglas, S. Freeman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5247-50.
- 167) P. Reigan, A. Gbaj, I. J. Stratford, R. A. Bryce, S. Freeman, *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1248-60.
- 168) A. Esteban-Gamboa, J. Balzarini, R. Esnouf, E. De Clerq, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 971-83.

- 169) J. Balzarini, J. Degrevé, A. Esteban-Gamboa, R. Esnouf, E. De Clerq, Y. Engelborhs, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, *FEBS Lett.* **2000**, *483*, 181-5.
- 170) S. Liekens, F. Bilsen, E. De Clerq, E. M. Priego, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, *FEBS Lett.* **2002**, *510*, 83-8.
- 171) I. Votruba, K. Pomeisl, E. Tloust'ova, A. Holy, B. Otova, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1517-21.
- 172) K. Pomeisl, A. Holy, I. Votruba, R. Pohl, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1364-7.
- 173) K. Pomeisl, A. Holy, R. Pohl, K. Horska, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8486-92.
- 174) K. Pomeisl, K. Horska, R. Pohl, J. Blazek, M. Krecmerova, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2012**, *31*, 159-71.
- 175) D. Marak, M. Otmar, I. Votruba, M. Dracinsky, M. Krecmerova, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 652-4.
- 176) S. A. Diab, C. De Schutter, M. Muzard, R. Plantier-Royon, E. Pfund, T. Lequeux, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2758-68.
- 177) Y. Li, Studies in Nucleoside Chemistry. Synthesis of Purine and Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors. Total Synthesis of the Sulfated Nucleoside Glycoside HF-7. Thèse de doctorat, Cornell University, Ithaca, NY, Janvier 2000.
- 178) A. L. Allan, P. L. Gladstone, M. L. Price, S. A. Hopkins, J. C. Juarez, F. Donate, R. J. Ternansky, D. E. Shaw, B. Ganem, Y. Li, W. Wang, S. Ealick, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7807-15.
- 179) P. Kocalka, D. Rejman, V. Vanek, M. Rinnova, I. Tomeckova, S. Kralikova, M. Petrova, O. Pav, R. Pohl, M. Budesinsky, R. Liboska, Z. Tocik, N. Panova, I. Votruba, I. Rosenberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 862-5.
- 180) I. Kosiova, O. Simak, N. Panova, M. Budesinsky, M. Petrova, D. Rejman, R. Liboska, O. Pav, I. Rosenberg, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 145-68.
- 181) L. A. Katz, J. A. Swain, M. A. Portman, R. S. Balaban, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1988**, *255*, H189.
- 182) S. Liekens, A.-I. Hernandez, D. Ribatti, E. De Clerq, M.-J. Camarasa, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29598-605.
- 183) E. Casanova, A.-I. Hernandez, E.-M. Priego, S. Liekens, M.-J. Camarasa, J. Balzarini, M.-J. Pérez-Pérez, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5562-70.
- 184) S. Liekens, A. Bronckaers, M. Belleri, A. Bugatti, R. Sienaert, D. Ribatti, B. Nico, A. Gigante, E. Casanova, G. Opdenakker, M.-J. Pérez-Pérez, J. Balzarini, M. Presta, *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 817-29.
- 185) S. Hussain, J. Gaffney, N. Ahmed, M. Slevin, M. I. Choudhary, V. U. Ahmad, Z. Qasmi, M. A. Abbasi, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2009**, *11*, 159-67.
- 186) L. Sun, H. Bera, W.-K. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 1-11.
- 187) H. Bera, P. K. Ojha, B. J. Tan, L. Sun, A. V. Dolzhenko, W.-K. Chui, G. N. C. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *78*, 294-303.
- 188) L. Sun, J. Li, H. Bera, A. V. Dolzhenko, G. N. C. Chui, W.-K. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 400-10.
- 189) H. Bera, W.-K. Chui, S. D. Gupta, A. V. Dolzhenko, L. Sun, *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 6010-21.
- 190) H. Bera, B. J. Tan, L. Sun, A. V. Dolzhenko, W.-K. Chui, G. N. C. Chui, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 325-34.
- 191) H. Bera, M. H. Lee, L. Sun, A. V. Dolzhenko, W.-K. Chui, *Bioorg. Chem.* **2013**, *50*, 34-40.
- 192) S. Javaid, S. M. Saad, S. Perveen, K. M. Khan, *Bioorg. Chem.* **2015**, *63*, 142-51.
- 193) S. Aoki, Y. Naka, T. Itoh, T. Furokawa, R. Rachmat, S. Akiyama, M. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 827-30.

- 194) M. Rajabi, D. Mansell, S. Freeman, R. A. Bryce, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1165-71.
- 195) K. M. Khan, N. Ambreen, S. Hussain, S. Perveen, M. I. Choudhary, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2983-8.
- 196) T. Emura, N. Suzuki, A. Fujioka, H. Ohshimo, M. Fukushima, *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 449-55.
- 197) R. J. Mayer, E. Van Cutsem, A. Falcone, T. Yoshino, R. Garcia-Carbonero, N. Mizunuma, K. Yamazaki, Y. Shimada, J. Tabernero, Y. Komatsu, A. Sobrero, E. Boucher, M. Peeters, B. Tran, H.-J. Lenz, A. Zaniboni, H. Hochster, J. M. Cleary, H. Prenen, F. Benedetti, H. Mizuguchi, L. Makris, M. Ito, A. Ohtsu, *New Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1909-19.
- 198) H.-J. Lenz, S. Stinzinger, F. Loupakakis, *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 777-83.
- 199) A. Tourteau, E. Merlet, A. Bontemps, M. Leland, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, S. Desbène-Finck, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *32*, 7028-35.
- 200) A. Bontemps, G. Mariaule, S. Desbène-Finck, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, V. Michelet, P. Belmont, *Synthesis* **2016**, *48*, 2178-90.
- 201) Y. Huang, A. Yazbak, A. Domling, *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*, Chichester, UK, John Wiley & Sons, **2012**, 768 p.
- 202) P. Slobbe, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Med. Chem. Comm.* **2012**, *3*, 1189-218.
- 203) B. Kokel, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 845-55.
- 204) M. Conrad, H. Reinbach, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 1339-44.
- 205) J. Tröger, C. Cohaus, *J. Prakt. Chem.* **1927**, *117*, 97-116.
- 206) F. E. King, T. J. King, *J. Chem. Soc.* **1947**, 726-34.
- 207) O. Jie, W. Jin-Jun, H. Guang-Fan, L. Yu-Tian, J. Gui-Ji, *Youji Huaxue* **1995**, *15*, 99-103.
- 208) H. Baumgarten, D. L. Pedersen, M. W. Hunt, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1977-81.
- 209) D. E. O'Brien, L. T. Wienstock, C. C. Cheng, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 99-105.
- 210) H. Fenner, P. Michaelis, *Arch. Pharm.* **1972**, *305*, 751-7.
- 211) E. C. Taylor, N. W. Kalenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5108-15.
- 212) H. K. Gakhar, R. Kaur, A. Gupta, S. B. Gupta, *Indian J. Chem.* **1990**, *29*, 992-4.
- 213) O. A. El Sayed, F. M. El-Bieh, S. I. El-Aqeel, B. A. Al-Bassam, M. E. Hussain, R. U. Roy, K. R. Desai, *Indian J. Heterocycl. Chem.* **1953**, *14*, 327-30.
- 214) V. Nadaraj, S. T. Selvi, S. Mohan, T. D. Thangadurai, *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2911-9.
- 215) A. Chandra, S. Upadhyay, B. Singh, N. Sharma, R. M. Singh, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9219-24.
- 216) K. Akinin, S. Desbène-Finck, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 123-30.
- 217) L. Bradford, T. J. Elliott, F. M. Rowe, *J. Chem. Soc.* **1947**, 437-45.
- 218) S. Tu, S. Wu, S. Yan, W. Hao, X. Zhang, X. Cao, Z. Han, B. Jiang, F. Shi, M. Xia, J. Zhou, *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 239-42.
- 219) M. Schulze, D. E. Scott, A. Scherer, F. Hampel, R. J. Hamilton, M. R. Gray, R. R. Tykwinski, J. M. Stryker, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5930-3
- 220) pKas estimés à l'aide du logiciel SPARC (<http://www.archemcalc.com/sparc-web/calc#/multiproperty>)
- 221) M. Scuotto, M. Persico, M. Bucci, V. Velleco, N. Borbone, E. Morelli, G. Oliviero, E. Novellino, G. Piccialli, G. Cirino, M. Varra, C. Fattorusso, L. Mayol, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5235-42.
- 222) T. G. Kraljevic, S. Kristafor, L. Suman, M. Kralj, S. M. Ametamey, M. Cetina, S. Raic-Malic, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2704-12.
- 223) H.-P. Sun, J.-M. Jia, F. Jiang, X.-L. Xu, F. Liu, X.-K. Guo, B. Cherfaoui, H.-Z. Huang, Y. Pan, Q.-D. You, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *79*, 399-412.

- 224) W. Zhu, C. Sun, S. Xu, C. Wu, J. Wu, M. Xu, H. Zhao, L. Chen, W. Zeng, P. Zheng, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6746-54.
- 225) D. R. Goldberg, T. Butz, M. G. Cardozo, J. Eckner, A. Hammach, J. Huang, S. Jakes, S. Kapadia, M. Kashem, S. Lukas, T. M. Morwick, M. Panzenbeck, U. Patel, S. Pav, G. W. Peet, J. D. Peterson, A. S. Prokopowicz, R. J. Snow, R. Sellati, H. Takahashi, J. Tan, M. A. Tschantz, X.-J. Wang, Y. Wang, J. Wolak, P. Xiong, N. Moss, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1337-49.
- 226) M. P. Groziak, D. W. Thomas, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2152-9.
- 227) R. S. Klein, J. J. Fox, *J. Org. Chem.* **1973**, *37*, 4381-6.
- 228) P. S. Mainkar, K. Johnny, T. P. Rao, S. Chandrasekhar, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2519-25.
- 229) C. Wang, J. Liu, Y. Ji, J. Zhao, L. Li, H. Zhang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2479-81.
- 230) V. M. T. Careiro, H. M. C. Ferraz, T. O. Vieira, E. E. Ishikawa, L. F. Silva, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2877-82.
- 231) K. Hirota, Y. Kitade, Y. Kanbe, Y. Isobe, Y. Maki, *Synthesis* **1993**, *2*, 213-5.
- 232) J. Toyohara, M. Okada, C. Toramatsu, K. Suzuki, T. Irie, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 67-74.
- 233) M. M. Alauddin, P. S. Conti, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1699-706.
- 234) K. Pomeisl, A. Holy, R. Pohl, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3065-7.
- 235) T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-10.
- 236) W. A. Skinner, M. G. M. Schelstraete, B. R. Baker, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 149-51.
- 237) J. H. Burckhalter, R. J. Seiwald, H. C. Scarborough, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 991-4.
- 238) R. H. E. Hudson, F. Wojciechowski, *Can. J. Chem.* **2005**, *83*, 1731-40.
- 239) J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751-4.
- 240) D. Jakubiec, K. Z. Walczak, *Monatsh. Chem.* **2011**, *142*, 1155-61.
- 241) J. Maes, T. R. M. Rauws, B. U. W. Maes, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9137-41.
- 242) J. S. Larsen, E. B. Pedersen, C. Nielsen, *Synthesis* **2004**, *11*, 1874-8.
- 243) I. Nowak, J. F. Cannon, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 532-7.
- 244) I. Devi, N. H. Borah, P. J. Bhuyan, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2405-8.
- 245) L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Chem. Comm.* **2009**, *48*, 6583-5.
- 246) B. Zaleska, S. Lis, *Synthesis* **2001**, *6*, 811-27.
- 247) K. Ostrowska, M. Ciechanowicz-Rutkowska, T. Pilati, G. Zuchowski, *Monatsh. Chem.* **1999**, *130*, 555-62.
- 248) S. V. Ryabukhin, D. M. Panov, A. S. Plaskon, O. O. Grygorenko, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 631-5.
- 249) M. A. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 665-8.
- 250) M. A. Walker, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5352-5.
- 251) L. J. Jiang, H. Q. Lan, J. F. Zheng, J. L. Ye, P. Q. Huang, *Synlett* **2009**, *2*, 297-301.
- 252) J. J. Wade, *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 981-7.
- 253) S. N. Rao, D. C. Mohan, S. Adimurthy, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1496-9.
- 254) L. Becerra-Figueroa, A. Ojeda-Porras, D. Gamba-Sanchez, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4544-52.
- 255) T. B. Nguyen, J. Sorres, M. Q. Tran, L. Ermolenko, A. Al-Mourabit, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3202-5.
- 256) E. Bon, R. Réau, G. Bertrand, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1217-20.
- 257) O. Meth-Cohn, B. Narine, B. Tarnowski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 1520-30.
- 258) J. Keilitz, H. A. Malik, M. Lautens, *Top Heterocycl. Chem.* **2013**, *32*, 187-224.
- 259) H. C. Shen, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3885-903.
- 260) K. Stefan, *Synthesis* **2008**, *20*, 3183-204.
- 261) B. Alcaide, P. Almendros, J. M. Alonso, *Molecules* **2011**, *16*, 7815-43.

- 262) C. I. Stathakis, P. L. Gkizis, A. L. Zografos, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1093-117.
- 263) A. Furstner, *Accounts Chem. Res.* **2014**, *47*, 925-38.
- 264) B. M. Trost, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 695-705.
- 265) F. Alonso, I. P. Beletskaya, M. Yus, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3079-160.
- 266) B. H. Lipshutz, Y. Yamamoto, *Coinage Metals in Organic Chemistry*, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2793-3442.
- 267) G. Fang, X. Bi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8124-73.
- 268) D. P. Day, P. W. H. Chan, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1368-84.
- 269) C. Aubert, L. Fensterbank, P. Garcia, M. Malacria, A. Simonneau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1954-93.
- 270) F. Inagaki, S. Kitagaki, C. Mukai, *Synlett* **2011**, *5*, 594-614.
- 271) P. Belmont, E. Parker, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *35*, 6075-89.
- 272) V. Michelet, *5.30 Noble Metal-Catalyzed Enyne Cycloisomerizations and Related Reactions, Comprehensive Organic Synthesis II, Second Edition*, Amsterdam, Pays-Bas, Elsevier, **2014**, 1483-536.
- 273) P. Y. Toullec, V. Michelet, *Top Curr. Chem.* **2011**, *302*, 31-80.
- 274) R. Dorel, A. M. Echavarren, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9028-72.
- 275) B. Alcaide, P. Almendros, J. M. Alonso, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4405-16.
- 276) B. Alcaide, P. Almendros, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2561-76.
- 277) T. Aggarwal, S. Kumar, A. K. Verma, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7639-53.
- 278) N. Asao, T. Nogami, K. Takahashi, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 764-5.
- 279) N. T. Patil, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5139-42.
- 280) A. Bacchi, M. Costa, N. Della Ca, M. Fabbriatore, A. Fazio, B. Gabriele, C. Nasi, G. Salerno, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *3*, 574-85.
- 281) L.-L. Wei, L.-M. Wei, W.-B. Pan, M.-J. Wu, *Synlett* **2004**, *9*, 1497-502.
- 282) A. Kotera, J. I. Uenishi, M. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *8*, 1166-9.
- 283) L.-P. Liu, G. B. Hammond, *Org. Lett.* **2010**, *20*, 4640-3.
- 284) T. Godet, C. Vaxelaire, C. Michel, A. Milet, P. Belmont, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5632-41.
- 285) M. Dell'Acqua, B. Castano, C. Cecchini, T. Pedrazzini, V. Pirovano, E. Rossi, A. Caselli, G. Abbiati, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3494-505.
- 286) S. Obika, H. Kono, Y. Yasui, R. Yanada, Y. Takemoto, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4462-8.
- 287) J. Barluenga, H. Vazquez-Villa, A. Ballesteros, J. M. Gonzalez, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9028-9.
- 288) D. Yue, N. Della Ca, R. C. Larock, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1581-4.
- 289) T. Godet, J. Bosson, P. Belmont, *Synlett* **2005**, *18*, 2786-90.
- 290) I. Cikotiene, M. Morkunas, D. Motiejaitis, S. Rudys, A. Bruskstus, *Synlett* **2008**, *11*, 1693-7.
- 291) M. Dell'Acqua, D. Facoetti, G. Abbiati, E. Rossi, *Synthesis* **2010**, *14*, 2367-78.
- 292) C. Kanazawa, A. Ito, M. Terada, *Synlett* **2009**, *4*, 638-42.
- 293) N. Asao, C. S. Chan, K. Takahashi, Y. Yamamoto, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11322-6.
- 294) X. Yao, C.-J. Li, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1953-5.
- 295) A. B. Beeler, S. Su, C. A. Singleton, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1413-9.
- 296) X. Yu, Q. Ding, W. Wang, J. Wu, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4390-3.
- 297) D. Malhotra, L.-P. Liu, M. S. Mashuta, G. B. Hammond, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4043-50.
- 298) G. Dyker, D. Hildebrandt, J. Liu, K. Merz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4399-402.
- 299) R.-Y. Tang, J.-H. Li, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4733-8.

- 300) B. Ouyang, J. Yuan, Q. Yang, Q. Ding, Y. Peng, J. Wu, *Heterocycles* **2011**, *82*, 1239-49.
- 301) G. Mariaule, G. Newsome, P. Y. Toullec, P. Belmont, V. Michelet, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4570-3.
- 302) C. Michel, T. Godet, M.-L. DheuAndries, P. Belmont, A. Milet, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2007**, *811*, 175-82.
- 303) E. Parker, N. Leconte, T. Godet, P. Belmont, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 343-5.
- 304) X. Bantreil, C. Vaxelaire, T. Godet, E. Parker, C. Sauer, P. Belmont, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4831-41.
- 305) J. Zhu, A. R. Germain, J. A. Porco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1239-43.
- 306) M. M. Ali, Tasneem, K. C. Rajanna, P. K. Saiprakash, *Synlett* **2001**, *2*, 251-3.
- 307) M. M. Ali, S. Sana, Tasneem, K. C. Rajanna, P. K. Saiprakash, *Synthetic Commun.* **2002**, *32*, 1351-6.
- 308) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-70.
- 309) M. Toyota, C. Komori, M. Ihara, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7110-3.
- 310) O. Meth-Cohn, B. Narine, B. Tarnowski, R. Hayes, A. Keyzad, S. Rhouati, A. Robinson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. A* **1981**, 2509-17.
- 311) P. Belmont, J.-C. Andrez, C. S. M. Allan, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2783-6.
- 312) M. Delobbeau, Synthèse de composés anti-angiogéniques par inhibition de la thymidine phosphorylase. Stage de Master 2^{ème} année, Université Paris Descartes, Paris, France, 2013.
- 313) E. Petricci, M. Radi, F. Corelli, M. Botta, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9181-4.
- 314) E. Parker, Réactions de cycloisomérisation catalysées par des complexes d'argent ou de rhodium pour accéder à des dérivés de Furoquinoléine, Pyranoquinoléine et Dibenzofurane. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Décembre 2010.
- 315) A. Orsini, A. Vitérisi, A. Bodlenner, J.-M. Weibel, P. Pale, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2259.
- 316) G. S. Lewandos, D. K. Gregston, F. R. Nelson, *J. Organomet. Chem.* **1976**, *118*, 363-74.
- 317) N. Asao, S. Yudha S., T. Nogami, Y. Yamamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5526-8.
- 318) J. U. Rhee, M. J. Krische, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2493-5.
- 319) H. Mayr, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 5095-111.
- 320) P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Edition*, Hoboken, New Jersey, USA, John Wiley & Sons, **2006**, 1082 p.
- 321) O. Meth-Cohn, *Heterocycles* **1993**, *35*, 539-57.
- 322) J. L. Shim, R. Niess, A. D. Broom, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 578-81.
- 323) T.-L. Su, J.-T. Huang, J. H. Burchenal, K. A. Watanabe, J. J. Fox, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 709-15.
- 324) D. Shi, L. Niu, J. Shi, X. Wang, S. Ji, *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 1083-90.
- 325) T.-L. Su, K. A. Watanabe, *J. Heterocyclic Chem.* **1982**, *19*, 1261-2.
- 326) T.-L. Su, K. A. Watanabe, *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, *21*, 1543-7.
- 327) M. J. Gonzalez-Moa, P. Besada, M. Teijeira, C. Teran, E. Uriarte, *Synthesis* **2004**, *4*, 543-8.
- 328) J. Malek, *Org. React.* **1988**, *36*, 249.
- 329) J. S. Cha, *Org. Prep. Proced. Int.* **1989**, *21*, 451.
- 330) H. Stephen, *J. Chem. Soc., Trans.* **1925**, *127*, 1874-7.
- 331) Y. M. Choi, M. Yoo, D. K. An, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 473-4.
- 332) G. Borzsonyi, A. Alsbaiee, R. L. Beingessner, H. Fenniri, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7233-9.
- 333) A. P. Van Sickle, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 895-901.
- 334) M. C. Bagley, M. C. Lubinu, *Synthesis* **2006**, *8*, 1283-8.
- 335) J. J. Vanden Eynde, F. Delfosse, A. Mayence, Y. Van Haverbeke, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6511-6.

- 336) H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *The Protein Data Bank Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235-42.
- 337) G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.
- 338) G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-48.
- 339) Tripos Associates, Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144.
- 340) M. Clark, R. D. III Cramer, N. Van Opdenbosch, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- 341) M. De Bruin, T. Van Capel, K. Smid, M. Fukushima, K. Hoekman, H. M. Pinedo, G. J. Peters *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *2*, 93-9.
- 342) F. Corelli, M. Botta, A. Lossani, S. Pasquini, S. Spadari, F. Focher, *Il Farmaco* **2004**, *59*, 987-92.
- 343) T. Kita, H. Takahashi, Y. Hashimoto, *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 860-2.
- 344) T. A. Krenitsky, S. R. M. Bushby, *Stabilized Thymidine Phosphorylase Formulation*. US4178212A, **1979**.
- 345) N. G. Panova, C. S. Alexeev, A. S. Kuzmichov, E. V. Shcheveleva, S. A. Gavryushov, K. M. Polyakov, A. M. Kritzyn, S. N. Mikhailov, R. S. Esipov, A. I. Miroshnikov, *Biochemistry (Moscow)* **2007**, *72*, 21-8.
- 346) A. Shamshad, R. Lofthouse, G. Shaw, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1976**, *18*, 1969-75.
- 347) M. Cernova, I. Cerna, R. Pohl, M. Hocek, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5309-19.
- 348) M. Dubernet, V. Caubert, J. Guillard, M.-C. Viaud-Massuard, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4585-93.
- 349) M. A. Kerry, G. W. Boyd, S. P. Mackay, O. Meth-Cohn, L. Platt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2315-21.
- 350) M. A. Elban, W. Sun, B. M. Eisenhauer, R. Gao, S. M. Hecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3513-6.
- 351) I. Sato, T. Nakao, R. Sugie, T. Kawasaki, K. Soai, *Synthesis* **2004**, *9*, 1419-28.
- 352) A. Patin, P. Belmont, *Synthesis* **2005**, *14*, 2400-6.
- 353) P. Belmont, T. Belhadj, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1793-5.
- 354) A. Chandra, B. Singh, S. Upadhyay, R. M. Singh, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11680-5.

Résumé

L'angiogenèse tumorale joue un rôle prépondérant dans la croissance et la dissémination des tumeurs solides. La thymidine phosphorylase (TPase) est une enzyme clé dans la mise en place de ce processus puisque sa surexpression, dans de nombreuses tumeurs solides, conduit à la libération de trois des principaux facteurs pro-angiogéniques (VEGF, MMP-1 et IL-8). Cette thèse s'inscrit dans un projet de recherche ayant trait à la conception rationnelle, la synthèse et l'évaluation biologique d'inhibiteurs de la TPase. Les inhibiteurs de première génération étaient construits autour du noyau pyrimidinedione du substrat naturel de l'enzyme, la thymidine. Plusieurs séries A, B et C avaient alors été développées, dans lesquelles ce noyau était combiné à un hétérocycle aromatique azoté par annélation ou par l'intermédiaire d'un espaceur de longueur variable. Des travaux préliminaires de docking dans le site actif de la TPase ont mis en évidence une spécificité de ces inhibiteurs qui interagissent avec une large poche jusqu'alors inexplorée. L'objectif de notre travail a été l'amélioration des composés de première génération et le développement de nouvelles séries D et E afin d'optimiser les interactions établies avec le site de fixation de la thymidine et la poche récemment mise en évidence. De nombreux dérivés ont ainsi été préparés en série pyrimidoquinoléine (série A), pyrroloquinoléine / pyrimidinedione (séries B et C), pyrimidopyridine-imide (série D) ou encore pyranoquinoléine et furoquinoléine (séries E). Cette grande diversité de structures a pu être obtenue grâce à des réactions « one-pot » multicomposants et des réactions tandem de cyclofonctionnalisation catalysées à l'argent que nous développons au laboratoire. La mise au point des différentes synthèses nous a amenés à élaborer une voie d'accès aux pyrimidopyridine-imides sélectivement substitués. Nous avons également réalisé une étude méthodologique consacrée à une réaction tandem de cyclofonctionnalisation avec addition de nucléophiles carbonés permettant d'accéder à une grande variété de pyranoquinoléines. Après mise au point d'un test enzymatique en plaque 96 puits basé sur une mesure UV *in situ*, l'évaluation du pouvoir inhibiteur de nos composés vis-à-vis de la TPase a permis au travers d'un premier criblage de détecter de bonnes activités au sein des différentes séries. Une étude mécanistique a confirmé que les inhibiteurs de la série A sont compétitifs vis-à-vis de la thymidine, et a mis en évidence un mécanisme d'inhibition différent pour certaines molécules des séries E. Ces résultats biologiques ont été corroborés par la modélisation moléculaire.

Mots clés

Thymidine phosphorylase, angiogenèse tumorale, anti-angiogéniques, synthèse "one-pot", réactions multicomposants, antitumoraux, modélisation moléculaire, chimie organométallique, catalyse à l'argent, réactions tandem d'addition/cyclisation, nucléophiles carbonés.

Summary

Angiogenesis is a prerequisite for tumor progression, invasion and metastasis. Thymidine phosphorylase (TPase) plays a prominent role in this process since it has been shown to be upregulated in many types of solid tumors, promoting the production of three major pro-angiogenic factors (VEGF, MMP-1 and IL-8). This thesis is part of a medicinal chemistry research project based on the rational conception, the synthesis and the biological evaluation of TPase inhibitors. The first generation inhibitors were built around the pharmacophoric pyrimidinedione core of the natural substrate thymidine. Several series A, B and C were then devised by combining this heteroaromatic ring with a nitrogen-containing aromatic heterocycle, by ring fusion or through various linkers. A preliminary docking study highlighted a specific interaction between these inhibitors and a wide pocket which had not been explored yet. Our work aimed at enhancing the inhibitors activity of the first generation and to develop novel D and E series, with optimized interactions in the thymidine binding site, along with the pocket identified during the preliminary docking study. Many derivatives were prepared with scaffolds such as pyrimidoquinoline (series A), pyrroloquinoline / pyrimidinedione (series B and C), pyrimidopyridine-imide (series D), furoquinoline and pyranoquinoline (series E). This great variety of structures was obtained thanks to one-pot multicomponent reactions and silver-catalyzed cyclofunctionalizations that are mastered in our laboratory. While we were devising these syntheses, an access to selectively-substituted pyrimidopyridine-imides was achieved. Moreover, we carried out a methodology research dedicated to a tandem cyclofunctionalization reaction, allowing us to introduce aromatic nucleophiles on our pyranoquinoline structures. After setting up a UV-based enzymatic test, we assessed the inhibitory potential of our compounds towards TPase through a first screening, which revealed several hits among the different series. A mechanistic study confirmed that the compounds of series A were competitive inhibitors towards thymidine, but also revealed that some of the inhibitors of series E had a different mechanism of inhibition. Lastly, a new molecular modelling study supported the results of the biological evaluation.

Keys words

Thymidine phosphorylase, tumor angiogenesis, anti-angiogenic, one-pot synthesis, multicomponent reactions, antitumor compounds, molecular modelling, organometallic chemistry, silver catalysis, addition/cyclization reactions, aromatic nucleophiles.