



**HAL**  
open science

# Synthèse d'inhibiteurs fluorescents des transporteurs vésiculaires du glutamate : outils pharmacologiques pour les maladies neurodégénératives

Mahamadou Djibo

► **To cite this version:**

Mahamadou Djibo. Synthèse d'inhibiteurs fluorescents des transporteurs vésiculaires du glutamate : outils pharmacologiques pour les maladies neurodégénératives. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB162 . tel-04482077

**HAL Id: tel-04482077**

**<https://theses.hal.science/tel-04482077>**

Submitted on 28 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.

**Université Paris Descartes**

Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

**THÈSE DE DOCTORAT**

Présenté par :

**Mahamadou DJIBO**

En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES**

Discipline/S spécialité : Chimie organique interface Chimie-Biologie

**Synthèse d'inhibiteurs fluorescents des transporteurs vésiculaires du  
glutamate : Outils pharmacologiques pour les maladies  
neurodégénératives**

Soutenue le 28 novembre 2016 devant le jury composé de :

|                                 |   |                    |
|---------------------------------|---|--------------------|
| <b>Pr. Philippe DAUBAN</b>      | Institut de Chimie des Substances<br>Naturelles | Rapporteur         |
| <b>Dr. Jean-DESSOLIN</b>        | Université de Bordeaux                          | Rapporteur         |
| <b>Pr. Philippe BELMONT</b>     | Université Paris Descartes                      | Examineur          |
| <b>Pr. Pierre-Yves RENARD</b>   | Université de Rouen                             | Examineur          |
| <b>Dr. Stéphanie DAUMAS</b>     | Université Pierre et Marie Curie                | Membre invité      |
| <b>Dr. Isabelle McCORT</b>      | Université Paris Descartes                      | Co-directeur       |
| <b>Dr. Nicolas PIETRANCOSTA</b> | Université Paris Descartes                      | Directeur de thèse |



*L'essentiel est l'exigence envers soi-même.  
Associe à cela, la patience, la tolérance et le pardon envers autrui.*



Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Philippe DAUBAN, le Dr. Jean-DESSOLIN, le Pr. Philippe BELMONT, le Pr. Pierre-Yves RENARD, et le Dr. Stéphanie DAUMAS, d'avoir accepté la participation à la commission des membres du jury. Je vous remercie d'avoir pris le temps pour la lecture, la compréhension et l'évaluation de ces travaux. Je remercie notamment les rapporteurs (le Pr. Philippe DAUBAN, et le Dr. Jean-DESSOLIN) pour leur compréhension, leur patience, et leurs conseils pour les corrections, notamment de la première version du rapport. Merci.

Je remercie ensuite, le Dr. Francine ACHER de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant ces trois années de thèse. Je la remercie pour ses conseils et pour son implication dans la réussite de ce projet. Merci énormément.

Je remercie ensuite Dr Nicolas PIETRANCOSTA pour tout. Cette thèse n'aurait sans doute pas aboutie sans toi. Je te remercie énormément pour ta patience, ta gentillesse et tes conseils scientifiques qui m'ont débloqué dans bien de situations. Tes qualités scientifiques et managériales sont sans limites. Merci beaucoup.

Merci également au Dr. Isabelle McCORT que nous considérons tous comme notre mère. Je te remercie beaucoup pour tes conseils qui m'ont énormément aidé. Je te remercie également pour ta bonne ambiance et pour ta joie de vivre.

Merci beaucoup à Laetitia CHAUSSET-BOISSARIE qui a synthétisé au moins la moitié des composés finaux présentés dans ce rapport. Merci pour ton implication dans le projet. Les deux années passées avec toi ont été tellement enrichissantes, tant sur un plan humain que scientifique. Merci beaucoup et bonne chance pour tes différents projets....

Merci à Sandy DESRAT. Je te considère comme un grand frère. Merci de m'avoir débloqué lors de la synthèse de mes composés et d'avoir partagé avec moi ces moments difficiles. Ta participation pendant les 7 mois sur ce projet a été énormément bénéfique. Sans toi, je ne serais, de toute évidence, pas arrivé au bout de mes synthèses. Je te remercie également pour les composés synthétisés et qui sont présentés dans le rapport. Tu es, tu as été, et tu seras toujours un exemple pour moi. Clin d'œil pour la fistinière.... !

Je remercie Kiranmai NAYAMI. J'aurais tant aimé que tu sois là pour voir l'avancé du projet. Je te remercie pour l'année passée ensemble dans le labo durant laquelle je t'ai vu te donner corps et âme pour la bonne réussite de ce projet. Tes conseils et ton soutien m'ont tellement aidé surtout quand je n'arrivais pas à purifier mes produits finaux. Tu as vraiment été une amie pour moi. Longue vie, prospérité et plein de bonheur à toi, ton mari, ton enfant, et toute la famille.

Je remercie aussi Bruno pour ton travail sur le projet. Merci pour les composés que tu as synthétisés et qui m'ont énormément été bénéfiques dans l'analyse de mes résultats. Je te souhaite bonne chance et bonne continuation dans le domaine de chimie. Tu fais partie de ces personnes qui méritent le respect et qui inspire les autres. Longue vie et plein de bonheur à ta famille.

Je remercie énormément Rodolphe ALVES de SOUSA pour m'avoir accepté sur sa paillasse pendant les deux mois qu'a duré le stage de Ada. Je te remercie pour ton implication dans le projet et pour tes conseils sages et très pertinents.

Je remercie également Erika de nous avoir aidés avec les références pour les mesures de fluorescence.

Je remercie bien évidemment Delphine RIGault et Assia HESSANI, mes favorites, pour votre joie de vivre et les bons moments passés ensemble. Je vous remercie pour les conseils amicaux, pour vos aides dans les moments importants. Dédé, je te remercie pour ton logement quand j'en avais besoin. Tu es sans doute l'une des personnes que j'ai le plus appréciée depuis ma venue en France. Assia je te remercie beaucoup pour ta joie de vivre, ta considération, et pour les spectres de masse que tu faisais rapidement avec le sourire. Merci à toutes les deux, qui transformaient mes tristesses en joies, qui ont été si gentilles, attentives et attentionnées avec moi, Je vous porte dans mon cœur, aujourd'hui, demain, dans les profondeurs de la mer et dans l'infini de l'univers.

Un grand remerciement à Claudia DESOLE, ma préférée. Ta seule présence dans le labo illuminait mes jours et me donnait la force de continuer avec le sourire malgré les jours difficiles. Ma tendresse pour toi est sans limite. Dixit Cummings, tu es tout ce que la lune a toujours voulu dire, tout ce que le soleil chantera, la merveille qui maintient les étoiles éparses.

Je remercie notamment Mylène pour son assistance et ses conseils sages, ainsi que pour les moments passer ensemble. Tu es sans doute l'une des personnes envers lesquelles ma considération est sans limite. Je te souhaite bonne chance pour la suite de projets.

Je remercie aussi Franck Besse-Cyril ainsi que Lilian. Franck, ton manuscrit a vraiment été une inspiration, pour moi, dans la rédaction de mon rapport. Les résultats obtenus lors de ta thèse constituent le fondement de tous les résultats obtenus durant ma thèse. Merci pour ton travail, si considérable. Lilian, les mois passés avec toi ont vraiment été enrichissant pour moi. Merci pour ta sympathie et pour les bonnes ambiances. L'après thèse n'est souvent pas facile, Je te souhaite bon courage et plein de chance dans l'obtention du poste que tu préfères.

Je remercie tous les stagiaires et post-docs qui sont passés dans le labo et avec qui j'ai pu passer de bons moments dont notamment Berine et Alex, les as de la modélisation ; Blaise, le spécialiste dans l'évaluation et l'application des composés fluorescents. Je remercie notamment Ada pour avoir travaillé durement pour la synthèse de certains composés finaux. Ton stage à été d'une aide précieuse ; Je remercie également ma petite Mabrouka pour les 3 mois passés ensemble dans le labo. Je remercie Viviana pour ton sourire. Tu es vraiment une superbe personne. Bonne chance pour ton doctorat en Finlande. Je remercie également Romain et Remis. Bonne chance et bon courage à vous dans vos projets doctoraux.

Je remercie également Anas, Pado, Marine, Aurélie, Sébastien, Bruno ainsi que tous mes amis et connaissance dans l'UMR dont Hamit en particulier, Nawel, Petra, Christine, Anna, Haoura, Racha, Moushira, Fx, solène, Nicolas, Erwan, Laurent, Farouk, Bakary, Abdou, Marie, Adia, et tous ceux que j'ai pu omettre le nom par inadvertance... Merci énormément à vous tous !

Je remercie tous mes professeurs pour m'avoir transmis la connaissance. Je remercie notamment Hamid et Peter pour leur considération, Diana et Guillaume pour avoir soutenue ma candidature, pour la bourse de thèse, auprès de mon gouvernement.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de Jean Pierre dont Pierre Olivier, Nikaïa, Nassima, et tous les autres... Merci pour votre présence et pour l'accueil dans l'équipe.

Un grand remerciement à nos collaborateurs en biologie, Salah El Mestikawy et son équipe qui effectuent les évaluations biologiques. Un merci particulier à Odile et Stéphanie qui font toutes les expériences. Merci pour votre collaboration et votre implication majeure dans la réussite de ce projet.

Je remercie le personnel de la reprographie pour l'impression du manuscrit dans la joie et la bonne humeur.

Merci à Allah et son prophète Muhamad, d'accorder vie, santé, force et courage à moi, mes parents, mes frères et sœurs, les personnes que j'aime, mes proches, et tous les gens de bien qui œuvrent pour le bien des autres.

Merci à vous, les lecteurs de cette thèse.





|   |           |
|---|-----------|
| <b>Chapitre I: Introduction Générale</b>                                    | <b>15</b> |
| A. Le glutamate   | 15        |
| I. Découverte .....   | 16        |
| II. Structure du composé .....  | 17        |
| III. Biosynthèse du glutamate .....   | 17        |
| IV. Quelques fonctions biochimiques du glutamate .....                      | 19        |
| B. La neurotransmission glutamatergique                                     | 21        |
| Introduction .....  | 21        |
| V. Les acteurs clés de la synapse glutamatergique .....                     | 22        |
| V.1. Les récepteurs du glutamate .....                                      | 23        |
| V.2. Les transporteurs du glutamate .....                                   | 30        |
| <b>Chapitre II: Objectifs et axes de travail</b>                            | <b>63</b> |
| A. Objectifs  | 65        |
| B. Présentation des axes du travail   | 68        |
| <b>Chapitre III: Conception des inhibiteurs</b>                             | <b>73</b> |
| Introduction  | 75        |
| VI. Formation de coumarines en condition acide.....                         | 76        |
| VII. Formation de coumarines en condition basique.....                      | 78        |
| VIII. Formation de coumarines : autres méthodes.....                        | 80        |
| Partie A: Synthèse des synthons   | 83        |
| Introduction  | 85        |
| IX. Synthèse des synthons coumarines .....                                  | 88        |
| IX.1. Synthèse de la 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine .....                     | 88        |
| IX.2. Synthèse des synthons 3-carboxy-coumariniques .....                   | 90        |
| X. Synthèse des synthons phényliques et biphényliques.....                  | 105       |
| X.1. Précurseurs phényliques .....  | 105       |
| X.2. Précurseurs biphényliques .....  | 106       |
| X.3. Précurseurs des composés entiers.....                                  | 109       |
| Partie B. Valorisation des synthons   | 113       |
| A. Synthèse des composés phényl-coumarinyles                                | 114       |
| XI. Synthèse des composés phényldiazényl-coumarinyles.....                  | 114       |
| XI.1. Synthèse des analogues par couplage diazoïque sur une coumarine ..... | 115       |
| XI.2. Conclusion .....  | 137       |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| XII.      | Synthèse des analogues styryl-coumarinyles .....                               | 138        |
| XII.1.    | Voie 1 : Couplage de Matsuda-Heck .....  | 139        |
| XII.2.    | Couplage de Suzuki-Miyaura.....  | 140        |
| XIII.     | Synthèse des analogues phényléthynyl-coumarinyles.....                         | 144        |
| XIV.      | Synthèse des composés phényltriazol-coumarinyles.....                          | 145        |
| XIV.1.    | Cycloaddition à partir d'une éthyne coumarine (voie 1).....                    | 147        |
| XIV.2.    | Cycloaddition à partir d'une d'azidocoumarine (voie 2) .....                   | 149        |
| XIV.3.    | Cas particulier de la 7-hydroxy-(phényltriazol)-coumarine 138. ....            | 150        |
| XV.       | Synthèse des analogues phényl-coumarinyles.....                                | 152        |
| XVI.      | Conclusion .....   | 153        |
| B.        | Synthèse des composés biphényl-coumarinyles .....                              | 155        |
| XVII.     | Synthèse des analogues biphényldiazényl-Coumarinyles .....                     | 156        |
| XVIII.    | Synthèse des analogues biphénylvinyl-coumarinyles .....                        | 158        |
| XIX.      | Synthèse d'analogues biphényléthynyl-coumarines .....                          | 159        |
| XX.       | Synthèse d'analogues biphényltriazol-coumarinyles : .....                      | 160        |
| C.        | Synthèse des analogues entiers .....   | 161        |
| XXI.      | Développement des analogues entiers symétriques .....                          | 162        |
| XXI.1.    | Composés entiers diazényles .....  | 162        |
| XXI.2.    | Synthèse composé entiers vinyl-, éthyne- et triazol-coumarinyles .....         | 165        |
| XXII.     | Perspectives (composés entiers dissymétriques).....                            | 166        |
| XXIII.    | Conclusion .....   | 167        |
|           | <b>Chapitre IV: Évaluation des activités biologiques</b> .....                 | <b>169</b> |
| A.        | Introduction .....   | 171        |
| B.        | Analyse des résultats .....  | 176        |
| XXIV.     | Pharmacomodulation du motif polaire naphtyle : .....                           | 179        |
| XXV.      | Pharmacomodulation du lien azo .....   | 184        |
| XXVI.     | Optimisation du motif aryle.....   | 188        |
| XXVII.1.  | Substitution sur le carbone 4' : augmentation de la taille de la molécule..... | 188        |
| XXVIII.2. | Substitution sur le carbone 2' .....   | 194        |
| C.        | Conclusion du chapitre et perspectives .....                                   | 196        |
|           | <b>Conclusion générale</b> .....   | <b>199</b> |
|           | <b>Experimental Section</b> .....  | <b>207</b> |

### Tableau des abréviations

|                    |  |
|--------------------|--|
| <sup>13</sup> C    | <sup>13</sup> Carbone  |
| <sup>18</sup> FDG  | <sup>18</sup> Fluorodéoxyglucose   |
| <sup>19</sup> F    | <sup>19</sup> Fluor  |
| <sup>1</sup> H     | <sup>1</sup> Proton  |
| <sup>1</sup> H-MRS | Signal de résonance magnétique du proton   |
| AChE               | Acétylcholinestérase   |
| ASCT               | Alanine serine cysteine transporter  |
| ApcT               | Amino acid polyamine organo-cation transporter   |
| ACPA               | Amino-3-carboxy-5-methylisoxazole propionic acid                                       |
| ACHD               | 1-Aminocyclohexane-1,3-dicarboxylic acid   |
| ACPD               | 1-Aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid  |
| AcOH               | Acide acétique   |
| AMPA               | Acide α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique                               |
| AMPc               | Adénosine monophosphate cyclique   |
| APP                | Protéine précurseur du peptide amyloïde  |
| Arg                | Arginine   |
| ARNm               | Acide ribonucléique messenger  |
| ASCT               | Transporteur d'acides aminés neutres sodium-dépendant                                  |
| ATP                | Adénosine triphosphate   |
| BHE                | Barrière hémato-encéphalique   |
| BNPI               | Transporteur spécifique Na <sup>+</sup> -dépendant de phosphate inorganique du cerveau |
| BT                 | Bleu Trypan  |
| CA                 | Corne d'Ammon  |
| CE <sub>50</sub>   | Concentration excitatrice à 50 %   |
| Cellules PC12      | Lignée cellulaire d'un phéochromocytome du médullosurrénale de rat                     |
| CI <sub>50</sub>   | Concentration inhibitrice à 50 %   |
| CLC                | Canal chlorure   |
| CLHP               | Chromatographie liquide haute performance  |
| D-ASP              | D-aspartate  |
| DIDS               | Acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique                                  |
| DLT                | Dépolarisation à long terme  |
| DCM                | Dichlorométhane  |
| DMF                | <i>N,N</i> -Diméthylformamide  |
| DMSO               | Diméthylsulfoxyde  |
| EAAC               | Transporteur d'acides aminés excitateurs   |
| EAAT               | Transporteur d'acides aminés excitateurs   |
| ESI                | Electrospray   |
| EtOH               | Ethanol  |
| <i>F</i>           | Constante de Faraday   |
| GABA               | Acide gammaaminobutyrique  |
| GDH                | Glutamate déshydrogénase   |
| GLAST              | Transporteur glutamate-aspartate   |
| Gln                | Glutamine  |

|        |  |
|--------|--|
| Glu    | Glutamate  |
| GMS    | Glutamate monosodique  |
| GS     | Glutamine synthétase   |
| HAT    | Heteromeric amino acid transporter family  |
| His    | Histidine  |
| HMBC   | Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy   |
| HMQC   | Heteronuclear Single Quantum Coherence   |
| iGluRs | Ionotropic glutamate receptors   |
| KA     | Kaïnate  |
| Km     | Constante de Mickaëlis   |
| L-ASP  | L-aspartate  |
| LAT    | Large-neutral amino acid transporter   |
| LSP    | Laboratoire des Saints Pères   |
| NAPCA  | S-2-Naphthyl-ethyl-ACPA  |
| NEIH   | 5-Naphthylethyl isoxazole-4-(2,4-dinitrophenol)hydrazonedinitrophenol  |
| NPT    | Transporteur de phosphate inorganique Na <sup>+</sup> -dépendant = transporteurs Na <sup>+</sup> /Pi           |
| NMDA   | N-Methyl-D-aspartate   |
| mGluRs | Metabotropic glutamate receptors   |
| SNC    | Système nerveux central  |
| SLA    | Sclérose latérale amyotrophique  |
| PET    | Tomoscintigraphie par émission de positrons  |
| PIP2   | Phosphatidyle-inositol-2-phosphate   |
| RB     | Rose Bengale   |
| RSA    | Relation structure-activité  |
| ROS    | Reactive oxygen species  |
| SLC    | Solute carrier   |
| SNAT   | Sodium-coupled neutral amino acid transporter  |
| SSZ    | Sulphasalazine, aka 6-oxo-3-(2-[4-(N-pyridin-2-ylsulphamoyl)phenyl]diazényl)cyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid |
| SxC-   | System xC-   |
| TBAB   | Tétrabutylammonium bromide   |
| TFMIH  | bis-Trifluorométhylphényl-isoxazole-4-hydrazone  |
| VGLUT  | Vesicular transporter of glutamate   |
| VMAT   | Vesicular monoamine transporter  |
| VNUT   | The vesicular nucleotide transporter   |





# **Chapitre I**

## **Introduction générale**



# A. Le glutamate

## I. Découverte

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, le professeur de chimie de l'université impériale de Tokyo Kikunae Ikeda, très grand amateur de bonite s'était rendu compte que le goût de la soupe katsuobushi n'était pas encore scientifiquement décrit. Il entreprit alors une vaste étude et découvre en 1908 que la molécule chimique à la base du goût si particulier du bouillon était le glutamate. Plus précisément, il s'agit d'un sel de l'acide glutamique, acide aminé omniprésent dans la nature. Il étudia les propriétés gustatives du glutamate et trouva une forme très savoureuse facilement cristallisable <sup>1</sup>, le sel de sodium de l'acide glutamique (le glutamate monosodique ou GMS, E621). Il nomma le goût umami et commercialisa le produit en 1909 avec les frères Suzuki sous l'appellation AJI-NO-MOTO® (qui veut dire essence du goût). La production se faisait à partir de l'algue marine Kombu entre 1909-1962 <sup>2</sup>. Depuis les techniques de production ont évolué et actuellement la production annuelle atteint les 2 millions de tonnes.

**Kikunae Ikeda**



**Cristaux de GMS = E621**



Figure 1: Professeur Kikunae Ikeda, algue marine Kombu, Glu-Na cristallisé, 1908.

De nos jours, la production se fait par fermentation bactérienne à partir de sucre et d'ammoniac en présence de bactéries spécifiques (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*) qui consomment le sucre et rejettent le glutamate comme déchet du métabolisme <sup>2a, 3</sup>. Le produit (le glutamate) est utilisé comme additif alimentaire ou rehausseur de goût notamment dans la cuisine asiatique qui consomme, à elle seule, près de 80% de la production mondiale. En dehors de son importance en tant que additif alimentaire, le glutamate est surtout l'un des 20 acides aminés naturels protéinogéniques. Son implication en neuroscience est importante. Il constitue en effet, le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux

central (concentration cytoplasmique = 1 - 10 mM). Il est donc impliqué dans divers maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, la sclérose en plaque ou la sclérose latérale amyotrophique (SLA) <sup>4</sup>.

## II. Structure du composé

L'acide L-glutamique (Glu) fait parti des 20 acides aminés naturels présents dans l'organisme. C'est un  $\alpha$ -amino-acide qui présente deux fonctions acides carboxyliques. La fonction amine  $\text{NH}_2$  et le groupement  $\text{COOH}$  du motif  $\alpha$ -amino-acide ont des pKa respectifs de 9.47 et 2.10 ; le groupement  $\text{COOH}$  distal possède un pKa = 4.07. A pH physiologique (7.4), la molécule une charge globale négative (pHi = 3.22).

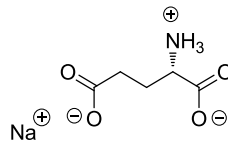


Schéma 1: Structure du L-glutaminate de sodium.

Les propriétés physico-chimiques du glutamate ne permettent pas une diffusion facile à travers les membranes cellulaires et notamment la barrière hématoencéphalique (BHE) dans le système nerveux centrale (SNC) où il constitue pourtant le principal neurotransmetteur excitateur <sup>5</sup>. Sa translocation dans les cellules, ou les compartiments, consomme de l'énergie. Elle se fait au travers de transporteurs membranaires spécialisés comme les transporteurs plasmiques du glutamate (transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs), les échangeurs cystéines/glutamate (système Xc-)), les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs). Le transport peut également se faire suivant un système assez sophistiqué nécessitant la conversion en glutamine *via* le cycle glutamate-glutamine. La glutamine sera ensuite transportée dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs plasmiques (transporteur d'alanine de serine et de cystéine (ASCT), transporteur d'acides aminés neutres dépendant du sodium (SNAT), transporteur d'acide aminé neutre à chaîne longue (LAT), etc.) puis, *in fine*, transformé en glutamate, *in situ*, à l'intérieur de la cellule.

## III. Biosynthèse du glutamate

En tant qu'acide aminé non essentiel, le glutamate est synthétisé dans l'organisme. La biosynthèse dans l'organisme peut se faire par différentes voies. Nous pouvons citer les deux principales : la voie métabolique issue de l' $\alpha$ -cétoglutarate, et le cycle glutamate-glutamine.

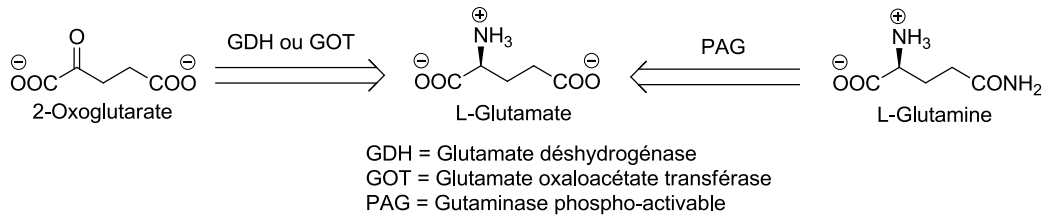


Schéma 2: Voies principales de biosynthèse du glutamate dans l'organisme.

### A partir du 2-Oxoglutarate

La formation du glutamate peut donc être effectuée à partir du 2-Oxoglutarate. Ce substrat est un métabolite important produit par réaction catabolique du glucose au cours du cycle des acides tricarboxyliques dans les mitochondries. Cette réaction est une condensation d'ion ammonium sur la fonction cétone du carbone 2 de l' $\alpha$ -cétoglutarate. Elle est catalysée par le glutamate déshydrogénase (GDH) qui assure la formation du motif  $\alpha$ -amino-acide à la fin de la réaction. L'enzyme est essentiellement présent dans les mitochondries.

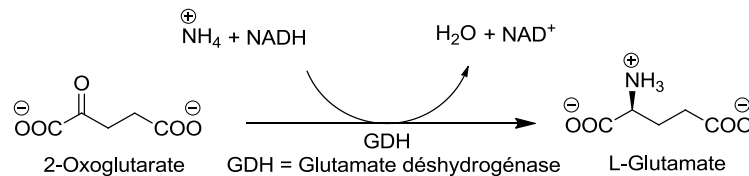


Schéma 3: Biosynthèse du glutamate par la GDH à partir de  $\alpha$ -cétoglutarate.

La biosynthèse du glutamate à partir de la 2-oxoglutarate peut également se faire à partir du glutamate oxaloacétate transaminase (GOT). Cette enzyme est présente dans le cytoplasme et les mitochondries des cellules hépatiques, rénales, dans les cellules du cerveau, les tissus musculaires du myocarde ainsi que les cellules pulmonaires. Elle est très importante dans le métabolisme des acides aminés. Dans le cerveau, l'enzyme catalyse la formation du glutamate à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate et l'aspartate.

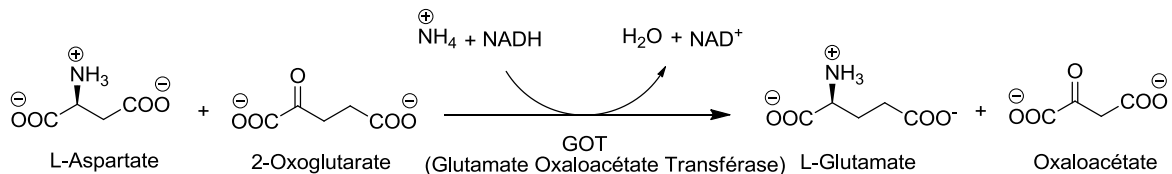


Schéma 4: Biosynthèse du glutamate par la GOT à partir de la L-aspartate.

### Cycle Glutamate/Glutamine

Il existe une autre voie métabolique dans le cerveau. En effet, la glutamine peut être transformée en glutamate lors d'un cycle biochimique appelé cycle glutamate-glutamine. La transformation biochimique est une désamination initié par la glutaminase phospho-activable (PAG),

enzyme essentiellement présente dans la membrane interne mitochondriale. Cette voie est primordiale dans le cerveau, notamment au niveau des neurones glutamatergique et gabaergique. Elle garantit le renouvellement du stock de neurotransmetteur (glutamate, GABA).

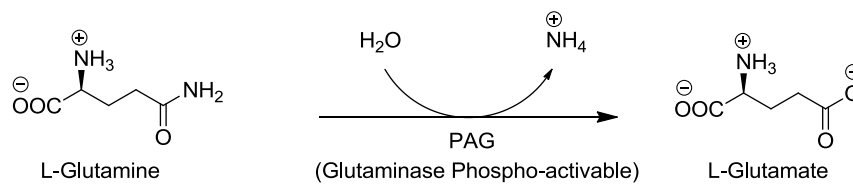


Schéma 5: Biosynthèse du glutamate par la PAG à partir de la glutamine.

La régulation de la biosynthèse est assurée par des enzymes hautement spécialisées (GDH, GOT et PAG). Dans le cerveau, où le glutamate représente le principal neurotransmetteur excitateurs, le maintien du stock est essentiellement contrôlé par la glutaminase phospho-activable (PAG). Cette enzyme initie le cycle glutamate-glutamine. En synergie avec les transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs), elle contrôle finement la quantité de glutamate extracellulaire.

#### IV. Quelques fonctions biochimiques du glutamate

Le glutamate joue un rôle ubiquitaire très important dans le maintien des fonctions biologiques cellulaires. En effet, il intervient dans divers fonctions métaboliques et de communications. En particulier, son implication dans la biogenèse des protéines, le transport de l'ammoniac, le maintien du pH sanguin, la production d'énergie, la neurotransmission, a été clairement établie.

Les biomolécules contenant les groupements amines, et notamment les acides aminés, subissent des oxydations permanentes dans l'organisme. La désamination oxydative d'un acide aminé conduit à la formation d'ammoniac toxique pour l'organisme, par conséquent, il est couplé au glutamate *via* le cycle glutamate-glutamine. La glutamine assure le transport de l'ammoniac. L'ammoniac est ensuite éliminé sous forme de chlorure d'ammonium au niveau du rein (ammoniogenèse) ou transformé en urée au niveau du foie (uréogenèse hépatique) <sup>6</sup>.

La dégradation oxydative du glutamate conduit à la formation de la 2-oxoglutarate, transformée ensuite en oxaloacétate. Cette voie de dégradation du glutamate est à la fois impliquée dans la production d'énergie *via* le cycle de Krebs mais également dans la gluconéogenèse. Elle produirait environ 25% du stock de glucose dans l'organisme <sup>7</sup>.

Le glutamate possède d'autres fonctions biochimiques et notamment la stimulation des cellules  $\beta$  de Langerhans (production d'insuline) <sup>8</sup>, la prolifération des lymphocytes T, la

différenciation des lymphocytes B, la phagocytose des macrophages <sup>9</sup>, la formation de glutathion, etc. <sup>9a</sup>.

Enfin, le glutamate joue un rôle capital dans la neurotransmission. En effet, il représente le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central utilisé par environ 40% des neurones dans l'organisme. Il est également le précurseur de l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA), neurotransmetteur inhibiteur important du système nerveux central.

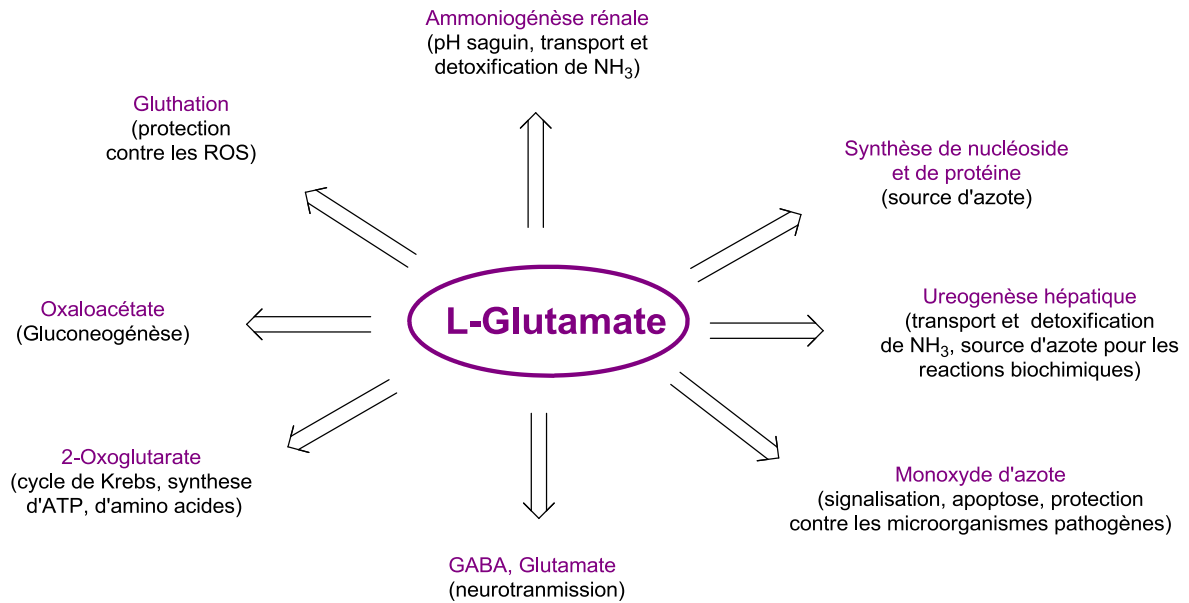


Schéma 6: Liste non-exhaustive des fonctions biochimiques du L-glutamate.

## B. La neurotransmission glutamatergique

### Introduction

La neurotransmission glutamatergique se répartit en différentes étapes successives. L'arrivée d'un influx nerveux provoque la décharge calcique par ouverture des canaux VOC (Voltage Operated Channels) suivie de la mobilisation et la fusion des vésicules chargées en neurotransmetteur avec la membrane présynaptique. Le glutamate est ensuite libéré par quanta dans la fente synaptique où il active ses récepteurs post-synaptiques ionotropiques iGluRs (NMDAR, AMPAR, KaR) et métabotropiques (mGluRs1-8) provoquant *in fine* la réponse post-synaptique adaptée <sup>10</sup>. Dans la fente synaptique, l'intensité du signal est contrôlée par les transporteurs plasmiques d'acides aminés excitateurs (EAATs1-5) qui permettent la recapture du glutamate dans les astrocytes. Le glutamate est ensuite transformé en glutamine afin d'être transporté dans les neurones *via* des transporteurs spécialisés (ASCTs, SNATs). Une fois reconvertit en glutamate, la reconstitution du stock vésiculaire est assurée par les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 2 : Les étapes de la neurotransmission glutamatergique 11. (a) : remplissage des vésicules via les VGLUTs; (b) amarrage (amorçage) des vésicules ; (c) : fusion des vésicules ; (d) : rélargage du Glu par les cellules gliales ; (e) : activation des mGluRs post-synaptiques ; (f) protéines de signalisation ; (g) : activation des AMPA ; (h , i): activation des NMDA ; (j) : recapture du Glu par les EAATs, (k) : modulation de la quantité de Glu dans les vésicules par les mGluRs présynaptiques ; Glu : glutamate, Gln : glutamine ; VGLUT : Vesicular GLutamate Transporters; SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor; AMPA :  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; NMDA : N-methyl-D-aspartate ; mGluR : metabotropic glutamate receptor; BDNF : Brain-derived neurotropic factor.

## V. Les acteurs clés de la synapse glutamatergique

La neurotransmission glutamatergique, comme toute synapse chimique, nécessite des protéines clés impliquées dans le transport et la reconnaissance du neurotransmetteur. Ces protéines interviennent à différents niveaux. Dans la synapse glutamatergique, on distingue notamment les iGluRs, mGluRs, les EAATs, les VGLUTs, etc.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 3: Acteurs clés de la synapse glutamatergique (les récepteurs iGluRs et mGluRs, les transporteurs EAATs et VGLUTs).

Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler les rôles, les localisations, les propriétés bioénergétiques, et les pharmacologies des récepteurs et transporteurs impliqués dans la neurotransmission glutamatergique.

## V.1. Les récepteurs du glutamate

Les récepteurs du glutamate sont des protéines transmembranaires qui peuvent être pré et/ou post-synaptiques. En fonction de leurs propriétés structurales, de la modalité de transduction du signal ou de leurs profils pharmacologiques, ces protéines sont classées en deux grandes catégories à savoir les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Le schéma ci-dessous représente l'ensemble des récepteurs du glutamate avec les différents types, sous-types ainsi que les voies impliquées dans la transduction du signal (canaux ioniques ou récepteurs couplés aux protéines G).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 4: Arbre d'homologie et voies de signalisation des récepteurs du glutamate <sup>12</sup> : NR = Sous-unités des récepteurs NMDA ; GluR, KA = sous-unités des récepteurs AMPA ou Kainate ; Gq, G11, Gi, Go = sont des protéines G ; PLC = Phospholipase C ; AC = Adénylate Cyclase

### V.1.1. Récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont des protéines de type canaux cationiques activés par le glutamate et perméables aux ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Ils sont répartis en trois groupes : les récepteurs NMDA (NMDAR, EC50 ≈ 1 μM), les récepteurs AMPA (AMPA, EC50 ≈ 100 μM) et les récepteurs Kainates (KaR) <sup>13</sup>. Leur nomenclature fut effectuée en fonction de l'agoniste sélectif préférentiel qui active le récepteur. Ainsi les NMDAR sont inhibés par la N-méthyl-D-aspartate (NMDA), les AMPAR par l'α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoazol-4-propionate (AMPA), et les KaR par l'ion kainate (Ka).

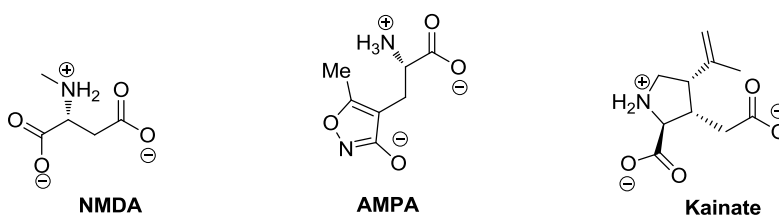


Schéma 7: Agonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate.



D'un point de vue structural, ces récepteurs sont formés de quatre sous-unités protéiques, chaque sous-unité contenant plusieurs variantes. Ces sous-unités s'assemblent au niveau de la membrane pour former un canal cationique. La liaison du ligand se fait sur la partie C-terminale extracellulaire de la protéine. L'apposition de la boucle S1 liée au domaine transmembranaire TM1 et de la boucle S2 liée au domaine transmembranaire TM3 et TM4, forme une poche dans laquelle se fixera le substrat naturel. La liaison du ligand provoque la fermeture de la poche et «tire» sur les segments transmembranaires immédiatement liés (TM1, TM3 et TM4) induisant l'ouverture du canal et l'entrée d'ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ .

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 5: Structure schématique des iGluRs. Ils présentent 4 domaines transmembranaires (TM1, TM2, TM3, TM4). La poche entre les boucles S1 et S2 permet la fixation du glutamate.

Du point de vue pharmacologique, l'affinité pour le substrat naturel, la cinétique d'activation et la durée la réponse est variable en fonction du type de récepteur et de la nature des sous-unités protéiques (variantes d'épissage ou d'édition de la même sous-unité). Néanmoins dans la neurotransmission du glutamate nous pouvons répartir les récepteurs iGluRs en deux catégories selon leur cinétique d'activation: la réponse rapide est assurée par les récepteurs AMPA/Ka et la réponse plus tardive, par les récepteurs NMDA.

### Les récepteurs AMPA et Kainate

#### a. Récepteurs AMPA(AMPA)

Ces récepteurs sont des tétramères (homo ou hétérotétramères) formés par l'assemblage de deux homodimères. Les 4 sous-unités sont codées par des gènes différents (GluA1-4 anciennement connus sous l'appellation GluR1-4). Les quatre protomères forment un canal cationique perméable notamment aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et souvent aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant de la nature des sous-unités. Les AMPAR sont généralement localisés au niveau des densités post-synaptiques excitatrices. Ils ont une cinétique d'activation rapide (< à la milliseconde) et représentent les premiers récepteurs activés lors de la libération du glutamate dans la fente synaptique. L'activation du récepteur provoque une

dépolarisation rapide du neurone post-synaptique (intégration rapide de l'information) caractérisée par une entrée massive de cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . La faible affinité de ces transporteurs pour le glutamate ( $\text{EC}_{50} \approx 100 \mu\text{M}$ ) permet une intégration rapide de l'information lors de la libération des pulses relativement rapides (intégration de quanta de glutamate séparé par 10 millisecondes, <sup>14</sup>).

Du point de vue structurale, la perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  est contrôlée par la sous-unité GluR2. Les AMPAR contenant la protéine GluR2 sont imperméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La particularité de cette sous-unité provient de la transformation d'une glutamine en arginine au niveau de la boucle transmembranaire TM2 lors de la modification post-transcriptionnelle des ARNm par édition (désamination d'une adénosine en inosine dans l'ARNm).

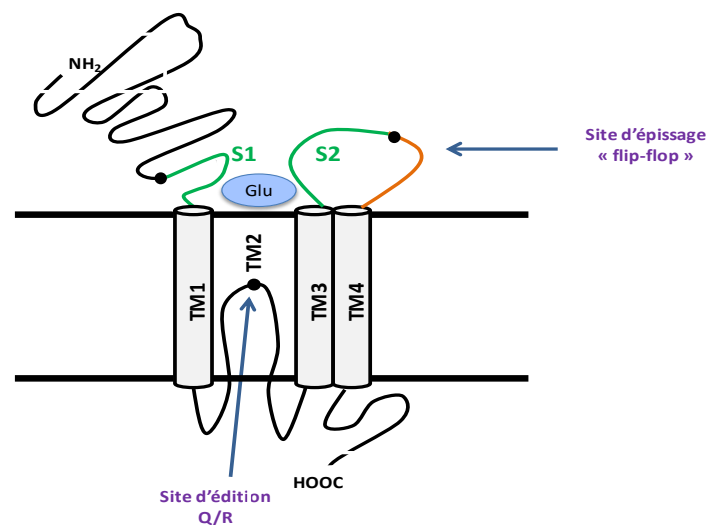


Figure 6: Domaines protéiques des récepteurs AMPA. Le site Q/R d'édition au niveau de la boucle TM2 permet la transformation de la glutamine en arginine. Le site d'épissage au niveau de la boucle S2 permet l'obtention de variantes des sous-unités. La poche entre la boucle S1 et S2 permet la fixation du glutamate.

Les AMPAR sont distribués dans différentes régions du cerveau. Notamment, certaines études ont montré que, dans l'amygdale et l'hippocampe, les isoformes d'AMPA riches en GluR2 étaient situées au niveau des neurones pyramidaux, tandis que les isoformes ne contenant pas de GluR2 sont plutôt présentes dans les interneurons inhibiteurs. Les AMPAR ont une cinétique d'inactivation rapide. Une exposition prolongée de ces récepteurs au glutamate provoque une désensibilisation se traduisant par l'arrêt de la dépolarisation au niveau du neurone post-synaptique (désensibilisation au bout de 10 millisecondes d'exposition). L'arrêt de l'intégration du potentiel post-synaptique excitateur permet d'éviter la surexcitation et minimiser d'éventuelles dégâts que pourrait provoquer une forte concentration du glutamate.

### *b. Récepteurs Kainate (KaR)*

Les récepteurs Kainate présentent beaucoup de similitudes avec les récepteurs AMPA. Ce sont des canaux ioniques perméables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , et souvent  $\text{Ca}^{2+}$  formés par l'autoassemblage de 4 sous-unités en oligomères hétéro- ou homotétramériques. Leur localisation est à la fois pré- et post-synaptique. Les protomères sont codés par 5 gènes différents conduisant à deux familles de sous-unité (GluR5-7 et KA1, KA2). La combinaison de KA1 et KA2 ne conduit pas à la formation de récepteur fonctionnel. Ces sous-unités n'ont pas de variante d'épissage ou d'édition lors de la maturation de l'ARNm. Les sous-unités GluR5-7 possèdent des variantes d'épissage et d'édition (perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$ ). Elles peuvent former des combinaisons homologues entre elles ou hétérologues avec KA1 et KA2. L'activation du récepteur par le glutamate provoque une dépolarisation grâce à l'entrée d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . La réponse physiologique est une diminution de la libération du neurotransmetteur suggérant par conséquent un rôle modulateur des récepteurs Kainate. L'importance de ces récepteurs doit cependant être clairement étudiée pour mieux comprendre leurs implications physiologiques dans la neurotransmission.

### **Les récepteurs NMDA (NMDAR)**

Les NMDAR sont des hétérotétramères formés très souvent de deux homodimères localisés généralement au niveau des synapses excitatrices. Les 4 sous-unités ont une organisation structurale proche des AMPAR. On distingue 3 domaines transmembranaires complétés par un quatrième partiellement transmembranaire mais néanmoins très important dans la création du canal ionique. Les protomères impliquées dans la formation des NMDAR sont codés par 7 gènes (NR1, NR2A-D, NR3A, NR3B). La sous-unité NR1 est codée par un seul gène. Elle possède néanmoins une dizaine de variantes d'épissage. Les sous-unités NR2 sont codées par 4 gènes (NR2A-D); NR2A ne possède pas de variante d'épissage contrairement aux trois autres sous-unités NR2B-D. Les récepteurs NMDAR sont généralement formés par l'association de deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2. Les autres combinaisons restent rares et sont peu ou pas fonctionnelles. Ainsi, la combinaison NR1/NR2/NR3 limite fortement la perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , tandis que les associations NR1/NR3, NR2/NR3 ne donnent pas de récepteurs fonctionnels. La liaison du substrat naturel se fait comme chez les AMPAR dans la poche formée par les boucles S1 et S2. L'activation du récepteur nécessite la liaison de deux co-agonistes (2 glycines ou 2 D-serines et 2 glutamates) La fixation du glutamate se fait sur les sous-unités NR2 tandis que la glycine se lie aux sous-unités NR2.

La cinétique d'activation des NMDAR est plus lente que celle des récepteurs AMPA/Ka. Le canal ionique est bloqué par les ions  $\text{Mg}^{2+}$  lorsque le neurone post-synaptique est au potentiel de repos. La levée d'inhibition se faisant à potentiel membranaire positif nécessite un temps de latence

plus long, responsable de la réponse tardive de ces récepteurs. L'ouverture du canal permet par la suite une entrée massive d'ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la réponse physiologique.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 7: Cinétique d'inactivation des récepteurs AMPA et NMDA.

Les NMDAR ont également une cinétique d'inactivation plus lente liée à leur affinité pour le glutamate ( $\text{EC}_{50} \approx 1 \mu\text{M}$ ). L'inactivation tardive de ces récepteurs est responsable de la potentialisation à long terme impliquée dans la plasticité neuronale nécessaire aux processus d'apprentissage et de mémorisation.

#### **V.1.2. Récepteurs métabotropiques**

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) ont été découverts au début des années 1980 lorsque Sladeczek *et coll.* se sont aperçus que la traduction du signal glutamatergique pouvait se faire par de nouveaux récepteurs capables d'activer la phospholipase C<sup>15</sup>. Par la suite, il a été montré que ces récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG) de la classe C. Ces protéines sont codées par 8 gènes différents avec des variantes d'épissage possibles (mGluR1-8). Leur nom a été attribué en fonction de l'ordre de leur découverte, et non de leur homologie de séquence. Elles sont composées d'une grande partie extracellulaire *N*-terminale (500 – 600 résidus), de sept domaines transmembranaires et d'une partie *C*-terminale intracellulaire importante dans la régulation de l'activité de la protéine. La liaison du ligand naturel se fait sur la partie *N*-terminale extracellulaire au niveau d'une région dont la séquence est bien conservée au cours de l'évolution (domaine Venus Flytrap (VFT)). La fixation du ligand au domaine VFT provoque un changement conformationnel dans les boucles extracellulaires. Ce signal est transmis à l'intérieur de la cellule au travers des sous-unités transmembranaires heptahélicoïdales. Le résultat est un changement conformationnel de la partie *C*-terminale intracellulaire provoquant la dissociation de la protéine G hétérotrimérique avec libération de protéines Gq et Gi/G0, qui activent les effecteurs secondaires.

Figure 8: Structure schématique des récepteurs métabotropiques du glutamate.

Selon leur identité de séquence primaire et le mode de la transduction du signal ces récepteurs sont classés en trois sous-groupes. Les récepteurs ayant 70% d'homologie de séquence primaire (ou plus) sont regroupés dans la même catégorie.

Le sous-groupe I regroupe les récepteurs mGluR1 et mGluR5. Ces récepteurs ont une grande affinité pour le glutamate (0.3  $\mu\text{M}$  et 0.8  $\mu\text{M}$ ). Ils sont situés sur les synapses glutamatergiques et gabaergiques au niveau des neurones post-synaptiques. Leur localisation est abondante dans le cerveau, notamment dans l'hippocampe et le cervelet. Ces récepteurs sont couplés à la phospholipase C (PLC) *via* la protéine Gq. La protéine lipophile membranaire PLC induit ensuite l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bi phosphate (PIP2) en inositol 1, 4,5 triphosphate (IP3) et en diacyl-glycérol (DAG). Les messagers secondaires IP3 et DAG sont responsables de la transduction du signal dans la cellule (libération d'ion  $\text{Ca}^{2+}$ , activation de la calmoduline, activation de la kinase PKC, etc.) La réponse physiologique est une faible dépolarisation se traduisant par l'augmentation de l'excitabilité neuronale.

Le sous-groupe II regroupe les récepteurs mGluR2 et mGluR3. Ces récepteurs ont également une bonne affinité pour le glutamate (0.04  $\mu\text{M}$  et 1.3-4  $\mu\text{M}$  respectivement pour mGluR3 et mGluR2). Ils sont préférentiellement localisés sur les axones, les terminaisons axonales des neurones présynaptiques et les cellules gliales dans les synapses glutamatergiques et gabaergiques. Ces récepteurs sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) *via* le dimère Gi/GO. L'adénylate cyclase est une enzyme transmembranaire impliquée dans la formation d'AMP-cyclique (AMPc), un messager secondaire. L'activation des récepteurs permet l'inactivation de l'adénylate cyclase conduisant à la diminution de la production d'AMPc. La réponse physiologique est une hyperpolarisation conduisant à la modulation de quantité de neurotransmetteur libérée par le neurone présynaptique.

Le sous-groupe III regroupe les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Ils possèdent une distribution semblable aux récepteurs du sous-groupe II à l'exception de mGluR6 qui se trouve majoritairement dans la rétine. Tout comme le groupe II, ils agissent comme auto- ou hétérorécepteurs dans la modulation de signaux glutamatergiques et gabaergiques.

Les récepteurs métabotropiques sont des hétérodimères. L'assemblage des oligomères se fait par interaction hydrophobe ou par établissement de pont disulfure entre les oligomères. La liaison d'une molécule de glutamate induit une activation partielle. L'activation complète du

récepteur nécessite la liaison simultanée de deux glutamates afin d'obtenir la réponse physiologique attendue.

## V.2. Les transporteurs du glutamate

Dans la neurotransmission glutamatergique, on distingue deux catégories de transporteurs : les transporteurs plasmiques du glutamate et les transporteurs vésiculaires du glutamate. Les deux catégories sont des transporteurs secondaires utilisant par conséquent les gradients électrochimiques générés par des pompes indépendantes :

- ✓ Les transporteurs plasmiques du glutamate permettent de contrôler très généralement la clairance extracellulaire du neurotransmetteur (EAATs notamment). Ils utilisent le gradient de sodium généré par la pompe sodium-potassium (pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase).
- ✓ Les transporteurs vésiculaires du glutamate permettent l'accumulation du neurotransmetteur dans les vésicules présynaptiques (VGLUTs). Ils utilisent le gradient électrochimique chimique de proton généré par l'ATPase vacuolaire (V-ATPase).

Dans les paragraphes ci-dessous nous allons donner quelques détails concernant la structure, les propriétés bioénergétiques, la pharmacologie ainsi que l'importance de ces transporteurs dans la neurotransmission glutamatergique.

### **V.2.1. Les transporteurs plasmiques du glutamate.**

#### **Les transporteurs d'acides aminés excitateurs, EAATs**

Parmi les transporteurs importants dans la neurotransmission glutamatergique, nous distinguons les transporteurs d'acide aminé excitateur (EAATs). Ces protéines sont des biomarqueurs des synapses excitatrices transportant les acides aminés excitateurs (D-Asp, L-Asp, L-Glu). Ces transporteurs présentent une très grande affinité pour le glutamate ( $K_m = 1-10 \mu\text{M}$ ) par comparaison aux transporteurs vésiculaires ( $K_m = 1-2 \text{ mM}$ ). Lors de la neurotransmission glutamatergique, les EAATs contrôlent l'intensité, la durée et la portée du signal en maintenant une concentration extracellulaire micromolaire du glutamate ( $10^5 \times [\text{Glu}]_{\text{extra}} < [\text{Glu}]_{\text{intra}}$ ). Par cette action ces transporteurs protègent les cellules contre la surexcitation responsable de la neurotoxicité qui est source de troubles neurologiques.

#### *a. Distributions et fonctions des EAATs :*

Les EAATs font partie de la famille des SLC1 (Soluté Carrier 1). Ils ont une distribution ubiquitaire dans le cerveau. On distingue 5 sous-types (EAAT1-5). Les trois premiers sous-types EAAT1-3 ont été découverts en 1992 (EAAT1/GLAST et EAAT2/GLT-1 dans le cerveau de rat <sup>16</sup>, EAAT3/EAAC1 dans l'intestin de lapin <sup>17</sup>). Les sous-types 4 et 5 furent découverts tardivement dans le cerveau humain en 1995 et 1997 <sup>18</sup>.

Les sous-types 1 et 2, préférentiellement exprimés sur les astrocytes péri- et extra-synaptiques de synapses excitatrices, sont très abondants dans le cerveau. Le sous type 1 est prédominant au cours du développement du cerveau tandis que le sous-type 2 est plus abondant dans le cerveau adulte. Les deux transporteurs, et en particulier le sous-type 2, sont responsables de la recapture de plus de 90% du glutamate extracellulaire dans les astrocytes environnants.

Le sous-type 3 est exprimé préférentiellement dans les compartiments dendrito-somatiques des neurones post-synaptiques. Ce transporteur présente une densité cérébrale bien inférieure aux sous-types 1 et 2 avec environ 130 EAAT3 par synapse dans l'hippocampe <sup>19</sup>. Il est localisé majoritairement dans l'hippocampe, le cervelet et les ganglions de la base. Ce sous-type est très important dans le contrôle du signal glutamatergique et la protection des neurones. Underhill et coll. ont récemment démontré l'effet psychotrope de l'amphétamine dans les neurones dopaminergiques de l'hippocampe <sup>20</sup>. Le psychostimulant diminue la clairance du glutamate par internalisation des EAAT3/EAAC1 exacerbant par conséquent l'effet du signal excitateur. Lors de la neurotransmission glutamatergique, EAAT3 agirait comme un tampon dans le contrôle de la clairance du glutamate, la distribution extracellulaire et le turnover des récepteurs ionotropiques AMPA <sup>20-21</sup>. Le transporteur peut également être co-localisé avec le récepteur métabotrope mGlu5 sur la membrane extra- et



intracellulaire des neurones post-synaptiques <sup>22</sup>. Dans cette configuration, il intervient dans l'activation du récepteur mGlu5 par translocation du glutamate dans le neurone post-synaptique. La transduction du signal induit par l'activation de mGlu5 est importante dans la plasticité neuronale notamment au niveau de l'hippocampe <sup>23</sup>. Enfin, EAAT3/EAAC1 est également impliqué dans la protection neuronale *via* la recapture de la cystéine, résidu utilisé pour la synthèse de glutathion (protection contre les espèces réactives de l'oxygène) et le maintien du potentiel réducteur du cytosol <sup>24</sup>.

Les sous-types 4 et 5 sont préférentiellement exprimés sur les neurones post-synaptiques, le sous-type 4 sur les cellules cérébelleux gabaergiques de Purkinje et le sous-type 5 au niveau des terminaisons glutamatergiques des cônes et bâtonnet dans la rétine <sup>18,25</sup>.

#### *b. Propriétés bioénergétiques des EAATs*

Les EAATs sont des protéines transmembranaires existant très souvent sous forme d'homotimères <sup>26</sup>. La forme trimérique est structurellement essentielle pour l'expression et la stabilité du transporteur. Cependant, les trois protomères fonctionnent de manière indépendante <sup>27</sup>. La structure cristallographique montre que la protéine est composée d'un domaine de transport permettant la translocation du substrat et d'un domaine de trimérisation permettant l'encrage dans la membrane et l'assemblage des trois sous-unités par l'intermédiaire d'interactions faibles <sup>26c</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 9: Structure tridimensionnelle d'un protomère des transporteurs EAATs (vue de côté), domaine de trimérisation en vert, domaine de transport en rouge.

Les EAATs utilisent le gradient de sodium comme force motrice afin de transporter le glutamate dans les cellules contre son gradient de concentration. La translocation d'une molécule de glutamate nécessite le symport de 3 Na<sup>+</sup> avec un H<sup>+</sup> transporté à l'intérieur de la cellule tandis qu'un K<sup>+</sup> serait expulsé vers l'extérieur <sup>28</sup>. Dans le processus de transport, la liaison des 3 Na<sup>+</sup>, du glutamate et du H<sup>+</sup> se fait par allostérie positive. Dans le mécanisme, la fixation des 3 ions Na<sup>+</sup> sur la conformation « ouverte » du transporteur est hautement énergétique. Elle provoque des changements conformationnels au niveau du domaine de transport facilitant la fixation du glutamate

et sa translocation dans le cytosol. De la même manière, dans le cytosol, la liaison du  $K^+$  sur la conformation « fermée » permet la retranslocation du domaine de transport.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 10: Mécanisme de transport du glutamate par les EAATs. La fixation de 2  $Na^+$  et un  $H^+$  à la forme «apo, ouverte sur le cytoplasme» provoque un changement conformationnel induisant la fixation du glutamate <sup>29</sup>. La fixation du troisième  $Na^+$  provoque la fermeture et la translocation du domaine HP2 de  $\approx 18 \text{ \AA}$ . Cela permet l'ouverture du domaine HP1 et la libération du Glu, 3  $Na^+$  et  $H^+$  dans le cytosol (<sup>30</sup>, mais voir plutôt <sup>26c</sup>).

Hormis leur rôle dans le transport du glutamate, les EAATs présentent également une conductance à l'ion chlorure (double rôle de transporteur et canal ionique). En fonction de l'efficacité de transport du glutamate et l'ampleur du courant des ions chlorures lors de la translocation, on répartit les EAATs en deux groupes : le premier groupe transporte efficacement le glutamate avec une faible conductance aux ions chlorures (EAAT1-3) tandis que le second groupe transporte peu de glutamate avec une forte conductance aux ions chlorures (EAAT4 et 5). La conductance des EAATs aux ions chlorures jouerait un rôle important dans la régulation de la transmission synaptique <sup>31</sup> et dans la régulation de la concentration des ions  $Cl^-$  dans les cellules gliales, notamment en modulant la neurotransmission des voies synapses inhibitrices <sup>32</sup>.

### *c. Pharmacologie des EAATs*

Comme indiqué précédemment, les EAATs sont impliqués dans le contrôle de l'intensité, la durée et la portée du signal dans la neurotransmission glutamatergique. Ces transporteurs sont donc très importants dans la protection des cellules contre l'excitotoxicité du glutamate. Cela a conduit de nombreuses équipes à travailler sur la conception d'outils pharmacologiques affins et sélectifs permettant de moduler l'activité des EAATs. Comme dans toutes régulations de fonctions biologiques, le problème majeur des composés impliqués dans la régulation du système glutamatergique *via* les EAATs reste les effets secondaires dus à l'importance et à la distribution ubiquitaire des neurones glutamatergiques. D'autre part, la conservation du domaine de transport

pose le problème pour avoir de la sélectivité <sup>26c</sup>. Les ligands des EAATs sont pour la plupart, des dérivés d' $\alpha$ -acides aminés et notamment les molécules dérivées du glutamate et l'aspartate. Ce sont très souvent des ligands allostériques ou des molécules modifiant l'expression des gènes.

### **i. Modulateurs allostériques**

Suivant leurs modes d'inhibition, les modulateurs des EAATs peuvent être classés globalement en deux groupes : les ligands inhibant la translocation de l'agoniste naturel en bloquant ou modifiant le site de fixation du glutamate/aspartate et les ligands modulant la recapture par translocation dans la cellule (inhibition par compétition). La recherche d'inhibiteurs affins et sélectifs a conduit au développement de plusieurs classes de molécules parmi lesquelles on notera les analogues 3- et 4-substitués du glutamate, les analogues  $\beta$ -substitués de l'aspartate, les dérivés de la pyrrolidine dicarboxylique (PDC) et les analogues 2-(carboxycyclopropyl)- et 2-(carboxycyclobutyl)-glycine. Dans les analogues dérivés des acides aminés (Glu et Asp), la distance entre les deux groupements COOH semble jouée un rôle important dans l'activité de la molécule. Elle ne dépasse pas 3 carbones en général. Dans le cas contraire on observe une baisse d'affinité de l'inhibiteur (cf. Schéma 8).

Les ligands kainate (KA), dihydrokainate (DHK) et DL- $\beta$ -thréo-hydroxyaspartate ( $\beta$ -THA) font partie des premiers inhibiteurs développés dans la pharmacologie des modulateurs des EAATs. KA et DHK sont des analogues structuraux dérivés du glutamate. Ils ont une affinité faible pour le transporteur mais présentent l'avantage d'être sélectifs sur le sous-type EAAT2. La  $\beta$ -THA est un composé non sélectif. Elle lie les sous-types EAAT1-4 de manière compétitive ainsi que le sous-type EAAT5 de manière non-compétitive. Ce composé a néanmoins servi de modèle de base pour le développement d'autres ligands présentant de bonnes activités biologiques parmi lesquels on peut citer notamment la L- $\beta$ -TBOA et la TFB-TBOA. Ces inhibiteurs présentent une bonne affinité avec une sélectivité 10 à 15 fois meilleure sur les sous-types 1 et 2 par rapport au sous-type 3. Un autre dérivé de l'aspartate, substitué sur le groupement amine, le WAY-213613 est 50 fois plus sélectif vis-à-vis du sous-type 2 par rapport aux sous-types 1 et 3. Un analogue sélectif d'EAAT3 a également pu être développé à partir de la L- $\beta$ -TBOA en substituant l'aspartate sur le carbone C3 par un groupement benzyle (I- $\beta$ -BA). Ce composé est 10 fois sélectif pour le sous-type 3 par rapport aux sous-types 1 et 2 (Schéma 8 ci-dessous).

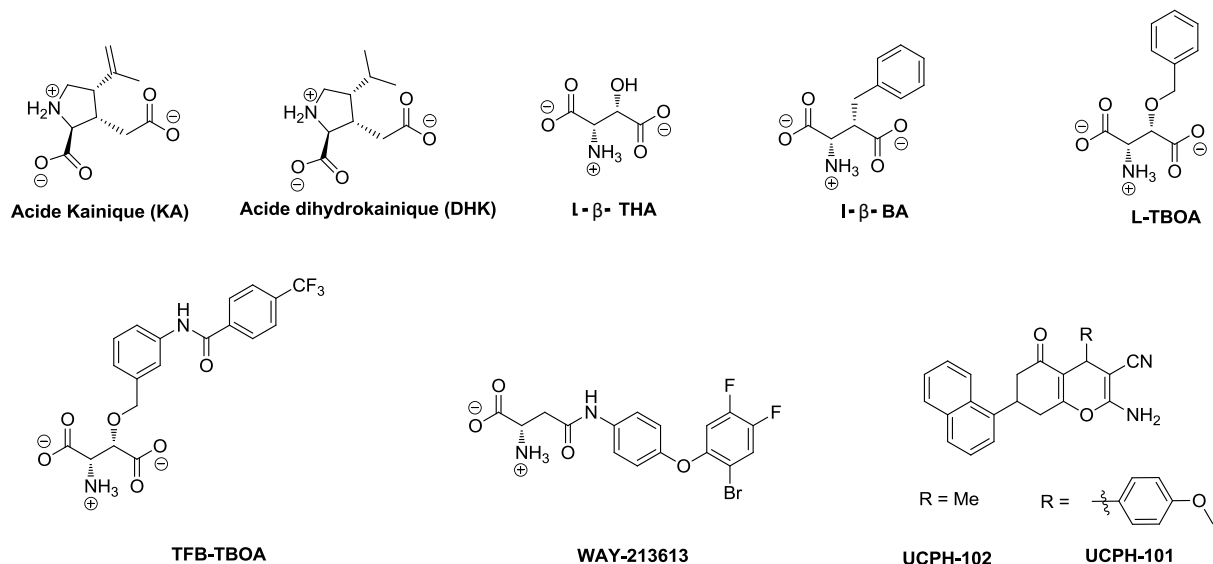


Schéma 8: Exemple de modulateurs allostériques des EAATs.

Jensen *et coll.* et Erichsen *et coll.* ont travaillé sur de nouvelles structures pour la recherche d'analogues sélectifs du sous-type 1. Leurs recherches ont permis la conception des composés polyaromatiques UCPH-101 et notamment UCPH-102 qui traverse la BHE. Les deux ligands présentent de bonnes affinités pour le transporteur EAAT1 (0.7  $\mu\text{M}$  pour la molécule UCPH-101 et 0.4  $\mu\text{M}$  pour UCPH-102)<sup>33</sup>. Les deux inhibiteurs allostériques ont été brevetés et sont actuellement commercialisés par la société « Hugin NeuroChemicals » comme inhibiteurs sélectifs de EAAT1.

## ii. Activateurs des EAATs

Les activateurs des EAATs sont, pour la plupart, des ligands augmentant l'expression des gènes en agissant très souvent soit sur la production des transcrits primaires soit sur la traduction des ARNm matures. Les antibiotiques comme la ceftriaxone augmentent la recapture glutamatergique en stimulant l'expression des gènes des EAAT2/GLT1 *via* la stimulation de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa\text{B}$  par dégradation protéasomique de la protéine inhibitrice I $\kappa\text{B}$ <sup>34</sup>. De la même manière le ligand LDN/OSU-0212320 active l'expression du transporteur EAAT2 en facilitant la traduction de l'ARNm *via* un mécanisme impliquant la phosphorylation du facteur de transcription YB-1 par la protéine kinase C<sup>35</sup>. D'autres ligands comme les analogues GF-109-203X et H89 améliorent l'expression du sous-type EAAT1 en inhibant la voie de la protéine kinase A<sup>36</sup>, tandis que l'acide valproïque augmente l'expression des gènes du transporteur EAAT3 en inhibant les histones déacétylases (HDACs) nécessaires à la formation des nucléosomes importants dans la compaction de l'ADN<sup>37</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 11: Activateurs des EAATs et mécanisme d'action du LDN/OSU-0212320, de la ceftriaxone et de l'acide valproïque <sup>26c</sup>.

D'autres analogues comme le Rubizole ou la Parawixin 1 agissent directement sur le transporteur d'acides aminés en améliorant le transport du substrat par allostérie positive. Ces composés restent cependant assez rares. Le développement d'analogues structuraux du Rubizole et de la Parawixin 1 permettra de pallier à ce problème et d'améliorer la pharmacologie des activateurs directs des EAATs.

#### Échangeurs cystéine/glutamate, système Xc-

Les échangeurs cystéine/glutamate aussi appelés système Xc- sont des antiports d'acides aminés qui permettent l'échange d'une molécule de L-cystéine contre une molécule de glutamate. Ces transporteurs ont été caractérisés pour la première fois en 1980 par Bannai et Kitamura dans les fibroblastes de poumons humains <sup>38</sup>. Ce sont des hétérodimères composés d'une chaîne lourde N-glycosylée d'environ 80 kDa de la famille des SCL3 (SLC3A2, 4F2hc) et d'une chaîne légère non glycosylée d'environ 40 kDa de la famille des SLC7 (SLC7A11, xCT). La chaîne lourde 4F2hc est responsable du transport et de l'adressage de la chaîne légère xCT <sup>39</sup>. La sous-unité xCT partage une homologie structurale avec la chaîne légère des transporteurs hétérodimères d'acide aminé HATs <sup>40</sup>. Elle présente 12 domaines transmembranaires composés d'hélices  $\alpha$  organisées de façon inversée-répétée semblable à celle présente dans la structure du transporteur de la leucine LeuT des bactéries. La sous-unité xCT est assemblée à la chaîne lourde 4F2hc par des ponts disulfures <sup>41</sup>. Elle représente la partie fonctionnelle de la protéine, contient le domaine de transport et peut fonctionner sans la chaîne lourde <sup>42</sup>. Le schéma ci-dessous représente le modèle d'homologie de la chaîne légère xCT obtenu par comparaison avec la séquence primaire des transporteurs d'acides aminés de polyamines et de cations organiques (ApCT) cristallisés à partir du thermophile *Methanocaldococcus jannaschii*. La protéine (ApCT) est cristallisée sous sa conformation «ouverte» du côté intracellulaire. La sphère blanche au centre représente un substrat hypothétique <sup>43</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 12: Modèle d'homologie de xCT construit en comparant la séquence primaire de xCT humain avec la structure de ApcT<sup>44</sup> (Structure de ApcT en blanc ; Structure de xCT : 12 domaines transmembranaires avec DT1 = rose pâle, DT2 = rose foncée, DT3 = bleu vif, DT4 = pourpre claire, DT5 = bleu canard, DT6 = vert foncé, DT7 = vert olive, DT8 = vert claire, , DT9 = jaune, , DT10 = or, DT11 = orange, , DT12 = rouge. La sphère jaune (en haut à gauche) représente la Cys158 responsable de la liaison avec la chaîne lourde 4F2hc par formation de pont disulfure. Les domaines C- et N-terminaux sont représentés respectivement par la sphère rouge et rose-pâle<sup>44</sup>.

*a. Distribution, propriétés bioénergétiques et fonctions dans le SNC de Xc-*

Le système Xc- a été caractérisé dans plusieurs types cellulaires. Dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP), ils ont été caractérisés sur les cellules gliales<sup>45</sup>, les cellules de la microglie<sup>46</sup>, les cellules vasculaires endothéliales, le plexus choroïde, les leptoméniges, ainsi que sur les cellules de Müller dans la rétine<sup>47</sup>.

Dans le processus de transport, le système Xc- utilise uniquement les formes anioniques des acides aminés. La cystéine est transportée sous sa forme oxydée cystine (Cystine = Cys-S-S-Cys) tandis que le glutamate est transporté sous sa forme mono-anionique (Glutamate = Glu). Le transport est indépendant du gradient de sodium mais dépendant des ions chlorures<sup>38a, 48</sup>. Le transporteur permet la translocation de la cystine à l'intérieur de la cellule et rélargage du glutamate dans le milieu extracellulaire. En théorie l'échangeur peut fonctionner dans les deux sens. Cependant, dans le SNC, la faible concentration intracellulaire de la cystéine (micromolaire, car transformé en GSH) associée à la grande concentration du glutamate (1-10 mM) sert de force motrice au fonctionnement du transporteur. Ces gradients initient le rélargage du glutamate et la translocation de la cystine dans la cellule<sup>38b</sup>. Par ailleurs dans le système Xc-, les deux acides aminés (Cystine et glutamate) sont, l'un pour l'autre, des inhibiteurs compétitifs. Ainsi, lors de l'échange, le glutamate bloque la fixation de la cystine avec une affinité de 150  $\mu$ M tandis que cette dernière, plus affine, inhibe la translocation intracellulaire du glutamate avec une affinité de 33  $\mu$ M<sup>49</sup>. Le transport de la cystéine nécessite une force motrice générée par la concentration intracellulaire de glutamate.

Ainsi, dans le SNC, le système Xc<sup>-</sup> est couplé avec les transporteurs EAATs qui permettent de maintenir la force motrice nécessaire au fonctionnement de la chaîne xCT. Les précurseurs de synthèse du glutamate (Aspartate, Glutamine) interviendraient également dans le transport de sa cystéine en augmentant sa concentration intracellulaire<sup>50</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 13: Echange cystine/glutamate *via* le système Xc<sup>-</sup>. La chaîne lourde 4F2hc permet l'ancrage et l'adressage de la chaîne légère xCT<sup>51</sup> qui contient les domaines de fixation des deux substrats (cystine et glutamate)<sup>42</sup>.

Le cerveau étant le principal consommateur d'oxygène dans l'organisme (20% au repos), l'échangeur Xc<sup>-</sup> y joue un rôle très important dans le maintien de l'intégrité des neurones. Le transporteur assure la protection des neurones et cellules gliales contre les ROS en transportant la cystéine, le précurseur de synthèse du glutathion. Il faut aussi noter que le transport de la cystéine *via* le système Xc<sup>-</sup> est associé à l'efflux de la cystéine *via* les transporteurs ASC (ASCT1 et 2,<sup>52</sup>). Par conséquent, le système Xc<sup>-</sup> contrôle l'homéostasie du couple redox cystine/cystéine dans le milieu intra et extracellulaire assurant ainsi une protection optimale aux cellules.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 14: Transport de la cystéine dans les neurones et cellules gliales *via* le système Xc<sup>-</sup>

La translocation de la cystéine *via* le système Xc<sup>-</sup> est associée à un efflux de glutamate. Le relargage du glutamate touche notamment les récepteurs extra-synaptiques mGlu2 et mGlu3 permettant une modulation de la neurotransmission<sup>53</sup>. La perturbation de cette voie de régulation de la neurotransmission est impliquée notamment dans l'addiction aux drogues<sup>54</sup>.

Parmi toutes les cellules du SNC, les cellules de la microglie, importantes pour la protection du cerveau contre les infections, sont les plus riches en système Xc-. Lors des infections ou des traumatismes, la mobilisation des cellules dans les zones lésées provoque une augmentation considérable de la concentration du glutamate à cause du rélargage du neurotransmetteur par l'échangeur cystéine/glutamate <sup>45b, 55</sup>. Cette libération du glutamate *via* le système Xc- est impliquée dans certaines troubles neurologiques comme les maladies d'Alzheimer <sup>56</sup>, de Parkinson <sup>57</sup> ou la sclérose en plaque <sup>58</sup>.

### *b. Pharmacologie*

Actuellement il n'existe aucun ligand spécifique du système Xc-. Parmi les inhibiteurs existant, nous distinguons les analogues cycliques et acycliques de la cystéine et du glutamate. Ces ligands ont permis de comprendre certaines propriétés de liaison du transporteur et notamment sa stéréosélectivité. Les D-acides aminés sont faiblement ou pas actifs. La longueur de la chaîne joue également un rôle important au regard de la comparaison de l'affinité du substrat naturel et de la L-Asp (L-Glu : 150 µM, L-Asp : inactif).

Parmi les ligands non cycliques on peut citer l' $\alpha$ -amino adipate produit du métabolisme de la lysine, la  $\beta$ -mercaptolactate-cystéine, l' $\alpha$ -aminopimelate, la L-serine-O-sulfate, la L-homocystéine-sulfinate ou la molécule Bay 94-9392 (Ki 29 - 34 µM) utilisée comme traceur pharmacologique dans la détection de tumeurs cérébrales par PET-Scan <sup>59</sup>. Ces analogues sont des inhibiteurs du système Xc- <sup>38, 48b, 60</sup>.

Les analogues cycliques d'acides aminés sont généralement bien meilleurs que les analogues acycliques correspondants. On distingue notamment le L-iboténate (Ki = 30 µM), le L-quisqualate (Ki = 5 µM), le (RS)-4-Bromo-homo-iboténate (Ki = 20 µM) et la (S)-4-carboxyphenylglycine ((S)-4-CPG, Ki = 1-5 µM) <sup>45b, 48b</sup>. L'iboténate est un composé produit par les champignons *amanites tue-mouches* et *amanites panthères*. Le quisqualate est obtenu naturellement à partir de graines de la *liane vermifuge*. Le quisqualate, la (S)-4-CPG et l'anti-inflammatoire sulphasalazine (6-oxo-3-(2-[4-(N-pyridin-2-ylsulphamoyl)phenyl]diazényl)-cyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid, Ki < 1 µM) utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde <sup>61</sup>, représentent les meilleurs inhibiteurs du système Xc- <sup>48b</sup>.



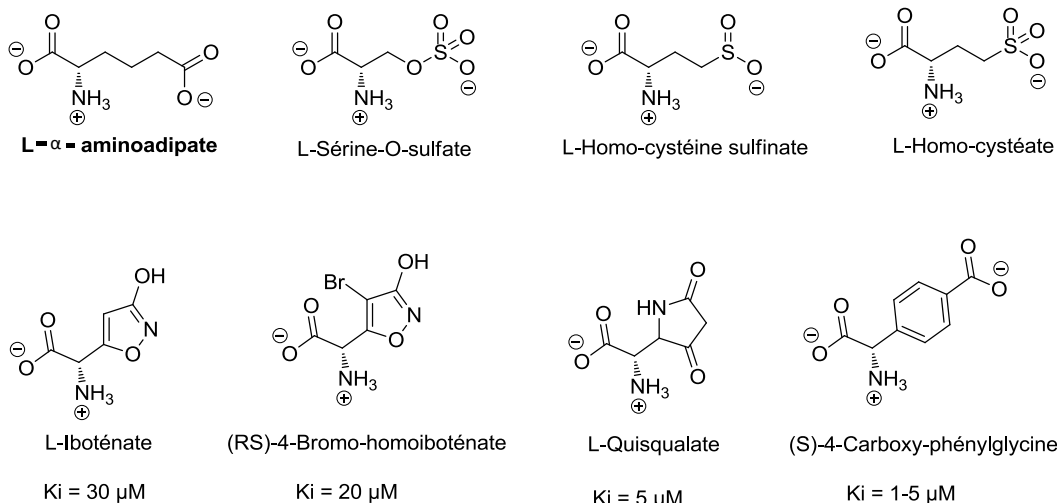


Schéma 9: Modulateurs du système Xc- dérivés d'acides aminés.

Les ligands du système Xc- cités ci-dessus ne sont pas spécifiques. Ils interagissent généralement sur d'autres systèmes et nomment les récepteurs ionotropiques et métabotropiques du glutamate. Ainsi le L-Homocystéate et le L-iboténate activent les récepteurs NMDA <sup>62</sup>. Le L-quisqualate et la (RS)-4-Br-homo-iboténate activent les récepteur AMPA. De la même manière les ligands L-iboténate, L-quisqualate, L-sérine-O-sulfate, L-homocystéate, L-homocystéine-sulfinate sont des agonistes des récepteurs mGlu <sup>63</sup>, tandis que la (S)-4-CPG est un antagoniste du récepteur mGlu1 <sup>64</sup>. L'utilisation de ces ligands dans la régulation du système Xc- poserait donc un problème considérable de perturbation du système glutamatergique. Patel et coll. ont récemment développé de nouveaux ligands dérivés des isoxazoles AMPA et ACPA <sup>65</sup>. Les études de structures-activités lors de la comparaison des activités des analogues NACPA (Ki = 50  $\mu$ M), TFMIH (Ki = 60  $\mu$ M) NEIH (Ki = 100  $\mu$ M) par rapport aux squelettes de référence AMPA et ACPA (inactifs) ont permis l'identification de deux poches hydrophobes adjacentes au domaine de liaison des substrats dans le système Xc- <sup>65</sup>. Dans les nouvelles générations d'inhibiteurs du système Xc-, l'exploitation de ces poches hydrophobes pourrait permettre l'obtention de ligands affins et sélectifs des échangeurs cystéine/glutamate.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Schéma 10: Modulateurs des échangeurs xCT dérivés de AMPA et ACPA <sup>65</sup>.

## V.2.2. Les transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUTs

Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) sont des protéines situées sur la membrane des vésicules présynaptiques. Ils assurent le remplissage des vésicules par le glutamate et représentent par conséquent, avec les EAATs, les principaux acteurs de la recapture glutamatergique. On distingue 3 sous-types de VGLUTs (VGLUT1-3). En raison de la concentration élevée du glutamate dans le cytosol (1-10 mM) ces transporteurs possèdent des affinités faibles pour le glutamate ( $K_m = 1-5 \text{ mM}$ )<sup>66</sup>. Ces faibles affinités sont cependant associées à une grande sélectivité permettant à ces transporteurs la translocation spécifique du glutamate par rapport aux acides aminés structurellement similaires comme l'aspartate ou la glutamine<sup>66-67</sup>. Les VGLUTs sont des marqueurs spécifiques du système glutamatergique et leur seule présence sur la membrane d'une vésicule confère, de façon certaine, le phénotype glutamatergique. Ils appartiennent à la famille des transporteurs de phosphate inorganique  $\text{Na}^+$ -dépendant (NPTs) et SLC17. Ils transloquent le phosphate inorganique (Pi) de façon indépendante par rapport au glutamate (Pi n'altère pas le transport du Glu). La découverte des VGLUTs est d'ailleurs inhérente aux études sur leurs propriétés de transport du phosphate inorganique<sup>68</sup>.

### Découvertes des VGLUTs

La protéine BNPI (Brain specific  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic transporter) a été découverte en 1994 par Ni et *coll.* Elle permet l'accumulation de phosphate inorganique (Pi) à l'intérieur d'ovocytes et présente 30% d'homologie avec le sous-type 1 de la famille des transporteurs sodium/phosphate (NPT-1)<sup>68-69</sup>. Plus tard, il a été montré que le transporteur est abondant au niveau des synapses excitatrices et serait impliqué dans le remplissage des vésicules de façon dépendante du gradient électrochimique de proton. En 2000, les hypothèses sur le rôle de BNPI dans le transport du glutamate ont été validées par Bellocchio et *coll.*, ainsi que par Takamori et *coll.* Les deux études indépendantes ont été réalisées sur des vésicules purifiées à partir de cellules de la lignée PC12 (Bellocchio et *coll.*) et sur les interneurons gabaergiques (Takamori et *coll.*). La surexpression de BNPI sur les vésicules, ou sa transfection des neurones gabaergiques, induit une translocation du glutamate dépendante du gradient électrochimique de proton. Ces expériences confirment que la présence de BNPI confère le phénotype glutamatergique aux neurones. De plus, BNPI est abondante dans le cerveau et est présente sur la membrane des vésicules présynaptiques de synapses asymétriques. La protéine a été baptisée VGLUT1 (transporteur vésiculaire du glutamate de type 1).

Lors de la recherche du transporteur VGLUT1, des résultats avaient confirmé l'absence de la protéine BNPI dans certaines régions glutamatergiques du cerveau comme le thalamus ou le tronc cérébral<sup>70</sup>. De plus, la mutation de l'homologue EAT-4 de BNPI chez la souris ne conduit pas à une

perte totale de la neurotransmission glutamatergique <sup>71</sup>. Ces résultats ont conduit les chercheurs à envisager l'existence d'autres sous-types de transporteurs vésiculaires du glutamate. Ainsi au début de l'année 2000, parallèlement aux études sur VGLUT1, la protéine DNPI (Differentiation-associated Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate transporter) a été découverte. Cette protéine appartient également à la famille des transporteurs Na<sup>+</sup>/Pi et présente 82% d'homologie avec l'isoforme VGLUT1 <sup>72</sup>. La protéine est distribuée de façon complémentaire au transporteur BNPI au niveau des terminaisons axonales des synapses asymétriques et confère également le phénotype glutamatergique aux neurones (expérience de transfection sur les neurones gabaergiques). Cette nouvelle protéine a été renommée VGLUT2, ou transporteur vésiculaire du glutamate de type 2.

En 2002, une nouvelle isoforme de VGLUT a été découverte simultanément par plusieurs équipes dont nos collaborateurs, le Dr. El Mestikawy et son équipe <sup>66g, 73</sup>. Cette nouvelle isoforme, appelée VGLUT3, partage 72% d'homologie avec VGLUT1 et 75% avec VGLUT2.

### **Phylogénie des VGLUTs**

Les VGLUTs font partie de la superfamille des transporteurs transmembranaires SLC (Solute Carrier). Les protéines de la famille SLC sont codées par plus de 300 gènes organisés en 52 familles <sup>74</sup>. Les substrats utilisés par ces transporteurs varient énormément (molécules organiques chargées ou neutres, ions, gaz). Actuellement, dans la superfamille SLC, neuf gènes répartis en trois familles sont identifiés comme codant pour les transporteurs vésiculaires (SLC17, SLC18, SLC32) <sup>75</sup>. Les trois familles sont réparties en fonction de la nature du substrat naturel.

- La famille des SLC17 utilise le gradient électrochimique de proton généré par la V-ATPase <sup>66f, 67a</sup> pour transloquer des substrats anioniques. Elle se compose notamment des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3, Km 1-2 mM), le transporteur vésiculaire d'acides aminés excitateurs (VEAT) représenté par la Sialine (Sialine, Km = 0.14 mM), les transporteurs de phosphate inorganique Na<sup>+</sup>-dépendant (NPT-1, -3, -4 et -5) et le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT) <sup>76</sup>.

Figure 15: Arbre phylogénique des transporteurs SLC17 chez l'homme <sup>76b</sup>.

- La famille des SLC18 regroupe les antiports de cations organiques, parmi lesquels on distingue les transporteurs vésiculaires de l'adrénaline, de la noradrénaline, de la sérotonine, de la dopamine (VMAT1 et 2,  $K_m < 1 \mu\text{M}$ ) <sup>77</sup>, et de l'acétylcholine (VACHT,  $K_m \approx 0.4 \text{ mM}$ ) <sup>78</sup>. Dans cette famille, la translocation du substrat à l'intérieur de la vésicule est couplée à l'efflux de 2  $\text{H}^+$  <sup>79</sup>.
- Les SLC32 comprennent les transporteurs vésiculaires d'acides aminés inhibiteurs (VIAAT) possédant une charge globalement neutre. Ils assurent la recapture de la GABA ( $K_m = 5 \text{ mM}$ ) et de la glycine ( $K_m = 25 \text{ mM}$ ) à l'intérieur des vésicules présynaptiques <sup>66d, 80</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 16: Substrats, courants ioniques et potentiel de membrane des transporteurs SLC17.

Les VGLUTs sont des protéines de 560 à 582 acides aminés difficilement purifiables situées sur la membrane des vésicules présynaptiques. Actuellement, aucune structure par cristallographie de ces protéines n'est encore disponible. Les VGLUTs présentent une homologie de séquence primaire significative avec les transporteurs de la superfamille MSF (Major Facilitator Superfamily). La superfamille des transporteurs MSF constitue avec la famille des SLC, la seconde grande famille de transporteurs transmembranaires ubiquitaires impliqués dans la translocation de petits solutés en utilisant la force motrice d'un gradient électrochimique. L'étude de la structure cristallographique de la perméase au lactose bactérienne, ou du transporteur de glycérol-3-phosphate (GlpT) a permis de déduire que ces transporteurs sont constitués de 12 hélices  $\alpha$  organisées en deux groupes de 6 (deux moitiés) avec les domaines *N*- et *C*-terminaux luminaux <sup>81</sup>. Les deux groupes de 6 hélices  $\alpha$  sont reliés par une boucle flexible cytoplasmique et forment en leur centre une cavité hydrophile en profondeur dans le transporteur permettant la translocation de substrats hydrophiles. Les résidus d' $\alpha$ -acides aminés responsables de la spécificité du transporteur se situent sur les parois de cette poche polaire <sup>82</sup>. Chez les membres de la famille des SLC17, la mutagenèse dirigée a permis d'identifier trois résidus

chargés importants dans la reconnaissance et la translocation du substrat. Il s'agit de l'Arg184, l'His128 et le Glu19<sup>66d</sup>. Les trois résidus sont conservés chez les membres de la famille des SLC17.

- L'Arg184 est située sur le domaine transmembranaire 4 (TMD4). Ce résidu est conservé chez tous les membres de la famille des SLC17 évoquant un rôle essentiel commun comme la reconnaissance des substrats anioniques (Glu, Asp, ATP), ou la liaison d'ions Cl<sup>-</sup> qui semble être une propriété commune à ces transporteurs. Sa mutation par un résidu apolaire comme l'alanine, ou des  $\alpha$ -acides aminés chargés positivement ou négativement à pH physiologique tels que la lysine ou le glutamate conduit à une perte totale du transport<sup>66d</sup>.
- L'His128 et le Glu191 se situent respectivement sur les domaines transmembranaires 2 et 4 (TMD2 et TMD4). Leur mutation inhibe également le transport du glutamate. Les deux résidus sont conservés chez les VGLUTs. L'His128 n'est pas conservé chez le transporteur aspartate/glutamate (la Sialine)<sup>83</sup> suggérant un rôle important de cet  $\alpha$ -acide aminé dans la distinction aspartate/glutamate<sup>84</sup>.

Un modèle par modélisation moléculaire du sous-type VGLUT2 a été généré en se basant sur la structure cristallographique du transporteur glycérol-3-phosphate (GlpT). Dans ce modèle d'homologie, on remarque que les trois résidus chargés sont situés en profondeur dans la poche de liaison hydrophile créée par les hélices  $\alpha$ <sup>66d, 85</sup>. L'interaction des ions Cl<sup>-</sup> avec les trois résidus provoquerait un changement conformationnel qui induirait la translocation du substrat.

### **Biodistribution des VGLUTs**

Les trois sous-types de VGLUTs ont des biodistributions différentes. Actuellement, aucune différence fonctionnelle, structurale, de propriétés bioénergétiques, ou de profil pharmacologique, ou de fonction physiologique notable n'a été identifiée entre les 3 isoformes.

#### *a. VGLUT1 et VGLUT2*

Le sous-type VGLUT1 est majoritairement présent au niveau des terminaisons axonales des synapses asymétriques du cortex cérébral, de l'hippocampe (CA1-3, gyrus dentelé) et dans les couches superficielles de cellules granulaires cérébelleuses. On le retrouve également dans l'amygdale et le pont de Varole. Il est le sous-type le plus abondant dans le cerveau et est responsable de la majeure partie de la recapture (environ 80%) du glutamate dans les vésicules présynaptiques<sup>86</sup>. Ce sous-type est exprimé sur des synapses possédant une potentialisation à long

terme (synapse PLT). Ces synapses sont les acteurs majeurs de la plasticité en permettant un fonctionnement synergique entre les réseaux neuronaux.

Le sous-type VGLUT2 est abondant dans les synapses excitatrices des neurones sous-corticaux et notamment dans le thalamus, le tronc cérébral, la protubérance annulaire dans l'hippocampe (gyrus dentelé, subiculum) ou l'habenula médian et latéral<sup>66c, 87</sup>. Il a une distribution complémentaire de VGLUT1 et peut être co-localisé avec ce dernier<sup>87b, 88</sup>. Une différence notable avec VGLUT1, est l'expression de la protéine sur des synapses DLT (dépression à long terme) importants également dans la plasticité neuronale, tout comme les synapses PLT<sup>87b, 89</sup>.

Les transcrits de VGLUT1 et 2 peuvent être absents de régions où leurs protéines sont abondamment synthétisées comme dans le caudé putamen. Cette répartition serait due à la compartimentation cellulaire dans la biosynthèse des molécules (protéine, ARNm) et la présence des protéines préférentiellement au niveau des terminaisons axonales des neurones présynaptiques. Enfin, l'expression des sous-types VGLUT1 et 2 ne se limite pas aux neurones. On les retrouve également dans les cellules  $\alpha$  endocrines du pancréas, les cellules entériques endocrines de l'estomac, les spermatides des tubes séminales des testicules, etc.<sup>90</sup>.

#### *b. VGLUT3*

Le sous-type VGLUT3 a une expression moins importante que les sous-types 1 et 2. On le retrouve notamment dans certains types spécifiques de neurones<sup>73b, 91</sup> comme dans les couches I-III et V-VI du cortex cérébral, les couches corticales I, V et VI du striatum, le noyau médian et latéral de l'habenula, l'hippocampe. Son transcrit est absent du thalamus, de la substance noire ou du cervelet. Le sous-type est très souvent co-localisé dans les populations de neurones utilisant d'autres neurotransmetteurs<sup>66g, 73</sup>. Dans le noyau de raphé, le cortex cérébral et le striatum, on le retrouve dans les neurones sérotoninergiques<sup>92</sup>, les interneurons gabaergiques et cholinergiques<sup>93</sup> suggérant une libération en synergie avec ces autres neurotransmetteurs.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 17: Expression cérébrale des ARNm des VGLUTs. VGLUT1 (rouge) est majoritairement exprimé dans le cortex (Ctx) et le noyau basolatéral de l'amygdale (Bl), l'hippocampe (Hc) et le gyrus dentelé (Dg). VGLUT2 (bleu) est majoritaire dans le

thalamus, le noyau médian de l'amygdale (M) et le noyau ventro-médian de l'hypothalamus (VMH). VGLUT3 (vert) est exprimé majoritairement dans la couche II du cortex <sup>94</sup>.

Récemment Vigneault *et coll.* ont déterminé la distribution des VGLUTs chez l'homme. Les résultats montrent une répartition similaire chez les rongeurs. Le tableau ci-dessous regroupe la distribution des transcrits et protéines des transporteurs VGLUTs dans le cerveau humain <sup>95</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Tableau 1: Distribution des ARNm et protéines des VGLUTs dans différentes régions du cerveau humain (N.D : Non Détecté, AL : Amygdale Latéral, CCG : Couche de Cellules Granulaires du cervelet <sup>95</sup>).

### **Propriétés bioénergétiques des VGLUTs**

Comme indiqué précédemment, les VGLUTs sont des protéines transmembranaires jouant un rôle clé dans le remplissage du glutamate dans les vésicules présynaptiques. Des efforts considérables ont été fournis pour comprendre le fonctionnement de ces transporteurs. En 1983 Naïto et Ueda ont montré que le transport du glutamate dépendait du gradient électrochimique de proton  $\Delta\mu\text{H}^+$  généré par la pompe à proton V-ATPase sur des fractions vésiculaires purifiées à partir de cerveaux de bœufs <sup>67a</sup>. Depuis, ces études ont été confirmées par plusieurs autres équipes <sup>66f, 96</sup>.

#### **1. Importance des ions chlorures**

La V-ATPase est une pompe électrogénique dont le fonctionnement nécessite la présence d'un contre-ion permettant de maintenir le gradient électrique généré par l'influx de proton <sup>96e</sup>. Dans le milieu intravésiculaire, ce rôle capital est assuré par les ions chlorures qui sont, par conséquent, indispensables à la neurotransmission. Le transport du glutamate est donc fortement dépendant de la conductance de la membrane de la vésicule à  $\text{Cl}^-$ , ainsi que de la concentration du milieu en  $\text{Cl}^-$ . Les analyses biochimiques ont montré que la principale composante de la force motrice ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) est le potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ). Néanmoins, le gradient chimique ( $\Delta\text{pH}$ ) jouerait un rôle important.



- En présence d'une concentration élevée d'ions chlorures (> 6 mM), la conductance aux ions chlorures de la membrane est importante. Elle induit une entrée massive de protons *via* la V-ATPase se traduisant par une augmentation considérable de la composante chimique ( $\Delta\text{pH}$ ) de la force motrice. Dans ces conditions, le transport du glutamate se fait avec une faible affinité.
- En présence d'une quantité plus faible d'ions chlorures (< 4 mM), la principale composante du gradient électrochimique est le potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ). Cependant, elle ne permet pas le transport du substrat avec une meilleure efficacité.
- En présence d'une concentration optimale d'ions chlorures (4-6 mM), la composante majeure de la force motrice reste le potentiel de membrane. La contribution du gradient chimique est minimale. Dans ces conditions, la combinaison des deux composantes induit le transport du glutamate avec une efficacité maximale.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 18: Régulation du transport du glutamate par les ions chlorures (On remarque que le transport est maximal à 4 mM. La composante majeure de la force motrice est le potentiel de membrane  $\Delta\psi$ . Le gradient chimique  $\Delta\text{pH}$  est nécessaire à un transport optimal)<sup>97</sup>.

Des valeurs typiques des deux composantes de la force motrice ( $\Delta\psi = 80 \text{ mV}$  et  $\Delta\text{pH} = 1.5$ ) permettent le remplissage des vésicules jusqu'à 100-150 mM de glutamate (10-20 fois plus concentré dans la vésicule que dans le cytoplasme<sup>75, 98</sup>). L'équation proposée par Omote *et coll.* permet de traduire la relation entre l'efficacité du transport, le potentiel de membrane et le gradient chimique de proton :

$$\ln \frac{[\text{Glu}]_{\text{intra}}}{[\text{Glu}]_{\text{extra}}} = F \cdot \Delta\psi + 2,3 \text{ RT} \cdot \Delta\text{pH}$$

Dans la formule,  $[\text{Glu}]_{\text{intra}}$  et  $[\text{Glu}]_{\text{extra}}$  représentent les concentrations intravésiculaires et extravésiculaires du glutamate, F représente la constante de Faraday (F =

96485 C.mol<sup>-1</sup>), R représente la constante des gaz-parfaits (R = 8.314 J.Kg<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>), T représente la température physiologique (T = 37 °C). Nous remarquons la contribution majeure du potentiel de membrane  $\Delta\psi$  par rapport au gradient chimique  $\Delta\mu$ .

## 2. Hypothèses de fonctionnement des ions chlorures : couple/ménage à trois

Malgré son importance physiologique, le mécanisme moléculaire par lequel l'ion chlorure améliore le transport du glutamate est toujours inconnu. Différentes hypothèses ont été proposées et sont souvent contradictoires en fonction de la nature du modèle utilisé.

### a. *Hypothèse des canaux chlorures : Jentsch, 2001*<sup>99</sup>

Xie *et coll.* ont montré en 1989 que les vésicules enveloppées d'un manteau de clathrine étaient toujours capables de transporter les ions chlorures<sup>100</sup>. Plus tard, en 2001, ces résultats ont amené Stobrawa *et coll.* à envisager un mécanisme dans lequel la conductance de la membrane à l'ion chlorure serait due à l'existence de canaux chlorures (CLC). Leur étude a montré que chez les souris CLC3-KO (CLC3 = sous type majoritaire des canaux chlorures dans le cerveau), la concentration lumineuse en ions chlorures était diminuée de moitié. Cette diminution est corrélée avec une baisse d'efficacité du transport de glutamate. Cependant, en 2009, des études menées par Schenck *et coll.* ont infirmé cette hypothèse. Ils ont montré que la diminution de la conductance à l'ion chlorure était due à une baisse de l'expression des VGLUTs sur les vésicules des souris CLC3-KO, et non à la perte des protéines canaux CLC3<sup>101</sup>. En effet, Stobrawa *et coll.* avaient travaillé sur des vésicules purifiées à partir d'une région de l'hippocampe présentant une neurodégénérescence. Les vésicules présentaient, en conséquence, une basse d'expression des VGLUTs en plus de celle des canaux chlorures CLC3. La comparaison des résultats de l'expérience sur des jeunes souris CLC3-KO avant et après la neurodégénérescence a démontré que seule la perte des transporteurs VGLUTs induit une diminution de la conductance aux ions chlorures.

### b. *Hypothèse d'un antiport Glu/Cl<sup>-</sup> : Schenck, 2009*<sup>101</sup>

Le glutamate est une molécule chargée négativement. Sa pénétration dans les vésicules crée une augmentation du gradient ionique qui doit être régulée. Vers le milieu des années 1990, Fairman *et coll.*, et Eliasof *et coll.*, ont montré que les transporteurs EAATs présentent une conductance aux ions chlorures<sup>102</sup>. En se basant sur ces études, Bellocchio *et coll.* ont proposé un modèle dans lequel

les VGLUTs agiraient aussi comme des canaux chlorures pour stimuler la neurotransmission du glutamate<sup>66b</sup>.

Les expériences réalisées sur les vésicules purifiées obtenues à partir de souris-KO peuvent être sujettes à de nombreux artefacts, tels que la pureté des fractions (contamination par d'autres membranes), ou des problèmes de biogenèse des vésicules provoqués par la perte d'un gène lors de la modification génétique des cellules souches embryonnaires<sup>86</sup>. Pour limiter ces artefacts Schenck et coll. ont travaillé en 2009 sur des modèles simplifiés des vésicules synaptiques, représentés par des protéoliposomes contenant du VGLUT1 recombinant et la H<sup>+</sup>-ATPase de la bactérie *Bacillus stearothermophilus* (TF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> = F-ATPase)<sup>101</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 19: Protéoliposome contenant VGLUT1 et la F-ATPase bactérienne.

Leur expérience a permis de montrer que l'augmentation de la concentration luminale d'ions chlorures améliore le transport du glutamate. Ainsi, le transporteur VGLUT1 agirait comme un antiport Glu/Cl<sup>-</sup>, en associant la translocation du glutamate à un efflux d'ions chlorures, induisant une augmentation du potentiel de membrane  $\Delta\psi$  et donc du transport du glutamate.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 20: Transport du glutamate *via* un antiport Glu/Cl<sup>-</sup>. La translocation du glutamate à l'intérieur de la vésicule (1) est stimulée par l'efflux d'ions chlorures (2).

c. *Hypothèse d'un échangeur Glu-K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Glu-K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>: Reinhard Jahn, 2014*<sup>103</sup>

Récemment, en 2014, Preobranschenski et coll. ont proposé un nouveau modèle dans lequel l'activation du transport du glutamate par les ions chlorures se ferait suivant deux nouveaux modes d'activation impliquant l'ion potassium K<sup>+</sup>. Leurs études réalisées sur les protéoliposomes contenant

du VGLUT1 et la F-ATPase bactérienne ont montré que le transport du glutamate était stimulé par la présence d'ions chlorures à l'intérieur, ou à l'extérieur de la vésicule. Ils ont proposé que l'ion chlorure aurait un site de fixation allostérique sur le transporteur VGLUT1 accessible de part et d'autre de la membrane (face cytosolique et luminale). De plus, leurs études ont aussi montré que la présence d'ions  $K^+$  dans le milieu expérimental stimule la recapture du glutamate même en absence d'ions chlorures. Ils ont conclu que le transporteur VGLUT1 posséderait trois sites de liaison impliqués dans le transport du glutamate. On distingue un site de haute affinité pour  $Cl^-$ , un site de faible affinité pour le couple  $Glu/Cl^-$ , et un site  $H^+/K^+$ . La translocation du glutamate se ferait suivant deux nouveaux modes nécessitant chacun la présence d'ions  $Cl^-$ . Dans le premier mode, le transporteur VGLUT1 co-transporte le glutamate, le  $K^+$ , associé à un efflux de  $H^+$  (antiport  $Glu, K^+/H^+$ , **fig22.a**). Dans le second mode, la translocation du couple  $Glu/K^+$  s'accompagne de l'efflux d'ions  $Cl^-$  (antiport  $Glu, K^+/Cl^-$ , **fig22.b**).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 21: Mécanisme moléculaire de transport du glutamate proposé par Preobranschenski et *coll.* impliquant les ions  $Cl^-$ ,  $K^+$  et  $H^+$ . **Fig.a** : le transporteur vésiculaire se comporte comme un échangeur  $Glu, H^+/K^+$ . **Fig.b** : la translocation du glutamate se fait *via* un antiport  $Glu, K^+/Cl^-$ .

#### d. Hypothèse d'un symport $Glu/H^+$

Après la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique, les vésicules sont régénérées par endocytose. Durant ce processus, les nouvelles vésicules se concentrent en ions chlorures créant un gradient initial entre le lumen et le cytosol. Ce gradient ionique initial permet l'acidification de la vésicule par la V-ATPase (création du gradient chimique  $\Delta pH$ ), importante pour la translocation du glutamate. En conclusion, la pénétration d'ions chlorures stimulerait indirectement le remplissage des vésicules en facilitant la création du gradient chimique nécessaire à la translocation du glutamate dans la vésicule synaptique<sup>66b, 104</sup>.

Figure 22: Transport du glutamate *via* un symport Glu/H<sup>+</sup>. La pénétration d'ions chlorures dans la vésicule (1) facilite la création du gradient chimique par la V-ATPase par entrée d'ions H<sup>+</sup> (2). Les ions H<sup>+</sup> stimulent la translocation du glutamate dans la vésicule (3).

*e. Hypothèse d'une coopération positive des ions Cl<sup>-</sup>: Omote, 2010* <sup>75</sup>

Juge et *coll.* ont envisagé une approche différente et simplifiée dans l'étude de l'activation du transport de glutamate par les ions chlorures. Ils ont étudié le transport du glutamate dans les protéoliposomes contenant uniquement le transporteur VGLUT2. La création du gradient électrique est assurée par un ionophore comme la valinomycine (sélectif des ions K<sup>+</sup>). Ce système annule la dépendance au gradient chimique de proton, et la conductance aux ions chlorures qui existe dans les liposomes contenant la F-ATPase bactérienne.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 23: Protéoliposome simplifié contenant le transporteur VGLUT2 et l'ionophore valinomycine.

Leurs résultats ont montré que le transport du glutamate se fait en présence ou en absence d'ions Cl<sup>-</sup>. Néanmoins, une nette amélioration du transport est observée en présence d'ions chlorures, à partir d'une concentration de 2 mM. Le transport du glutamate est maximum à 5 mM d'ions chlorures <sup>105</sup>. Ils en concluent que les ions Cl<sup>-</sup> favorisent le transport du glutamate et que les VGLUTs sont directement activés par ces ions. De plus, les expériences réalisées en présence d'une concentration extravésiculaire élevée en ions chlorures (jusqu'à 100 mM) n'altère pas le transport du glutamate comme cela a été envisagée par Schenck et *coll.*, ou Preobranschenski et *coll.* <sup>101, 103</sup>. Par ailleurs, une forte concentration luminale en ions chlorures (100 mM) ne modifie pas non plus le transport du glutamate. Ils ont confirmé ces observations en étudiant la mobilité des ions chlorures par radioactivité (test de recapture du <sup>36</sup>\*Cl), et par fluorescence (utilisation de la sonde fluorescente 6-méthoxy-N-(3-sulfopropyl)-quinolinum-monohydrate <sup>106</sup>). Ces résultats montrent que les ions

chlorures ne se lient pas au même site de liaison que le glutamate, et que les VGLUTs ne se comportent pas comme des canaux chlorures.

Donc, en conclusion, les transporteurs VGLUTs ne sont ni des antiports  $\text{Glu}/\text{H}^+$ , ni des antiports  $\text{Glu}/\text{Cl}^-$ , ni des Symports  $\text{Glu}/\text{Cl}^-$ , ou des canaux chlorures. Jahn et *coll.* ont proposé un mécanisme allostérique dans lequel l'activation des VGLUTs se ferait par liaison des ions chlorures sur un site spécifique conduisant à l'ouverture du transporteur et la translocation du glutamate (coopération positive)<sup>75</sup>. Deux modes de régulation par allostérie peuvent exister : coopération positive par liaison d'ions chlorures sur la face luminale<sup>96d</sup>, ou par fixation d'ions chlorures sur la face cytosolique du transporteur<sup>101, 103, 105</sup>.

On note également que l'activation des VGLUTs par les ions  $\text{Cl}^-$  présente une forte coopérativité avec un coefficient de Hill proche de 3. L'activation du transport par le  $\text{Cl}^-$  nécessite, par conséquent, la présence de multiples sites de liaison avec des affinités similaires (nombre de sites  $\leq 3$ )<sup>105</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 24: Amélioration du transport de glutamate par coopération positive des ions chlorures. La liaison d'ions chlorures sur un site spécifique (1) stimule la translocation du glutamate dans la vésicule (2)<sup>107</sup>.

### **3. En conclusion**

Les VGLUTs sont des protéines clés dans le remplissage du glutamate dans les vésicules présynaptiques. Ces protéines transportent également du Pi. La présence d'ions sodiums, potassiums, et notamment d'ions chlorures, active de transport du glutamate.

Figure 25: Ions transportés et/ou intervenant dans la régulation des VGLUTs <sup>108</sup>.

La régulation du transport par les ions chlorures est une propriété spécifique de certains membres de la famille SLC17 (VGLUTs, VNUT, VEAT, NTP1). Le mécanisme moléculaire de la régulation du transport par les ions chlorures doit cependant être éclairci afin de mieux comprendre le remplissage des VGLUTs. Différents modèles ont été proposés pour expliquer la régulation des VGLUTs par les ions chlorures. Cependant, aucun de ces modèles ne fait actuellement l'unanimité.

Enfin, on notera que l'affinité des VGLUTs peut être régulée par des corps cétoniques dans le milieu physiologique. Ces composés présentent une activité opposée aux ions chlorures et permettent de moduler la neurotransmission synaptique. Les dérivés du métabolisme comme l'acétoacétate, le pyruvate, le phénylpyruvate, le kynurénate, l' $\alpha$ -céto- $\beta$ -méthyl valérate, l' $\alpha$ -céto-isovalérate modulent la neurotransmission en diminuant le remplissage des vésicules. Par exemple, l'effet bénéfique du jeûne dans le traitement de l'épilepsie serait dû à la modulation de la neurotransmission glutamatergique par l'acétoacétate <sup>105, 109</sup>. Les corps cétoniques se fixeraient au même site de liaison que les ions chlorures et moduleraient l'activité des VGLUTs par coopération négative. L'exploration de cette voie de régulation pourrait conduire à la conception de nouveaux outils pharmacologiques pour les désordres neurologiques liés à l'excitotoxicité du glutamate.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 26: Régulation de la neurotransmission glutamatergique par coopération négative des corps cétoniques <sup>105</sup>.

### VGLUTs et désordres neurologiques

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du SNC. Pour cette raison, il se trouve impliqué dans divers troubles neurologiques de façon directe ou indirecte. Les études menées sur les souris-KO ont permis de montrer l'importance des VGLUTs, et notamment, d'appréhender leur implication dans certains désordres neurologiques.

En 2004, Wojcik et *coll.* (ainsi que Freneau et *coll.*) ont montré que les souris-KO VGLUT1 meurent 2 à 3 semaines après leur naissance<sup>86, 110</sup>. Les souris-KO VGLUT2 meurent d'insuffisance respiratoire immédiatement après leur naissance<sup>111</sup>. Ces études montrent le rôle capital des VGLUTs dans le maintien des fonctions physiologiques chez le nouveau né. Des expériences similaires réalisées chez les souris adultes (diminution de l'expression de VGLUT1 et/ou VGLUT2) ont montré que l'altération de l'expression de VGLUT1 est associée à l'anxiété, le désordre de l'humeur<sup>112</sup>, ainsi que dans les désordres neurologiques tels que la maladie de Parkinson et l'épilepsie<sup>113</sup>. L'altération de l'expression de VGLUT2 est associée également à une diminution de la dégénérescence des motoneurones<sup>114</sup>. Kashani et *coll.* ont montré en 2008 une corrélation entre la quantité de VGLUT1 et le score de démence associé à la maladie d'Alzheimer. Leurs études, réalisées sur des sujets à différents stade de la maladie, ont montré une diminution prononcée de l'expression de VGLUT1 dans le lobe frontal de sujets atteints d'une forme sévère de neurodégénérescence<sup>115</sup>. Cependant, des études à plus grande échelle semblent modérées ces observations. D'autres études, comme celles réalisées par Shen et *coll.* en 2010, Moechars et *coll.* en 2006, ou Mariana et Brumovsky en 2015, montrent également l'implication des VGLUTs dans la schizophrénie et les douleurs neuropathiques.<sup>111a, 116</sup> De plus, les deux sous-types sont exprimés au niveau des nerfs sensitifs de la corne postérieure de la moelle épinière suggérant également leur implication dans la perception des douleurs nociceptives<sup>117</sup>.

Contrairement à VGLUT1 et 2, les souris-KO VGLUT3 survivent normalement. Néanmoins, elles présentent un phénotype de surdité ainsi que des troubles accrus de l'anxiété et des problèmes de locomotion<sup>118</sup>. De plus, la distribution spécifique de VGLUT3 dans les régions du cerveau, telles que les couches I-III et V-VI du cortex cérébral, renforce l'hypothèse de son implication dans la locomotion, et suggère un rôle primordial de ces transporteurs dans la régulation de l'humeur, et la récompense<sup>118a, 119</sup>.

Ces observations montrent que les transporteurs VGLUTs pourraient être utilisés comme outils pharmacologiques dans le diagnostic et/ou le suivi thérapeutique de la dépression, de l'anxiété, la sclérose latérale amyotrophique, la schizophrénie, les douleurs neuropathiques chroniques, les douleurs nociceptives, l'addiction, la maladie de Parkinson, et la maladie d'Alzheimer.



## Pharmacologie des VGLUTs

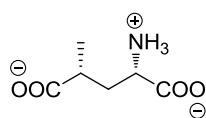
Nous avons vu que les VGLUTs sont des protéines transmembranaires transportant spécifiquement le glutamate avec une faible affinité (1-5 mM). Le gradient chimique généré par la pompe à proton et les ions chlorures sont nécessaires au transport. Les composés qui interagissent directement avec les VGLUTs ou qui influent sur les paramètres physiologiques nécessaires au transport, modulent la neurotransmission glutamatergique. Actuellement, la pharmacologie des VGLUTs est assez pauvre. On distingue essentiellement des inhibiteurs de la recapture du glutamate. Parmi ces inhibiteurs, certains interagissent directement avec la protéine VGLUT (inhibiteurs compétitifs et non-compétitifs). D'autres modulent indirectement le transport en perturbant le gradient électrochimique nécessaire au transport du glutamate (découpleur du gradient électrochimique).

### *a. Inhibiteurs interagissant directement avec les transporteurs VGLUTs*

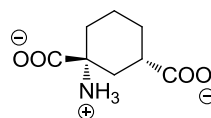
#### **i. Inhibiteurs compétitifs**

##### **i.a. Les analogues du substrat**

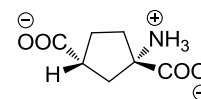
Parmi les modulateurs compétitifs de la neurotransmission glutamatergique, on distingue notamment les analogues cycliques et non-cycliques du glutamate, comme la (2S, 4R)-4-méthyl-glutamate ( $Cl_{50} = 0.7$  mM), la L-trans-ACPD ( $Cl_{50} = 0.23$  mM), ou la DL-trans-ACHD ( $Cl_{50} = 0.8$  mM)<sup>120</sup>. Ces composés modulent également l'activité des récepteurs iGluRs, mGluRs et les transporteurs plasmiques EAATs avec une bonne affinité.



(2S, 4R)-4-méthyl-glutamate  
 $Cl_{50} = 0.7$  mM



DL-trans-ACHD  
 $Cl_{50} = 0.8$  mM



L-trans-ACPD  
 $Cl_{50} = 0.23$  mM

Schéma 11: Structures d'analogues cycliques et non-cycliques du glutamate modulant la recapture du glutamate<sup>120a</sup>.

##### **i.b. Les analogues quinoléines et quinoxalines**

Bartlett et *coll.* ont mis en évidence, en 1998, l'importance des motifs quinoléines et quinoxalines dans l'inhibition de la recapture glutamatergique. Les composés comme le kynurénate, le xanthurénate, le 7-chloro-kynurénate, et le 2-quinoxaline-carboxylate présentent une bonne affinité pour les VGLUTs (1-15  $\mu$ M). Ces composés sont des modulateurs compétitifs du glutamate,

mais agissent également au niveau post-synaptique sur les récepteurs ionotropiques iGluRs<sup>66f, 120a, 121</sup>.

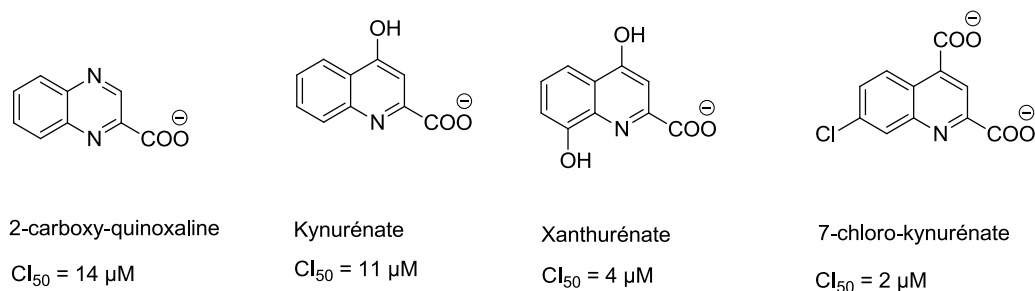


Schéma 12: Structures des meilleurs motifs quinoléines et quinoxalines modulant la neurotransmission glutamatergique.

Le kynurénate est un composé endogène neuroactif (anti-excitotoxique et anticonvulsif) dérivé du métabolisme du tryptophane. Carrigan et coll. ont pharmacomodulé l'hydroxyle en position 4 par un groupement acide carboxylique pour générer des motifs 2,4-dicarboxy-quinoléiques (motif QDC). Ils ont développé une série de ligands à partir de ce motif qui ont des affinités plus ou moins bonnes<sup>122</sup>. Les études RSA réalisées sur ces ligands ont permis de mettre en exergue certains sites pharmacophoriques, et notamment l'importance des charges négatives du motif QDC, ainsi que l'importance de la taille du motif aryle hydrophobe. La pharmacomodulation du motif phényle par le biphenyle induit un gain d'affinité d'un *log*<sup>122-123</sup>. Les deux meilleurs modulateurs obtenus sont la 6-biphényl-QDC et la 6-(4-phénylstyryl)-QDC avec des affinités respectives de 41 μM et 64 μM (**Schéma 13** ci-dessous).

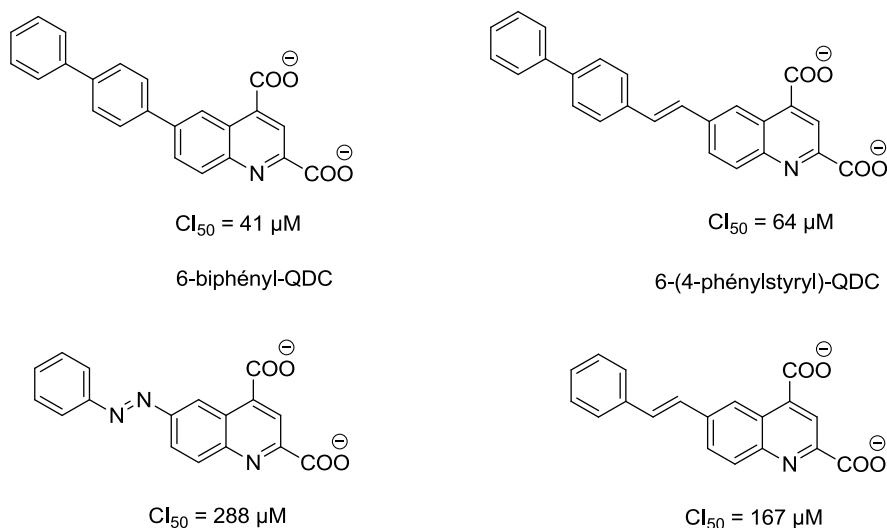


Schéma 13: Structures d'analogues QDCs développés par Carrigan et coll.<sup>122</sup>.

### **i.c. Les colorants azoïques**

Les colorants azoïques sont des composés formés par une partie polaire reliée à un corps hydrophobe *via* un lien azo. Ces molécules possèdent au moins une charge négative assurée par le groupement sulfonate. La charge négative est importante pour l'activité du ligand et jouerait le même rôle que le groupement COO<sup>-</sup> proximal du glutamate. Le groupement NH<sub>2</sub>, présent sur la partie polaire de certains inhibiteurs, jouerait le même rôle que le groupement amino du glutamate. Ce groupement ne semble pas indispensable à l'affinité du ligand<sup>124</sup>. Actuellement, les colorants azoïques inhibant des VGLUTs avec les meilleures affinités sont : le Jaune Brillant (JB, Cl<sub>50</sub> = 15 nM), la Chrysophénine qui correspond à l'analogue méthylé du Jaune Brillant (CP, Cl<sub>50</sub> = 27 nM), le Bleu Trypan (BT, Cl<sub>50</sub> = 50 nM), le Bleu Evans (BE, Cl<sub>50</sub> = 90 nM), et le Violet Direct 51 (VD51, Cl<sub>50</sub> = 148 nM)<sup>124-125</sup>.

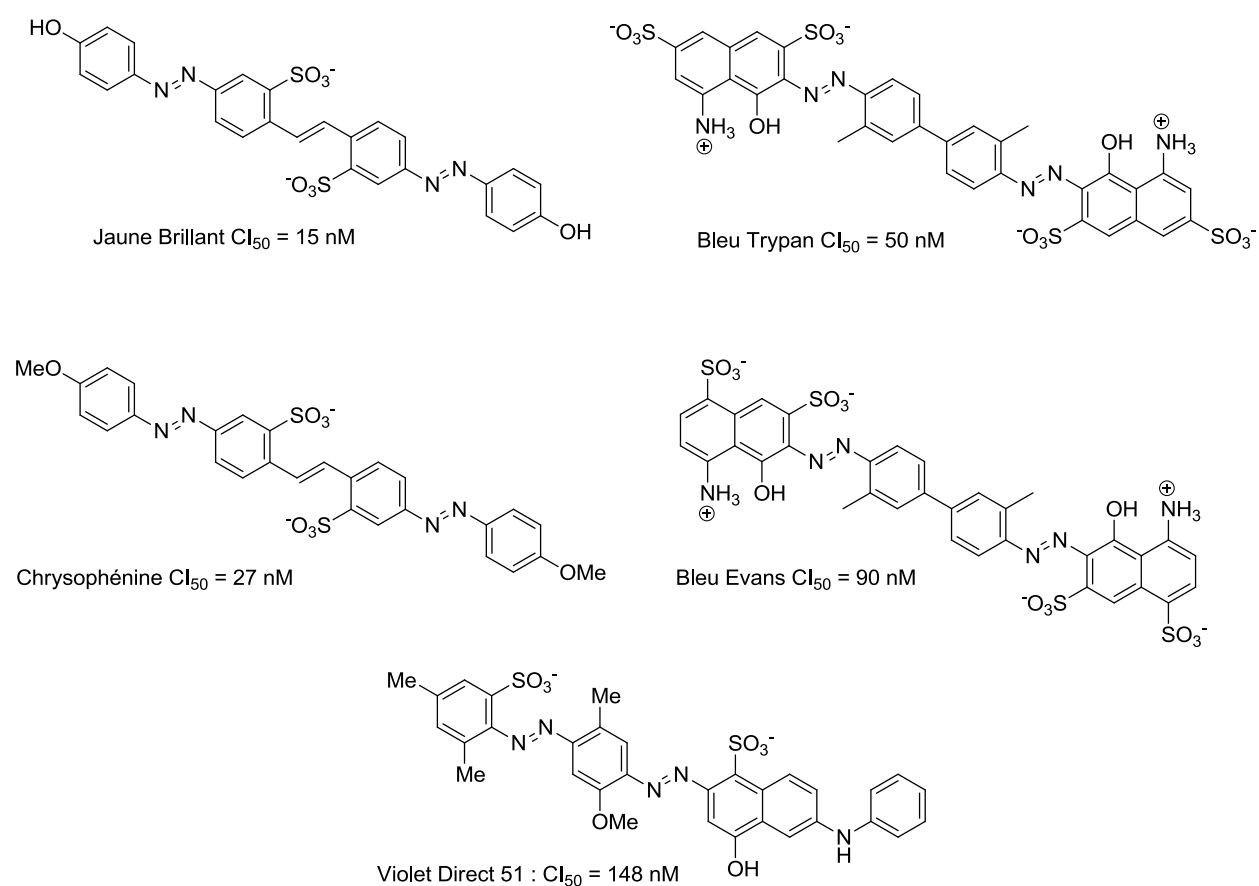


Figure 27: Meilleurs modulateurs des VGLUTs parmi les colorants azoïques<sup>124-125</sup>.

Deux études de relation structure-activité, réalisées en parallèle en 2014, ont permis d'identifier les sites pharmacophoriques importants dans l'affinité des colorants azoïques<sup>124-125</sup>.

Notre équipe a effectué une étude RSA sur les dérivés azoïques du BT <sup>125a</sup>. Cette étude a permis de mettre en exergue l'importance du motif aryle hydrophobe, et notamment l'impact de l'augmentation de sa taille (motif phényle en biphenyle) ou l'incorporation de groupements halogènes, qui induisent un gain d'affinité notable. Cette étude a également confirmé l'importance des charges négatives du motif polaire naphthyl-disulfonique <sup>125a</sup>.

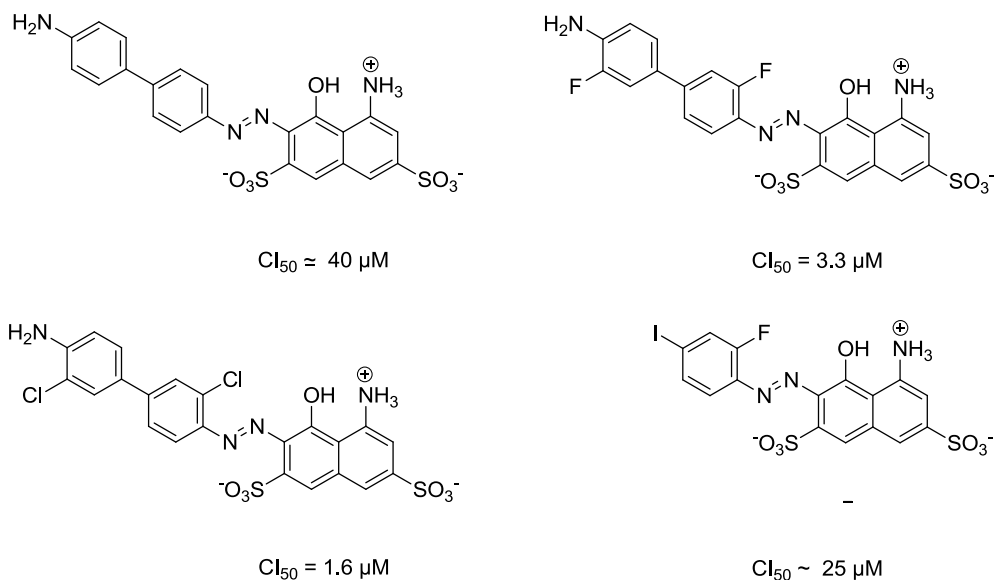


Schéma 14: Importance de la taille dans les colorants azoïques dérivés du BT <sup>125a</sup>.

Parallèlement à ces études, Tamura et *coll.* ont effectué une étude RSA du Jaune Brillant et ses dérivés <sup>124</sup>. Leur étude a confirmé l'importance de la charge négative du groupement sulfonate, mais aussi l'importance du corps hydrophobe aryle, de la liaison azo, et du groupement accepteur de liaison H (cette fois-ci, en para du lien azo). Ce groupement (OH dans le JB, OMe dans la CP) établirait une liaison hydrogène clé avec la Tyr195 qui empêcherait la liaison du glutamate aux résidus chargés (Arg184, His128 et notamment Glu191) dans la poche hydrophile des VGLUTs <sup>124</sup>. La distance entre l'atome d'azote de la liaison azo et l'atome d'oxygène chargé négativement du groupement sulfonate (distance N-O) serait également un facteur important dans l'affinité des colorants azoïques. Tamura et *coll.* ont ainsi montré que cette distance est similaire dans le Jaune Brillant ( $d(N-O^-) = 9.324 \text{ \AA}$ ), le Bleu Trypan ( $d(N-O^-) = 9.799 \text{ \AA}$ ) et le Violet Direct 51 ( $d(N-O^-) = 8.274 \text{ \AA}$ ,  $d'(N-O^-) = 10.354 \text{ \AA}$ ) <sup>124</sup>.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Schéma 15: Importance de la distance entre l'atome d'azote du lien azo et l'atome d'oxygène chargé négativement du groupement sulfonate <sup>124</sup>.

On note que les colorants azoïques restent peu spécifiques à une concentration élevée. Par exemple, le Bleu Evans inhibe de façon non-spécifique le transport gabaergique avec une affinité de 23  $\mu\text{M}$ . L'inhibition non-spécifique est due à la perturbation du gradient électrochimique de proton. Roseth et *coll.* ont montré, en 1995, que l'inhibition non-spécifique des colorants azoïques est environ 15 x moins importante que la modulation obtenue par liaison directe au transporteur <sup>126</sup>.

## ii. Inhibiteurs non-compétitifs

Parmi les modulateurs non-compétitifs des VGLUTs, on distingue notamment les analogues polyhalogénés de la polyhalogénés de la fluorescéine, parmi lesquels le Rose Bengale (RB) possède la meilleure affinité ( $\text{CI}_{50} = 25 \text{ nM}$ ) <sup>127</sup>. ( $\text{CI}_{50} = 25 \text{ nM}$ ) <sup>127</sup>. Pientrancosta et *coll.* (de notre équipe) ont effectué en 2010, des études RSA portant sur le Rose portant sur le Rose Bengale et ces dérivés <sup>128</sup>. Ces études ont permis l'identification de la forme bioactive des dérivés du bioactive des dérivés du Rose Bengale (forme acide de la molécule, cf.

**Schéma 16).** La forme lactone induit une perte d'affinité. Ces études ont également permis de souligner l'importance des substituants halogènes sur le motif xanthène, et phényle. Notamment, un modèle pharmacophorique a été généré par modélisation moléculaire. Ce modèle illustre l'importance des substituants halogènes. Le site de liaison pour ce type de ligand n'a pas encore été identifié. Certaines études suggèrent une modulation allostérique, tandis que d'autres préconisent une modulation par interaction avec des protéines nécessaires au transport du glutamate. Par ailleurs, les dérivés du Rose Bengale sont non-spécifiques des VGLUTs et modulent l'activité des VMAT2 avec une bonne affinité ( $\text{CI}_{50} = 64 \text{ nM}$ ). Leur effet sur le transporteur vésiculaire d'acétylcholine (VACHT), à forte concentration ( $\geq 1 \mu\text{M}$ ), est dû probablement à une perturbation du gradient électrochimique ( $\text{Ki} = 10 \mu\text{M}$ ) <sup>128</sup>.

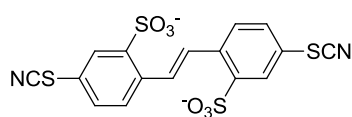
En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Schéma 16: Structures et modèle pharmacophorique d'analogues dérivés de la fluorescéine.

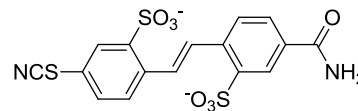
### iii. Découpleurs du gradient électrochimique

Les découpleurs du gradient électrochimique sont des composés qui modulent la recapture du glutamate en dissipant la force motrice nécessaire au transport du glutamate. La force motrice possède deux composantes : une composante électrique  $\Delta\psi$ , et une composante chimique  $\Delta\text{pH}$ .

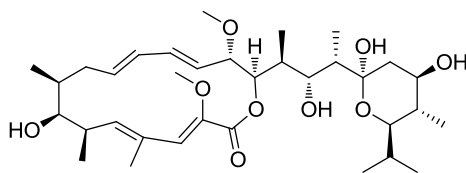
Les inhibiteurs, comme le DIDS ( $\text{CI}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$ ) et le SITS ( $\text{CI}_{50} = 0.2 \mu\text{M}$ ), modulent le transport du glutamate en annulant la composante électrique  $\Delta\psi$ . Les modulateurs, tels que la nigéricine (échangeur  $\text{H}^+/\text{K}^+$ ), la bafilomycine (ionophore  $\text{K}^+$ ,  $\text{CI}_{50} = 15 \text{ nM}$ ) la bromocriptine ( $\text{CI}_{50} = 22 \mu\text{M}$ ), la CCCP ( $\text{CI}_{50} \approx 50 \mu\text{M}$ ), dissipent la composante chimique  $\Delta\text{pH}$ <sup>96d, 126</sup>. Ces composés ne sont pas spécifiques du système glutamatergique. Ils inhibent entre autres, le transport de tous neurotransmetteurs nécessitant un gradient électrochimique *via* l'action sur l'ATPase (VMAT1 et 2, VACHT, VIAAT, VGLUT1-3)<sup>96c, 126</sup>.



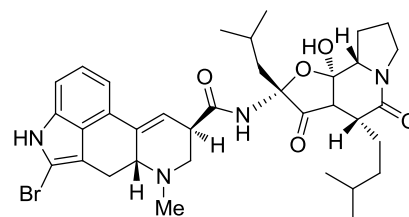
DIDS  
 $\text{CI}_{50} = 0,7 \mu\text{M}$



SITS  
 $\text{CI}_{50} = 2 \mu\text{M}$



Bafilomycine  
 $\text{CI}_{50} = 15 \text{ nM}$



Bromocriptine  
 $\text{CI}_{50} = 22 \mu\text{M}$

Schéma 17: Structures de découpleurs du gradient électrochimique modulant la recapture du glutamate.

### iv. Modulateurs protéiques

Il existe d'autres modulateurs du transport glutamatergique comme l'inhibiteur de facteurs protéiques IPF (composé de trois isoformes IPF $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Cette protéine inhibe le transport du glutamate de façon non-spécifique avec une bonne affinité de  $24 \text{ nM}$ <sup>129</sup>. Le térapeptide D-Gln-L-Ile-D-Glu-D-Trp, développé par Patel et *coll.* en 2007, inhibe également la recapture glutamatergique avec une affinité de  $465 \mu\text{M}$ <sup>130</sup>. Pour ces composés, le mode d'action reste encore à déterminer.



# **Chapitre II**

## **Objectifs et axe de travail**





## A.Objectifs

Comme mentionné précédemment, le glutamate est le principal neurotransmetteur du système nerveux central. Le système glutamatergique est impliqué directement ou indirectement dans plusieurs désordres neurologiques. Les VGLUTs, en tant que meilleurs biomarqueurs du système glutamatergique, représentent des cibles potentielles dans le suivi de différents troubles neurologiques, et nous voulons mieux comprendre l'implication physiopathologique des VGLUTs.

### Problématique et inconvénient de la pharmacologie existante

La pharmacologie des VGLUTs reste malheureusement très pauvre aujourd'hui. Parmi les modulateurs de la neurotransmission glutamatergique, seules deux familles interagissent directement avec les transporteurs VGLUTs. On distingue la famille des analogues du substrat naturel dont les meilleurs composés sont le trans-ACPD ( $Cl_{50} = 0.2 \text{ mM}$ ) et la (2S, 4R)-4-méthylglutamate ( $Cl_{50} = 0.7 \text{ mM}$ ), inhibiteurs peu affins et non spécifiques. On distingue également la famille des colorants dont le meilleur composé est le Bleu Trypan ( $Cl_{50} = 50 \text{ nM}$ ). Il présente une très bonne affinité pour les VGLUTs, est sélectif, mais possède une mauvaise biodisponibilité (problème de passage de la BHE). Par ailleurs, il présente une structure peu pharmacomodulable.

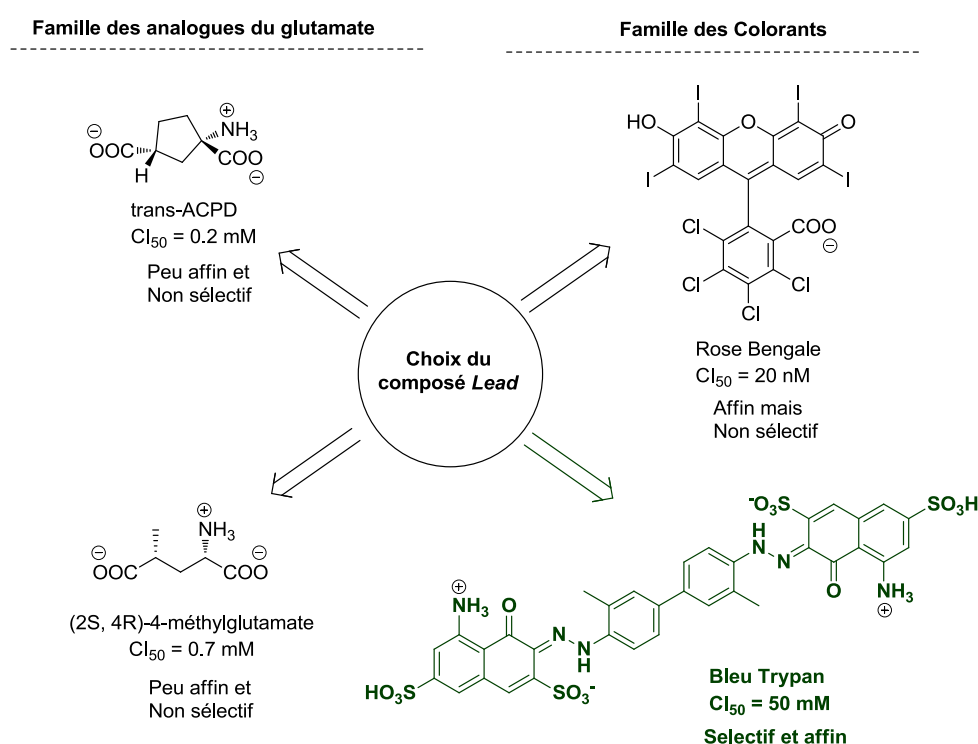


Schéma 18: Principales familles des modulateurs des VGLUTs.

Nous allons dans ce projet, développer de nouveaux modulateurs des transporteurs vésiculaires du glutamate. Pour cela nous nous sommes fixés trois principaux objectifs.

## Objectif 1 : Conceptions de ligands affins et sélectifs des VGLUTs

Nous avons choisi le Bleu Trypan comme *Lead* pour notre étude car ce composé présente le meilleur compromis affinité/sélectivité. Notre objectif principal dans le projet est la conception de nouveaux analogues structuraux affins et sélectifs afin d'enrichir la pharmacologie des VGLUTs. Ces composés serviront d'outils pharmacologiques dans la compréhension de l'implication physiopathologique des VGLUTs dans les désordres neurologiques. Des travaux préliminaires réalisés dans l'équipe ont mis en évidence l'importance de certaines modifications sur les colorants azoïques dérivés du BT, et notamment la taille du modulateur. On remarque un gain de **1 log** entre le composé **LSP9-2126** et **LSP9-2073** (modification du phényle en biphenyle), ainsi qu'entre le composé **LSP9-2073** et **LSP9-2105** (ajout d'un second motif naphthyle).

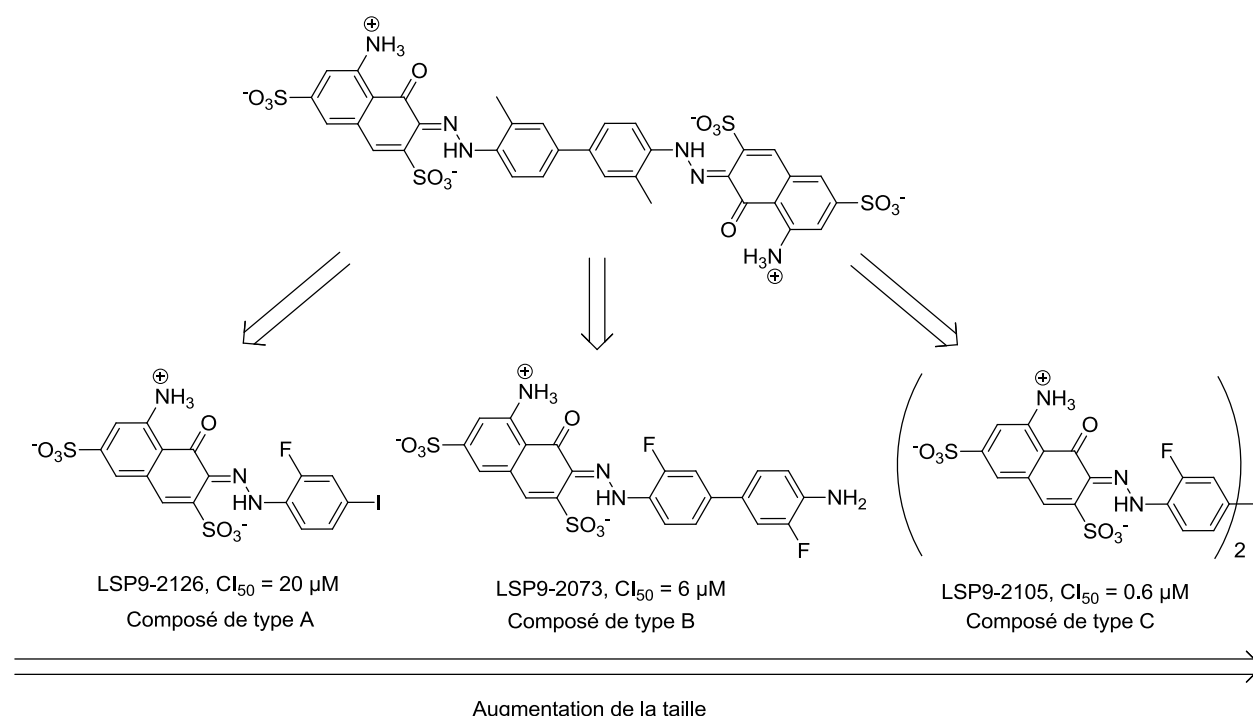


Schéma 19: Amélioration de l'affinité lors de l'augmentation de la taille des composés

En se basant sur ces résultats, nous envisageons la synthèse de composés de tailles différentes. Parmi les molécules, on distinguera les composés de type A, B, et C. Cette stratégie permet l'obtention de molécules de petites tailles, pour lesquelles les activités biologiques seront directement comparées à celles issues du BT.

## Objectif 2 : Conception de modulateurs post-fonctionnalisables

Le BT est un composé difficilement pharmacomodulable et possède une mauvaise biodisponibilité. Son affinité de 50 nM *in vitro* sur les vésicules purifiées, chute lors de son évaluation

dans des contextes plus physiologiques. En effet, des études préliminaires montrent une perte de **2 logs** et **5 logs** lors de l'évaluation de l'activité du composé respectivement *ex-vivo* et *in vivo*.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 28: Comparaison de l'affinité du BT *in vitro* ( $CE_{50} = 50$  nM), *ex vivo* ( $CE_{50} = 2$   $\mu$ M) et *in vivo* ( $CE_{50} = 1$  mM). Dans l'expérience *in vitro*, les mesures sont effectuées sur des vésicules purifiées à partir du lobe frontal, les mesures *ex vivo* sont effectuées sur des tranches du lobe frontal (Dutar et coll.), l'évaluation *in vivo* mesure la réduction du potentiel d'action au niveau du nerf auditif (Puel et coll.).

Un de nos principaux objectifs est donc la conception d'analogues structuraux du BT facilement modifiables. Les nouveaux composés porteront des groupements fonctionnalisables permettant l'incorporation de motifs nécessaires à l'amélioration de la biodisponibilité (greffage de motif type acide ascorbique, formation de liaison ester hydrolysable *in vivo*, etc.). En outre, les nouveaux composés seront facilement radiomarquables. Les ligands, comme le  $^{18}$ FDG (cartographie cérébrale par scintigraphie),  $^{123}$ IMIBG (détection de neuroblastomes),  $^{123}$ I-Iodoflupane (diagnostic de la maladie de Parkinson), le  $^{11}$ C-PiB et  $^{18}$ F-florbetaben (diagnostic de la maladie d'Alzheimer), sont couramment utilisés en imagerie médicale. A l'instar de ces sondes, les nouveaux composés formés durant le projet pourraient être utilisés comme outils pharmacologiques dans le diagnostic de désordres neurologiques impliquant le système glutamatergique. Les techniques d'imagerie médicale, telles que la tomographie par émission positronique, ou la tomographie par émission monophotonique, seront d'un intérêt particulier dans les études physiopathologiques.

### **Objectif 3 : Conception de modulateurs Fluorescents**

Actuellement, l'évaluation des activités biologiques des molécules se fait par recapture du glutamate tritié à l'intérieur des vésicules entières fonctionnelles. Ce test exige des conditions

précises de pH, de température et de concentration en sels ioniques ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ). En outre, le test se heurte à certains artefacts dont le rélargage du glutamate tritié conduisant à un faible rapport signal/bruit. L'un des objectifs du projet porte sur la synthèse d'inhibiteurs fluorescents afin de permettre le passage d'un test par quantification de glutamate tritié incorporé dans des vésicules purifiées à un simple test de liaison par fluorescence sur membranes purifiées. Le test de liaison est plus fiable et facilement reproductible. De plus, contrairement au test de compétition par radiomarquage, il ne se heurte pas aux problèmes de rélargage du glutamate. De plus, le test de liaison par fluorescence permet d'évaluer un plus grand nombre de produits en utilisant peu de matériels biologiques (Criblage).

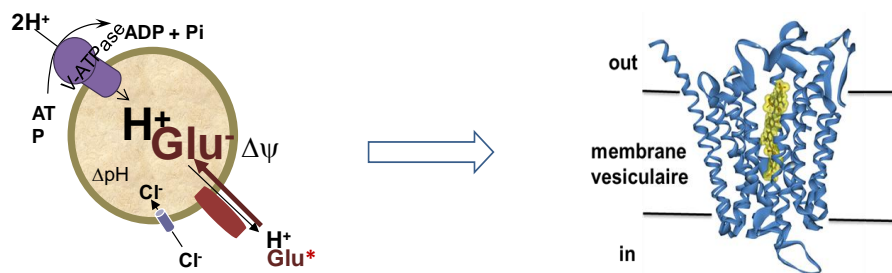


Figure 29 : Passage du test de compétition sur vésicules purifiées à un test de liaison par fluorescence.

## B. Présentation des axes du travail

Les études RSA et le docking par modélisation moléculaire ont permis de déterminer les sites de fixation du BT sur les VGLUTs. On distingue notamment trois poches d'interactions. Au niveau du site 1, la liaison du ligand se fait par le naphtyle poly-fonctionnalisé. Ce motif naphtyle atteint les poches d'interactions hydrophiles de haute affinité situées en profondeur dans le transporteur. Au niveau du site 2 la liaison du ligand se fait par le motif aryle hydrophobe. Ce motif interagit avec des poches hydrophobes également situées en profondeur dans le transporteur. Le second motif naphtyle se trouve en contact avec le cytosol (milieu aqueux). Il interagit avec les poches hydrophiles de faibles affinités au niveau du site de liaison 3. Les interactions électrostatiques établies par ce motif sont moins fortes en comparaison aux interactions du naphtyle situé à l'intérieur du VGLUT (**Schéma 20** ci-dessous).

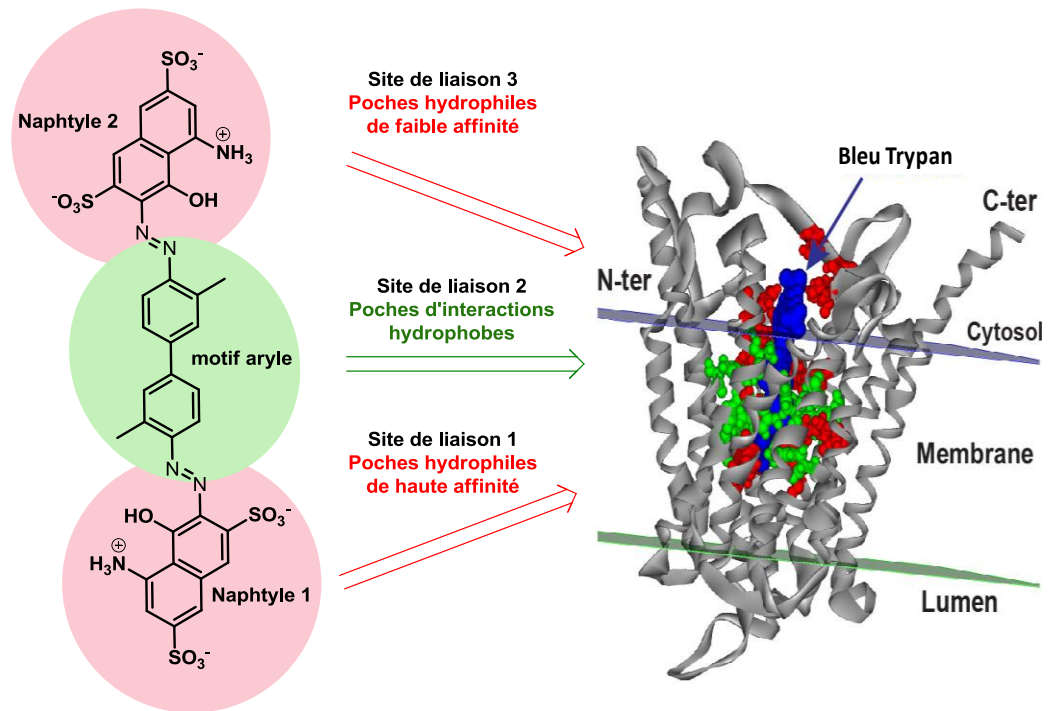


Schéma 20: Sites de liaison du Bleu Trypan dans les VGLUTs.

Nous avons envisagé trois types de pharmacomodulations potentielles pour la conception de nouveaux ligands : incorporation d'un isostère fluorescent du naphtyle (interactions au niveau du site de liaison 1), modification de la nature du lien azo (interactions au niveau des 3 sites de liaison), puis finalement optimisation de la nature des substituants sur le motif aryle (interactions au niveau du site de liaison 2, **Schéma 21** ci-dessous).

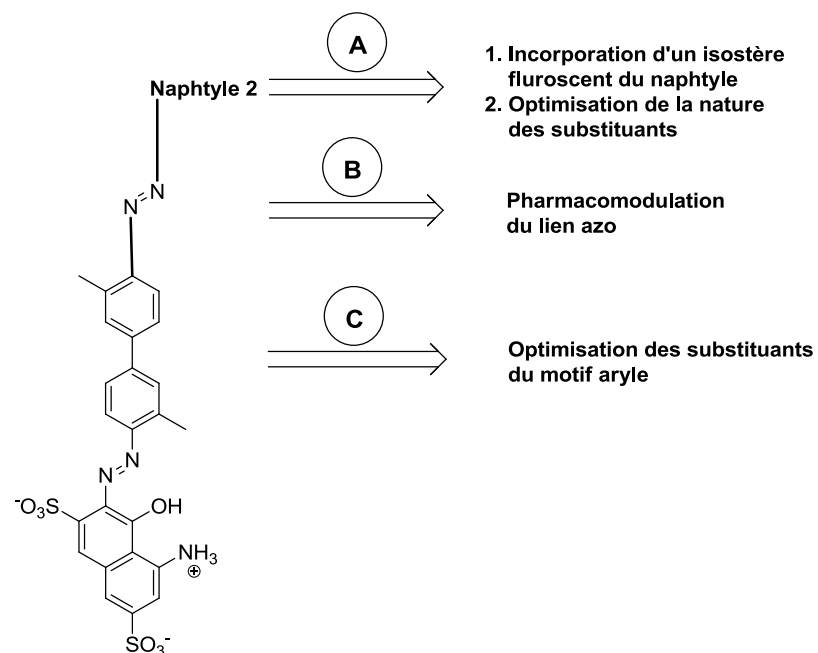


Schéma 21: Présentation des trois modifications majeures envisagées pour l'obtention de nouveaux ligands.

## Partie A : Remplacement du naphthyle par un fluorophore

Pour atteindre les poches d'interaction hydrophiles, nous allons remplacer le naphthyle par un isostère fluorescent. Nous allons remplacer soit un seul, ou les deux motifs naphtyles. La pharmacomodulation d'un seul motif naphthyle conduira à des ligands « entiers » dissymétriques tandis que le remplacement des deux motifs naphtyles conduira à des ligands « entiers » symétriques. Les structures schématiques des deux types de ligand sont présentées dans le **Schéma 22** ci-dessous.

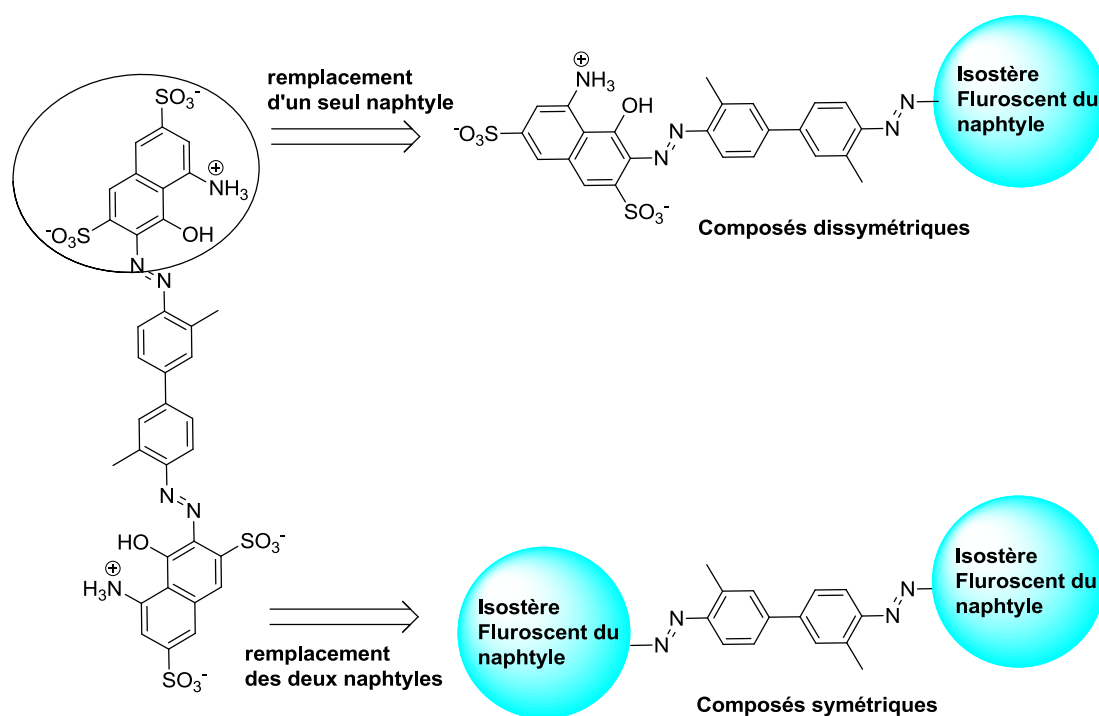


Schéma 22: Pharmacomodulation des motifs naphtyles par un isostère fluorescent.

Ces modifications touchent les sites 1 et/ou 3 lors de la liaison des ligands au niveau du transporteur. Le choix du motif fluorescent est fait en fonction de la similarité des propriétés physicochimiques avec le Bleu Trypan, telles que la solubilité, la polarité, le poids moléculaire, etc. Les charges négatives présentes sur le naphthyle sont très importantes dans la liaison du ligand au transporteur. Pour cette raison, les motifs fluorescents sélectionnés posséderont idéalement une charge négative. Nous avons choisi les motifs 4-méthyl-coumariniques et 3-carboxy-coumariniques. Ces motifs fluorescents seront substitués par des petits groupements (H, OH, OMe, NET<sub>2</sub>) afin d'améliorer l'affinité et les propriétés de fluorescence des composés finaux (**Schéma 23** ci-dessous).

### motifs polaires coumariniques sélectionnés

---

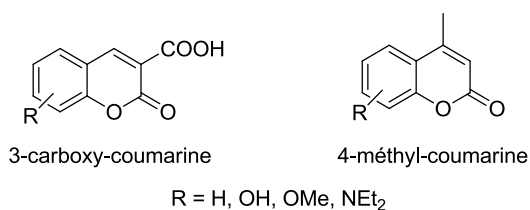


Schéma 23: Isostères fluorescents du motif naphtyle choisis pour la formation des nouveaux ligands.

### Partie B : Pharmacomodulation du lien azo

Dans la seconde partie, nous allons remplacer le lien azo par d'autres espaceurs comme la liaison alcène, alcyne, triazole, ou en supprimant tout simplement l'espaceur. Ces transformations nous permettront d'évaluer l'importance de l'espaceur dans la liaison des ligands au niveau des VGLUTs. On pourra estimer l'influence de différents types d'interactions faibles établies, mais également de la géométrie imposée aux composés par l'espaceur. La modification de l'espaceur touche donc les trois sites de liaison.

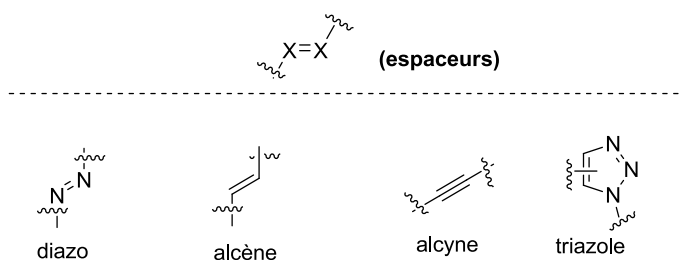


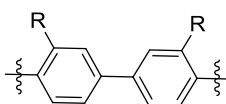
Schéma 24: Pharmacomodulation du lien azo.

### Partie C : Pharmacomodulation du motif aryle hydrophobe

Dans cette dernière partie, nous allons tenter d'améliorer l'affinité des ligands en variant la nature des substituants du motif aryle. Les petits groupements hydrophobes comme le méthyle, le méthoxy, le chlore ou le fluor pourront être incorporés. Ces groupements modifient la densité électronique du motif aryle et peuvent établir des liaisons, notamment au niveau des interactions hydrophobes (site de liaison 2).



-----  
**motifs aryles hydrophobes**  
-----



**Biphényle**

R = H, Me, OMe, Cl, F

Schéma 25: Variation de la nature des substituants du motif aryle hydrophobe.

Nous espérons obtenir à la suite de ces trois pharmacomodulations, des modulateurs affins, sélectifs, et fluorescents des VGLUTs qui pourraient être utilisés comme outils pharmacologiques. Dans les paragraphes suivants nous allons présenter en détail la synthèse des ligands ainsi que leurs évaluations des activités biologiques.

# **Chapitre III**

## **Conception des inhibiteurs**



# Introduction

Les coumarines sont des molécules naturelles très utilisées en cosmétique et en agroalimentaire. Elles sont, par exemple, utilisées comme agents azurants dans l'industrie du textile, pour la fabrication de détergents, ou de papiers<sup>131</sup>. Elles sont également utilisées par les chimistes et les biologistes pour leurs propriétés de fluorescence, ou en pharmacologie comme structures privilégiées (au sens d'Evans). On les retrouve dans plusieurs substances actives,<sup>132</sup> telles que les anticoagulants, les antibiotiques, les anti-tumoraux, les anti-HIV, les anti-hypertensives, les anti-inflammatoires, etc.<sup>133</sup>. Nous avons choisi les coumarines comme synthons de base pour nos molécules, pour la simplicité de synthèse, leurs propriétés intéressantes de pharmacomodulation et de fluorescence<sup>134</sup>. Dans la littérature, il existe différentes méthodes de synthèse des coumarines. Ces méthodes utilisent pour la plupart les dérivés du phénol (**Schéma 26** ci-dessous).

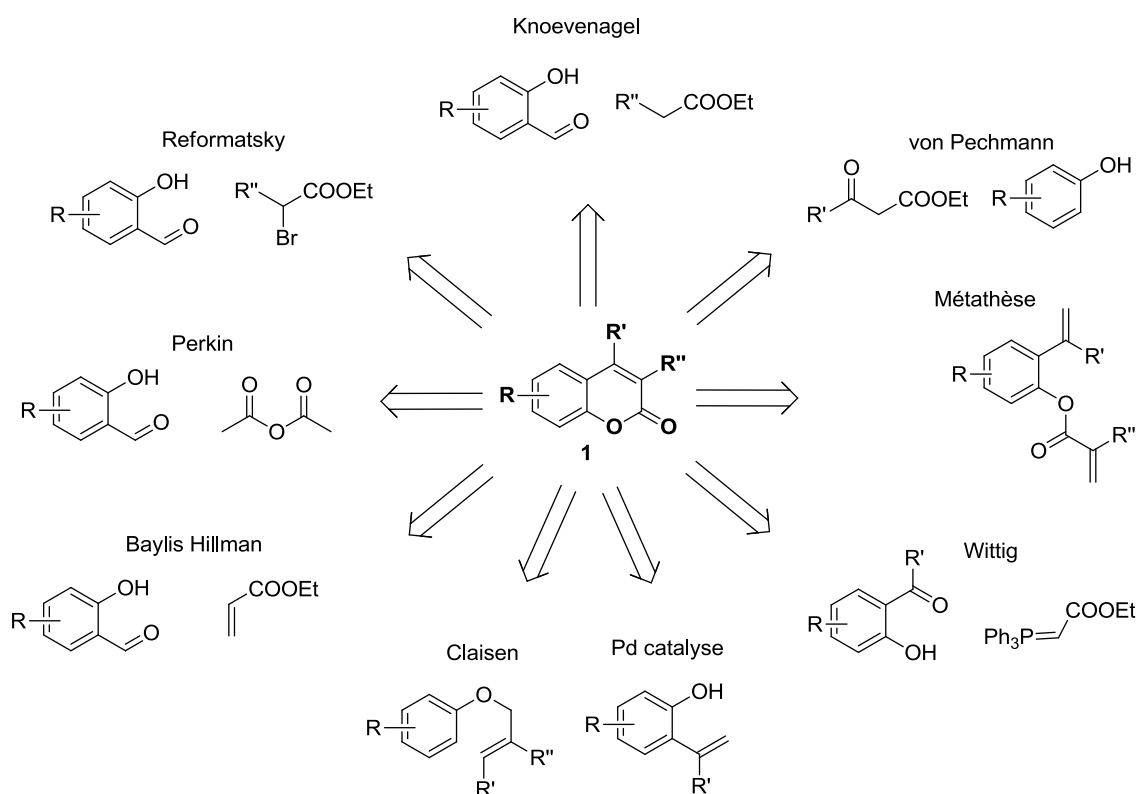


Schéma 26: Résumé des stratégies décrites pour la formation des coumarines.

## VI. Formation de coumarines en condition acide

La formation des coumarines en condition acide peut se faire par réarrangement de Claisen en présence d'un acide de Brønsted comme le TFA<sup>135</sup>, ou un acide de Lewis comme AlCl<sub>3</sub><sup>136</sup>. Cette méthode est généralement utilisée pour la formation des coumarines. Sunitha et *coll.* ont, par exemple, utilisé la catalyse en présence d'AlCl<sub>3</sub> pour former des méthylènes coumarines **3** par réarrangement à partir d'allyl-aryl-éthers **2**, avec de bons rendements variant entre 65 - 80%.

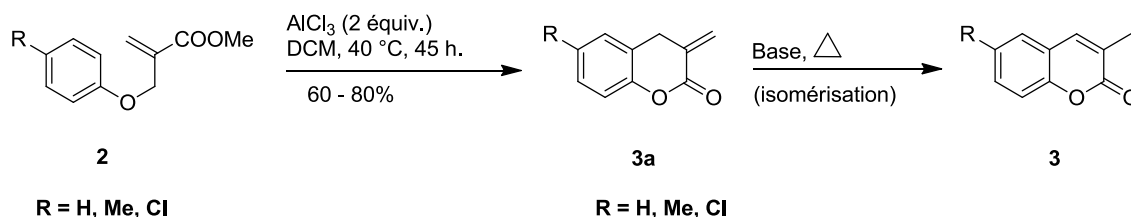


Schéma 27: Formation de coumarines par réarrangement de Claisen<sup>136</sup>.

La méthode la plus décrite pour la formation des coumarines en milieu acide reste la condensation de von Pechmann. La réaction présente de nombreux avantages : i) des conditions de synthèse très simples à mettre en place ; ii) une très grande disponibilité des réactifs, ainsi que, dans certains cas iii) la purification facile du produit final par précipitation dans la glace. La formation de la coumarine se fait en milieu acide fort en présence d'un dérivé phénolique et d'un β-céto-ester. L'acide utilisé lors de la réaction peut être un acide de Brønsted comme H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>137</sup>, le CF<sub>3</sub>COOH<sup>138</sup>, le CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H<sup>139</sup>, le pentoxyde de phosphore<sup>140</sup>. L'utilisation d'acides de Lewis, comme AlCl<sub>3</sub><sup>141</sup>, ZnCl<sub>2</sub><sup>142</sup>, BiCl<sub>3</sub><sup>143</sup>, InCl<sub>3</sub><sup>144</sup> ou l'isopropoxyde de titane (Ti(OiPr)<sub>4</sub>)<sup>145</sup>, a également été décrite. La réaction peut également être réalisée en catalyse hétérogène avec l'utilisation d'agents de condensation comme le Zeokarb 225, l'Amberlite IR.120<sup>146</sup>, le Nafion-H, la zéolite H-BETA<sup>147</sup>. Certaines méthodes utilisent la catalyse aux microondes<sup>148</sup>. D'autres utilisent des liquides ioniques<sup>149</sup> ou la silice mésoporeuse<sup>147</sup>. La méthode de von Pechmann est généralement adaptée à la synthèse des 4-alkyl-coumarines. Parmi tous les catalyseurs mentionnés ci-dessus, l'acide sulfurique est principalement utilisé dans la littérature. Les conditions réactionnelles et les rendements varient beaucoup en fonction de la nature des réactifs et notamment en fonction de l'encombrement stérique et du caractère électrodonneur ou électroattracteur des substituants portés par le phénol et le β-céto-ester. Les diphenols et notamment les dérivés du résorcinol donnent en général de bons rendements en raison de l'activation du cycle aromatique par les groupements hydroxyles. Dans ce cas, la réaction se fait très souvent à basse température (≤ 0 °C). Kathuria et *coll.* ont, par exemple, utilisé cette méthode pour développer des dérivés 7-hydroxy-4-méthyl-coumarinyles **6** avec des bons rendements variant entre 75 - 80%<sup>137b</sup>.

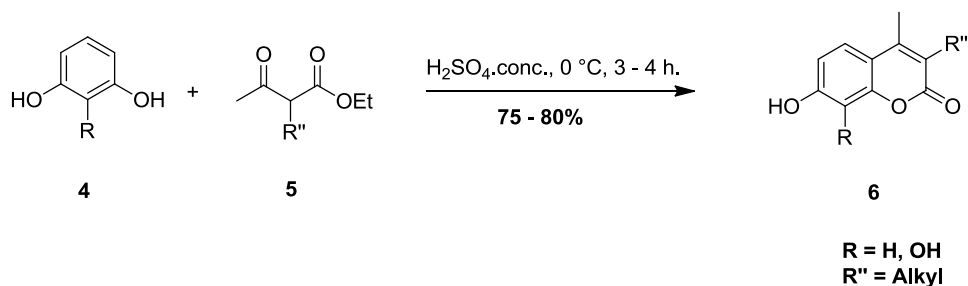


Schéma 28: Formation de coumarines par la méthode de von Pechmann *via* la catalyse à l'acide sulfurique<sup>137b</sup>.

L'un des avantages majeurs de la catalyse à l'acide sulfurique réside dans la purification par précipitation de la coumarine dans la glace à la fin de la réaction<sup>137b, c</sup>. Dans le cas des composés difficilement purifiables, la catalyse hétérogène peut être une alternative assez intéressante. Une méthodologie sur résine échangeuse de cation (Zeokarb225 ou Amberlite IR.120) a été développée par John et Israelstan en 1961. Elle conduit à la formation des coumarines avec des rendements très variables (9 - 80%)<sup>150</sup>. D'autres stratégies plus récentes et plus innovantes, comme la catalyse sur silice mésoporeuse greffée par un acide sulfonique sont également des alternatives. Karimi et Zareyee ont utilisé cette méthode en 2008 pour former des composés 4-méthyl-coumarinyles avec de bons rendements variant de 30 - 90%<sup>151</sup>.

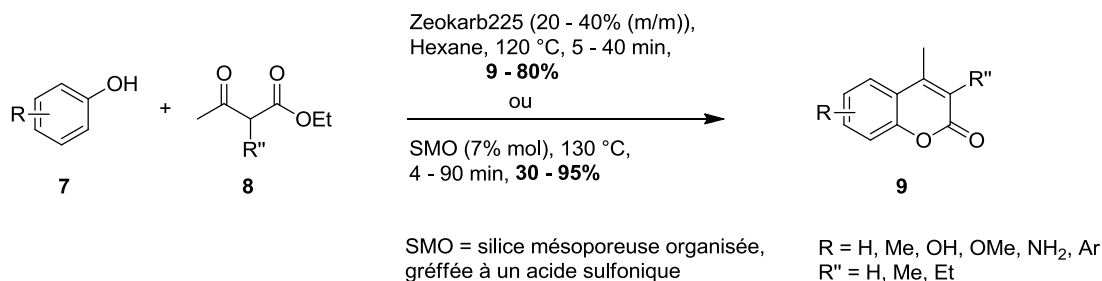
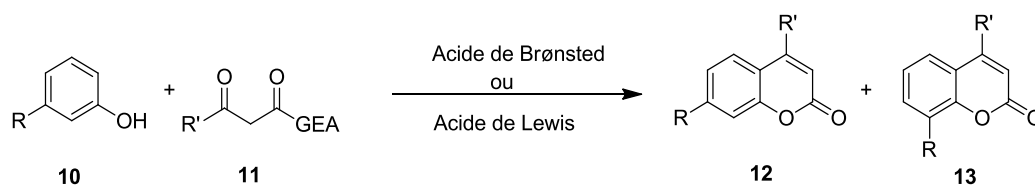


Schéma 29: Formation de coumarines par la méthode de von Pechmann *via* la catalyse hétérogène<sup>146-147</sup>.

La méthode par catalyse acide présente certains avantages mais également quelques inconvénients et notamment la sensibilité aux conditions acides comme certains groupements protecteurs. Une autre limite de la méthode réside dans la possible formation de régioisomères dans le cas de phénols non symétriques (**Schéma 30** ci-dessous).



GEA = groupement électrotracteur

Schéma 30: Formation de régioisomères lors de la formation de coumarines par condensation de von Pechmann.

## VII. Formation de coumarines en condition basique

Parmi les méthodes de formation des coumarines en milieu basique, on distingue notamment la condensation de Knoevenagel, les réactions de Perkin, de Reformatsky ou la cyclisation intramoléculaire à partir de l'adduit de Baylis-Hillman.

La réaction de Knoevenagel est une méthode de synthèse découverte par Emil Knoevenagel en 1894. Cette réaction permet la formation d'une double liaison carbone-carbone par condensation d'un carbanion sur un aldéhyde en présence d'une base faible comme la pyridine, la triméthylamine ou la pipéridine. La base faible peut être ajoutée en quantité catalytique (0.2 - 0.4 eq)<sup>152</sup> ou en très grande quantité et servir souvent de solvant pour la réaction<sup>153</sup>. La méthode est généralement utilisée pour la formation des coumarines substituées sur le carbone 3. A partir des dérivés du 2-hydroxybenzaldéhydes, elle conduit à la formation des coumarines avec des rendements très variables dépendant des conditions réactionnelles et de la nature des réactifs utilisés<sup>154</sup>. Vekariya et Patel ont écrit en 2014 une revue sur les conditions utilisées lors de la formation de coumarines par la méthode de Knoevenagel<sup>154</sup>. Nous constatons que la méthode de Knoevenagel se fait avec des rendements satisfaisants en général (40 - 98%), avec une variabilité considérable de substituants et de conditions (solvant : EtOH, MeCN, Dioxane, THF, H<sub>2</sub>O ; T °C : de 0 °C à 100 °C ou plus, Temps : 2 - 24h généralement, réaction en phase homogène ou en non, catalyse sous microondes, résines échangeuses d'ions, liquides ioniques, etc.). Mohareb et *coll.* ont développé la synthèse de molécules actives (antibiotiques et antifongiques) avec de bons rendements<sup>155</sup> par la méthode de Knoevenagel. On peut également énumérer les travaux de Shaabani et *coll.* qui ont utilisé le liquide ionique recyclable 1,1,3,3-N,N,N',N'-tetramethylguanidinium trifluoroacetate (TMGT) à chaud ou sous microonde pour former des coumarines avec des rendements satisfaisants<sup>156</sup>.

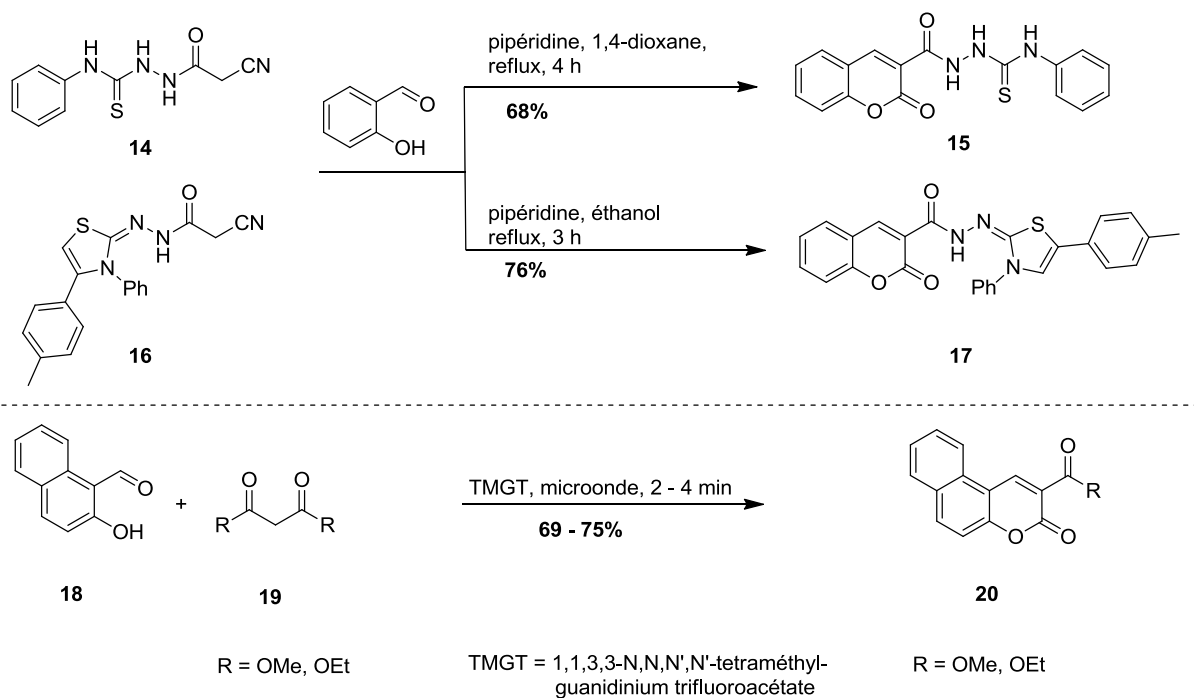


Schéma 31: Formation de coumarines par condensation de Knoevenagel<sup>155-156</sup>.

Les réactions de Baylis-Hillman, de Perkin, de Reformatsky ou la réaction de Wittig utilisent les dérivés du 2-hydroxybenzaldéhydes comme réactifs. Dans la réaction de Perkin le 2-hydroxybenzaldéhyde réalise une transestérification sur l'anhydride acétique suivie de la cyclisation pour la formation de la coumarine. L'inconvénient majeur de la méthode est l'utilisation de conditions très dures ( $\Delta = 200^{\circ}\text{C}$ ) et la formation du produit avec de faibles rendements. La méthode est peu utilisée dans la littérature pour la formation de coumarines substituées sur le carbone **3** ou **4**. La réaction de Reformatsky se fait par condensation d'un énolate zincique sur l'hydroxybenzaldéhyde suivie de la lactonisation. La réaction Baylis-Hillman permet la synthèse d'intermédiaires utilisés principalement dans la formation de coumarines substituées sur la position **3**<sup>157</sup> par catalyse en milieu basique (DABCO généralement). En 2004 Kaye et *coll.* ont utilisé cette méthode pour développer des composés possédant une activité anti-HIV. Tout comme la réaction Perkin, les méthodes de Baylis-Hillman et de Reformatsky sont peu utilisées dans la littérature pour la formation des coumarines.



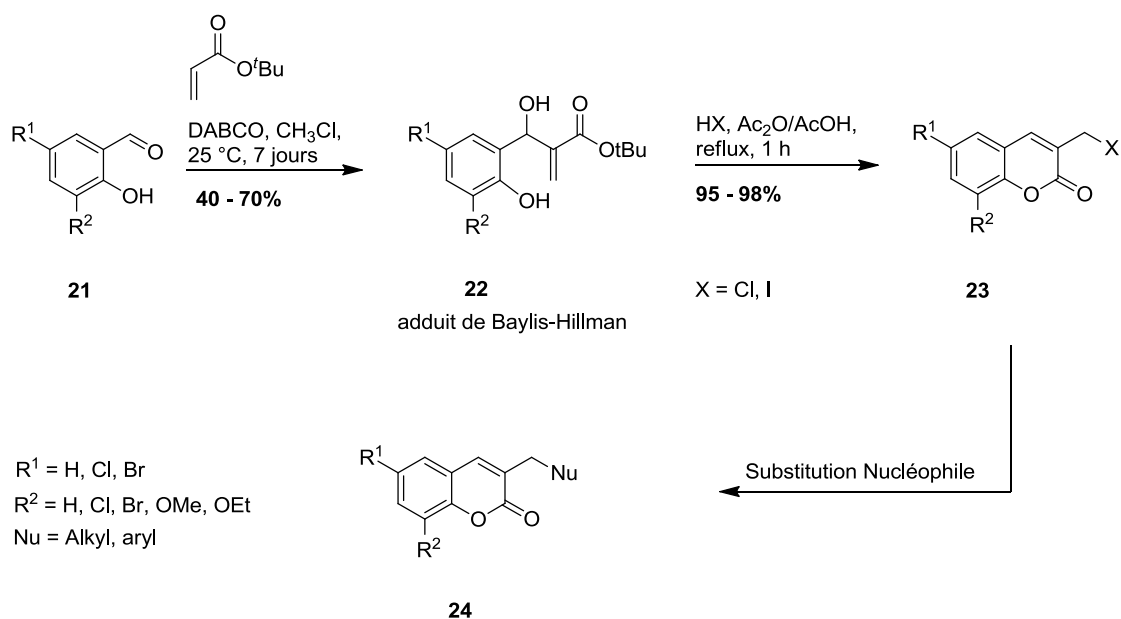


Schéma 32: Formation de coumarines *via* la méthode de Baylis-Hillman <sup>157</sup>.

## VIII. Formation de coumarines : autres méthodes

D'autres méthodes peuvent être utilisées dans la formation des coumarines. Il est difficile de faire une liste exhaustive de toutes ces méthodologies. On peut notamment citer les réactions de Wittig, les réactions palladocatalysées ou la métathèse.

La réaction de Wittig se fait par condensation d'un ylure de phosphore sur un dérivé carbonyle 2-hydroxy-phényle. La cyclisation, pour la formation de la coumarine, se fait ensuite par lactonisation. L'inconvénient majeur de la réaction de Wittig réside dans la formation majoritaire de l'alcène E, la transestérification intramoléculaire nécessaire à la formation de la coumarine ne pouvant se faire qu'à partir du stéréoisomère minoritaire Z. La difficulté de la purification des produits, dans ce cas, peut être aussi un autre facteur limitant. En 1997, Cartwright et McNab ont développé une technique permettant d'obtenir les coumarines avec de bons rendements (75 - 96%) par réaction de Wittig. Dans leur stratégie, la formation du produit se fait par Flash-Vacuum-Pyrolysis (FVP) à haute température (750 °C) permettant l'isomérisation du stéréoisomère E en Z <sup>158</sup>. Dans le mécanisme de la réaction, la formation de la coumarine se fait *via* un intermédiaire cétène (Schéma 33 ci-dessous).

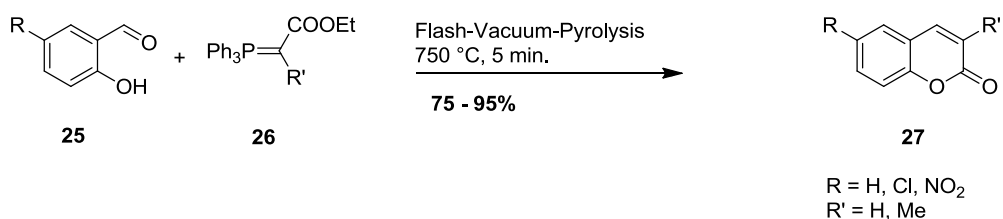


Schéma 33: Formation de coumarines par réaction de Wittig *via* la pyrolyse <sup>158</sup>.

La métathèse peut également être une alternative dans la formation des coumarines non possible *via* les méthodes citées précédemment. Chatterjee et *coll.* ont utilisé cette méthode sur des 2-hydroxybenzaldéhydes substitués. La formation des coumarines se fait à partir des intermédiaires **28** par RCM (Ring Closing Métathésis) en utilisant les catalyseurs de Grubbs au ruthénium de seconde génération avec de bons rendements variant de 75 - 90%<sup>159</sup>. Schmidt et *coll.* ont également utilisé la métathèse pour la conception d'anti-leshmaniose avec des rendements satisfaisants<sup>160</sup> (Schéma 34 ci-dessous).

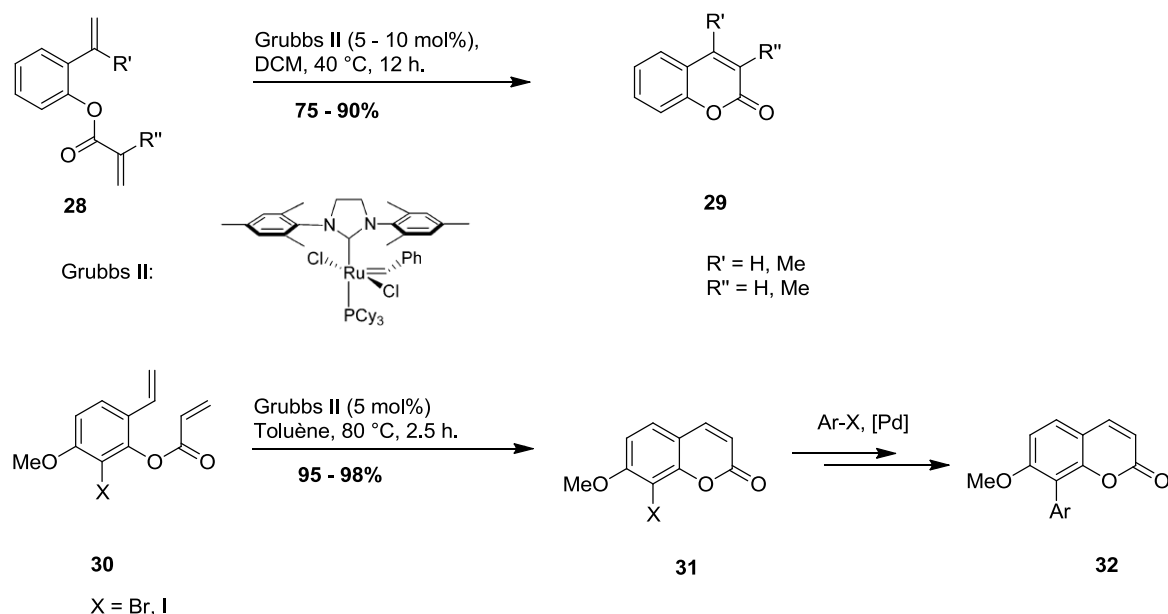
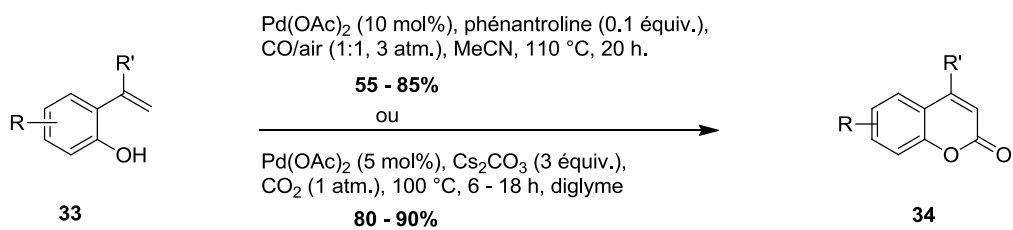
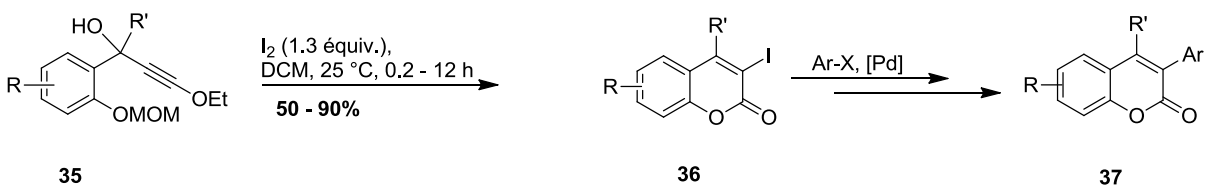


Schéma 34: Formation de coumarine par métathèse.

L'inconvénient majeur de la métathèse est le prix élevé et la sensibilité des catalyseurs à l'oxydation. Les réactions palladocatalysées peuvent être une option intéressante. Plusieurs équipes ont utilisé cette méthode pour former des coumarines. Comme exemple, nous pouvons citer les travaux de Sasano et *coll.* ainsi que Ferguson et *coll.* qui ont formé des coumarines par cyclocarbonylation à partir des 2-hydroxystyrènes respectivement en présence de CO<sub>2</sub><sup>161</sup> et CO<sup>162</sup>. D'autres équipes, comme Song et *coll.* ont formé des coumarines par catalyse au Hf(OTf)<sub>4</sub> à partir des intermédiaires alkyl- ou aryl-alcynes<sup>163</sup>. Reddy et *coll.* ont également utilisé les intermédiaires alkyl- ou aryl-alcynes pour la formation de 3-iodocoumarines par iodo-cyclisation *6-endo-dig* dans des conditions très douces (I<sub>2</sub> dans DCM ou toluène à 25 °C)<sup>164</sup>. Les iodocoumarines peuvent être utilisées comme synthons dans la formation d'autres molécules plus complexes.



R = H, Me, OMe  
R' = H, Me, Ar



R = *i*Pr, Cl, NO<sub>2</sub>  
R' = H, Me, Ph

Schéma 35: Formation de coumarines par réactions palladocatalysées <sup>161-162, 164</sup>.

Après cette présentation des différentes méthodologies de synthèse des dérivés coumariniques, nous allons détailler les synthèses des analogues structuraux du Bleu Trypan dans les paragraphes suivants.

## **Partie A: Synthèse des synthons**



# Introduction

Parmi les dérivés du Bleu Trypan, on distingue les analogues phényldiazényl-naphtalène-disulfoniques (composés de type **A**), les analogues biphényl-naphtalène-disulfoniques (composés de type **B**), et les analogues strictes (composés de type **C**). Ces ligands serviront de référence pour le développement des nouveaux analogues structuraux.

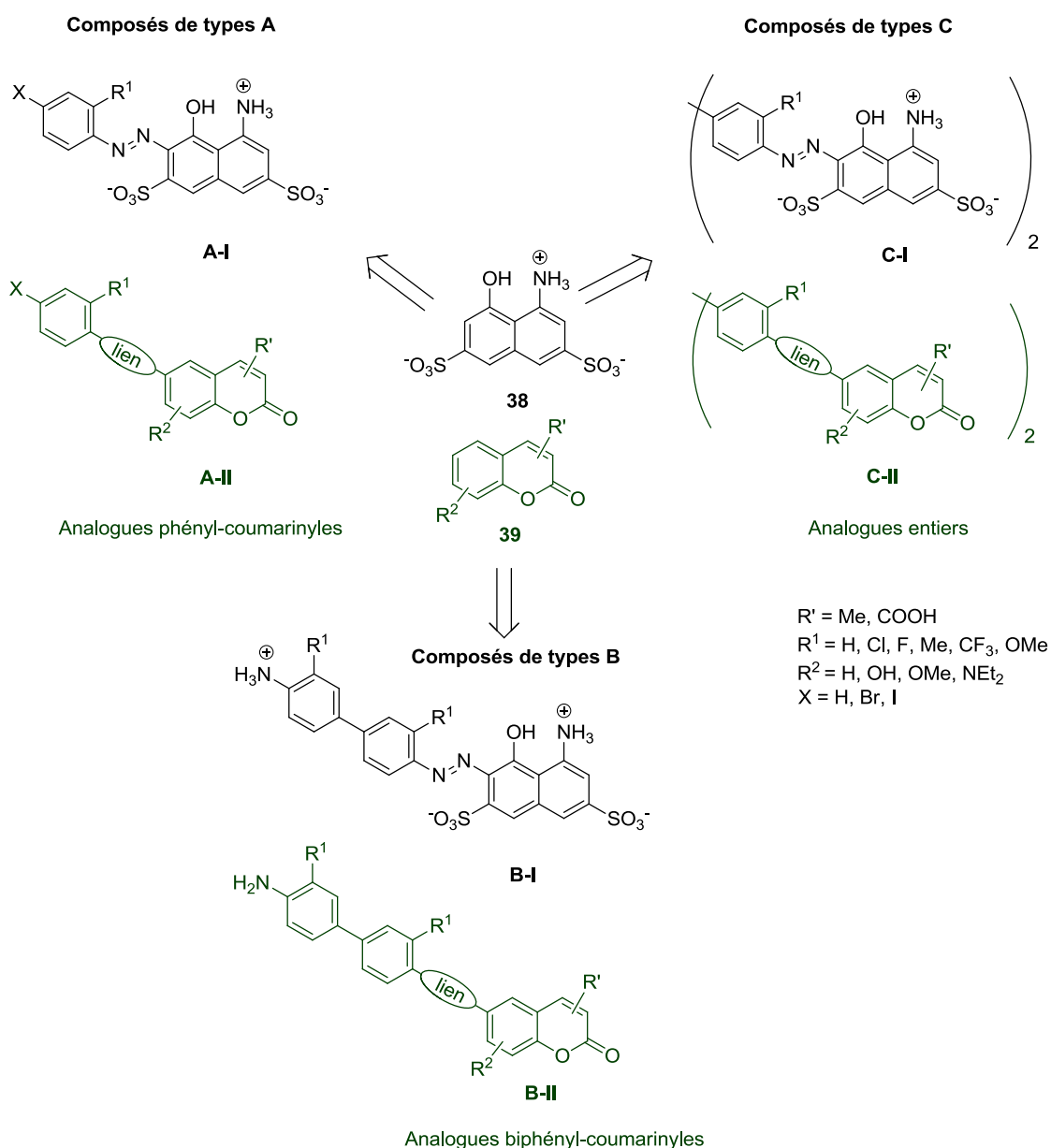
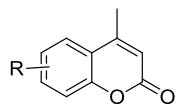


Schéma 36: Structures des différents types de composés.

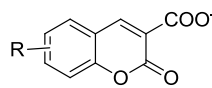
Lors de la synthèse des analogues fluorescents, les équivalents phényl-coumarinyles **A-II** seront d'abord développés. Une comparaison de l'affinité est ensuite effectuée avec le dérivé azoïque **A-I** correspondant pour juger de la potentialité de synthèse des analogues biphényl-

coumarinyles **B-II** et surtout des entiers **C-II** symétriques (dans la partie sur les évaluations des activités biologiques).

Nous avons en notre possession deux types de motifs coumariniques qui seront utilisés comme isostère du naphthyle : les motifs 4-méthyl-coumariniques et 3-carboxy-coumariniques.



40



41

motifs 4-méthyl-coumariniques    motifs 3-carboxy-coumariniques

Schéma 37: motifs coumariniques utilisés comme isostère du BT.

Le remplacement du naphthyle par les motifs 4-méthyl-coumariniques permettrait de prouver l'importance de la charge négative des groupements sulfonates anioniques tandis que les motifs 3-carboxy-coumariniques permettraient de valider cette hypothèse. Dans le **chapitre II**, nous avons montré que l'un de nos principaux objectifs était la variation du lien azo, en liens alcène, alcyne, triazol ou directement lié (sans espaceur). Par conséquent, nous distinguons différentes familles de molécules en fonction de la nature du lien entre le motif aryle hydrophobe et le motif coumarinique polaire (**Schéma 38** ci-dessous) :

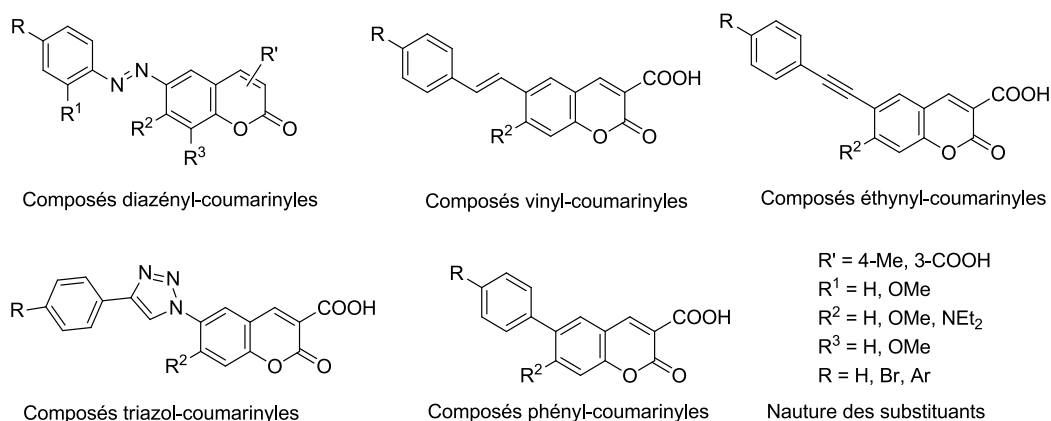


Schéma 38: Liste des analogues phényl-coumarinyles.

Les méthodes utilisées pour la synthèse des composés différeront en fonction de la nature du lien entre le motif coumarinique et le motif aryle. Nous avons envisagé une synthèse convergente dans laquelle les analogues diazényl-coumarinyles seront formés en utilisant des synthons coumariniques simples (coumarines non-substituées sur la position **6**), les analogues éthyne-, styryl- et phényl-coumarinyles, quant à eux, seront obtenus en utilisant des synthons 6-iodo-coumariniques. Enfin, la synthèse des analogues triazol-coumarinyles se fera à partir des synthons 6-azido-

coumariniques. Le **Schéma 39** ci-dessous montre la synthèse convergente des analogues structuraux fluorescents du Bleu Trypan :

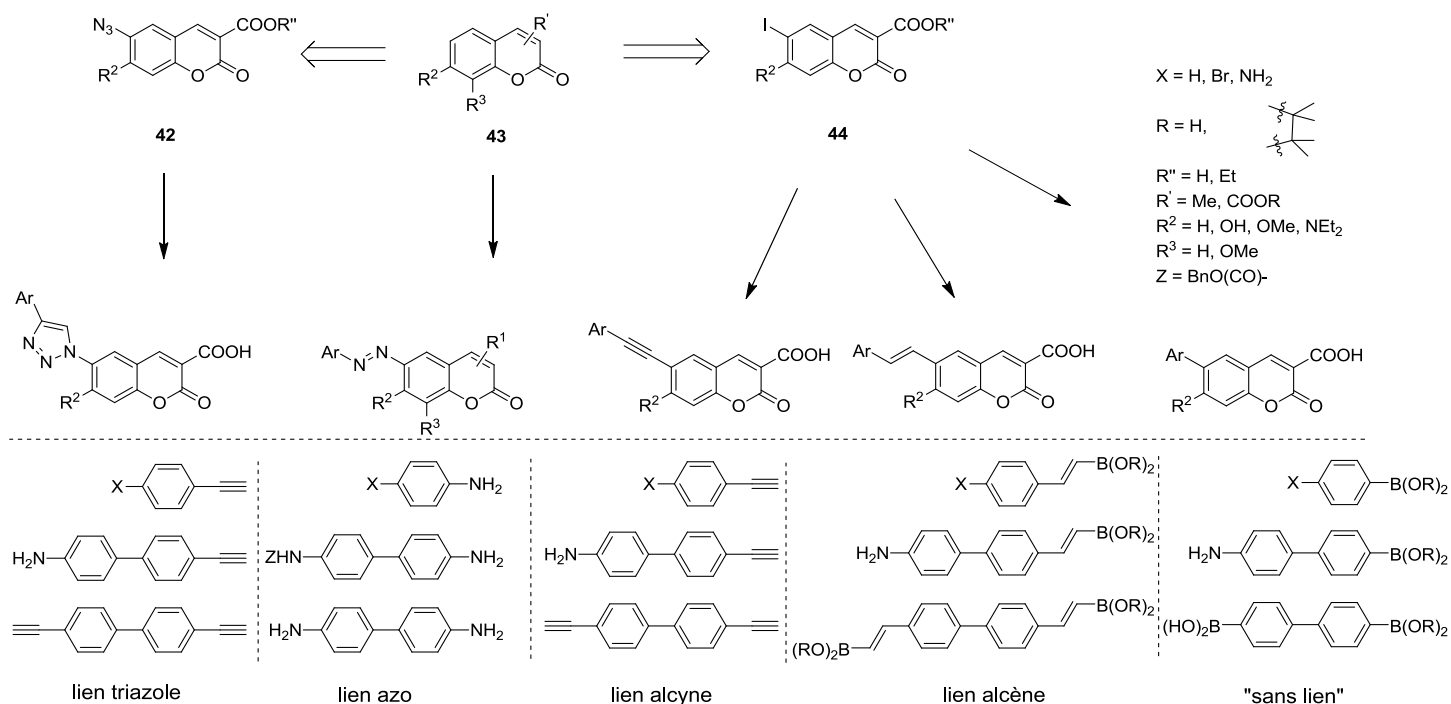


Schéma 39: Synthèse convergente à partir des synthons coumariniques et des précurseurs phényles et biphenyliques.



## IX. Synthèse des synthons coumariniques

Dans ce paragraphe, nous allons détailler la synthèse des synthons coumariniques. On distingue trois types de synthons coumariniques : les synthons coumariniques simples, 6-iodo-coumariniques et 6-azido-coumariniques (**Schéma 40** ci-dessous). Nous allons détailler la synthèse de ces synthons dans les paragraphes suivants.

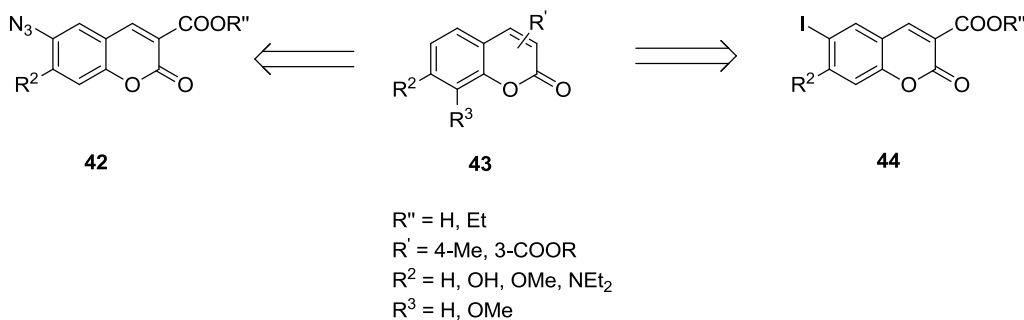


Schéma 40: Structures des synthons coumariniques.

### IX.1. Synthèse de la 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine

Parmi les différentes méthodes permettant l'accès aux 4-méthyl-coumarines, décrites dans l'introduction de ce chapitre, notre choix s'est porté sur la condensation de von Pechmann. La formation de la 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine nécessite l'utilisation du résorcinol, en présence d'un catalyseur acide de Lewis ou de Brønsted. Nous avons effectué la réaction à froid (0 - 5 °C), en présence de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et d'acétoacétate d'éthyle (**Schéma 41** ci-dessous). L'acide sulfurique joue un double rôle, solvant et activateur.

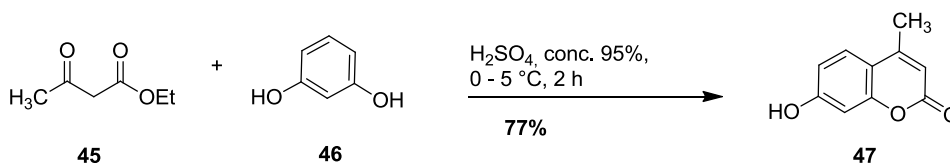


Schéma 41: Formation de la 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine **47** par condensation de von Pechmann.

Un mécanisme plausible a été proposé par Robertson et *coll.* pour la formation des 4-alkyl-coumarines. Ce mécanisme a été vérifié expérimentalement *via* la caractérisation d'un intermédiaire clé stable <sup>165</sup>, et théoriquement *via* des études énergétiques des états de transition et d'intermédiaires réactionnels, par DFT (théorie de la densité fonctionnelle, <sup>166</sup>). Dans ce mécanisme, le noyau aromatique riche en électron réalise d'abord une attaque nucléophile sur la cétone de l'acétoacétate d'éthyle activée par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cette première étape lente est suivie de la rearomatation du cycle aromatique, puis d'une déshydratation (élimination E1) conduisant à l'intermédiaire **47f** relativement stable (un dérivé du cinnamate d'éthyle). Cet intermédiaire est expérimentalement

caractérisable par GC-MS <sup>165c</sup>. La dernière étape concerne la formation de la coumarine par lactonisation à partir de l'isomère Z de l'intermédiaire **47g** (Schéma 42 ci-dessous).

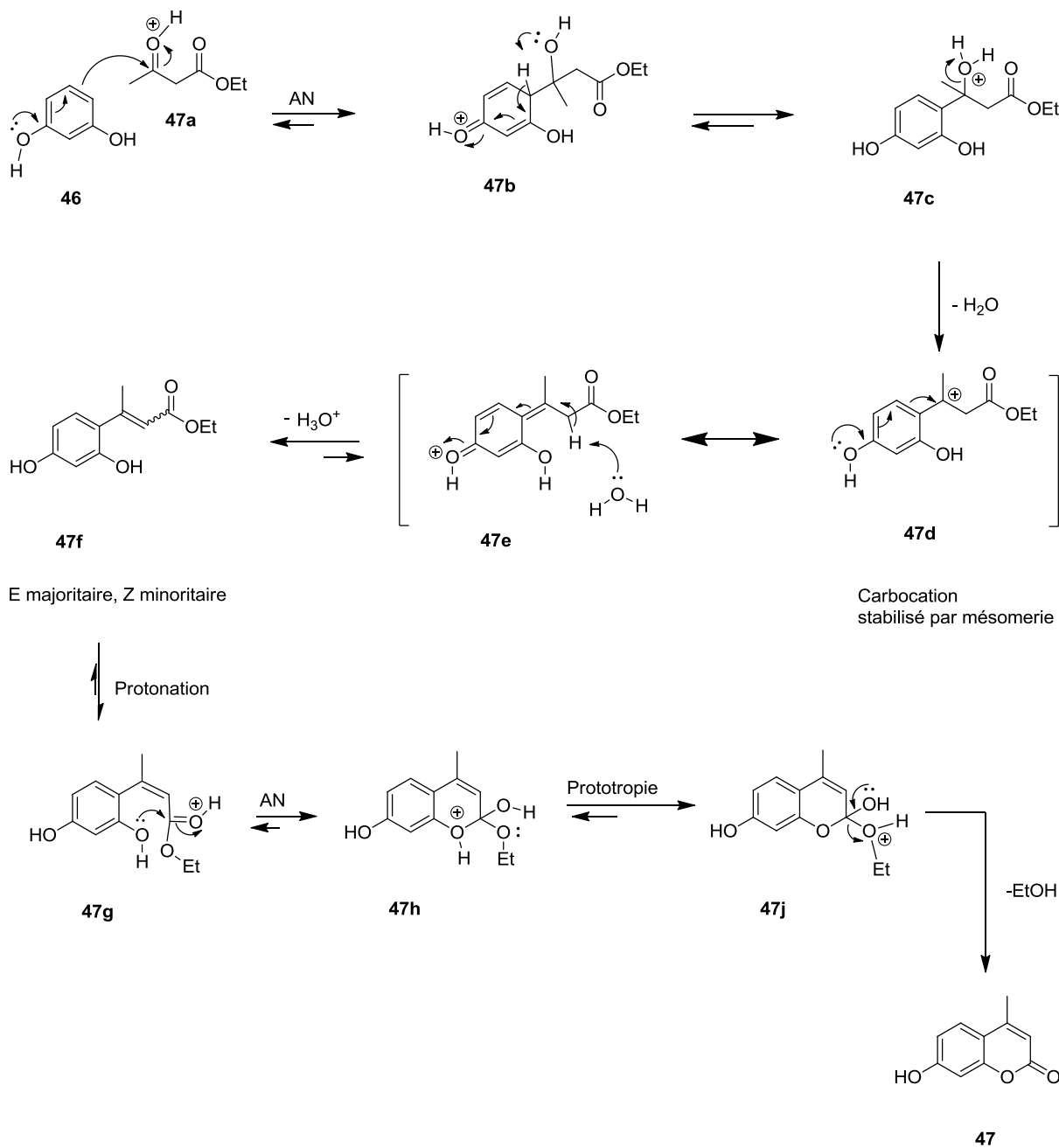


Schéma 42: Mécanisme proposé par Robertson et *coll.* pour la formation de coumarines par la méthode de von Pechmann <sup>150, 165a, 166, 167</sup>.

On remarque le rôle important des protons fournis par  $H_2SO_4$  (initiation de la réaction par activation de l'acétoacétate d'éthyle pour former **47a**). La condensation se fait sur le carbone **4** du réSORCINOL. Elle est cinétiquement défavorisée sur le carbone **2** à cause des effets inducteurs attracteurs associés à l'encombrement stérique engendré par les groupements hydroxyyles.

## IX.2. Synthèse des synthons 3-carboxy-coumariniques

### I.2.1. Synthèses des motifs 3-carboxy-coumariniques simples

#### Conditions réactionnelles et mécanisme

Nous avons effectué la formation des 3-carboxy-coumarines par condensation de Knoevenagel en présence d'un dérivé du 2-hydroxybenzaldéhyde ( $pK_a < 9$ ), d'une base faible comme la pipéridine ( $pK_a = 11.2$ ), de l'acide acétique ( $pK_a = 4.8$ ), et d'un nucléophile comme l'acide de Meldrum ( $pK_a = 4.97$ ) ou le malonate de diéthyle ( $pK_a \approx 13$ ). La pipéridine et l'acide acétique jouent le rôle d'activateur, ils sont ajoutés en quantité catalytique. La réaction se fait dans l'éthanol à reflux (**Schéma 43** ci-dessous).

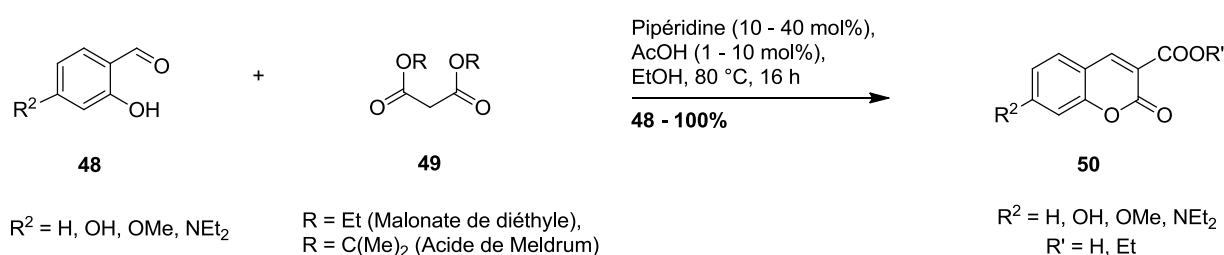


Schéma 43: Formation de 3-carboxy-coumarines à partir du malonate de diéthyle et l'acide de Meldrum.

Le mécanisme de formation de la coumarine est similaire lors de l'utilisation des deux composés **49**. Nous allons présenter le mécanisme dans le cas de l'acide de Meldrum. Deux mécanismes sont généralement admis: *via* la formation d'un aminal<sup>168</sup> ou d'un iminium<sup>169</sup>. La condensation *via* l'aminal, proposée par Bednarz et *coll.* en 2009, est favorisée dans les solvants aprotiques comme le toluène tandis que la condensation *via* l'iminium, proposée par Hann et Lapworth en 1904, est favorisée dans les solvants protiques. La réalisation de la réaction dans l'éthanol (solvant protique), et notamment la présence de l'acide acétique, favorisent donc la formation de l'iminium **50a**<sup>168-170</sup>. La pipéridine catalyse la condensation de l'acide de Meldrum sur ce dernier pour former l'intermédiaire **50d** *via* un mécanisme de type E1cB (élimination monomoléculaire à partir de la base conjuguée). La dernière étape conduit à la formation de la coumarine **50** par lactonisation.



## Formation des produits

### a. A partir de l'acide de Meldrum

L'avantage de l'acide de Meldrum est l'obtention de l'acide carboxylique directement à la fin de la réaction. La condensation de Knoevenagel, réalisée en présence de l'acide de Meldrum, n'a malheureusement pas permis l'obtention des produits souhaités à cause de problèmes de purification des coumarines acides. Pour cette raison, nous avons remplacé l'acide de Meldrum par le malonate de diéthyle.

### b. A partir du malonate de diéthyle

Les coumarines obtenues à la fin de la réaction, avec le malonate de diéthyle, sont des éthyl-coumarine-3-carboxylates. L'ester éthylique est saponifié pour former le 3-carboxy-coumarine-acide final (**Schéma 46** ci-dessous).

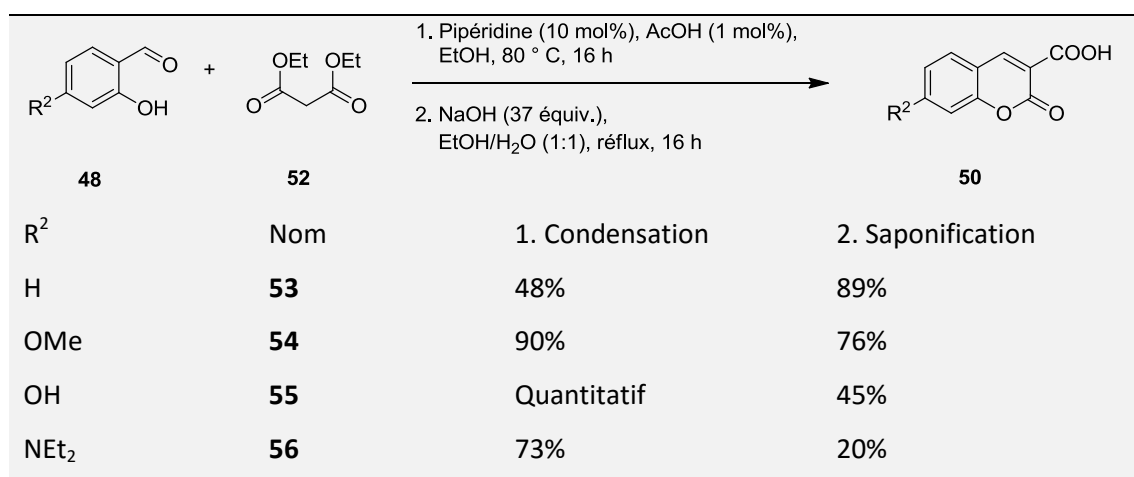


Schéma 46: Formation de 3-carboxy-coumarines à partir du malonate de diéthyle par condensation de Knoevenagel.

Les rendements de la condensation et de la saponification varient beaucoup en fonction de la nature des substituants du dérivé 2-hydroxybenzaldéhyde. La trituration dans EtOH, quoi que responsable du rendement faible de l'étape de saponification, est nécessaire pour obtenir les produits purs sans passer par une purification fastidieuse sur colonne chromatographique. Comme indiquée dans le **Schéma 45**, la réactivité de l'hydroxybenzaldéhyde vis-à-vis du malonate de diéthyle s'améliore en présence des groupements électrodonneurs, de même que le rendement de la réaction.

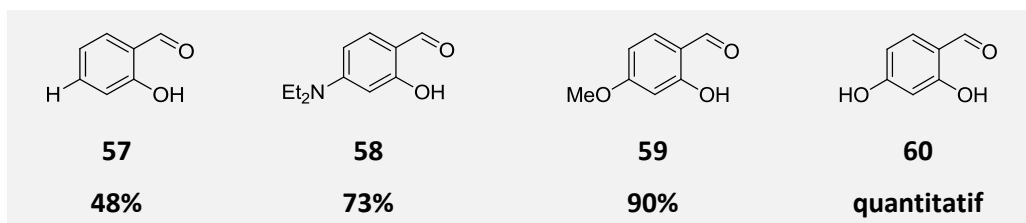


Schéma 47: Réactivité des hydroxybenzaldéhydes substitués vis-à-vis du malonate de diéthyle.

### IX.2.2. Synthèse des synthons 6-iodo-coumariniques

La synthèse des synthons 6-iodo-coumariniques peut se faire par iodation à partir des hydroxybenzaldéhydes **63** (iodation suivie de la formation de la coumarine, voie 1), ou à partir des motifs coumariniques simples **50** correspondants, par iodation (voie 2).

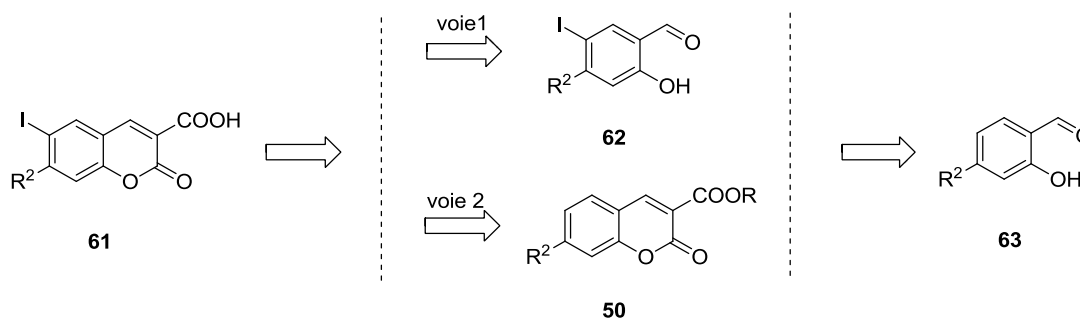


Schéma 48: Rétrosynthèse de synthons 6-iodo-3-carboxy-coumariniques.

#### Voie 1 (iodation sur l'hydroxybenzaldéhyde substitué)

Nous avons effectué la synthèse de quatre synthons 6-iodo-coumariniques. Deux motifs (6-iodocoumarine et 6-iodo-7-méthoxy-coumarine), dont les formations *via* la voie 1 conduisent à des rendements globaux faibles (< 10%), ont finalement été synthétisés *via* la voie 2, par iodation sur le 2-hydroxybenzaldéhyde substitué **63** suivie de la formation de la 6-iodocoumarine **61** (Schéma 49 ci-dessous).

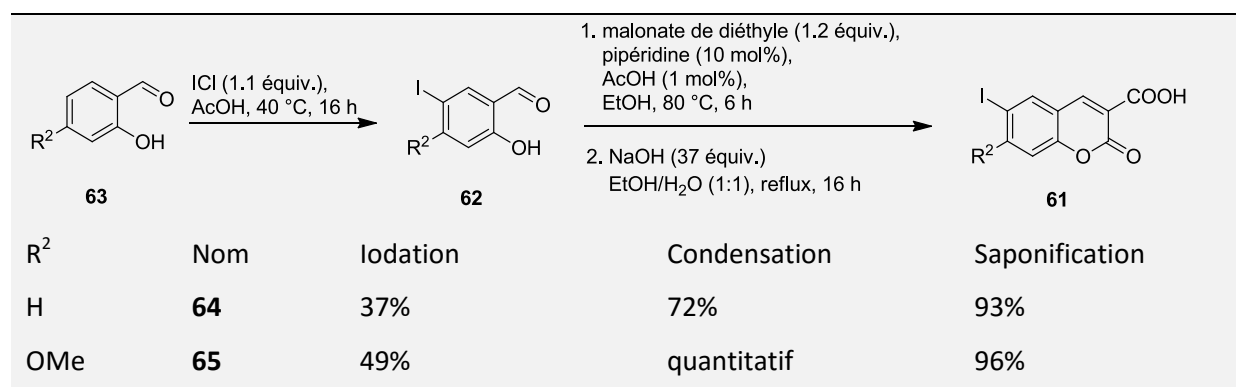


Schéma 49 : Formation des synthons 6-iodo-coumariniques précurseurs **64** et **65**.

## Voie 2 (iodation sur la coumarine)

Les deux autres motifs 6-iodo-coumariniques (7-(diéthylamino)-6-iodocoumarine **66**, et 7-hydroxy-6-iodocoumarine **67**) ont été formés différemment. La 7-(diéthylamino)-6-iodocoumarine **66** se forme par iodation sur la 7-(diéthylamino)-coumarine-acide **56**. La réaction a lieu en milieu basique en présence de diiode et d'une solution saturée d'iodure de potassium (**Schéma 50** ci-dessous).

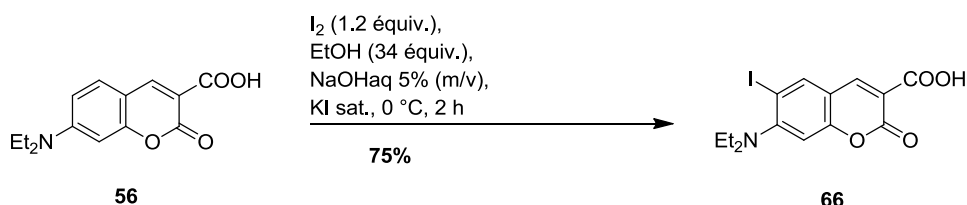


Schéma 50 : Synthèse de la 7-(diéthylamino)-6-iodocoumarine **66**.

Lors de la réaction, le carbone **6** de la coumarine, enrichi en électron par le doublet libre du groupement 7-diéthylamino, opère une attaque nucléophile sur le diiode suivie de la rearomatization rapide pour conduire à la formation du produit iodé. De plus, en milieu basique (excès de NaOH), la coumarine peut subir une ouverture par attaque nucléophile de l'anion hydroxyde<sup>171</sup>. L'ouverture de la coumarine améliore beaucoup la réactivité du cycle aromatique, notamment au niveau du carbone **6**. Le carbone **8** est moins nucléophile et encombré par les deux groupements (7-diéthylamino et hydroxyle). Le mécanisme proposé est décrit dans le **Schéma 51** ci-dessous:

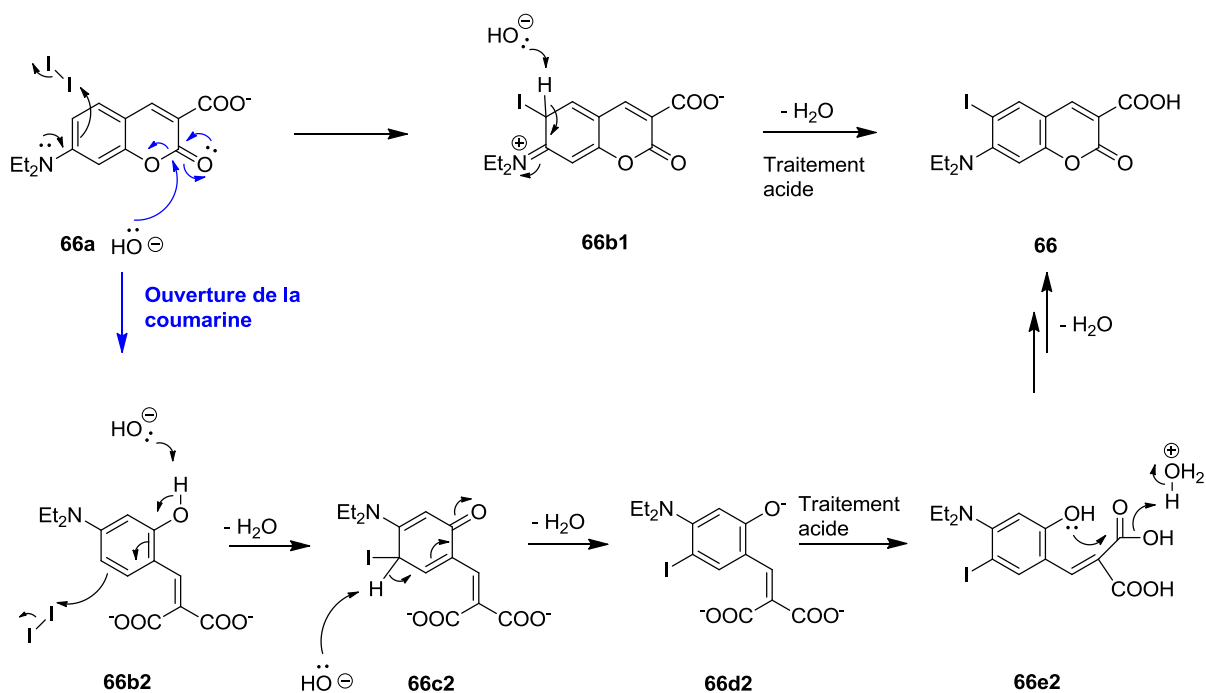


Schéma 51: Mécanisme proposé pour la formation de la 7-(diéthylamino)-6-iodocoumarine **66** en milieu basique.

○ **Cas particulier de la 7-hydroxy-6-iodocoumarine 67**

Différentes méthodes de rétrosynthèse ont été envisagées pour la formation de la 7-hydroxy-6-iodocoumarine **67**. Elle peut se faire par iodation à partir de la coumarine **55** (voie 1), par deméthylation à partir de la coumarine **65** (voie 2), par iodation du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **60**, ou du 4-(benzyloxy)-hydroxybenzaldéhyde **71** suivie de la formation de la coumarine (voie 3a et 3b), ou par débenzylation à partir de la coumarine **69** (voie 4). Le **Schéma 52** ci-dessous présente des voies de rétrosynthèse possibles envisagées :

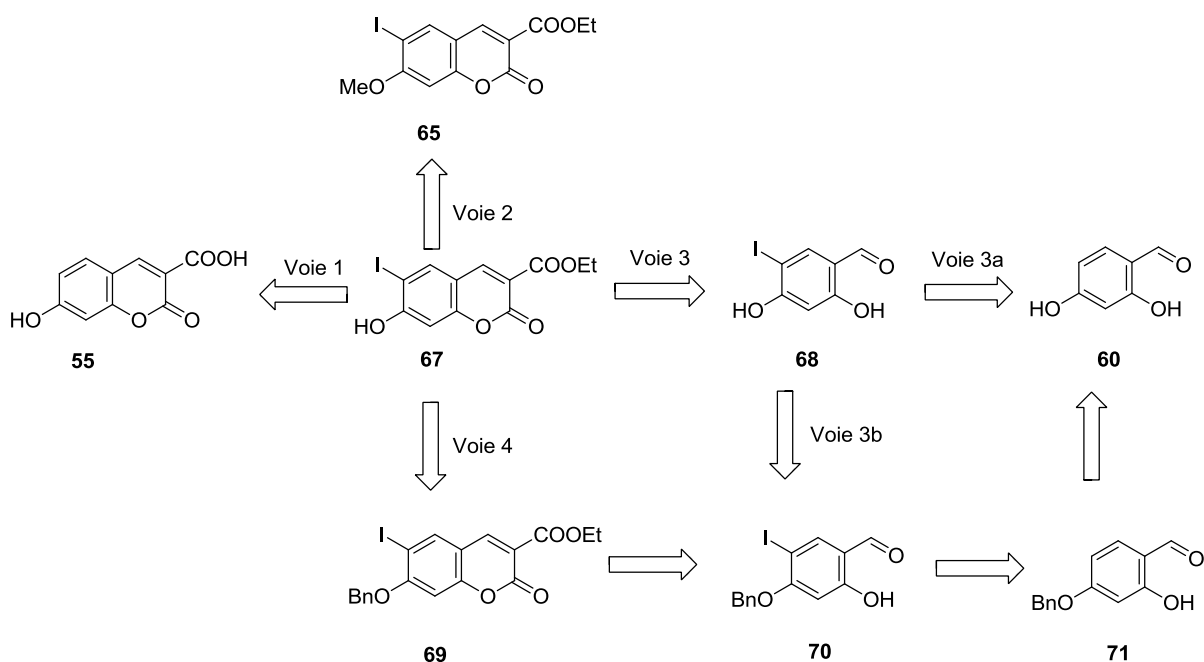


Schéma 52: Rétrosynthèse pour la formation de la 7-hydroxy-6-iodocoumarine **67**.

**i. Voie 1 : Iodation sur la 7-hydroxycoumarine 55**

La réaction se fait en milieu basique dans l'éthanol en présence d'iodure de potassium et de diiode (**Schéma 53** ci-dessous).

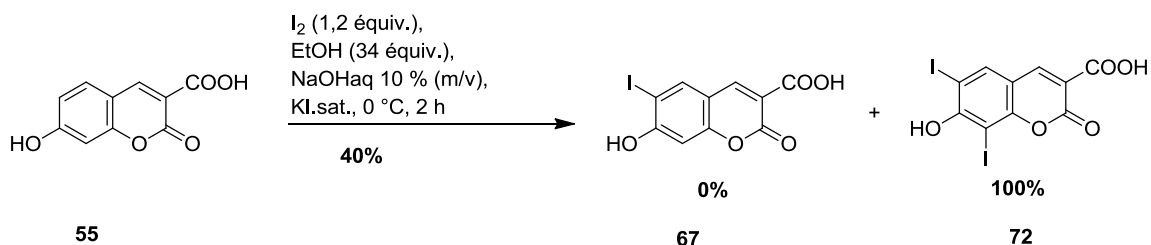


Schéma 53: Iodation de la 7-hydroxy-3-carboxycoumarine **55** en milieu basique.

Cette méthode ne conduit malheureusement pas à la formation du produit souhaité. On obtient uniquement la formation du produit de diiodation. Le mécanisme de la réaction est similaire à celui de l'iodation de la 7-(diéthylamino)-coumarine (cf. Schéma **51**). Il permet d'expliquer la



diiodation. L'ouverture de la coumarine améliore la réactivité du cycle aromatique. Le produit de mono-iodation **67**, formé en premier, reste très nucléophile et réagit de nouveau avec un second équivalent de diiode pour conduire au produit de diiodation **72**.

### ii. Voie 2 : Deméthylation de la 6-iodo-7-méthoxy-coumarine 65

La deméthylation se fait en présence d'un excès d'acide bromique, ou en présence du tribromure de bore suivant le **Schéma 54** ci-dessous :

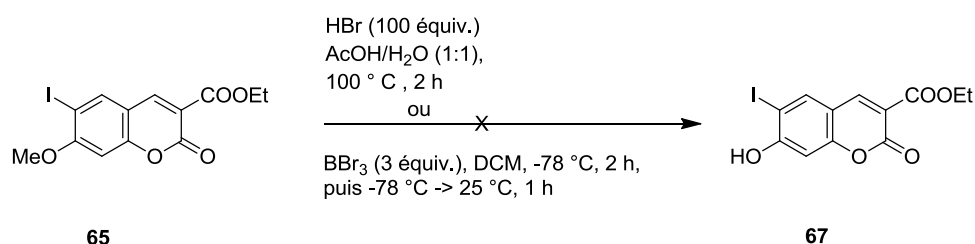


Schéma 54: Formation de la 7-hydroxy-6-iodocoumarine par deméthylation.

Malheureusement, ces conditions ne permettent pas la formation du produit souhaité (**67**). Nous observons soit l'hydrolyse d'une partie de l'ester éthylique (réaction avec HBr), soit la dégradation de la coumarine (réaction avec HBr et BBr<sub>3</sub>). Nous avons alors envisagé la formation du produit par iodation sur les 2-hydroxybenzaldéhydes substitués **60** et **71** (voie 3).

### iii. Voie 3 : Iodation sur un 2-hydroxybenzaldéhyde substitué

L'iodation du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **60** se fait dans l'acide acétique en présence du monochlorure d'iode (**Schéma 55** ci-dessous).

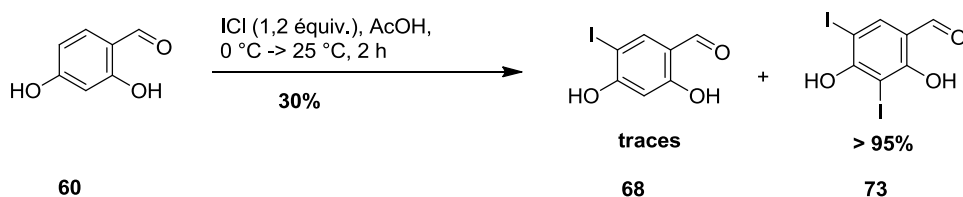


Schéma 55: Iodation du 2,4 dihydroxybenzaldéhyde par le monochlorure d'iode.

Cette réaction conduit malheureusement à la formation du produit de diiodation **73**. Nous avons estimé que la très grande réactivité du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **60** était à l'origine de la formation du produit de diiodation. Finalement, nous avons protégé le groupement hydroxyle situé sur le carbone 4 par un benzyle afin de diminuer la nucléophilie du cycle aromatique. L'iodation, réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, permet la formation du produit monoiodé **70** avec un bon rendement (60%). Cependant, la déprotection du O-benzyle en présence de HBr/AcOH ne conduit pas à la formation du produit **68** souhaité (**Schéma 54**). Finalement, la

réaction, effectuée en présence de tribromure de bore à -78 °C, permet la déprotection et l'obtention de l'intermédiaire **68** avec un très bon rendement (86%). La formation de la coumarine **67** se fait avec un rendement faible de 15% (**Schéma 56** ci-dessous).

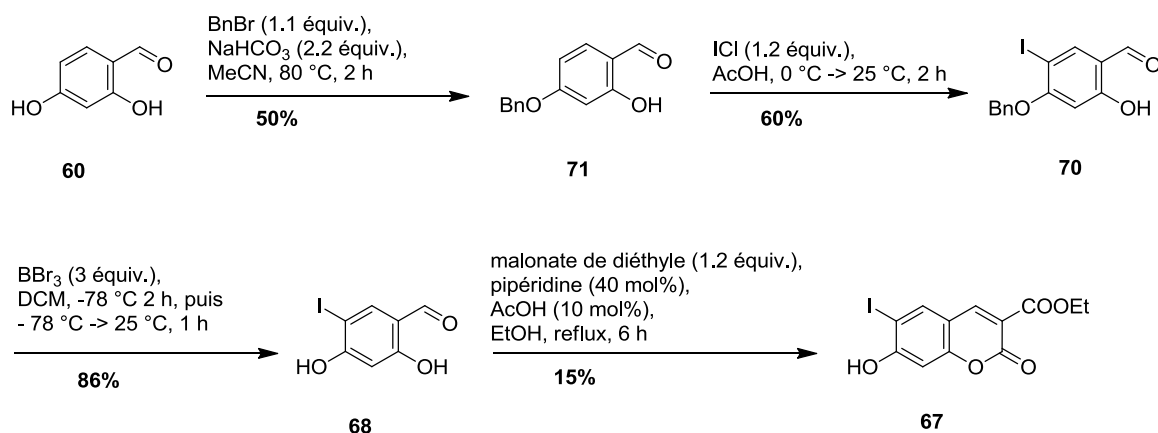


Schéma 56: Synthèse du produit 2,4-dihydroxy-5-iodo-benzaldéhyde.

On notera que, la déprotection à partir de la 7-(benzyloxy)-6-iodocoumarine **69** n'a pas conduit pas à l'obtention de la coumarine **67** souhaitée (voie 2-b). La réaction a été réalisée en présence du Pd/C 10% (pas de réaction ou désiodation de la coumarine à 4 bars de H<sub>2</sub>).

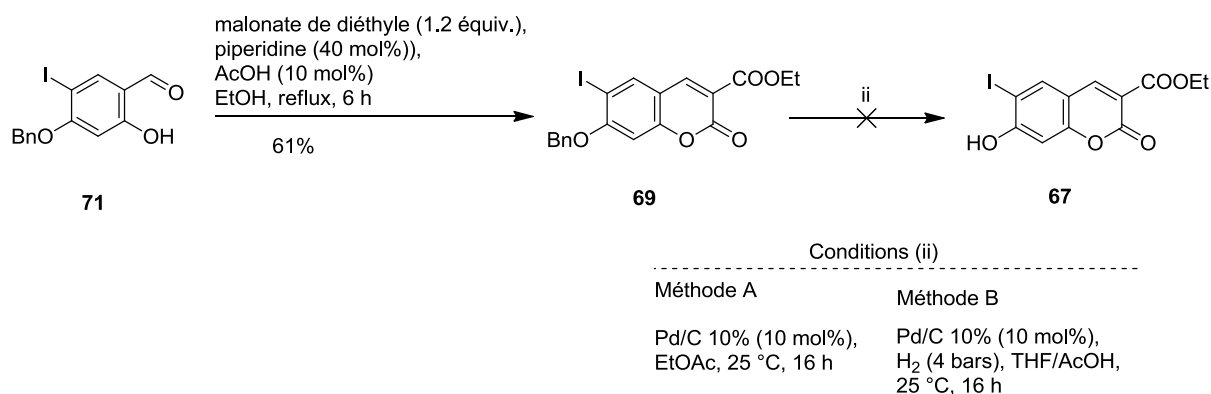


Schéma 57: Déprotection du groupement benzyle.

### i. Conclusion

En conclusion, nous avons formé quatre synthons 6-iodo-coumariniques. Le tableau ci-dessous regroupe les synthons avec les rendements sur les deux dernières étapes.

| R <sup>2</sup>   | R  | Composé   | Rendement |
|------------------|----|-----------|-----------|
| H                | Et | <b>64</b> | 25%       |
| OMe              | H  | <b>65</b> | 47%       |
| OH               | Et | <b>67</b> | 4%        |
| NEt <sub>2</sub> | H  | <b>66</b> | 11%       |

Tableau 2: Résumé des synthons 6-iodo-coumariniques formés avec leurs rendements

### IX.2.3. Synthèse des synthons 6-azido-coumariniques

Nous avons effectué la formation des synthons 6-azido-coumariniques en envisageant deux voies de rétrosynthèse : par azidation direct à partir du synthon 6-iodo-coumarinique **61** (voie 1) ou par réaction de Sandmeyer à partir d'une 6-aminocoumarine **74** (voie 2). Le **Schéma 58** ci-dessous résume la rétrosynthèse.

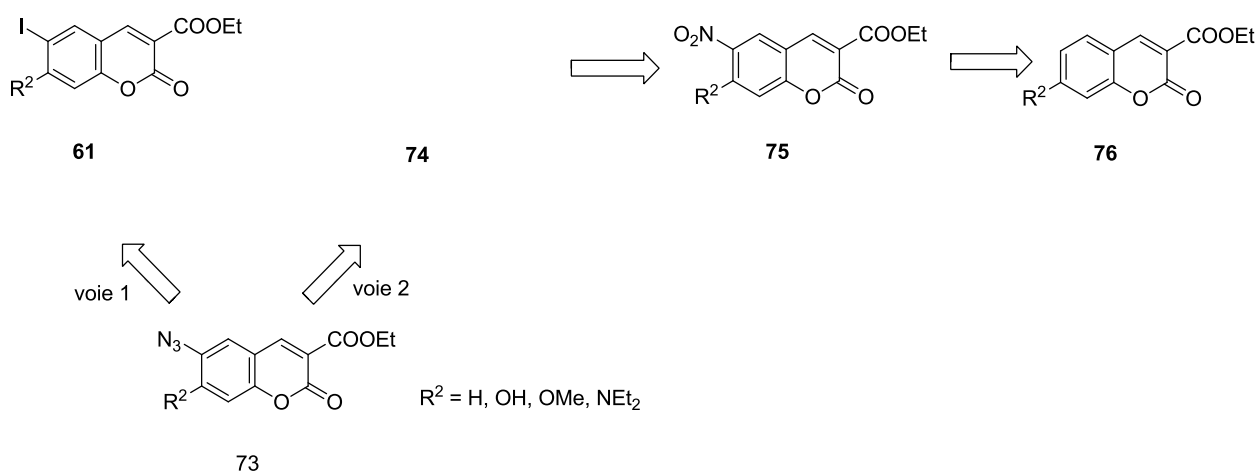


Schéma 58: Rétrosynthèse des synthons 6-azido-coumariniques.

#### a. Voie 1 : Azidation à partir de synthons 6-iodo-coumariniques

Nous avons essayé trois protocoles de synthèse pour l'azidation sur les 6-iodocoumarines. Le

**Schéma 59** ci-dessous résume les différentes conditions utilisées :

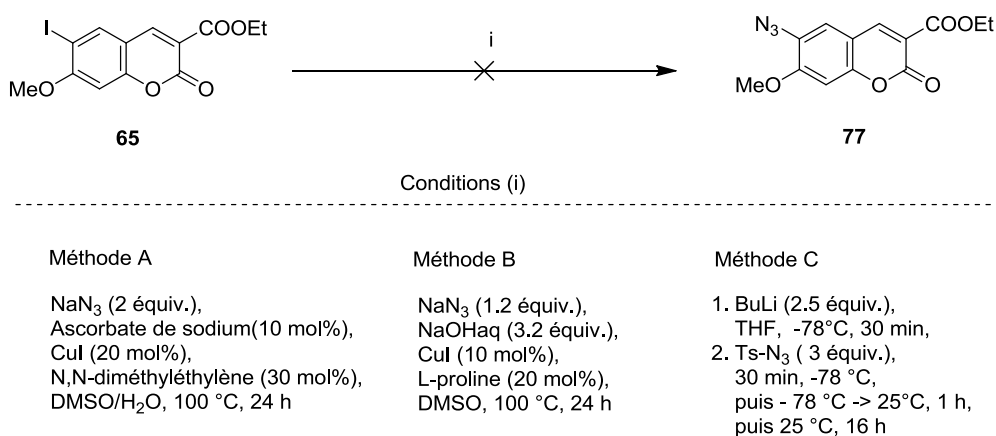


Schéma 59: Azidation sur la 6-iodo-7-méthoxy-coumarine **65**.

Les trois méthodes n'ont pas permis la formation du produit souhaité :

- Nous avons effectué l'azidation sur la 6-iodo-7-méthoxy-coumarine **65** en présence d'iodure de cuivre, d'azoture de sodium, d'ascorbate de sodium et de N,N diméthyléthylène. On récupère alors la coumarine de départ à la fin de la réaction (pas de réaction).
- Nous avons ensuite effectué l'azidation en présence d'iodure de cuivre, d'azoture de sodium, de L-Proline et de NaOHaq. Ce mélange ne permet non plus pas l'incorporation de l'azide N<sub>3</sub>. On récupère de nouveau le réactif (pas de réaction).
- Finalement nous avons réalisé une ortho-lithiation en présence de butyl-lithium à -78 °C suivie de l'azidation en présence de l'azoture de tosylo. On observe alors une dégradation de la coumarine dans ces conditions.

Nous avons finalement adopté la voie 2 pour la formation des synthons 6-azido-coumariniques **73**.

*b. Voie 2 : Formation par réaction de Sandmeyer*

Nous avons effectué la formation de quatre synthons 6-azido-coumariniques. La réaction a lieu par nitration de synthons coumariniques simples **50** dans un mélange H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>.conc à 25 °C, suivie de la réduction des nitrocoumarines **75** en présence d'un excès de Fe<sup>(0)</sup> et du NH<sub>4</sub>Cl, pour former, *in fine*, les aminocoumarines **74** avec des rendements moyens (40 - 60%). La réaction de Sandmeyer se fait par diazotation en présence du nitrite de sodium, suivie de la substitution nucléophile aromatique en présence l'azoture de sodium. On obtient les azidocoumarines avec des rendements variant entre 20 - 85% (**Schéma 60** ci-dessous).

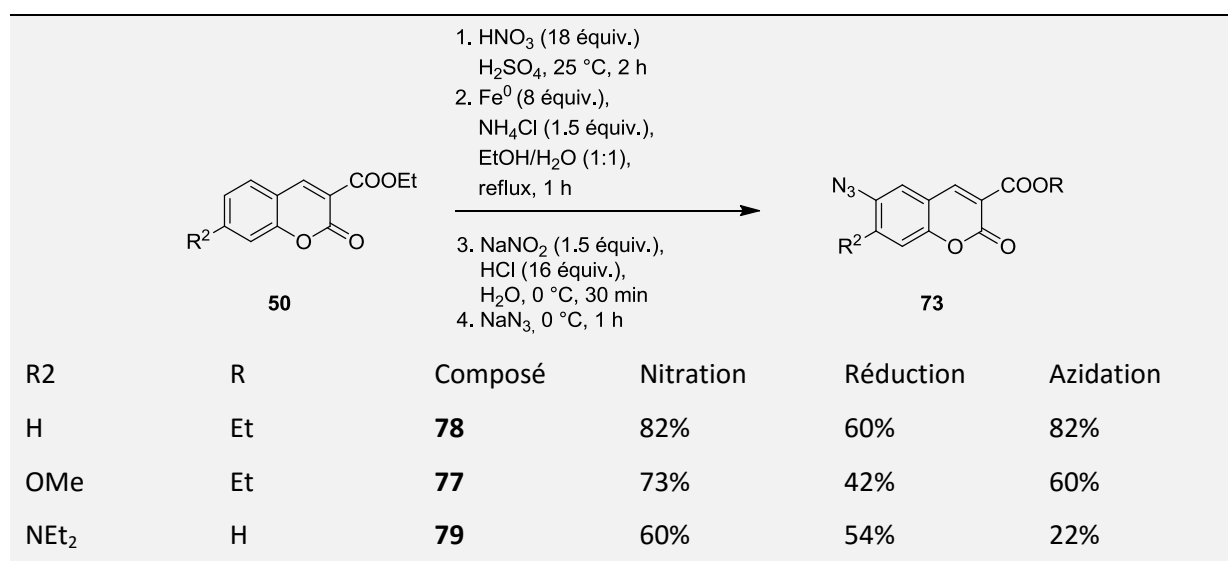


Schéma 60: Formation des azidocoumarines par réaction de Sandmeyer.

On notera que, pour limiter les problèmes de solubilité, l'azidation (diazotation suivie de la réaction de Sandmeyer) est réalisée sur la forme acide de la coumarine 7-(diéthylamino)-coumarine. Sa saponification a été effectuée en milieu basique (NaOHaq 10%, EtOH, reflux, 16 h) avec un rendement moyen (50%). Les rendements de la réaction de Sandmeyer varient en fonction de l'encombrement stérique du substituant sur le carbone **7**, en ortho du groupement partant (diazonium => N<sub>2</sub>). Ainsi, nous observons un bon rendement lors de la formation de la 6-azidocoumarine (**78**, 82%), la 6-azido-7-méthoxy-coumarine (**77**, 60%), et un rendement faible pour la 6-azido-7-(diéthylamino)-coumarine (**79**, 22%). En outre de l'encombrement stérique, la faible solubilité est un facteur expliquant la mauvaise réactivité de la 6-amino-7-(diéthylamino)-coumarine.

○ Cas particulier de la 6-azido-7-hydroxycoumarine **80**

La formation du composé **80** peut se faire par différentes méthodes. Nous avons exploré cinq voies: (i) par deméthylation à partir de la 6-azido-7méthoxy-coumarine **77** (voie 1), (ii) par azidation à partir de la 7-hydroxy-6-iodocoumarine **67** (voie 2), (iii) par réaction de Sandmeyer à partir de la 6-amino-7-hydroxycoumarine **81** (voie 3), (iv) par déprotection à partir de la 7-(benzyloxy)-coumarine **83** (voie 4), (v) ou par condensation de Knoevenagel à partir de la 5-azido-dihydroxy-benzaldéhyde **85** (voie 5) :

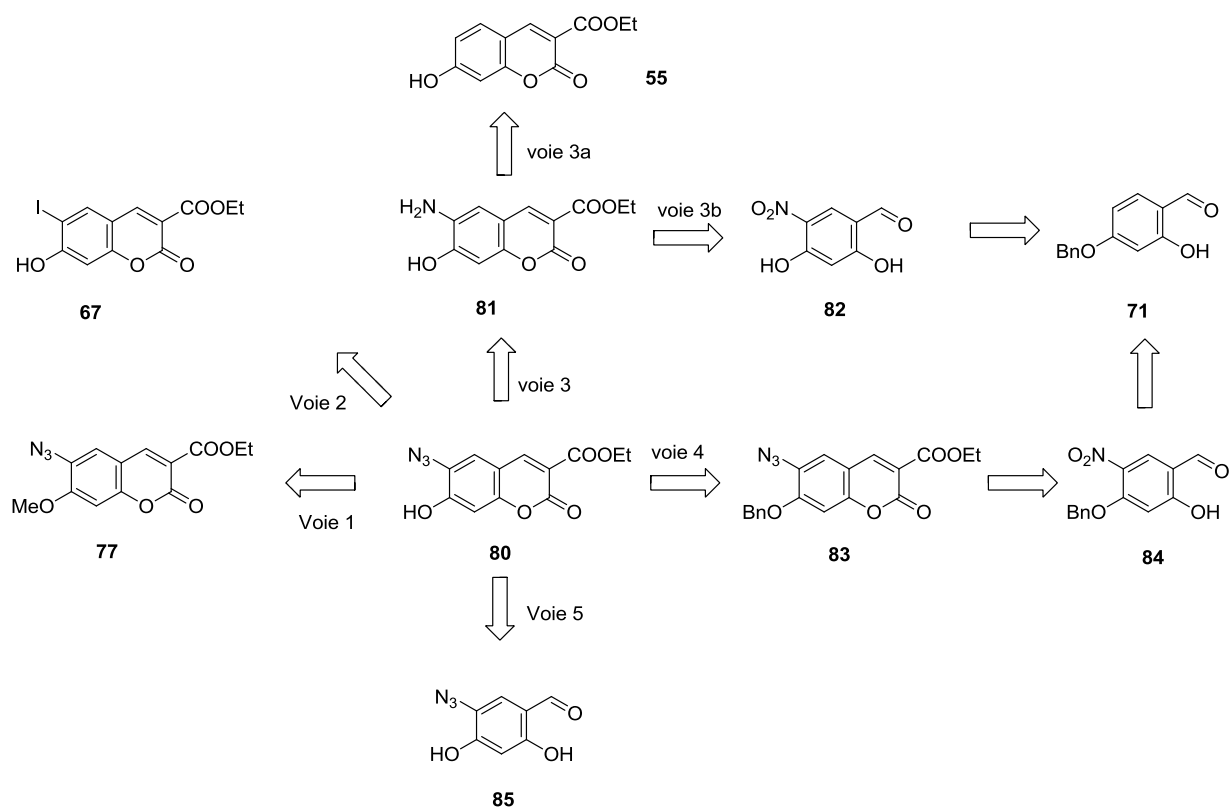


Schéma 61: Rétrosynthèse de la 7-hydroxy-6-azidocoumarine **80**.

*i. Voie 1, 2, 3*

La deméthylation et l'azidation, respectivement à partir de la 6-azido-7-méthoxy-coumarine **77** (voie 1) et la 7-hydroxy-6-iodocoumarine **67** (voie 2), ne permettent pas la formation du produit **80** souhaité (méthodologies décrites précédemment, cf. Schéma 54 et

Schéma 59). Nous avons donc opté pour la synthèse à partir de la 6-amino-7-hydroxycoumarine **81**. Nous avons effectué la formation de la coumarine **86** à partir de la 7-hydroxycoumarine **240** en présence d'HNO<sub>3</sub>.conc dans l'acide acétique (Schéma 62 ci-dessous).

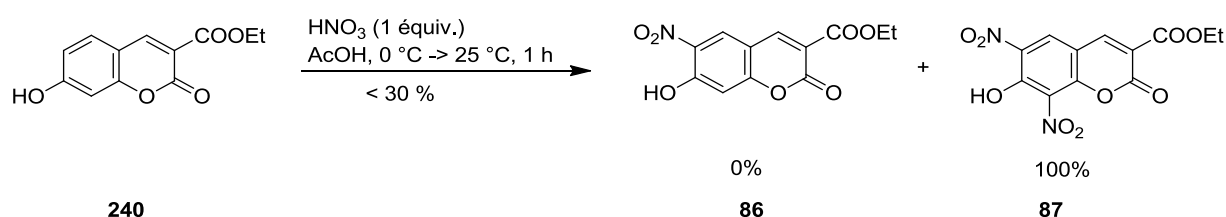


Schéma 62: Nitration sur la 7-hydroxy-3-carboxy-coumarine **240**.

Malheureusement, la réaction conduit uniquement au produit de di-nitration **87** (voie 3a). Nous avons donc testé la synthèse du produit (**80**) à partir du 7-(benzyloxy)-2-hydroxybenzaldéhyde **71** (voie-3b). La formation de l'aminocoumarine **81** se fait en quatre étapes suivant la séquence «nitration, déprotection du O-benzyle, formation de la coumarine, réduction du NO<sub>2</sub> en NH<sub>2</sub>». L'aminocoumarine sera ensuite transformée en azidocoumarine par réaction de Sandmeyer (Schéma 63 ci-dessous).

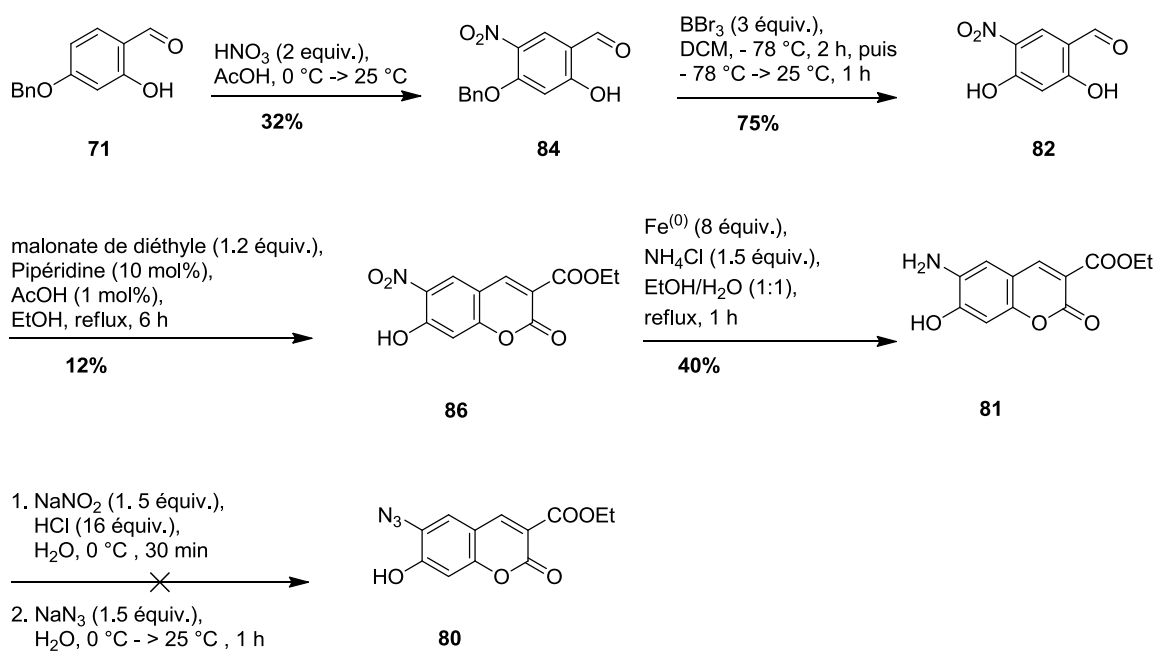


Schéma 63: Formation de la 6-azido-7-hydroxycoumarine **80**.

La réaction de Sandmeyer en présence d'azoture de sodium ne conduit malheureusement pas à la formation de la 6-azido-7-hydroxycoumarine **80** souhaitée. Nous constatons la dégradation du réactif.

*ii. Voie 4*

Nous avons donc protégé le groupement 7-hydroxyle par un benzyle (voie 4, **Schéma 64** ci-après). La 4-(benzyloxy)-5-nitrobenzaldéhyde **84** conduit à la formation de la 6-azido-7-(benzyloxy)-coumarine **83** sur trois étapes avec un rendement global de 37%. La réaction se fait suivant la séquence « (i) formation de la coumarine **88**, (ii) réduction du groupement NO<sub>2</sub> pour donner l'aminocoumarine **89**, (iii) réaction de Sandmeyer en présence d'azoture de sodium pour former l'azidocoumarine **83** ». La déprotection est la dernière étape. Elle se fait en présence de BBr<sub>3</sub> à -78°C (**Schéma 64** ci-dessous).

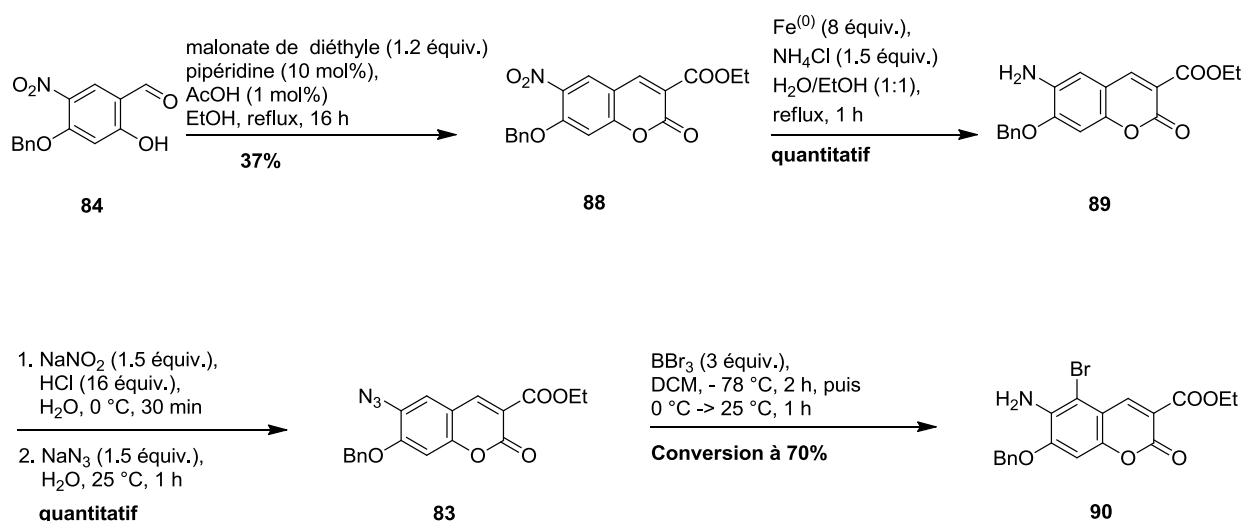


Schéma 64: Formation de la 6-azido-7-hydroxycoumarine par la voie 4.

Malheureusement, la déprotection du O-benzyle de l'azidocoumarine **83**, en présence de BBr<sub>3</sub>, conduit uniquement à la formation du produit de bromation **90**. Le mécanisme proposé pour la bromation est présenté dans le **Schéma 65**. Le bore active l'électrophilie de la coumarine en rendant le carbone **5** très réactif. Un anion bromure s'additionne alors en conduisant à la perte de N<sub>2</sub>. Enfin, la rearomatisation permet d'obtenir le dérivé 6-amino-7-(benzyloxy)-5-bromo-coumarine **90** (**Schéma 65** ci-dessous).

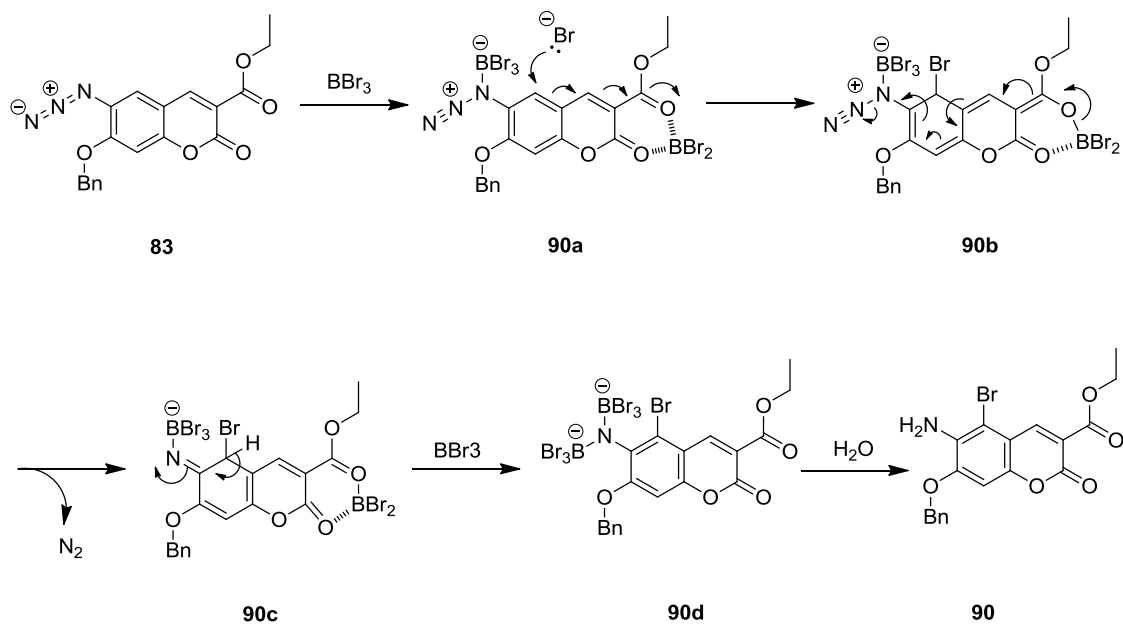
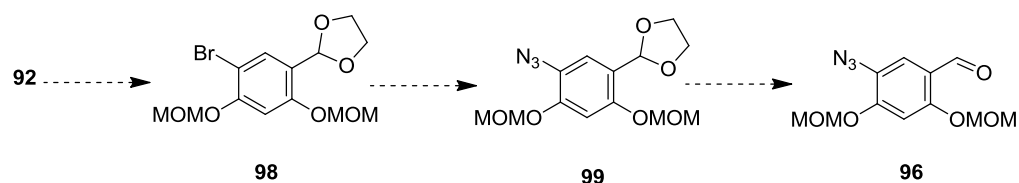
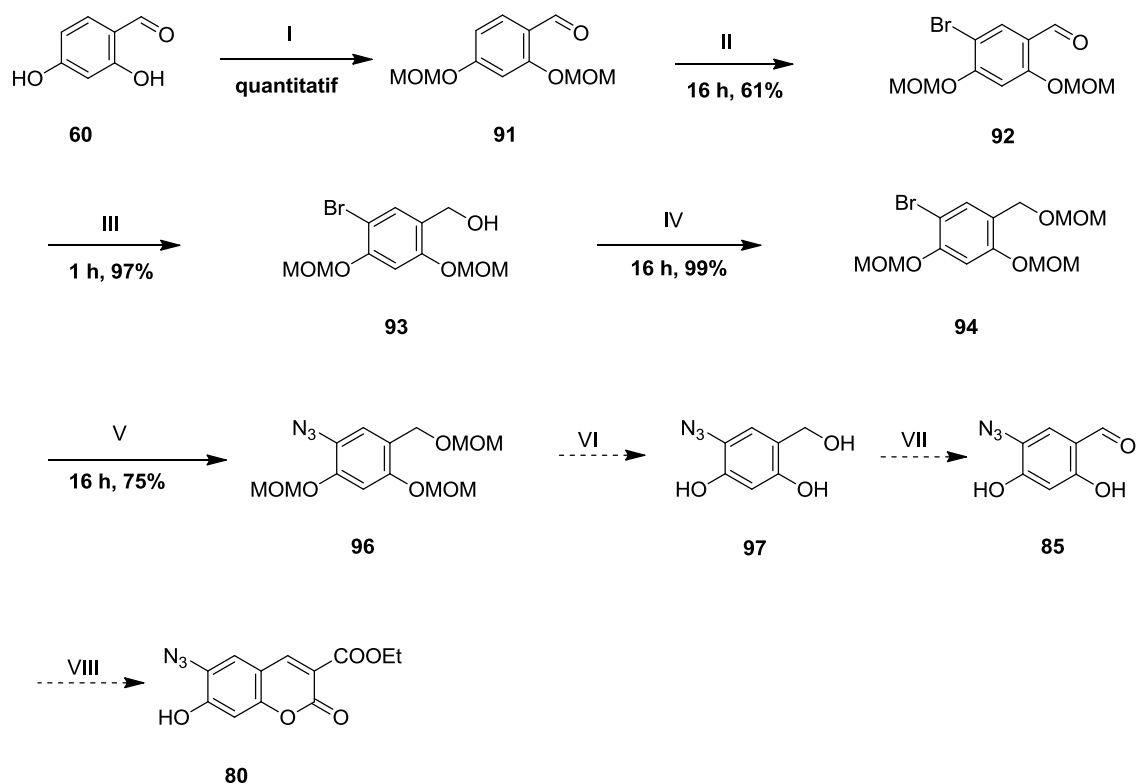


Schéma 65: Mécanisme proposé pour la bromation de la coumarine **83** en présence de  $\text{BBr}_3$ .

**iii. Voie 5 : Perspective pour la synthèse de la 6-azido-7-hydroxycoumarine**

Nous avons testé une dernière méthode dans laquelle l'introduction du groupement azido se fait sur le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **60** en 5 étapes, suivant la séquence « (i) diprotection par le groupement méthoxyméthyle éther, (ii) bromation, (iii) protection de l'aldéhyde, (iv) azidation par réaction de Sandmeyer » (**Schéma 66** ci-dessous).





I. MOM-Cl (3 équiv.), DIPEA (3 équiv.), DMAP (5 mol%), DCM, 25 °C, 16 h, 100%

II. NBS, SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, 25 °C, 16 h, sans lumière, 61%

III. NaBH<sub>4</sub> (1.5 équiv.), EtOH, 0 °C, 1 h, 97%

IV. MOM-Cl (3 équiv.), DIPEA(3 équiv.), DMAP (5 mol%), DCM, 25 °C, 16 h, 99%

V. 1. BuLi (1.8 équiv.), DCM, - 78 °C, 30 min; 2. TsN<sub>3</sub> (3 équiv.), - 78 °C, 1 h, puis - 78 °C -> 25 °C, 16 h, 75%

Schéma 66: Perspective pour la synthèse de la 6-azido-7-hydroxycoumarine **80**.

Nous nous sommes arrêtés à la cinquième étape, après la formation du produit **96**. Dans la suite de cette stratégie, l'azidocoumarine **80** pourrait être obtenue après 3 étapes à partir de cet intermédiaire (**96**), par (i) déprotection du méthoxyméthyle éther suivie de (ii) l'oxydation puis (iii) la condensation de Knoevenagel. On pourrait évidemment réduire le nombre d'étapes en protégeant l'aldéhyde **92** sous forme d'acétonide pour former l'intermédiaire **98** suivie de l'azidation (Schéma 66).

## X. Synthèse des synthons phényliques et biphényliques

Dans le paragraphe précédent, nous avons présenté la synthèse des synthons coumariniques. Ces coumarines doivent être couplées sur des précurseurs phényliques et biphényliques afin d'obtenir les produits finaux. Nous allons détailler dans ce paragraphe, la synthèse de ces derniers précurseurs.

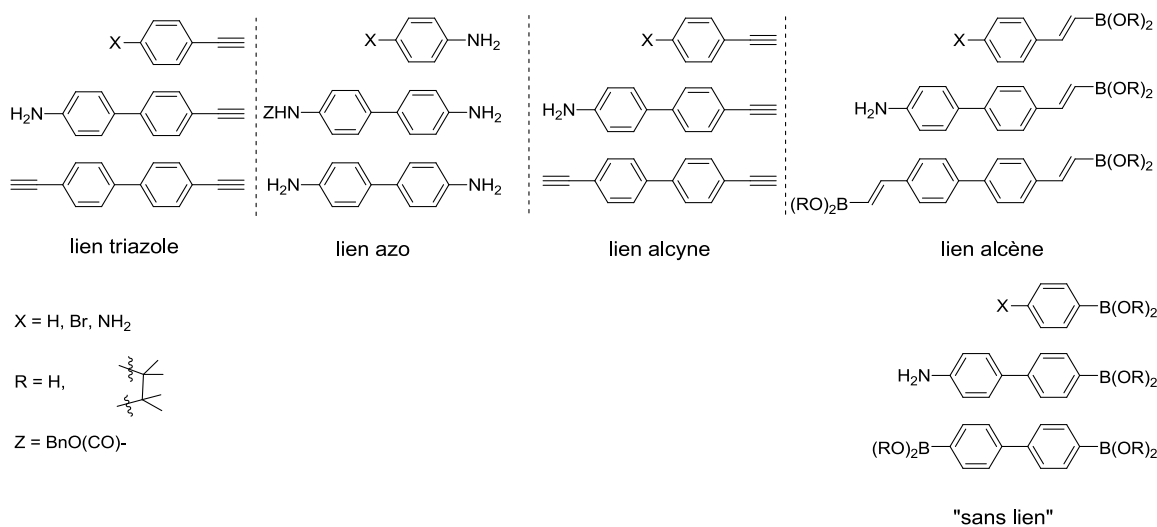


Schéma 67: Liste des précurseurs phényliques et biphényliques nécessaire à l'obtention des composés finaux.

### X.1. Précurseurs phényliques

Les précurseurs phényliques utilisés pour la formation des ligands sont tous des produits commerciaux. La formation des composés contenant le lien azo se fait à partir d'un dérivé d'aniline **100** (l'aniline, la 4-bromoaniline, et la 4-bromo-2-méthoxy-aniline). La formation des molécules avec le lien alcène, et alcyne se fait à partir du trans-2-phényl-vinyl-dioxaborolane **102**, et le phénylacétylène **101**, respectivement. Les composés «sans lien» sont obtenus en utilisant le phényl-dioxaborolane **103** (Schéma 68 ci-dessous) :

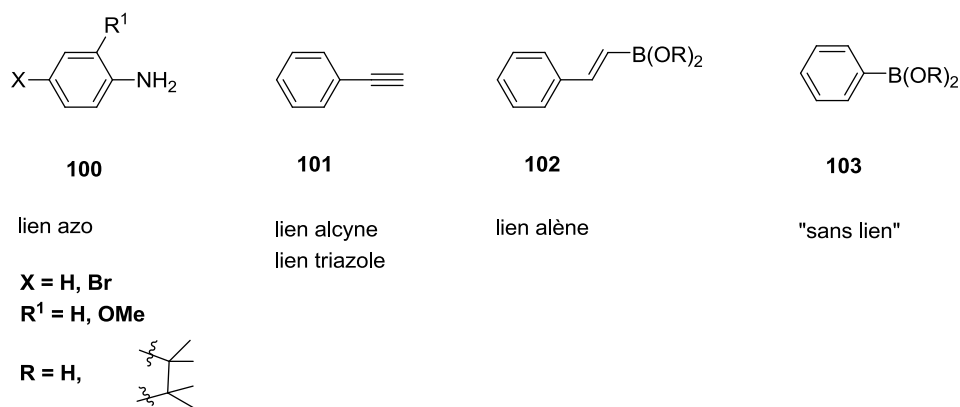


Schéma 68: Précurseurs phényliques utilisés pour la formation de produits finaux.

## X.2. Précurseurs biphényliques

Les précurseurs biphényliques seront utilisés pour la formation des composés biphényliques (composés de type **B**, cf. **Schéma 36**), et des composés entiers (composés de type **C**, cf. **Schéma 36**). Nous allons présenter dans ce paragraphe, la synthèse des précurseurs biphényliques en fonction du type de composés (composés biphényliques ou entiers) et de la nature du lien (azo, alcène, alcyne, ou triazole).

### II.2.1. Précurseurs des composés biphényliques

Les précurseurs nécessaires à la formation des composés biphenyl-coumarinyles sont listés dans le **Schéma 69** ci-dessous :

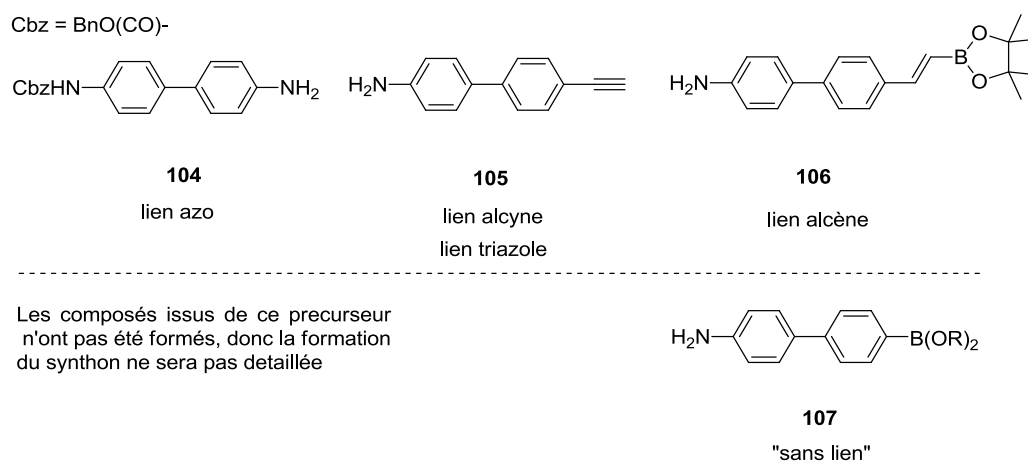


Schéma 69: Précurseurs biphényliques nécessaires à la formation des composés biphenyl-coumarinyles.

#### a. Lien azo : formation du précurseur **104**

Nous avons choisi de monoprotéger la dianiline **108** (benzidine) par un benzyle carbamate. Ce groupement résiste aux conditions acides fortes, utilisées lors la formation de la liaison azo (HCl 6 N, 0 °C, 1 h). La réaction de monoprotection se fait dans l'acétonitrile en présence de chloroformiate de benzyle. La dianiline joue le rôle de base en piégeant les protons libérés au cours de la transformation (**Schéma 70** ci-dessous).

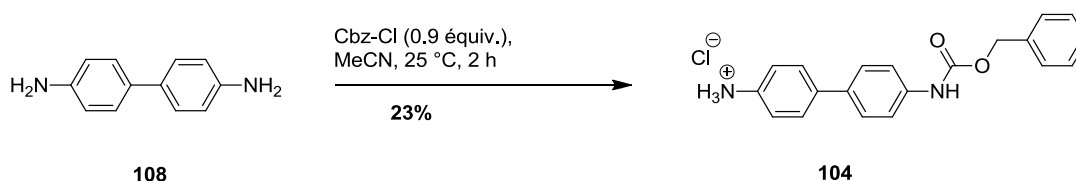


Schéma 70: Monoprotection de la benzidine **108**.

Nous obtenons la formation du produit **104** souhaité avec un rendement faible de 23%. Lors de la réaction, le Cbz-Cl est ajouté en défaut (0.9 équivalent) pour limiter la formation du produit de diprotection, obtenu majoritairement avec un rapport de 2/3 pour 1/3 par rapport au produit monoprotégé.

*b. Lien alcyne et triazole : formation du précurseur 105*

La formation du synthon **105** se fait par déprotection du triméthylsilyle à partir de l'alcyne **109**, issu du couplage palladocatalysé de Sonogashira à partir de l'iodo-aryle **110**, lui-même obtenu en deux étapes à partir du 1,1-biphényle **112**. (Schéma 71 ci-dessous).

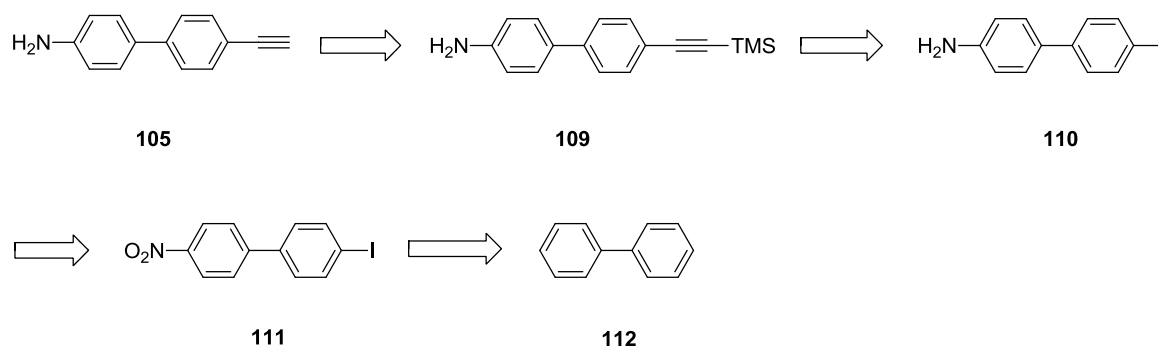


Schéma 71: Rétrosynthèse de l'éthynyl-(1,1)-biphényl-4-amine **105**.

La première étape de la synthèse est une iodo-nitration sur le composé **112** (1,1 biphényle). La réaction a lieu en présence de diiode et d'acide nitrique. Dans le protocole expérimental, le diiode est ajouté en premier sur le composé **112** dissout dans l'acide acétique, permettant l'iodation. Ensuite, HNO<sub>3</sub>.conc est ajouté sous grande agitation à 70 °C. Dans ces conditions, la formation d'électrophiles forts (nitrosonium et acétyl-nitrate) permet la nitration du 1,1-biphényl-iodé<sup>172</sup> (Schéma 72 ci-dessous).

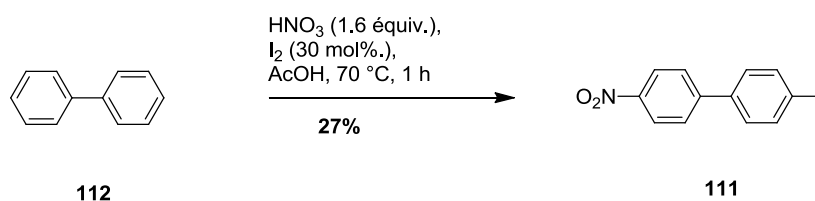


Schéma 72: Iodo-nitration du 1,1-biphényl **112**.

Nous obtenons la formation du produit iodo-nitré **111** avec un rendement faible (27%). Les trois prochaines étapes de la voie de synthèse permettent la formation du synthon 4'-éthynyl-[1,1'-biphényl]-4-amine **105**. Elle se fait par réduction du NO<sub>2</sub> du composé **111** en NH<sub>2</sub> pour former

l'intermédiaire **110**, suivie du couplage de Sonogashira en présence du triméthylsilylacétylène pour conduire à l'intermédiaire **109**. La dernière étape est la déprotection du groupement triméthylsilyle (TMS) en milieu basique (**Schéma 73** ci-dessous).

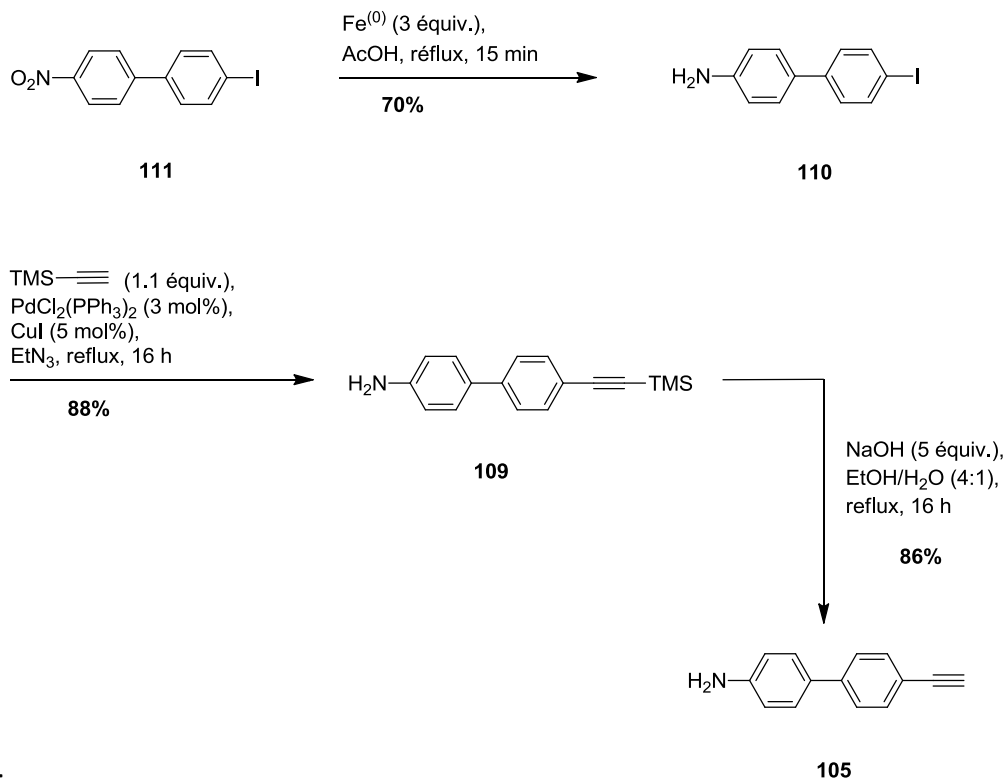


Schéma 73: Formation de la 4'-éthynyl-[1,1'-biphényl]-4-amine.

Les trois étapes se font avec des très bons rendements (70 – 88%). On obtient la formation du produit **105** souhaité avec un rendement global satisfaisant (53%).

### c. Lien alcène : formation du précurseur **106**

L'intermédiaire **105** récemment formé a servi de précurseur pour la formation du synthon vinyl-boronique **106**. La réaction se fait dans le mélange toluène/ $\text{H}_2\text{O}$  en présence d'un catalyseur au ruthénium (**Schéma 74** ci-dessous).

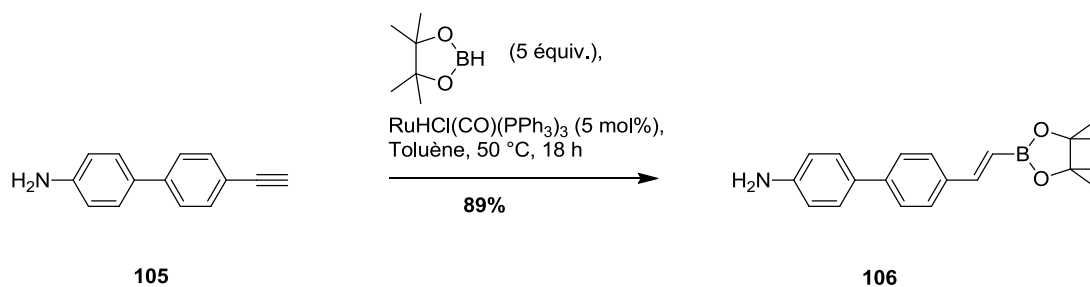


Schéma 74: Formation du précurseur **106**.

L'ester boronique **106** est obtenu avec un très bon rendement (89%) par hydroboration en présence d'un catalyseur au ruthénium et du tétraméthyl-dioxadiborolane. Lors de la réaction le catalyseur  $[Ru^{(II)}]$  réalise une hydrogénation de l'alcyne (syn addition) pour former l'intermédiaire **106c**, suivie de la borylation (addition oxydante) pour former l'intermédiaire **106d**, puis l'élimination réductrice pour former le produit **106** (Schéma 75 ci-dessous).

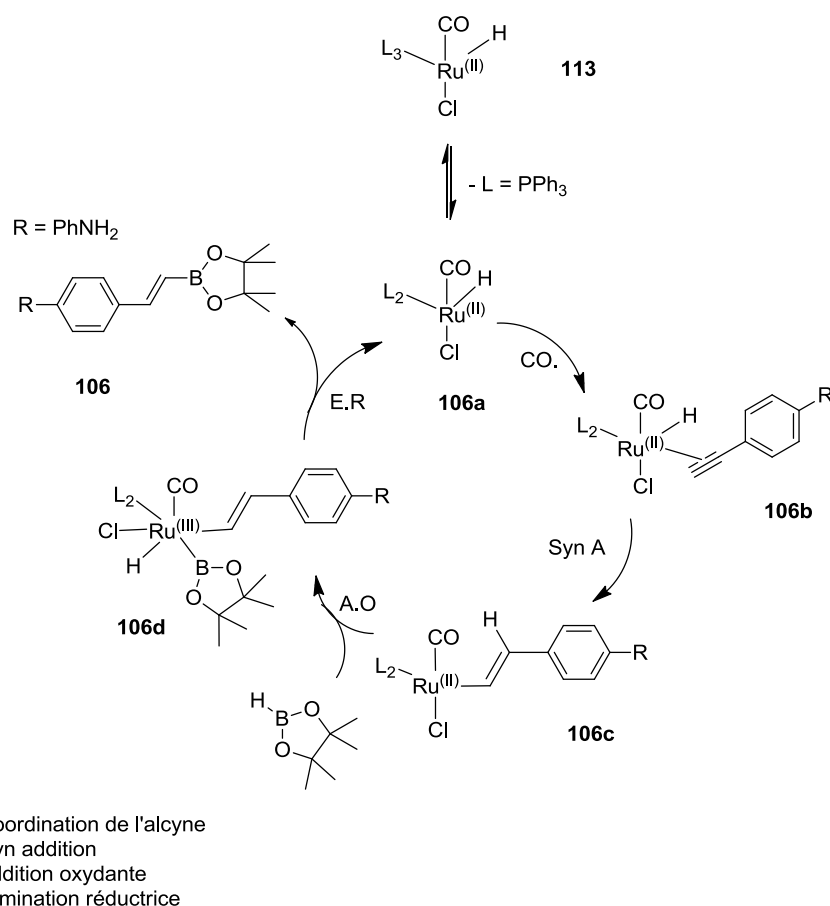
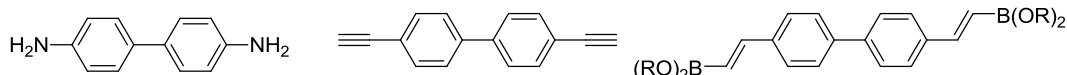


Schéma 75: Mécanisme de formation du précurseur **106**.

### X.3. Précurseurs des composés entiers

Les précurseurs nécessaires à la formation des composés entiers (composés de type **C**) sont listés dans le Schéma 76 ci-dessous



**108**

lien azo

**114**

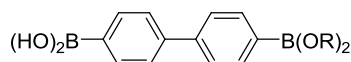
lien alcyne

lien triazole

**115**

lien alcène

Les composés issus de ce précurseur n'ont pas été formés, donc la formation du synthon ne sera pas détaillée



**116**

"sans lien"

Schéma 76: Liste des synthons biphenyliques utilisés pour la formation des composés entiers.

On note que la dianiline utilisée lors de la formation du lien azo est un produit commercial (la benzidine). La synthèse des synthons diéthyne-biphényle **114** et bis-dioxaborolane-vinyl-biphényle **115** est présentée dans le paragraphe ci-dessous.

### II.3.1. Précurseur diéthyne-biphényle (lien alcyne et triazole)

La formation de ce précurseur se fait à partir du 4,4'-dibromo-biphényle **117**, par couplage de Sonogashira en présence du 3-méthyl-but-3-yn-2-ol **118**. Lors la réaction le  $[Pd^{(0)}]$  est généré *in situ* à partir de  $Pd(OAc)_2$  et du ligand  $PPh_3$  (Schéma 77 ci-dessous).

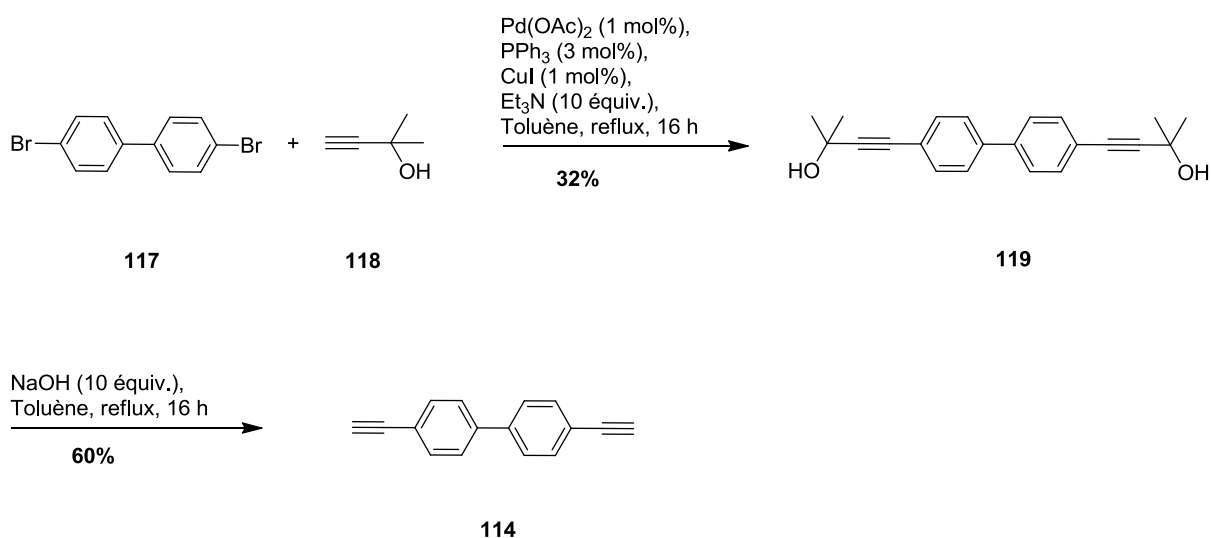


Schéma 77: Formation du précurseur diéthyne-biphényle **114**.

On obtient la formation du produit **119** avec un rendement de 32%. La déprotection du tert-butanol conduit à la formation du précurseur **114** avec un rendement satisfaisant (60%).

### ***II.3.2. Précurseur bis-dioxaborolane-vinyl-biphényle 120 (lien alcène)***

La formation du précurseur **120** se fait à partir du diéthyne-biphényle **114** précédemment formé par catalyse au ruthénium (cf. **Schéma 75**). Le produit est obtenu avec un très bon rendement de 92% (**Schéma 78** ci-dessous).

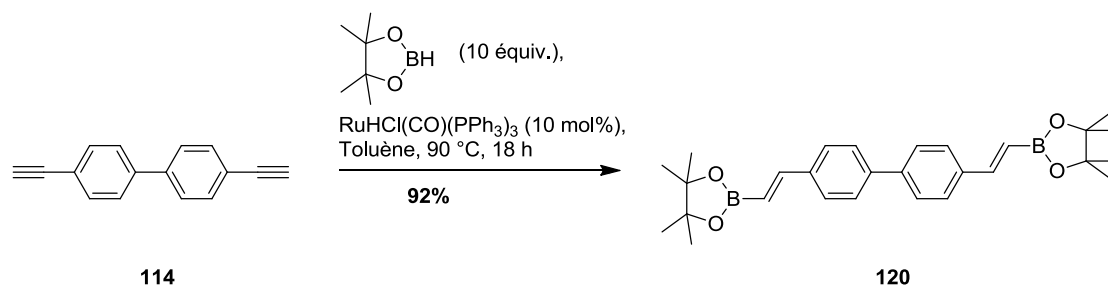


Schéma 78: Formation du précurseur **120**.





## **Partie B. Valorisation des synthons**

# A.Synthèse des composés phényl-coumarinyles

## XI. Synthèse des composés phényldiazényl-coumarinyles

### Généralités

Nous avons commencé nos synthèses par les composés phényldiazényl-coumarinyles (lien azo). Deux voies de rétrosynthèse ont été envisagées: formation de la liaison azo par couplage directement sur les syntons coumariniques simples (voie 1), ou le couplage sur un dérivé phénolique suivi de la formation de la coumarine (**Schéma 79** ci-dessous) :

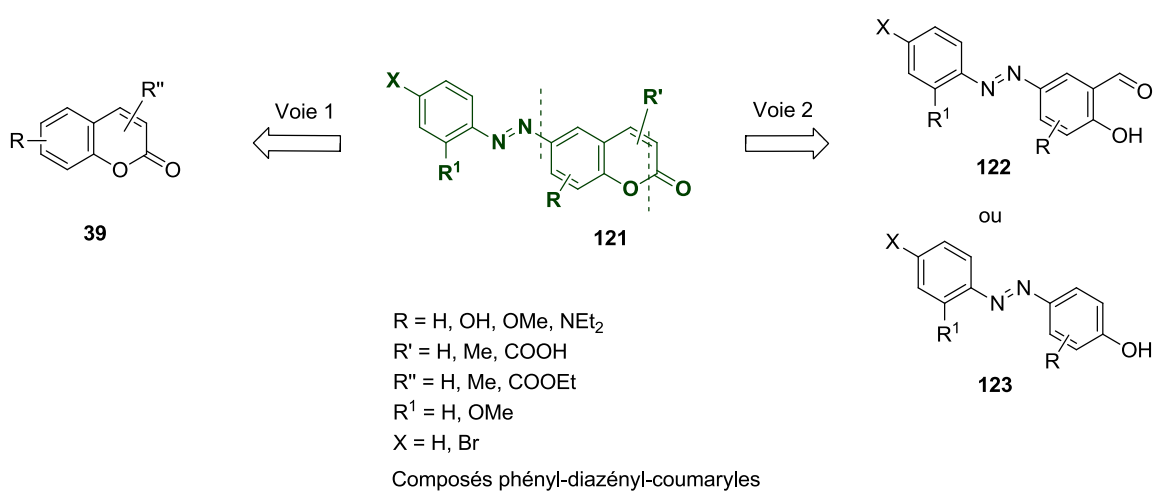


Schéma 79: Rétrosynthèse des composés phényldiazényl-coumarinyles.

## XI.1. Synthèse des analogues par couplage diazoïque sur une coumarine

### XI.1.1. Formation du sel de diazonium

La première méthode de synthèse (voie 1) envisage la formation de la liaison azo par couplage directement sur le synthon coumarinique. Nous allons présenter, dans le paragraphe ci-dessous, quelques méthodes permettant la formation de la liaison azo avant de détailler la synthèse des ligands.

La liaison azo est une liaison chimique très importante en chimie organique. Elle est surtout connue pour la synthèse de colorants dans l'industrie textile, la synthèse d'additifs alimentaires dans l'industrie agroalimentaire, et la synthèse de composés photoswitchables (systèmes on-off) pour les études biologiques<sup>173</sup>. La formation de la liaison azo peut se faire par différentes méthodes, les plus utilisées sont représentées dans le **Schéma 80** ci-dessous.

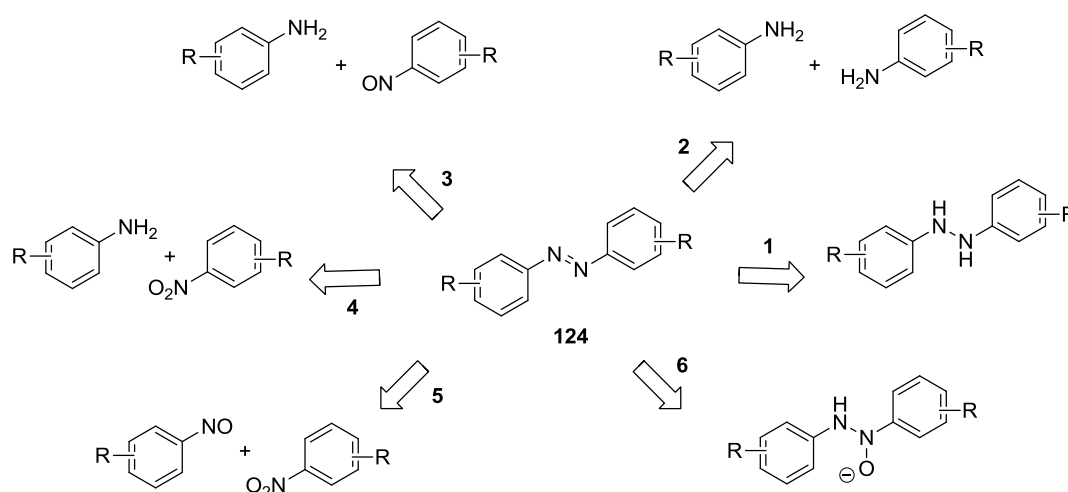


Schéma 80: Méthodes les plus utilisées pour la formation de la liaison azo (oxydation (voies 1, et 2), réduction (voies 3, 4, 5, et 6)).

#### a. Formation de la liaison azo par oxydation d'anilines (voie 1, 2)

L'oxydation d'arylhyaazines est une méthode couramment utilisée pour la formation de liaison azo (voie 1). La méthode nécessite l'utilisation d'oxydant, comme le  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ <sup>174</sup>,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , le *N*-bromosuccinimide dans la pyridine, le tetrabutylammonium cérium(IV) nitrate<sup>175</sup>,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en présence du 2,4,6-triphenylphenol<sup>176</sup>,  $\text{CuCl}_2$ , air/ $\text{NaOH}$ <sup>177</sup>,  $(\text{PhSeO})_2\text{O}$ ,  $\text{PhSeO}_2\text{H}$ , peroxyde arylsulfonique,  $\text{NaNO}_2$  dans l'anhydride acétique et  $\text{NaNO}_2/\text{NaHSO}_4$  sur silice (cf.<sup>178</sup>). En général, dans ces conditions, la formation de la liaison azo se fait avec un rendement satisfaisant. Un des inconvénients majeurs de cette méthode est l'utilisation des sels de métaux en quantité stœchiométrique posant des problèmes de toxicité. Ainsi, des méthodes catalytiques d'oxydation ont été développées<sup>178</sup>. En 2008, Corma *et coll.* ont développé des catalyseurs à l'or (nanoparticules d'or

supportées par TiO<sub>2</sub>) permettant la formation de la liaison azo par oxydation sélective d'anilines avec des rendements satisfaisants. Les réactions ont lieu à l'air libre, ou sous pression de dioxygène<sup>179</sup>.

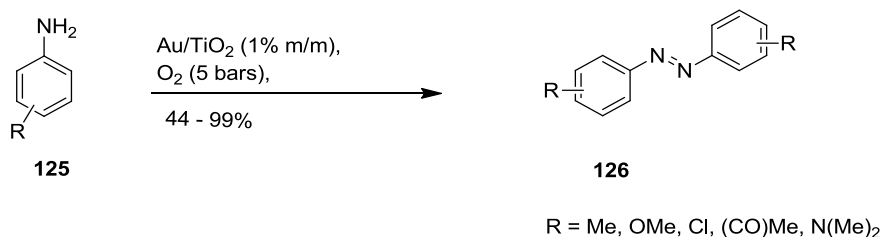


Schéma 81: Oxydation d'anilines pour la formation de la liaison azo par catalyse à l'or<sup>179</sup>.

En 2010, Zhang *et coll.* ont développé des catalyseurs au cuivre plus efficaces, pour la formation de liaison azo (couplage croisé entre deux anilines), et avec une variabilité considérable au niveau des substituants sur le dérivé aniline<sup>180</sup>.

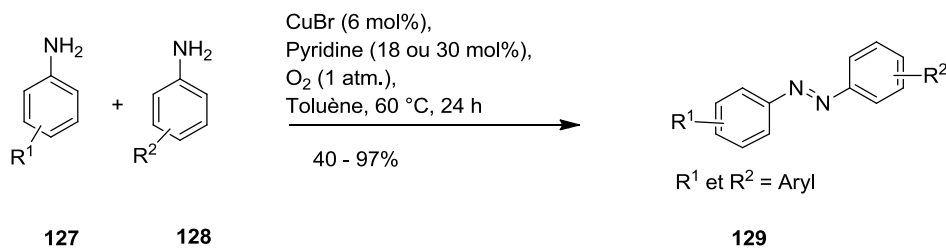


Schéma 82: Couplage croisé entre anilines pour la formation de la liaison azo par catalyse au CuBr<sup>180</sup>.

#### b. Formation de la liaison azo par réaction de Mills (voie 3)

La réaction de Mills est aussi très utilisée pour la formation de la liaison azo. En général, le couplage se fait avec des rendements satisfaisants<sup>178</sup>. Un des inconvénients de la méthode est la préparation du nitroso-aryle de départ. Plusieurs méthodologies ont été développées pour la formation des nitroso-aryles. L'une des méthodes couramment utilisées, est la réaction en présence d'Oxone® (2KHSO<sub>5</sub>.KHSO<sub>4</sub>.K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dans le mélange biphasique H<sub>2</sub>O/DCM. Dans ces conditions, la formation du nitroso-aryle se fait généralement avec un bon rendement. L'utilisation du système biphasique permet de limiter les réactions secondaires. Le nitroso-aryle, peu soluble dans l'eau, précipite dans le milieu réactionnel, ce qui réduit le contact avec les réactifs. La formation de la liaison azo peut se faire ensuite à température ambiante dans l'acide acétique<sup>178</sup>. Byung-chan *et coll.* ont, par exemple, utilisé cette méthode en 2006 pour développer des composés azo avec des rendements satisfaisants<sup>181</sup>.

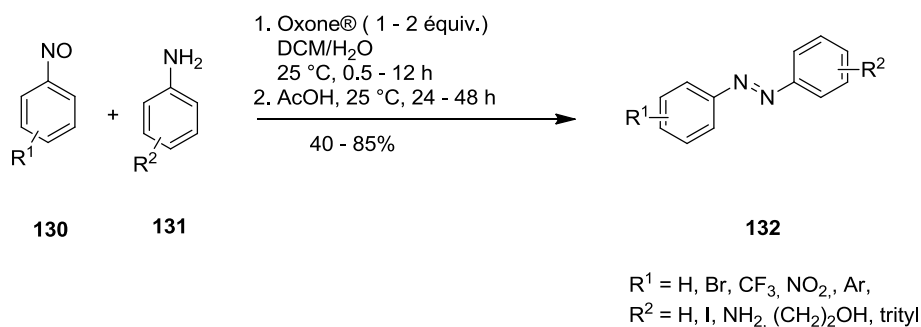


Schéma 83 : Formation de la liaison azo par réaction de Mills <sup>181-182</sup>.

D'autres méthodologies, comme la réduction à partir de composés nitroso-aryles et nitro-aryles (voie 5), ou la réduction à partir d'azoxybenzène par réaction de Wallach (voie 6), permettent également l'obtention de la liaison azo.

Les méthodes mentionnées ci-dessus sont toutes, des voies de synthèse couramment utilisées pour la formation de la liaison azo. Cependant, ces méthodes nécessitent, pour certaines, la synthèse du réactif de départ, pour d'autres, la réalisation de la réaction dans des conditions vigoureuses, ou/et une purification fastidieuse des produits. En outre, certaines méthodes sont décrites avec peu de variabilité au niveau des substituants. Pour cette raison, nous avons choisi une autre méthode simple, couramment utilisée pour la formation de la liaison azo : le couplage azoïque à partir du sel de diazonium obtenu à partir d'un dérivé aniline.

### c. Formation de la liaison azo par couplage azoïque

La voie de synthèse adoptée pour la formation de la liaison azo a été la copulation azoïque à partir d'un sel de diazonium. Le sel de diazonium est formé dans un premier temps, puis directement engagé dans le couplage azoïque pour la formation de la liaison azo par SEAr.

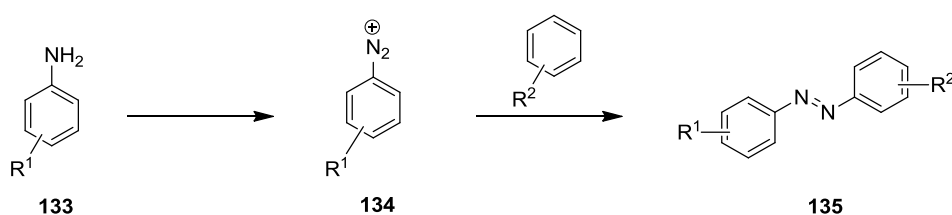


Schéma 84: Formation de la liaison azo par copulation azoïque.

### i. Conditions réactionnelles et mécanisme

La formation du sel de diazonium se fait dans les conditions acides en présence d'une aniline et du nitrite de sodium. La réaction libère deux molécules d'eau et forme le sel de sodium. En théorie, deux équivalents de l'acide sont suffisants pour former le sel de diazonium. En pratique,

l'acide se trouve généralement en large excès pour favoriser une bonne cinétique en stabilisant les intermédiaires clés de la réaction <sup>183</sup>. Différents acides, comme l'acide sulfurique, l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique, etc., peuvent être utilisés pour conduire la réaction (**Schéma 85** ci-dessous).



Schéma 85: Equation réactionnelle de la formation du sel de diazonium.

Dans le mécanisme, l'acide permet la transformation du nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en ion nitrosonium NO<sup>+</sup>. Cet électrophile fort est attaqué par le doublet non liant de l'aniline, suivie de la déshydratation pour former le sel de diazonium **137** (**Schéma 86** ci-dessous).

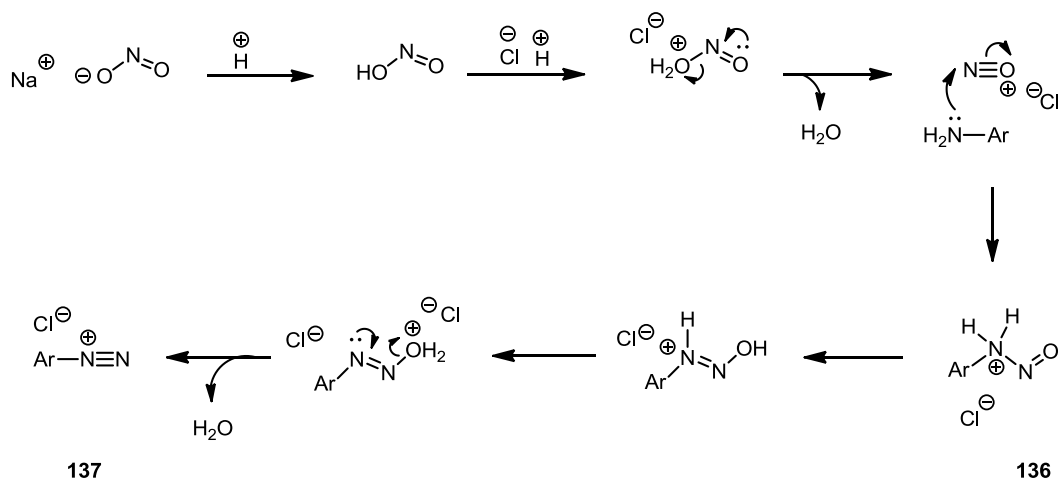


Schéma 86: Mécanisme de la formation du sel de diazonium dans HCl.

La formation du nitrosonium est dirigée par la force de l'acide. Des études mécanistiques menées par Hughes, Ingold et Ridd en 1958 ont montré que le mécanisme de la réaction diffère en fonction de la nature du contre-ion de l'acide <sup>184</sup>. Ainsi, dans le cas de certains acides, comme l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ou l'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>) l'électrophilie du NO<sup>+</sup> est annihilé par le contre ion de l'acide. Il n'est pas assez réactif pour permettre l'attaque d'un nucléophile faible tel que l'aniline <sup>184c</sup>. Dans ces conditions, la formation du sel de diazonium **137** se fait à partir d'une autre espèce réactive plus électrophile, le trioxyde de dinitrogène ONONO, obtenu par réaction du nitrite sur le nitrosonium. Quelle que soit l'espèce réactive, Ridd et *coll.* ont montré que l'étape limitante de la réaction est la nitrosation de l'aniline <sup>185</sup>.

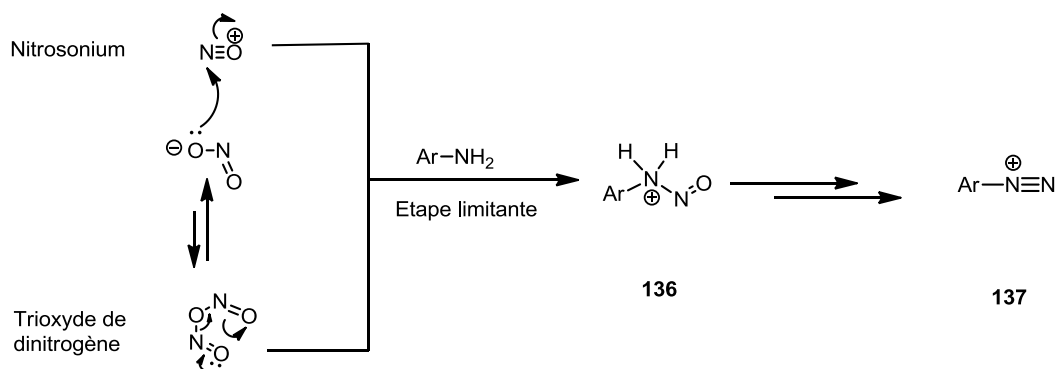


Schéma 87: Formation du trioxyde de dinitrogène, et étape limitante de la réaction de formation du sel de diazonium.

## ii. Stabilité des sels de diazonium

Les sels de diazonium sont des composés très réactifs et instables à température ambiante. Pour limiter les réactions secondaires, la formation du produit se fait généralement à 0 °C. Lorsque la réaction est réalisée dans l'eau, on peut obtenir la formation de produits secondaires phénol (hydratation), halogéno-aryle (halogénéation), biaryle (dimérisation). A température ambiante (ou à chaud), on peut observer une dégradation par libération de diazote responsable du caractère explosif de ces composés.

## iii. Formation des sels de diazonium

Des études préliminaires réalisées dans l'équipe sur la cinétique de formation des sels de diazonium ont montré que la conversion des anilines est maximale en présence de nitrite de sodium en milieu acide (HCl, 4 eq, NaNO<sub>2</sub> 1.1 eq à 0 °C, <sup>125a</sup>). Elle est totale lorsque le pKa de l'aniline est supérieure à 4 (données non publiées, **Tableau 3**).

| Composé    | R <sup>1</sup>  | R <sup>2</sup>  | pKa (ArNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /ArNH <sub>2</sub> ) | % de conversion |
|------------|-----------------|-----------------|--|-----------------|
| <b>140</b> | H               | COOH            | 4.6  | 100             |
| <b>141</b> | Me              | COOH            | 4.4  | 100             |
| <b>142</b> | F               | COOH            | 3.2  | 85              |
| <b>143</b> | F               | I               | 2  | 80              |
| <b>144</b> | NO <sub>2</sub> | NO <sub>2</sub> | -4.3   | 70              |

Tableau 3: Taux de conversion d'anilines en sels de diazonium en fonction du pKa.



En se basant sur ces résultats, nous avons effectué la synthèse de trois sels de diazonium (le benzène diazonium, le 4-bromo-benzène diazonium, et le 4-bromo-2-méthoxy-benzènediazonium) à partir des trois dérivés anilines correspondants [l'aniline (pKa = 4.6), la 4-bromoaniline (pKa = 4.0) et la 4-bromo-2-méthoxy-aniline (pKa > 4)]. Nous avons estimé que la diazotation de ces anilines est totale (pKa ≥ 4). La formation des sels de diazonium a été effectuée dans un mélange EtOH/HCl 37% (1:1) qui permet une bonne solubilisation du dérivé aniline (**Schéma 88**).

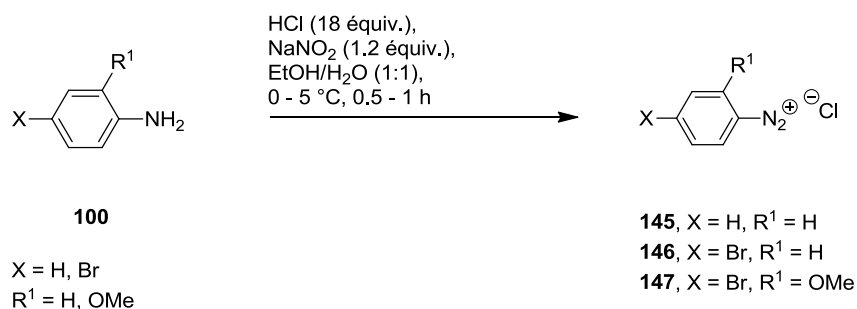


Schéma 88: Réaction de formation des sels diazonium.

Les rendements de ces réactions ne sont pas évalués. Les sels de diazonium sont directement engagés dans la prochaine étape de couplage azoïque sans aucune purification.

### XI.1.2. Le couplage azoïque

Nous disposons de deux types de synthons coumariniques simples : La 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine et l'éthyle coumarine 3-carboxylate. Ces deux types de synthons permettront la formation des analogues phényldiazényl-coumarinyles (**Schéma 89** ci-dessous).

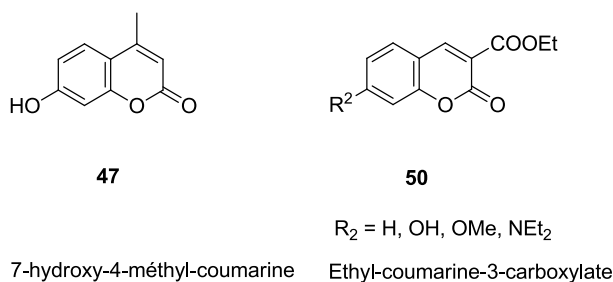


Schéma 89: Structure des synthons coumariniques.

#### a. Formation de la phényldiazényl-4-méthyl-coumarinyle **149**:

Nous avons formé le composé **149** par couplage du 4-bromo-benzènediazonium sur la coumarine **47**. Le couplage azoïque se fait en milieu basique (pH = 8 - 9) à basse température (**Schéma 90** ci-dessous).

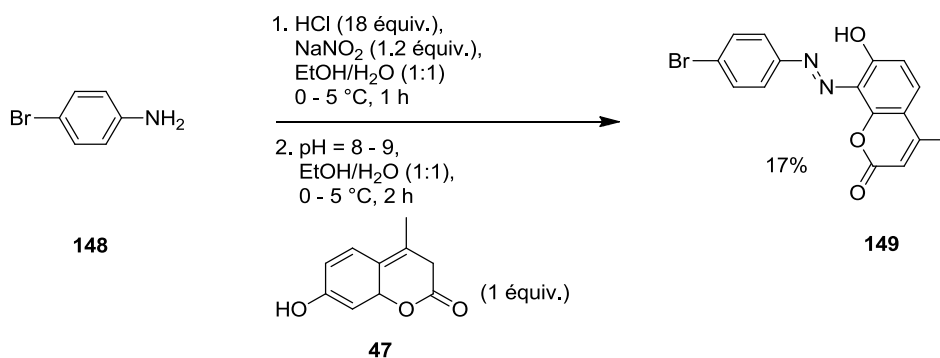


Schéma 90: Couplage azoïque sur la 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine.

Nous obtenons la formation du produit **149** avec un rendement faible (17%). En milieu basique, l'hydroxyle de la coumarine **47** est déprotoné. Cela enrichi les positions **6** et **8** et oriente le couplage en ortho (sur le carbone **8**) pour former l'intermédiaire **149c** qui se rearomatise en **149d**. On forme l'hydroxycoumarine **149** en acidifiant le milieu à la fin de la réaction.

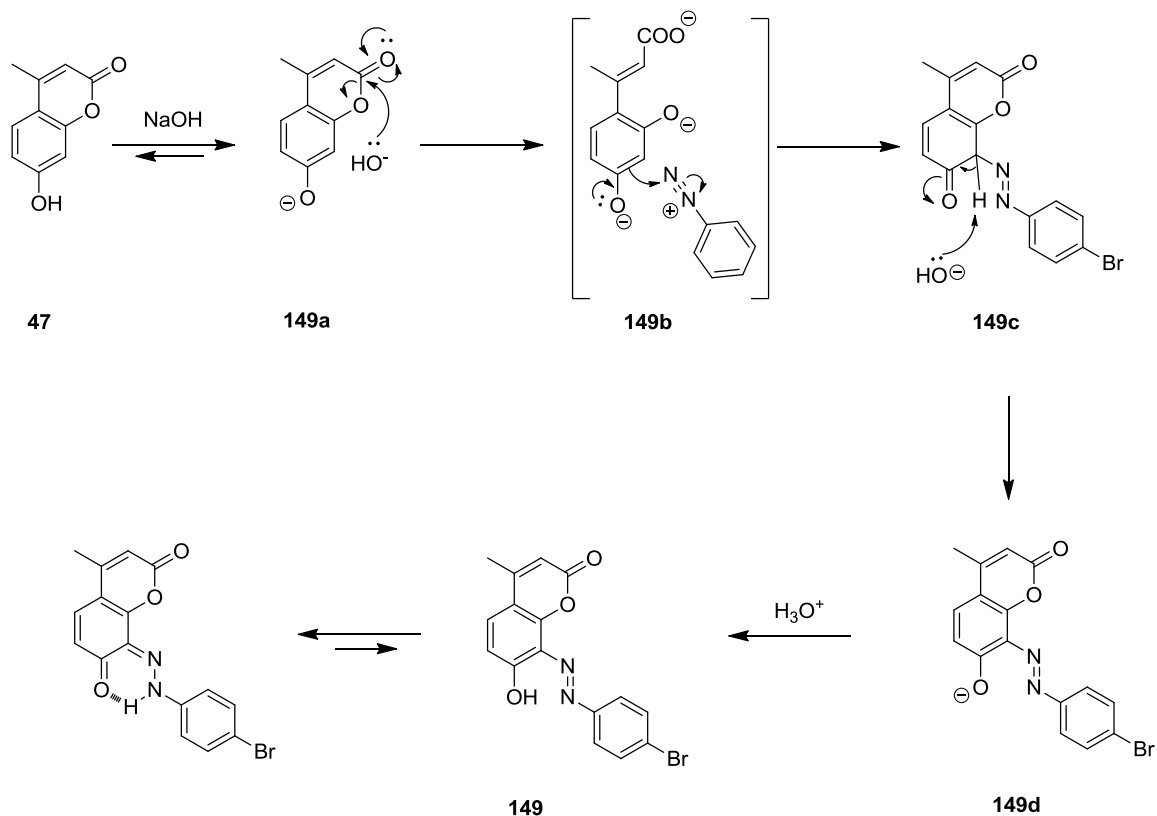


Schéma 91: Mécanisme du couplage azoïque pour la formation de l'analogue 4-Bromo-phényldiazényl-7-hydroxy-4-méthyl-coumarine **149**.

Nous obtenons uniquement la formation du produit de couplage en position **8**. On explique ces résultats par l'ouverture de la coumarine en milieu basique<sup>186</sup>, associée à l'attraction électrostatique entre le diazonium (cation) et les hydroxylates (anions). Des résultats similaires avaient été observés avec le motif naphyle disulfonique. Lors du couplage azoïque sur ce motif en



b. Formation des phényldiazényl-3-carboxy-coumarinyles

i. Couplage sur les synthons 3-carboxy-coumariniques (voie 1, Schéma 79)

Nous avons réalisé le couplage azoïque sur les synthons 3 carboxy-coumariniques **54** et **240** (voie 1, **Schéma 79**). La réaction se fait par formation du diazonium en présence de nitrite de sodium en milieu acide suivie de la seconde étape de formation de la liaison azo en milieu basique (**Schéma 93** ci-dessous) :

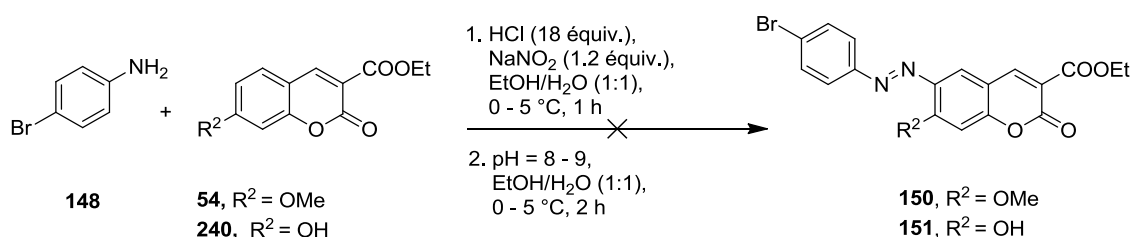
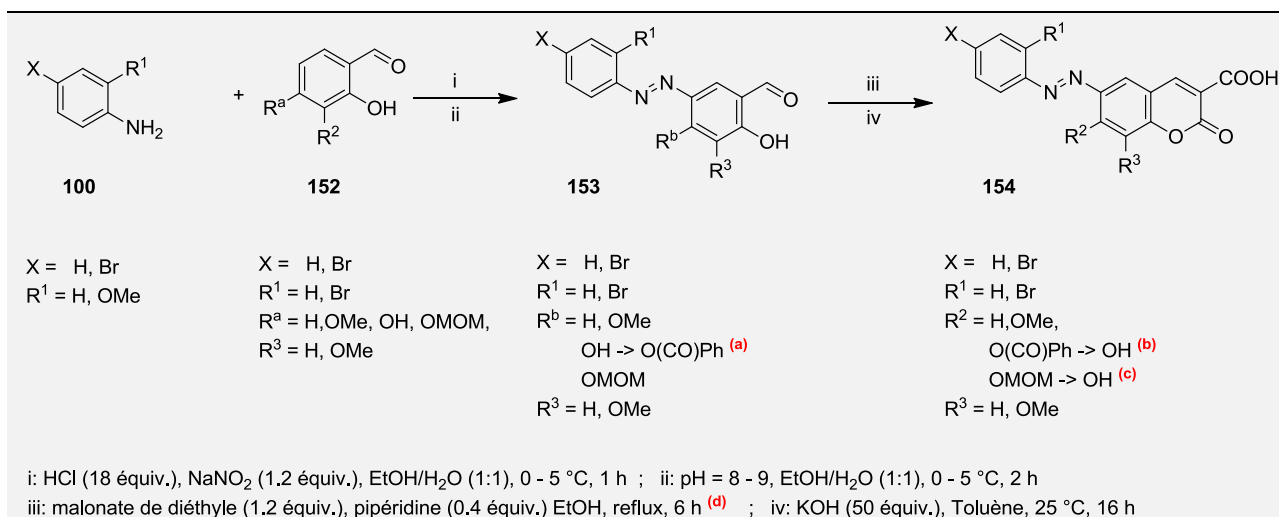


Schéma 93: Formation de composés phényldiazényl-3carboxy-coumarinyles par couplage sur les synthons 3-carboxy-coumariniques.

Malheureusement, la réalisation de la réaction dans ces conditions basiques ne conduit pas à la formation du produit souhaité. Dans le cas de la réaction de formation du composé **151**, nous constatons la dégradation du produit formé, on récupère une partie de la coumarine **240** de départ. Dans le cas de la réaction de formation du composé **150** nous remarquons que la coumarine **54** ne réagit pas avec le sel diazonium. Nous en concluons que la coumarine **54** n'est pas assez nucléophile pour faire la réaction de substitution électrophile. L'ouverture de la coumarine en milieu basique ne se produit donc pas à pH 8 - 9 pour les 3-carboxy-coumarines. Par conséquent, nous avons changé de conditions en augmentant le temps de réaction (2 - 5 h) et/ou en effectuant le couplage sur l'hydroxycoumarine **240** (plus nucléophile) en milieu acide. Mais nous n'obtenons malheureusement pas la formation du produit souhaité dans ces conditions. Nous avons donc changé de voie de synthèse en réalisant le couplage du diazonium sur un dérivé 2-hydroxybenzaldéhyde.

ii. Couplage sur un dérivé du 2-hydroxybenzaldéhyde (voie 2, Schéma 79)

Nous avons effectué le couplage azoïque des sels de diazonium (benzènediazonium, 4-bromo-benzènediazonium, 4-bromo-2-méthoxy-benzènediazonium (cf. **Schéma 88**) sur les l'hydroxybenzaldéhydes substitués (salicylaldéhyde, 4-méthoxy-benzaldéhyde, vanilline, et 2,4-dihydroxybenzaldéhyde) en milieu basique à pH 8 – 9 à froid. La coumarine est ensuite formée par condensation de Knoevenagel suivie de la saponification de l'ester en présence de KOH (**Schéma 94** ci-dessous).



| Composés  | X  | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | Rendement de la réaction |                    |                    |
|-----------|----|----------------|----------------|----------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
|           |    |                |                |                | (i) + (ii)               | (ii)               | (iii)              |
|           |    |                |                |                | Couplage<br>azoïque      | Condensation       | Saponification     |
| LSP9-4126 | H  | H              | H              | H              | 24%                      | 62%                | 76%                |
| LSP9-4108 | H  | H              | OMe            | H              | 12%                      | 33%                | 92%                |
| LSP9-4153 | H  | H              | OH             | H              | 21% <sup>(a)</sup>       | 89% <sup>(b)</sup> | 31% <sup>(e)</sup> |
| LSP9-3160 | Br | H              | H              | H              | 99%                      | 56%                | 98%                |
| LSP9-3164 | Br | H              | OMe            | H              | 87%                      | 56%                | 41%                |
| LSP9-5096 | Br | H              | OH             | H              | 44%                      | 12%                | 94% <sup>(d)</sup> |
| LSP9-3162 | Br | H              | H              | OMe            | 94%                      | 58%                | 60%                |
| LSP9-3161 | Br | OMe            | H              | H              | 63%                      | 60%                | 45%                |
| LSP9-4150 | Br | OMe            | OMe            | H              | 67%                      | 60%                | 9%                 |
| LSP9-3163 | Br | OMe            | H              | OMe            | 52%                      | 45%                | 59%                |

(a): le groupement OH est protégé sous forme de -O(CO)Ph avant de faire la condensation de Knoevenagel. (b): La déprotection du groupement -O(CO)Ph se fait in situ lors de la condensation de Knoevenagel (étape iii). (c): la saponification (étape iv) est suivie de l'hydrolyse acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc, 40 °C, 15 min, en one-pot) du groupement méthoxyméthyle-éther pour générer l'hydroxyle. (d): la catalyse de la condensation de Knoevenagel se fait uniquement en présence de la pipéridine (en absence d'AcOH). (e): La saponification du composé se fait en présence de 6 équivalents de KOH.

#### Schéma 94 : Formation des analogues phényldiazenyl-3-carboxy-coumarinyles.

Nous avons formé 10 analogues en utilisant cette méthode de synthèse. Les rendements des 4 étapes, et notamment du couplage azoïque et la condensation de Knoevenagel, varient beaucoup en fonction de la nature des réactifs (dérivé aniline, et 2-hydroxybenzaldéhyde substitué).



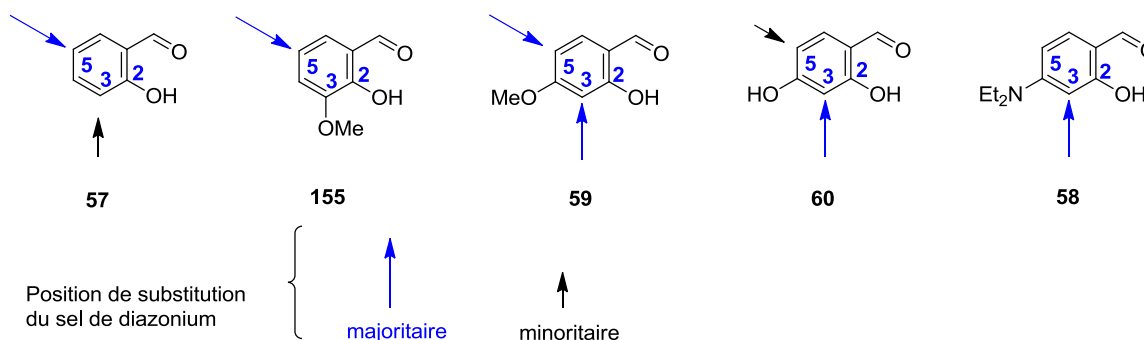


Schéma 96: Structures des hydroxybenzaldéhydes substitués et position du couplage azoïque.

La réactivité des composés **57**, **155**, **59**, **60** est présentée dans les paragraphes ci-dessous. Nous allons présenter la réactivité du composé **58** dans un paragraphe dédié à cet effet.

○ Régiosélectivité sur le salicylaldéhyde et la vanilline, réactifs 57 et 155

Nous avons réalisé le couplage azoïque des composés **57** et **155** sur les sels de diazonium **145**, **146** et **147**. Nous obtenons cinq composés dont les structures et les rendements du couplage azoïque sont présentés dans le **Tableau 4** ci-dessous.

| Hydroxybenzaldéhyde substitué       |            |    |                |                |                  |
|-------------------------------------|------------|----|----------------|----------------|------------------|
|                                     | Composés   | X  | R <sup>1</sup> | R <sup>3</sup> | Couplage azoïque |
| <b>Salicylaldéhyde (réactif 57)</b> | <b>156</b> | H  | H              | H              | 24%              |
|                                     | <b>157</b> | Br | H              | H              | 99%              |
|                                     | <b>158</b> | Br | OMe            | H              | 63%              |
| <b>Vanilline (réactif 155)</b>      | <b>159</b> | Br | H              | OMe            | 94%              |
|                                     | <b>160</b> | Br | OMe            | OMe            | 52%              |

Tableau 4 : Intermédiaires diazényles obtenus par couplage azoïque sur le salicylaldéhyde et la vanilline.

Nous constatons que, lors de la formation de la liaison azo sur les composés **57** et **155**, la régiosélectivité de la réaction est orientée par le groupement OH situé sur le carbone **2**. En milieu basique, ce groupement est déprotoné. Il active le carbone **5** en para, et le carbone **3** en ortho. La substitution des sels de diazonium est régiospécifique sur le carbone **5**. Elle conduit très majoritairement au produit de couplage en para du 2-hydroxyle (sur le carbone **5**) avec des rendements modérés à bons (24 - 99%). L'attraction électrostatique entre le diazonium (cation) et l'anion hydroxylate ne semble pas assez conséquente pour induire la substitution en ortho (sur le carbone **3**). L'encombrement stérique, associé à l'effet inducteur attracteur du groupement hydroxylate, défavorise la substitution sur cette position (sur le carbone **3**). La comparaison des

rendements du couplage azoïque sur le réactif **57** (**157** et **158**, 99% et 63%) par rapport au réactif **155** (**159** et **160**, 94% et 52%), montre que le groupement 3-méthoxy (réactif = vanilline) n'a que peu d'effet sur la variation du rendement de la réaction.

○ **Régiosélectivité sur le 4-méthoxy-hydroxybenzaldéhyde (réactif 59)**

Trois intermédiaires, dont les structures sont mentionnées dans le **Tableau 5** ci-dessous, ont été obtenus à partir de l'hydroxybenzaldéhyde **59**.


| Hydroxybenzaldéhyde substitué |            |  |                |                  |
|-------------------------------|------------|--|----------------|------------------|
|                               | Composés   | X  | R <sup>1</sup> | Couplage azoïque |
| réactif 59                    | <b>160</b> | H  | H              | 12%              |
|                               | <b>161</b> | Br   | H              | 87%              |
|                               | <b>162</b> | Br   | OMe            | 63%              |

Tableau 5: Intermédiaires diazényles obtenus par couplage azoïque sur le 4-méthoxy-hydroxybenzaldéhyde.

Le composé **59** possède deux groupements orienteurs (OH, OMe). Dans le cas du composé **162** par exemple, le couplage azoïque en milieu basique (pH = 8 – 9), et acide (pH = 1) conduit à la formation des deux régioisomères avec un rapport  $\approx 1/3$ , et 1/1 (ortho/para), respectivement. Nous en déduisons qu'en milieu basique le groupement 2-hydroxyle oriente majoritairement la régiosélectivité. En milieu acide, l'effet activateur des deux groupements mésomères donneurs est comparable. De plus, l'hydroxyle est légèrement désactivé par la fonction aldéhyde *via* une stabilisation par liaison hydrogène intracyclique. Les produits de couplage sont obtenus avec des rendements de 12 – 87% (**Tableau 5** ci-dessus).

○ **Le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde, réactif 60**

Nous avons couplé le 4-bromo-benzènediazonium **146** et le benzènediazonium **145** sur le composé **60** (**Tableau 6** ci-dessous).

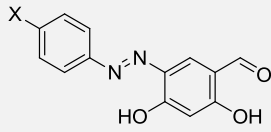
| Hydroxybenzaldéhyde substitué |            |  |  |                  |
|-------------------------------|------------|--|--|------------------|
|                               | Composés   | X  |  | Couplage azoïque |
| réactif 60                    | <b>163</b> | Br   |  | 44%              |
|                               | <b>164</b> | H  |  | 21%              |

Tableau 6: Intermédiaires diazényles obtenus par couplage azoïque sur le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde.



Lors du couplage du 4-bromo-benzènediazonium, on obtient la formation de deux régioisomères (couplage sur les carbones **3** et **5**), avec un rapport 2/1 en faveur du produit de couplage sur le carbone **3**. Nous expliquons ces résultats par l'attraction électrostatique entre le cation diazonium et les anions hydroxylates. Le produit souhaité **163** est obtenu avec un rendement de 44%.

Dans le cas du benzènediazonium, nous obtenons la formation du produit de couplage sur le carbone **5** (majoritaire) et le produit dicouplé (minoritaire) avec un rapport 2/1. Le produit souhaité **164** est obtenu avec un rendement faible (21%).

○ **Réactivité des intermédiaires diazényles dans la Condensation de Knoevenagel**

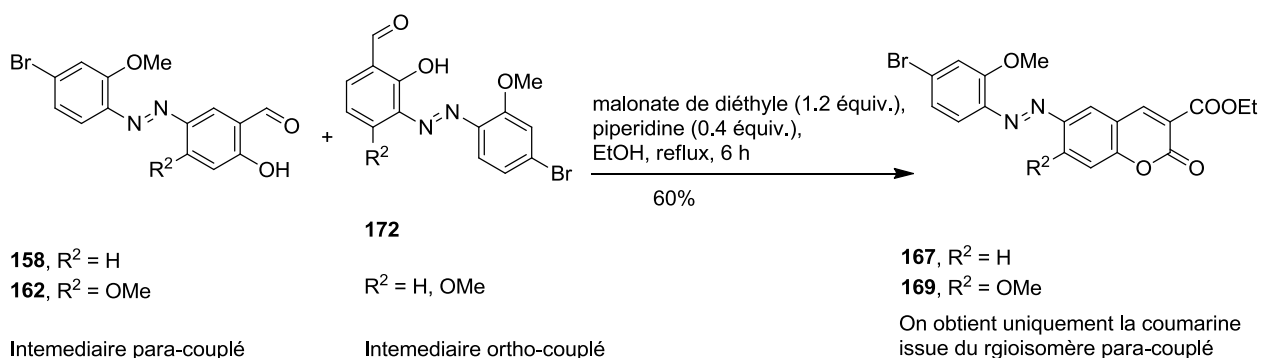
La formation de la coumarine se fait dans les conditions classiques à partir des intermédiaires diazényles issus du couplage azoïque (cf. **Schéma 94**), en présence de pipéridine dans l'EtOH à reflux. Le **Tableau 7** résume les rendements de la condensation en fonction de la nature, et la position des substituants.

| Composés   | X  | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | Condensation |
|------------|----|----------------|----------------|----------------|--------------|
| <b>165</b> | H  | H              | H              | H              | 62%          |
| <b>166</b> | Br | H              | H              | H              | 56%          |
| <b>167</b> | Br | OMe            | H              | H              | 60%          |
| <b>168</b> | Br | H              | OMe            | H              | 56%          |
| <b>169</b> | Br | OMe            | OMe            | H              | 60%          |
| <b>170</b> | Br | H              | H              | OMe            | 58%          |
| <b>171</b> | Br | OMe            | H              | OMe            | 45%          |

Tableau 7: variation du rendement de la réaction de Knoevenagel en fonction de la nature des substituants.

Nous analysons les effets des substituants OMe et Br. On remarque d'après les résultats que les rendements varient peu en fonction de la position du groupement méthoxy (45 - 62%). Il semble donc que la présence de la liaison azo limite les effets électroniques du groupement OMe, notamment sur le carbone **7**. En absence de la liaison azo, ce groupement OMe améliore le rendement de la condensation de Knoevenagel (**Schéma 47**). La substitution de la position **8** par un groupement très encombré empêche la formation de la coumarine. Ces observations sont confirmées lors de la formation de la coumarine sur un mélange de régioisomères ortho/para d'intermédiaires phényl-diazényles (voir le

Schéma 97 ci dessous).



| Proportions des deux regiomères | ortho | para |
|---------------------------------|-------|------|
| R <sup>2</sup> = H              | 2     | 8    |
| R <sup>2</sup> = OMe            | 1     | 1    |

Schéma 97: Effet d'un substituant encombré sur le carbone 3.

### Cas particulier des intermédiaires issus du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde

#### *i. Produit issu de la réaction avec le benzènediazonium 145*

La formation de la coumarine sur l'intermédiaire **164** ne conduit pas au produit souhaité (**174**). On observe au contraire la dégradation du réactif. Nous avons donc protégé l'hydroxyle en position **4** par un groupement benzoyle, suivie de la formation de la coumarine dans les conditions classiques de condensation de Knoevenagel (**Schéma 98** ci-dessous).

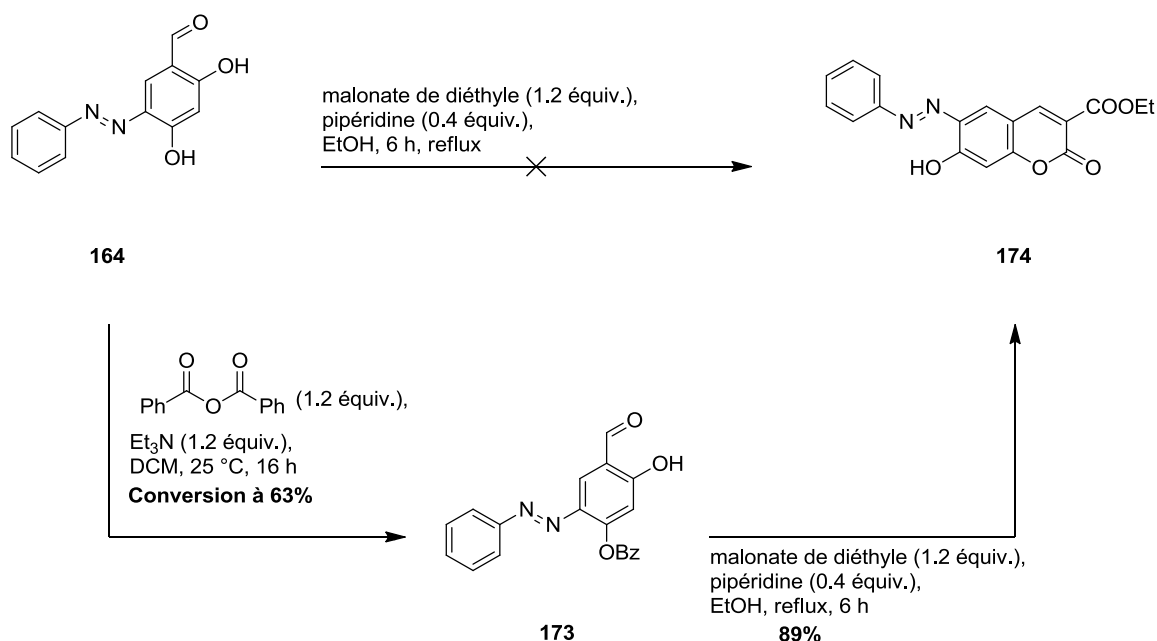


Schéma 98: Formation du composé **174** par condensation de Knoevenagel.

Lors de la réaction, la condensation de Knoevenagel est lancée sur le mélange de **164** (se dégrade lors de la réaction) et **173**. Nous obtenons la formation du produit **174** à partir du réactif **173** avec un bon rendement (89%). La déprotection du benzoyle se fait *in situ* lors de la formation de la coumarine. Lors de l'analyse par CCM, nous remarquons la formation de deux produits séparables sur colonne chromatographique, avec un rendement de 65%, et 24%. Cependant, l'analyse par RMN montre que les deux produits sont identiques (mêmes pics avec exactement les mêmes déplacements chimiques). Les deux produits représentent probablement les deux formes tautomères du composé **174** (Schéma 99 ci-après). La caractérisation de la forme majoritaire a été faite par RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC, NOESY). Le spectre <sup>1</sup>H montre un proton déblindé à **12.02** ppm similaire au déplacement chimique d'un groupement hydroxyle O-H, ou d'une amine N-H. Le spectre <sup>13</sup>C ne montre pas la présence de pic caractéristique des cétones aromatiques (160 – 180 ppm). L'analyse du spectre HMBC permet l'identification des protons **H5** et **H8**, se trouvant à **8.24** ppm et **7.04** ppm respectivement. Le spectre NOESY montre une corrélation entre le proton déblindé (à **12.02** ppm) et le proton **H8** à **7.04** ppm montrant que la molécule se trouve potentiellement sous la forme azo **A174/B174**. Cependant, l'absence de corrélation en NOESY ne permet pas de conclure sur l'absence de la forme hydrazo.

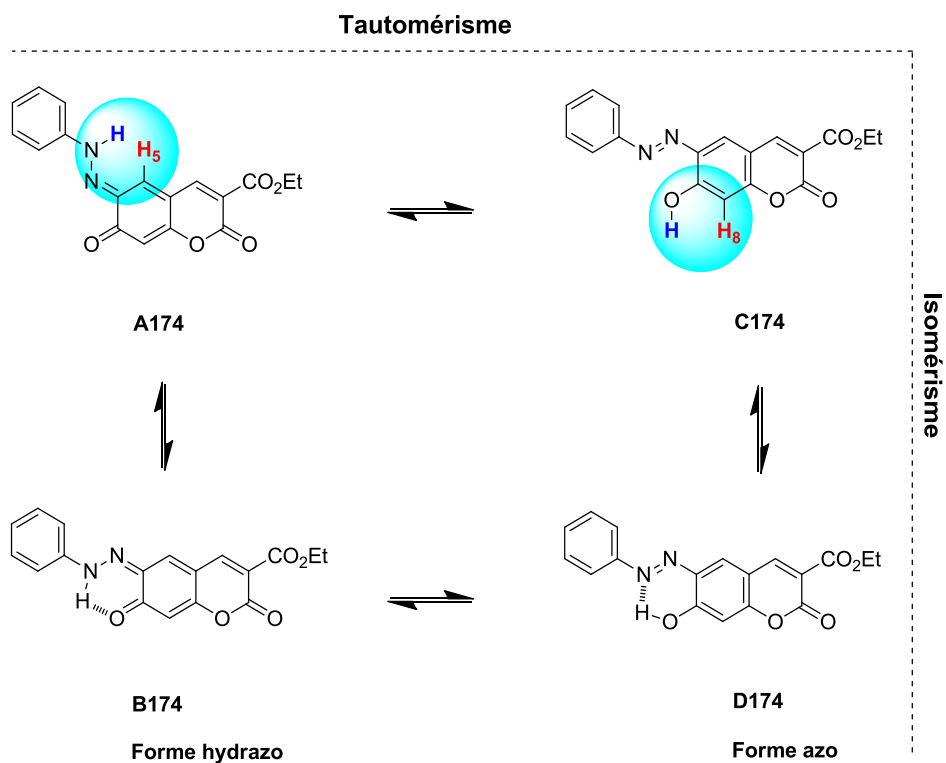


Schéma 99: équilibre céto-énolique.

**ii. Produit issu de la réaction avec le 4-bromo-benzènediazonium**

Pour cette synthèse, nous avons monoprotégé le 2,4 dihydroxybenzaldéhyde par le groupement méthoxyméthyle éther, effectué le couplage azoïque, puis formé la coumarine par condensation de Knoevenagel (**Schéma 100** ci-dessous).

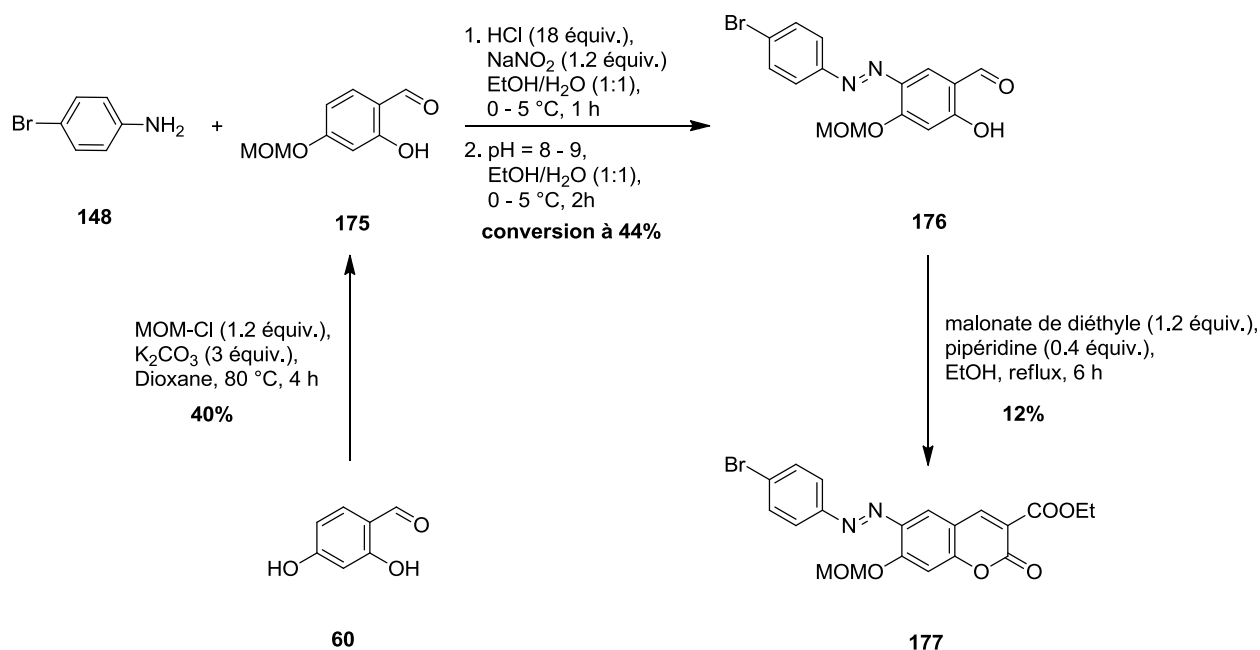


Schéma 100: Formation de l'analogue **177**.

Nous obtenons le produit **176** avec un taux de conversion de 44%. Un mélange du produit d'intérêt **176** et du réactif **175** est obtenu. Le mélange est difficilement séparable (rapport frontal sur CCM très proche). La formation de la coumarine **177** se fait sur le mélange avec un rendement faible (12%).

○ **Cas particulier de la 7-diéthylamino-phényldiazényl-coumarine 178**

Nous avons envisagé différentes méthodes de rétrosynthèse pour la formation de ce composé. Le produit pourrait être obtenu à partir du couplage d'un dérivé aniline (**148**) sur la 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde **58** par couplage azoïque suivi de la formation de la coumarine (voie 1). Dans la voie 2, le produit serait formé par couplage azoïque de l'aniline **180** sur l'6-aminocoumarine **179**. Enfin, la voie 3 est une condensation du dérivé nitrosobenzène **181** sur l'aminocoumarine **179** (Schéma 101 ci-dessous).

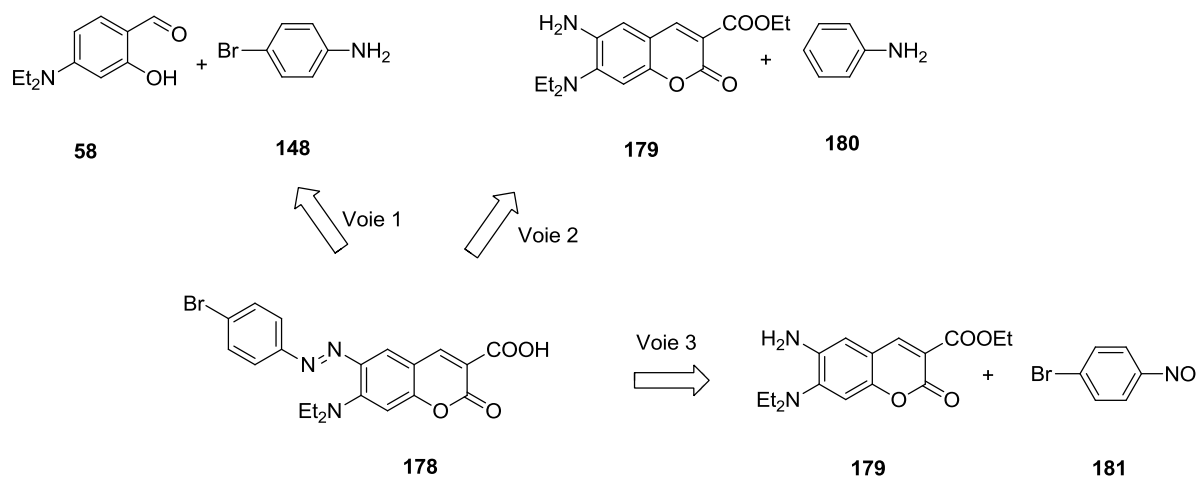


Schéma 101: Rétrosynthèse de la 7-diéthylamino-phényldiazényl-coumarine **178**.

### Voie 1 : couplage sur l'hydroxybenzaldéhyde substitué 58

Nous avons réalisé le couplage du 4-bromo-benzènediazonium sur le réactif **58** en milieu basique (**Schéma 102** ci-dessous).

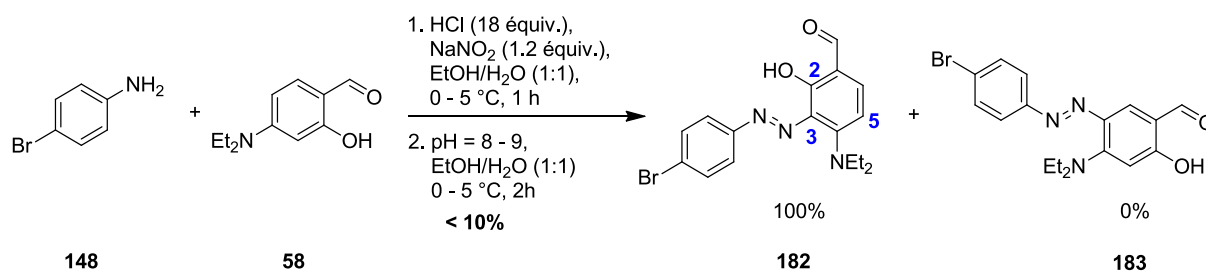


Schéma 102: Couplage azoïque sur la 4-(diéthylamino)-2-hydroxybenzaldéhyde.

Nous obtenons la formation régiospécifique du produit non souhaité avec un rendement faible (< 10%). Nous avons estimé que l'encombrement stérique important du groupement 4-diéthylamino diminue considérablement la réactivité du réactif **58**. Dans ces conditions, la substitution serait orientée par l'attraction électrostatique entre le cation diazonium et l'anion hydroxylate. Par conséquent, nous avons réalisé le couplage azoïque en milieu acide (pH 4 - 5) afin d'éviter la déprotonation du groupement 2-hydroxyle. Malheureusement, nous obtenons des résultats similaires au couplage en milieu basique avec la formation régiospécifique du produit de couplage sur le carbone **3**. Nous expliquons ces résultats par la déprotonation locale du groupement 2-hydroxyle provoqué par l'ajout de NaOH lors du contrôle du pH de la réaction. En effet, dans le protocole expérimental, nous maintenons le pH de la réaction à 4 - 5 en utilisant une solution de NaOHaq 10%. Cette solution basique déprotonerait localement le groupement 2-hydroxyle et conduirait, par conséquent, à la formation du produit ortho-couplé. Des résultats similaires avaient

été observés lors du couplage de sels diazonium sur le motif naphthyle pour la formation de colorants azoïques <sup>125a</sup>. Kaminski et coll. ont dénommé ce phénomène «effet de micromixing» <sup>187</sup>. Le couplage sur le dérivé hydroxybenzaldéhyde **58** n'ayant pas conduit au produit souhaité (voie 1), nous avons donc effectué le couplage de l'aniline sur l'aminocoumarine **179** (voie 2).

### Voie 2 : Formation du produit à partir d'une 6-aminocoumarine

Dans cette voie de synthèse, le sel de diazonium sera formé à partir de l'aminocoumarine. Le couplage azoïque à pH 7 - 8 permettrait la formation de la liaison azo. L'aniline peut attaquer le sel de diazonium par le carbone **4** en para du groupement amino, ou par le groupement NH<sub>2</sub>. La formation du produit souhaité passe par un intermédiaire triazène lorsque l'attaque nucléophile est réalisée par le groupement amino. Dans ce cas, un second équivalent de l'aniline est nécessaire à la transformation du triazène pour former le produit souhaité. La dernière étape concernera la transformation du groupement amino en brome par réaction de Sandmeyer en présence de KBr suivie de la saponification.

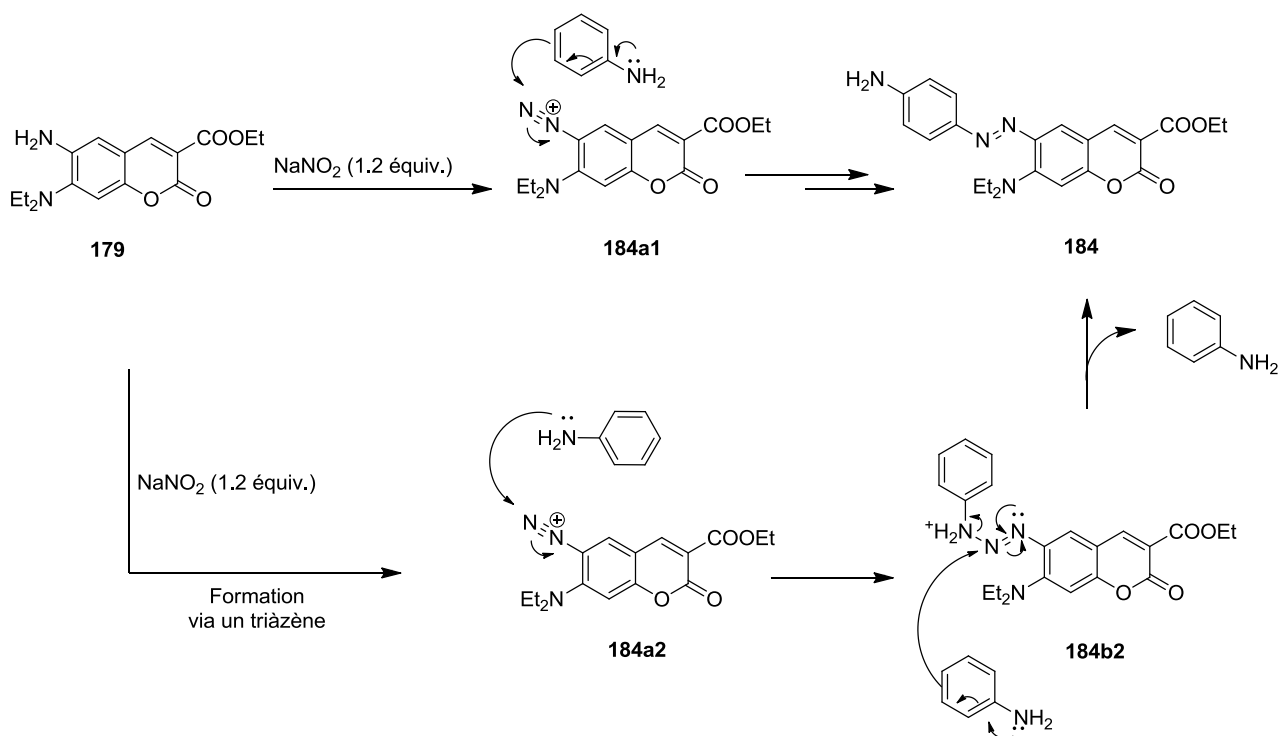
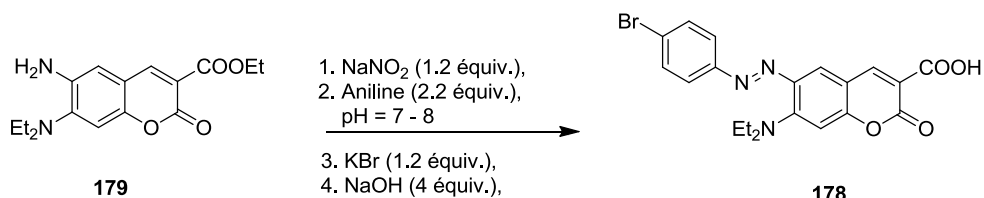


Schéma 103: Mécanisme réactionnel proposé du couplage azoïque de l'aniline sur l'aminocoumarine **179**.

Nous avons formé l'aminocoumarine **179** en trois étapes à partir de 4-diéthylamino **58** suivant la séquence «nitration, condensation en coumarine, réduction du groupement nitro». La nitration se fait dans l'acide acétique en présence de 2 équivalents d'acide nitrique. La formation de la coumarine se fait dans les conditions classiques de Knoevenagel, en présence du malonate de diéthyle et la pipéridine. La réduction du groupement nitro a lieu en présence de Zn<sup>(0)</sup> et du NH<sub>4</sub>Cl (**Schéma 104** ci-dessous).

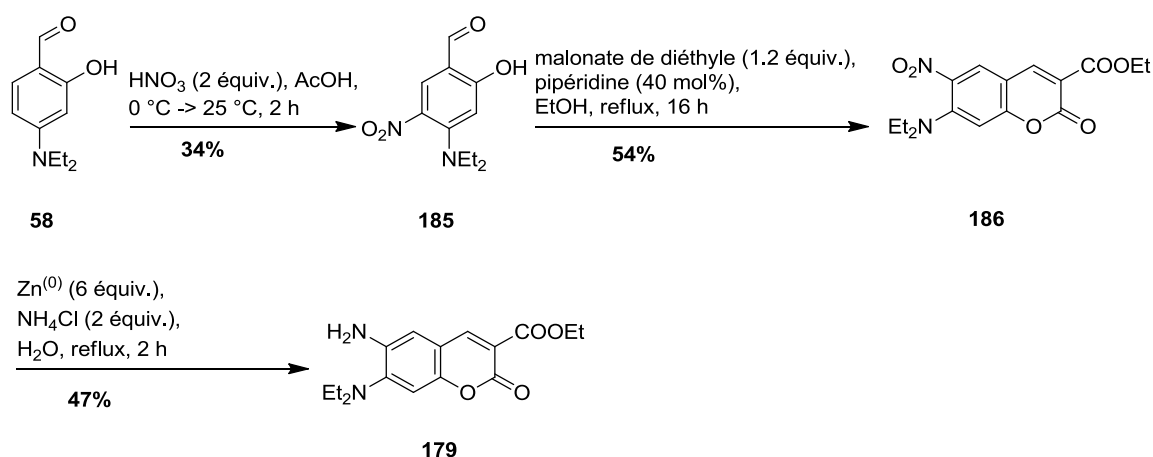


Schéma 104: Formation de la 6-aminocoumarine **179**.

La nitration du réactif **58** et la formation de la coumarine **186** se font avec des rendements de 34% et 54%, respectivement. La réduction du groupement nitro en NH<sub>2</sub> se fait *via* une réduction à 6 électrons par le zinc métallique avec un rendement de 47%. Nous avons formé le sel de diazonium à partir de cette aminocoumarine (**179**), en milieu acide, en présence de nitrite de sodium. Le couplage azoïque se fait pH 7 - 8 en présence de l'aniline. Lors de la réaction, l'aniline est ajoutée en excès (2 équivalents) pour induire la transformation de l'intermédiaire triazène éventuel (cf. **Schéma 103**). Le **Schéma 105** montre les conditions réactionnelles.

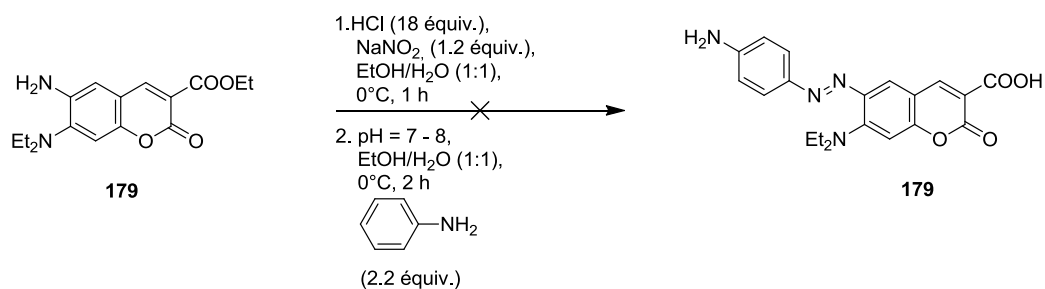


Schéma 105: Couplage azoïque de l'aniline sur le sel de diazonium de la 6-aminocoumarine **179**.



Malheureusement, nous n'obtenons pas la formation du produit souhaité dans ces conditions. Nous remarquons que le sel de diazonium ne réagit pas avec l'aniline, vraisemblablement pas assez nucléophile.

### Perspective pour la formation de ce produit

La réaction de Mills à partir de l'aminocoumarine **179** et du 4-bromo-nitrosobenzène **181** pourrait être une bonne méthode pour la formation de ce produit. La synthèse du dérivé nitrosobenzène se ferait en présence d'Oxone® dans un mélange biphasique H<sub>2</sub>O/DCM, suivie de la condensation du groupement nitroso sur l'aminocoumarine dans l'acide acétique (**Schéma 106** ci-dessous).

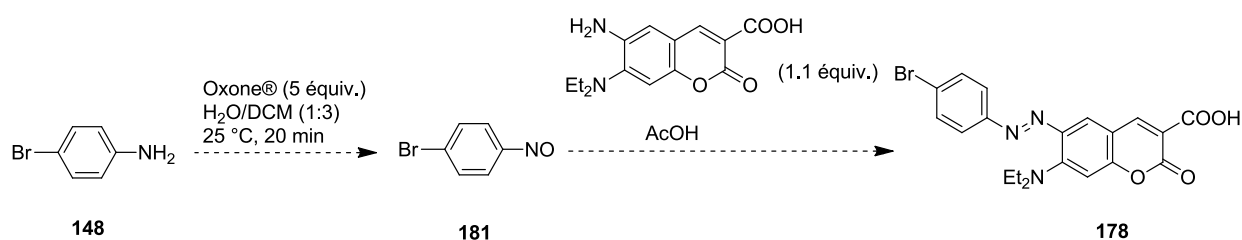


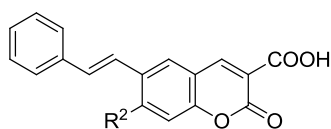
Schéma 106: Formation du composé phényldiazényl-7-diéthylamino-coumarine par réaction de Mills

## XI.2. Conclusion

Nous avons formé 11 composés phényldiazényl-coumarinyles parmi lesquels on distingue dix analogues diazényl-3-carboxy-coumarinyles et un analogue diazényl-4-méthyl-coumarinyle. Les composés 3-carboxy-coumarinyles sont formés en 3 à 5 étapes, notamment, suivant la séquence « couplage diazoïque, condensation de Knoevenagel, saponification », l'analogue diazényl-4-méthyl-7-hydroxycoumarine est formé en 2 étapes, suivant la séquence « condensation de von Pechmann, couplage azoïque ». L'évaluation des activités biologiques de ces composés permettra de savoir si les motifs 3-carboxy-coumarines et les 4-méthyl-coumarines sont des bons isostères du motif naphthyle disulfonique.

## XII. Synthèse des analogues styryl-coumarinyles

Nous avons développé des analogues styryl-coumarinyles. Dans ces composés, la liaison azo est remplacée par une liaison alcène. La structure de ces ligands est présentée dans le **Schéma 107** ci-dessous.



Analogues styryl-coumarinyles

Schéma 107: Structure des analogues styryl-coumarinyles.

Trois voies de rétrosynthèse ont été envisagées pour la formation de ces composés. La première voie est un couplage de Matsuda-Heck à partir du styrène et d'une aminocoumarine **74**. Les voies 2 et 3 sont des couplages de Suzuki-Miyaura à partir d'une iodocoumarine. Dans la voie 2 l'ester boronique est généré *in situ* (**Schéma 108** ci-dessous).

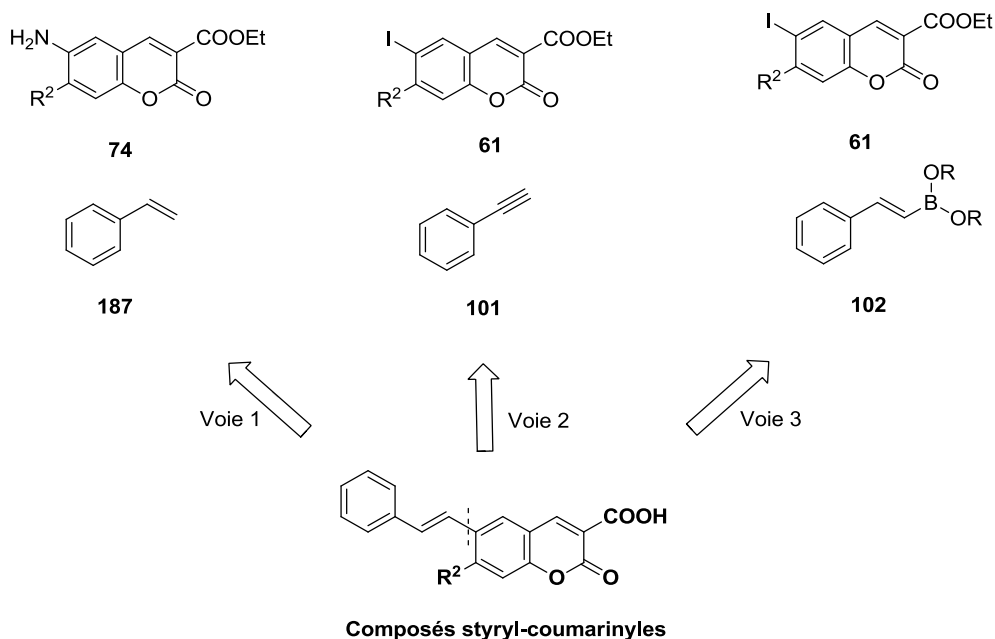


Schéma 108: Rétrosynthèse des composés styryl-coumarinyles.

Dans les paragraphes ci-dessous, nous allons détailler ces trois voies de synthèse.

## XII.1. voie 1 : Couplage de Matsuda-Heck

Le couplage de Matsuda-Heck est une arylation palladocatalysée utilisant des sels de diazonium à la place des iodo-aryles et triflate-aryles utilisés lors du couplage de Mizoroki-Heck. Le couplage sur le sel de diazonium libère du diazote, très bon groupement partant, qui facilite l'addition oxydante sur le palladium [ $\text{Pd}^{(0)}$ ]. L'étape suivante est une carbopalladation, puis la déshydropalladation permet la formation du produit **190**. Le palladium [ $\text{Pd}^{(0)}$ ] est régénéré en présence de la base (**Schéma 109** ci-dessous).

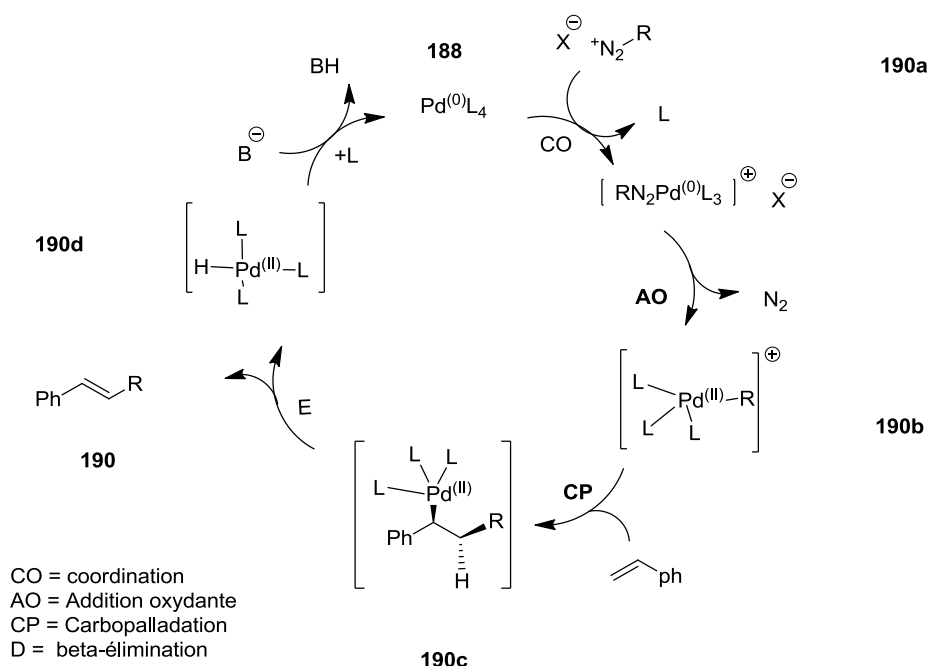


Schéma 109: Mécanisme du couplage de Matsuda-Heck proposé par Sabino et *coll*<sup>188</sup>.

Nous avons utilisé cette méthode pour former les composés styryl-coumarinyles. La réaction a lieu à 25 °C dans le THF en présence de l'aminocoumarine **191**, du nitrite de tert-butyle, de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  et du ligand 2,6-diisopropylphényl-imidazolium (**Schéma 110** ci-dessous).

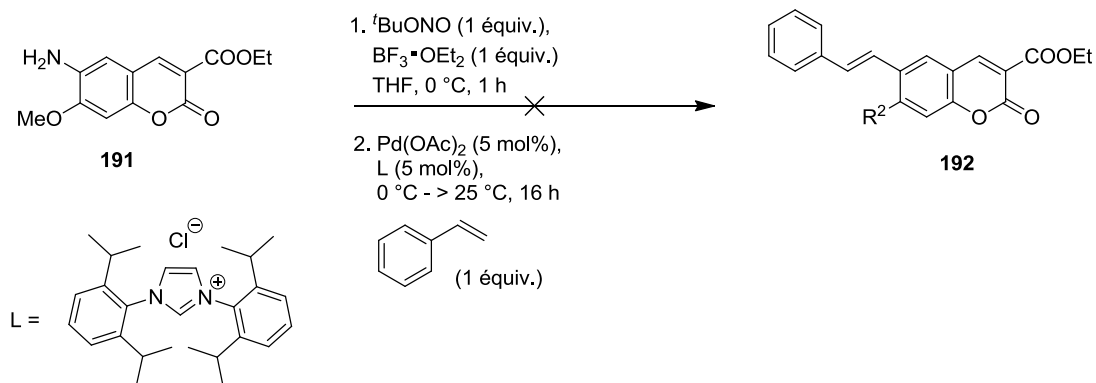


Schéma 110: Formation des composés styryl-coumarinyles par couplage Matsuda-Heck

Le nitrite de tert-butyle est un donneur organique d'ion nitrosonium hautement électrophile. Durant la réaction, l'aminocoumarine est d'abord transformée en sel de diazonium, suivie du couplage palladocatalysé du styrène. Le  $[Pd^{(0)}]$  nécessaire à la catalyse de la réaction est généré in situ à partir du  $Pd(OAc)_2$  du ligand 2,6-diisopropylphényl-imidazolium<sup>189</sup>. Malheureusement, nous remarquons que ces conditions réactionnelles conduisent à la dégradation du sel de diazonium. Une stabilisation du diazonium, sous forme de sel de tétrafluoroborate en présence de l'acide  $BF_3 \bullet OEt_2$ , a été envisagée sans conduire à un résultat concluant (dégradation du réactif). Nous avons donc effectué la synthèse du produit par couplage de Suzuki-Miyaura.

## XII.2. Couplage de Suzuki-Miyaura

Deux voies de synthèse par couplage de Suzuki-Miyaura pour la formation des produits finaux ont été testées. Les deux méthodes utilisent des iodocoumarines comme précurseur. L'arylation palladocatalysée de Suzuki-Miyaura se fait en milieu basique à partir d'un halogéno-aryle et d'un ester boronique (ou acide boronique). Dans le mécanisme de la réaction, le palladium  $[Pd^{(0)}]$ , utilisé comme catalyseur, réalise une addition oxydante sur l'halogéno-aryle suivie de l'échange de ligand de l'halogène par l'ion hydroxyde présent dans le milieu (condition basique). Ce groupement hydroxyde lie le bore et facilite la transmétallation sur le palladium. Les dernières étapes sont la cis-isomérisation suivie de l'élimination réductrice conduisant à la libération du produit de couplage et la régénération du catalyseur. L'hydroxyde joue un rôle important lors de la cis-isomérisation.

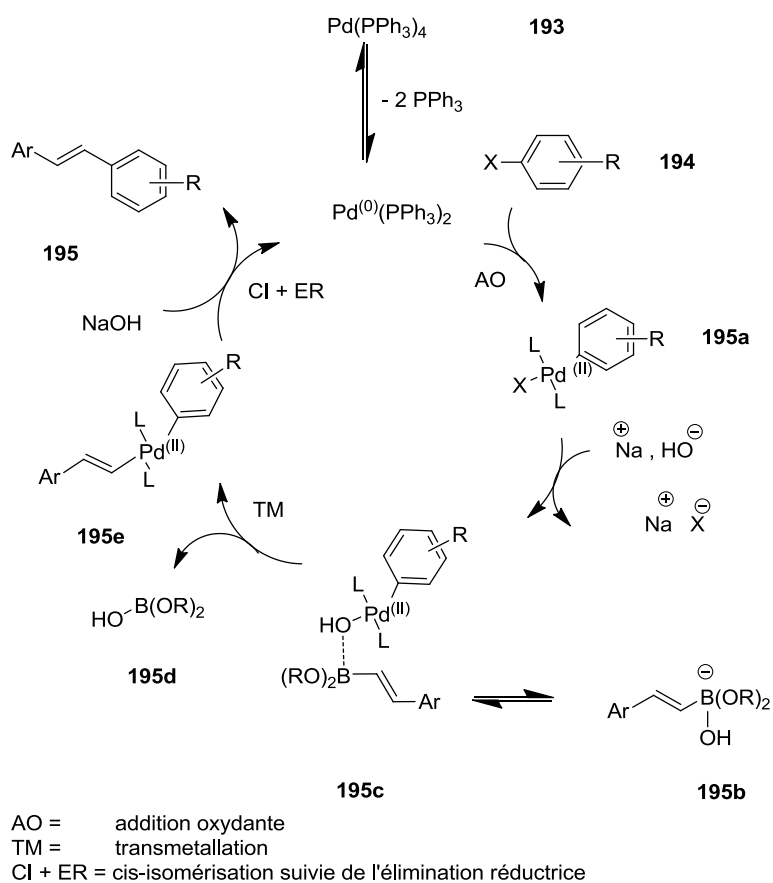


Schéma 111: Mécanisme du couplage de Suzuki-Miyaura

Nous avons réalisé la formation des composés styryl-coumarinyles par cette méthode. Dans la voie 2, la formation du produit **LSP16-2074** se fait dans le THF en présence d'un excès de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , du catéchol borane, du phénylacétylène **101**, du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  et d'un synthon iodo-coumarinique. Dans ces conditions, l'ester boronique est généré *in situ* à partir du phénylacétylène **101** (Schéma 112 ci-dessous).

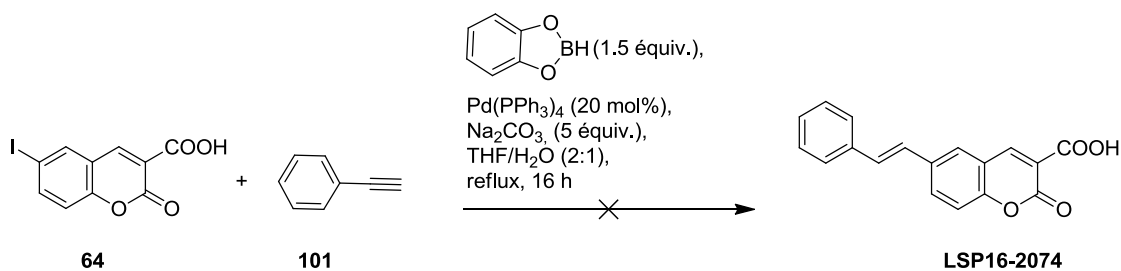


Schéma 112: Formation du composé **LSP16-2074** par couplage de Suzuki-Miyaura (voie2).

Cette voie de synthèse ne conduit pas non plus à la formation du produit souhaité. Nous expliquons ses résultats par une dégradation du catécholborane. Finalement, nous avons opté pour l'utilisation d'un ester boronique commercial pour former les produits (voie 3). Le couplage se fait

dans un reflux de THF/H<sub>2</sub>O (1 :1) en présence de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> et d'un excès la base Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nous avons utilisé les synthons éthyle-6-iodo-coumariniques pour réaliser la réaction. La saponification de l'ester éthylique se fait *in situ* (**Schéma 113** ci-dessous).

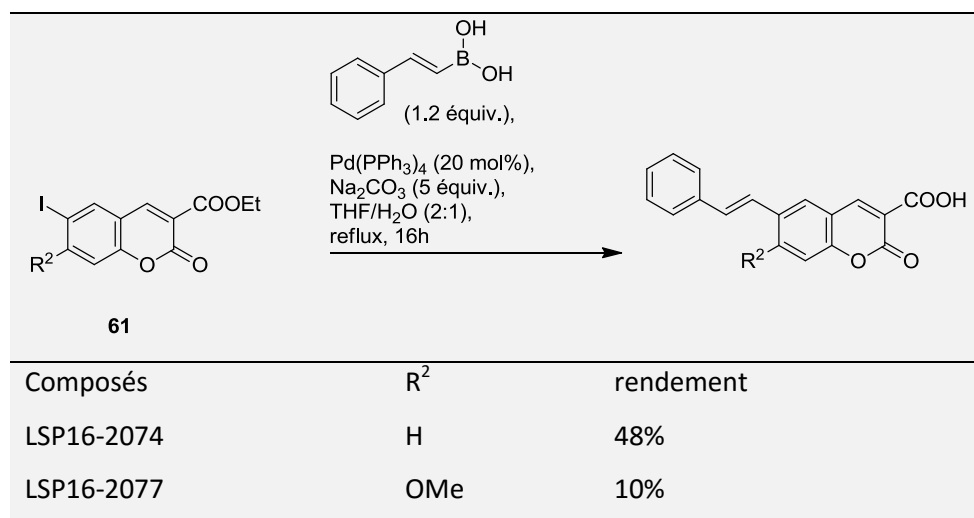


Schéma 113: Formation des analogues styryl-coumarinyles par le couplage de Suzuki-Miyaura (voie 3)

Nous avons obtenus les produits finaux avec des rendements faibles de 48% et 10% respectivement pour les composés **LSP16-2074** et **LSP16-2077**. Le mauvais rendement de cette dernière est dû à la purification délicate du composé, par trituration dans l'éthanol à chaud. Les tentatives de purification sur colonne chromatographique ont conduit à la dégradation du produit.

○ **Cas particulier de l'analogue 7-hydroxy-6-styryl-coumarine LSP16-2095**

Nous avons envisagé la formation du composé **130** dans les conditions classiques de couplage de Suzuki-Miyaura en présence de l'iodocoumarine, d'un 'excès de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, et en présence du catalyseur Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (**Schéma 114** ci-dessous).

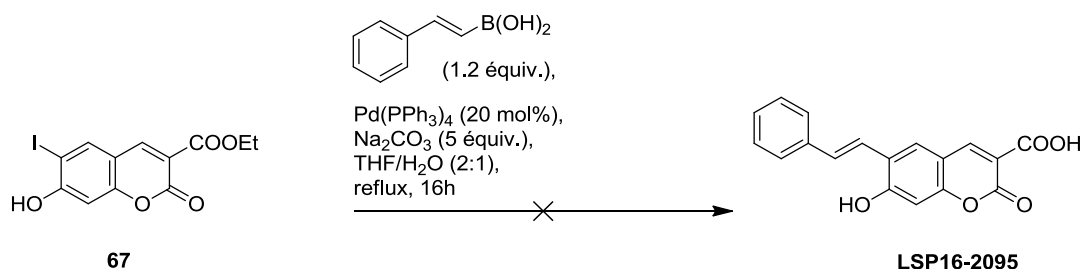


Schéma 114: Couplage de Suzuki-Miyaura sur la 7-hydroxy-6-iodocoumarine.

Malheureusement, nous n'obtenons pas la formation du produit souhaité dans ces conditions. On remarque la dégradation de l'iodocoumarine **67**. Le groupement 7-hydroxyle de la coumarine a finalement été protégé par le méthoxyméthyle éther suivie du couplage palladocatalysé. La déprotection du groupement protecteur méthoxyméthyle se fait ensuite en

milieu acide dans un mélange H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH. La saponification se fait en milieu basique (Schéma 115 ci-dessous).

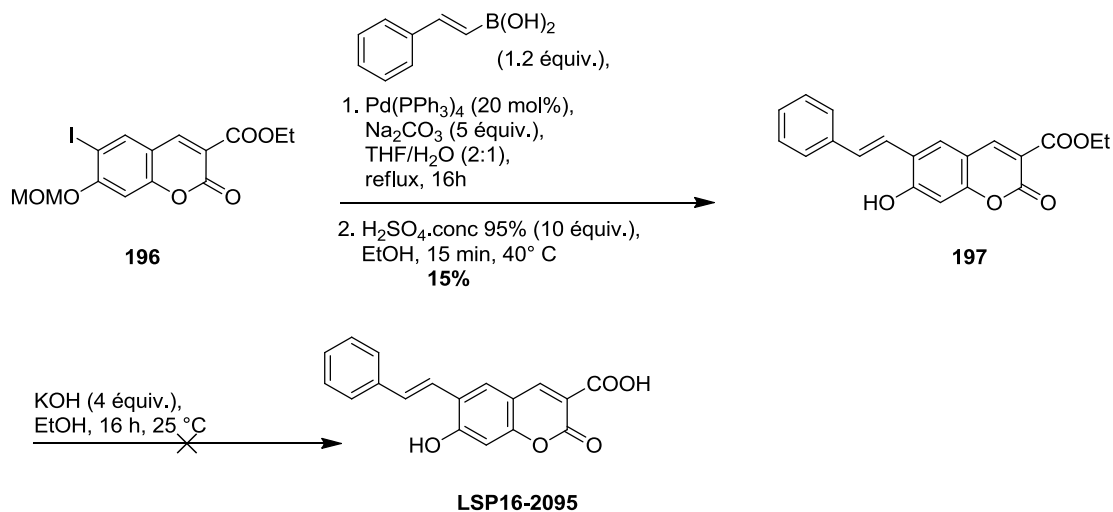


Schéma 115: Formation de l'analogue 7-hydroxy-6-styryl-coumarine (LSP16-2095).

Nous avons obtenu le composé **197** avec un rendement faible de 15%. Malheureusement, contre toute entente, la saponification en milieu basique conduit à la dégradation du composé. Dans les perspectives, pour la formation de cet analogue, la saponification de l'ester éthylique sera faite avant la déprotection du groupement méthoxyméthyle éther. On pourrait également réaliser le couplage de Suzuki-Miyaura directement sur la coumarine acide **127**.

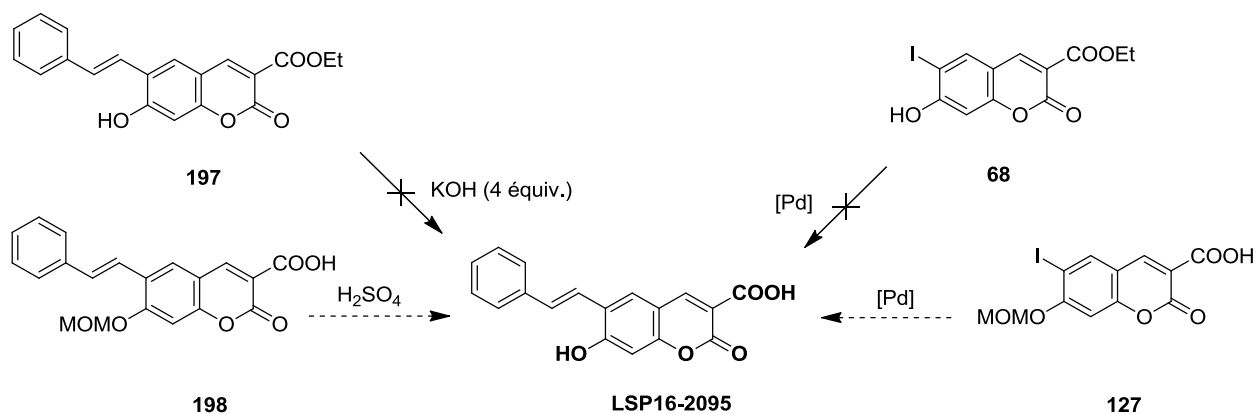


Schéma 116: Perspectives pour la synthèse de la 7-hydroxy-6-styryl-coumarine (LSP16-2095).



### XIII. Synthèse des analogues phényléthyne-coumarinyles

La méthode la mieux adaptée pour la formation de la liaison alcyne entre deux aryles est le couplage palladocatalysé de Sonogashira. Ce couplage se fait en présence d'un halogéno-aryle et d'un éthyne-aryle. Le palladium  $[Pd^{(0)}]$  est utilisé comme catalyseur, il réalise une addition oxydante sur l'halogéno-aryle. En parallèle, l'alcyne terminal est déprotoné par la triéthylamine. On obtient alors l'alcynure de cuivre qui effectue une transmétallation avec le palladium pour former l'intermédiaire **202c**. La dernière étape d'élimination réductrice conduit à la formation du produit de couplage (**Schéma 117** ci-dessous).

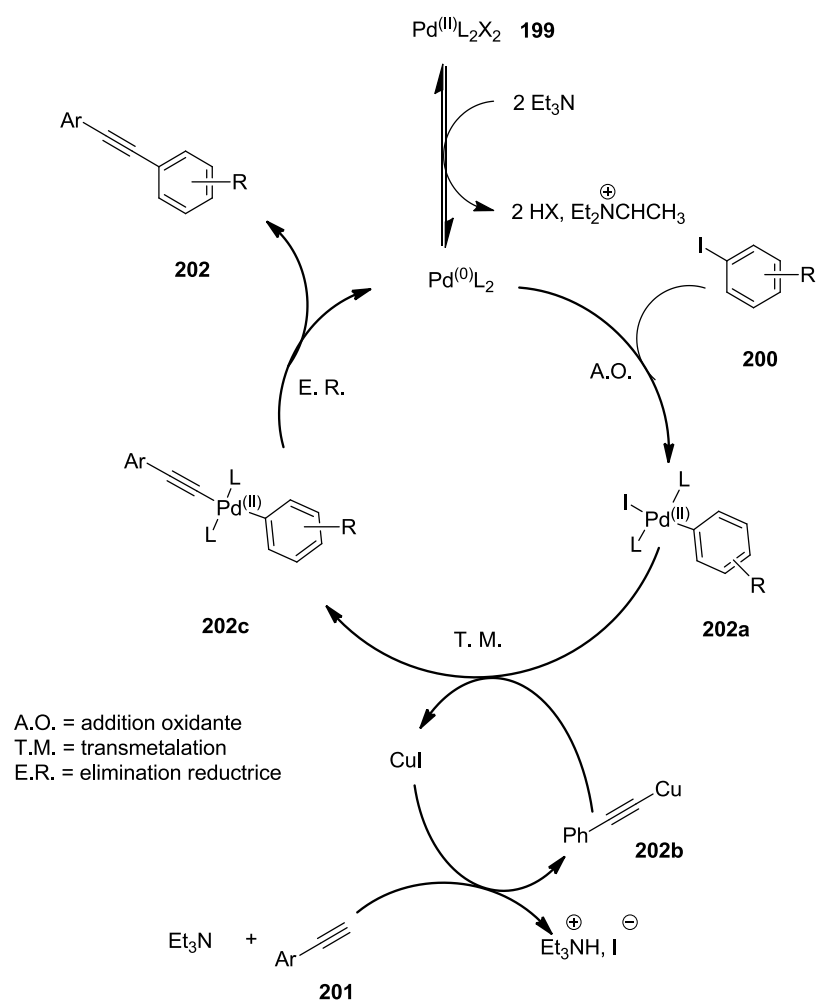


Schéma 117: Mécanisme du couplage de Sonogashira <sup>190</sup>.

Cette méthode a été employée pour parvenir à la formation des composés éthyne-coumarinyles. Nous avons utilisé les synthons iodo-coumariniques et le phénylacétylène. La formation des produits a été faite dans les conditions classiques de Sonogashira en présence de la  $Et_3N$  dans le DMF à 25 °C. Dans le cas où l'iodocoumarine utilisée est sous forme ester éthylique (cas

de **LSP17-1177**), la saponification se fait en milieu basique en présence de NaOHaq à reflux (**Schéma 118** ci-dessous).

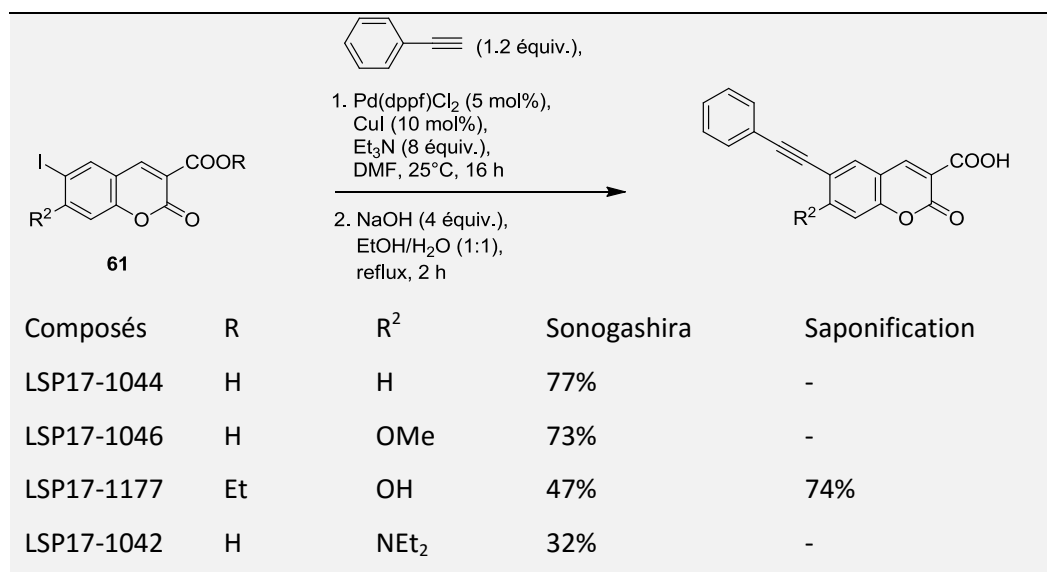


Schéma 118: Formation des composés phényléthynyl-coumarinyles.

Nous obtenons la formation des produits avec des bons rendements (30 - 80%). Dans le cas de l'analogue **LSP14-1177**, la forme ester éthylique du synthon coumarinique est utilisée lors du couplage de Sonogashira. Le produit obtenu à l'issue du couplage est saponifié avec un bon rendement (74%).

#### o Commentaire sur les rendements du couplage de Sonogashira

Les deux étapes limitantes du couplage sont l'addition oxydante et la transmétallation. Elles sont sensibles à la force de la liaison carbone-iodure (addition oxydante), et à l'encombrement stérique (addition oxydante, transmétallation). Plus la liaison carbone-iodure est faible, meilleur est le rendement, de même plus la coumarine est pauvre en électrons, meilleur sera le rendement de la réaction. Enfin, moins la coumarine est encombrée meilleur sera le rendement. L'analyse des rendements vérifie les prédictions. Le meilleur rendement est obtenu avec le composé **LSP17-1044** tandis que le rendement diminue considérablement dans le cas de du composé 7-diéthylamino **LSP17-1042** (encombrement stérique important).

## XIV. Synthèse des composés phényl-triazol-coumarinyles

Les composés phényl-triazol-coumarinyles représentent les analogues dans lesquels le lien azo est remplacé par un cycle 1,2,3-triazole. Différentes méthodes de formation des cycles triazoles existent dans la littérature. Parmi ces méthodes, la mieux adaptée reste la cycloaddition 1,3 dipolaire

en présence d'un précurseur alcyne et un azide. La méthode proposée par Sharpless préconise une catalyse au Cu(I). Cela permet notamment la formation régiospécifique du produit 1,4-di-substitué (régioisomère souhaité) à 25°C et avec de très bons rendements<sup>191</sup>. Le mécanisme proposé par Sharpless commence par la formation de l'alcynure de cuivre **204a** suivie de la coordination de l'azoture sur le métal *via* l'azote N1 (**204b**). On obtient ensuite un metallacycle à 6 chaînons (**204c**) formé par attaque nucléophile de l'azote N3 sur le carbone C2 de l'alcyne. La contraction du metallacycle **204c** conduit à la formation d'un intermédiaire cuprate à 5 chaînons, **204d**. La dernière étape du mécanisme permet la régénération du catalyseur et la formation régiosélective du produit 1,4-di-substitué **204** par protonation<sup>191a, 192</sup>. Le mécanisme de la réaction est présenté dans le **Schéma 119** ci-dessous.

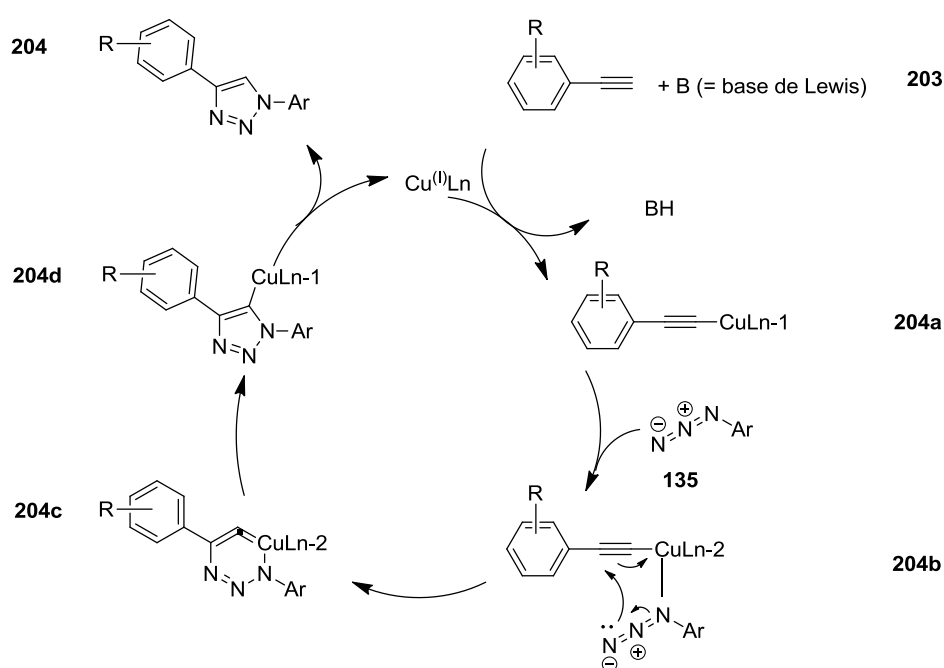


Schéma 119: Mécanisme de la cycloaddition 1,3-dipolaire proposé par Sharpless<sup>191a, 192</sup>.

Pour la formation des analogues phényltriazo-coumarinyles, deux voies retrosynthétiques ont été envisagées. La cycloaddition peut se faire à partir d'une azidocoumarine ou d'une éthynylcoumarine. Ces deux voies conduisent à des régioisomères différents. L'usage des précurseurs éthynécoumarines **205** conduit au régioisomère où la coumarine est portée par le carbone C4 du noyau triazole (voie 1). Les précurseurs azidocoumarines **207** permettent la formation du régioisomère où la coumarine est portée par l'azote N1 du noyau triazole (voie 2, **Schéma 120** ci-dessous).

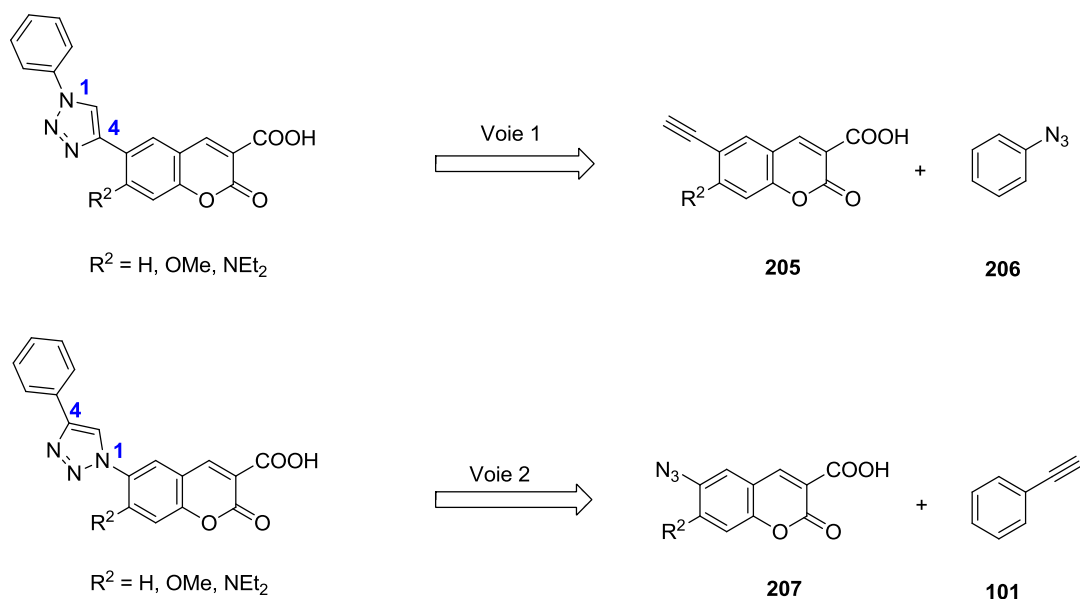


Schéma 120: Rétrosynthèse des analogues phényl-triazol-coumarinyles.

Nous avons formé différents analogues en variant la nature du substituants sur le carbone 7 de la coumarine.

#### XIV.1. Cycloaddition à partir d'une éthyne coumarine (voie 1)

Nous avons obtenus les précurseurs éthyne coumarines à partir des synthons iodo-coumariniques dans les conditions classiques de couplage palladocatalysé de Sonogashira, dans le DMF en présence du triméthylsilylacétylène, du palladium  $[\text{Pd}^{(0)}]$ , de la triéthylamine et de l'iodure de cuivre (Schéma 121 ci-dessous).

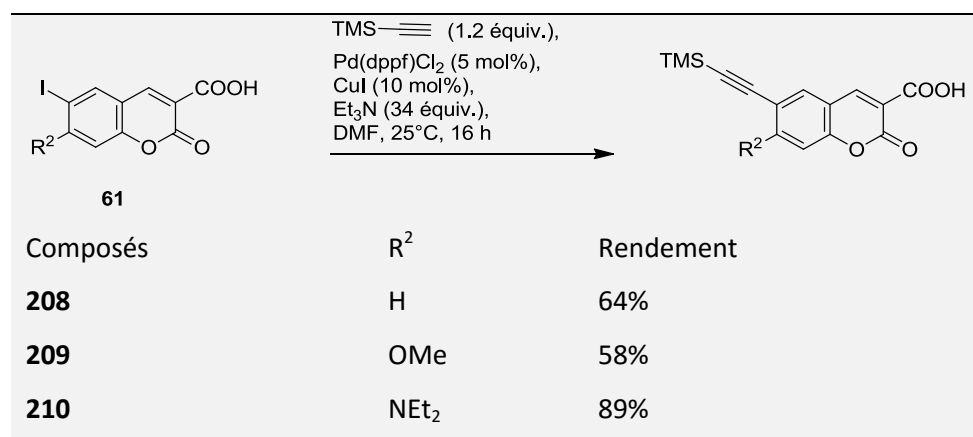


Schéma 121: Formation d'éthyne coumarines par couplage de Sonogashira.

Nous avons réalisé la cycloaddition 1,3-dipolaire directement sur l'intermédiaire silylé **209** en présence d'ascorbate de sodium, de fluorure de potassium dans un mélange THF/MeOH/H<sub>2</sub>O. Le sulfate de cuivre monohydraté (CuSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O) est utilisé comme catalyseur. (**Schéma 122** ci-dessous).

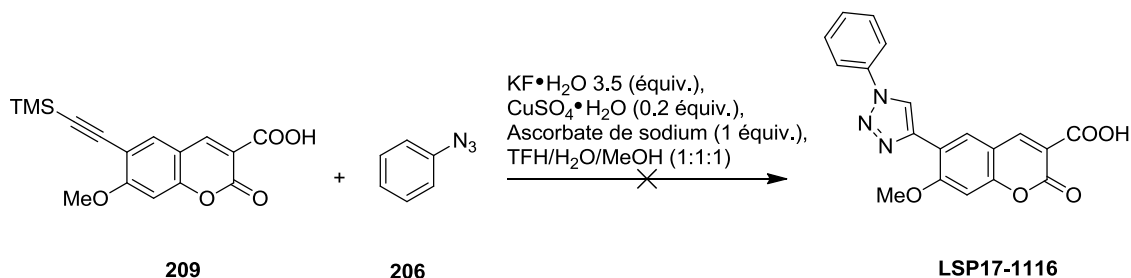


Schéma 122: Cycloaddition sur l'intermédiaire triméthylsilyl-éthynylcoumarine **209**.

Dans ces conditions, la déprotection du groupement triméthylsilyl a lieu *in situ*, suivie de la cycloaddition. Cette méthode ne conduit malheureusement pas à la formation du produit souhaité. Nous avons donc opté pour une déprotection du triméthylsilyl suivie du couplage de Sonogashira. La déprotection est effectuée en présence de TBAF dans le THF à température ambiante ou en présence de TFA dans le mélange THF/ H<sub>2</sub>O (**Schéma 123** ci-dessous).

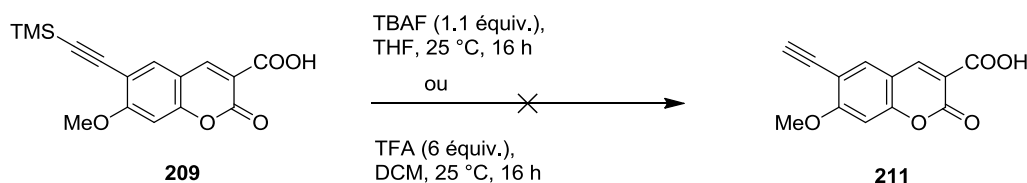


Schéma 123: Déprotection du TMS.

Lors de la réaction, l'anion fluorure hautement silicophile attaque le silicium et induit la libération de l'alcyne terminale. Malheureusement, cette voie de synthèse conduit à la dégradation du réactif. La déprotection en présence de TFA ne permet pas non plus à la formation du produit souhaité. La coumarine ne réagit pas avec l'acide à 25 °C tandis que le chauffage à 80°C conduit à la dégradation du réactif après 4 h de réaction. Nous avons changé de conditions réactionnelles en effectuant la déprotection à 25 °C en présence d'EtOH/NaOHaq 10% (**Schéma 124** ci-dessous).

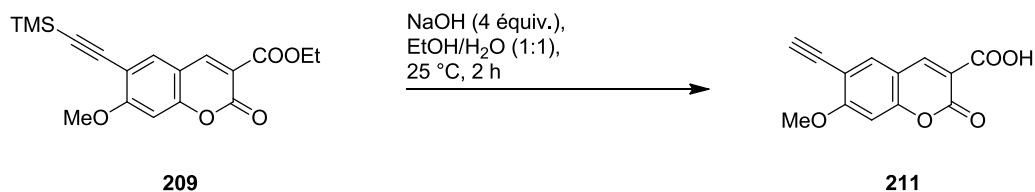


Schéma 124: Déprotection du TMS avec le NaOH.

La déprotection du triméthylsilyl-éthynylcoumarine **209** fonctionne dans ces conditions. Cependant, nous obtenons également une impureté difficilement séparable du produit souhaité. Nous avons donc changé de voie de synthèse.

## XIV.2. Cycloaddition à partir d'une d'azidocoumarine (voie 2)

Cette voie de synthèse utilise les synthons azidocoumarines dont la synthèse a été détaillée dans le partie A de ce chapitre. La cycloaddition se fait à 25 °C par catalyse à l'iodure de cuivre dans le DMSO. Lorsque l'azidocoumarine utilisée est sous forme d'ester éthylique, la cycloaddition dipolaire est suivie de l'hydrolyse en milieu acide (TFA), ou basique (NaOH) pour obtenir les composés finaux (**Schéma 125** ci-dessous).

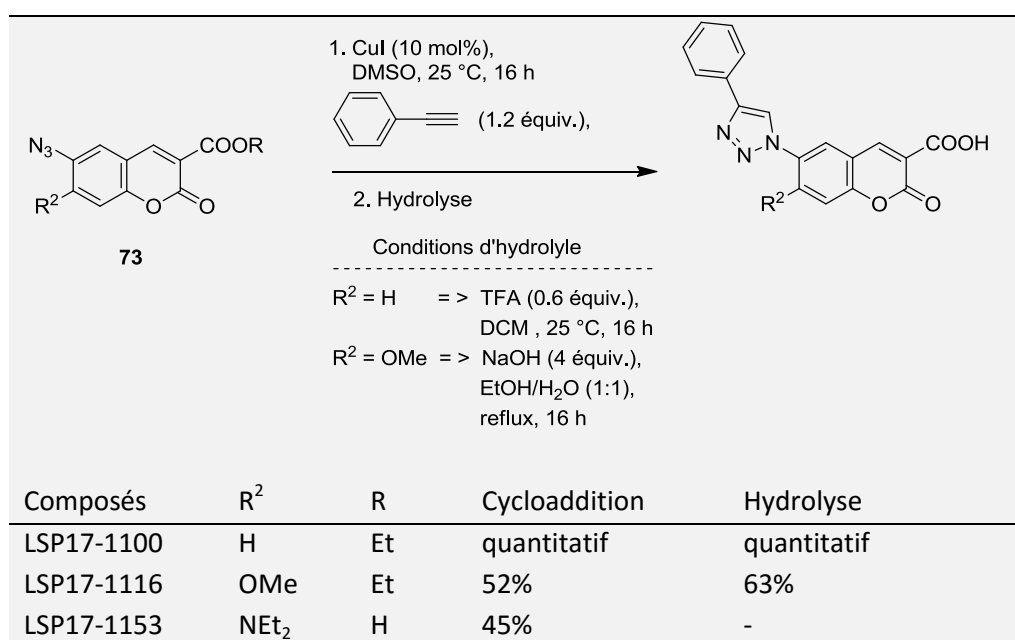


Schéma 125: Réaction de formation des analogues phényltriazol-coumarinyles.

Le rendement de la réaction de cycloaddition dépend surtout de la facilité avec laquelle le dipolairophile arriverait à s'approcher suffisamment près de l'azidocoumarine pour initier la cycloaddition. Ainsi, moins la coumarine est encombrée meilleur est le rendement de la réaction. Ces prédictions sont confirmées dans notre cas au regard de la comparaison des rendements des composés **LSP17-1-100** (quantitatif) et **LSP17-1-153** (45%, dû à l'encombrement stérique du groupement diéthylamino).

### XIV.3. Cas particulier de la 7-hydroxy-(phényltriazol)-coumarine 213.

Ce ligand présente une analogie intéressante avec les colorants azoïques dérivé du Bleu Trypan : les deux types de composés possèdent un groupement hydroxyle en ortho d'une liaison -N=N-. Cette similarité permettrait une bonne comparaison entre les deux types de ligands (**Schéma 126** ci-dessous).

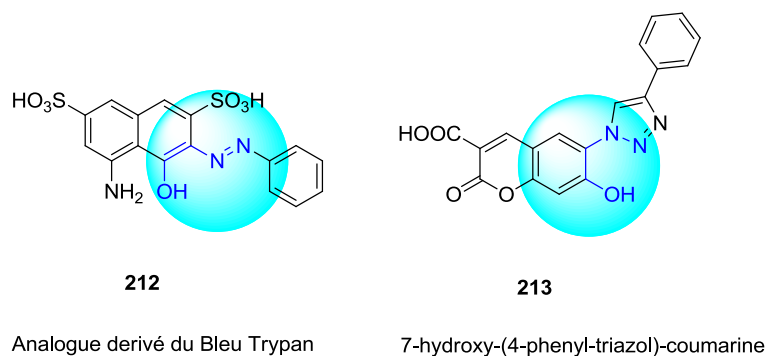


Schéma 126: Similarité entre le naphtyle-azo et la 7-hydroxycoumarine-triazole.

Lors de la synthèse des synthons azido-coumariniques, nous n'avons pas obtenu la 6-azido-7-hydroxycoumarine (cf. partie A de ce chapitre). Cependant nous avons obtenu l'azidocoumarine **83** qui permet la réaction de cycloaddition en présence de phénylacétylène et d'iodure de cuivre (**Schéma 127** ci-dessous).

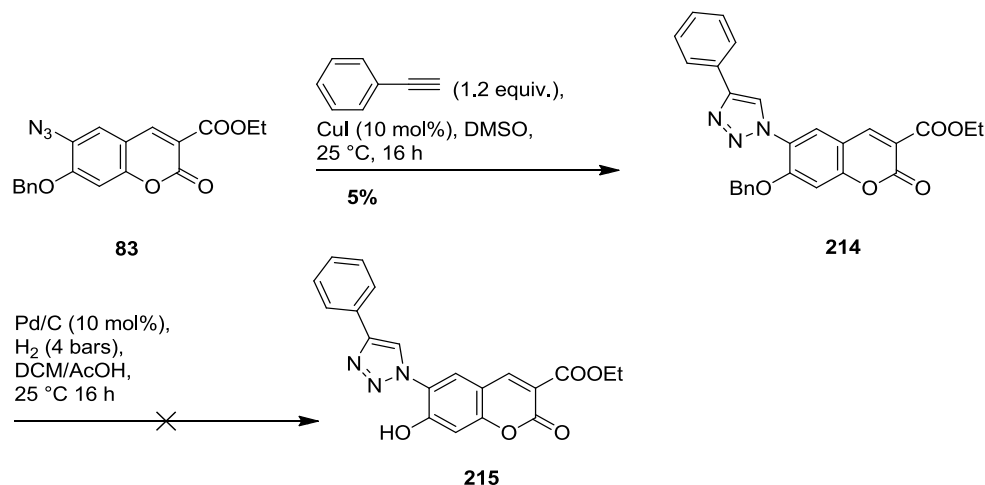


Schéma 127: Formation de la 7-hydroxy-(phényltriazol)-coumarine.

Nous obtenons la formation du produit **214** avec un rendement faible (5%) dû à l'encombrement stérique du benzyle. Malheureusement, la déprotection du benzyle en présence de Pd/C ne permet la formation du produit souhaité. Le composé **214** ne réagit pas dans ces conditions. L'augmentation de la pression de dihydrogène conduit à des réactions secondaires sur la coumarine (dégradation).

### Perspective pour la formation du produit

Dans les perspectives, la formation de l'analogue **215** pourrait se faire à partir de la l'azidocoumarine **80** dont une stratégie de synthèse à été présenté dans le **Schéma 66**. La formation du noyau triazole se ferait toujours par cycloaddition 1,3-dipolaire (**Schéma 128** ci-dessous).

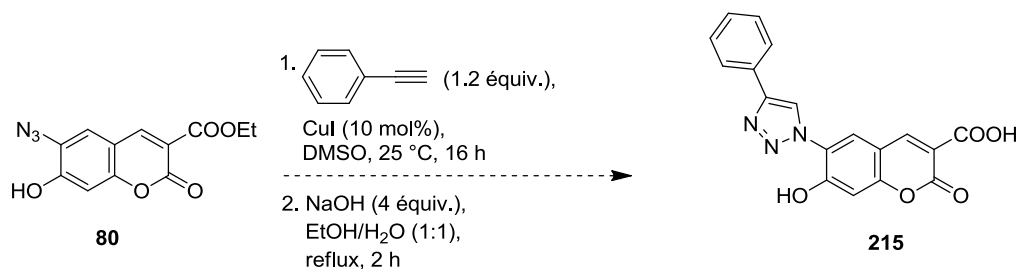


Schéma 128: Perspective pour la formation du composé **215**.



## XV. Synthèse des analogues phényl-coumarinyles

Pour l'obtention de ces analogues, la coumarine est directement liée au motif hydrophobe aryle. Différentes méthodes de synthèse restent possibles pour former ces analogues. Cependant, seul le couplage de Suzuki-Miyaura a été réalisé. La réaction se fait en présence de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  et de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (ou de  $\text{CsF}$ ) dans un mélange THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , ou dans le DMF (**Schéma 129** ci-dessous).

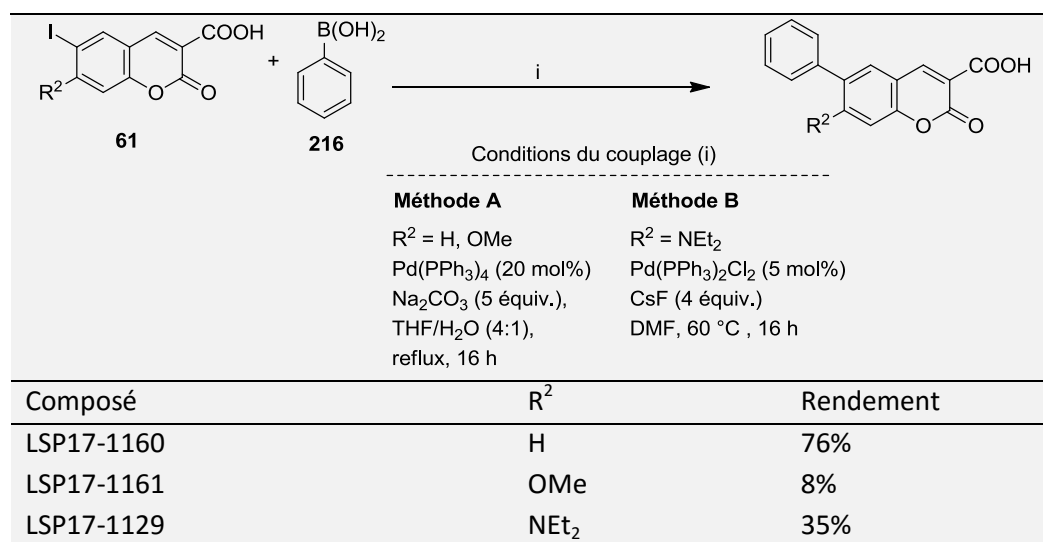


Schéma 129: Synthèse d'analogues phényl-coumarines.

La formation des composés **LSP17-1160** et **LSP17-1161** se fait dans le mélange THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (méthode A). Ces composés sont obtenus avec un rendement de 76% et 8%, respectivement. Le rendement très faible (8%) lors de la formation du composé **LSP17-1160** provient des problèmes de solubilité rencontrés avec le synthon 7-méthoxy-6-iodocoumarine dans le solvant THF/ $\text{H}_2\text{O}$ . Pour limiter ces problèmes, la synthèse du composé **LSP17-1129** a donc été réalisée dans le DMF (méthode B). Nous obtenons la formation du produit avec un rendement faible (35%).

## XVI. Conclusion

Nous avons formés 23 composés coumarinyles repartis en 5 familles en fonction de la nature du lien entre la coumarine et le motif aryle hydrophobe. On distingue 11 composés phényldiazényl-coumarinyles (lien azo), 2 composés styryl-coumarinyles (lien alcène), 4 composés phényléthynyl-coumarinyles (lien alcyne), 3 composés phényltriazol-coumarinyles (lien triazole) et 3 composés phényl-coumarinyles (liaison directe de la coumarine au motif aryle).

La synthèse des composés diazényles (lien azo) se fait en 2 - 4 étapes avec des rendements globaux faibles à bons (2 – 55%). Lors de ces synthèses, nous avons pu mettre en évidence l'existence de deux formes tautomériques (formes azo et hydrazo). Contre toute attente, nous avons observé que les composés se présentent potentiellement sous la forme azo dans le DMSO. Ces résultats sont différents des observations effectuées lors des études préliminaires sur les colorants azoïques dérivés du Bleu Trypan, qui se présentent sous la forme hydrazo <sup>125a</sup>.

La formation des composés styryl-coumarinyles à été effectuée par couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura. Ces composés sont obtenus avec des rendements faibles (10 - 35%). Ces types de molécules semblent sensibles aux conditions basiques lorsque la coumarine est substituée par un groupement 7-hydroxyle. De même, les analogues phényl-coumarinyles («sans lien») sont formés par couplage de Suzuki-Miyaura. Les produits sont obtenus avec des rendements faibles à bons (8 – 80%).

Les composés éthynyl-coumarinyles sont formés par couplage palladocatalysé de Sonogashira. Les molécules sont obtenues avec des rendements variables (30 - 80%), en fonction de l'encombrement stérique du substituant présent sur le carbone 7 des synthons 6-iodo-coumariniques utilisés lors du couplage.

Les composés triazol-coumarinyles sont obtenus par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au Cu(I). La formation des produits se fait avec des rendements modérés à bons (45 – 100%), en fonction de l'encombrement stérique sur le carbone 7 des synthons 6-azido-coumariniques utilisés lors de la réaction.



## B.Synthèse des composés biphenyl-coumarinyles

Les composés biphenyl-coumarinyles représentent les analogues phényl-coumarinyles augmentés d'un noyau phényle supplémentaire. Le motif aryle hydrophobe de ces composés est substitué par un groupement amino post-fonctionnalisable qui améliore les propriétés de solubilité. On distingue 4 familles de molécule, dont les structures sont présentées dans le **Schéma 130** ci-dessous.

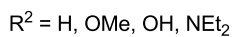
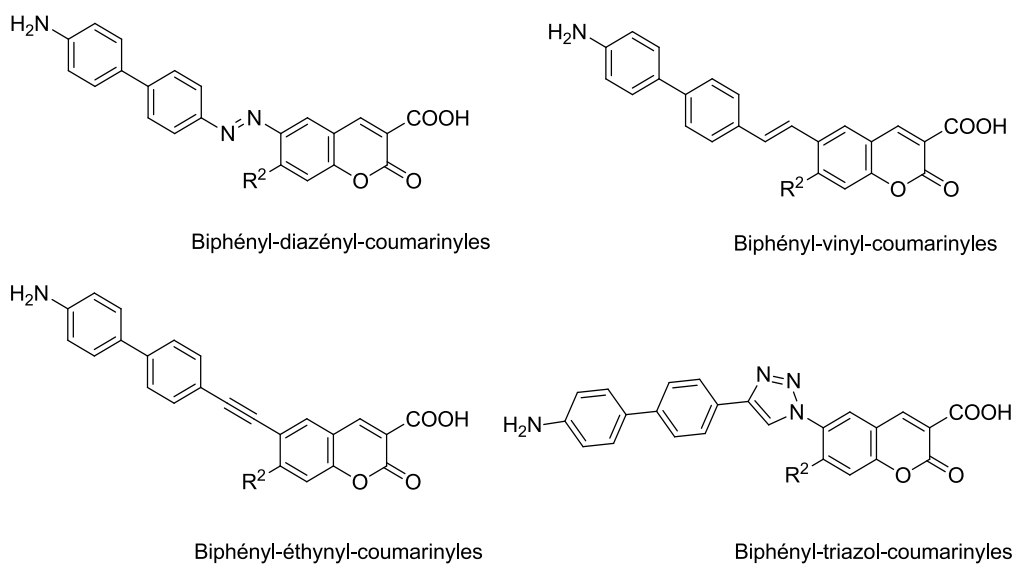


Schéma 130: Structures des analogues biphenyl-coumarinyles

## XVII. Synthèse des analogues biphényldiazényl-Coumarinyles

Nous avons envisagé deux voies de rétrosynthèse pour la formation de ces composés. La première concerne le couplage monoazoïque sur un hydroxybenzaldéhyde substitué suivie de la formation de la coumarine. Dans la seconde méthode, la synthèse se fait par couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura à partir des composés phényldiazényl-coumarinyles (**Schéma 131** ci-dessous).

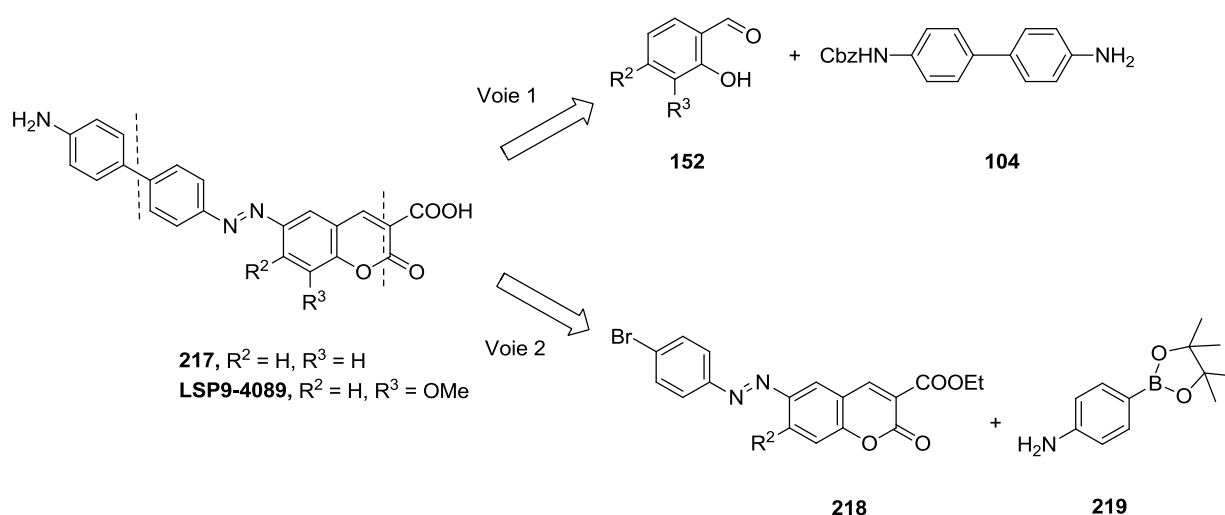


Schéma 131: Rétrosynthèse d'analogues biphényldiazényl-coumarinyles.

La formation des composés **104** et **218** a été détaillé dans la partie A de ce chapitre.

### Voie 1 : Couplage azoïque sur un 2-hydroxybenzaldéhyde substitué

Nous avons formé le sel de diazonium du précurseur **104** en milieu acide en présence de nitrite de sodium. Le couplage azoïque sur le 2-hydroxybenzaldéhyde substitué se fait à pH basique dans le solvant EtOH/H<sub>2</sub>O. La coumarine est formée dans les conditions classiques de condensation de Knoevenagel (**Schéma 132** ci-dessous)

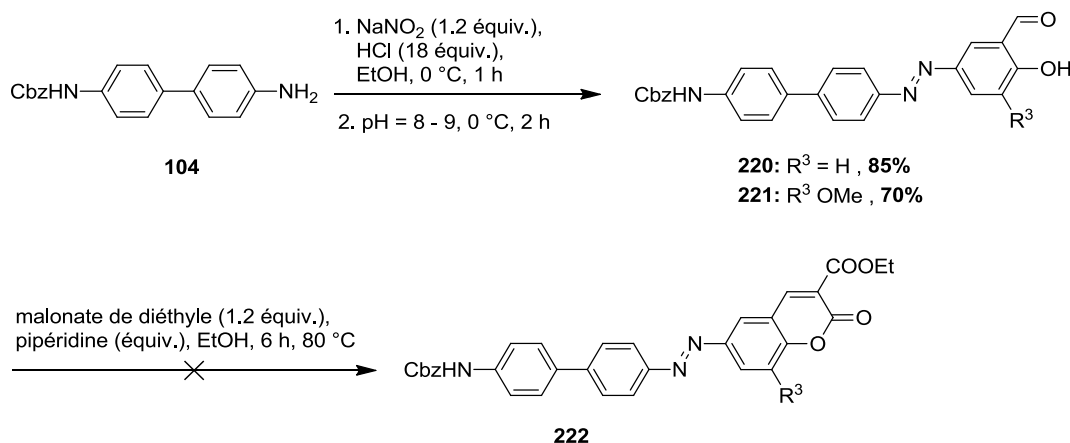


Schéma 132: Formation de composés biphényldiazényl-coumarines.

Dans ces conditions, le couplage azoïque se fait avec un bon rendement (70 - 90%). Malheureusement, la condensation de Knoevenagel ne conduit pas à la formation du produit, principalement à cause de la très mauvaise solubilité des réactifs dans le solvant EtOH. Nous avons donc opté pour la formation du produit à partir de la voie 2.

### Voie 2 : Couplage de Suzuki-Miyaura sur les composé phényldiazényle-coumarinyles

Le couplage de Suzuki-Miyaura a été réalisé dans un mélange biphasique Toluène/H<sub>2</sub>O en présence d'un excès du précurseur diazényle **218**, de l'ester borique en défaut, du bromure de tétrabutylammonium (TBAB) comme agent de transfert de phase, du carbonate de potassium, et du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. La saponification se fait en présence de KOH (Schéma 133 ci-dessous).

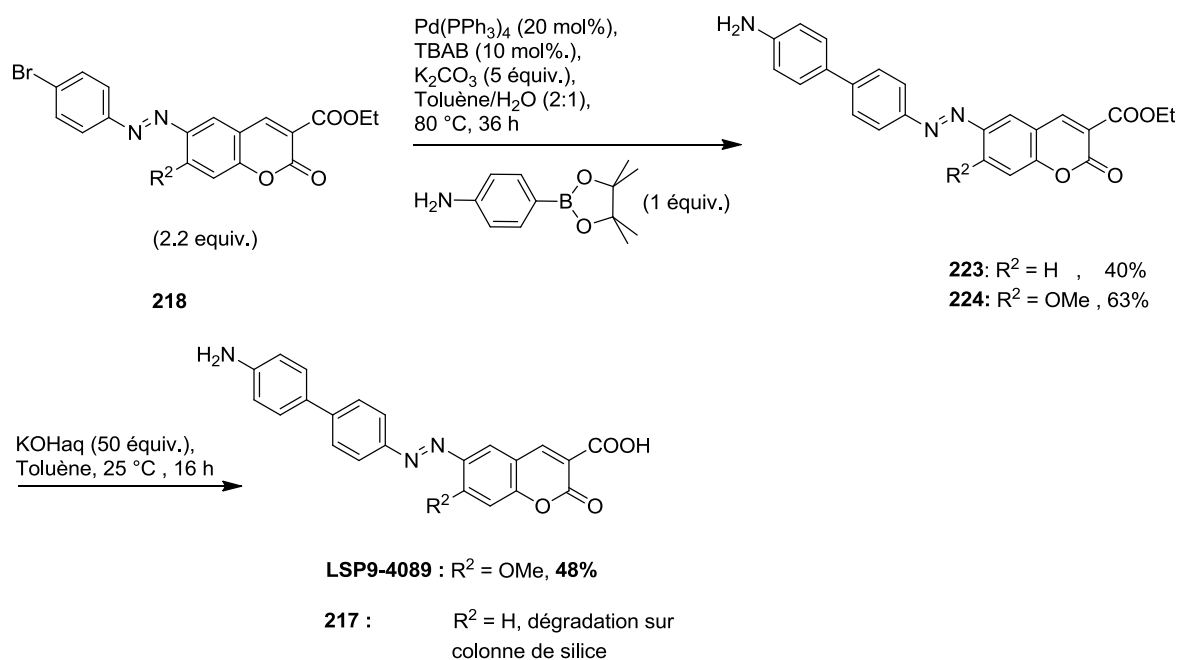


Schéma 133: Formation des composés **LSP9-4089** et **217**.

Nous obtenons la formation des produits souhaités avec des rendements de 40% et 63%, respectivement pour les composés **223** et **224**. Le produit final **LSP9-4-089** est obtenu avec un rendement faible (48%). Le produit **217** se dégrade lors de la purification sur colonne chromatographique.

## XVIII. Synthèse des analogues biphenylvinyl-coumarinyles

La formation des composés biphenylvinyl-coumarinyles se fait à partir du précurseur biphenylvinyl-dioxaborolane **106** précédemment synthétisé et des synthons iodo-coumariniques **61**. La synthèse se fait par couplage de Suzuki-Miyaura dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O, en présence de [Pd<sup>0</sup>] et d'un excès de la base (**Schéma 134** ci-dessous).

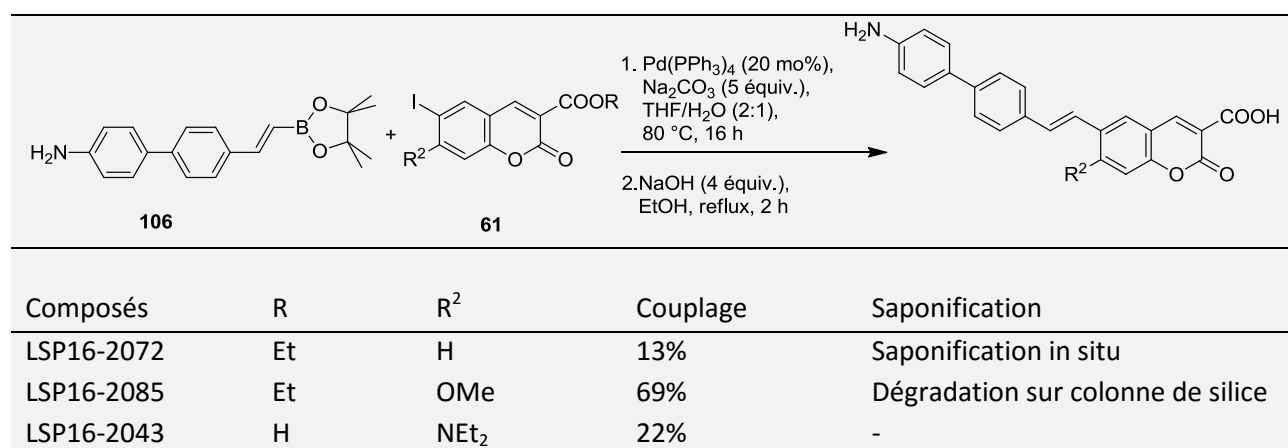


Schéma 134: II. Formation des analogues biphenylvinyl-coumarinyles.

Nous obtenons les produits avec des rendements faibles à bons (10 – 70%). Lors de la formation du composé **LSP16-2072**, la saponification de la coumarine a lieu *in situ*, due à l'excès de la base Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 équivalents). Le composé **LSP16-2085** est saponifié après le couplage de palladocatalysé. Malheureusement, ce produit se dégrade lors de la purification sur colonne chromatographique. Pour limiter les problèmes de solubilité, la forme acide de la coumarine est utilisée lors de la formation du composé **LSP16-2043**. Le produit déprotégé est donc directement obtenu.

## XIX. Synthèse d'analogues biphenyléthynyl-coumarinyles

La formation des biphenyléthynyl-coumarines se fait par couplage de Sonogashira. La réaction a lieu dans le DMF à 25 °C, en présence du précurseur 4'-éthynyl-[1,1'-biphényl]-4-amine **105** et des synthons iodo-coumariniques **61** (Schéma 135 ci-dessous).

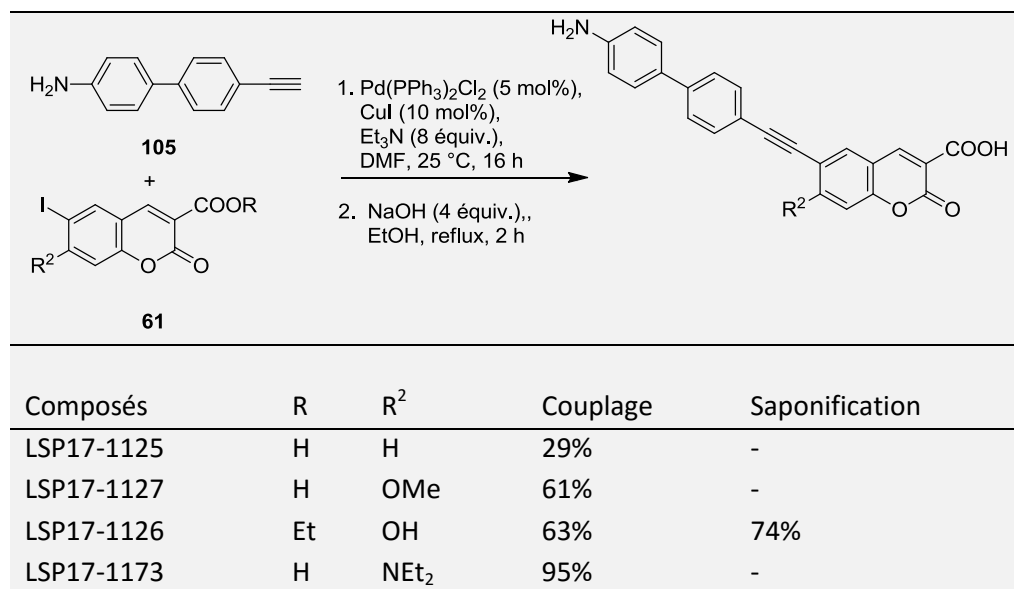


Schéma 135: Formation des biphenyléthynyl-coumarinyles.

Les produits finaux sont obtenus avec des rendements modérés à bons (30 - 95%). Dans le cas du composé **LSP17-1126**, le couplage se fait sur la forme ester éthylique de la coumarine. Le produit final est obtenu après saponification avec un rendement de 74%.



## XX. Synthèse d'analogues biphenyltriazol-coumarinyles:

La formation des biphenyltriazol-coumarinyles se fait par cycloaddition 1,3 dipolaire en présence d'iodure de cuivre. Dans le cas où la forme ester de l'azidocoumarine est utilisée pour effectuer la cycloaddition, la saponification en présence de NaOHaq permet de conduire à la formation du produit final (**Schéma 136** ci-dessous).

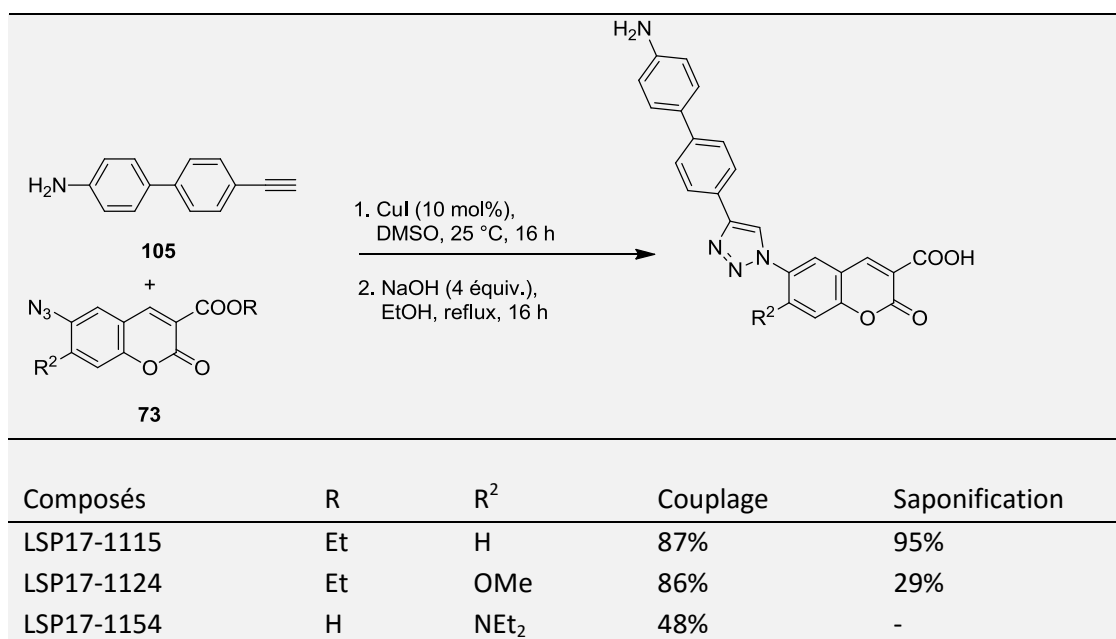


Schéma 136: Formation des composés biphenyltriazol-coumarinyles.

Les produits sont obtenus avec des rendements satisfaisants. Les composés **LSP17-1115** et **LSP17-1124** sont obtenus sous forme d'ester éthylique. La formation des produits finaux se fait par saponification avec un rendement de 95% et 29%, respectivement pour les composés **LSP17-1115** et **LSP17-1124**. Le rendement faible de la saponification du composé **LSP17-1124** provient vraisemblablement de sa purification délicate par trituration à chaud dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (1 :1).

## C. Synthèse des analogues entiers

Notre objectif final est la formation des composés entiers. Nous distinguons deux types: les analogues entiers symétriques et les analogues entiers dissymétriques. La différence entre les deux composés réside dans le nombre de motif coumarinique présent dans la molécule. Dans les analogues entiers symétriques les deux motifs naphtyles du Bleu Trypan sont remplacés par des motifs coumariniques, tandis que les analogues dissymétriques possèdent un seul motif coumarinique.

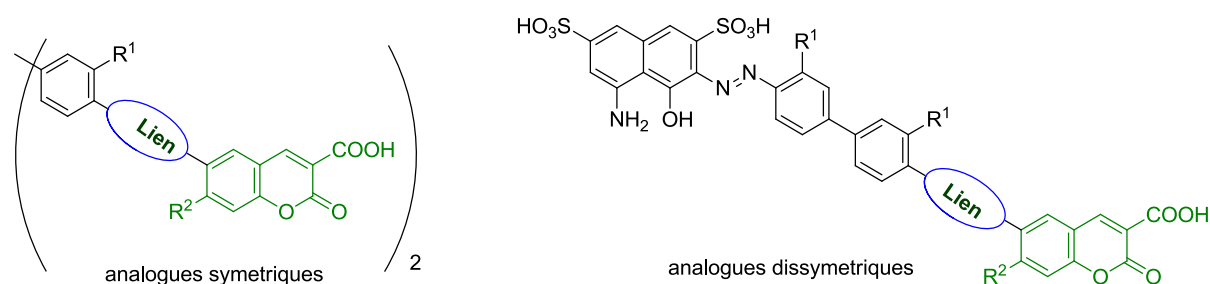


Schéma 137: Structure des analogues entiers.

Nous allons développer la synthèse des composés entiers symétriques dans les paragraphes ci-dessous. La formation des analogues entiers dissymétriques (un seul composé) sera présentée dans les perspectives.

## XXI. Développement des analogues entiers symétriques

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, nous distinguons différentes familles de composés entiers en fonction de la nature de la liaison entre les motifs coumariniques et le motif aryle hydrophobe. Nous avons tenté la formation de quatre types de composés, à savoir les analogues avec le lien azo, alcène, alcyne, et triazole.

### XXI.1. Composés entiers diazényles

Nous avons envisagé deux voies de rétrosynthèse pour la formation de ces composés. Dans la première méthode, la formation du produit se fait par couplage bis-diazoïque d'un bis-diazonium sur un 2-hydroxybenzaldéhyde substitué, suivi de la formation de la coumarine par condensation de Knoevenagel. La seconde méthode utilise les composés phényldiazényl-coumarinyles comme précurseurs pour la formation d'ester boronique **228** suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura (**Schéma 138** ci-dessous).

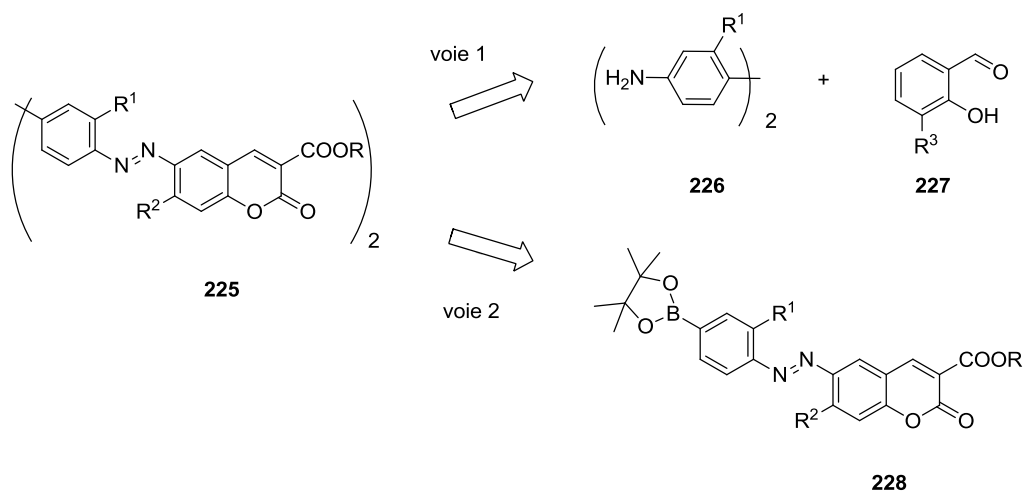


Schéma 138: Rétrosynthèse des analogues entiers diazényles symétriques.

#### a. Voie 1 : Synthèse à partir d'une dianiline

Nous avons formé des sels de bis-diazonium à partir de la benzidine **108** et la 2-tolidine **229** dans les conditions classiques de diazotation, en présence de  $NaNO_2$  en milieu acide. Deux hydroxybenzaldéhydes substitués (**57** et **155**) ont ensuite été couplés sur ces sels de bis-diazonium suivi de la formation des coumarines par condensation de Knoevenagel (**Schéma 139** ci-dessous).

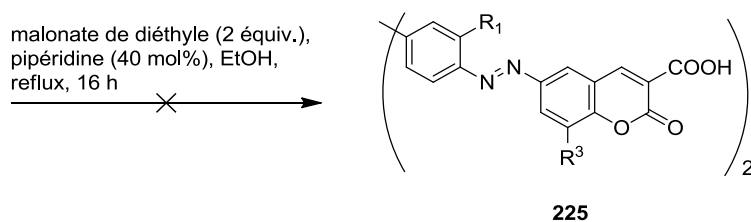
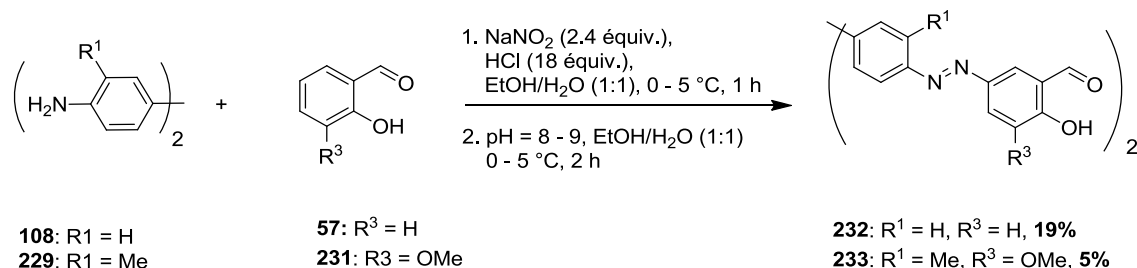


Schéma 139: Formation de composés entiers diazényles à partir d'une dianiline et un hydroxybenzaldéhyde substitué.

Les produits de la réaction sont purifiés par trituration dans l'éthanol à chaud, suivie d'une précipitation à froid dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1) à pH 4 - 5 et à 4 °C durant 16 h. Dans ces conditions, les composés (**232** et **233**) purs sont obtenus avec des rendements faibles (19% et 5%). Malheureusement, la condensation Knoevenagel en présence d'EtOH ne conduit pas à la formation des produits souhaités. Nous constatons un problème majeur de solubilité des composés **232** et **233**. Nous avons donc varié la nature du solvant (**Tableau 8** ci-dessous).

| Entrée | Solvant     | conditions  | Solubilité/Observation   |
|--------|-------------|---|--|
| 1      | EtOH        | Malonate de diéthyle (2 équiv.), pipéridine (0.8 équiv.), reflux, 16h | Le réactif ( <b>232</b> , ou <b>233</b> ) est non soluble. On n'observe pas la formation du produit <b>225</b> . |
| 2      | MeOH        |   |  |
| 3      | Toluène/THF |   |  |
| 4      | DMSO        | Malonate de diéthyle (2 équiv.), 100 °C, 16h                          | Le réactif ( <b>232</b> , ou <b>233</b> ) est soluble. On n'observe pas la formation du produit <b>225</b> .     |
| 5      | Pyridine    | Malonate de diéthyle (2 équiv.), 80 °C, 16h                           |  |

Tableau 8: Variation de la nature du solvant dans la condensation de Knoevenagel.

La solubilité des réactifs **232** et **233** est similaire dans l'éthanol et le méthanol. Elle est nettement améliorée dans le mélange toluène/THF. Elle est quasi-totale dans la pyridine et le DMSO à chaud. Lorsque la pyridine est employée comme solvant de la réaction, aucune autre base n'est ajoutée dans le milieu. Les produits obtenus dans ces différentes conditions et notamment dans le mélange toluène/THF, la pyridine et le DMSO sont difficilement caractérisables par RMN. L'analyse

par spectroscopie de masse ne montre pas la présence d'ions moléculaires correspondants aux produits souhaités. Nous avons donc effectué la formation des composés diazényles entiers par couplage de Suzuki-Miyaura.

*b. Voie 2 : Formation des composés diazényles entiers par couplage de Suzuki-Miyaura*

La borylation des composés phényldiazényl-coumarinyles se fait en présence de bis-pinacolato-dioxaborolane et de palladium  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ . La formation des composés entiers se fait ensuite par couplage de Suzuki-Miyaura dans le mélange Toluène/ $\text{H}_2\text{O}$  en présence du même catalyseur  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  (**Schéma 140** ci-dessous).

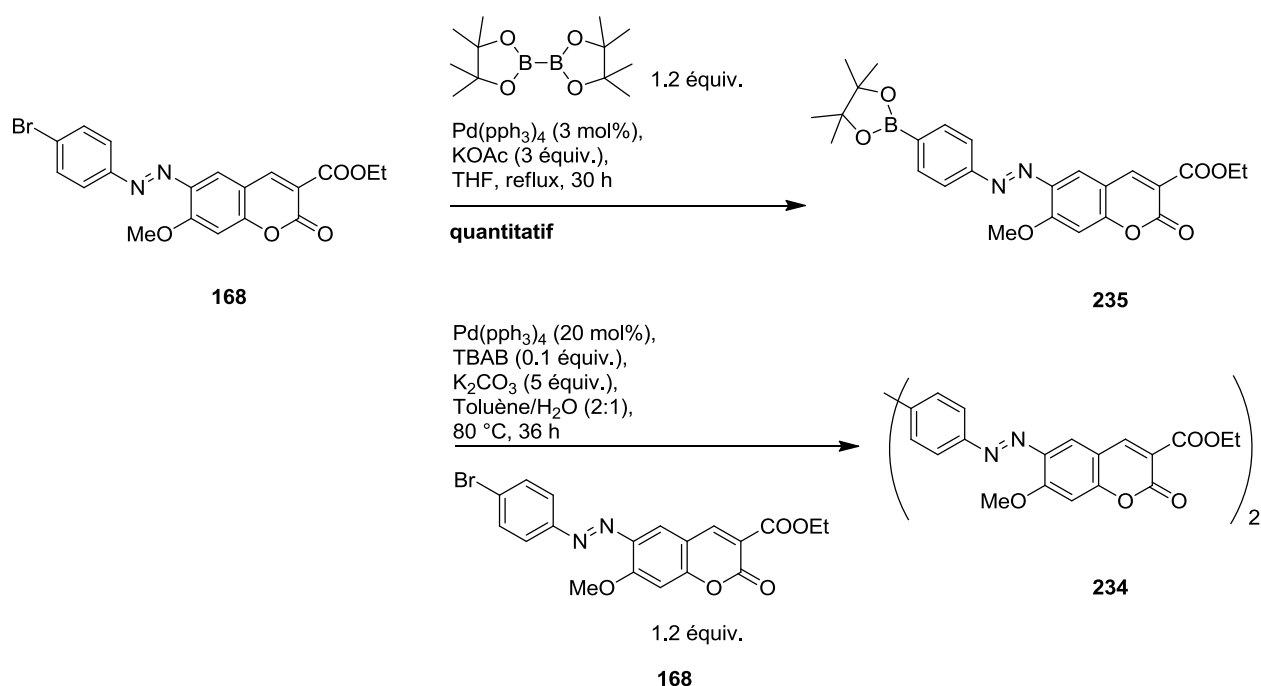


Schéma 140: Formation de composés **234** par le couplage de Suzuki-Miyaura

La borylation conduit à la formation du composé **235** avec un rendement quantitatif. De même le couplage de Suzuki-Miyaura se fait de façon quantitative (conversion). Le produit obtenu à la fin de la réaction n'est pas caractérisable par RMN (pics larges). Néanmoins, l'analyse par spectroscopie de masse indique la présence du produit souhaité **234**. La purification du composé pourrait se faire par CLHP. Cependant, nous n'avons pas eu le temps de développer une méthodologie adaptée liée aux problèmes de solubilité du composé.

## XXI.2. Synthèse composé entiers vinyl-, éthyngyl- et triazol-coumarinyles

Les composés vinyl-, éthyngyl et triazol-coumarinyles sont formés à partir des précurseurs biphényl-diéthyne **114** et biphényl-di-boronique ester **120**, et des synthons iodo-coumariniques et azido-coumariniques. La synthèse des vinyl-coumarinyles entiers se fait dans les conditions classiques de couplage de Suzuki-Miyaura, à partir des synthons iodo-coumariniques, en présence du précurseur biphénylvinyl-di-boronique ester **120** et du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  en milieu basique. Les composés entiers éthyngyl-coumarinyles sont formés à partir du précurseur biphényl-diéthyne **114** et des synthons iodo-coumariniques par couplage palladocatalysé de Sonogashira. Les composés entiers triazol-coumarinyles sont aussi formés à partir du précurseur biphényl-diéthyne **114** mais, par cycloaddition 1,3-dipolaire avec les synthons azido-coumariniques.

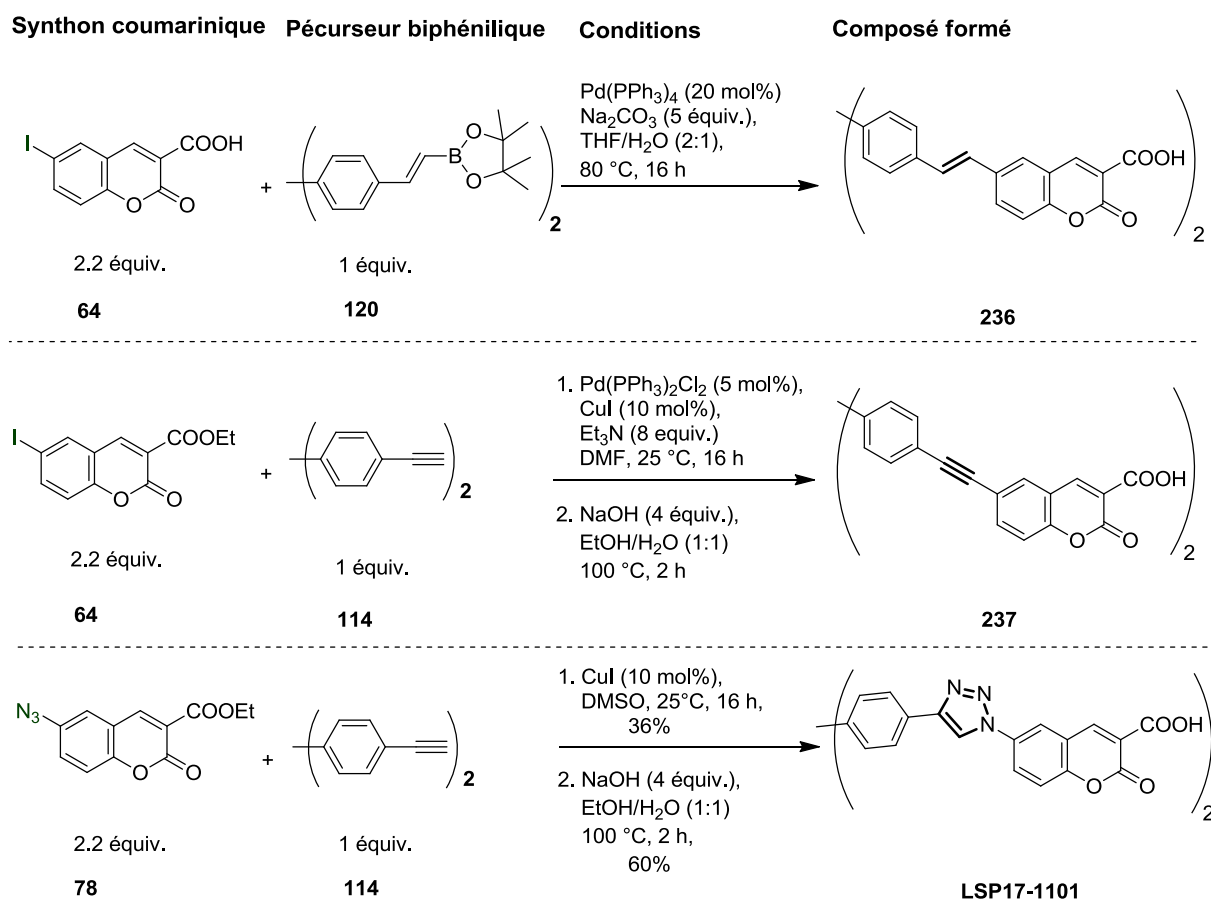


Schéma 141: Formation des composés entiers vinyl-, éthyngyl- et triazol-coumarinyles.

Nous obtenons des solides à la fin de la réaction qui, après trituration dans l'éthanol à chaud, suggèrent 30 - 90% de conversion. Ces solides ne sont pas caractérisables par RMN. Seule la spectroscopie de masse permet de confirmer la présence des produits. D'autres méthodes d'analyse doivent être utilisées pour attester la pureté des produits et confirmer leurs structures. Nous avons effectué l'analyse élémentaire par combustion complète des composés. Elle nous permet de

confirmer la présence du composé **LSP17-1101** avec une pureté de 90 - 95%. Elle ne nous permet pas ce pendant, la caractérisation des composés **236** et **237** qui semblent contenir beaucoup d'impuretés.

## XXII. Synthèse composés entiers dissymétriques

Une méthode de purification des composés entiers symétriques doit être mise en place notamment par CLHP. Cela permettra l'obtention d'une nouvelle série de ligands entiers des VGLUTs. Une alternative importante pour l'obtention d'analogues entiers est la formation de composés dissymétriques. Ces composés contiennent un motif naphtyle polaire qui améliore considérablement la solubilité des ligands entiers. Nous avons pu comparer la solubilité des composés entiers symétriques, dissymétriques et les colorants azoïques dérivés du BT, en synthétisant l'analogue **238** dont la formation se fait par diazotation, suivie du couplage azoïque sur le naphtyle (**Schéma 142** ci-dessous).

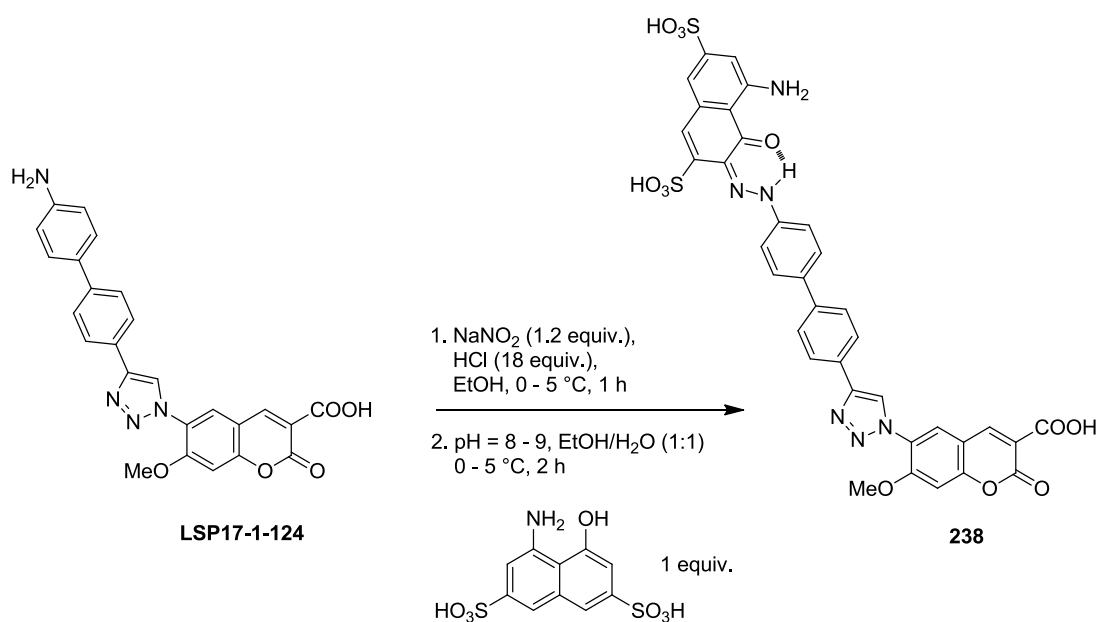


Schéma 142: Formation du composé entier dissymétrique **238**.

La structure de ce composé est analysable par RMN, et nous observons la formation du produit **238** avec un taux de conversion de 70%. Le produit secondaire semble provenir de la dégradation du diazonium. Comme prévu, nous remarquons la relative bonne solubilité du composé et notamment dans le tampon acétate d'ammonium (0.05 M)/acétonitrile (1:1) utilisé comme solvant d'élution des colorants azoïques dérivés du BT. Ces observations nous montrent que nous pourrions optimiser les conditions de purification des colorants azoïques en les adaptant aux composés dissymétriques coumarinyles.

## XXIII. Conclusion

Durant ce projet de doctorat, nous avons développé des analogues structuraux du Bleu Trypan. Ces composés sont obtenus en effectuant trois pharmacomodulations majeures. La première pharmacomodulation a concerné le remplacement du naphthyle par un fluorophore coumarine ; La seconde modification a porté sur la variation du lien entre le motif coumarinique et le motif aryle ; tandis que la troisième modification majeure a porté sur la variation de la nature du lien (suppression du lien azo, ou son remplacement par une liaison alcène alcyne, triazole). Ces différentes pharmacomodulations nous ont permis d'obtenir 34 composés finaux repartis en cinq familles, suivant la nature du lien.

La formation du composé avec le lien azo se fait en 2 - 4 étapes, dont les principales sont le couplage azoïque, suivi de la formation de la coumarine puis la saponification. Durant les synthèses, nous avons pu particulièrement constater certains problèmes de purification et/ou de dégradation de ces composés. Nous avons également constaté que la régiosélectivité du couplage azoïque peut être différente en fonction du pH de la réaction (pH = 1 ou pH = 8 - 9). Nous avons pu notamment montrer que l'attraction électrostatique entre les charges négatives du nucléophile (hydroxylate) et le cation diazonium influent beaucoup sur l'orientation du couplage. L'effet de cette orientation semble considérable lorsque le nucléophile porte deux charges négatives situées en position méta. Nous avons également constaté que les composés diazényles peuvent exister sous deux formes tautomériques (forme azo et hydrazo). Dans les solvants comme le *d*<sub>6</sub>-DMSO ou le CDCl<sub>3</sub>, la forme azo semble majoritaire. En revanche, en milieu acide, sur une colonne chromatographique ou sur une plaque de silice, les deux tautomères sont souvent séparables.

Les composés «sans lien», et ceux avec le lien alcène sont formés par couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura. Nous avons pu notamment constater des problèmes de solubilités lors de la formation de certains de ces analogues, et notamment lors de l'utilisation du synthon 7-(diéthylamino)-6-iodocoumarine. Ainsi lors de l'utilisation de ce synthon, nous faisons la réaction à partir forme acide de la coumarine et/ou dans le solvant DMF qui permet une meilleure solubilisation des réactifs.

Les composés avec le lien triazole sont obtenus par cycloaddition 1,3-dipolaire. Nous avons utilisé la méthode de Sharpless par catalyse au Cu(I) qui permet la formation régiospécifique du 1,4-di-substitué dans des conditions douces (25°C) avec des rendements satisfaisants.

Lors de la formation des composés entiers symétriques, nous avons rencontré des problèmes considérables de purification et de caractérisation. Nous avons notamment remarqué que ces composés ne sont que très peu solubles dans les solvants organiques classiques. Ils n'ont pas pu être purifiés par les techniques usuelles incluant la CLHP. Pour cette raison ces composés n'ont pas pu



être obtenus. Nous avons estimé qu'une alternative intéressante pour l'obtention composés entiers serait la formation de ligands dissymétriques. Ces ligands contiennent un motif coumarinique et un motif naphthyle. Le motif naphthyle améliore considérablement la solubilité. Nous avons notamment remarqué que ces composés sont solubles dans un tampon acétate d'ammonium (0.05 M)/acétonitrile (1:1) déjà utilisé comme solvant de purification des colorants azoïques. Ces observations nous montrent que nous pourrions optimiser les conditions pour la purification des composés dissymétriques coumarinyles par CLHP.

# **Chapitre IV**

## **Évaluation des activités biologiques**



## A.Introduction

Les transporteurs vésiculaires du glutamate représentent les meilleurs biomarqueurs spécifiques des neurones glutamatergiques. Le développement d'outils pharmacologiques ciblant ces transporteurs devrait permettre de faire des études physiopathologiques des maladies neurodégénératives qui impliquent la neurotransmission glutamatergique.

Les transporteurs vésiculaires sont des protéines transmembranaires très difficilement purifiables situées sur des vésicules présynaptiques. Les vésicules présentent une distribution de taille homogène (40 nm) et peuvent par conséquent être enrichies par des techniques de purification comme la centrifugation (différentielle, et à l'équilibre) suivie de la chromatographie d'exclusion<sup>193</sup>. Takamori et *coll.* ont quantifié la composition moyenne en protéines de la membrane d'une vésicule présynaptique par spectroscopie de masse. Ils ont montré que ces vésicules sont dotées de protéines de transport sophistiquées comme les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs), les transporteurs vésiculaires de monoamines (VMATs), les ATPases vacuolaires (V-ATPases) responsables de l'établissement du gradient électrochimique de proton, ou de protéines d'adhésion (synaptobrevine, synaptogamine, syntaxine, SNAP25) nécessaires à la fusion de la vésicule avec la membrane du neurone présynaptique permettant la libération du neurotransmetteur. On compte en moyenne 1 à 2 copies de V-ATPase par vésicules assurant l'acidification du lumen (pH 5.5), et environ 9 et 14 copies respectivement de VGLUT1 et VGLUT2<sup>98</sup>. On estime cependant qu'un seul transporteur est responsable de l'accumulation des 1790 molécules de glutamate<sup>194</sup> incorporées dans la vésicule (150 mM)<sup>98</sup>.

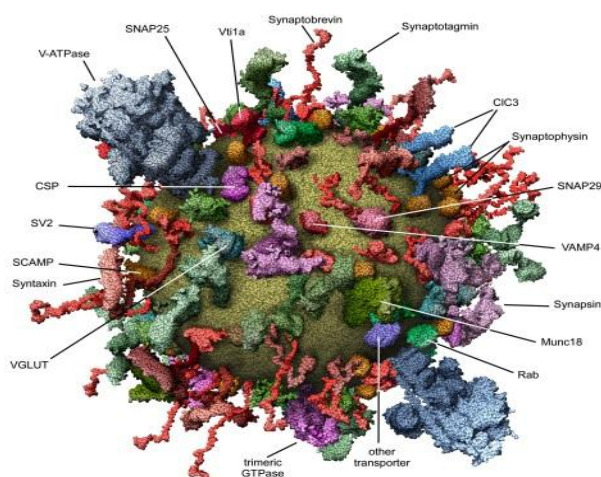
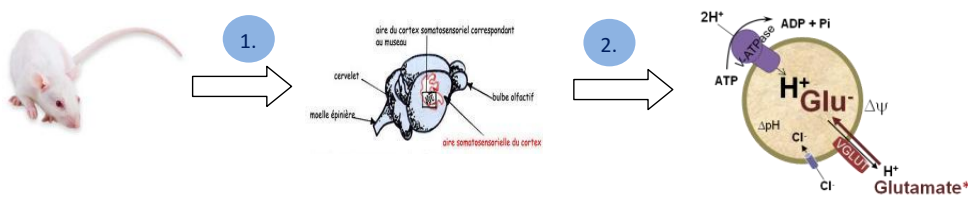


Figure 30: Représentation d'une vésicule présynaptique.<sup>98</sup>

Après avoir détaillé la synthèse des inhibiteurs, nous avons étudié leurs affinités sur les VGLUTs. L'absence de test de liaison nous a conduits à mesurer les évaluations biologiques sur des vésicules entières fonctionnelles. Le fonctionnement des VGLUTs se fait en synergie avec d'autres

protéines présentes sur la membrane de la vésicule comme les V-ATPases responsables de la force motrice nécessaire au transport. La purification des vésicules se fait à partir du cortex, du tronc cérébral, de l'hippocampe et du striatum, de cerveau de *rats Sprague-Dawley*. Les mesures sont effectuées sur des cocottes de 12 puits. L'affinité du ligand est déterminée par comptage de la radioactivité du glutamate radiomarqué ( $[^3\text{H}]\text{-Glu}$ ) incorporé à l'intérieur des vésicules entières fonctionnelles en présence de l'inhibiteur (**Schéma 143**).

### A. Préparation des vésicules synaptiques



### B. Mesure de l'affinité des nouveaux ligands

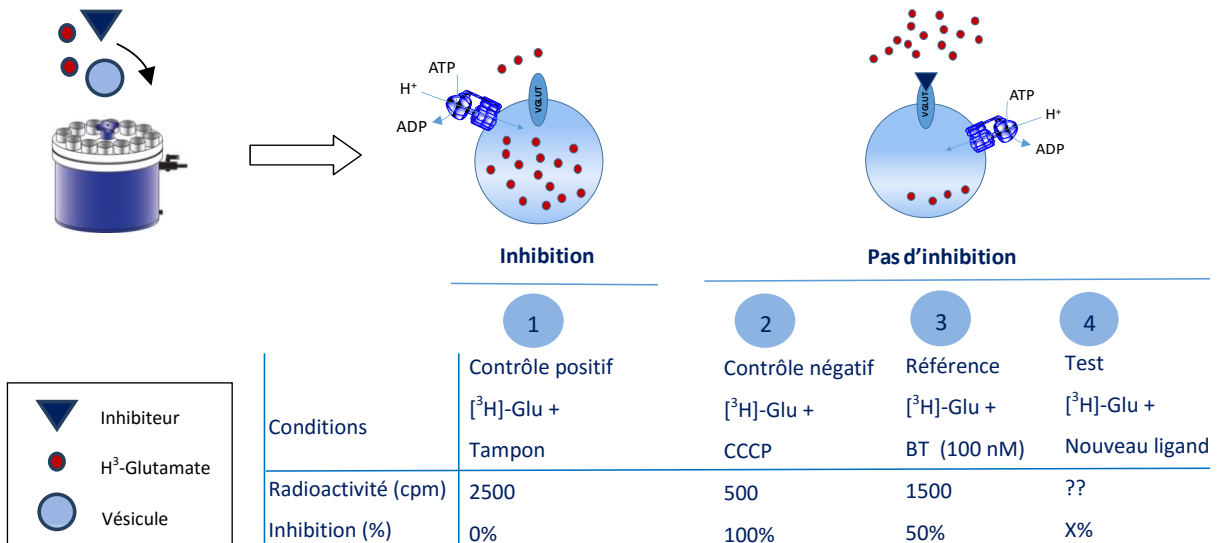


Schéma 143: Test de compétition : détermination de l'affinité de l'inhibiteur par comptage de  $[^3\text{H}]\text{-Glu}$  dans les vésicules entières fonctionnelles.

Lors des évaluations biologiques le CCCP (inhibiteur de la V-ATPase) est utilisé comme contrôle négatif. Il dissipe le gradient électrochimique de proton nécessaire à la translocation du glutamate à l'intérieur de la vésicule (100% d'inhibition). Le contrôle positif se fait en absence de tous modulateurs et conduit à 0% d'inhibition. Tous les points de mesures sont faits au moins en triplicat (sur trois expériences indépendantes). Les inconvénients majeurs de la méthode restent de rélargage du glutamate ainsi que la sensibilité du test aux différentes conditions expérimentales (température, pH, concentrations ioniques et plus particulièrement celle en ions sodiums et le chlorures). En effet, comme expliqué dans le chapitre I, des études bioénergétiques ont montré qu'à certaines concentrations les ions chlorures modifient énormément la recapture du glutamate par les VGLUTs<sup>103, 107, 195</sup>. Une activité maximale du transporteur est observée pour des concentrations en ion chlorure comprises entre 4 – 6 mM<sup>103, 195b</sup>. Dans le cas contraire, il inhibe la capture du glutamate (**Figure 31** ci-dessous).

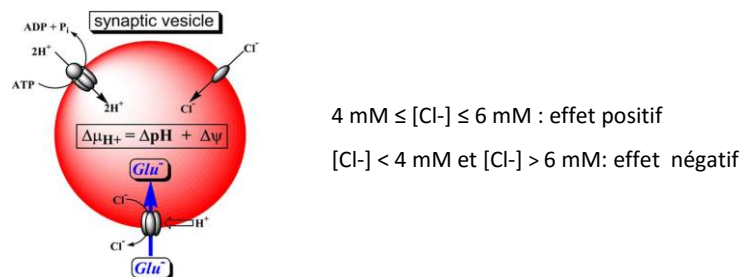


Figure 31: Effet des ions chlorures sur la recapture du glutamate dans la vésicule présynaptique [6-9].

Notre objectif a été le développement d'inhibiteurs fluorescents des VGLUTs. Sur la base des données présentes dans la littérature et notamment les travaux préliminaires effectués dans l'équipe<sup>125a</sup> et par Carrigan et coll.<sup>122</sup>, nous avons développé des analogues structuraux du Bleu de Trypan en remplaçant la tête polaire naphthyl-disulfonique, par un isostère, le motif 3-carboxy-coumarinique.

Les études de relations structure-activité réalisées dans l'équipe<sup>125a</sup> sur les colorants azoïques dérivés du Bleu Trypan ont permis de montrer l'importance de certaines pharmacomodulations telles que la taille et la présence d'halogène sur le motif aryle hydrophobe. Carrigan et coll. ont travaillé sur les analogues structuraux du Bleu Trypan en modifiant la nature du lien entre le motif polaire naphthyl-disulfonique et le corps hydrophobe par une liaison alcène, ainsi que le motif polaire par la 2,4-dicarboxy-quinoléine<sup>122</sup>. Ils ont ainsi montré l'importance de la présence des charges négatives sur le motif polaire quinoléine ainsi que l'importance de la taille du motif aryle hydrophobe. Les pharmacomodulations que nous avons envisagées se sont inscrites dans la même logique en remplaçant le motif naphthyle par un autre motif polaire ayant des propriétés intéressantes, en modifiant la nature des substituants sur ce motif, puis en variant la taille et les substituants du motif l'aryle hydrophobe.

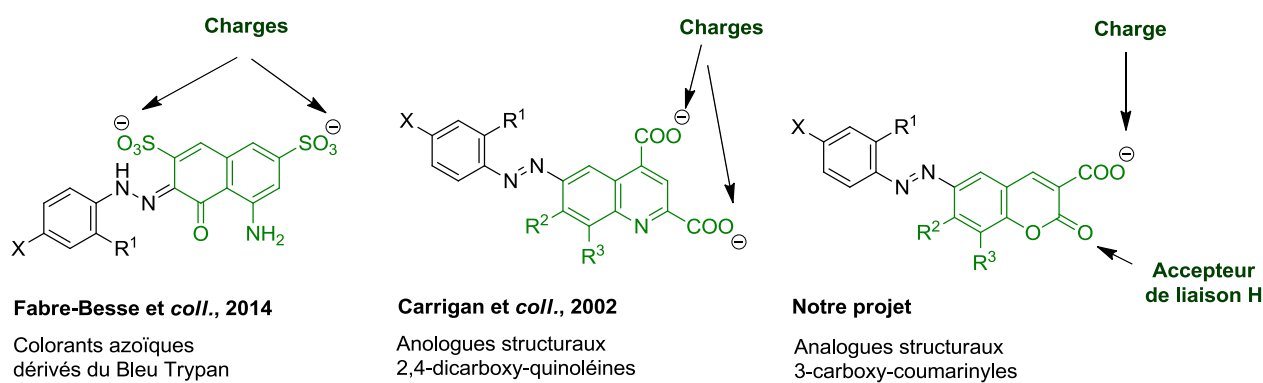


Schéma 144: Pharmacomodulation du motif polaire naphtyle.

Notre objectif est l'obtention d'inhibiteurs compétitifs fluorescents, affins, sélectifs, et post-fonctionnalisables des VGLUTs. Les synthèses réalisées nous ont permis d'obtenir et d'évaluer les activités biologiques d'une trentaine de molécules réparties sur quatre familles structurales suivant la nature du lien entre le motif coumarinique polaire et le motif aryle hydrophobe (Schéma 145 ci-dessous):

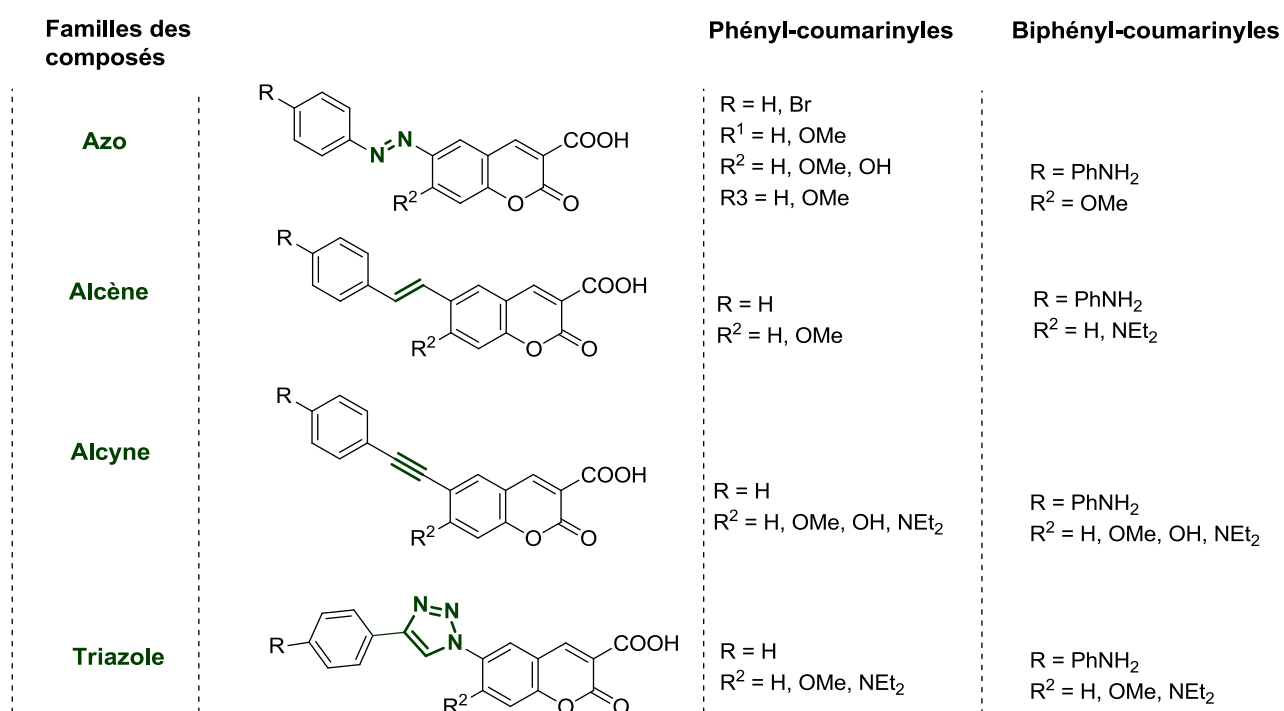


Schéma 145: Liste des analogues structuraux coumarinyles évalués.

Nous avons évalué quatre grandes familles de molécules à savoir les analogues aryl-diazényl-coumarinyles (lien azo), aryl-vinyl-coumarinyles (lien alcène), aryl-éthynyl-coumarinyles (lien alcyne) et aryl-triazol-coumarinyles (lien triazole). Chaque famille de molécules se répartit en deux groupes en fonction de la taille du motif aryle hydrophobe. On distingue les analogues phényles (motif aryle = phényle) et biphényles (motif aryle = biphényle) (**Schéma 145**). La famille des

analogues aryl-diazényl-coumarinyles (lien azo) se compose de 13 molécules parmi lesquelles on distingue 12 composés phényl-diazényl-coumarinyles et un composé biphényl-diazényl-coumarinyles. La comparaison l'activité de ces analogues avec les colorants azoïques dérivés du Bleu Trypan nous permettra d'évaluer l'importance et la potentialité de la pharmacomodulation du naphthyle par le motif coumarinique. Dans les autres familles, suivant la nature des substituants sur la coumarine, nous avons évalué l'activité de 4 analogues aryl-vinyl-coumarinyles (lien alcène), 8 analogues aryl-éthynyl-coumarinyles (lien alcyne) et 6 analogues aryl-triazol-coumarinyles (lien triazole).

Lors des tests biologiques, nous évaluons d'abord les pourcentages d'inhibition des molécules à 20  $\mu\text{M}$  (seuil). Sauf cas particulier, les  $\text{CI}_{50}$  sont déterminées uniquement pour les ligands présentant un pourcentage d'inhibition supérieur à 50% à 20  $\mu\text{M}$ .



## B. Analyse des résultats

Nous avons donc développé des analogues structuraux du Bleu Trypan (BT) dans l'objectif d'obtenir des inhibiteurs affins des VGLUTs. Afin de montrer l'importance des pharmacomodulations, nous nous appuyerons régulièrement sur la comparaison des activités biologiques des composés coumarinyles avec les colorants azoïques dérivés du BT. Nous avons effectué trois modifications majeures à partir des colorants azoïques dérivés du BT dans la conception de nouveaux modulateurs des VGLUTs :

- Pharmacomodulation de la tête polaire naphthyle des colorants azoïques

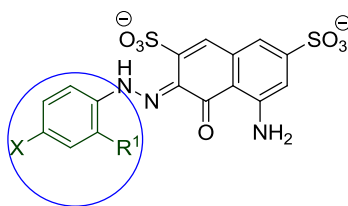
Nous avons remplacé le motif naphthyle des colorants azoïques par un bioisostère fluorescent. En effet, les modulateurs contenant le motif naphthyle donnent de bonnes activités ( $CI_{50}$  du meilleur analogue =  $1.6 \mu\text{M}$ )<sup>125a</sup>, mais présentent l'inconvénient d'être très difficilement pharmacomodulable au niveau du naphthyle limitant ainsi les possibilités dans la conception de meilleurs ligands. Nous avons remplacé le naphthyle par un motif polaire, la 3-carboxy-coumarine. Cette modification nous a permis d'obtenir des analogues fonctionnalisables que nous avons optimisés pour la conception de nouveaux modulateurs. De plus, la coumarine est un fluorophore utilisable dans les tests de liaison si l'affinité le permet ( $CI_{50} < 50 \text{ nM}$ ). Les ligands pourront être utilisés comme outils pharmacologiques pour le suivi de pathologies impliquant le système glutamatergique.

- Pharmacomodulation du lien

La modification du lien azo représente le second volet des changements effectués. Nous avons évalué l'importance de la présence du lien azo entre la coumarine et le motif aryle hydrophobe. Pour se faire, il a été remplacé par un lien alcène (même géométrie), alcyne (orientation différente du motif hydrophobe), ou 1H-1,2,3-triazole (liaison H, orientation quasi-plane du motif aryle). Ces transformations influent également sur les propriétés de fluorescence des molécules finales.

- Optimisation du motif aryle hydrophobe

Dans la dernière partie nous avons envisagé la pharmacomodulation du motif aryle hydrophobe. Les résultats préliminaires avaient en effet montré l'importance des modifications effectuées sur ce motif. On remarque l'amélioration de l'affinité lorsqu'on remplace  $\text{CH}_3$  par  $\text{CF}_3$  (substituant R1) ou lorsqu'on remplace l'iode par le groupement phényl-amino (substituant R1, **Tableau 9** ci-dessous).



| X                 | R1              | % d'inhibition à 20 $\mu$ M | CI50 ( $\mu$ M) |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
| COOH              | CH <sub>3</sub> | 15                          | -               |
| COOH              | CF <sub>3</sub> | 76                          | 6.8             |
| I                 | Cl              | 45                          | -               |
| PhNH <sub>2</sub> | Cl              | 88                          | 1.6             |

Tableau 9: Pharmacomodulation du motif aryle hydrophobe dans les colorants azoïques dérivés du BT <sup>125a</sup>.

Le **Schéma 146** ci-dessous regroupe les différentes pharmacomodulations majeures effectuées à partir des colorants azoïques dérivés du BT dans la conception de nouveaux ligands affins fluorescents des VGLUTs.

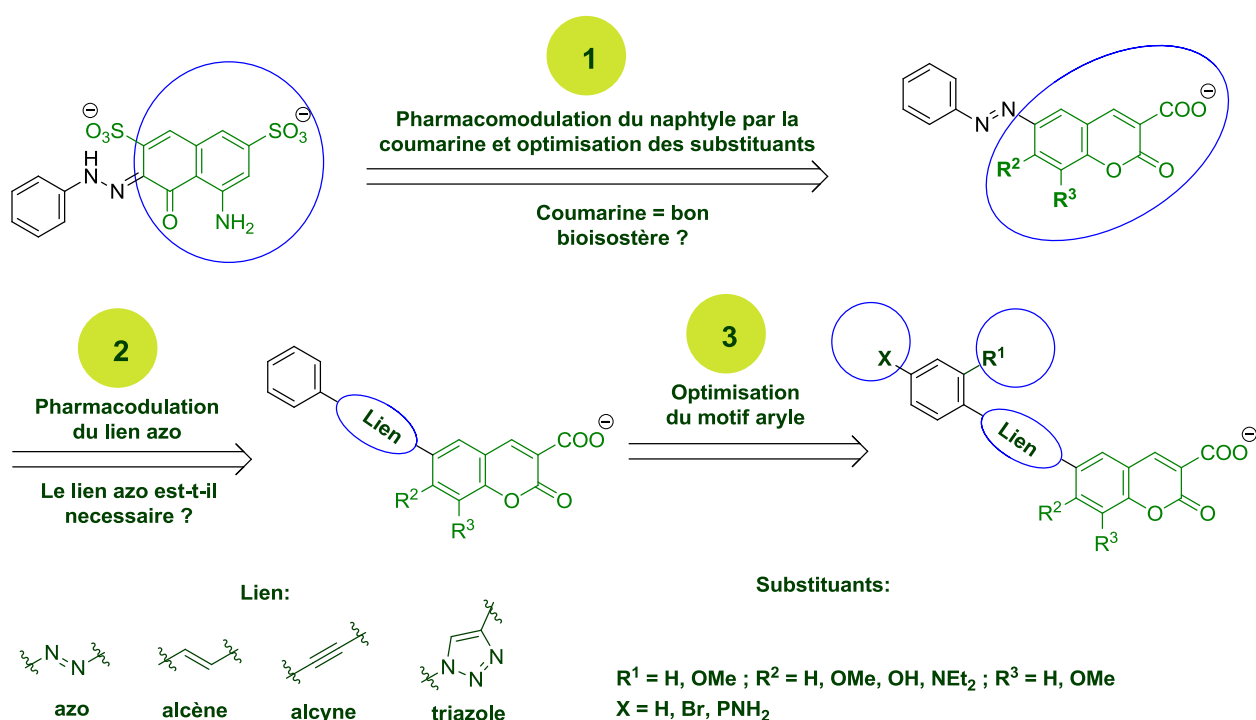
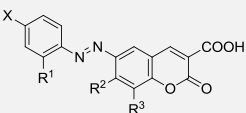
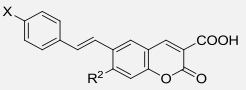
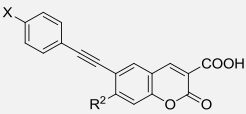
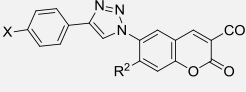


Schéma 146: Pharmacomodulations des colorants azoïques dérivés du BT pour la conception de nouveaux ligands affins fluorescents des VGLUTs.

Nous allons respectivement détailler l'importance de ces transformations majeures dans les paragraphes ci-dessous. Les tests de compétition ont été faits pour 27 composés. L'analyse des résultats nous permet de mieux comprendre les interactions des ligands avec le transporteur et d'en déduire les pharmacomodulations importantes pour l'obtention d'inhibiteurs affins. Le **Tableau 10** ci-dessous regroupe l'ensemble des activités biologiques des ligands :

|   | Référence   | X                 | R <sup>1</sup>   | R <sup>2</sup>   | R <sup>3</sup> | % d'inhibition<br>à 20 µM | CI50<br>(µM) | Score<br>PLP2 |      |
|---|---|-------------------|------------------|------------------|----------------|---------------------------|--------------|---------------|------|
|    | LSP9-4126   |                   |                  | H                |                | 5                         | -            | 55.18         |      |
|   | LSP9-4153   | H                 | H                | OH               | H              | 12                        | -            | 67.68         |      |
|   | LSP9-4108   |                   |                  | OMe              |                | 30                        | 50           | 71.43         |      |
|   | LSP9-3160   |                   |                  | H                | H              | 14                        | -            | 69.52         |      |
|   | LSP9-5096   | Br                | H                | OH               | H              | 10                        | -            | 78.09         |      |
|   | LSP9-3164   |                   |                  | OMe              | H              | 40                        | 30           | 77.21         |      |
|   | LSP9-3162   |                   |                  | H                | OMe            | 42                        | -            | 78.04         |      |
|   | LSP9-3161   |                   |                  | H                | H              | 1                         | -            | 75.5          |      |
|   | LSP9-4150   | Br                |                  | OMe              | OMe            | H                         | 15           | -             | 82.5 |
|   | LSP9-3163   |                   |                  | H                | OMe            | 9                         | -            | 82.3          |      |
| LSP9-4089   | PhNH <sub>2</sub>   | H                 | OMe              | H                | 35             | -                         | -            |               |      |
|    | LSP16-2074  | H                 | H                | H                |                | 30                        | -            | -             |      |
|   | LSP16-2077  |                   |                  | OMe              |                | 30                        | -            | -             |      |
|  | LSP17-1044  |                   |                  | H                |                | 30                        | -            | 63.51         |      |
|   | LSP17-1177  | H                 | H                | OH               |                | 20                        | 267          | 68.44         |      |
|   | LSP17-1046  |                   |                  | OMe              | H              | 48                        | 21           | 73.01         |      |
|   | LSP17-1042 <sup>a</sup>   |                   |                  | NEt <sub>2</sub> |                | 12                        | -            | 72.67         |      |
|   | LSP17-1125  |                   |                  | H                |                | 100                       | 5            | 80.81         |      |
|   | LSP17-1127 <sup>a</sup>   | PhNH <sub>2</sub> | H                | OMe              |                | 40                        | -            | -             |      |
|   | LSP17-1173  |                   |                  | OH               | H              | 100                       | 0.5          | 87.72         |      |
|   | LSP17-1126  |                   |                  | NEt <sub>2</sub> |                | 100                       | 5            | 81.44         |      |
|   | LSP17-1100  |                   |                  | H                |                | 48                        | 23           | -             |      |
|   | LSP17-1116  | H                 | H                | OMe              | H              | 45                        | 25           | 78.17         |      |
| LSP17-1153  |  |                   | NEt <sub>2</sub> |                  | 62             | 15                        | 72.63        |               |      |
| LSP17-1115  |   |                   | H                |                  | 6              |                           | 81.59        |               |      |
| LSP17-1124  |   | PhNH <sub>2</sub> | H                | OMe              | H              | 100                       | 0.4          | 85.69         |      |
| LSP17-1154 <sup>a</sup>   |   |                   | NEt <sub>2</sub> |                  | 50             | 20                        | 88.52        |               |      |

<sup>a</sup>: problème de solubilité lors des évaluations biologiques

Tableau 10: Activités biologiques des ligands.

## XXIV. Pharmacomodulation du motif polaire naphthyle :

### 1. Présentation du contexte

Nous avons logiquement commencé les analyses par les analogues aryl-diazényl-coumarinyles qui correspondent aux colorants azoïques dérivés du BT par remplacement strict du naphthyle avec comme objectif de répondre à cette question : la coumarine est-elle un bioisostère du naphthyle ?

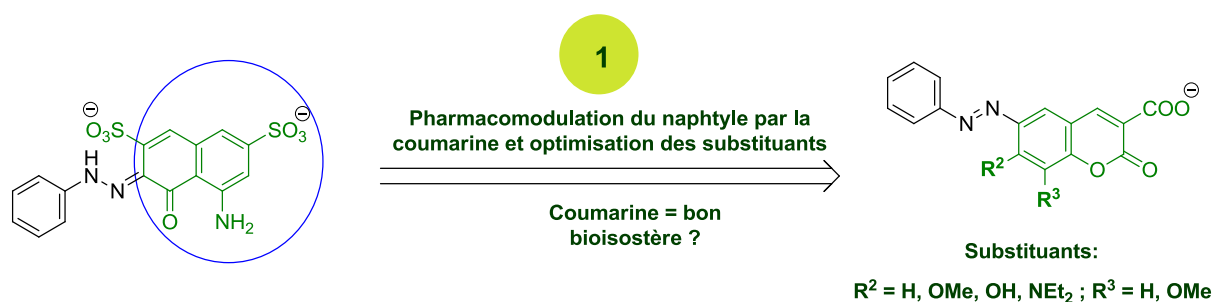


Schéma 147 : Pharmacomodulation du motif naphthyle.

Lors des études préliminaires des colorants phényl-monoazoïques et biphenyl-monoazoïques avaient été évalués <sup>125a</sup>. La relative faible inhibition de la majeure partie de ces analogues nous avait conduits à envisager une fixation partielle de ces analogues dans les poches de liaison des transporteurs VGLUTs.

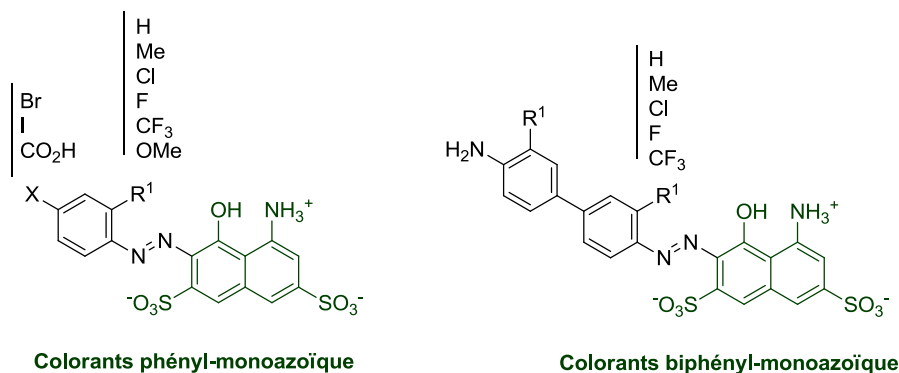


Schéma 148: Structures des colorant phényl-monoazoïque et biphenyl-monoazoïques dérivés du BT.

Les transporteurs VGLUTs sont constitués de **560** à **582** acides aminés organisés en 12 hélices  $\alpha$  insérées dans la membrane de la vésicule présynaptique. Le profil d'hydrophobicité estimé par modélisation moléculaire montre des couches hydrophiles de faibles affinités situées du côté cytosolique, des couches hydrophobes au niveau des domaines transmembranaires ainsi que des poches hydrophile de très hautes affinités situées en profondeur dans la protéine (**Figure 32**). Le docking a mis en évidence la fixation des colorants azoïques dérivés du BT *via* une orientation qui suggère les liaisons électrostatiques (liaisons H, et ioniques) du naphthyle avec les poches hydrophiles

de faibles affinités à la surface de la protéine (à l'interface avec le tampon), coté cytosolique (**Figure 32** ci-dessous).

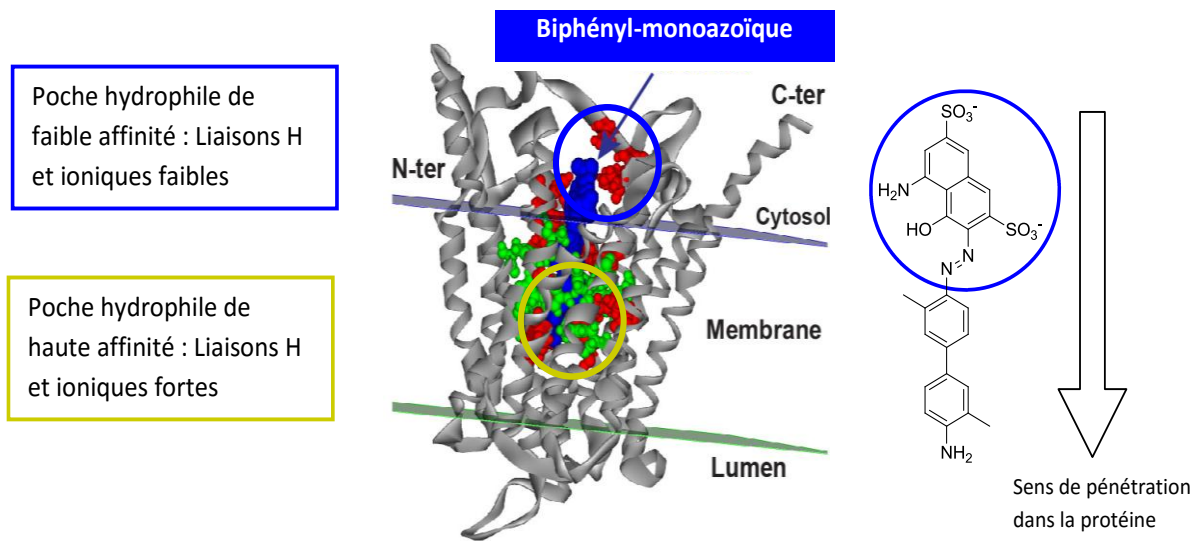


Figure 32: Exemple de la fixation d'un colorant azoïque biphénylique dérivé du BT dans les VGLUTs.

Nous expliquons ce mécanisme de fixation des colorants azoïques par la très grande hydrophilie du motif naphthyle. La liaison se fait par pénétration du motif aryle hydrophobe en amont dans couches lipophiles du transporteur. Il établit des interactions hydrophobes tandis que le motif naphthyle se lie par des liaisons électrostatiques avec les couches de faibles affinités (liaisons H et ioniques) du coté cytosolique. Dans ce cas, les liaisons électrostatiques fortes au niveau des couches de hautes affinités en profondeur dans la protéine se limitent aux liaisons hydrogènes réalisées par le groupement amino du motif aryle hydrophobe. Le mode de liaison des modulateurs dans lequel le motif aryle hydrophobe pénètre en premier dans le transporteur est appelé fixation dans le **sens direct**. Nous avons remplacé le naphthyle par un motif moins polaire pouvant pénétrer en profondeur dans la protéine pour atteindre les poches hydrophiles de hautes affinités et établir des liaisons électrostatiques fortes. Ce mode de fixation du ligand dans lequel le motif polaire pénètre en premier dans le transporteur est appelé fixation dans le **sens indirect** (**Figure 31** ci-dessous).

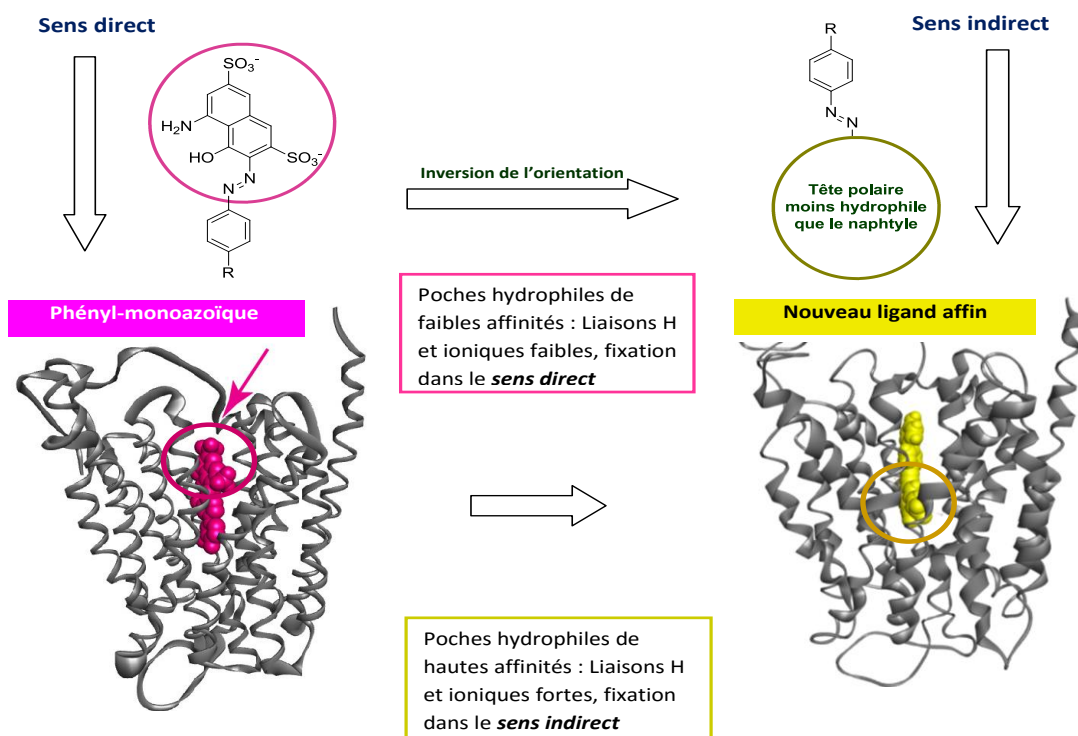


Figure 33: Pharmacomodulation du naphthyle par un motif moins polaire.

Ainsi nous avons commencé les investigations par le choix d'un motif mieux adapté ayant un bon compromis hydrophilie/hydrophobie/solubilité. Nous avons choisi de remplacer la tête polaire naphthyle par des motifs 3-carboxy-coumariniques substitués (en position 7 ou 8) qui possèdent des propriétés physicochimiques intéressantes (**Tableau 11** ci-dessous).

| Motif polaire | logP   | Fraction polaire surfacique | Indice de solubilité | pKa (prédiction)   | Masse molaire |
|---------------|--------|-----------------------------|----------------------|--|---------------|
|               | -4.075 | 0.648                       | -1.822               | - SO <sub>3</sub> H : 1.72<br>- SO <sub>3</sub> H : 2.69<br>- NH <sub>2</sub> : 2.9<br>- OH : 9.24 | 317.30        |
|               | -0.93  | 0.459                       | -1.936               | - COOH : 2.52<br>- OH : 5.49   | 204.14        |
|               | -0.001 | 0.352                       | -2.401               | - COOH : 2.52  | 219.17        |
|               | -0.001 | 0.352                       | -2.437               | - COOH : 2.52  | 219.17        |
|               | 0.875  | 0.252                       | -2.921               | - COOH : 2.52  | 260.27        |

Tableau 11: Comparaison des propriétés physicochimiques du naphthyle avec des 3-carboxy-coumarines substituées en position 7 ou 8. Les valeurs indiquées correspondent à des estimations théoriques.

Nous remarquons la très grande polarité du motif naphthyle avec un logP très bas (- 4.075). La fraction polaire surfacique traduit cette hydrophilie en montrant que 65% du volume moléculaire du naphthyle est en contact direct avec l'eau. Les groupements OH (pKa = 9.2) et NH<sub>2</sub> (pKa = 2.9) sont neutre à pH physiologique contrairement aux groupements sulfonates (pKa1 = 1.72, pKa2 = 2.69) qui attribuent une charge négative à la molécule.

De tous les motifs 3-carboxy-coumariniques sélectionnés, la 7-hydroxy-3-carboxy-coumarine est celle qui présente des propriétés physicochimiques plus proches du motif naphthyle. Cette coumarine est soluble dans l'eau (indice de solubilité = -1.936) et présente une fraction polaire surfacique de 46%. Les groupements carboxyle et hydroxyle présentant respectivement des pKa de 2.52 et 5.49 et sont déprotonés à pH 7. Les 7-méthoxy- et 8-méthoxy-3-carboxy-coumarines sont assez apolaires mais la déprotonation sous forme de carboxylate ne permet cependant d'améliorer que peu leur solubilité. La 7-diéthylamino-3-carboxy-coumarine est très apolaire mais devrait avoir des propriétés physicochimiques intéressantes. Ces motifs coumariniques nous ont permis d'obtenir une série de ligand avec des propriétés physicochimiques différentes en fonction de la coumarine utilisée. Le remplacement du naphthyle par les motifs coumariniques nous permet d'évaluer l'importance du naphthyle dans l'affinité des modulateurs mais de connaître également l'influence de la polarité du motif coumarinique sur le mode de fixation du ligand dans le transporteur (**Figure 33**).

Le point fort du motif polaire 3-carboxy-coumarine est la facilité d'exploration d'éventuelles pharmacomodulations possibles et importantes pour la compréhension des relations structure-activités permettant l'obtention de ligands affins et également fluorescents.

## **2. Analyse des activités biologiques des ligands**

L'affinité du composé dépend de la nature des substituants sur le motif coumarinique. Nous avons étudié l'influence des substituants de la coumarine sur l'inhibition du transporteur afin de déterminer le meilleur bioisostère du motif naphthyle. Dans les analogues diazényl-coumarinyles, nous avons incorporé les substituants sur les positions **7 (H, OMe, OH)** ou **8 (H, OMe)** de la coumarine. Les activités biologiques de ces analogues, présentées dans le tableau ci-dessous nous ont permis d'une part, d'apporter une analyse claire sur la variation de l'affinité en fonction de la nature des substituants et d'autre part, de valider l'hypothèse affirmant que les motifs 3-carboxy-coumariniques sont des bons bioisostères du motif polaire naphthyl-disulfonique.

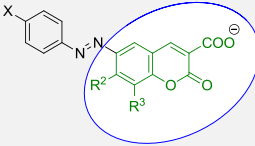
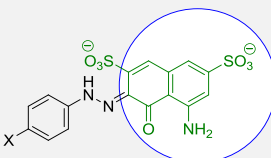
|   | Référence | X                 | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | % d'inhibition<br>à 20 µM |
|---|-----------|-------------------|----------------|----------------|---------------------------|
|  | LSP9-3160 |                   | H              | H              | 14                        |
|   | LSP9-5096 | Br                | OH             | H              | 10                        |
|   | LSP9-3164 |                   | OMe            | H              | 40                        |
|   | LSP9-3162 |                   | H              | OMe            | 42                        |
|   | LSP9-4089 | PhNH <sub>2</sub> | OMe            | H              | 35                        |
|  | LSP9-2120 | Br                | -              | -              | 33                        |
|   | LSP9-2122 | COOH              | -              | -              | 15                        |
|   | LSP9-2142 | PhNH <sub>2</sub> | -              | -              | 25                        |

Tableau 12: Comparaison des activités de colorants azoïques dérivés du BT et de ligands diazényl-coumarinyles.

L'activité des composés augmente lors de la substitution du motif 3-carboxy-coumarinique par le groupement mésomère. Le composé **LSP9-5096**, substitué en position 7 par un **OH**, conduit à une inhibition similaire au composé de référence **LSP9-3160** ( $R^2 = H$ ). En revanche, l'introduction du groupement mésomère donneur **OMe** en position 7 (**LSP9-3164**) ou en position 8 (**LSP9-3162**) augmente l'affinité, et ce, de façon comparable. Ces deux ligands (**LSP9-3164**, **LSP9-3162**) conduisent à des activités relativement meilleures que les colorants azoïques. Cette corrélation concernant l'amélioration de l'inhibition lors du remplacement du naphtyle par une méthoxy-coumarine reste vérifiée lors de la modification de la nature du motif phényle hydrophobe en biphényle (substitution du phényle sur le carbone 4' par un groupement **PhNH<sub>2</sub>**) en comparant l'activité du composé biphényl-coumarinyle **LSP9-4089** et du colorant biphényl-monoazoïque **LSP9-2142**.

#### Interprétation des observations

L'analyse par modélisation moléculaire nous a permis de mieux comprendre les interactions des composés avec les transporteurs VGLUTs et de connaître les raisons qui sont à l'origine de la faible affinité des ligands coumarinyles **LSP9-3160** (14% à 20 µM,  $R^2 = H$ ) et **LSP9-5096** (10% à 20 µM,  $R^2 = OH$ ) (Tableau 12). Le mécanisme de fixation du composé dans le transporteur dépend énormément des propriétés physicochimiques hydrophilie/lipophilie du motif coumarinique. Ainsi lors de la fixation du composé **LSP9-5096** la plus grande hydrophilie de la 7-hydroxy-coumarine-3-carboxylate (**OH** et **COOH** déprotonés à pH 7) induit la fixation de la molécule dans le *sens direct* à la manière des colorants azoïques contenant le motif polaire naphtyle (Figure 33, Figure 32). Dans ce mode de liaison la solvatation due au contact avec le tampon physiologique minimise la force des



liaisons hydrogènes et ioniques. L'inhibition du transport se fait donc avec une faible affinité (**Tableau 13**).

La fixation des deux meilleurs ligands de la série des composés diazényl-coumarinyles **LSP9-3162** et **LSP9-4089** contenant respectivement les motifs 7-méthoxy-3-carboxy-coumarine et 8-méthoxy-3-carboxy-coumarine se fait dans le *sens indirect* (**Figure 33**). La substitution de la coumarine par un groupement méthoxy améliore relativement son hydrophobicité. Cela induit la pénétration de la coumarine en amont dans les couches légèrement profondes du transporteur pour établir des liaisons électrostatiques. Le groupement méthoxy occupe également une nouvelle poche hydrophobe. Nous estimons que la fixation du composé contenant la 3-carboxy-coumarine (**LSP9-3160**) se partage entre les deux modes de fixation *sens direct-sens indirect* (**Tableau 13**).

| Nom       | R <sup>2</sup> | Sens de fixation dans les VGLUTs | % d'inhibition à 20 μM |
|-----------|----------------|----------------------------------|------------------------|
| LSP9-3160 | H              | Sens direct et indirect          | 14%                    |
| LSP9-3164 | OMe            | Sens indirect                    | 40%                    |
| LSP9-5096 | OH             | Sens direct                      | 10%                    |

Tableau 13: Mode de fixation des ligands **LSP9-5096**, **LSP9-3160** et **LSP9-3164**.

Ces analyses nous permettent de conclure que les motifs 3-carboxy-coumariniques substitués sur les positions **7** ou **8** par un groupement **méthoxy** sont de bons bioisostères du motif polaire naphtyle. Nous allons dans la suite, améliorer l'affinité des ligands en optimisant le lien azo et les substituants du motif aryle hydrophobe.

## XXV. Pharmacomodulation du lien azo

Nous avons choisi de modifier la nature du lien entre la coumarine et le motif aryle hydrophobe dans la conception de nouveaux ligands affins des VGLUTs. Le lien azo est remplacé par un lien alcène, alcyne et 1,2,3-triazole à partir des composés aryl-diazényl-coumarinyles.

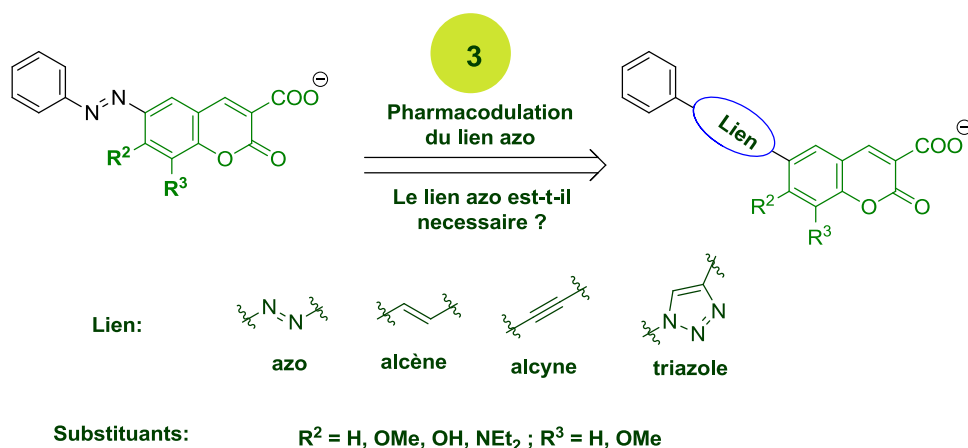


Schéma 149: Pharmacomodulation du lien azo à partir de ligands diazényl-coumarinyles.

Nous obtenons trois familles supplémentaires de composés. Les ligands avec le lien alcène ont une géométrie spatiale similaire aux composés aryl-diazényl-coumarinyles (molécules planes). Ce lien nous permet de mesurer l'importance des atomes d'azotes et donc de la présence d'accepteurs de liaison H, dans l'affinité des ligands pour le transporteur (comparaison de  $-\text{N}=\text{N}-$  vs  $-\text{C}=\text{C}-$ ).

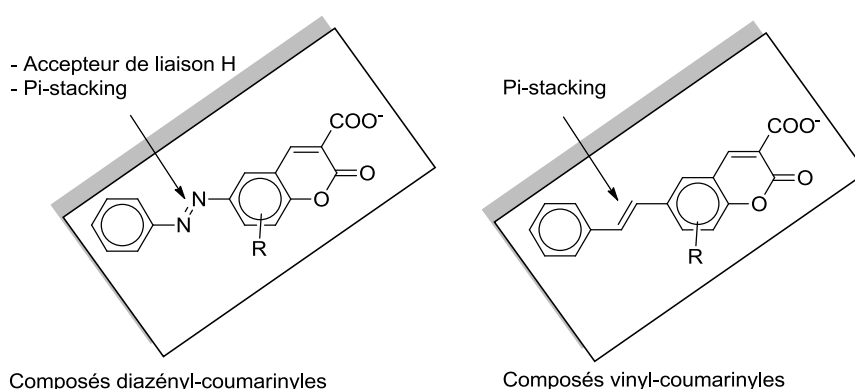


Schéma 150: Géométrie spatiale des ligands avec le lien azo et alcène.

La modification du lien azo entre la coumarine et le motif aryle en un espaceur alcyne induit une géométrie linéaire se traduisant par une orientation orthogonale de l'aryle par rapport à la coumarine. Cette famille de molécules nous permettra d'estimer l'importance de la géométrie dans la liaison des ligands aux protéines VGLUTs (**Schéma 151**).

Le triazole est un noyau aromatique très stable qui résiste aux conditions d'hydrolyse acide et basique, aux conditions d'oxydation, de réduction et à la dégradation métabolique en milieu biologique<sup>196</sup>. Ce noyau aromatique augmente la solubilité du ligand et présente l'avantage de posséder de bons accepteurs (N2 et N3) et donneur (C4-H) de liaisons hydrogènes<sup>197</sup>. De plus, le moment dipolaire (5 Debyes) du cycle<sup>198</sup> lui permet de faire également des interactions faibles dipôle-dipôle<sup>197a</sup>. La géométrie imposée par la 1,4-disubstitution ainsi que les interactions faibles

établies par le noyau 1H-1,2,3-triazole se rapprochent beaucoup de la liaison amide (Z)<sup>199</sup>. La série d'inhibiteurs avec le lien triazole nous permettra d'estimer l'importance de cet espaceur.

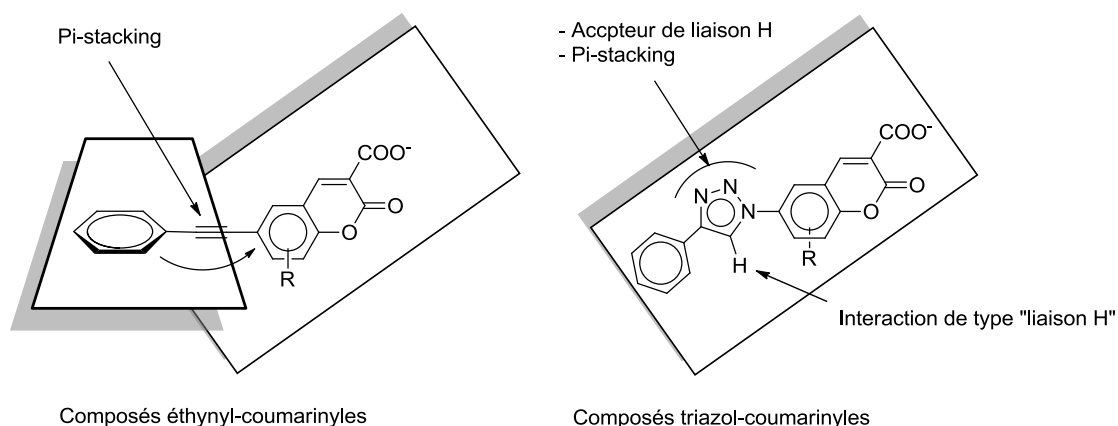


Schéma 151: Structure spatiale de ligands avec le lien alcyne et triazole.

Nous allons analyser le tableau des activités ci-dessous afin de pouvoir connaître l'importance de la pharmacomodulation du lien dans l'affinité des ligands.

|                |          | Référence  | % d'inhibition<br>à 20 $\mu$ M | Score PLP2 |
|----------------|----------|------------|--------------------------------|------------|
| Nature du lien | Azo      | LSP9-4126  | 5                              | 77.21      |
|                | Alcène   | LSP16-2074 | 30                             | -          |
|                | Alcyne   | LSP17-1044 | 30                             | 72.67      |
|                | Triazole | LSP17-1100 | 48                             | 78.17      |

Tableau 14: Variation de l'affinité en fonction de la nature du lien.

Il y a une amélioration très notable de l'inhibition lors de la modification du lien azo en alcène, en alcyne ou en triazole. Le lien azo n'est donc pas indispensable pour la conception de nouveaux ligands affins. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Carrigan et *coll.* sur les dérivés 2,4-dicarboxy-quinoléines<sup>200</sup>. Nous remarquons que les liens alcène et alcyne conduisent à des résultats similaires (**Tableau 14**). Les composés avec le lien alcène sont des molécules planes contrairement à la géométrie linéaire non-plane imposée par le lien alcyne. On peut donc en déduire que la géométrie spatiale du composé, imposée par le lien, ne joue pas autant d'importance dans l'amélioration de l'affinité des ligands. Ces résultats sont cohérents avec les observations effectuées par Carrigan et *coll.*<sup>122</sup>. Le lien triazole conduit à une affinité relativement meilleure par rapport aux autres espaceurs azo, alcène ou alcyne. Ce cycle aromatique intervient dans la liaison du modulateur dans la protéine VGLUT en établissant des liaisons faibles (Liaison H,  $\pi$ -stacking, **Schéma 152** ci-dessous).

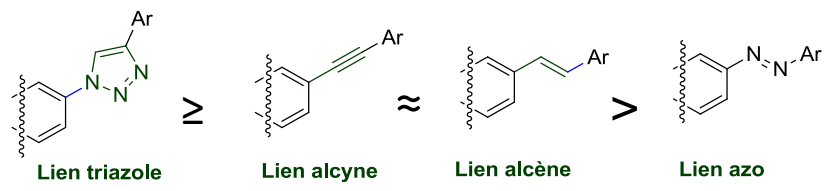


Schéma 152: Influence de la pharmacomodulation du lien sur l'affinité des ligands

## XXVI. Optimisation du motif aryle

Nous avons également cherché à optimiser l'affinité des composés en modifiant la nature des substituants sur le motif aryle hydrophobe. L'importance de cette modification avait en effet été démontrée lors des études préliminaires sur les colorants azoïques (**Tableau 9**). Nous avons effectué des pharmacomodulations sur les carbones 2' et 4' en se basant sur ces résultats des études préliminaires<sup>125a</sup> en incorporant des substituants halogène (**Br**, position 4'), phényl-amino (**PhNH<sub>2</sub>**, position 4') ou méthoxy (OMe, position 2').

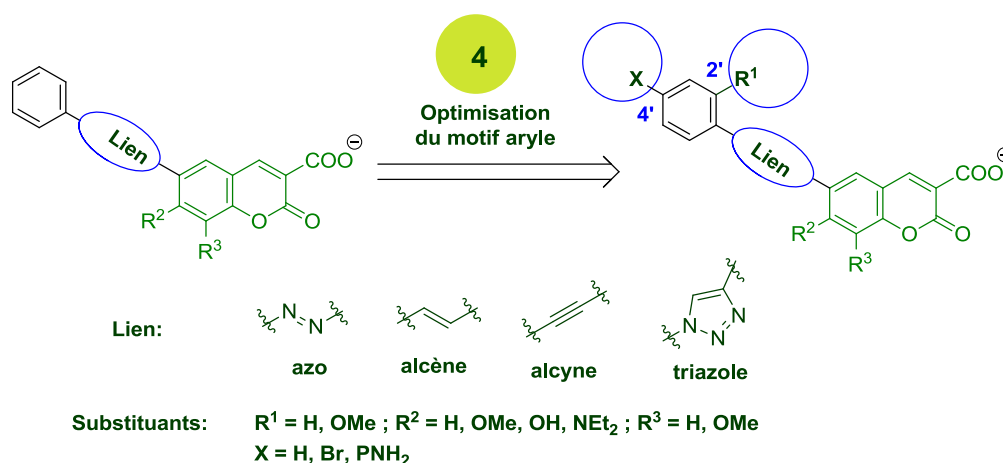


Schéma 153: Optimisation des substituants sur le motif aryle

### XXVI.1. Substitution sur le carbone 4' : augmentation de la taille

#### XXVI.1.1. Substitution par un halogène (le brome)

Nous avons développé des composés aryl-diazényl-coumarinyles substitués par un atome de brome sur le carbone 4' du motif phényle hydrophobe (**Schéma 153** ci-dessus). La comparaison des activités biologiques de ces molécules avec les analogues non-substitués correspondant nous permettra de comprendre l'importance de la lipophilie des composés *via* l'augmentation de la taille du motif aryle.

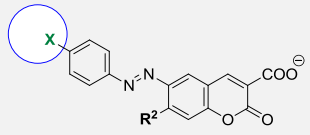
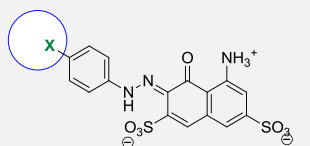
|   | Référence | X    | R <sup>2</sup> | % d'inhibition<br>à 20 μM |
|---|-----------|------|----------------|---------------------------|
|  | LSP9-4126 | H    | H              | 5                         |
|   | LSP9-4153 | H    | OH             | 12                        |
|   | LSP1-4108 | H    | OMe            | 30                        |
|   | LSP9-3160 | Br   | H              | 14                        |
|   | LSP9-5096 | Br   | OH             | 10                        |
|   | LSP9-3164 | Br   | OMe            | 40                        |
|  | LSP9-2122 | COOH | -              | 15                        |
|   | LSP9-2120 | Br   | -              | 33                        |

Tableau 15: Variation de l'affinité en fonction de la nature des substituants sur le carbone 4' du motif aryle hydrophobe

Les résultats du test de compétition montrent que l'affinité des analogues diazényl-coumarinyles augmente légèrement lors de la substitution du motif phényle par un halogène sur la position 4' (Tableau 15 ci-dessus). Des remarques similaires avaient été observées lors des études préliminaires sur les colorants azoïques. On observe par exemple une affinité meilleure lors du remplacement du groupement COOH de l'analogue **LSP9-2122** par un brome pour donner le composé **LSP9-2120** (Tableau 15). On notera que le brome est un groupement lipophile tout comme le motif aryle. Par conséquent, l'ajout du brome sur le motif aryle correspond globalement à un agrandissement de la taille de la molécule et notamment de la partie hydrophobe. On en conclut que l'augmentation de la lipophilie de la molécule *via* le motif aryle hydrophobe améliorerait l'affinité des ligands (paragraphe ci-dessous pour la validation de l'hypothèse).

#### **XXVI.1.2. Substitution par un phényl-amino**

Pour confirmer l'hypothèse concernant l'amélioration de l'affinité des ligands lors de l'augmentation de la taille du motif aryle hydrophobe, nous avons développé une série de composés substitués sur le motif aryle par un groupement phényl-amino (**PhNH<sub>2</sub>**). On obtient des composés similaires aux colorants biphenyl-monoazoïques (structures présentées dans le **Schéma 154** ci-dessous).

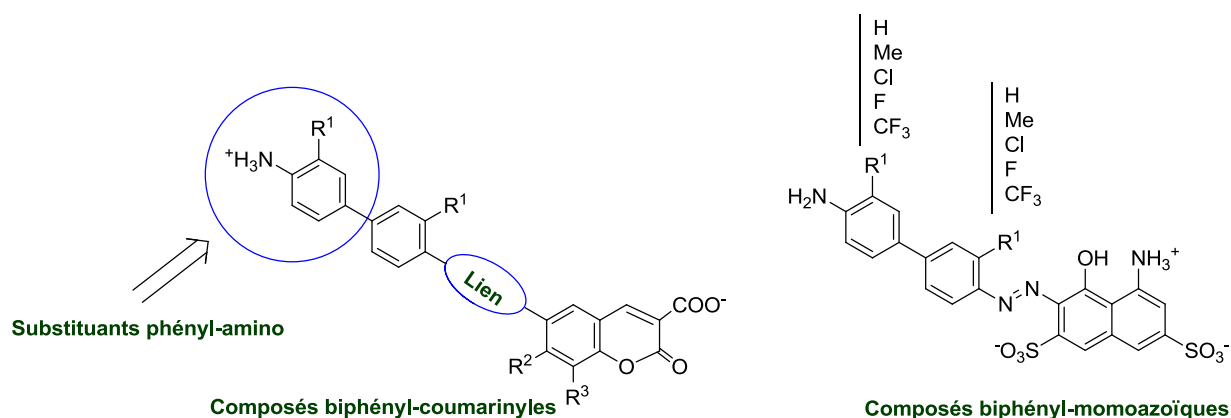


Schéma 154: Structure des composés biphenyl-coumarinyles et biphenyl-monoazoïques (dérivés du BT)

Le tableau ci-dessous regroupe les affinités des ligands biphenyliques avec les analogues phényliques correspondants permettant la comparaison avec les colorants azoïques dérivés du BT.

|                |                        | Référence               | X  | R <sup>2</sup>    | % d'inhibition à 20 μM | CI50 (μM) | Score PLP2 |
|----------------|------------------------|-------------------------|----|-------------------|------------------------|-----------|------------|
| Nature du lien | Azo                    | LSP9-4108               | -  | OMe               | 30                     | 50        | 71.43      |
|                | Alcyne                 | LSP17-1046              |    | OMe               | 48                     | 21        | 72.67      |
|                |                        | LSP17-1177              |    | H                 | OH                     | 20        | 267        |
|                | Triazole               | LSP17-1116              |    | OMe               | 45                     | 25        | 78.17      |
|                |                        | LSP17-1153              |    | NEt <sub>2</sub>  | 62                     | 15        | 72.63      |
|                | Azo                    | LSP9-4089               |    | OMe               | 35                     | -         | -          |
|                | Alcyne                 | LSP17-1127 <sup>a</sup> |    | OMe               | 40                     | -         | -          |
|                |                        | LSP17-1173              |    | PhNH <sub>2</sub> | OH                     | 100       | 0.5        |
|                | Triazole               | LSP17-1124              |    | OMe               | 100                    | 0.4       | 85.69      |
|                |                        | LSP17-1154 <sup>a</sup> |    | NEt <sub>2</sub>  | 50                     | 20        | 88.52      |
|                | LSP9-2192              | COOH                    | 55 | ~ 20              | -                      |           |            |
|                | LSP9-2179              | I                       | 45 | ~ 30              | -                      |           |            |
|                | LSP9-3075 <sup>b</sup> | 2-Cl-PhNH <sub>2</sub>  | 80 | 1.47              | -                      |           |            |

<sup>a</sup>: Problème de solubilité ; b : 2-Cl-PhNH<sub>2</sub> correspond au groupement phényl-amino substitué en ortho de l'amine par le chlore (Schéma 154).

Tableau 16: Influence de la taille du motif aryle hydrophobe sur l'affinité des ligands

Les résultats des tests de compétition montrent une nette amélioration des affinités entre les analogues phényles et biphényles. La corrélation est vérifiée pour tous les analogues à l'exception des composés biphenyl-éthynyl- et biphenyl-triazol- (**LSP17-1127** et **LSP17-1154**) contenant respectivement la 7-méthoxy-3-carboxy-coumarine et la 7-diéthylamino-3-carboxy-coumarine (**Tableau 16**). On notera que la faible affinité de ces deux modulateurs est due à leurs très mauvaises solubilités observées dans les conditions de test biologique. Dans ces nouveaux composés biphényles, deux ligands se distinguent particulièrement avec une très bonne inhibition avec des affinités sub-micromolaires pour la première fois pour des ligands synthétiques. Il s'agit des analogues **LSP17-1173** ( $CI_{50} = 0.5 \mu M$ ) de la série alcyne et **LSP17-1124** ( $CI_{50} = 0.4 \mu M$ ) de la série triazole. La comparaison des affinités avec les analogues phényliques correspondants montre un **gain substantiel** d'un facteur 100 (**2 logs**) obtenu en augmentant la taille du motif aryle hydrophobe. Des observations similaires avaient été faites lors des études préliminaires avec les colorants azoïques dérivés du BT, cependant la meilleure optimisation conduisait à **gain** d'un facteur 10 (**1 log**) lors l'augmentation de la taille du motif aryle hydrophobe (pharmacomodulation du composé **LSP9-2192** en **LSP-3075**).

Ces résultats démontrent les très bonnes interactions que ces ligands biphényles doivent établir dans les poches de liaison des transporteurs VGLUTs. L'analyse par modélisation moléculaire permet de mieux comprendre la fixation des ligands (**Figure 34**).

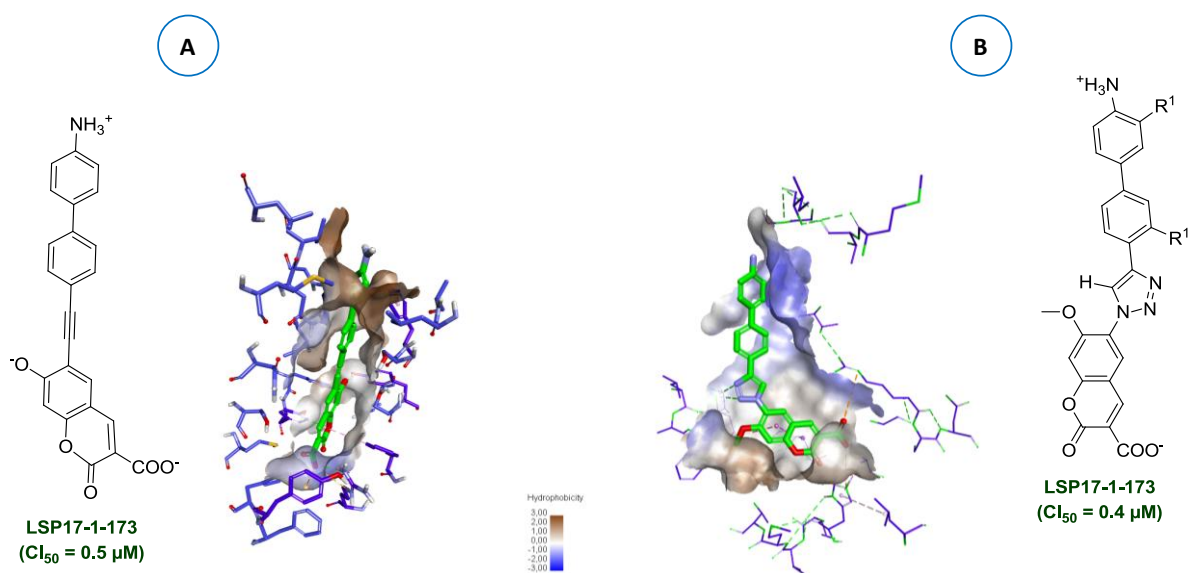


Figure 34: Illustration de la fixation du Ligand biphenyl-éthynyl **LSP17-1173** (**figure-A** à gauche) et biphenyl-triazol **LSP17-1124** (**figure-B** à droite) dans les poches de liaison des transporteurs VGLUTs. Les parties de la protéine colorées en bleu correspondent aux poches hydrophiles, les parties en brun correspondent aux poches hydrophobes)



Nous remarquons d'après ces illustrations que la liaison des ligands au transporteur se fait dans le *sens indirect* correspondant à la pénétration de la coumarine suivie du motif aryle hydrophobe. Les ligands rentrent en profondeur dans la protéine pour établir les interactions électrostatiques fortes dans les poches hydrophiles de hautes affinités.

a. Cas de l'analogue éthynyl-coumarinyle **LSP17-1173** (figure 35-A)

La liaison du modulateur se fait en positionnant la coumarine dans une poche hydrophile. La **Figure 35** ci-dessous donne plus de détails concernant les acides aminés du transporteur impliqués dans la liaison du composé.

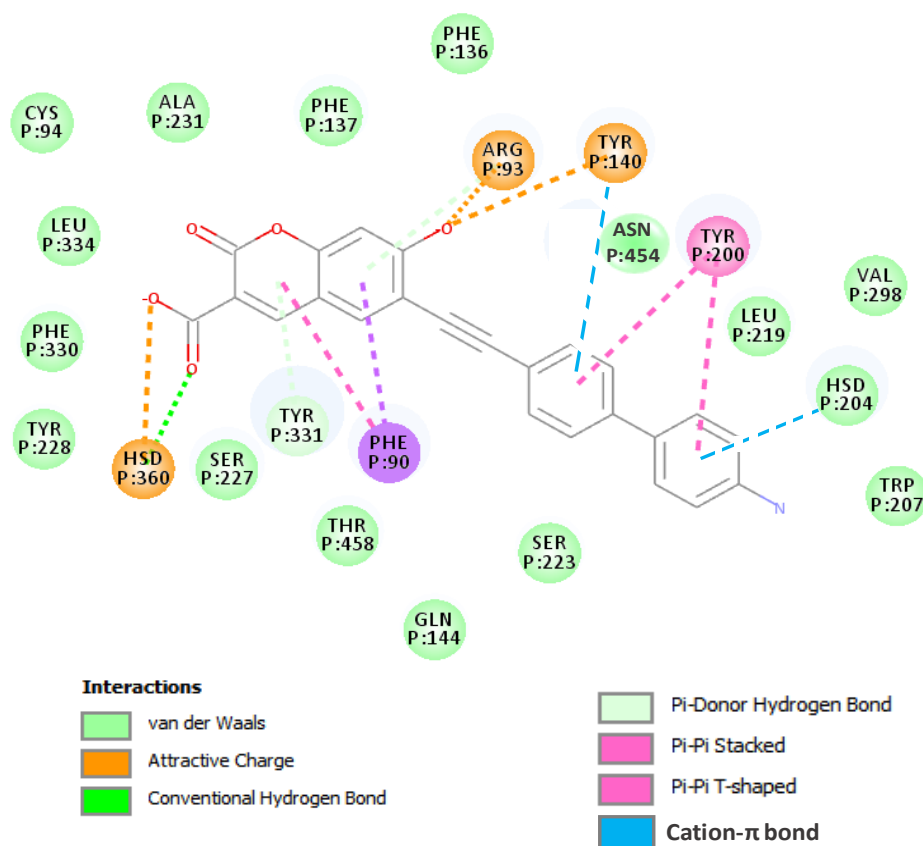


Figure 35: acides aminés impliqués dans la liaison du ligand biphenyl-éthynyl-coumarinyle **LSP17-1173** aux transporteurs VGLUTs.

Nous pouvons notamment identifier les liaisons ioniques fortes établies par le groupement carboxylate avec l'**His360**. On remarque le rôle très important du groupement hydroxylate qui établie une liaison ionique forte avec l'**Arg93** et une liaison forte de type charge-dipôle avec la **Tyr140**. Cette **Tyr140** établie également une interaction  $\pi$ - $\pi$  avec le noyau phényle proximal, de même l'**His204** effectue une interaction cation- $\pi$  avec le noyau phényle distal. La **Tyr200** réalise des interactions hydrophobes types  $\pi$ -statiques avec le noyau aryle hydrophobe. Ces analyses mettent

en exergue le rôle capital du motif coumarinique qui cumule à lui seul toutes les liaisons électrostatiques fortes (liaisons H et ioniques).

*b. Cas de l'analogue triazol-coumarinyle LSP17-1124 (figure 35-B)*

La molécule est positionnée de façon à maximiser les interactions hydrophobes avec le groupement OMe (dans une poche hydrophobe) et les liaisons polaires avec le groupement carboxylate (dans une poche hydrophile). La **Figure 36** ci-dessous donne plus de détails sur les acides aminés impliqués dans la liaison de la molécule au transporteur.

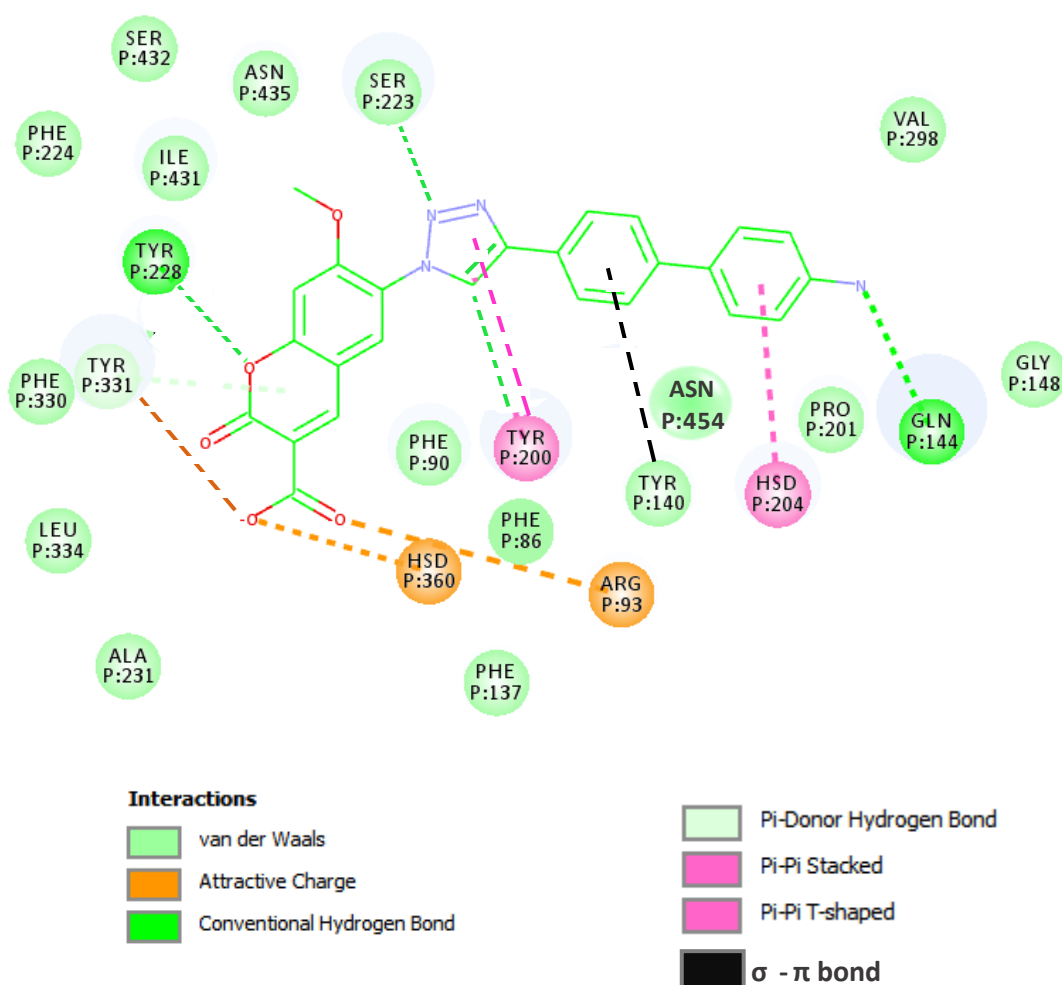
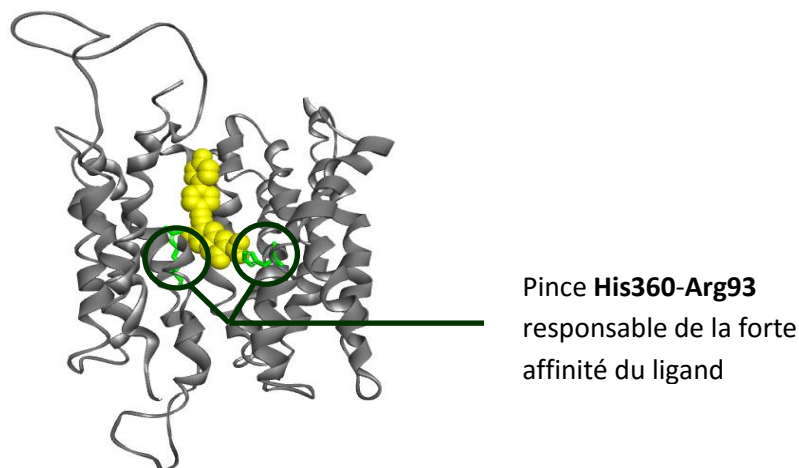


Figure 36: Acides aminés impliqués dans la liaison du ligand biphenyl-triazol-coumarinyle **LSP17-1124** aux transporteurs VGLUTs.

Nous remarquons notamment une liaison type charge-dipôle avec la **Tyr331** et deux liaisons ioniques fortes induisant la chélation du ligand *via* une pince **His360-Arg93** située en profondeur dans les poches hydrophiles de hautes affinités. Cette pince serait à l'origine de la très forte affinité du modulateur **LSP17-1124** pour le transporteur (**Figure 37**). On note également la liaison hydrogène

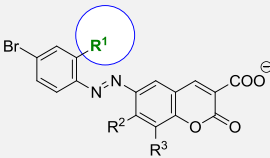
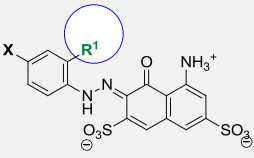
forte de l'oxygène intracyclique de la lactone (avec la **Tyr228**). Nous pouvons constater le rôle important de l'espaceur triazole qui augmente l'affinité en réalisant deux liaisons hydrogènes avec la **Ser223** et la **Tyr200**. Cette dernière fait également une interaction  $\pi$ -stacking avec le triazole. Le motif aryle hydrophobe intervient dans la fixation du composé *via* des interactions  $\sigma - \pi$  et  $\pi$ -stacking respectivement avec la **Tyr140** et l'**His204**. Le groupement amino réalise une liaison hydrogène avec la **Gln144**.



**Figure 37:** Chélation du ligand **LSP17-1124** par la pince **His360-Arg93**

## **XXVI.2. Substitution sur le carbone 2'**

Nous avons finalement substitué le motif aryle hydrophobe des composés aryl-diazényles par le groupement méthoxy sur le carbone **2'** en ortho du lien. Cette modification a permis d'étudier l'importance de la position de substitution du motif aryle hydrophobe et d'évaluer également la taille des substituants du carbone **2'** en ortho de l'espaceur.

|   | Référence              | X                      | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | % d'inhibition<br>à 20 µM |
|---|------------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|
|  | LSP9-3160              | Br                     | H              | H              | H              | 14                        |
|   | LSP9-3164              | Br                     | H              | OMe            | H              | 40                        |
|   | LSP9-3162              | Br                     | H              | H              | OMe            | 42                        |
|   | LSP9-3161              | Br                     | OMe            | H              | H              | 1                         |
|   | LSP9-4150              | Br                     | OMe            | OMe            | H              | 15                        |
|   | LSP9-3163              | Br                     | OMe            | H              | OMe            | 9                         |
|  | LSP9-2120              | Br                     | H              | H              | 33             | -                         |
|   | LSP9-2122              | Br                     | OMe            | OMe            | 42             | -                         |
|   | LSP9-2142              | PhNH <sub>2</sub>      | H              | -              | 25             | -                         |
|   | LSP9-3075 <sup>a</sup> | 2-Cl-PhNH <sub>2</sub> | Cl             | -              | 88             | 1.6                       |

<sup>a</sup> : groupement phényl-amino substitué par le chlore ou le méthyle (Schéma 154)

Tableau 17: Variation de l'affinité en fonction de la nature du substituant sur le carbone 2' du motif aryle hydrophobe.

Nous remarquons une nette diminution de l'affinité lors de la substitution des ligands coumarinyles par le groupement **OMe** sur le carbone **2'** (substituant **R<sup>1</sup>**) du motif aryle hydrophobe (**Tableau 17** ci-dessus). L'analyse par modélisation moléculaire montre que la poche hydrophobe qui loge le groupement méthoxy n'est pas assez large pour permettre le bon positionnement du ligand dans le transporteur. Cette remarque est vérifiée avec les 3 composés (**LSP9-3161**, **LSP9-4150** et **LSP9-3163**). Dans les études préliminaires sur les colorants azoïques dérivés du BT, la substitution du motif aryle hydrophobe par le groupement méthoxy provoquait une légère amélioration de l'affinité (**Tableau 17** ci-dessus). Les résultats obtenus étaient bien meilleurs avec le chlore (**LSP9-3075**, **Cl<sub>50</sub> = 1.6 µM**), pour lequel un gain notable d'un facteur 10 (**1 log**) était observé. Ces résultats confirment le mode de fixation dans le *sens direct* des colorants azoïques dans lequel le corps hydrophobe est responsable en majeure partie de l'affinité en établissant des interactions hydrophobes en profondeur dans la protéine (voir **Figure 33**).

## C. Conclusion du chapitre et perspectives

Nous avons développé quatre familles de composés analogues structuraux du Bleu Trypan. Ces molécules nous ont permis de mener des études RSA. En conclusion de ces études, nous pouvons identifier les sites pharmacophoriques nécessaires à la conception de modulateurs affins des VGLUTs. Les sites pharmacophoriques comprennent :

- La charge négative du groupement 3-carboxylate sur la coumarine

Cette charge négative est importante pour l'activité de la molécule. Elle améliore le caractère hydrophile du fluorophore permettant son accession aux poches hydrophiles de haute affinité en profondeur dans le transporteur. Ce substituant remplit la même fonction que les groupements sulfonates du naphtyle dans le BT. Elle intervient notamment dans les liaisons ioniques nécessaires à l'encrage du ligand dans le transporteur (paragraphe **XXIV p.179**).

- Le groupement mésomère donneur en position 7 ou 8 de la coumarine

Ce groupement joue un rôle important dans l'amélioration de l'affinité du composé en effectuant des interactions faibles hydrophobes. Il est également important pour les propriétés physicochimiques du motif coumarinique (bon compromis hydrophilie/lipophilie) nécessaire à l'obtention d'un ligand affiné. Le groupement mésomère donneur est un hydroxyle dans le cas du lien alcyne, très hydrophobe qui optimise la solubilité du ligand et induit une bonne affinité (paragraphe **XXIV p.179**).

- Le lien entre le fluorophore et le motif aryle hydrophobe

Ce lien joue un rôle capital en permettant des interactions faibles supplémentaires (liaison H, pi-stacking) et notamment en optimisant les propriétés physicochimiques hydrophilie/lipophilie. Cet espaceur peut être un lien alcyne ou idéalement un 1-H-1,2,3-triazole qui donne une bonne affinité avec une meilleure solubilité (paragraphe **XXV, p.184**).

- La taille du motif aryle hydrophobe (paragraphe **XXVI, p.188**).

La taille du motif aryle est très importante pour l'affinité du ligand. Elle est nécessaire pour atteindre des poches hydrophiles de haute affinité en profondeur dans le transporteur et notamment la pince His360-Arg93 (cf. **Figure 37**). Pour cette raison certaines modifications comme l'incorporation du groupement hydroxyle en position 7 du motif coumarinique n'est important que lorsque la taille de l'aryle est suffisante (deux noyaux phényles couplés à la coumarine).

Le **Schéma 155** ci-dessous illustre les sites pharmacophoriques nécessaires pour une bonne affinité des modulateurs coumarinyles des transporteurs VGLUTs.

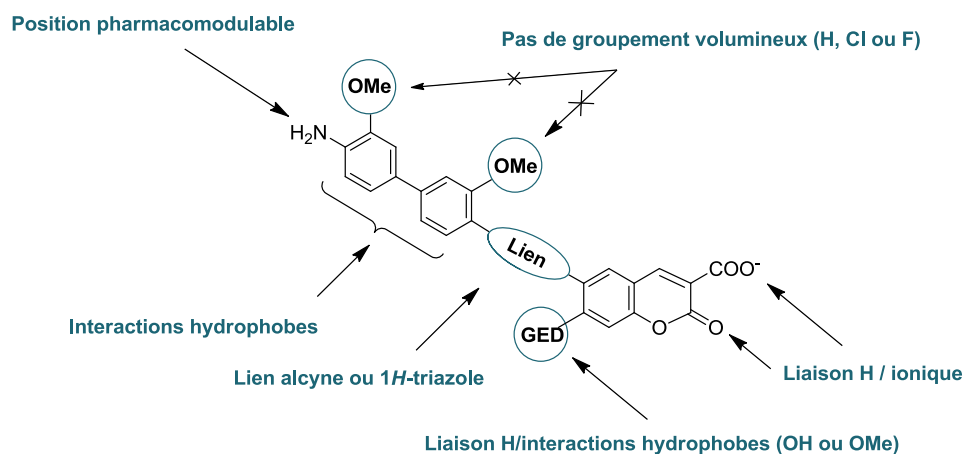
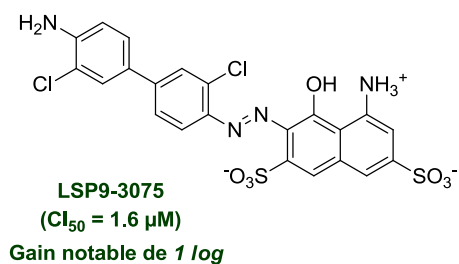
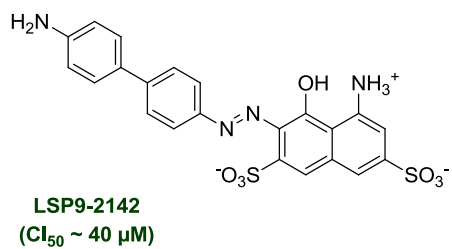


Schéma 155: Sites pharmacophoriques nécessaires à la conception d'un modulateur optimal.

Ces pharmacomodulations permettront d'obtenir des ligands avec des activités sub-micromolaires (**Tableau 16**). Enfin, un dernier avantage, non moins important de ces composés, est la présence d'un groupement amino post-fonctionnalisable permettant l'incorporation de motifs clés comme le naphthyle pour une meilleure solubilité ou pour le radiomarquage des ligands.

Dans les études préliminaires, l'importance de la substitution du motif aryle par le chlore sur le carbone **2'** induisait un gain d'affinité d'un facteur 10 (cf. **Tableau 17**, <sup>125a</sup>). Par analogie avec les composés coumarinyles, nous pourrions optimiser l'affinité des deux meilleurs modulateurs **LSP17-1173** et **LSP17-1124** (cf. **Tableau 16**) en introduisant des petits substituants lipophiles, comme le chlore ou le fluor, sur le motif aryle hydrophobe (**Schéma 156**).

Composés biphenyl-monoazoïques



Composés biphenyl-coumarinyles

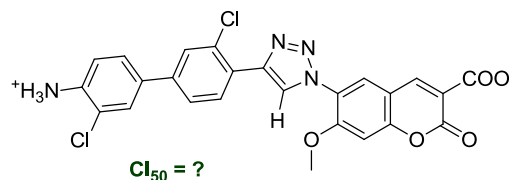
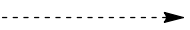
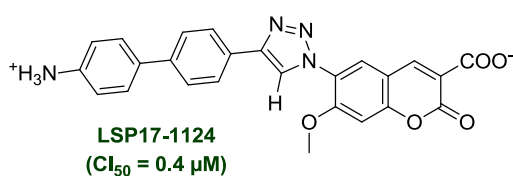
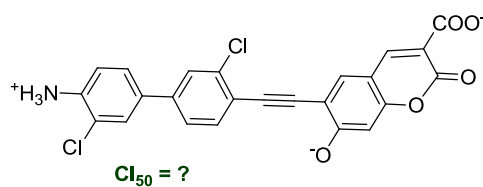
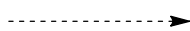
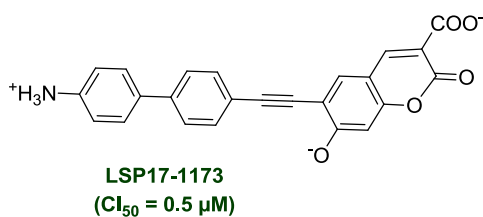


Schéma 156: Perspectives pour l'optimisation de l'affinité par incorporation du chlore sur le motif aryle hydrophobe

# Conclusion générale

Le système glutamatergique est le principal système de neurotransmission excitatrice du système nerveux central. Il est impliqué dans plusieurs désordres neurologiques, tels que la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, les douleurs neuropathiques chroniques, etc. Les VGLUTs sont les meilleurs biomarqueurs spécifiques de ce système et représentent, par conséquent, des cibles clés utilisables dans le suivi physiopathologique des maladies impliquant la neurotransmission glutamatergique. Durant ce projet doctoral, nous avons travaillé sur la conception d'analogues structuraux du Bleu Trypan (molécule *Lead*). Cet inhibiteur affin et sélectif des VGLUTs ( $CI_{50} = 50$  nM) reste difficilement pharmacomodulable, et présente une faible biodisponibilité dans le cerveau (problème de passage de la BHE). Notre objectif a donc été la synthèse de modulateurs (analogues structuraux du BT) affins, sélectifs, fluorescents, et surtout post-fonctionnalisables des VGLUTs.

## Partie Chimie

Pour atteindre ces objectifs, nous avons effectué trois pharmacomodulations majeures à partir du Bleu Trypan. Nous avons, dans une première étape, remplacé le naphtyle du Bleu Trypan par des isostères 4-méthyl-coumarines et 3-carboxy-coumarines. Dans un second temps, nous avons, soit supprimé le lien azo entre le motif coumarinique et le motif aryle hydrophobe, soit remplacé ce lien par d'autres espaceurs (liaison alcène, alcyne ou triazole). Enfin, dans la dernière partie, nous avons optimisé la nature des substituants sur le motif coumarinique et sur le motif aryle hydrophobe. Ces trois pharmacomodulations nous ont permis d'obtenir 34 composés répartis en cinq familles en fonction de la nature du lien entre le motif coumarinique et le motif aryle hydrophobe. Dans chaque famille, on distingue deux types de composés : les analogues phényliques (motif aryle = phényle) et les analogues biphényliques (motif aryle = biphényle).

Nous avons formé 34 composés coumarinyles

**Lien**  
azo, alcène, alcyne, triazol, "sans lien"

X = H, Br, PhH<sub>2</sub>  
R = 4-Me ou 3-COOH  
R<sup>2</sup> = H, OMe, OH, NET<sub>2</sub>  
R<sup>3</sup> = H, OMe

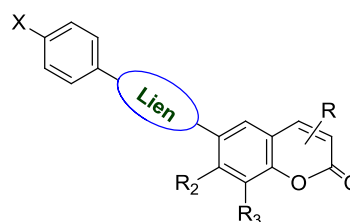


Schéma 157: Composés formés durant la thèse



## Activités biologiques vs modélisation moléculaire

Parmi les 34 composés finaux, nous avons pu évaluer les activités biologiques de 30 composés sur des vésicules entières fonctionnelles, par test de compétition de recapture du [<sup>3</sup>H]-Glu. Les résultats des tests biologiques nous ont permis de faire des études RSA. À partir de ces résultats, nous avons pu conclure que les motifs 3-carboxy-coumariniques sont de bons isostères du motif naphthyle. Nous avons également pu montrer l'importance de certaines pharmacomodulations, telles que l'augmentation de la taille du motif aryle (phényle en biphenyle), ou la présence de groupements accepteurs de liaison H, en ortho du lien (OH, OMe, NEt<sub>2</sub>). Ces conclusions ont été finalement confirmées avec les composés présentant des liens alcynes et triazoles dans les composés biphenyliques (composés de types B) pour lesquels on obtient un gain d'activité de **2 logs**. Nous avons obtenus, pour la première fois, deux composés biphenyliques et pharmacomodulables, qui modulent la recapture du glutamate tritié avec des affinités sub-micromolaires (400 - 500 nM).

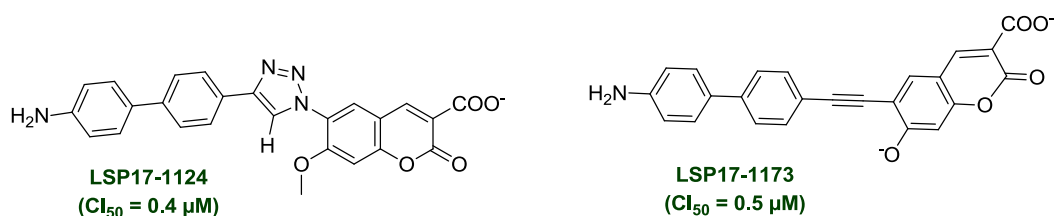


Schéma 158: Structures des deux meilleurs ligands.

Les composés synthétisés ont permis d'affiner le modèle moléculaire par homologie des protéines VGLUTs développé dans l'équipe. Nous avons notamment pu utiliser ce modèle pour comprendre le mode de fixation de nos composés dans les transporteurs VGLUTs. Nous avons constaté que la fixation des colorants azoïques dérivés du Bleu Trypan se faisait dans le **sens direct** (pénétration du motif aryle hydrophobe en amont), contrairement à nos nouveaux composés coumarinyles qui se fixent dans le **sens indirect** (pénétration du motif polaire coumarinique en amont). Ces observations nous montrent l'importance des propriétés physicochimiques des composés, et notamment des motifs polaires 3-carboxy-coumariniques (bon compromis lipophilie/hydrophilie). Les motifs coumariniques, de part leur lipophilie, arrivent à pénétrer en profondeur dans le transporteur, au niveau des poches hydrophiles de haute affinité, afin d'établir des liaisons électrostatiques fortes (liaisons H et ioniques). Nous avons mis en exergue l'importance de ces interactions électrostatiques pour nos deux meilleurs ligands, avec la caractérisation d'une pince **His360-Arg93** dans le transporteur.

## Limites des structures

Nous rencontrés des problèmes majeurs de solubilité lors des synthèses, mais également lors des évaluations des activités biologiques des composés. En particulier, la synthèse et la caractérisation des composés entiers symétriques se sont révélées très délicates. Ces composés sont très hydrophobes et très peu solubles dans les solvants organiques usuels. De manière générale, nous avons remarqué que les liaisons alcène et alcyne conduisent à des ligands moins solubles que les ligands contenant le lien azo et triazole. Ce problème de solubilité conduit à des résultats biaisés lors des évaluations des affinités. En effet, le produit étant très peu soluble dans les conditions du test, la concentration réelle du produit solubilisé dans le tampon biologique doit être déterminée afin de juger de la potentialité du ligand. Nous avons remarqué ce problème, plus particulièrement avec les composés **LSP17-1127** et **LSP16-2043** (Schéma 159).

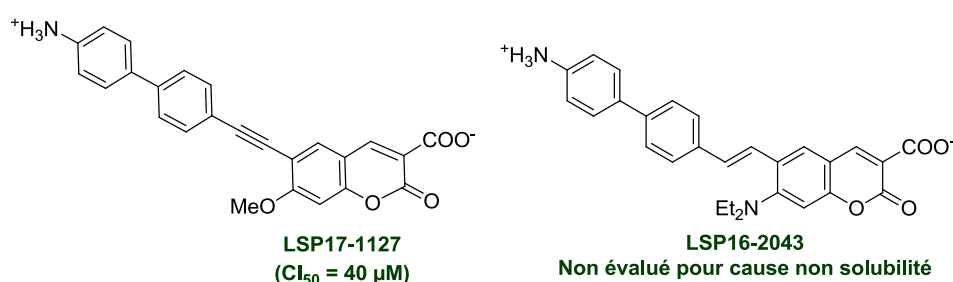


Schéma 159: Structures des composés présentant une très mauvaise solubilité dans les conditions du test biologique

Nous avons pu comprendre que la combinaison d'un groupement améliorant la solubilité comme le groupement amino et hydroxyle dans le cas du lien alcyne est nécessaire à l'obtention d'un meilleur ligand (bon compromis solubilité/polarité), tandis que le lien triazole (qui améliore la solubilité) donne un bon ligand avec un groupement moins hydrosoluble (comme le OMe). Par ailleurs, la modélisation moléculaire a pu nous montrer que les ligands trop hydrophobes ne pénètrent que très peu profondément dans le transporteur et donnent par conséquent une faible affinité, de même que les ligands très hydrosolubles comme les dérivés phényl-monoazoïques du Bleu Trypan. En effet, ces ligands n'atteignent pas les poches d'interaction de haute affinité hydrophile et/ou hydrophobe nécessaire à une bonne affinité du ligand pour le transporteur.

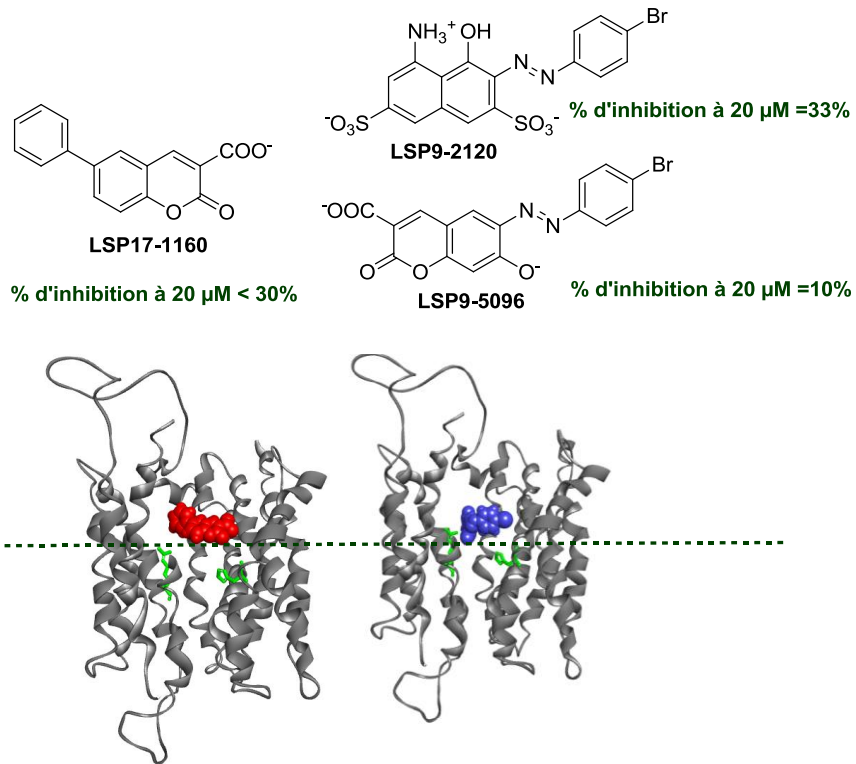


Schéma 160: Illustration de la fixation de ligands trop hydrophobes et trop hydrophiles dans les transporteurs VGLUTs

### Perspectives

Nous avons observé, lors des études préliminaires, l'importance de l'incorporation de petits substituants hydrophobes sur le motif aryle tels que le chlore ou le fluor qui améliorent l'affinité des ligands par un gain substantiel de 1 log. Nous pouvons par conséquent envisager les mêmes pharmacomodulations pour nos deux meilleurs ligands.

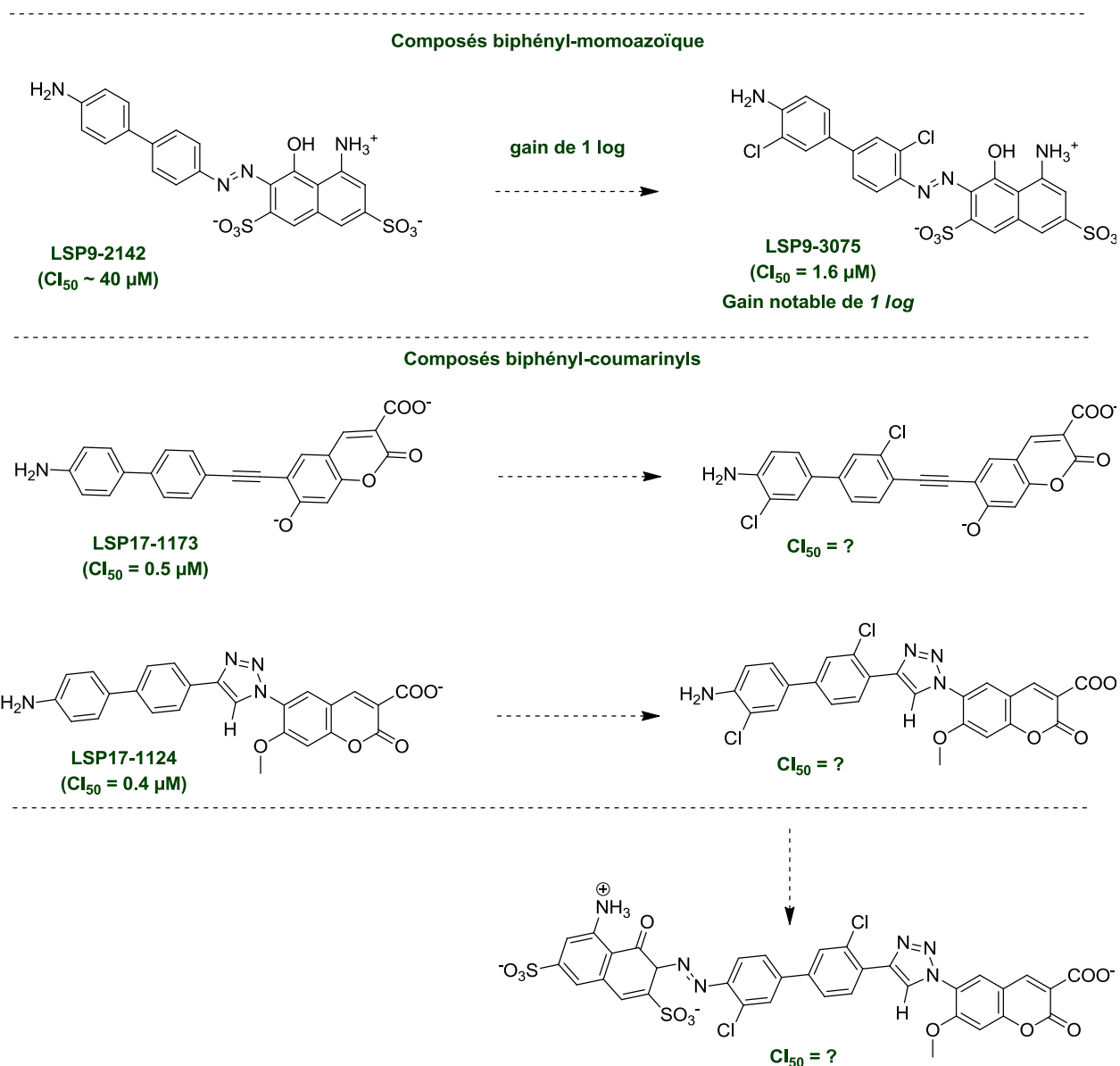


Schéma 161: Amélioration de l'affinité par incorporation de substituents hydrophobes sur le motif aryle

En supposant que les résultats des activités biologiques soient équivalents entre les colorants azoïques et les dérivés coumarinyles, nous pouvons voir que cette pharmacomodulation permettrait l'obtention de ligands avec des affinités en dessous de la cinquantaine de nanomolaire.

Au regard des problèmes de solubilité constatés avec les nouveaux ligands dichlorés, nous pouvons envisager la conception de ligands dissymétriques, analysables et purifiables par les techniques d'analyse courantes comme la CLHP (purification, caractérisation) et la RMN (caractérisation). Ces ligands limitent les problèmes de solubilité par la présence du motif polaire naphthyle-disulfonique. D'autre part, nous pouvons postuler que la fixation de ces ligands se fera par

la pénétration du motif polaire coumarinique en amont assurant une meilleure affinité pour ces composés. Les motifs coumariniques présentent une meilleure affinité pour les poches hydrophiles de hautes affinités, en comparaison du motif naphthyle plus polaire.

### Sélectivité/Fluorescence

Rosenmund et *coll.* ont montré la sélectivité des colorants azoïques sur des modèles d'autapses. Ils ont notamment prouvé que le Bleu Trypan ne module ni l'activité des canaux ioniques, ni l'activité des récepteurs iGLURs et mGLURs. Leur étude a confirmé que l'action du Bleu Trypan sur la recapture glutamate est spécifique des VGLUTs.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 38: Comparaison de l'affinité du Bleu Trypan *in vitro* (50 nM), *ex-vivo* (2  $\mu$ M) et *in vivo* (1 mM). Dans l'expérience *in vitro*, les mesures sont effectuées sur des vésicules purifiées à partir du lobe frontal (Dutar et *coll.*), les mesures *ex-vivo* sont effectuées sur des tranches du lobe frontal, l'évaluation *in vivo* mesure la réduction du potentiel d'action au niveau du motif (Puel et *coll.*).

De manière à compléter l'évaluation de nos composés, la sélectivité de nos ligands sera déterminée de la même manière : d'abord sur les vésicules purifiées, puis sur des tranches d'hippocampe *in vivo*. Ces études se font actuellement en collaboration avec les équipes du Pr. Dutar et *coll.*, du Pr. Rosenmund et *coll.*, et le Pr. Puel et *coll.* Ces expériences nous permettront de connaître si nos composés, à l'instar du Bleu Trypan, n'ont pas d'action sur les VMAT1-2, les récepteurs ionotropiques et métabotropiques du glutamate. On espère ainsi conclure, à la suite de ces analyses, sur la sélectivité de nos composés coumarinyles. La biodisponibilité des molécules sera également évaluée en effectuant des expériences *in vivo* sur l'audition chez les souris (Puel et *coll.*). Les propriétés de fluorescences des ligands sont actuellement en cours d'évaluation et nécessiteraient plus de données. Nous avons notamment étudié les propriétés d'absorption et d'émission de nos deux meilleurs composés **LSP17-1173** et **LSP17-1124**.

|                     | LSP17-1124 | LSP17-1173 |
|---------------------|------------|------------|
| $\lambda_{ex}$ (nm) | 360        | 340        |
| $\lambda_{ém}$ (nm) | 475        | 420        |
| $\Delta S$ (nm)     | 115        | 80         |

Nous remarquons que les deux ligands donnent des maxima d'absorption et d'émission importants proche de 500, notamment pour le composé biphényltriazole **LSP17-1124**. Les deux composés ont également un grand déplacement de Stokes montrant qu'il serait intéressant d'approfondir les études sur les propriétés de fluorescence de nos composés.



# Experimental Section



## General Information

All air and moisture sensitive manipulations were performed either under argon or *in vacuo* using standard Schlenk techniques. Anhydrous solvents (Et<sub>2</sub>O, THF, Dioxane, DCM and toluene) were purchased from Sigma Aldrich. In addition, MeOH was stored over oven dried 4 Å molecular sieves under argon for at least 16 hours prior to use. All chemicals were purchased from Alfa Aesar, Sigma Aldrich and TCI Europe and were used without further purification unless otherwise stated.

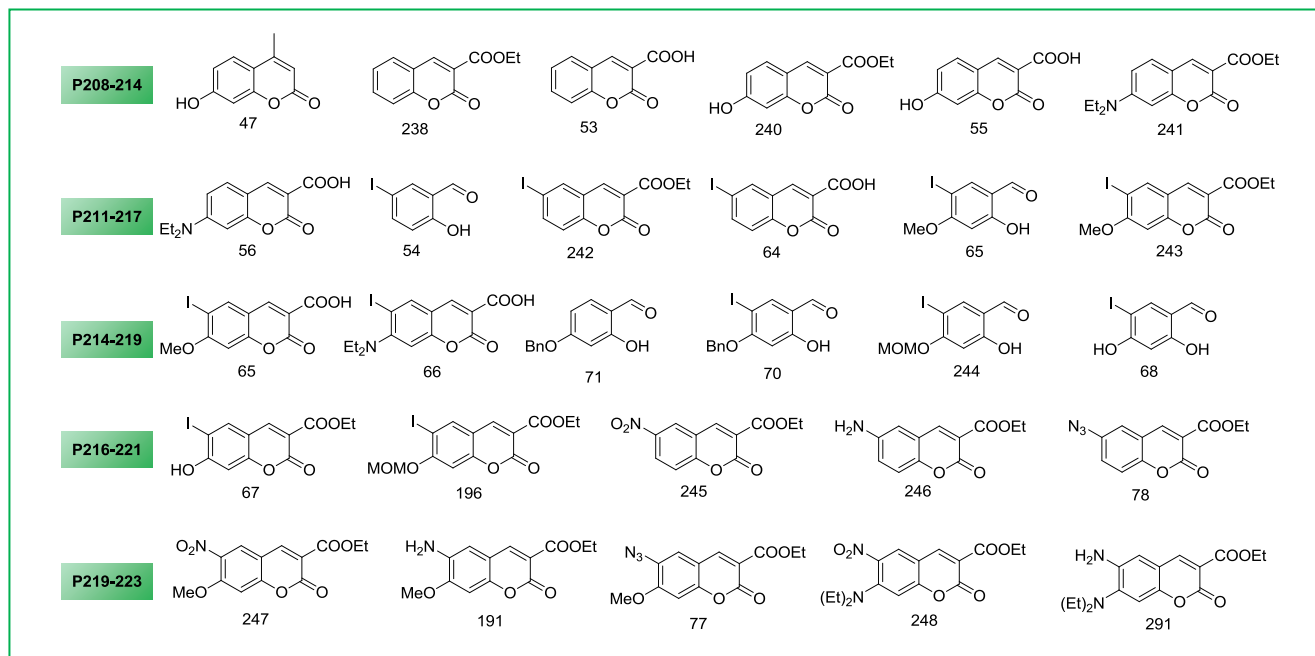
Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed with Merck SIL G/UV<sub>254</sub> plates. Compounds were visualised by exposure to UV light or by dipping the plates in solutions of phosphomolybdic acid, ninhydrin or potassium permanganate followed by heating. Flash column chromatography was performed in air with silicagel 60 (Fluka). Column chromatography was performed with Merck Kieselgel 60 (200–500 mm). The solvent systems were given (s/s v:v). Compounds color are taken from [https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_colors:\\_A%E2%80%93F](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_colors:_A%E2%80%93F).

NMR spectra <sup>1</sup>H (250.13 or 500.16 MHz), <sup>13</sup>C (62.9 or 125.78 MHz) were respectively recorded on an ARX 250 or an Avance II 400 Bruker or an Avance II 500 Bruker spectrometer. Chemical shifts (δ, ppm) are given with reference to residual <sup>1</sup>H or <sup>13</sup>C of deuterated solvents in the solvent indicated (CDCl<sub>3</sub> 7.27, 77.00 ; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO 2.05, 29.84 and 206.26, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO 2.50, 39.52)). <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) relative to the TMS scale. Coupling constants *J* are quoted in Hz. The following abbreviations are used for the proton spectra multiplicities: s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, qt: quintuplet, m: multiplet, br.: broad, dd: double doublet, dt: double triplet. Coupling constants (*J*) are reported in Hertz (Hz). Several signals could not be attributed will be represented by ArH (aromatic hydrogen).

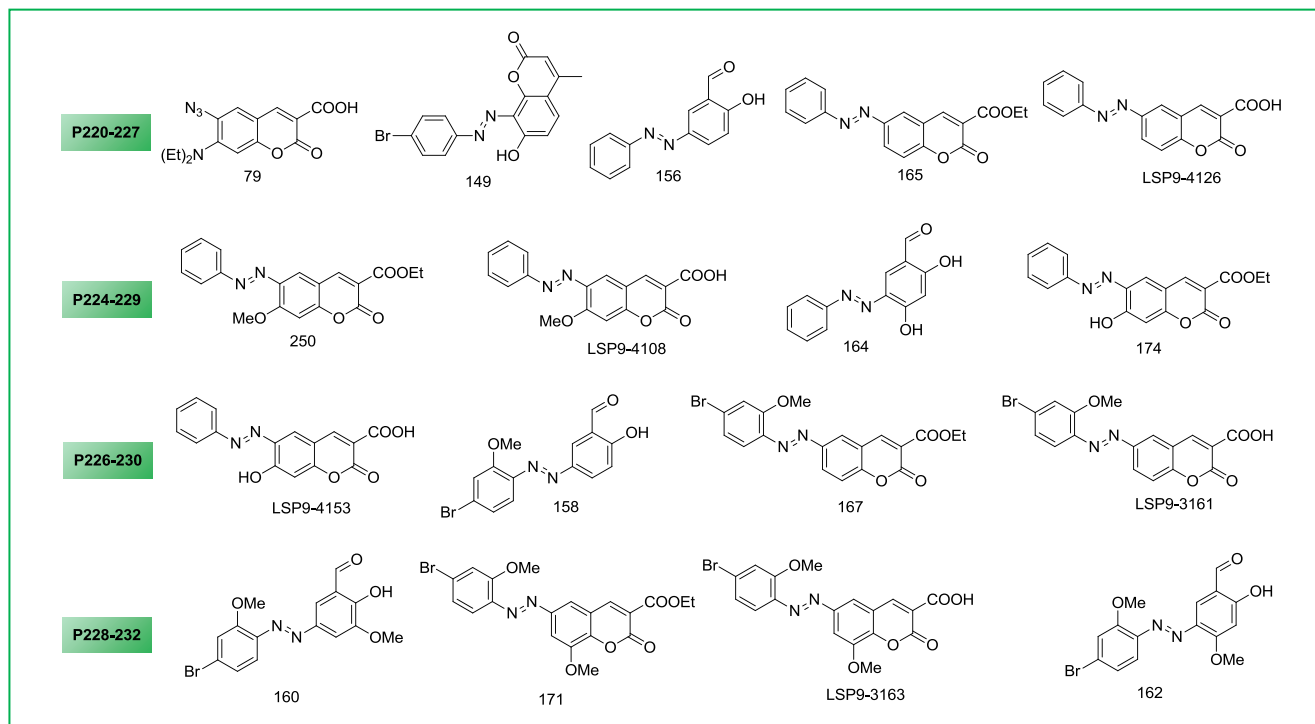
All mass spectrometry was carried out by the University of Paris Descartes mass spectrometry service. Mass spectra (MS) were recorded with a LCQ-advantage (ThermoFinnigan) mass spectrometer with positive (ESI<sup>+</sup>) or negative (ESI<sup>-</sup>) electrospray ionization (ionization tension 4.5 kV, injection temperature 240 °C).

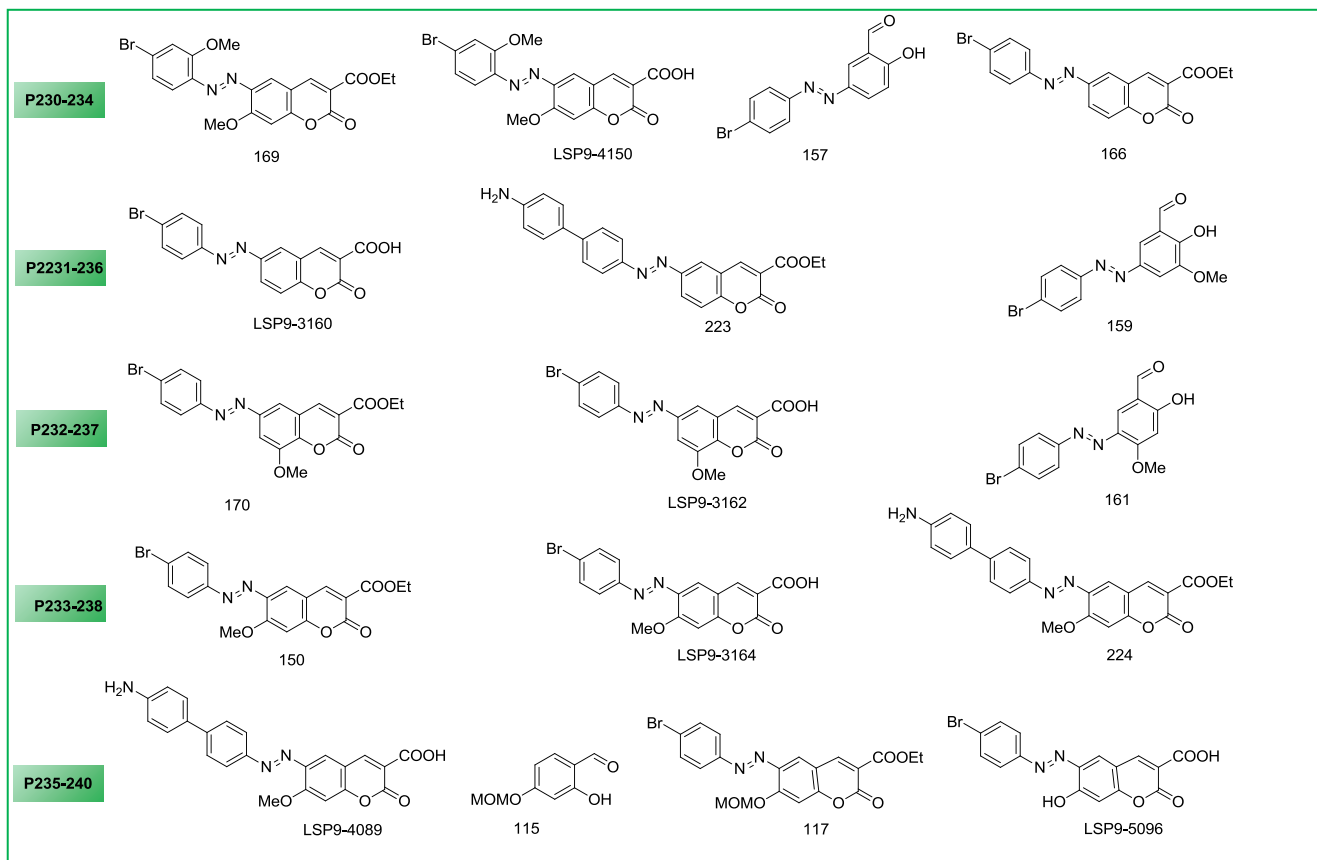
# List of compounds

## Coumarins

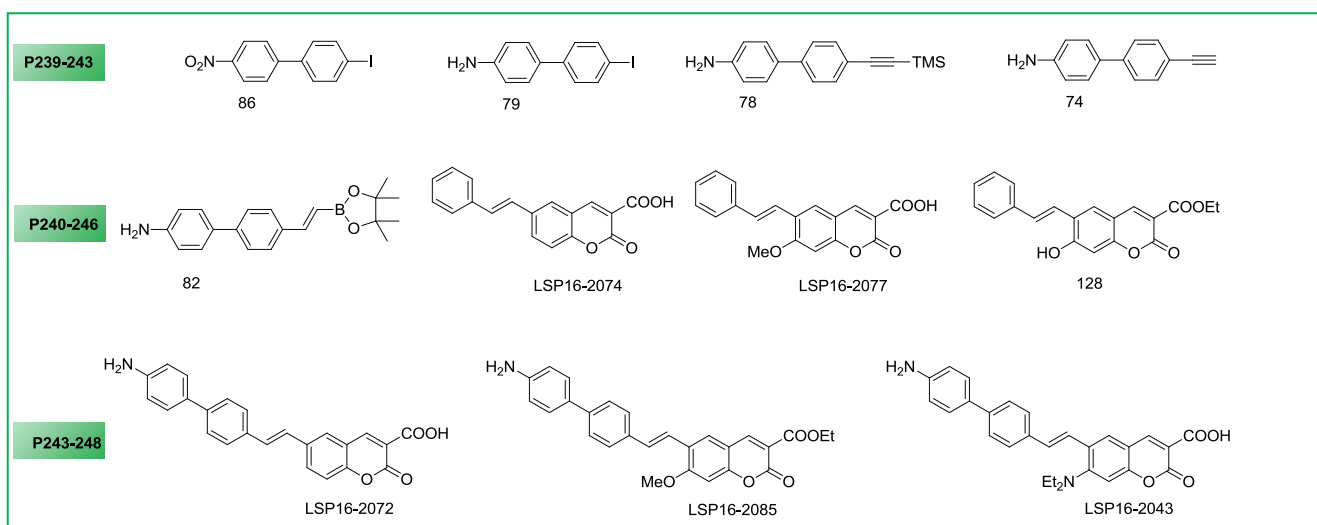


## Aryldiazényl coumarins

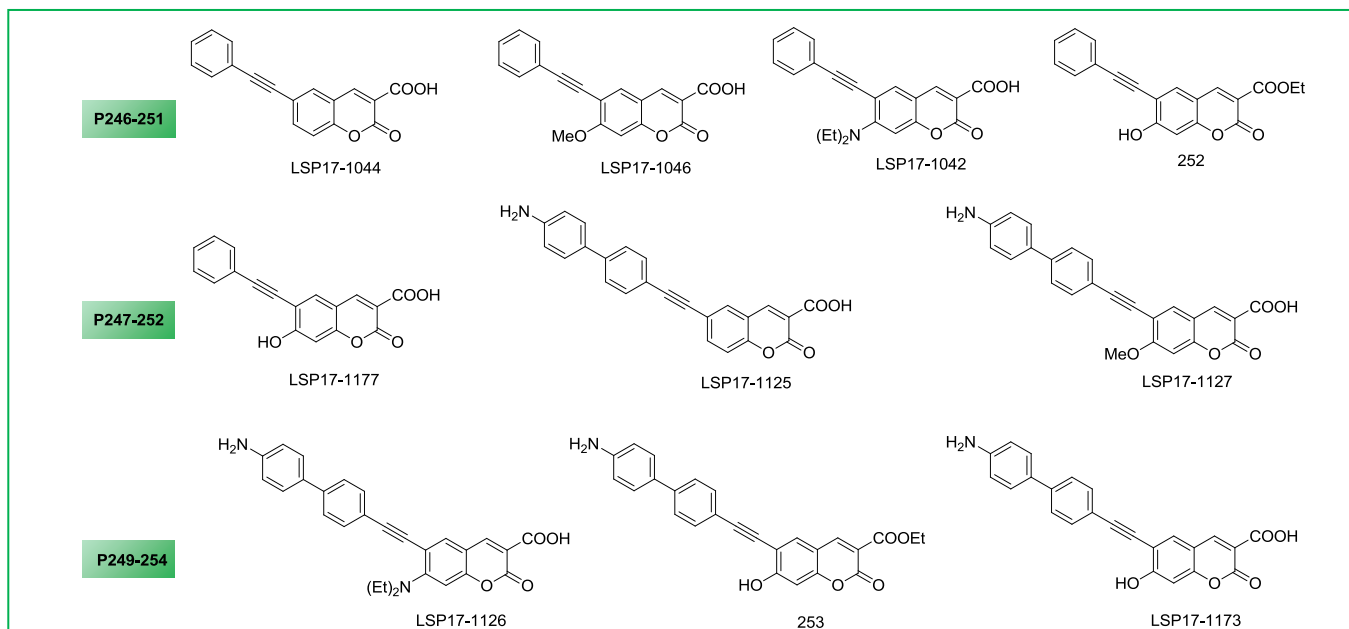




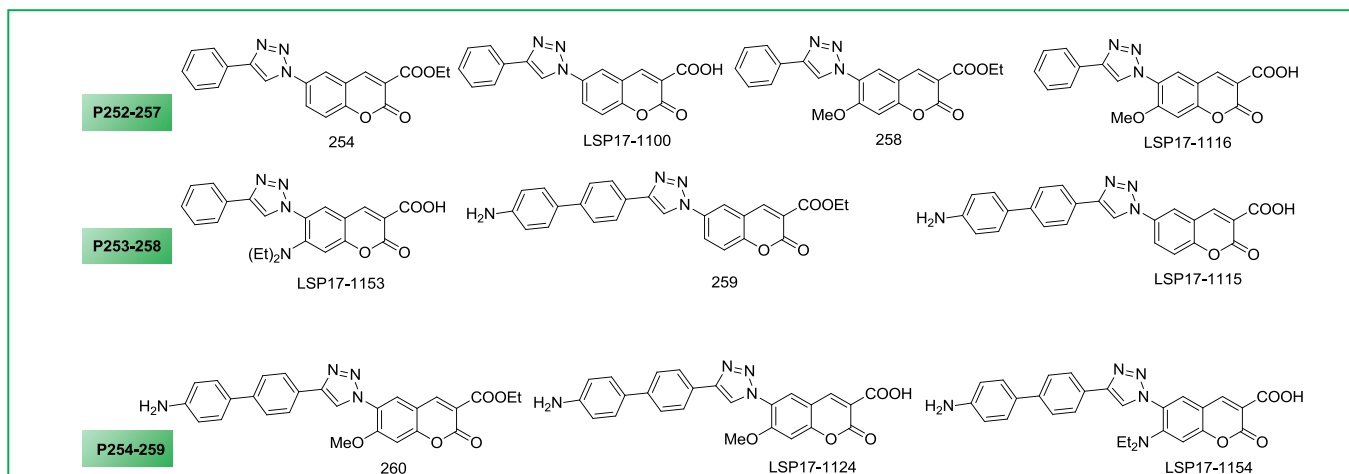
## ArylVinyl coumarins



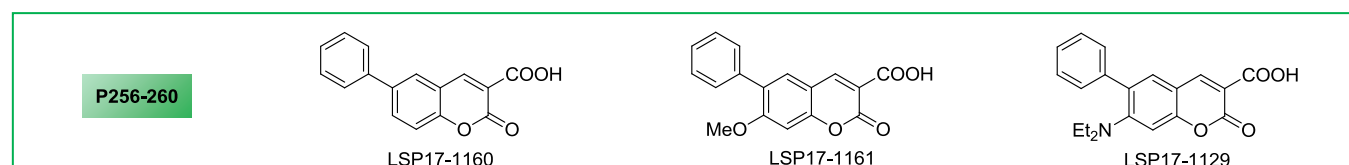
## Arylethynyl coumarins



## Aryltriazol coumarins



## Arylcoumarins

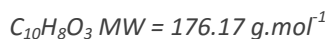
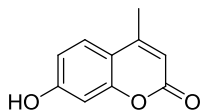




**I. Starting coumarins**

I.1. 4-substituted-2H-chromen-2-one

7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one (47)



To a cool solution of resorcinol (3.747 g, 34 mmol, 1 equiv.) in  $H_2SO_4$  (50 mL) was added ethyl acetoacetate (3.8 mL, 228 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and then poured into crushed ice. The solid was filtrated, washed and precipitated in cool ethanol to get the final pure compound as a *white* solid (4.61 g, 77% yield)<sup>137b,c</sup>;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_{H-}$ : 10.49 (s, 1 H, OH), 7.59 (d, 1 H,  $J = 8.5$  Hz, ArH), 6.80 (dd, 1 H,  $J = 2$  Hz, 8.5 Hz, CHCHCOH), 6.70 (d, 1 H,  $J = 2$  Hz, HOCCHCO), 6.12 (s, 1 H, CHCOOC), 2.36 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (125.78 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_{C-}$ : 161.1, 160.2, 154.8, 153.5, 126.6, 112.81, 111.9, 110.2, 102.1, 18.06; HR-MS (ESI, m/z)  $[M-H]^-$ : calcd. for  $[C_{10}H_7O_3]^-$ , 175.0401, found 175.0393.

## I.2. Ethyl 7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate

### General Procedure 1: Synthesis of Ethyl 7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate<sup>152, 201</sup>

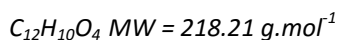
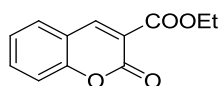
A mixture of corresponding benzaldehyde (1 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (1.2 mmol, 1.2 equiv.), catalytic amount of piperidine (10 mol%) and few drops of glacial acetic acid were added in absolute ethanol (1.2 mL). The reaction was refluxed for 16 h. The formed precipitate was filtered off, washed with ethanol, dried and triturated in EtOH to give the Ethyl 7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate pure product in indicated yield.

### General Procedure 2: 7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid

A solution of appropriate (1 mmol) and NaOH (37 mmol) in ethanol (1.5 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness. The residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH = 1 - 2). The precipitate was filtered, dried and triturated in ethanol to give the pure 7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid product in indicated yield.

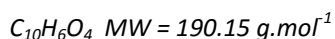
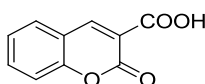


### Ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (238)



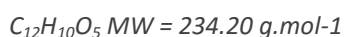
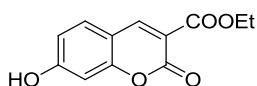
Desired product was obtained as a *white* solid (12.72 g, 48% yield) from 2-hydroxy-benzaldehyde (15 g, 122.8 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (147 mmol, 1.2 equiv.), catalytic amount of piperidine (13 mmol, 10 mol%) dissolved in 150 mL of absolute ethanol according to General Procedure 1.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.76 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 7.93 (dd, 1 H,  $J$  = 1.6 Hz, 7.6 Hz ArH), 7.74 (m, 1 H, ArH), 7.43 (d, 1 H,  $J$  = 8.5 Hz, ArH), 7.43 (td, 1 H,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 1 Hz, ArH), 4.30 (q, 2 H,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31 (t, 3 H,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 162.6, 155.9, 154.5, 148.6, 134.4, 130.2, 124.8, 117.8, 117.7, 116.1, 61.2, 14.0; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 219.0652, found 219.0641.

### 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (53)



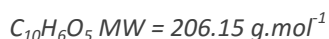
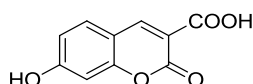
Desired product was obtained as a *white* (9.83 g, 89% yield) from Ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (12.72 g, 58.3 mmol), NaOH (2.16 mol, 37 equiv.) dissolved in 90 mL of ethanol according to General Procedure 2.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.16 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>H), 7.76 (dd, 1 H,  $J$  = 1.5 Hz, 7.5 Hz ArH), 7.66 (m, 1 H, ArH), 7.44 (d, 1 H,  $J$  = 8.2 Hz, ArH), 7.40 (td, 1 H,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 1 Hz, ArH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 162.5, 157.6, 153.4, 141.4, 132.5, 128.9, 125.2, 124.8, 118.4, 116.2.

### Ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (240)



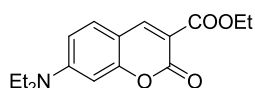
Desired product was obtained in quantitative yield as a *burnt amber* solid from 2,4-dihydroxy-benzaldehyde (1.38 g, 10 mmol) according to General Procedure 1.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$ : 11.06 (br, 1 H, OH), 8.67 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 7.75 (d, 1 H,  $J$  = 8.5 Hz, ArH), 6.84 (dd, 1 H,  $J$  = 2.5 Hz, 8.5 Hz ArH), 6.73 (d, 1 H,  $J$  = 8.5 Hz, CHCOH), 4.26 (q, 2 H,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29 (t, 3 H,  $J$  = 7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 164.0, 162.9, 157.1, 156.4, 149.4, 132.1, 113.9, 112.1, 110.4, 101.8, 60.8, 14.1. HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup>: calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>, 233.0455, found 233.0447.

### Ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (55)



Desired product was obtained as a *burnt amber* solid (1.2 g, 46% yield) from Ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (3 g, 12.81 mmol) according to General Procedure 2;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$ : 8.68 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>H), 7.74 (d, 1 H,  $J$  = 8.5 Hz, ArH), 6.85 (dd, 1 H,  $J$  = 2.5 Hz, 8.5 Hz, ArH), 6.74 (d, 1 H,  $J$  = 2.5 Hz,  $J$  = 1 Hz, CHCOH).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 164.2, 163.9, 157.6, 156.9, 149.3, 132.0, 113.9, 112.5, 110.6, 101.8. HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup>: calcd. for [C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>, 205.0142, found 205.0142.

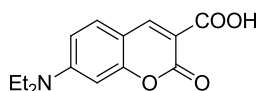
### Ethyl 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (241)



$$C_{16}H_{19}NO_4 \text{ MW} = 289.33 \text{ g.mol}^{-1}$$

Desired product was obtained as a *yellow* solid (13.38 g, 73% yield) from 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde (12.24 g, 63.34 mmol) according to General Procedure 1;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 8.54 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 7.62 (d, 1 H,  $J$  = 8.5 Hz, ArH), 6.77 (dd, 1 H,  $J$  = 2.5 Hz, 9.0 Hz, ArH), 6.53 (d, 1 H,  $J$  = 2.0 Hz, ArH), 4.23 (q, 2 H,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.48 (q, 4 H,  $J$  = 7.5 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, 3 H,  $J$  = 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.14 (t, 3 H,  $J$  = 7.5 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 163.3, 157.9, 156.9, 152.7, 149.1, 131.7, 109.7, 107.4, 106.9, 95.8, 60.3, 44.3, 14.2 (×2), 12.3 (×2). HR-MS (ESI,  $m/z$ )  $[M+H]^+$ : calcd. for  $[C_{16}H_{20}NO_4]^+$ , 290.1387, found 290.1376.

### 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (56)

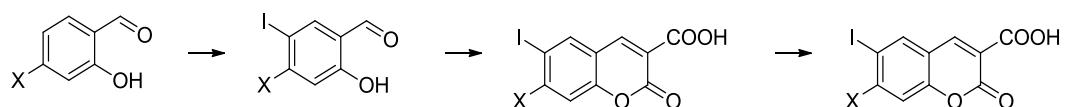


$$C_{16}H_{19}NO_4 \text{ MW} = 261.27 \text{ g.mol}^{-1}$$

Desired product was obtained as a *yellow* solid (2.25 g, 20% yield) from Ethyl 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (10.12 g, 38.77 mmol) according to General Procedure 2;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$ : 12.48 (br, 1H, COOH), 8.59 (s, 1 H, CHCOOH), 7.64 (d, 1 H,  $J$  = 9 Hz, ArH), 6.79 (dd, 1 H,  $J$  = 2.5 Hz, 9.0 Hz, ArH), 6.57 (d, 1 H,  $J$  = 2.5 Hz, ArH), 3.49 (q, 4 H,  $J$  = 7.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.14 (t, 6 H,  $J$  = 7.5 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 164.4, 159.5, 157.9, 152.9, 149.4, 131.6, 110.0, 107.3, 107.1, 95.9, 44.4 (×2), 12.3 (×2).

### I.3. 6-iodo-7-substituted-coumarin

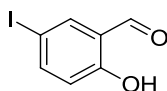
The 6-iodo-7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acids were synthesized by a sequence of procedures shown below:



#### General Procedure 1: Synthesis of Ethyl 6-iodo-7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate

To a solution salicylaldehyde derivatives (1 mmol, 1 equiv.) and diethyl malonate (1.2 equiv.) in absolute ethanol (1.2 mL), a catalytic amount of piperidine (10 mol%) and few drops of glacial acetic acid were added. The reaction mixture was refluxed for 16 h. The formed precipitate was filtered off, washed with ethanol, dried and precipitated from EtOH to give *ethyl 6-iodo-7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate*.

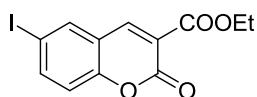
### 2-hydroxy-5-iodobenzaldehyde (64)



$$C_7H_5IO_2 \text{ MW} = 248.02 \text{ g.mol}^{-1}$$

To a solution of 2-hydroxybenzaldehyde (20 g, 164 mmol, 1 equiv.) in AcOH (140 mL) was added ICl (29.4 g, 181 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was then stirred for 16 h at 40 °C. Then the crude reaction was extracted with Et<sub>2</sub>O (3x 200 mL) and saturated solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The organic layer was concentrated *in vacuo* and precipitated in Et<sub>2</sub>O/pentane to get the final pure product as a *white* solid (10.1 g, 37 % yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 10.92 (s, 1 H, OH), 10.16 (s, 1 H, CHO), 7.88 (d, 1 H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.78 (dd, 1 H, *J* = 2.5 Hz, 8.5 Hz ArH), 6.85 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz, CHCOH). <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 189.7, 160.3, 144.1, 136.7, 124.58, 120.1, 81.4.

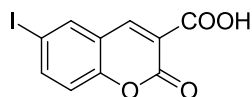
### Ethyl 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (242)



$$C_{12}H_9IO_4 \text{ MW} = 344.10 \text{ g.mol}^{-1}$$

Desired product was obtained as a *white* solid (4 g, 72% yield) from 2-hydroxy-5-iodobenzaldehyde (10 g, 40.3 mmol) according to General Procedure 1 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.16 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.25 (d, 1 H, *J* = 2.2 Hz, ArH), 7.94 (dd, 1 H, *J* = 2.2 Hz, 8.7 Hz, ArH), 7.20 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 4.24 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.24 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 162.3, 155.5, 154.1, 147.2, 142.2, 138.0, 120.0, 118.5, 118.4, 88.3, 61.3, 14.0 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>IO<sub>4</sub>], 344.9613, found 344.9629

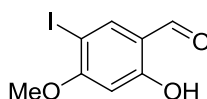
### 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (64)



$$C_{10}H_5IO_4 \text{ MW} = 316.05 \text{ g.mol}^{-1}$$

Desired product was obtained as a *white* solid (3.5 g, 93% yield) from ethyl 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (4.0 g, 11.62 mmol) according to General Procedure 2 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.65 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.29 (d, 1 H, *J* = 2.2 Hz, ArH), 7.99 (dd, 1 H, *J* = 2.2, 8.7 Hz, ArH), 7.25 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, ArH) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 163.8, 156.2, 154.1, 146.9, 142.1, 138.0, 120.3, 119.4, 118.5, 88.4 ; HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup> : calcd. for [C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>IO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 314.9152, found 314.9160.

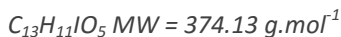
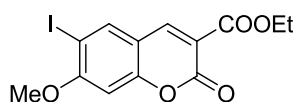
### 2-hydroxy-5-iodo-4-methoxybenzaldehyde (65)



$$C_8H_7IO_3 \text{ MW} = 278.44 \text{ g.mol}^{-1}$$

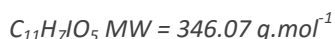
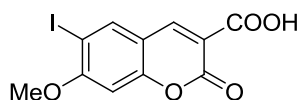
To a solution of 2-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde (13.5 g, 89 mmol, 1 equiv.) in AcOH (75 mL) was added ICl (15.8 g, 98 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was then stirred for 16 h at 40 °C. Then the crude was concentrated *in vacuo* and precipitated in Et<sub>2</sub>O/pentane to get the final pure product as a *white* solid (9.5 g, 49 % yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 11.14 (s, 1 H, OH), 9.99 (s, 1 H, CHO), 8.00 (s, 1 H, CHCl), 6.57 (s, 1 H, CHCOH), 3.88 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 189.5, 163.4, 163.2, 139.7, 118.1, 99.9, 74.7, 56.8.

### Ethyl 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (243)



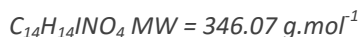
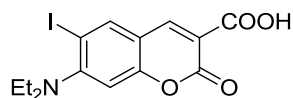
Desired product was obtained in quantitative yield as a *white solid* from 2-hydroxy-5-iodobenzaldehyde (9 g, 32 mmol) according to General Procedure 1 ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  : 8.68 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{Et}$ ), 8.36 (s, 1 H,  $\text{CHCl}$ ), 7.13 (s, 1 H,  $\text{CHCO}$ ), 4.28 (q, 2 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.96 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.30 (t, 3 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$  : 162.6, 162.4, 157.0, 155.9, 148.0, 139.6, 114.9, 113.4, 99.3, 81.9, 61.0, 57.6, 14.1 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : calcd. for  $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{IO}_5]^+$ , 374.9724, found 374.9717..

### 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (65)



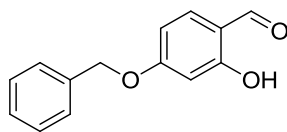
A solution of ethyl 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (1.47 g, 3.93 mmol) and NaOH aq 10% (6 mL) in ethanol (6 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, dried and crystallized from ethanol to give the title compound as a *white solid* (1.3 g, 96 % yield) ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  : 8.67 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{H}$ ), 8.36 (s, 1 H,  $\text{CHCl}$ ), 7.12 (s, 1 H,  $\text{CHCO}$ ), 3.96 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$  : 163.9; 162.2, 156.9, 156.6, 147.7, 139.5, 114.6, 113.5, 99, 3, 81.8, 57.5 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}-\text{H}]^-$  : calcd. for  $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{IO}_5]^-$ , 344.9265, found 344.9260.

### 7-(diethylamino)-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (66)



A mixture of A47-IV, Ethyl 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (2.0 g, 7.65 mmol, 1 equiv.) in EtOH (15 mL) and 382 mL NaOH aq 5% was cooled at 0 °C. Then  $\text{I}_2$  (2.33 g, 9.19 mmol, 1.2 equiv.) in sat. KCl aq solution was added dropwise and the reaction was stirred for 2 hours. Then the crude reaction was acidified with aq HCl, concentrated *in vacuo* and extracted with 150 mL portions of  $\text{Et}_2\text{O}$ . The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  then concentrated *under vacuo* to get the final pure product as a *yellow solid* (2.22 g, 75 % yield).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  : 13.08 (br, 1 H,  $\text{COOH}$ ), 8.64 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{H}$ ), 8.40 (s, 1 H,  $\text{CHCl}$ ), 7.11 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 3.19 (q, 4 H,  $J = 7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.02 (t, 6 H,  $J = 7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$  : 163.9, 157.4, 156.80, 155.7, 147.5, 140.9, 115.3, 111.0, 109.8, 91.8, 46.2 ( $\times 2$ ), 12.1 ( $\times 2$ ).

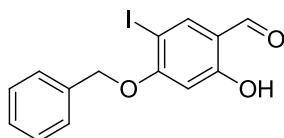
#### 4-(benzyloxy)-2-hydroxybenzaldehyde (71)



$$C_{14}H_{12}O_3 \text{ MW} = 228.08 \text{ g.mol}^{-1}$$

To a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (9 g, 65.16 mmol, 1 equiv.), in MeCN (660 mL) was added  $\text{NaHCO}_3$  (12.04 g, 143 mmol, 2.2 equiv.) and benzyl bromide (8.52 mL, 71.67 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred under reflux for 2 h. The crude was then extracted with EtOAc (3x 200 mL). The organic layer was concentrated *in vacuo* and purified by silica gel column chromatography (Cyclohexane/AcOEt 95:5 to 80:20). The pure product was obtained as a *white* solid (15 g, 50 % yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 11.44 (s, 1 H,  $\text{OH}$ ), 9.70 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 7.42 (d, 1 H,  $J = 8.9$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.39 (m, 5 H,  $\text{ArH}$ ), 6.60 (dd, 1 H,  $J = 2.2$  Hz, 8.5 Hz,  $\text{ArH}$ ), 6.5 (d, 1 H,  $J = 2.2$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 5.01 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 194.6, 166.1, 164.7, 135.9, 135.5, 129.0 ( $\times 2$ ), 128.6, 127.8 ( $\times 2$ ), 115.6, 109.2, 101.9, 70.6; HR-MS (ESI,  $m/z$ )  $[\text{M-H}]^-$ : calcd. for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3]^-$ , 227.0714, found 227.0706.

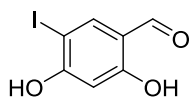
#### 4-(benzyloxy)-2-hydroxy-5-iodobenzaldehyde (70)



$$C_{14}H_{11}IO_3 \text{ MW} = 354.14 \text{ g.mol}^{-1}$$

A solution of iodine monochloride (1.7 g, 10.52 mmol), in glacial acetic acid (5.3 mL) was added dropwise to a solution of 4-(benzyloxy)-2-hydroxybenzaldehyde (2.0 g, 8.77 mmol), in glacial acetic acid (13 mL) with stirring. The mixture was allowed to stir at room temperature for 2 h then the resulting suspension was removed by filtration. The residue was dissolved with EtOAc, washed with a saturated  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  solution, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo* to give the title compound as a *white* solid (1.31 g, 60% yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 11.16 (br, 1 H,  $\text{OH}$ ), 9.97 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 8.03 (s, 1 H,  $\text{CHCl}$ ), 7.50 (d, 2 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.43 (t, 2 H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.36 (t, 2 H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 6.66 (s, 1 H,  $\text{CHCO}$ ), 5.25 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 189.4, 162.8, 162.2, 139.6, 135.7, 128.3 ( $\times 2$ ), 127.8, 127.0 ( $\times 2$ ), 118.1, 101.0, 75.0, 70.3; HR-MS (ESI,  $m/z$ )  $[\text{M-H}]^-$ : calcd. for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{IO}_3]^-$ , 352.9680, found 352.9687.

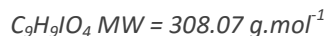
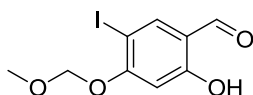
#### 2,4-dihydroxy-5-iodobenzaldehyde (68)



$$C_7H_5IO_3 \text{ MW} = 264.02 \text{ g.mol}^{-1}$$

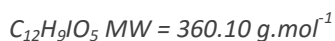
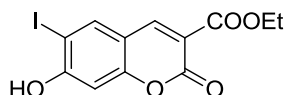
To a solution of 4-(benzyloxy)-2-hydroxy-5-iodobenzaldehyde (2.35 g, 6.63 mmol) in dry DCM (85 mL) was added dropwise a solution  $\text{BBr}_3$  (1.0 M in DCM, 20 mL, 20 mmol) at  $-78^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$ . The reaction mixture was stirred at this temperature for 2 h then warmed up  $0^\circ\text{C}$  (1 h), water was then added and the reaction mixture was stirred for another hour. The aq. layer was extracted with DCM; the combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was washed with cyclohexane to give the title compound as a *beige* solid (1.48 g, 86% yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 11.45 (br, 1 H,  $\text{OH}$ ), 10.88 (br, 1 H,  $\text{OH}$ ), 9.91 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 7.94 (s, 1 H,  $\text{CHCl}$ ), 6.52 (s, 1 H,  $\text{CHCO}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 188.7, 163.1, 162.5, 139.9, 117.6, 102.0, 74.0; HR-MS (ESI,  $m/z$ )  $[\text{M-H}]^-$ : calcd. for  $[\text{C}_7\text{H}_4\text{IO}_3]^-$ , 262.9211, found 262.9214.

### 2-hydroxy-5-iodo-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (244)



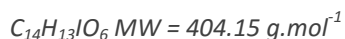
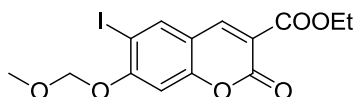
To an argon refluxed (3x) mixture of 2,4-dihydroxy-5-iodobenzaldehyde (3 g, 14.22 mmol, 1 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g, 14.7 mmol, 1.2 equiv.) was added acetone (60 mL), and chloro(methoxy)methane (1.1 mL, 13.65 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred under 25 °C for 16 h. Then acetone was removed and the solid was extracted with H<sub>2</sub>O/AcOEt. The product was obtained as a white solid after purification by silica gel column chromatography with [gradient from 9:1 to 7:3] Cyclohexane/AcOEt (2.63 g, 60% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  : 11.04 (s, 1 H, OH), 9.98 (s, 1 H, CHO), 7.99 (s, 1 H, CHCl), 6.69 (s, 1 H, CHCO), 5.31 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>O), 3.40 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$  : 189.2, 162.5, 160.9, 139.5, 119.0, 102.5, 94.6, 75.4, 56.1. HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup> : calcd. for [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>IO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 306.9473, found 306.9463.

### Ethyl 7-hydroxy-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (67)



Desired product was obtained as a *beige* solid (0.3 g, 15% yield) from 2,4-dihydroxy-5-iodobenzaldehyde (1.48 g, 5.6 mmol) according to General Procedure 1 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  : 11.95 (br, 1 H, OH), 8.63 (s, 1 H, CHCCOEt), 8.31 (s, 1 H, CHCl), 6.79 (s, 1 H, CHCOH), 4.25 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.27 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

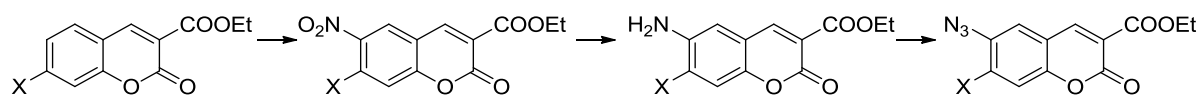
### ethyl 6-iodo-7-(methoxymethoxy)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (196)



Desired product was obtained as a *beige* solid (2.1 g, 80% yield) from 2-hydroxy-5-iodo-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (2.0 g, 6.49 mmol) according to General Procedure 1 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  : 8.67 (s, 1 H, CHCCOEt), 8.40 (s, 1 H, CHCl), 7.14 (s, 1 H, CHCOH), 5.43 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>O), 4.28 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.43 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$  : 162.5, 159.5, 156.3, 155.7, 147.7, 139.8, 114.6, 114.1, 101.5, 94.9, 82.6, 61.0, 56.3, 14.0 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>IO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 404.9830, found 404.9822.

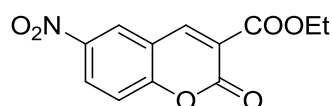
**I.4. 6-azido-7-substituted-Coumarin:**

The ethyl 6-azido-7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate were synthesized by a sequence of procedures shown below:





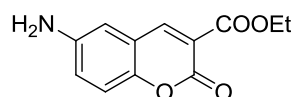
### Ethyl 6-nitro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (245)



$$C_{12}H_9NO_6 \text{ MW} = 263.20 \text{ g.mol}^{-1}$$

To a solution on coumarin (5 g, 22.9 mmol) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%, 9 mL) was added dropwise at room temperature a solution of nitric acid (70%, 9 mL). After 5 h, the reaction was quenched by addition of water then, the resulting suspension was removed by filtration. The residue was dried to give the title compound (4.44 g, 82% yield) as a *yellow* solid; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.92 (m, 2 H, CHCCO<sub>2</sub>Et, CHCNO<sub>2</sub>), 8.50 (dd, 1 H, *J* = 2.8 Hz, 9.1 Hz, CHCNO<sub>2</sub>), 7.65 (d, 1 H, *J* = 9.1 Hz, CHCO), 4.32 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.1, 158.0, 155.0, 147.6, 143.6, 128.5, 126.0, 119.5, 118.2, 117.7, 61.5, 14.0; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 264.0503, found 264.0507.

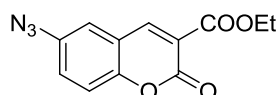
### Ethyl 6-amino-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (246)



$$C_{12}H_{11}NO_4 \text{ MW} = 233.22 \text{ g.mol}^{-1}$$

To a solution on coumarin (5 g, 22.9 mmol, 1 equiv.) in a mixture of H<sub>2</sub>O-EtOH (1:1, 80 mL) was added dropwise a suspension of NH<sub>4</sub>Cl (0.98 g, 18.3 mmol, 0.8 equiv.) and Fe<sup>(0)</sup> (7.13 g, 127 mmol, 6 equiv.). The reaction mixture was refluxed during 1 hour. After cooling, the resulting black suspension was filtered through a pad of celite® and washed with a solution of THF/EtOH. After evaporation *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with DCM/MeOH (9:1) to yield *yellow* oil (2.25 g, 60% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.54 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 7.15 (d, 1 H, *J* = 8.9 Hz, CH CO), 6.99 (dd, 1 H, *J* = 2.7, 8.9 Hz, CHCNH<sub>2</sub>), 6.89 (d, 1 H, *J* = 2.7 Hz, CHCNH<sub>2</sub>), 5.42 (br, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.27 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 163.0, 156.4, 148.5, 146.3, 145.7, 121.6, 118.1, 117.5, 116.5, 111.1, 61.0, 14.0; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 234.0761, found 264.0562.

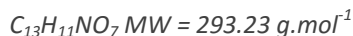
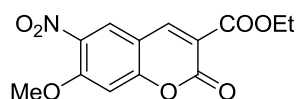
### Ethyl 6-azido-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (78)



$$C_{12}H_9N_3O_4 \text{ MW} = 259.22 \text{ g.mol}^{-1}$$

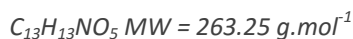
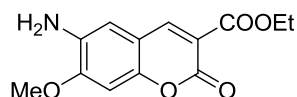
To a solution on coumarin (2.25 g, 9.65 mmol, 1 equiv.) in HCl 17% (30 mL) was added dropwise at 0 °C a solution of NaNO<sub>2</sub> (0.99 g, 14.48 mmol, 1.5 equiv.) in water (4.35 mL). The reaction mixture was stirred at this temperature for 30 minutes then a solution of NaN<sub>3</sub> (0.94 g, 14.48 mmol, 1.5 equiv.) in water (6.6 mL) was added dropwise. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for an additional 1 h. The resulting suspension was filtered then dried to yield *brown* solid (2.05 g, 82% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.73 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 7.15 (d, 1 H, *J* = 7.74 Hz, CH CN), 7.46 (m, 2 H, ArH), 4.30 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.4, 155.7, 151.7, 147.7, 136.0, 125.3, 119.4, 118.7, 118.6, 117.8, 61.3, 14.0; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>], 260.0666, found 260.0667.

### **Ethyl 7-methoxy-6-nitro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (247)**



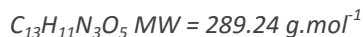
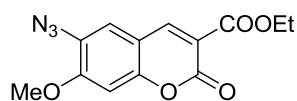
To a cooled mixture (0 °C) of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95% / Nitric acid 70% (1:1, 25.76 mL) was added over 30 minutes coumarin (8 g, 32.44 mmol) as solid. The reaction mixture was then stirred 2 h at room temperature then quenched by addition of water and the resulting suspension was removed by filtration. The residue was dried to give the title compound (6.94 g, 73% yield) as a *bronze* solid ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.80 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.64 (s, 1 H, CHCNO<sub>2</sub>), 7.44 (s, 1 H, CHCOMe), 4.29 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.03 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 162.2, 158, 5, 156.8, 155.3, 148.1, 136.2, 127.7, 115.9, 110.6, 101.8, 61.2, 57.9, 14.0 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 294.0608, found 294.0603.

### **ethyl 6-amino-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (191)**



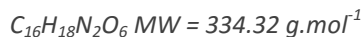
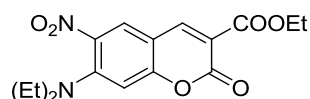
To a solution on coumarin (2.6 g, 8.85 mmol, 1 equiv.) in a mixture of H<sub>2</sub>O-EtOH (1:1, 26 mL) was added dropwise a suspension of NH<sub>4</sub>Cl (0.54 g, 10.18 mmol, 1.2 equiv.) and Fe<sup>(0)</sup> (3.95 g, 70 mmol, 8 equiv.). The reaction mixture was refluxed during 1 hour. After cooling, the resulting black suspension was filtered through a pad of celite® and washed with a solution of THF/EtOH. After evaporation *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with DCM/MeOH (9:1) to yield *yellow* oil (1 g, 42% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.38 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 6.77 (s, 1 H, CHCNO<sub>2</sub>), 6.74 (s, 1 H, CHCOMe), 4.32 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.34 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> : 164.1, 157.9, 153.8, 151.1, 149.0, 134.4, 114.5, 111.7, 111.3, 98.7, 61.8, 56.5, 14.5. HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 264.0866, found 264.0861.

### **Ethyl 6-azido-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (77)**



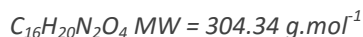
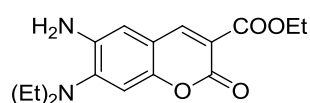
To a solution on coumarin (1 g, 3.80 mmol, 1 equiv.) in HCl 17% (10 mL) was added dropwise at 0 °C a solution of NaNO<sub>2</sub> (0.39 g, 5.70 mmol, 1.5 equiv.) in water (1.31 mL). The reaction mixture was stirred at this temperature for 30 minutes then a solution of NaN<sub>3</sub> (0.37 g, 5.79 mmol, 1.5 equiv.) in water (2.6 mL) was added dropwise. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for an additional 1 h. The resulting suspension was filtered then dried to yield *bronze* solid (0.65 g, 60% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.70 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 7.68 (s, 1 H, CH CN), 7.21 (s, 1 H, CHCOMe), 4.27 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.96 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 162.5, 157.0, 155.9, 154.0, 148.3, 125.1, 120.4, 114.2, 111.1, 100.3, 60.9, 57.9, 57.0, 14.0.

### Ethyl 7-(diethylamino)-6-nitro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (248)



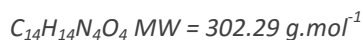
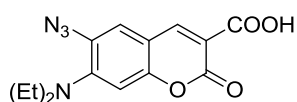
Desired product was obtained as a *yellow* solid (2.2 g, 60% yield) from 4-(diethylamino)-2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde (1.11 g, 4.66 mmol) according to General Procedure 1;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.68 (s, 1 H,  $\text{CHCCO}_2\text{Et}$ ), 8.40 (s, 1 H,  $\text{CHCNO}_2$ ), 7.06 (s, 1 H,  $\text{CHCOMe}$ ), 4.26 (q, 2 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.30 (q, 4 H,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.29 (t, 3 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.11 (t, 6 H,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 162.7, 157.6, 155.9, 148.6, 147.5, 136.9, 129.6, 113.2, 108.2, 108.3, 104.3, 61.1, 45.9 ( $\times 2$ ), 14.2, 12.2 ( $\times 2$ ); HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calcd. for  $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4]^+$ , 335.1238, found 335.1242.

### Ethyl 6-amino-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (179)



To a solution on coumarin (2.2 g, 6.58 mmol, 1 equiv.) in a mixture of  $\text{H}_2\text{O}$ -EtOH (1:1, 20 mL) was added dropwise a suspension of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.4 g, 7.57 mmol, 1.2 equiv.) and  $\text{Fe}^{(0)}$  (2.93 g, 52.67 mmol, 8 equiv.). The reaction mixture was refluxed during 1 hour. After cooling, the resulting black suspension was filtered through a pad of celite® and washed with a solution of THF/EtOH. After evaporation *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with Cyclohexane/EtOAc (8:2 to 6:4) to yield *brown* solid (1.17 g, 54% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.50 (s, 1 H,  $\text{CHCCO}_2\text{Et}$ ), 6.97 (s, 1 H,  $\text{CHCNH}_2$ ), 6.93 (s, 1 H,  $\text{CHCO}$ ), 4.87 (s, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 4.25 (q, 2 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.09 (q, 4 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.29 (t, 3 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.97 (t, 6 H,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 163.2, 156.8, 148.5, 148.3, 144.6, 140.7, 113.8, 112.9, 111.4, 108.0, 60.8, 44.2 ( $\times 2$ ), 14.1, 12.0 ( $\times 2$ ); HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calcd. for  $[\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4]^+$ , 305.1496, found 305.1499.

### 6-azido-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (79)

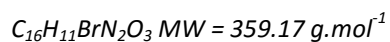
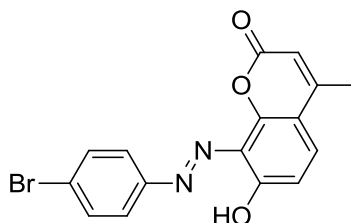


To a solution on coumarin (1.40 g, 4.60 mmol, 1 equiv.) in HCl 17% (12 mL) was added dropwise at 0 °C a solution of  $\text{NaNO}_2$  (0.476 g, 6.90 mmol, 1.5 equiv.) in water (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at this temperature for 30 minutes then a solution of  $\text{NaN}_3$  (0.448 g, 6.90 mmol, 1.5 equiv.) in water (2.14 mL) was added dropwise. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for an additional 1 h. The resulting suspension was filtered then dried to yield *brown* solid (0.3 g, 22% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.66 (s, 1 H,  $\text{CHCCO}_2\text{Et}$ ), 7.71 (s, 1 H,  $\text{CHCN}$ ), 6.86 (s, 1 H,  $\text{CHCO}$ ), 3.39 (q, 4 H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.97 (t, 6 H,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ); HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calcd. for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4]^+$ , 305.1496, found 305.1499.

**I. Aryldiazenyl coumarins**

## II.1. Diazényl-4-methyl-coumarin

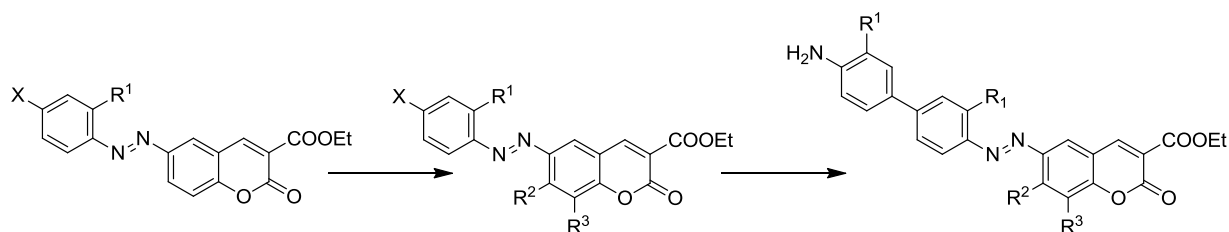
### (E)-8-((4-bromophenyl)diazényl)-7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one (149)



4-Bromoaniline (0.808 g, 4.70 mmol, 1 equiv.),  $\text{NaNO}_2$  (0.37 g, 6.27 mmol, 1.2 equiv.), and 7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one (0.83 g, 4.70 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. The crude reaction was filtered then purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:3) to get the desired product as a *barm red* solid (0.28 g, 17% yield)<sup>125a</sup>;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 13.21 (s, 1 H, OH), 7.97 (dd,  $J = 2 \text{ Hz}$ ,  $J = 7 \text{ Hz}$ , 2 H, ArH), 7.86 (m, 3 H, ArH), 7.05 (d,  $J = 9.5 \text{ Hz}$ , 1 H, CHCOH), 6.35 (d,  $J = 1 \text{ Hz}$ , 1 H, CHCCH<sub>3</sub>), 2.46 (d,  $J = 1 \text{ Hz}$ , 3 H, CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 159.3, 154.8, 153.6, 152.0, 149.3, 132.8 (×2), 130.7, 125.5, 125.3, 124.3 (×2), 114.3, 112.8, 111.4, 18.9.

## II.2. Synthesis of ethyl 7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acids:

The Ethyl (E)-ethyl 6-((4'-aminobiphenyl-4-yl)diazenyl)-7-substituted-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate were synthesized by a sequence of procedures shown below:



### General Procedure 3: Azo bond formation <sup>125a, 183, 202</sup>

To a cool (0 °C) suspension of corresponding aniline (1 mmol, 1 equiv.) in 1:1 HCL 12N/EtOH (3 mL) was added dropwise an aqueous solution of NaNO<sub>2</sub> (1.2 mmol, 1.2 equiv., 1 M). After 1h stirring at this temperature, the mixture was added dropwise to a cool (0 °C) basic (pH = 8 - 9) solution of corresponding 2-hydroxybenzaldehyde (1 mmol, 1 equiv.) in 1:1 H<sub>2</sub>O/EtOH (10 mL). The mixture was stirred for 2 h at 0 °C. The pH was kept on 8 - 9 with a 10% NaOH aq solution. Purification was done according to the specific case to yield the final pure product.

### General Procedure 4: Knoevenagel condensation <sup>152, 201</sup>

To a solution of corresponding 2-hydroxy-phenyldiazenyl-benzaldehyde (1 mmol, 1 equiv.) in absolute ethanol (8 mL) was added diethyl malonate (1.2 mmol, 1.2 equiv.) and piperidine (0.4 mmol, 40 mol%). The mixture was refluxed for 6 h. The crude reaction was then allowed to attain room temperature and get purified according to specific case.

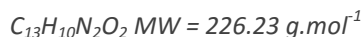
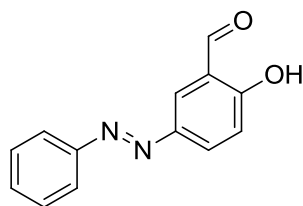
### General Procedure 5: Suzuki coupling

An argon flushed (3x) mixture of 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (1 mmol, 1 equiv.), phenyl-diazenyl-coumarin derivative (2.2 mmol, 2.2 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 mmol, 5 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (0.2 mmol, 0.2 equiv.) was taken in 2:1 Toluene/H<sub>2</sub>O (23 mL). The mixture was purged for 15 minutes. Then Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (10% mmol, 0.1 equiv.) was added. The mixture was stirred at 80 °C for 36 h. Final pure compound was obtained after purification according to the specific case.

### General Procedure 6: Ester hydrolysis

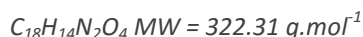
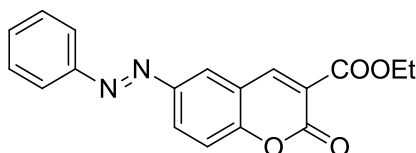
To a solution of corresponding ethyl-2-oxo-(phenyldiazenyl)-chromene-3-carboxylate (1 mmol, 1 equiv.) in 1:1 Toluene/KOH aq 30%, or 1:1 MeOH/KOH aq 30% (20 mL). The mixture was stirred for overnight at 25 °C. Then concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc 95% was added to precipitate the product. The solid was filtered and washed with Et<sub>2</sub>O to obtain the final desired compound in indicated yield.

**(E)-2-hydroxy-5-(phenyldiazenyl)benzaldehyde (156)**



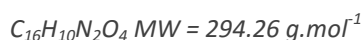
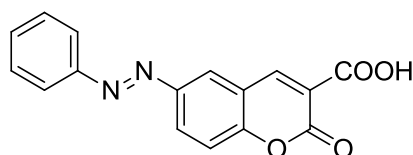
Chlorhydrate aniline (0.52 g, 4 mmol, 1 equiv.), NaNO<sub>2</sub> (0.335 g, 4.8 mmol, 1.2 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (12 mL), 2-hydroxybenzaldehyde (0.42 mL, 4 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. The crude reaction was then filtrated. The solid was washed with Et2O. After ethanol removal, the filtrate was undergone an acid extraction with 3x100 mL ethyl acetate and 1 M chlorhydric acid solution. The pure product was getting after purification by silica gel column chromatography with 9:1 cyclohexane/ethyl as an *Aztec gold* solid (0.22 g, 24% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 11.30 (s, 1 H, OH), 10.02 (s, 1 H, CHO), 8.19 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 8.17 (dd, J = 2.5 Hz, 9 Hz, 1 H, ArH), 7.46 (dd, J = 1 Hz, 8 Hz, 1 H, ArH), 7.49 (m, 3 H, ArH), 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 196.8, 164.0, 152.6, 146.2, 131.3, 130.9, 129.5, 129.4 (×2), 123.0 (×2), 120.6, 118.8.

**(E)-ethyl 2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (165)**



156, (E)-2-hydroxy-5-(phenyldiazenyl)benzaldehyde (0.226 g, 1 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (0.168 mL, 1 mmol, 1 equiv.) and piperidine (40 μL, 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 8 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion ethanol was removed. Then an acid extraction with ethyl acetate (3 x 100 mL) and 1 M chlorhydric acid solution was done followed by a silica gel column chromatography with Cyclohexane/ethyl acetate [gradient from 9:1 to 1:1]. Pure compound was obtained as a *banana-yellow* solid (0.14 g, 62% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.94 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.50 (d, J = 2 Hz, 1 H, ArH), 8.22 (dd, J = 2 Hz, 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.91 (dd, J = 0.5 Hz, 8 Hz, 2 H, ArH), 7.63 (m, 4 H, ArH), 4.32 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.33 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.4, 156.1, 155.6, 151.7, 148.5, 148.3, 131.9, 129.6 (×2), 127.0, 125.4, 122.7 (×2), 118.6, 118.5, 117.6, 61.4, 14.1; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 323.1026, found 323.1032.

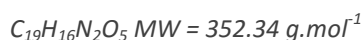
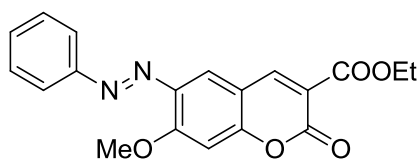
**(E)-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-4126)**



Desired product was obtained as an *amber* solid (38 mg, 76% yield) from A111-I, (E)-ethyl 2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (50 mg, 0.17 mmol) in 1:1 Toluene/KOHaq 30% according to General Procedure 6; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO + A few drops of DCl) δ<sub>H</sub>: 8.85 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.43 (s, 1 H, ArH), 8.116 (s, 1 H, ArH), 7.86 (s, 2 H, ArH), 7.58 (m, 4 H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO + A few drops of

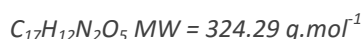
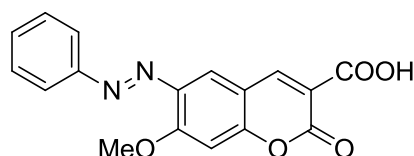
DCI)  $\delta_c$  : 164.1, 156.8, 156.5, 152.2; 148.8, 148.7, 132.4, 130.1 ( $\times 2$ ), 127.2, 126.0, 123.1 ( $\times 2$ ); 119.6, 119.0, 118.1 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[M+H]^+$  : calcd. for  $[C_{18}H_{11}N_2O_4]^+$ , 295.0713, found 295.0720.

**(E)-ethyl 7-methoxy-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (250)**



Chlorhydrate aniline (1.296 g, 10 mmol, 1 equiv.), NaNO<sub>2</sub> (0.759 g, 11 mmol, 1.1 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (30 mL), 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (1.522 g, 10 mmol, 1 equiv.), was taken according to General Procedure 3. The crude reaction was then filtrated. The residue was washed with Et<sub>2</sub>O. The filtrate was concentrated *in vacuo* then extracted with ethyl acetate (3x100 mL) and 1 M HCl solution. The pure product (E)-2-hydroxy-4-methoxy-5-(phenyldiazenyl)benzaldehyde was got after silica gel column chromatography with 7:3 cyclohexane/ethyl acetate as a *bronze powder* (0.69 g). (0.213 g, 0.83 mmol, 1 equiv.) of this intermediate was then taken in diethyl malonate (0.128 mL, 1 mmol, 1.2 equiv.), piperidine (34  $\mu$ L, 0.33 mmol, 40 mol%) and 6 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. Ethanol was removed at the completion. Then an acid extraction with of EtOAc (3 x 100 mL) and 1 M HCl aqueous solution was done followed by a silica gel column chromatography with 7:3 Cyclohexane/ethyl acetate. Pure compound was obtained as a *bronze powder* in (96 mg, 33% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ : 8.56 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 7.90 (dd, *J* = 1.5 Hz, 8 Hz, 2 H, ArH), 7.87 (s, 1 H, ArH), 7.50 (m, 3 H, ArH), 6.98 (s, 1 H, ArH), 4.39 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.09 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.39 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_c$ : 163.2, 162.2, 158.9, 156.7, 153.1, 149.5, 140.2, 131.8, 129.4, 129.0, 123.4, 119.8, 117.5, 115.8, 111.4, 100.4, 62.1, 57.2, 14.5 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[M+H]^+$  : calcd. for calcd. for  $[C_{19}H_{17}N_2O_5]^+$ , 353.1132, found 353.1127.

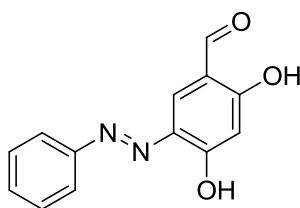
**(E)-7-methoxy-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-4108)**



Desired product was obtained as a *bronze solid* (33 mg, 92% yield) from A111-II, (E)-ethyl 7-methoxy-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (36 mg, 0.1 mmol) in 1:1 Toluene/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  : 8.81 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.06 (s, 1 H, ArH), 7.86 (dd, *J* = 2 Hz, 8 Hz, 2 H, ArH), 7.60 (m, 3 H, ArH), 7.37 (s, 1 H, ArH), 4.09 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_c$  : 163.9, 161.2, 158.2, 156.5, 152.3, 149.1, 139.1, 131.6, 129.5 ( $\times 2$ ), 122.6 ( $\times 2$ ), 117.4, 115.6, 111.1, 100.7, 57.1 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[M+H]^+$  : calcd. for  $[C_{17}H_{13}N_2O_4]^+$ , 325.0819, found 325.0820.



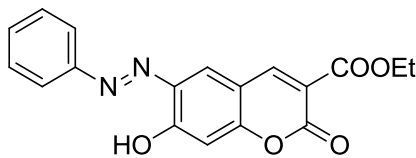
**(E)-2,4-dihydroxy-5-(phenyldiazenyl)benzaldehyde (164)**



$$C_{13}H_{10}N_2O_3 \text{ MW} = 242.23 \text{ g.mol}^{-1}$$

Chlorhydrate aniline (1.296 g, 10 mmol, 1 equiv.),  $\text{NaNO}_2$  (0.75 g, 12 mmol, 1.2 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (30 mL), 2, 4-dihydroxybenzaldehyde (1.381 g, 10 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. The crude reaction was then filtrated; the solid washed with  $\text{Et}_2\text{O}$ , the filtrate concentrated *in vacuo* then extracted with EtOAc (3 x 200 mL) and 1 M chlorhydric acid aqueous solution. The pure product was get after silica gel column chromatography with Cyclohexane / ethyl acetate [gradient from (9:1) to (1:1)] as a *bronze* powder (0.69 g, 28% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 14.1 (s, 1 H, OH), 11.6 (s, 1 H, OH), 9.8 (s, 1 H, CHO), 8.2 (s, 1 H, CHCHO), 7.8 (dd,  $J = 1.5$  Hz, 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.5 (m, 3 H, ArH), 6.5 (s, 1 H, CHCOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 194.5, 166.0, 162.3, 150.1, 141.1, 132.6, 131.6, 129.7 (x2), 122.3 (x2), 115.8, 105.2; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calcd. for  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2]^+$ , 241.0619, found 241.0610.

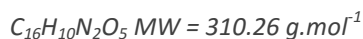
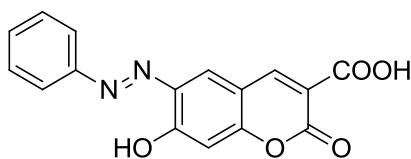
**(E)-ethyl 7-hydroxy-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (174)**



$$C_{18}H_{14}N_2O_5 \text{ MW} = 338.31 \text{ g.mol}^{-1}$$

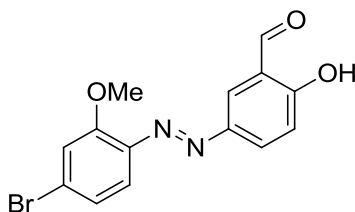
To an argon fluxed (3x) mixture of 164, (E)-2,4-dihydroxy-5-(phenyldiazenyl)benzaldehyde (0.32 g, 1 mmol, 1 equiv.) with  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.151 mL, 1.2 mmol, 1.2 equiv.) in 20 mL of DCM was added benzoic anhydride (0.272 g, 1.2 mmol, 1.2 equiv.). After an overnight stirring at 25 °C, the crude reaction was extracted with 3 x 100 mL of DCM and 1 M chlorhydric acid solution to get a *bronze* powder A mixture of beginning reactant and desired product was obtained (conversion rate = 63%). The mixture was directly engaged into the next step without further more purification; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : calcd. for  $[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4]^-$ , 345.0881, found 345.0877. This intermediate (0.2 g, 0.58 mmol, 1 equiv.) was then taken in diethyl malonate (0.36 mL, 2.3 mmol, 4 equiv.), piperidine (95  $\mu\text{L}$ , 0.93 mmol, 1.6 equiv.) and absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion, the crude reaction was concentrated *in vacuo*. Then an acid extraction with 3 x 100 mL of ethyl acetate and 1 M chlorhydric acid solution was done followed by silica gel column chromatography with 7:3 Cyclohexane/ethyl acetate. Pure compound was obtained as a *bronze* solid (0.11 g, 89% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 12.01 (s, 1 H, OH), 8.85 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.25 (s, 1 H, ArH), 7.99 (dd,  $J = 1.5$  Hz, 8 Hz, 2 H, ArH), 7.61 (m, 3 H, ArH), 7.04 (s, 1 H, CHCOH), 4.28 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 162.6, 160.7, 158.0, 155.8, 155.6, 149.6, 137.0, 131.7, 129.5 (x2), 122.8 (x2), 122.4, 114.2, 111.0, 104.0, 61.0, 14.1.

**(E)-7-hydroxy-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-4153)**



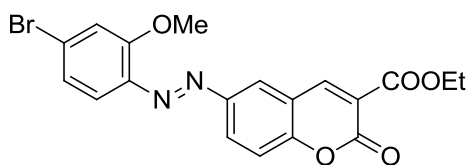
Desired product was obtained as a *bronze* solid (38 mg, 31% yield) from 174, (E)-ethyl 7-hydroxy-2-oxo-6-(phenyldiazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (21 mg, 0.06 mmol) in 1:1 Toluene/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 12.02 (s, 1 H, OH), 8.81 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.24 (s, 1 H, ArH), 7.99 (m, 2 H, ArH), 7.61 (m, 3 H, ArH), 7.04 (s, 1 H, CHCOH) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 163.9, 160.4, 158.0, 156.5, 151.6, 149.3, 137.0, 131.7 (×2), 129.5, 122.8 (×2), 122.5, 114.9, 111.2, 104.1 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 311.0662, found 311.0665.

**(E)-5-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2-hydroxybenzaldehyde (158)**



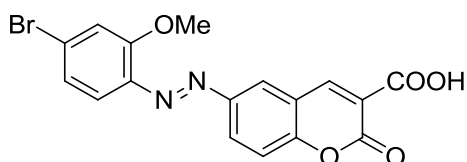
4-bromo-2-methoxy-aniline (0.404 g, 2 mmol, 1 equiv.), NaNO<sub>2</sub> (0.15 g, 2.2 mmol, 1.1 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (6 mL), 2-hydroxybenzaldehyde (0.21 mL, 2 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. Then the crude reaction was allowed to precipitate. The solid was filtrated and washed by cool ethanol and ether. Then a trituration was done with cyclohexane/pentane/dichloromethane to get pure product as an *amber* solid (0.57 g, 63% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> : 11.30 (s, 1 H, OH), 10.00 (s, 1 H, CHO), 8.16 (m, 1 H, ArH), 8.56 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.23 (d, *J* = 3 Hz, 1 H, ArH), 7.16 (dd, *J* = 2 Hz, 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 4.01 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> : 196.8, 164.0, 157.5, 146.6, 141.1, 131.5, 129.3, 126.7, 124.3, 118.8, 118.3, 116.5, 56.8 ; HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup> : calcd. for [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 332.9880, found 332.9872.

**(E)-ethyl 6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (167)**



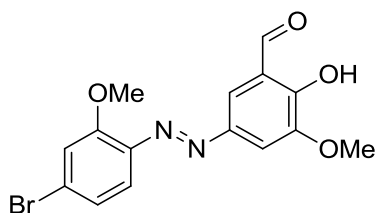
158, (E)-5-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2-hydroxybenzaldehyde (0.416 g, 1.24 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (0.19 mL, 1.24 mmol, 1 equiv.) and piperidine (50  $\mu$ L, 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 9 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion, the crude reaction was concentrated *in vacuo*. Then an acid extraction in toluene (3 x 50 mL) with 2:1 water/acetic acid was done to get the final pure product as an *amber* solid (0.323 g, 60% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  : 8.60 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.20 (dd, 1 H,  $J$  = 2 Hz, 8.5 Hz, ArH), 8.13 (d, 1 H,  $J$  = 2.5, ArH), 7.57 (d, 1 H,  $J$  = 8 Hz, ArH), 7.45 (d, 1 H,  $J$  = 8.5 Hz, ArH), 7.25 (d, 1 H,  $J$  = 1.5 Hz, ArH), 7.16 (dd, 1 H,  $J$  = 2 Hz, 8.5 Hz, ArH), 4.42 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.02 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.40 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  : 163.0, 157.9, 156.6, 156.4, 149.8, 148.6, 140.9, 128.7, 127.6, 124.4, 124.3, 119.3, 119.4, 118.4, 118.2, 117.9, 116.7, 62.4, 58.8, 14.5 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 431.0237, found 431.0230.

**(E)-6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-3161)**



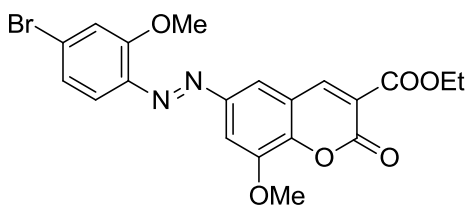
Desired product was obtained as a *amber* solid (26 mg, 46% yield) from C111-I, (E)-ethyl 6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2H-chromene-3-carboxylate (60 mg, 0.14 mmol) 1:1 MeOH/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + a few drops of DCl)  $\delta_H$ : 8.82 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.35 (s, 1 H, ArH), 8.07 (dd,  $J$  = 2.5 Hz, 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.55 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.44 (m, 2 H, ArH), 7.22 (dd,  $J$  = 1.5 Hz, 8 Hz, 1 H, ArH), 3.92 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 402.9924, found 404.9904.

**(E)-5-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (160)**



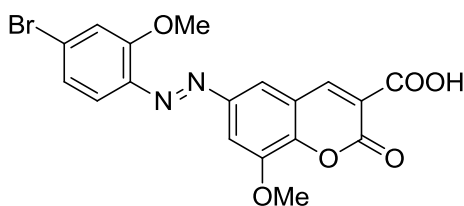
4-bromo-2-methoxy-aniline (0.404 g, 2 mmol, 1 equiv.),  $\text{NaNO}_2$  (0.15 g, 2.2 mmol, 1.1 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (6 mL), 2-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (0.304 g, 2 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. Then the crude reaction was allowed to precipitate. The solid was filtrated and washed by cool ethanol and ether to get the final pure product as a *dark goldenrod* powder (0.38g, 52% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_H$ : 8.84 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 8.04 (d, 1 H,  $J = 1.5 \text{ Hz}$ , ArH), 7.72 (d, 1 H,  $J = 2 \text{ Hz}$ , ArH), 7.53 (d, 1 H,  $J = 2 \text{ Hz}$ , ArH), 7.48 (d, 1 H,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , ArH), 7.27 (dd, 1 H,  $J = 2 \text{ Hz}$ , 8.5 Hz, ArH), 4.01 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.01 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125.78 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_C$ : 163.8, 157.2, 155.3, 148.5, 147.2, 145.8, 140.3, 126.4, 123.7, 118.7, 118.1, 118.0, 116.8, 106.8, 56.6, 56.3; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M-H}]^-$ : calcd. for  $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}_4]^-$ , 362.9986, found 362.9990.

**(E)-ethyl 6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-8-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (171)**



C112-IV, (E)-5-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (0.38 g, 1.04 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (159 mL, 1.04 mmol, 1 equiv.) and piperidine (42  $\mu\text{L}$ , 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 8 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion, the crude reaction was concentrated *in vacuo*. Then an acid extraction in toluene (3 x 100 mL) with 2:1 water/acetic acid was done to get the final pure product as a *bronze* solid (0.22g, 45% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_H$ : 8.92 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{Et}$ ), 8.06 (d,  $J = 2 \text{ Hz}$ , 1 H, ArH), 7.75 (d,  $J = 2 \text{ Hz}$ , 1 H, ArH), 7.54 (d,  $J = 2 \text{ Hz}$ , 1 H, ArH), 7.49 (d,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , 1 H, ArH), 7.28 (dd,  $J = 2 \text{ Hz}$ , 8.5 Hz, 1 H, ArH), 4.32 (q, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.02 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.01 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.33 (t, 3 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (62.9 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_C$ : 162.4, 157.3, 155.3, 148.8, 148.6, 147.2, 146.0, 140.3, 126.4, 123.7, 118.7, 118.5, 118.0, 117.9, 116.8, 107.5, 61.4, 56.7, 56.4, 14.1.

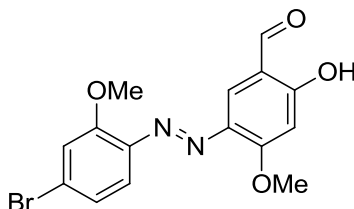
**(E)-6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-8-methoxy-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-3163)**



$$C_{18}H_{13}BrN_2O_6 \text{ MW} = 433,21 \text{ g.mol}^{-1}$$

Desired product was obtained as an *alloy orange* (43 mg, 59% yield) solid from C111-IV, (E)-ethyl 6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-8-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (77 mg, 0.17 mmol) in 1:1 MeOH/(KOH aq 30%) according to General Procedure 6;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.84 (s, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), 8.04 (d,  $J = 2$  Hz, 1 H, ArH), 7.72 (d,  $J = 2$  Hz, 1 H, ArH), 7.53 (d,  $J = 2$  Hz, 1 H, ArH), 7.49 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, ArH), 7.27 (dd,  $J = 2$  Hz, 8.5 Hz, 1 H, ArH), 4.01 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 163.8, 157.2, 155.8, 148.5, 147.9, 147.2, 145.8, 140.3, 126.4, 123.7, 118.7, 118.1, 118.0, 116.8, 106.8, 56.5, 56.3; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calcd. for  $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_6]^+$ , 433.0030, found 433.0207.

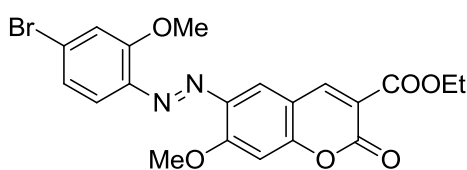
**(E)-5-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (162)**



$$C_{15}H_{13}BrN_2O_4 \text{ MW} = 365.18 \text{ g.mol}^{-1}$$

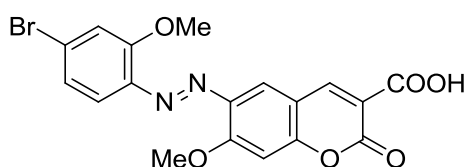
4-bromo-2-methoxy-aniline (0.808 g, 4 mmol, 1 equiv.),  $\text{NaNO}_2$  (0.307 g, 4.4 mmol, 1.1 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (12 mL), 2-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde (0.608 g, 4 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. Then the crude reaction was allowed to precipitate. The solid was filtrated and washed by cool ethanol and ether to get the desired pure product as a *barn red* solid in (0.98 g, 67% yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 11.57 (s, 1 H, OH), 10.17 (s, 1 H, CHO), 7.87 (s, 1 H, ArH), 7.48 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1 H, ArH), 7.36 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, ArH), 7.23 (dd,  $J = 1.5$  Hz, 8.5 Hz, 1 H, ArH), 6.76 (s, 1 H,  $\text{CHCOCH}_3$ ), 4.01 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.99 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 162.5, 161.4, 158.3, 157.3, 155.8, 149.6, 140.9, 139.5, 136.2, 123.7, 118.1, 117.6, 116.7, 114.8, 111.0, 100.7, 61.0, 57.1, 56.6, 14.0; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : calcd. for  $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}_4]^-$ , 362.9986, found 362.9985.

**(E)-ethyl 6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (169)**



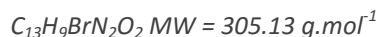
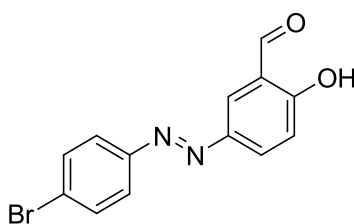
C112-II, (E)-5-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (0.727 g, 1.99 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (0.31 mL, 1.04 mmol, 1 equiv.) and piperidine (80  $\mu$ L, 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 15 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion the mixture was concentrated *in vacuo*. Then the mixture was allowed to precipitate in AcOEt/pentane. The solid was filtrated and was with a few Et<sub>2</sub>O to get the final pure product as *barn red* solid (0.55g, 60% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  : 8.54 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 7.82 (s, 1 H, ArH), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.23 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H, ArH), 7.14 (dd, *J* = 1.5 Hz, 8.5 Hz, 1 H, ArH), 6.96 (s, 1 H, ArH), 4.38 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.08 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.02 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.38 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$ : 163.2, 162.0, 158.9, 157.7, 156.6, 149.5, 141.6, 140.7, 127.4, 124.4, 118.7, 117.8, 116.5, 115.8, 111.4, 100.3, 62.1, 57.2, 56.8, 14.5 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 461.0343, found 461.0337.

**(E)-6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP-4150)**



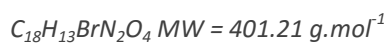
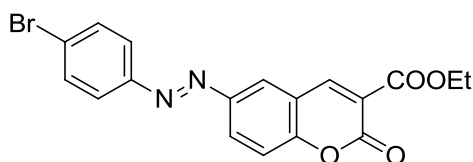
Desired product was obtained as a *barn red* solid (8 mg, 9 % yield) from C111-II, (E)-ethyl 6-((4-bromo-2-methoxyphenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (0.1 g, 0.22 mmol) in 1:1 MeOH/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6. The product was purified by silica gel chromatography using a 6:4:0.5% mixture of DCM-AcOEt-AcOH ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  : 9.00 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 7.88 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 7.82 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 7.57 (d, 1 H, *J* = 9 Hz, ArH), 7.27 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 7.17 (dd, 1 H, *J* = 2 Hz, 9 Hz, ArH), 4.09 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.03 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$ : 163.5, 162.2, 158.0, 151.9, 150.4, 148.5, 145.8, 140.8, 128.1, 124.4, 119.2, 118.5, 118.3, 116.7, 116.0, 109.1, 57.0, 56.8 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na]<sup>+</sup>, 454.9849, found 456.9847.

**(E)-5-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-hydroxybenzaldehyde (157)**



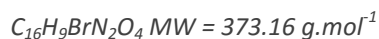
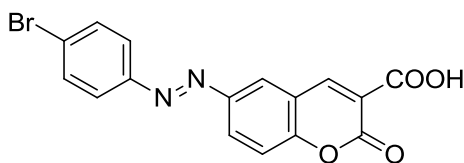
4-Bromoaniline (1.72 g, 10 mmol, 1 equiv.), NaNO<sub>2</sub> (0.85 g, 12 mmol, 1.2 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (30 mL), 2-hydroxybenzaldehyde (1.04 mL, 10 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. At the completion, the mixture was allowed to precipitate. The residue was filtrated and washed with cool ethanol and ether to get the desired pure product as an *earth-yellow* solid (3.04 g, 99% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> : 11.33 (s, 1 H, OH), 10.02 (s, 1 H, CHO), 8.19 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 8.16 (dd, J = 2.5 Hz, 9 Hz, 1 H, ArH), 7.76 (d, J = 9 Hz 2 H, ArH), 7.63 (d, J = 9 Hz 2 H, ArH), 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArH) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> : 196.7, 164.2, 161.3, 146.0, 132.6 (×2), 130.9, 129.8, 125.7 (×2), 124.5 (×2), 120.6, 118.9.

**(E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (166)**



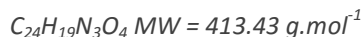
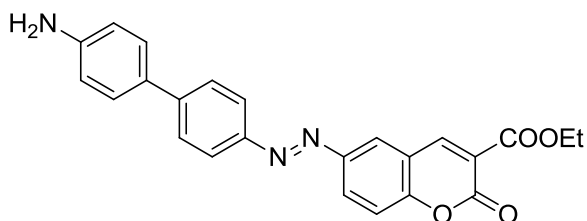
157, (E)-5-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-hydroxybenzaldehyde (3.3 g, 10 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (1.53 mL, 12 mmol, 1.2 equiv.) and piperidine (0.4mL, 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 77 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. The crude reaction was then filtrated. The residue was washed with cool ethanol and Et<sub>2</sub>O. The filtrate was concentrated *in vacuo* then extracted with ethyl acetate (3 x 200 mL) and 1 M chlorhydric acid solution. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo*. The final pure product was get as *camel* powder after silica gel column chromatography with 8:2 Cyclohexane / ethyl acetate (2.57 g, 56% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.60 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 8.21 (dd, J = 2.5 Hz, 6.5 Hz, 1 H, ArH), 8.16 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 7.79 (d, J = 9 Hz, 2 H, ArH), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2 H, ArH), 7.46 (d, J = 9 Hz, 1 H, ArH), 4.42 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.41 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 163.0, 156.8, 156.3, 151.2, 149.2, 148.5, 132.7 (×2), 128.2, 126.5, 124.8, 124.7 (×2), 119.5, 118.4, 118.0, 62.4, 14.5 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 401.0131, found 403.0106

**(E)-6-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-3160)**



Desired product was obtained as an *amber* solid (54 mg, 98% yield) from B111-I, (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (56 mg, 0.16 mmol) in 1:1 toluene/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO + A few drops of DCl)  $\delta_H$  : 8.95 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>H), 8.55 (d, *J* = 5 Hz, 1 H, ArH), 8.27 (m, 2 H, ArH), 7.91 (m, 4 H, ArH), 7.68 (d, *j* = 9 Hz, 1 H, ArH) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO + A few drops of DCl)  $\delta_C$  : 163.6, 156.2, 156.1, 150.6, 148.1, 148.1, 132.6 (×2), 126.7, 125.7, 125.3, 124.5 (×2), 119.2, 118.5, 117.6 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na]<sup>+</sup>, 394.9638, found 291.0657.

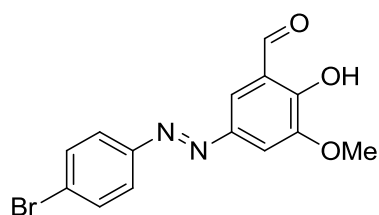
**(E)-ethyl 6-((4'-aminobiphenyl-4-yl)diazenyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (223)**



An argon flushed (3x) mixture of 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (0.223 g, 1equiv., 0.48 mmol) , (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.46 g, 1.06 mmol, 2.2 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.334 g, 2.45 mmol, 5 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (31 mg, 0.01 mmol, 0,2 equiv.) , Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (56 mg, 10 mol%, 0.05 mmol) was taken in 2:1 toluene/water under reflux for 30 h according to General Procedure 5. At the completion a basic extraction with 3 x 100 mL of ethyl acetate and 1 M KOHq solution was done. Purification was done by silica gel column chromatography cyclohexane/ethyl acetate/Et<sub>3</sub>N [gradient from 70:30:0.1 to 50:50:0.1]. The pure product was get as *dark sienna* powder (80 mg, 40% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  : 8.62 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 8.23 (dd, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz, 1 H, ArH), 8.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 7.96 (dd, *J* = 2 Hz, 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.69 (dd, *J* = 2 Hz, 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.49 (m, 3 H, ArH), 6.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 4.43 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.42 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$  : 158.5; 150.9; 149.6; 148.7; 144.8; 128.4 (×2); 128.3, 127.0 (×2), 124.4, 123.9 (×2); 118.4, 117.9, 115.6 (×2), 62.4, 35.7, 25.1, 14.5 ; HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup> : calcd. for [C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 412.1303, found 412.1309.

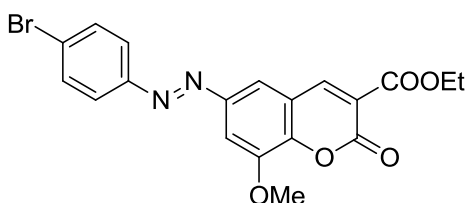


**(E)-5-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (159)**



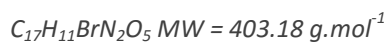
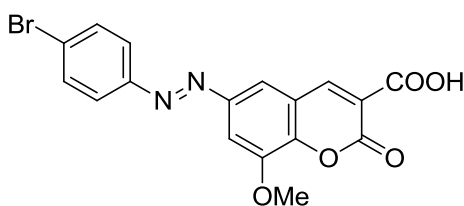
4-Bromoaniline (0.172 g, 10 mmol, 1 equiv.), NaNO<sub>2</sub> (0.75 g, 11 mmol, 1.1 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (30 mL), 2-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (0.152 g, 10 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. Then the crude reaction was allowed to precipitate. The solid was filtrated and washed with cool ethanol and ether to get the pure product as a *bronze* solid in (3.04 g, 94% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 11.65 (s, 1 H, OH), 9.82 (s, 1 H, CHO), 7.96 (s, 1 H, ArH), 7.74 (dd, J = 2 Hz, 7 Hz, 2 H, ArH), 7.62 (dd, J = 2 Hz, 7 Hz, 2 H, ArH), 6.60 (s, 1 H, CHCOCH<sub>3</sub>), 4.06 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 196.6, 155.0, 151.3, 149.6, 145.7, 132.6 (×2), 125.6, 124.5 (×2), 124.2, 120.2, 108.2, 56.7; HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup>: calcd. for [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], 332.9880, found 332.9886.

**(E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazanyl)-8-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (170)**



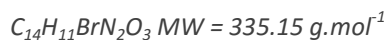
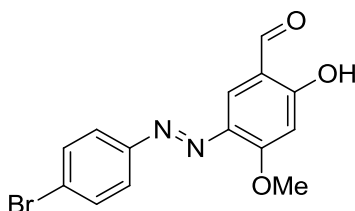
B112-IV, (E)-5-((4-bromophenyl)diazanyl)-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (1.670 g, 5 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (0.763 mL, 5 mmol, 1 equiv.) and piperidine (0.204 mL, 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 36 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion, the crude reaction was concentrated *in vacuo*. Then an acid extraction in toluene (3 x 150 mL) with 2:1 water/acetic acid was done to get the final pure product as *bronze* solid in (1.25g, 58% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.90 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 8.13 (d, J = 2 Hz, 1 H, ArH), 7.82 (m, 4 H, ArH), 7.80 (d, J = 2 Hz, 1 H, ArH), 4.32 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.03 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.33 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.4, 155.2, 150.5, 148.7, 148.0, 147.3, 146.3, 132.6 (×2), 125.3, 124.5 (×2), 119.1, 118.7, 118.5, 106.6, 61.4, 56.4, 14.0; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 431.0237, found 431.0231.

**(E)-6-((4-bromophenyl)diazenyl)-8-methoxy-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-3162)**



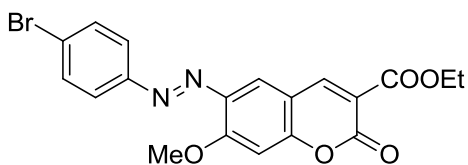
Desired product was obtained as a *bronze* solid (0.175g, 62% yield) from B111-IV (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-8-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (0.3 g, 0.7 mmol) in 1:1 MeOH/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.85 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{H}$ ), 8.12 (d,  $J = 2$  Hz, 1 H,  $\text{ArH}$ ), 7.86 (d,  $J = 9$  Hz, 2 H,  $\text{ArH}$ ), 7.82 (d,  $J = 9$  Hz, 2 H,  $\text{ArH}$ ), 7.79 (d,  $J = 9$  Hz, 2 H,  $\text{ArH}$ ), 7.79 (d,  $J = 2$  Hz, 1 H,  $\text{CHOCH}_3$ ), 4.03 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 163.8, 155.8, 150.5, 147.9, 147.3, 146.2, 132.6, 125.2, 124.5, 119.8, 119.2, 118.7, 106.1, 56.4 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : calcd. for  $[\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_5]^+$ , 402.9924, found 4404.9909.

**(E)-5-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (161)**



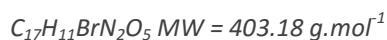
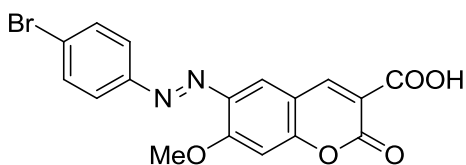
4 - Bromoaniline (3.44 g, 20 mmol, 1 equiv.),  $\text{NaNO}_2$  (1.7 g, 24 mmol, 1.2 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (60 mL), 2-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde (3.04 g, 10 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. Then the crude reaction was allowed to precipitate. The solid was filtrated and washed by cool ethanol and ether. The filtrate was concentrated *in vacuo* then extracted with ethyl acetate (3x400 mL) and 1 M chlorhydric acid solution. The product was get as a *bronze* solid after purification by silica gel column chromatography with 7:3 cyclohexane / ethyl acetate (5.9 g, 87% yield) ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_H$ : 11.65 (s, 1 H,  $\text{OH}$ ), 9.82 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 7.96 (s, 1 H,  $\text{ArH}$ ), 7.75 (dd,  $J = 2$  Hz, 6.5 Hz, 2 H,  $\text{ArH}$ ), 7.62 (dd,  $J = 2$  Hz, 6.5 Hz, 2 H,  $\text{ArH}$ ), 6.65 (s, 1 H,  $\text{ArH}$ ), 4.06 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_C$ : 195.6, 166.6, 164.3, 151.9, 136.6, 132.6 ( $\times 2$ ), 125.4, 124.6 ( $\times 2$ ), 122.3, 114.5, 100.6, 57.0 ; HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M}-\text{H}]^-$  calcd. for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_2\text{O}_3]^-$ , 332.9880, found 332.9876.

**(E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (150)**



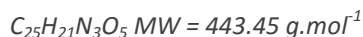
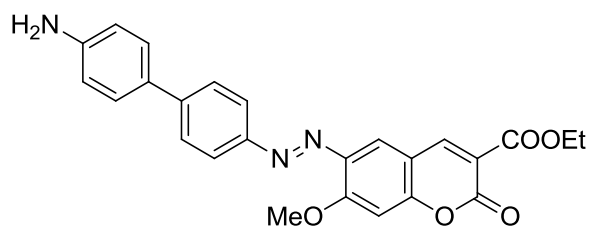
B112-II, (E)-5-((4-bromophenyl)diazenyl)-2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (2.78 g, 8.31 mmol, 1 equiv.), diethyl malonate (1.27 mL, 8.31 mmol, 1 equiv.) and piperidine (0.34 mL, 0.4 mmol, 40 mol%) was taken together in 100 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion, the crude reaction was concentrated *in vacuo*. Then an acid extraction in toluene (3 x 150 mL) with 2:1 water/acetic acid was done to get the final pure product as *bronze solid* (2g, 56% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  : 8.54 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 7.88 (s, 1 H, CHCN), 7.78 (dd, *J* = 2 Hz, 6.5 Hz, 2 H, ArH), 7.64 (dd, *J* = 2 Hz, 6.5 Hz, 2 H, ArH), 6.98 (s, 1 H, CHCO), 4.39 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.09 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.39 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$  : 163.2; 162.2; 159.0; 156.6; 151.7; 149.4; 139.9; 132.7 (×2); 126.3; 124.8 (×2); 117.5; 115.9; 111.4; 100.5; 62.1; 57.2; 14.5 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>], 431.0237, found 431.0231.

**(E)-6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-3164)**



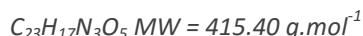
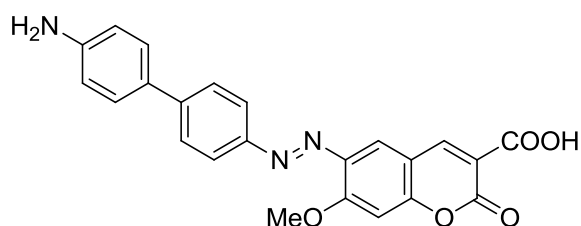
Desired product was obtained as a *dark sienna solid* (45 mg, 41% yield) from B111-II (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (0.11 g, 0.26 mmol, 1 equiv.) in 1:1 Toluene/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$  : 8.79 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>H), 8.08 (s, 1 H, ArH), 7.82 (m, 4 H, ArH), 7.37 (s, 1 H, CHOCH<sub>3</sub>), 4.09 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$  : 163.9, 161.4, 158.5, 156.4, 151.1, 149.1, 138.9, 132.6, 131.7, 125.0, 124.5, 121.3, 117.5, 115.7, 111.2, 100.8, 57.2 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>], 402.9924, found 402.9939.

**(E)-ethyl 6-((4'-aminobiphenyl-4-yl)diazenyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (224)**



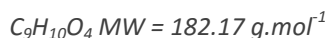
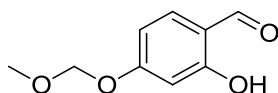
An argon flushed (3x) mixture of 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (0.557 g, 1.21 mmol, 1 equiv.), (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-methoxy-2H-chromene-3-carboxylate (1.143 g, 2.65 mmol, 2.2 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.83 g, 6 mmol, 5 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (77 mg, 0.24 mmol, 20 mol%), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.14 g, 0.12 mmol, 10 mol%) was taken in 2:1 toluene/water according to General Procedure 5. At the completion the mixture was extracted with 3 x 200 mL of ethyl acetate and 1 M KOH solution. Purification was done by silica gel column chromatography cyclohexane / ethyl acetate / Et<sub>3</sub>N (1:1:0.1%). The pure product was get as *dark sienna* solid in (283 mg, 63% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.57 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et), 7.95 (dd, J = 2 Hz, j = 7 Hz, 2 H, ArH), 7.88 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CN), 7.67 (dd, J = 2 Hz, 6.5 Hz, 2 H, ArH), 7.48 (dd, J = 2 Hz, 6.5 Hz, 2 H, ArH), 6.98 (s, 1 H, CHO), 6.76 (dd, J = 2 Hz, 6.5 Hz, 2 H, ArH), 4.39 (q, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.10 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.39 (t, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 163.5, 162.1, 158.7, 156.7, 151.5, 149.6, 147.0, 144.5, 140.0, 130.2, 128.4 (×2), 127.0 (×2), 124.0 (×2), 117.4, 116.7, 115.6 (×2), 111.4, 100.4, 62.1, 57.2, 14.5 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 444.1554, found 444.1549.

**(E)-6-((4'-aminobiphenyl-4-yl)diazenyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-4089)**



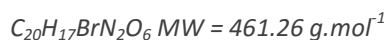
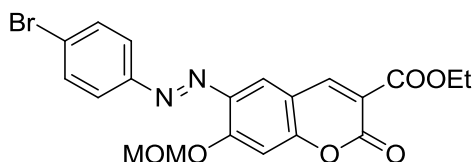
144-II (0.11 g, 0.24 mmol, 1 equiv.) was taken in 7 mL of 1:1 Toluene/(KOHaq 30%) according to General Procedure 6 to get the desired pure product as a *dark sienna* powder (48 mg, 48% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + a few drops of DCl) δ<sub>H</sub> : 8.73 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 7.98 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CN), 7.87 (m, 4 H, ArH), 7.85 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.24 (s, 1 H, CHCO), 4.03 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + a few drops of DCl) δ<sub>C</sub> : 163.9; 161.5; 158.4; 156.9; 151.7, 149.5, 141.8, 139.3, 139.1, 131.11, 128.3 (×2), 128.0 (×2), 124.3 (×2), 123.6 (×2), 117.6, 15.3, 111.3, 100.8, 57.4 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 416.1241, found 416.1241.

### 2-hydroxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (115)



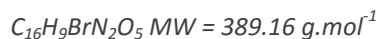
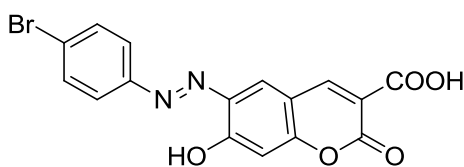
To an argon refluxed (3x) mixture of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (1.96 g, 14.22 mmol, 1 equiv.),  $K_2CO_3$  (5.9 g, 42.66 mmol, 3 equiv.) was added anhydrous dioxane (45 mL), and chloro(methoxy)methane (1.26 g, 15.64 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred under 80 °C for 4 h. Then the crude reaction was extracted with  $H_2O/AcOEt$ . The product was obtained as a *white* solid after purification by silica gel column chromatography with [gradient from 9:1 to 7:3] Cyclohexane/ $AcOEt$  (1.04g, 40% yield);  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 11.34 (s, 1 H, OH), 9.72 (s, 1 H, CHO), 7.43 (d, 1 H,  $J = 8.5$ , CHCCHO), 6.63 (dd, 1 H,  $J = 2$  Hz, 8.5 Hz, CHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.59 (d, 1 H,  $J = 2$ , CHCOH), 5.230 (s, 2 H, OCH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3.46 (s, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (62.9 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 194.8; 164.6; 164.4; 135.6; 116.2; 109.3; 103.7; 94.3; 36.7; HR-MS (ESI, m/z)  $[M-H]^-$ : calcd. for  $[C_9H_9O_4]^-$ , 181.0506, found 181.0495.

### (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-(methoxymethoxy)-2-oxo-2H-chromene-carboxylate (117)



4-Bromoaniline (0.69 g, 4 mmol, 1 equiv.),  $NaNO_2$  (0.33 g, 4.8 mmol, 1.2 equiv.), 1:1 EtOH/HCl 12N (12 mL), 2-hydroxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde 115, (0.73 g, 4 mmol, 1 equiv.) was taken according to General Procedure 3. Then the crude reaction was concentrated *in vacuo* and purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ $AcOEt$  [gradient from 9:1 to 7:3]. The impure solid (0.82 g) of the desired product and the beginning reagent was getting (44% of desired product). The mixture was directly engaged into the next step without further more purification. This intermediate (0.77 g, 2.93 mmol, 1 equiv.) was then taken in diethyl malonate (0.54 mL, 3.52 mmol, 1.2 equiv.), piperidine (0.12 mL, 1.17 mmol, 40 mol%) and 40 mL of absolute ethanol according to General Procedure 4. At the completion the mixture was concentrated *in vacuo*, extracted with water and EtOAc (36 x 100 mL) then purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ $AcOEt$  [gradient from 95/5 to 70:30]. Desired product was get as a *bronze* solid (69 mg, 12% yield);  $^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_H$ : 8.86 (s, 1 H, CHCCOOEt), 8.14 (s, 1 H, CHCN), 7.84 (d, 2 H,  $J = 9.0$  HZ, ArH), 7.81 (d, 2 H,  $J = 9.0$  HZ, ArH), 7.38 (s, 1 H, CHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.56 (s, 2 H, OCH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 4.39 (q, 2 H,  $J = 7.0$  HZ, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.48 (s, 3 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.39 (t, 3 H,  $J = 7.0$  HZ, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (62.9 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$ : 162.4, 158.8, 157.9, 155.6, 151.1, 149.3, 139.5 (x2), 132.7, 125.3, 124.5 (x2), 118.0, 115.6, 112.1, 103.5, 95.3, 61.1, 56.4, 14.0.

(E)-6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP9-5096)



To a solution of 117, (E)-ethyl 6-((4-bromophenyl)diazenyl)-7-(methoxymethoxy)-2-oxo-2H-chromene-carboxylate (69 mg, 0.15 mmol) in EtOH (10 mL) was added NaOH aq 10% (10 mL). The mixture was stirred under reflux for 2 h. The crude reaction was acidified with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc 95% (0.05 mol, pH = 1) then stirred under 40 °C for 15 minutes. The mixture was then extracted with AcOEt (3x 200 mL) and 1 M solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The organic layer was then concentrated *in vacuo* and purified by silica gel column chromatography with 6:4:0.5% of DCM/AcOEt/AcOH. The pure product was obtained as a *dark jungle green* solid (55 mg, 94% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> : 13.57 (s, 1 H, OH), 8.94 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>COOH), 8.33 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CN), 7.78 (dd, 2 H, J = 2 Hz, 7.0 Hz, ArH), 7.70 (dd, 2 H, J = 2 Hz, 7.0 Hz, ArH), 7.03 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>COH). <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> : 164.0, 162.7, 160.6, 157.4, 151.2, 148.8, 136.2, 135.6, 133.3 (x2), 127.7, 124.3 (x2), 118.5, 112.3, 106.3. HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na]<sup>+</sup>, 410.9587, found 410.9589.

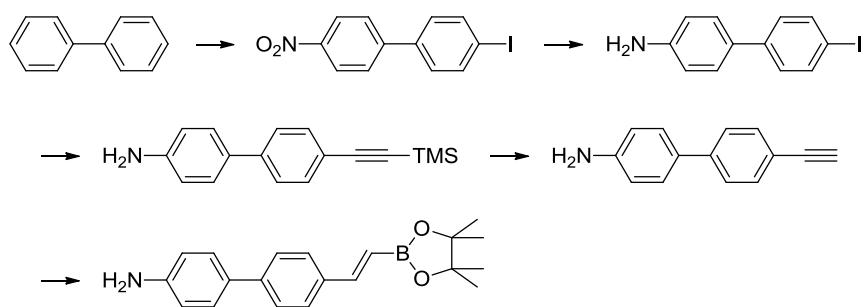


## II. Arylvinyl coumarins

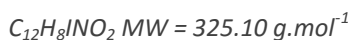
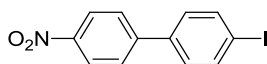


### III.1. Starting vinyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine:

The 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine was synthesized by a sequence of procedures shown below:

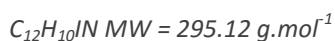
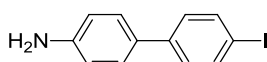


#### 4-iodo-4'-nitro-1,1'-biphenyl (86)



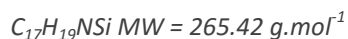
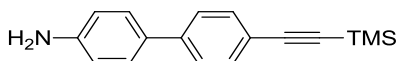
Biphenyl (30 g, 0.195 mol, 1 equiv.) and iodine (15 g, 0.059 mol, 30 mol%) was taken in acetic acid (20 mL). Then conc. HNO<sub>3</sub> (70%, 72 mL) was slowly added over 1 h within rigorous gas formation, and the resulting mixture was stirred for 1 h at 70 °C. The cooled reaction mixture was then poured into water (100 mL), and the *beige* solid was filtered, washed with water, triturated in toluene 100 mL, filtrated and washed with toluene (11.96 g, 27 % yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.31 (dd, 2 H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 6.5 Hz, ArH), 7.96 (dd, 2 H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 6.5 Hz, ArH), 7.90 (dd, 2 H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 6.5 Hz, ArH), 7.60 (dd, 2 H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 6.5 Hz, ArH); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 146.9, 145.5, 138.0 (×2), 137.3, 129.3 (×2), 127.7 (×2), 124.1 (×2), 96.0.

#### 4'-iodo-[1,1'-biphenyl]-4-amine (79)



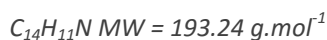
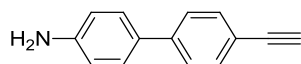
80, 4-iodo-4'-nitrobiphenyl (14.65 g, 0.045 mol, 1 equiv.) was dissolved in acetic acid (80 mL) and Fe<sup>0</sup> powder (7.55 g, 0.135 mol, 3 equiv.) was added slowly over 10 min to the refluxing solution. After heating for 15 min, the solution was cooled to room temperature and poured into crushed ice. A *pale yellow* compound precipitated from the solution (9.19 g, 70 % yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 6.72 (br, 2 H, ArH), 7.33 (br, 4 H, ArH), 7.66 (br, 2 H, ArH).

#### 4'-((trimethylsilyl)ethynyl)-[1,1'-biphenyl]-4-amine (78)



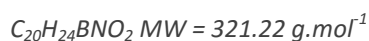
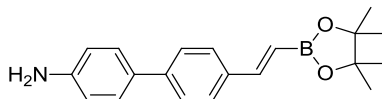
A mixture of 4'-iodo-[1,1'-biphenyl]-4-amine (2.06 g, 6.98 mmol, 1 equiv.), ethynyltrimethylsilane (1.08 mL, 7.68 mmol, 1.1 equiv.), CuI (66 mg, 0.349 mmol, 5% equiv.) and PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (147 mg, 0.209 mmol, 3% equiv.) in dry triethylamine (33 ml) was heated at reflux for 16 h under argon. The reaction mixture was filtered over Celite<sup>®</sup> and washed with EtOAc. The filtrate was evaporated *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a mixture of Cyclohexane/EtOAc (9:1 to 4:6) to yield *apricot* solid (1.63 g, 88% yield). Data matches literature values<sup>203</sup>; <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.45 (m, 4 H, ArH), 7.395 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 6.72 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 3.73 (br, 2 H, NH<sub>2</sub>), 0.24 (s, 9 H, SiCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 145.4, 141.36, 132.6, 130.8, 128.1, 126.2, 121.0, 111.6, 105.5, 94.5, 0.3.

#### 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (74)



A solution of 4'-((trimethylsilyl)ethynyl)-[1,1'-biphenyl]-4-amine (1.63 g, 6.14 mmol) and NaOH 10% (14.6 mL) in methanol (61 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with Cyclohexane:EtOAc (9:1 to 1:9) to yield *pale orange* solid (1.02 g, 86% yield). Data matches literature values ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  : 7.56 (dd, 2 H,  $J = 1.5, J = 6.5$ , ArH), 7.46 (dd, 2 H,  $J = 1.5, J = 6.5$ , ArH), 7.40 (dd, 2 H,  $J = 1.5, J = 6.5$ , ArH), 6.65 (dd, 2 H,  $J = 1.5, J = 6.5$ , ArH), 5.31 (s, 2 H, NH $_2$ ), 4.14 (s, 1 H, CH);  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$  : 148.9; 141.0; 132.1 ( $\times 2$ ); 127.2 ( $\times 2$ ); 126.0; 125.2 ( $\times 2$ ); 118.6; 114.1 ( $\times 2$ ); 83.7; 80.6 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H] $^+$  : calcd. for [C $_{14}$ H $_{12}$ N] $^+$ , 194.0964, found 194.0963.

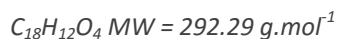
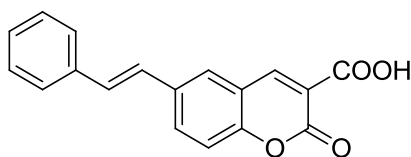
#### (E)-4'-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)-[1,1'-biphenyl]-4-amine (82)



An agron fluxed (3x) solution of 74, 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (0.6 g, 3.1 mmol, 1 equiv.) in anhydrous toluene (20 mL) and RuHCl(CO)(PPh $_3$ ) $_3$  (0.14 g, 0.15 mmol, 5% equiv.) was stirred for 5 minutes. Then 4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (1.99 g, 15.5 mmol, 5 equiv.) was added. The mixture was stirred for 18 h at 50 °C. The crude reaction was concentrated in *vacuo* then extracted with Et $_2$ O and saturated solution of NaHCO $_3$ . The organic layer was concentrated in *vacuo* and purified by silica gel column chromatography with 50:50 (Cyclohexane/AcOEt). The pure product was get as *dark jungle green* oil (0.86 g, 89 % yield) ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta_H$  : 7.56 (m, 4 H, ArH) 7.49 (d, 2 H,  $J = 8.5$ , ArH), 7.30 (d, 1 H,  $J = 16.5$ , ArH), 6.64 (d, 2 H,  $J = 8.5$ , ArH), 6.10 (d, 1 H,  $J = 16.5$ , CHCH), 5.27 (s, 2 H, NH $_2$ ), 1.25 (s, 12 H, CH $_3$ COB), 1.16 (s, 12 H, CH $_3$ COB) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz, CDCl $_3$ )  $\delta_C$  : 149.0, 148.7, 141.3, 134.2, 127.5 ( $\times 2$ ), 127.0 ( $\times 2$ ), 126.5, 125.3 ( $\times 2$ ), 114.2 ( $\times 2$ ), 82.9, 81.3, 73.5, 24.6, 24.4.

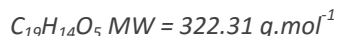
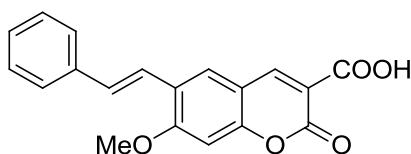
### III.2. Arylvinyl coumarin analogs

**(E)-2-oxo-6-styryl-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP16-2074)**



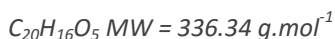
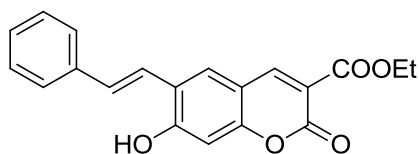
An argon fluxed (3x) solution of B49-I, Ethyl 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.2 g, 0.58 mmol, 1 equiv.); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4 g, 2.9 mmol, 5 equiv.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.135 g, 0.116 mmol, 20 mol%), in 4:1 THF/water (10 mL) was stirred for 15 minutes. Then trans-2-phenylvinyl-boronic acid (0.112 g, 0.755 mmol, 1.3 equiv.) was added. The mixture was refluxed for 12 h. The crude reaction was then concentrated *in vacuo*. The mixture was acidified with a 1 M solution of HCl and extracted in Et<sub>2</sub>O (2 x 100 mL) and AcOEt (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo* then precipitated in DCM / Pentane to get a solid which was taken in 1:1 EtOH/KOHaq 1 M (10 mL) under reflux for 4 h. The crude reaction was then acidified with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. The yellow solid was filtrated and washed with few Et<sub>2</sub>O to get the final pure product in (82 mg, 48% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.71 (s, 1 H, CHCOOH), 8.10 (d, 1 H, J = 2 Hz, ArH), 7.99 (dd, 1 H, J = 2 Hz, J = 8.5 Hz, ArH), 7.62 (d, 2 H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.46 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.41 (m, 2 H, ArH), 7.32 (s, 2H, CHCH), 7.29 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 163.9, 156.6, 153.8, 148.1, 136.6, 134.0, 132.0, 129.5, 128.7 (x2), 127.3, 127.4, 126.5 (x2), 118.8, 188.2, 116.5; HR-MS (ESI, m/z) [M-H]<sup>-</sup>: calcd. for [C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 291.0663, found 291.0664.

**(E)-7-methoxy-2-oxo-6-styryl-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP16-2077)**



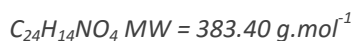
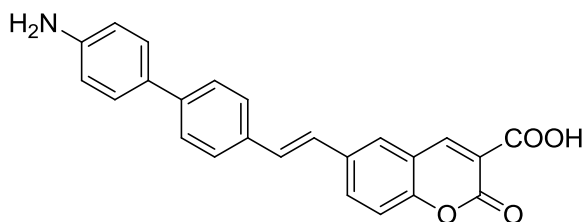
An argon fluxed (3x) solution of B49-II, Ethyl 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H chromene-3-carboxylate (0.8 g, 2.14 mmol, 1 equiv.); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.48 g, 10.7 mmol, 5 equiv.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.5 g, 0.43 mmol, 20 mol%), in 4:1 THF/water (20 mL) was stirred for 15 minutes. Then trans-2-phenyl vinyl boronic acid (0.32 g, 2.14 mmol, 1 equiv.) was added. The mixture was refluxed for 12 h. The crude reaction was then concentrated *in vacuo*. The mixture was acidified with a 1 M solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solid was filtrated (0.455 g) then was triturated in warm EtOH (70 mL) for 1 h under reflux. The yellow solid was then filtrated and washed with a few warm EtOH and Et<sub>2</sub>O to get the final pure product (67 mg, 10 % yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 12.82 (s, 1 H, COOH), 8.89 (s, 1 H, CHCOOH), 7.85 (s, 1 H, ArH), 7.53 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.38 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.36 (d, 1 H, J = 8 Hz, ArH), 7.35 (d, 1 H, J = 16.5 Hz, CHCH), 7.29 (m, 1 H, ArH), 7.15 (d, 1 H, J = 16.5 Hz, CHCH), 6.92 (s, 1 H, CHOCH<sub>3</sub>), 4.03 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 164.7, 163.6, 163.2, 156.5, 151.4, 137.1, 132.3, 129.0, 128.6, 127.4, 127.2, 127.1, 120.9, 112.5, 111.6, 99.2, 56.8. HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 323.0914, found 323.0928.

**(E)-ethyl 7-hydroxy-2-oxo-6-styryl-2H-chromene-3-carboxylate (128)**



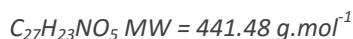
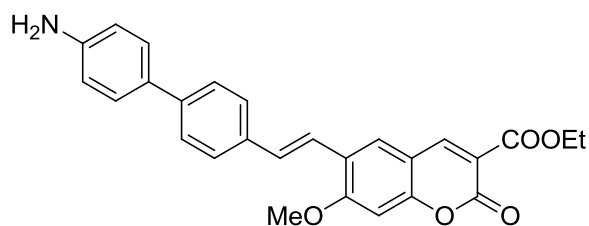
An argon fluxed (3x) solution of B49-III, ethyl 6-iodo-7-(methoxymethoxy)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.865 g, 2.14 mmol, 1 equiv.); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.48 g, 10.7 mmol, 5 equiv.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.5 g, 0.43 mmol, 20 mol%) in 4:1 THF/water (20 mL) was stirred for 15 minutes. Then trans-2-phenyl vinyl boronic acid (0.32 g, 2.14 mmol, 1 equiv.) was added. The mixture was refluxed for 12 h. The crude reaction was then concentrated *in vacuo*. The mixture was acidified with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.conc 95% (22 mmol, pH = 1), then stirred for 15 min at 40 °C. The solid was filtrated then triturated in warm EtOH (70 mL) for 1 h under reflux. The *yellow* solid was then purified by silica gel column chromatography (using gradient 8:2 to 4:6 of Cyclohexane/EtOAc) to get the final pure product (112 mg, 15 % yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 11.40 (s, 1 H, OH), 8.67 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 8.18 (s, 1 H, ArH), 7.57 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.40 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.39 (d, 1 H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.36 (d, 1 H, J = 16.5 Hz, CHCH), 7.28 (m, 1 H, ArH), 7.26 (d, 1 H, J = 16.5 Hz, CHCH), 6.81 (s, 1 H, CHOH), 4.26 (q, J = 7 Hz, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, J = 7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.8, 161.3, 156.2, 155.9, 149.3, 137.1, 129.4, 128.8, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7, 126.4, 122.9, 121.6, 112.6, 110.7, 101.8, 60.8, 14.1.

**(E)-6-(2-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP16-2072)**



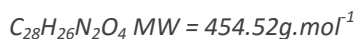
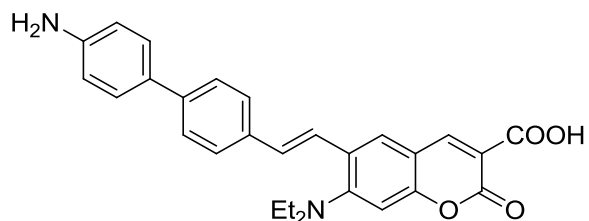
An argon fluxed solution of B49-I, Ethyl 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.2 g, 0.58 mmol, 1 equiv.); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4 g, 2.9 mmol, 5 equiv.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.135 g, 0.116 mmol, 20 mol%) in 4:1 THF/water (10 mL), 82, (E)-4'-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl [1,1'-biphenyl]-4-amine (0.134 g, 0.69 mmol, 1.2 equiv.) was refluxed for 12 h. The crude reaction was then concentrated *in vacuo*. The mixture was extracted with water and AcOEt (3 x 100 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo* then precipitated in pentane to get a solid which was triturated in warm EtOAc. The *beige* solid was then filtrated and washed with a few H<sub>2</sub>O and Et<sub>2</sub>O to get the final pure product as a *yellow* solid in (30 mg, 13% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.72 (s, 1 H, CHCOOH), 8.11 (d, 1 H, J = 2 Hz, ArH), 8.01 (dd, 1 H, J = 2.0 Hz, 8.5 Hz, ArH), 7.69 (s, 2 H, ArH), 7.48 (d, 1 H, J = 8.5 Hz), 7.35 (br, 1 H), 7.28 (br, 3 H), 7.10 (br, 3 H), 7.01 (br, 4 H); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 127.4, 127.4, 127.4, 126.3, 147.9, 131.8, 128.8, 127.1, 126.9, 125.9, 116.3; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>24</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>, 406.1050, found 406.1054.

**(E)-ethyl 6-(2-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (LSP16-2085)**



An argon fluxed solution of B49-II, Ethyl 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.932 g, 2.49 mmol, 1 equiv.); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.728 g, 12.5 mmol, 5 equiv.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.58 g, 0.5 mmol, 20 mol%) in 4:1 THF/water (25 mL), 82, (E)-4'-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl) [1,1'-biphenyl]-4-amine (0.134 g, 0.69 mmol, 1.2 equiv.) was refluxed for 12 h. The crude reaction was then concentrated *in vacuo*. The mixture was extracted with water and AcOEt (3 x 100 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered through a pad of celite® and concentrated *in vacuo* get the final product as a brown solid (0.305g, 69% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.54 (s, 1 H, CHCOOEt), 7.75 (s, 1 H, ArH), 7.54 (s, 4 H, ArH), 7.43 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.35 (d, 1 H, J = 16.5 Hz, CHCH), 7.12 (d, 1 H, J = 16.5 Hz, CHCH), 6.62 (s, 1 H, CHOCH<sub>3</sub>), 6.75 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, CHCNH<sub>2</sub>), 4.39 (q, 2 H, J = 7.5 HZ, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.40 (t, 3 H, J = 7.5 HZ, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**(E)-ethyl 6-(2-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (LSP16-2043)**



An argon fluxed solution of A49-IV, 7-(diethylamino)-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.1 g, 0.26 mmol, 1 equiv.); Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.372 g, 1.3 mmol, 5 equiv.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.06 g, 0.05 mmol, 20 mol%) in 4:1 THF/water (6 mL), 82, (E)-4'-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl) [1,1'-biphenyl]-4-amine (0.1 g, 0.31 mmol, 1.2 equiv.) was refluxed for 12 h. The crude reaction was then concentrated *in vacuo*. The mixture was extracted with sat. NH<sub>4</sub>Cl aq solution and Et<sub>2</sub>O (2 x 100 mL) and DCM (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo* then purified by silica gel column chromatography (using 6:4:0.5% DCM/AcOEt/AcOH) to get the final pure product as a yellow solid in (26 mg, 22% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + few drops of TFA-*d*) δ<sub>H</sub>: 8.54 (s, 1 H, CHCOOH), 8.08 (s, 1 H, ArH), 7.58 (s, 4 H, ArH), 7.40 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.15 (d, 2 H, J = 5.5 Hz, ArH), 6.99 (s, 1 H, ArH), 6.64 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, ArH), 3.30 (q, 4 H, J = 7.0 HZ, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.09 (t, 6 H, J = 7.0 HZ, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 453.1820, found 455.1984

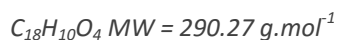
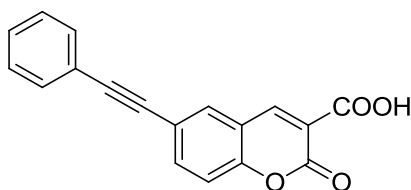
### II.3. Arylethynyl coumarins

#### General Procedure 7: Synthesis of *Arylethynyl coumarin* by Sonogashira coupling.

Using a procedure of Rozhkov and co-workers, iodocoumarin derivatives (0.25 mmol, 1 equiv.), alkyne (0.5 mmol, 2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (0.0125 mmol, 5% equiv.), CuI (0.025 mmol, 10% equiv.) and NEt<sub>3</sub> (2 mmol, 8 equiv.) were dissolved in 2 mL of DMF and stirred at r.t. for 16 h (unless noted otherwise). Progress of the reaction was monitored by TLC using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1 mixture as eluent. Upon completion of the reaction, solvent was evaporated *in vacuo* and solid residue was purified by flash chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOAc step gradient solvent system as an eluent. The following new compounds were prepared using this procedure.

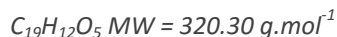
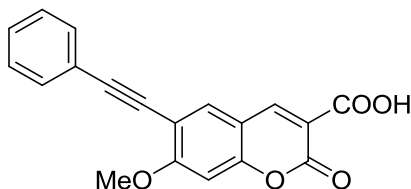


### 2-oxo-6-(phenylethynyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1044)



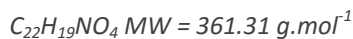
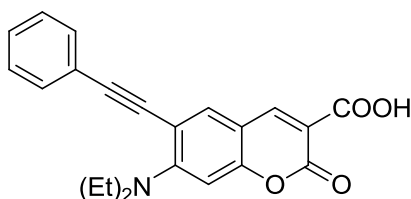
According to General Procedure 7, 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.1 g, 0.31 mmol, 1 equiv.) in DMF (2.5 mL) was reacted with phenylacetylene (70  $\mu$ L, 0.63 mmol, 2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (11 mg,  $0.158 \times 10^{-3}$  mmol, 5% equiv.), CuI (6 mg,  $0.316 \times 10^{-3}$  mmol, 10% equiv.) and  $NEt_3$  (0.35 mL, 2.53 mmol, 8 equiv.) which, after column chromatography (90%  $CH_2Cl_2$ , 10% MeOH), gave the *phenylethynyl coumarin* (0.100 g, 77% yield) as a *brown solid*;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 8.90 (s, 1 H,  $CHCCO_2H$ ), 7.88 (s, 1 H,  $CH$ ), 7.87 (dd, 1 H,  $J = 2.5$  Hz, 7.5 Hz, ArH), 7.53 (m, 2 H, ArH), 7.46 (d, 1 H,  $J =$  Hz), 7.37 (m, 3 H, ArH);  $^{13}C$  NMR (62.9 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$ : 163.8, 162.3, 154.0, 151.0, 138.6, 133.1, 131.9 ( $\times 2$ ), 129.3, 128.7 ( $\times 2$ ), 122.3, 118.7, 117.7 ( $\times 2$ ), 115.8, 91.2, 86.5; HR-MS (ESI, m/z)  $[M+H]^+$ : calcd. for  $[C_{18}H_{11}O_4]^+$ , 291.0652, found 291.0657.

### 7-methoxy-2-oxo-6-(phenylethynyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1046)



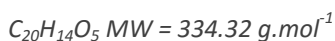
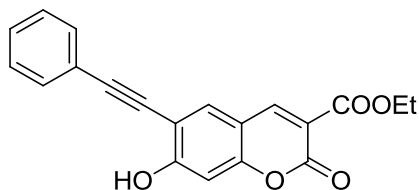
According to General Procedure 7, 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.1 g, 0.28 mmol, 1 equiv.) in DMF (2.3 mL) was reacted with phenylacetylene (64  $\mu$ L, 0.58 mmol, 2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (10 mg,  $0.144 \times 10^{-3}$  mmol, 5% equiv.), CuI (5.5 mg,  $0.289 \times 10^{-3}$  mmol, 10% equiv.) and  $NEt_3$  (0.322 mL, 2.31 mmol, 8 equiv.) which, after column chromatography (90%  $CH_2Cl_2$ , 10% MeOH), gave the *phenylethynyl coumarin* (0.067 g, 73% yield) as a *brown solid*;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 13.11 (br, 1 H, OH), 8.70 (s, 1 H,  $CHCCO_2H$ ), 8.07 (s, 1 H,  $CH$ ), 7.53 (dd, 2 H,  $J = 2.0$ , 7.5 Hz, ArH), 7.43 (m, 3 H, ArH), 7.20 (s, 1 H, ArH), 3.99 (s, 3 H,  $OCH_3$ );  $^{13}C$  NMR (62.9 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$ : 164.1, 163.9, 156.7, 156.6, 148.1, 134.2, 131.2 ( $\times 2$ ), 128.8, 128.7 ( $\times 2$ ), 122.1, 114.9, 111.4, 109.3, 99.4, 93.3, 84.0, 57.0; HR-MS (ESI, m/z)  $[M-H]^-$ : calcd. for  $[C_{19}H_{11}O_5]^-$ , 319.0612, found 319.0606.

### 7-(diethylamino)-2-oxo-6-(phenylethynyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1042)



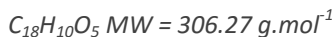
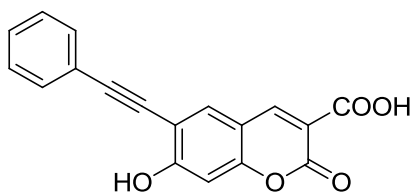
According to General Procedure 7, Ethyl 7-hydroxy-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.1 g, 0.26 mmol, 1 equiv.) in DMF (2.3 mL) was reacted with phenylacetylene (56  $\mu$ L, 0.52 mmol, 2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (9 mg,  $0.129 \times 10^{-3}$  mmol, 5% equiv.), CuI (4.9 mg,  $0.258 \times 10^{-3}$  mmol, 10% equiv.) and  $NEt_3$  (0.288 mL, 2.06 mmol, 8 equiv.) which, after column chromatography (90%  $CH_2Cl_2$ , 10% MeOH), gave the *phenylethynyl coumarin* (0.031 g, 32% yield) as a *brown solid*;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 12.79 (br, 1 H, OH), 8.59 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>H), 7.97 (s, 1 H, CH), 7.52 (dd, 2 H,  $J = 2.0, 7.8$  Hz, ArH), 7.42 (m, 3 H, ArH), 6.74 (s, 1 H, ArH), 3.67 (q, 4 H,  $J = 7.0$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.22 (t, 6 H,  $J = 7.0$  Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$ : 164.1, 157.7, 156.3, 154.5, 148.1, 137.7, 130.8 ( $\times 2$ ), 128.7 ( $\times 2$ ), 128.5, 122.4, 111.3, 109.1, 106.9, 100.8, 92.4, 88.1, 45.3 ( $\times 2$ ), 12.9 ( $\times 2$ ); HR-MS (ESI,  $m/z$ )  $[M+H]^+$ : calcd. for  $[C_{22}H_{20}O_4N]^+$ , 362.1387, found 362.1385.

### Ethyl 7-hydroxy-2-oxo-6-(phenylethynyl)-2H-chromene-3-carboxylate (252)



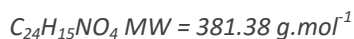
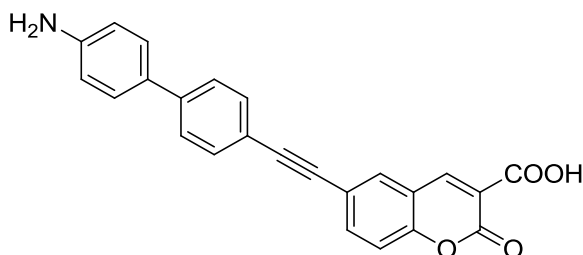
According to General Procedure 7, ethyl 7-hydroxy-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.150 g, 0.41 mmol, 1 equiv.) in DMF (3.5 mL) was reacted with phenylacetylene (91  $\mu$ L, 0.83 mmol, 2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (14 mg,  $0.208 \times 10^{-3}$  mmol, 5% equiv.), CuI (7.9 mg,  $0.416 \times 10^{-3}$  mmol, 10% equiv.) and  $NEt_3$  (0.464 mL, 3.33 mmol, 8 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature before quenching by water. The aqueous mixture was extracted with  $CH_2Cl_2$ , dried over  $MgSO_4$  and concentrated *in vacuo* which, after column chromatography (90%  $CH_2Cl_2$ , 10% MeOH), gave the *phenylethynyl coumarin* (0.066 g, 47% yield) as a *brown solid*;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 8.90 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>Et), 8.24 (s, 1 H, OH), 7.94 (d, 2 H,  $J = 7.0$  Hz, ArH), 7.81 (s, 1 H, CH), 7.63 (s, 1 H, CH), 7.55 (m, 2 H, ArH), 7.46 (m, 1 H, ArH), 4.31 (q, 2 H,  $J = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, 3 H,  $J = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_C$ : 162.5, 157.2, 157.0, 155.9, 152.5, 149.3, 129.2, 128.9 ( $\times 2$ ), 128.6, 126.4, 124.6 ( $\times 2$ ), 122.3, 115.2, 114.5, 101.4, 98.8, 60.9, 13.8.

**7-hydroxy-2-oxo-6-(phenylethynyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1177)**



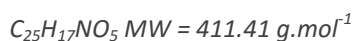
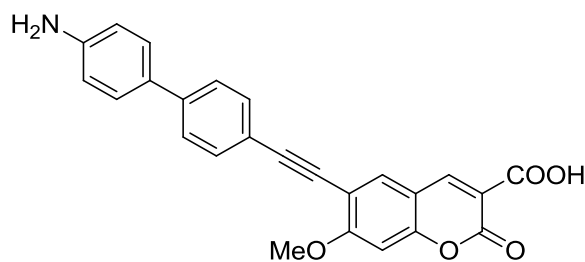
A solution of ethyl 7-hydroxy-2-oxo-6-(phenylethynyl)-2H-chromene-3-carboxylate (60 mg, 0.18 mmol) and NaOH 10% (0.3 mL) in ethanol (1 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, washed with ethanol to give the title compound (40 mg, 74% yield) as a *brown* solid ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.89 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et), 8.21 (s, 1 H, OH), 7.95 (dd, 2 H, J = 1.6, 8.3 Hz, ArH), 7.80 (s, 1 H, CH), 7.61 (s, 1 H, CH), 7.54 (t, 2 H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.45 (t, 1 H, J = 7.4 Hz, ArH) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 164.0, 157.4, 157.1, 156.9, 152.6, 149.3, 129.4, 129.1 (×2), 128.3, 124.8 (×2), 122.4, 116.1, 114.9, 101.6, 99.0 ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 307.0601, found 306.0611.

**6-((4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethynyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1125)**



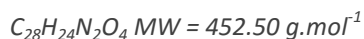
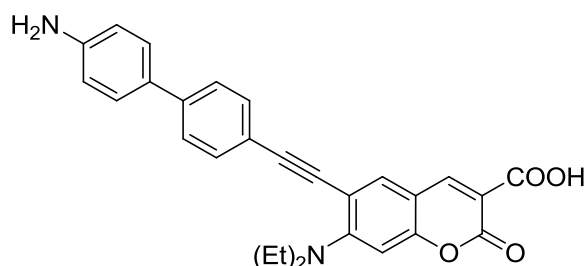
According to General Procedure 7, 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.2 g, 0.64 mmol, 1 equiv.) in DMF (5 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (0.146 g, 0.76 mmol, 1.2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (22 mg, 0.032×10<sup>-3</sup> mmol, 5%), CuI (12 mg, 0.063×10<sup>-3</sup> mmol, 10% equiv.) and NEt<sub>3</sub> (0.705 mL, 5.06 mmol, 8 equiv.). Water was added to the reaction mixture; the residue was filtered and washed with DCM, MeOH and Et<sub>2</sub>O to give the title compound (0.070 g, 29% yield) as a *brown* solid ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.72 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 8.11 (d, 1 H, J = 1.5 Hz CH<sub>2</sub>CC), 7.83 (m, 3 H, ArH), 7.74 (d, 2 H, J = 8.0 Hz ArH), 7.66 (m, 3 H), 7.48 (d, 3 H, J = 8.5 Hz ArH), 7.45 (d, 1 H, J = 9.0 Hz, ArH) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 169.3, 164.0, 156.6, 154.7, 148.0, 139.7, 139.5, 137.0, 133.4, 133.1, 132.4, 131.2, 128.5, 128.4, 127.5, 127.4, 124.3, 121.9, 119.5, 119.1, 118.7, 117.2, 89.8, 88.9.

**6-((4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethynyl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1127)**



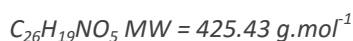
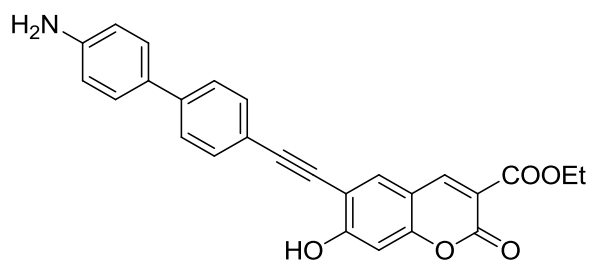
According to General Procedure 7, 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.2 g, 0.58 mmol, 1 equiv.) in DMF (4.6 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (0.134 g, 0.69 mmol, 1.2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (20 mg, 0.029×10<sup>-3</sup> mmol, 5% equiv.), CuI (11 mg, 0.058×10<sup>-3</sup> mmol, 10% equiv.) and NEt<sub>3</sub> (0.644 mL, 4.62 mmol, 8 equiv.). Water was added to the reaction mixture; the residue was filtered and washed with DCM, MeOH and Et<sub>2</sub>O to give the title compound (0.145 g, 61% yield) as a *brown* solid; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.05 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 7.60 (m, 6 H, ArH), 7.51 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.43 (d, 2 H, *J* = 6 Hz, ArH), 7.19 (s, 1 H, CHCOCH<sub>3</sub>), 6.64 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>, 412.1179, found 412.1189.

**6-((4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethynyl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1126)**



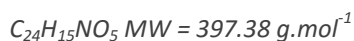
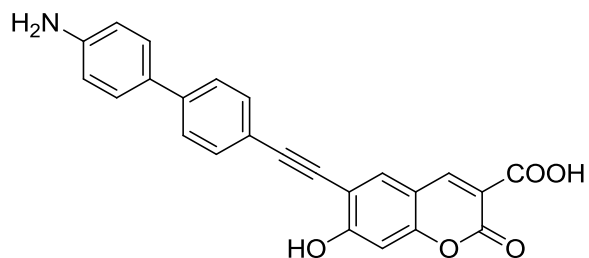
According to General Procedure 7, ethyl 7-hydroxy-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.2 g, 0.56 mmol, 1 equiv.) in DMF (4.1 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (120 mg, 0.62 mmol, 1.2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (18 mg, 0.03 ×10<sup>-3</sup> mmol, 5% equiv.), CuI (10 mg, 0.056×10<sup>-3</sup> mmol, 10% equiv.) and NEt<sub>3</sub> (0.576 mL, 4.13 mmol, 8 equiv.). Water was added to the reaction mixture; the residue was filtered and washed with DCM, MeOH and Et<sub>2</sub>O to give the title compound (0.22 g, 95% yield) as a *brown* solid; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.62 (br, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 7.96 (s, 1 H, CH), 7.60 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.49 (d, 2 H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.41 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 6.74 (s, 1 H, CHCN), 7.41 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 3.70 (q, 4 H, *J* = 6.9 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.25 (t, 6 H, *J* = 6.9 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, 453.1809, found 453.1814.

### Ethyl-6-((4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethynyl)-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (253)



According to General Procedure 7, ethyl 7-hydroxy-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.15 g, 0.42 mmol, 1 equiv.) in DMF (3.3 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (96 mg, 0.51 mmol, 1.2 equiv.), bis(diphenylphosphino)palladium dichloride (15 mg, 0.021×10<sup>-3</sup> mmol, 5% equiv.), CuI (8 mg, 0.042×10<sup>-3</sup> mmol, 10% equiv.) and NEt<sub>3</sub> (0.464 mL, 3.33 mmol, 8 equiv.). Water was added to the reaction mixture; the residue was filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo* then washed with DCM, MeOH and Et<sub>2</sub>O to give the title compound (0.112 g, 63% yield) as a *brown* solid; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.88 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 8.19 (s, 1 H, OH), 7.91 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.79 (s, 1 H, CH), 7.70 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.56 (s, 1 H, CHCO), 7.46 (d, 2 H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 6.66 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 5.14 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.30 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.8, 157.7, 157.3, 156.2, 152.7, 149.7, 149.0, 141.6, 132.9, 127.2 (×2), 126.9, 126.1, 126.0, 125.7 (×2), 125.4 (×2), 122.2, 115.4, 114.7, 114.3, 100.9, 99.0, 61.2, 14.2.

### 6-((4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethynyl)-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1173)



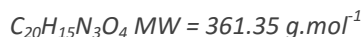
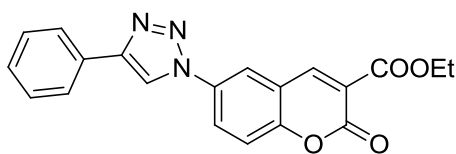
A solution of ethyl-6-((4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)ethynyl)-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (60 mg, 0.18 mmol) and NaOH 10% (0.3 mL) in ethanol (1 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, washed with ethanol to give the title compound (0.11 g, 74%, contaminated with NH<sub>4</sub>Cl) as a *brown* solid; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.90 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 8.20 (s, 1 H, OH), 7.92 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.79 (s, 1 H, CH), 7.71 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.57 (s, 1 H, CHCO), 7.47 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 6.67 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, ArH); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 162.0, 157.6, 157.1, 157.0, 152.6, 149.4, 148.8, 141.5, 127.2 (×2), 126.8, 126.1, 125.9, 125.6 (×2), 125.3 (×2), 122.1, 115.9, 114.8, 114.2(×2), 100.8, 98.9.

## II.4. Aryl-triazol coumarins

### General Procedure 8: Synthesis of *Aryl*triazol coumarin by click chemistry.

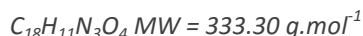
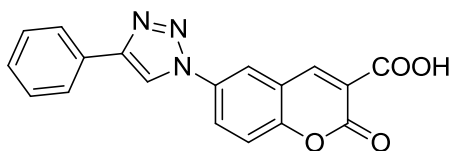
Azidocoumarin derivatives (1.5 mmol, 1 equiv.), alkyne (1.8 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (0.025 mmol, 10% equiv.) were dissolved in 3 mL of degassed DMSO and stirred at 60 °C for 16 h (unless noted otherwise) under argon. Upon completion of the reaction, water was added and the resulting suspension was removed by filtration. The residue was successively washed with water, DCM and Et<sub>2</sub>O then dried to give the title compound. If the residue is soluble with respect to the solvent system, the solid was purified by flash chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH step gradient solvent system as an eluent. The following new compounds were prepared using this procedure.

**Ethyl 2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylate (254)**



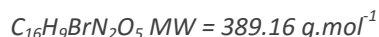
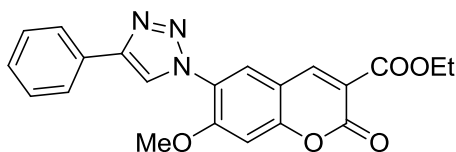
According to General Procedure 8, ethyl 6-azido-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.4 g, 1.54 mmol, 1 equiv.) in DMSO (3 mL) was reacted with phenylacetylene (0.204 mL, 1.85 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (29 mg, 0.154 mmol, 10% equiv.) which, after column chromatography (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH), gave the *phenyltriazol coumarin* in quantitative yield (0.56 g) as *brown* a solid ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 9.30 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.83 (s, 1 H, CHN), 8.54 (d, 1 H, *J* = 2.7 Hz, CHCN), 8.25 (dd, 1 H, *J* = 2.7, 8.9 Hz, CHCN), 7.94 (d, 2 H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.77 (d, 1 H, *J* = 9.0 Hz, CHCO), 7.51 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.40 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz, ArH), 4.32 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.33 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 162.2, 155.5, 153.8, 147.7, 147.4, 132.9, 129.9, 129.0 (×2), 128.3, 125.7, 125.3 (×2), 121.0, 119.8, 119.1, 118.5, 117.7, 61.3, 14.0 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 362.1135, found 362.1140.

**2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1100)**



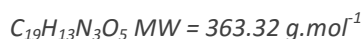
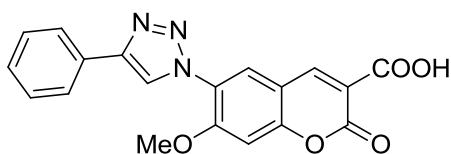
To a solution of ethyl 2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylate (0.35 g, 0.485 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (0.883 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature during 16 h. The reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, washed with ethanol to give the title compound (0.32 g, quantitative yield) as a *brown* solid ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 9.30 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>H), 8.79 (s, 1 H, CHN), 8.52 (d, 1 H, *J* = 2.6 Hz, CHCN), 8.24 (dd, 1 H, *J* = 2.7, 9.0 Hz, CHCN), 7.94 (d, 2 H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.70 (d, 1 H, *J* = 9.0 Hz, CHCO), 7.51 (t, 2 H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.40 (t, 1 H, *J* = 7.3 Hz, ArH) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 163.7, 156.1, 153.8, 147.5, 147.1, 133.0, 130.0, 129.0, 128.3 (×2), 125.6, 125.3 (×2), 121.0, 121.0, 119.9, 118.7, 117.8.

**Ethyl 7-methoxy-2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylate (258)**



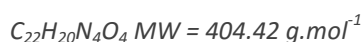
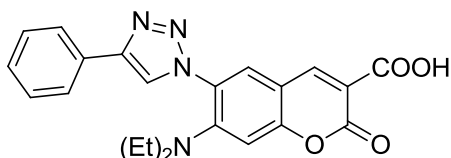
According to General Procedure 8, ethyl 6-azido-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.3 g, 1.03 mmol, 1 equiv.) in DMSO (2 mL) was reacted with phenylacetylene (0.136 mL, 1.24 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (19.7 mg, 0.103 mmol, 10%) which, gave the *phenyltriazol coumarin* as a *brown* solid (0.212 g, 52% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.97 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.83 (s, 1 H, CHN), 8.32 (s, 1 H, CHCN), 7.95 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.49 (t, 2 H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.45 (s, 1 H, CHCO), 7.94 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 4.30 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.31 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 162.3, 156.8, 156.6, 155.5, 148.2, 146.2, 129.9, 128.9 (×2), 127.9, 126.9, 125.3 (×2), 123.3, 123.0, 114.9, 110.9, 100.6, 60.9, 57.3, 13.8 ; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 392.1241, found 392.1245.

**7-methoxy-2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylic-acid (LSP17-1116)**



A solution of ethyl 7-methoxy-2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylate (100 mg, 0.25 mmol) and NaOH 10% (0.384 mL) in ethanol (0.084 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, washed with ethanol to give the title compound (58 mg, 63%, contaminated with NH<sub>4</sub>Cl) as a *brown* solid ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.96 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.80 (s, 1 H, CHN), 8.30 (s, 1 H, CHCN), 7.94 (d, 2 H, J = 8.0 Hz, ArH), 7.49 (t, 2 H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.44 (s, 1 H, CHCO), 7.38 (t, 1 H, J = 7.3 Hz, ArH), 4.00 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 163.8, 156.8, 156.7, 156.3, 148.1, 146.4, 130.1, 128.9 (×2), 128.1, 127.1, 125.3 (×2), 123.5, 123.1, 115.7, 111.2, 100.7, 57.4.

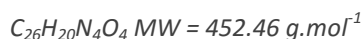
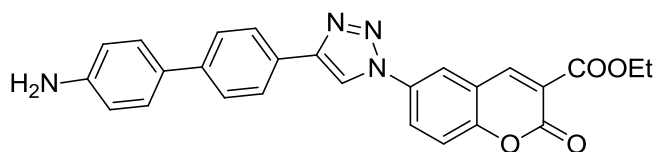
**7-(diethylamino)-2-oxo-6-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1153)**



According to General Procedure 8, 6-amino-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.100 g, 0.33 mmol, 1 equiv.) in DMSO (0.6 mL) was reacted with phenylacetylene (0.043 mL, 0.39 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (6.3 mg, 0.033 mmol, 10% equiv.) which, gave the *phenyltriazol coumarine* as a *brown* solid (0.06 g, 45% yield) ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> : 8.92 (s, 1 H, CHCCO<sub>2</sub>Et), 8.64 (br, 1 H, CHN), 7.95 (s, 1 H, CHCN), 7.93 (d, 2 H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.48 (t, 2 H, J = 7.7 Hz, ArH), .48 (t, 1 H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.10 (s, 1 H, CHCO), 2.94 (q, 4 H, J = 7.2 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.94 (t, 6 H, J = 7.1 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> : 164.1, 157.1, 156.6, 156.3, 150.2, 147.8, 146.9, 130.2, 130.2, 129.0 (×2), 128.2, 125.4 (×2), 124.7, 123.7, 110.4, 105.8, 45.1 (×2), 12.2 (×2) ; HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> : calcd. for [C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 405.1557, found 405.1574.

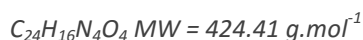
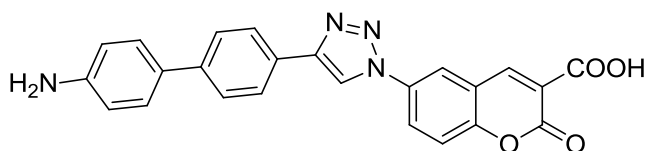


**Ethyl-6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (259)**



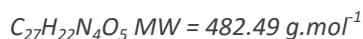
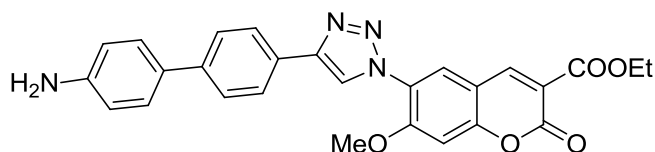
According to General Procedure 8, B53-I ethyl 6-azido-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.800 g, 3.08 mmol, 1 equiv.) in DMSO (7 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (0.716 mL, 3.70 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (59 mg, 0.308 mmol, 10% equiv.) which gave the *phenyltriazol coumarin* as a *brown* solid (1.23 g, 87% yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$  + few drops of TFA- $d$ )  $\delta_H$ : 9.29 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{Et}$ ), 8.77 (s, 1 H,  $\text{CHN}$ ), 8.49 (d, 1 H,  $J = 2.5$  Hz,  $\text{CHCN}$ ), 8.23 (dd, 1 H,  $J = 2.5, 9.0$  Hz,  $\text{CHCN}$ ), 8.02 (d, 2 H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.83 (d, 2 H,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.79 (d, 2 H,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.62 (d, 1 H,  $J = 9.0$  Hz,  $\text{CHCO}$ ), 7.48 (t, 2 H,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 4.28 (q, 2 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.29 (t, 3 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$  + few drops of TFA- $d$ )  $\delta_C$ : 162.5, 155.8, 154.2, 147.9, 147.3, 140.1, 138.8, 133.3, 133.2, 130.8, 129.9, 128.3, 128.1, 127.5, 127.3, 126.2, 125.8, 124.1, 124.1, 121.1, 120.0, 119.3, 118.8, 117.9, 61.5, 13.9; HR-MS (ESI,  $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calcd. for  $[\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4]^+$ , 453.1557, found 453.1571.

**6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1115)**



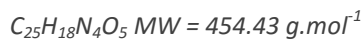
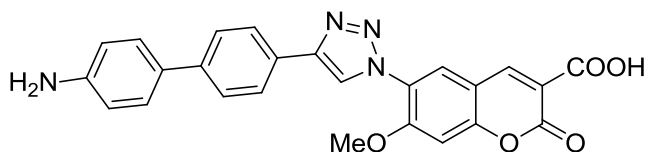
A solution of ethyl-6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.186 g, 0.411 mmol) and NaOH 10% (0.6 mL) in ethanol (0.6 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, washed with ethanol to give the title compound (0.165 g, 95% yield) as a *brown* solid;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$  + few drops of TFA- $d$ )  $\delta_H$ : 9.29 (s, 1 H,  $\text{CHCO}_2\text{Et}$ ), 8.77 (s, 1 H,  $\text{CHN}$ ), 8.49 (d, 1 H,  $J = 2.5$  Hz,  $\text{CHCN}$ ), 8.23 (dd, 1 H,  $J = 2.5, 9.0$  Hz,  $\text{CHCN}$ ), 8.02 (d, 2 H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.83 (d, 2 H,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.79 (d, 2 H,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 7.62 (d, 1 H,  $J = 9.0$  Hz,  $\text{CHCO}$ ), 7.48 (t, 2 H,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 4.28 (q, 2 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.29 (t, 3 H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**ethyl 6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate  
(260)**



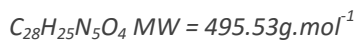
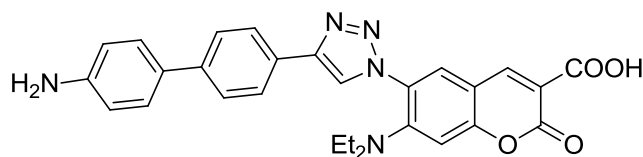
According to General Procedure 8, B53-II Ethyl 6-azido-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.32 g, 1.1 mmol, 1 equiv.) in DMSO (2.2 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (0.256 g, 1.32 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (21 mg, 0.110 mmol, 10% equiv.) which gave the *phenyltriazol coumarin* as a *brown solid* (0.462 g, 86% yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.96 (s, 1 H, CH $\text{CCO}_2\text{Et}$ ), 8.84 (s, 1 H, CH $\text{N}$ ), 8.33 (s, 1 H, CH $\text{CN}$ ), 7.94 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 7.67 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 7.47 (s, 1 H, OCH $_3$ ), 7.45 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 6.67 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 4.31 (q, 2 H,  $J = 7.5$  Hz, CH $_2$ CH $_3$ ), 4.02 (s, 3 H,  $J = 7.0$  Hz, OCH $_3$ ), 1.32 (t, 3 H,  $J = 7$  Hz, CH $_2$ CH $_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 162.5, 157.0, 156.8, 155.8, 148.5, 146.4, 140.3, 132.8, 127.4, 127.1, 126.9, 125.7 ( $\times 2$ ), 125.7 ( $\times 2$ ), 125.3, 123.3, 123.1, 115.1, 114.4, 114.4, 114.3, 111.1, 100.8, 61.1, 57.5, 14.0.

**6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid  
(LSP17-1124)**



A solution of 155-II, ethyl 6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.440 g, 0.912 mmol) and NaOHaq 10% (1.40 mL) in ethanol (1.40 mL) was refluxed during 16 h. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness; the residue was dissolved in water and acidified with diluted hydrochloric acid (pH 1 - 2). The precipitate was filtered, washed with DCM and Et $_2$ O. The impure solid was then triturated in EtOH-H $_2$ O (80 ° C) for 1 hour. The solid was then filtrated and washed with warm EtOH to give the title compound as a *brown solid* (0.12 g, 29% yield);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 8.96 (s, 1 H, CH $\text{CCO}_2\text{H}$ ), 8.81 (s, 1 H, CH $\text{N}$ ), 8.31 (s, 1 H, CH $\text{CN}$ ), 7.67 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 7.94 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 7.46 (s, 1 H, CH $\text{OCH}_3$ ), 7.44 (d, 2 H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 7.67 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, Ar $\text{H}$ ), 4.02 (s, 3 H, OCH $_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125.78 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 163.9, 156.9, 156.8, 156.4, 148.3, 146.4, 140.3, 127.1, 127.1 ( $\times 2$ ), 125.8 ( $\times 2$ ), 125.7 ( $\times 2$ ), 123.3, 123.2, 115.7, 114.4 ( $\times 2$ ), 111.3, 100.8, 57.5.

**6-(4-(4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1154)**



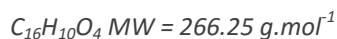
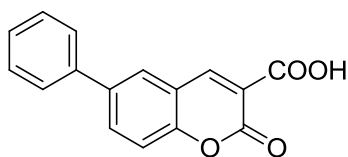
According to General Procedure 8, 6-azido-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.1 g, 0.33 mmol, 1 equiv.) in DMSO (0.6 mL) was reacted with 4'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (076 mg, 0.397 mmol, 1.2 equiv.), and CuI (6.3 mg, 0.033 mmol, 10% equiv.) which gave the *phenyltriazol coumarin* as a *brown solid* (79 mg, 48% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.88 (s, 1 H, CHCO<sub>2</sub>H), 8.67 (s, 1 H, CHN), 8.03 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 87.94 (s, 1 H, CHCN), 7.81 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.76 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.47 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.07 (s, 1 H, CHCNET<sub>2</sub>), 2.93 (q, 4 H, *J* = 7.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.93 (t, 6 H, *J* = 7.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125.78 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 169.5, 164.1, 156.6, 150.6, 148.6, 146.9, 140.3, 138.9, 130.7, 130.4, 130.1, 128.1 (×2), 127.5, 126.3, 125.2, 124.2 (×2), 123.9, 113.9, 111.0, 106.2, 45.4 (×2), 12.10 (×2); HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 496.1979, found 496.1994.

## II.V. Arylcoumarins

### General Procedure 9: Synthesis of *phenylcoumarin* by Suzuki-Miyaura coupling.

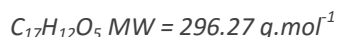
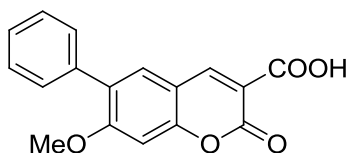
Iodocoumarin derivatives (0.63 mmol, 1 equiv.), phenylboronic ester (0.75 mmol, 1.2 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.316 mmol, 5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.126 mmol, 20% equiv.) were dissolved in a mixture of THF-H<sub>2</sub>O (4:1, 10 mL) and stirred at reflux for 16 h (unless noted otherwise) under argon. Upon completion of the reaction, water was added and the resulting suspension was removed by filtration. The residue was successively washed with water, DCM and Et<sub>2</sub>O then dried to give the title compound. The solid was purified by flash chromatography. The following new compounds were prepared using this procedure.

### 2-oxo-6-phenyl-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1154)



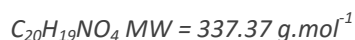
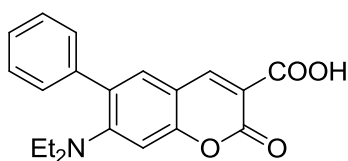
According to General Procedure 9, ethyl 6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.2 g, 0.63 mmol, 1 equiv.) in THF-H<sub>2</sub>O (4:1, 10 mL) was reacted with 4,4,5,5-tetramethyl-2-phenyl-1,3,2-dioxaborolane (0.155 g, 0.75 mmol, 1.2 equiv.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.146 g, 0.126 mmol, 20% equiv.) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.905 g, 3.16 mmol, 5 equiv.) which, after column chromatography (60% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt 40%, AcOH 0.5%), gave the title compound as a *yellow* solid (0.128 g, 76 % yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.79 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 8.23 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 8.03 (dd, 1 H, *J* = 1.5 Hz, 9 Hz, ArH), 7.51 (m, 3 H, ArH), 7.41 (m, 1 H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 156.7, 153.9, 148.4, 148.3, 138.4, 136.7, 132.5, 129.1, 127.9, 126.7 (×2), 118.8, 118.8, 118.4, 116.7; HR-MS (ESI, *m/z*) [M-H]<sup>-</sup>: calcd. for [C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 265.0506, found 265.0518.

### 7-methoxy-2-oxo-6-phenyl-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1161)



According to General Procedure 9, ethyl 6-iodo-7-methoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (0.2 g, 0.58 mmol, 1 equiv.) in THF-H<sub>2</sub>O (4:1, 10 mL) was reacted with 4,4,5,5-tetramethyl-2-phenyl-1,3,2-dioxaborolane (0.141 g, 0.69 mmol, 1.2 equiv.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.133 g, 0.115 mmol, 20% equiv.) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.807 g, 2.89 mmol, 5 equiv.) which, after column chromatography (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH), gave the title compound (0.015 g, 8% yield) as a *beige* solid; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.80 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 7.90 (s, 1 H, CH), 7.54-7.44 (m, 4 H, ArH), 7.48-7.44 (m, 1 H, ArH), 7.26 (s, 1 H, CHCO), 3.96 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 164.1, 161.6, 157.2, 156.3, 149.0, 136.3; 134.0, 131.4, 129.3, 128.2, 127.9, 127.4, 127.3, 114.3, 111.5, 99.3, 56.7; HR-MS (ESI, *m/z*) [M-H]<sup>-</sup>: calcd. for [C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>, 297.0757, found 297.0768.

### 7-(diethylamino)-2-oxo-6-phenyl-2H-chromene-3-carboxylic acid (LSP17-1129)



A49-IV, 7-(diethylamino)-6-iodo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (0.2 g, 0.52 mmol, 1 equiv.) in DMF (4 mL) was reacted for 24 h at 60 °C with 4,4,5,5-tetramethyl-2-phenyl-1,3,2-dioxaborolane (0.42 g, 0.21 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.02 g, 0.025 mmol, 0.05 equiv.) and CsF (0.314 g, 2.06 mmol, 4 equiv.) which after column chromatography (6:4:0.5% of DCM/AcOEt/AcOH), gave the title compound as a *yellow* solid (0.061 g, 35% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> + few drops of TFA-*d*) δ<sub>H</sub>: 8.67 (s, 1 H, CH<sub>2</sub>COOH), 7.61 (s, 1 H, ArH), 7.47 (br, 2 H, ArH), 7.46 (d, 2 H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.36 (m, 1 H, ArH), 6.98 (s, 1 H, CHCN(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.04 (q, 4 H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.9 (t, 6 H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, + few drops of TFA-*d*) δ<sub>C</sub>: 164.2, 157.9, 155.7, 154.6, 149.0, 140.3, 133.2, 130.7, 128.7, 128.0, 127.2, 112.2, 111.0, 105.1, 45.2, 11.9; HR-MS (ESI, *m/z*) [M+H]<sup>+</sup>: calcd. for [C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 338.1387, found 338.1396.





## Références

1. (a) Giacometti, T., Free and bound glutamate in natural products. In: Filer LJ, Garattini S, Kare MR, Wurtman RJ, eds. *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology*. New York, NY: Raven Press **1979**, 25–34; (b) Zhang YJ, S. Z., XuW, Chen G, Li Z. , L-glutamic acid hydrochloride at 153K. . *Acta Crystallogr* **2008**, E64, O446.
2. (a) Sano, C., History of glutamate production. *Am J Clin Nutr* **2009**, 90, 728S–32S; (b) K., I., Leading-edge R&D at Ajinomoto Co, Inc: 50 years of innovation and beyond. Tokyo,. *Japan: Ajinomoto Co, Inc* **2008**.
3. Kinoshita S, U. S., Shimamoto M. , Studies on amino acid fermentation, part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. . *J Gen Appl Microbiol* **1957**, 3, 193–205.
4. Sheldon, A. L.; Robinson, M. B., The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International* **2007**, 51 (6-7), 333-355.
5. Matthews JC, A. K., Recent advances in amino acid transporters and excitatory amino acid receptors. . *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2002**, 5, 77–84.
6. (a) D., H., Glutamine metabolism in the liver: overview and current concepts. . *Metabolism* **1989**, 38, 14–17; (b) Curthoys NP, W. M., Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. . *Ann Rev Nutr* **1995**, 15, 133; (c) Haussinger, D., Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J* **1990**, 267, 281–290.
7. Stumvoll M, P. G., Meyer C, Gerich J. , Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. . *Kidney Int* **1999**, 5, 778–779.
8. (a) Gao ZY, L. G., Najafi H, Wolf BA, Matschinsky FM. , Glucose regulation of glutaminolysis and its role in insulin secretion. . *Diabetes* **1999**, 48, 1535–1542; (b) Tanizawa Y, N. K., Sasaki T, et al. , Unregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion. . *Diabetes* **2002**, 51, 712–717.
9. (a) Newsholme, P., Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post-injury, surgery or infection? . *J Nutr* **2001**, 131, 2515–2522; (b) Wells SM, K. S., Yaqoob P, Wallace F, Calder PC. , Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. . *Nutrition* **1999**, 15, 881–884; (c) Kew S, W. S., Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. , Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. . *J Nutr* **1999**, 29, 1524–1531; (d) Yeh SL, Y. C., Lin MT, Lo PN, Chen WJ. , Effects of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on cytokine production and T cell population in septic rats. . *JPEN* **2001**, 25, 269–274; (e) Moinard C, C. B., Walrand S, et al. , Phagocyte functions in stressed rats: comparison of modulation by glutamine, argine and ornithine 2-oxoglutarate. . *Clin Sci* **1999**, 97, 59–65.
10. Chaudhry, F. A.; Edwards, R. H.; Fonnun, F., Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, 48, 277-301.
11. Sanacora, G.; Zarate, C. A.; Krystal, J. H.; Manji, H. K., Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (5), 426-437.
12. Kew, J. N. C.; Kemp, J. A., Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **2005**, 179 (1), 4-29.
13. Attwell D, G. A., Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* **2005**, 6, 841-849.
14. Gielen, M., Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate. *médecine/sciences* **2010**, 26 (1), 65-72.
15. Sladeczek, F., and al. , Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **1985**, 317, 717.



16. Storck, T.; Schulte, S.; Hofmann, K.; Stoffel, W., Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89* (22), 10955-10959.
17. Kanai, Y.; Hediger, M. A., Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **1992**, *360* (6403), 467-471.
18. Arriza, J. L.; Eliasof, S.; Kavanaugh, M. P.; Amara, S. G., Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94* (8), 4155-4160.
19. Holmseth, S.; Dehnes, Y.; Huang, Y. H.; Follin-Arbelet, V. V.; Grutle, N. J.; Mylonakou, M. N.; Plachez, C.; Zhou, Y.; Furness, D. N.; Bergles, D. E.; Lehre, K. P.; Danbolt, N. C., The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. *Journal of Neuroscience* **2012**, *32* (17), 6000-6013.
20. Underhill SM, W. D., Li M, Watts SD, Ingram SL, Amara SG:, Amphetamine modulates excitatory neurotransmission through endocytosis of the glutamate transporter EAAT3 in dopamine neurons. *Neuron* **2014**, *83*, 404-416.
21. Scimemi, A.; Tian, H.; Diamond, J. S., Neuronal Transporters Regulate Glutamate Clearance, NMDA Receptor Activation, and Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* **2009**, *29* (46), 14581-14595.
22. Jong Y, K. V., Kingston AE, Romano C, O'Malley KL:, Functional metabotropic glutamate receptors on nuclei from brain and primary cultured striatal neurons: role of transporters in delivering ligand. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 30469-30480.
23. Purgert CA, I. Y., Jong YJ, Kumar V, Zorumski CF, O'Malley KL, Intracellular mGluR5 can mediate synaptic plasticity in the hippocampus. *J Neurosci* **2014**, *34*, 4589-4598.
24. Zerangue N, K. M., Interaction of L-cysteine with a human excitatory amino acid transporter. *J Physiol* **1996**, *493*, 419-423.
25. (a) Fairman, W. A.; Vandenberg, R. J.; Arriza, J. L.; Kavanaugh, M. P.; Amara, S. G., An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **1995**, *375* (6532), 599-603; (b) Bar-Peled, O.; Ben-Hur, H.; Biegón, A.; Groner, Y.; Dewhurst, S.; Furuta, A.; Rothstein, J. D., Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *J. Neurochem.* **1997**, *69* (6), 2571-2580.
26. (a) Grewer C, B. P., Weidenfeller C, Bartusel T, Tao Z, Rauen T, Individual subunits of the glutamate transporter EAAC1 homotrimer function independently of each other. *Biochemistry-Us* **2005**, *44*, 11913-11923; (b) Koch HP, B. R., Larsson HP The glutamate-activated anion conductance in excitatory amino acid transporters is gated independently by the individual subunits. *J Neurosci* **2007**, *27*, 2943-2947; (c) Jensen, A. A.; Fahlke, C.; Bjørn-Yoshimoto, W. E.; Bunch, L., Excitatory amino acid transporters: recent insights into molecular mechanisms, novel modes of modulation and new therapeutic possibilities. *Current Opinion in Pharmacology* **2015**, *20*, 116-123; (d) Nothmann D, L. A., Torres-Salazar D, Kovermann P, Hotzy J, Gameiro A, Grewer C, Fahlke Ch, Heterooligomerization of neuronal glutamate transporters. *J Biol Chem Ber* **2011**, *286*, 3935-3943.
27. Guus B. Erkens, I. H. n., Joris M. H. Goudsmits, Dirk Jan Slotboom & Antoine M. van Oijen, Unsynchronised subunit motion in single trimeric sodium-coupled aspartate transporters. *Nature* **2019**, *502*.
28. Grégory Verdon, S. O., Ryan N Serio, Olga Boudker, Coupled ion binding and structural transitions along the transport cycle of glutamate transporters. *Biophysics and structural biology | Neuroscience* **2014**, 1-23.
29. (a) Reyes N, O. S., Boudker O, Binding thermodynamics of a glutamate transporter homolog. *Nat Struct Mol Biol* **2013**, *20*, 634-640; (b) Ewers D, B. T., Machtens JP, Weyand I, Fahlke Ch Induced fit substrate binding to an archeal glutamate transporter homologue. . *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 12486-12491; (c) Focke PJ, M.-L. P., Larsson HP Opposite movement of the external gate of a glutamate transporter homolog upon binding cotransported sodium compared with substrate. *J Neurosci. Lett.* **2011**, *31*, 6255-6262.

30. (a) Reyes N, G. C., Boudker O, Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature* **2009**, *462*, 880-885; (b) Verdon G, O. S., Serio RN, Boudker O, Coupled ion binding and structural transitions along the transport cycle of glutamate transporters. *Elife (Cambridge)* **2014**, *3*, e02283.
31. Veruki ML, M. S., Hartveit E, Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. *Nat Neurosci* **2006**, *9*, 1388-1396.
32. Winter N, K. P., Fahlke Ch, A point mutation associated with episodic ataxia 6 increases glutamate transporter anion currents. *Brain* **2012**, *135*, 3416-3425.
33. (a) Anders A. Jensen, M. N. E., Christina W. Nielsen,† Tine B. Stensbøl, Jan Kehler, and Lennart Bunch, Discovery of the First Selective Inhibitor of Excitatory Amino Acid Transporter Subtype 1. *J. Med. Chem* **2009**, *52*, 912–915; (b) Erichsen, M. N.; Huynh, T. H.; Abrahamsen, B.; Bastlund, J. F.; Bundgaard, C.; Monrad, O.; Bekker-Jensen, A.; Nielsen, C. W.; Frydenvang, K.; Jensen, A. A.; Bunch, L., Structure-activity relationship study of first selective inhibitor of excitatory amino acid transporter subtype 1: 2-Amino-4-(4-methoxyphenyl)-7-(naphthalen-1-yl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chrom ene-3-carbonitrile (UCPH-101). *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (19), 7180-7191; (c) Huynh, T. H.; Shim, I.; Bohr, H.; Abrahamsen, B.; Nielsen, B.; Jensen, A. A.; Bunch, L., Structure-Activity Relationship Study of Selective Excitatory Amino Acid Transporter Subtype 1 (EAAT1) Inhibitor 2-Amino-4-(4-methoxyphenyl)-7-(naphthalen-1-yl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chrom ene-3-carbonitrile (UCPH-101) and Absolute Configurational Assignment Using Infrared and Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy in Combination with ab Initio Hartree-Fock Calculations. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (11), 5403-5412; (d) Jensen, A. A.; Erichsen, M. N.; Nielsen, C. W.; Stensbol, T. B.; Kehler, J.; Bunch, L., Discovery of the first selective inhibitor of excitatory amino acid transporter subtype 1. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (4), 912-915.
34. Lee SG, S. Z., Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, Volsky DJ, Fisher PB Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 13116-13123.
35. Kong Q, C. L., Takahashi K, Liu Q, Schulte DA, Lai L, Ibabao B, Lin Y, Stouffer N, Das Mukhopadhyay C et al. 2014, 124, Small molecule activator of glutamate transporter EAAT2 translation provides neuroprotection. *J Clin Invest* **2014**, *124*, :1255-1267.
36. Adolph, O.; Koster, S.; Rath, M.; Georgieff, M.; Weigt, H. U.; Engele, J.; Senftleben, U.; Fohr, K. J., Rapid increase of glial glutamate uptake via blockade of the protein kinase A pathway. *Glia* **2007**, *55* (16), 1699–1707.
37. Bianchi MG, F.-G. R., Reia L, Allegri M, Uggeri J, Chiu M, Sala R, Bussolati O, Valproic acid induces the glutamate transporter excitatory amino acid transporter-3 in human oligodendrogloma cells. *Neuroscience* **2012**, *227*, 260-270.
38. (a) Kitamura, S. B. a. E., Transport Interactiono f t-Cystine and L-Glutamate in Human Diploid Fibroblasts in Culture. *THE JOURNAL OF BIOLOGICCAHLE MISTRY* **1980**, *255* (6), 2372-2376; (b) Bannai, S., Exchange of Cystine and Glutamate across Plasma Membrane of Human Fibroblasts. *THEJ OURNAOFL B IOLOGICACLH EMISTRY* **1986**, *261* (5), 2256-2263.
39. (a) Sato H, T. M., Ishii T, and Bannai S. , Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem Ber* **1999**, *274*, 11455–11458; (b) Bridges, R. J.; Natale, N. R.; Patel, S. A., System xc-cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British Journal of Pharmacology* **2012**, *165* (1), 20-34.
40. Verrey F, C. E., Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* **2004**, *447*, 532–542.
41. Gasol E, J.-V. M., Chillaron J, Zorzano A, Palacin M, Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 31228–31236.
42. Reig, N., The light subunit of system b<sup>o+</sup> is fully functional in the absen of heavy subunit. *The EMBO Journal* **2002**, *21* (18), 4906-49-14.

43. (a) Shaffer PL, G. A., Shankaranarayanan A, Gouaux E Structure and mechanism of a Na<sup>+</sup>-independent amino acid transporter. . *Science* **2009**, *325*, 1010–1014; (b) Yamashita A, S. S., Kawate T, Jin Y, Gouaux E Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependent neurotransmitter transporters. . *Nature* **2005**, *437*, 215–223.
44. Shaffer PL, G. A., Shankaranarayanan A, Gouaux E Structure and mechanism of a Na<sup>+</sup>-independent amino acid transporter. *Science* **2009**, *325*, 1010–1014.
45. (a) Cho Y, B. S., Uptake of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. . *J Neurochem* **1990**, *55*, 2091–2097; (b) Ye Z, R. J., Sontheimer H, Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci* **1999**, *19*, 10767–10777; (c) Allen JW, S. G., Aschner M Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res.* **2001**, *894*, 131–140.
46. Piani D, F. A., Involvement of the cystine transport system xc<sup>-</sup> in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* **1994**, *152*, 3578–3585.
47. Kato S, I. S., Sugawara K, Mawatari K Cystine/glutamate antiporter expression in retinal muller glial cells: implications for DL-alpha-amino adipate toxicity. *Neuroscience* **1993**, *57*, 473–482.
48. (a) MB, G. G. a. R., Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent LSYSTEM xc<sup>2</sup> IN HEALTH AND DISEASE 547 [3H]glutamate transport and expression of both system xc<sup>-</sup> subunits. . *J Neurochem* **2001**, *78*, 276–286; (b) Patel SA, W. B., Rhoderick JF, Bridges RJ, Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc<sup>(c)-</sup>: an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. . *Neuropharmacology* **2004**, *46*, 273–284.
49. Christensen, M. M. a. N., Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. *J Biol Chem* **1982**, *257*, 5663–5670.
50. (a) Rimaniol AC, H. S., Martin M, Le Grand R, Boussin FD, Dereuddre-Bosquet N, Gras G, and Dormont D. , Na<sup>+</sup> - dependent high-affinity glutamate transport in macrophages. . *J Immunol* **2000**, *164*, 5430–5438; (b) Rimaniol AC, M. P., Clayette P, Dormont D, and Gras G., Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages. . *Am J Physiol Cell Physiol* **2001**, *281*, C1964–C1970.
51. Lewerenz, J.; Hewett, S. J.; Huang, Y.; Lambros, M.; Gout, P. W.; Kalivas, P. W.; Massie, A.; Smolders, I.; Methner, A.; Pergande, M.; Smith, S. B.; Ganapathy, V.; Maher, P., The Cystine/Glutamate Antiporter System xc<sup>-</sup> in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18* (5), 522–555.
52. Kanai Y, H. M., The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. . *Pflugers Arch* **2004**, *447*, 469–479.
53. (a) Baker DA, X. Z., Hui S, Swanson CJ, Kalivas PW The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci* **2002**, *22*, 9134–9141; (b) Xi ZX, S. H., Baker DA, Kalivas PW Inhibition of non-vesicular glutamate release by group III metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens. *J Neurochem* **2003**, *87*, 1204–1212; (c) Mohan A, P. S., Kalivas PW, Nair SS (2011). , *Neural Comput* **2011**, *23*, 984–1014.
54. (a) Kalivas, P., The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. . *Nat Rev Neurosci* **2009**, *10*, 561–572; (b) Madayag A, K. K., Lobner D, Mantsch JR, Wisniewski S, Baker DA, Drug-induced plasticity contributing to heightened relapse susceptibility: neurochemical changes and augmented reinstatement in high-intake rats. *J Neurosci* **2010**, *30*, 210–217.
55. (a) Espey MG, K. Y., Sei Y, Basile AS Extracellular glutamate levels are chronically elevated in the brains of LP-BM5-infected mice: a mechanism of retrovirus-induced encephalopathy. *J Neurochem* **1998**, *71*, 2079–2087; (b) Qin S, C. C., Hinners I, Gervais A, Cheret C, Mallat M System Xc<sup>-</sup> and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. *J Neurosci* **2006**, *26*, 3345–3356; (c) DV, P., Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to

- aminoadipic acid, a selectively transported substrate. . *Glia* **2001**, *34*, 27–38; (d) Shih AY, E. H., Sun X, Toda S, Kalivas PW, and Murphy TH. , Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. . *J Neurosci* **2006**, *26*, 10514–10523; (e) Barger SW, G. M., Porter MM, Beggs ML Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J Neurochem* **2007**, *101*, 1205–1213.
56. Barger SW, B. A., Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. . *J Neurochem* **2001**, *76*, 846–854.
  57. Zeng Y, L. Y., Chen RS, He X, Yang L, and Li W. , Overexpression of xCT induces up-regulation of 14–3-3beta in Kaposi's sarcoma. *Biosci Rep* **2010**, *30*, 277–283.
  58. Domercq M, S.-G. M., Sherwin C, Etxebarria E, Fern R, Matute C System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol* **2007**, *178*, 6549–6556.
  59. Koglin N, M. A., Berndt M, Schmitt-Willich H, Toschi L, Stephens AW, Gekeler V, Friebe M, and Dinkelborg LM. , Specific PET imaging of xc - transporter activity using a 18F-labeled glutamate derivative reveals a dominant pathway in tumor metabolism. . *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 6000–6011.
  60. Christensen, M. M. a. H., Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. . *J Biol Chem* **1982**, *257*, 5663–5670.
  61. Gout P, B. A., Simms C, Bruchovsky N Sulfasalazine, a potent supressor of lymphoma growth by inhibition of the xccystine transporter: a new action of an old drug. . *Leukemia* **2001**, *15*, 1633–1640.
  62. (a) Do KQ, H. P., Streit P, and Cuenod M., Release of neuroactive substances: homocysteic acid as an endogenous agonist of the NMDA receptor. . *J Neural Transm* **1988**, *72*, 185–190; (b) Ebert B, M. U., Johansen TN, and Krogsgaard-Larsen P. , NMDA receptor agonists: relationships between structure and biological activity. . *Adv Exp Med Biol* **1991**, *287*, 483–487.
  63. (a) Brauner-Osborne H, N. B., and Krogsgaard-Larsen P, Molecular pharmacology of homologues of ibotenic acid at cloned metabotropic glutamic acid receptors. *Eur J Pharmacol* **1998**, *350*, 311–316; (b) Kingston AE, L. J., Evans N, Clark B, Tomlinson R, Burnett JP, Mayne NG, Cockerham SL, and Lodge D., Sulphur-containing amino acids are agonists for group 1 metabotropic receptors expressed in clonal RGT cell lines. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 277–287; (c) Monaghan DT, H. P., Jane DE, and Bridges RJ., The excitatory amino acid system. In: *Biological Psychiatry*, edited by D'haenen H, den Boer JA, Westenberg H and Willner P. Chichester:. *John Wiley and Sons Ltd* **2002**, 76–84; (d) Shi Q, S. J., Hufeisen SJ, Rauser L, Grajkowska E, Ernsberger P, Wroblewski JT, Nadeau JH, and Roth BL.. , Lhomocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *305*, 131–142.
  64. Bedingfield JS, K. M., Jane DE, Tse HW, Roberts PJ, and Watkins JC, Structure-activity relationships for a series of phenylglycine derivatives acting at metabotropic glutamate receptors (mGluRs). . *Br J Pharmacol* **1995**, *116*, 3323–3329.
  65. Patel SA, R. T., O'Brien E, Burkhart DJ, Nelson JK, Twamley B et al., Isoxazole analogues bind the System xc- transporter: structure-activity relationship and pharmacophore model. . *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 202–213.
  66. (a) Bai L, X. H., Collins JF, Ghishan FK. , Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 36764–36769; (b) Bellocchio EE, R. R., Fremeau RT Jr, Edwards RH., Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **2000**, *289*, 957–960; (c) Herzog, E.; Bellenchi, G. C.; Gras, C.; Bernard, V.; Ravassard, P.; Bedet, C.; Gasnier, B.; Giros, B.; El Mestikawy, S., The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* **2001**, *21* (22), RC181; (d) Juge, N.; Yoshida, Y.; Yatsushiro, S.; Omote, H.;

- Moriyama, Y., Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (51), 39499-39506; (e) Moriyama, Y.; Yamamoto, A., Vesicular L-glutamate transporter in microvesicles from bovine pineal glands. Driving force, mechanism of chloride anion activation, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (38), 22314-22320; (f) Naito, S.; Ueda, T., Characterization of Glutamate Uptake into Synaptic Vesicles. *J. Neurochem.* **1985**, *44* (1), 99-109; (g) Schäfer MK, V. H., Defamie N, Weihe E, Erickson JD., Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 50734– 50748; (h) Varoqui H, S. M., Zhu H, Weihe E, Erickson JD., Identification of the differentiation-associated Na/Pi transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* **2002**, *22*, 142–155.
67. (a) Naito S, U. T., Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J Biol Chem* **1983**, *258*, 696–699; (b) Takamori, S.; Rhee, J. S.; Rosenmund, C.; Jahn, R., Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **2000**, *407* (6801), 189-194.
68. Ni, B. H.; Rosteck, P. R.; Nadi, N. S.; Paul, S. M., Cloning and Expression of a Cdna-Encoding a Brain-Specific Na<sup>+</sup>-Dependent Inorganic-Phosphate Cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91* (12), 5607-5611.
69. Ozkan, E. D. a. U., T., Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol* **1998**, *77*, 1-10.
70. (a) Ni, B., Wu, X., Yan, G. M., Wang, J. and Paul, S. M., Regional expression and cellular localization of the Na<sup>(+)</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. . *J Neurosci* **1995**, *15*, 5789-5799; (b) Bellocchio, E. E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V. M. and Edwards, R. H, The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. . *J Neurosci* **1998**, *18*, 8648-8659.
71. Raymond Y. N. Lee, E. R. S., Martin Chalfie, H. Robert Horvitz, and Leon Avery, EAT-4, a Homolog of a Mammalian Sodium-Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter, Is Necessary for Glutamatergic Neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **1999**, *19* (1), 159-167.
72. Aihara, Y.; Mashima, H.; Onda, H.; Hisano, S.; Kasuya, H.; Hori, T.; Yamada, S.; Tomura, H.; Yamada, Y.; Inoue, I.; Kojima, I.; Takeda, J., Molecular cloning of a novel brain-type Na<sup>(+)</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* **2000**, *74* (6), 2622–2625.
73. (a) Fremeau, R. T., Jr.; Burman, J.; Qureshi, T.; Tran, C. H.; Proctor, J.; Johnson, J.; Zhang, H.; Sulzer, D.; Copenhagen, D. R.; Storm-Mathisen, J.; Reimer, R. J.; Chaudhry, F. A.; Edwards, R. H., The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (22), 14488-14493; (b) Gras, C.; Herzog, E.; Bellenchi, G. C.; Bernard, V.; Ravassard, P.; Pohl, M.; Gasnier, B.; Giros, B.; El Mestikawy, S., A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* **2002**, *22* (13), 5442-5451; (c) Takamori, S.; Malherbe, P.; Broger, C.; Jahn, R., Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* **2002**, *3* (8), 798-803.
74. Hediger MA, R. M., Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins: Introduction. *Pflugers Arch.* **2004**, *447* (5), 465-8.
75. Omote, H.; Miyaji, T.; Juge, N.; Moriyama, Y., Vesicular Neurotransmitter Transporter: Bioenergetics and Regulation of Glutamate Transport. *Biochemistry-Us* **2011**, *50* (25), 5558-5565.
76. (a) Miyamoto, K.-I.; Haito-Sugino, S.; Kuwahara, S.; Ohi, A.; Nomura, K.; Ito, M.; Kuwahata, M.; Kido, S.; Tatsumi, S.; Kaneko, I.; Segawa, H., Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters: Lessons from Gene Knockout and Mutation Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *100* (9), 3719-3730; (b) Reimer, R. J., SLC17: A functionally

- diverse family of organic anion transporters. *Molecular Aspects of Medicine* **2013**, *34* (2-3), 350-359.
77. (a) Doris Peter, J. J., Yongjian LiulflJt ung Kimln, and Robert H. Edwardsln, The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. . *J Biol Chem*, **1994**. , *269* (10), 7231-7237; (b) Erickson, J. D., et al., , Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (10), 5166-5171.
  78. Bahr BA, C. E., Rogers GA, Noremborg K, Parsons SM. A, kinetic and allosteric model for the acetylcholine transporter-vesamicol receptor in synaptic vesicles. *Biochemistry-U S* **1992**, *31*, 5752–5762.
  79. (a) Johnson, R. G., Jr., , Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* **1988**, *68* (1), 232-307; (b) Nguyen, M. L., G.D. Cox, and S.M. Parsons,, Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. . *Biochemistry*. **1998**, *37* (38), 13400-13410; (c) Gasnier, B., he SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflügers Arch* **2004**, *447*, 756–759.
  80. (a) Fykse EM, F. F., Uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J Neurochem* **1988**, *50* (1), 237–1242; (b) Chaudhry F, R. R., Bellocchio E, Danbolt N, Osen K, Edwards R, Storm-Mathisen J. , The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. . *J Neurosci* **1998**, *18*, 9733–9750.
  81. David L. Foster, M. B., and H. Ronald KabackS, Structure of the lac Carrier Protein of Escherichia coli. *The journal of biological chemistry* **1983**, *268* (1), 31-34.
  82. (a) Jeff Abramson, I. S., Vladimir Kasho, Gillian Verner, H. Ronald Kaback and So Iwata,, Structure and Mechanism of the Lactose Permease of Escherichia coli *Science* **2003**, *301*, 610-615; (b) Yafei Huang, M. J. L., Jinmei Song, Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from Escherichia coli. *Science* **2003**, *5633*, 616-620
  83. Hayashi, M.; Yamada, H.; Uehara, S.; Morimoto, R.; Muroyama, A.; Yatsushiro, S.; Takeda, J.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y., Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (3), 1966-1974.
  84. Omote, H.; Moriyama, Y., Vesicular Neurotransmitter Transporters: An Approach for Studying Transporters With Purified Proteins. *Physiology* **2013**, *28* (1), 39-50.
  85. Almqvist, J.; Huang, Y.; Laaksonen, A.; Wang, D.-N.; Hovmöller, S., Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Science* **2007**, *16* (9), 1819-1829.
  86. Fremeau, R. T., Jr.; Kam, K.; Qureshi, T.; Johnson, J.; Copenhagen, D. R.; Storm-Mathisen, J.; Chaudhry, F. A.; Nicoll, R. A.; Edwards, R. H., Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* **2004**, *304* (5678), 1815-1819.
  87. (a) Fujiyama, F.; Furuta, T.; Kaneko, T., Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *435* (3), 379-387; (b) Edwards, R. H.; Fremeau, R. T.; Troyer, M. D.; Pahner, I.; Nygaard, G. O.; Tran, C. H.; Reimer, R. J.; Bellocchio, E. E.; Fortin, D.; Storm-Mathisen, J., The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **2001**, *31* (2), 247-260; (c) Kaneko, T.; Fujiyama, F., Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res* **2002**, *42* (4), 243-250; (d) Kaneko, T.; Fujiyama, F.; Hioki, H., Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **2002**, *444* (1), 39-62.
  88. (a) Hisano, S.; Sawada, K.; Kawano, M.; Kanemoto, M.; Xiong, G.; Mogi, K.; Sakata-Haga, H.; Takeda, J.; Fukui, Y.; Nogami, H., Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of

- the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **2002**, *107* (1), 23-31; (b) Herzog, E.; Takamori, S.; Jahn, R.; Brose, N.; Wojcik, S. M., Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* **2006**, *99* (3), 1011-1018; (c) Nakamura, K.; Hioki, H.; Fujiyama, F.; Kaneko, T., Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGLUT)1 and VGLUT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *492* (3), 263-288.
89. Erickson, J. D.; Varoqui, H.; Schafer, M. K. H.; Zhu, H. M.; Weihe, E., Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/P-I transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* **2002**, *22* (1), 142-155.
90. (a) Boulland, J. L., Jenstad, M., Boekel, A. J., Wouterlood, F. G., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J., et al., Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb. Cortex* **2009**, *19*, 241-248; (b) Fattorini, G., Verderio, C., Melone, M., Giovedi, S., Benfenati, F., Matteoli, M., et al., VGLUT1 and VGAT are sorted to the same population of synaptic vesicles in subsets of cortical axon terminals. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1538-1546; (c) Zander, J. F., Munster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gomez-Lira, G., Heinemann, U., et al., Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *30*, 7634-7645; (d) Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., et al., Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate post-synaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron* **2011**, *69*, 445-452.
91. Herzog, E.; Gilchrist, J.; Gras, C.; Muzerelle, A.; Ravassard, P.; Giros, B.; Gaspar, P.; El Mestikawy, S., Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* **2004**, *123* (4), 983-1002.
92. Kiyasova, V., Fernandez, S. P., Laine, J., Stankovski, L., Muzerelle, A., Doly, S., et al., A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J. Neurosci. Res.* **2011**, *31*, 2756-2768.
93. El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G. M., Descarries, L., and Trudeau, L. E., From glutamate co-release to vesicular synergy : vesicular glutamate transporters. *Rev. Neurosci* **2011**, *12*, 204-216.
94. Edwards, R. H.; Fremeau, R. T.; Voglmaier, S.; Seal, R. P., VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* **2004**, *27* (2), 98-103.
95. Vigneault, É.; Poirel, O.; Riad, M.; Prud'homme, J.; Dumas, S.; Turecki, G.; Fasano, C.; Mechawar, N.; El Mestikawy, S., Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain. *Frontiers in Neuroanatomy* **2015**, *9*.
96. (a) Peter R. Maycox, T. D. a. R. J., Bacteriorhodopsin drives the glutamate transporter of synaptic vesicles after co-reconstitution. *The EMBO Journal* **1990**, *9* (5), 1465- 1469; (b) Maycox, P. R.; Deckwerth, T.; Hell, J. W.; Jahn, R., Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (30), 15423-15428; (c) Carlson, M. D.; Kish, P. E.; Ueda, T., Glutamate uptake into synaptic vesicles: competitive inhibition by bromocriptine. *J. Neurochem.* **1989**, *53* (6), 1889-1894; (d) Hartinger, J.; Jahn, R., An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (31), 23122-23127; (e) Egashira, Y.; Takase, M.; Takamori, S., Monitoring of Vacuolar-Type H<sup>+</sup> ATPase-Mediated Proton Influx into Synaptic Vesicles. *Journal of Neuroscience* **2015**, *35* (8), 3701-3710.
97. El Mestikawy, S.; Wallén-Mackenzie, Å.; Fortin, G. M.; Descarries, L.; Trudeau, L. E., From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience* **2011**, *12* (4), 204-216.
98. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P.; Müller, S. A.; Rammner, B.; Gräter, F.; Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmüller, H.; Heuser, J.; Wieland, F.; Jahn, R., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, *127* (4), 831-846.

99. Stobrawa, S. M.; Breiderhoff, T.; Takamori, S.; Engel, D.; Schweizer, M.; Zdebik, A. A.; Bosl, M. R.; Ruether, K.; Jahn, H.; Draguhn, A.; Jahn, R.; Jentsch, T. J., Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **2001**, *29* (1), 185-196.
100. Xie, X. S.; Crider, B. P.; Stone, D. K., Isolation and reconstitution of the chloride transporter of clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (32), 18870-18873.
101. Schenck, S.; Wojcik, S. M.; Brose, N.; Takamori, S., A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat Neurosci* **2009**, *12* (2), 156-162.
102. (a) Ryan, R. M.; Mindell, J. A., The uncoupled chloride conductance of a bacterial glutamate transporter homolog. *Nature Structural & Molecular Biology* **2007**, *14* (5), 365-371; (b) Fairman WA, V. R., Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara; (, S., An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel 375599a0. *Nature* **1995**, *375*, 599–603; (c) Eliasof S, J. C. R. g. c. g. t. i. c. t. a. a. c., Retinal glial cell glutamate transporter is coupled to an anionic conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4153–4158.
103. Preobraschenski, J.; Zander, J.-F.; Suzuki, T.; Ahnert-Hilger, G.; Jahn, R., Vesicular Glutamate Transporters Use Flexible Anion and Cation Binding Sites for Efficient Accumulation of Neurotransmitter. *Neuron* **2014**, *84* (6), 1287-1301.
104. (a) Tabb, J. S.; Kish, P. E.; Van Dyke, R.; Ueda, T., Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (22), 15412-15418; (b) Wolosker, H.; de Souza, D. O.; de Meis, L., Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (20), 11726-11731.
105. Juge, N.; Gray, J. A.; Omote, H.; Miyaji, T.; Inoue, T.; Hara, C.; Uneyama, H.; Edwards, R. H.; Nicoll, R. A.; Moriyama, Y., Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* **2010**, *68* (1), 99-112.
106. Biwersi, J., Tulk, B., and Verkman, A.S., Long-wavelength chloridesensitive fluorescent indicators. *Anal. Biochem* **1994**, *219*, 139-143.
107. Takamori, S., Vesicular glutamate transporters as anion channels? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2015**, *468* (3), 513-518.
108. Accardi, A., Unveiling the Secret Lives of Glutamate Transporters: VGLUTs Engage in Multiple Transport Modes. *Neuron* **2014**, *84* (6), 1110-1112.
109. 1999., V. E., Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Epilepsy Research* **1999**, *37* (3), 181-190.
110. Wojcik, S. M.; Rhee, J. S.; Herzog, E.; Sigler, A.; Jahn, R.; Takamori, S.; Brose, N.; Rosenmund, C., An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101* (18), 7158-7163.
111. (a) Moechars, D.; Weston, M. C.; Leo, S.; Callaerts-Vegh, Z.; Goris, I.; Daneels, G.; Buist, A.; Cik, M.; van der Spek, P.; Kass, S.; Meert, T.; D'Hooge, R.; Rosenmund, C.; Hampson, R. M., Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci* **2006**, *26* (46), 12055-12066; (b) Wallen-Mackenzie, A., Gezelius, H., Thoby-Brisson, M., Nygard, A., Enjin, A., Fujiyama, F., et al., Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J. Neurosci. Res.* **2006**, *26*.
112. (a) Oni-Orisan, A., Kristiansen, L.V., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J.H., and McCullumsmith, R.E., Altered vesicular glutamate transporter expression in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **2008**, *63*, 766–775; (b) Uezato, A., Meador-Woodruff, J.H., and McCullumsmith, R.E., Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Bipolar Disord.* **2009**, *11*, 711–725; (c) Eastwood, S. L., and Harrison, P.J., Markers of glutamate synaptic transmission and



- plasticity are increased in the anterior cingulate cortex in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* **2010**, *67*, 1010–1016.
113. (a) Kirvell, S. L.; Esiri, M.; Francis, P. T., Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2006**, *98* (3), 939-950; (b) VanDerHel, W. S., Verlinde, S.A., Meijer, D.H., DeWit, M., Rensen, M.G., Van Gassen, K.L., et al., Hippocampal distribution of vesicular glutamate transporter1 in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **2009**, *50*, 1717–1728.
  114. Wootz, H.; Enjin, A.; Wallen-Mackenzie, A.; Lindholm, D.; Kullander, K., Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37* (1), 58-66.
  115. Kashani, A.; Lepicard, E.; Poirel, O.; Videau, C.; David, J. P.; Fallet-Bianco, C.; Simon, A.; Delacourte, A.; Giros, B.; Epelbaum, J.; Betancur, C.; El Mestikawy, S., Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **2008**, *29* (11), 1619-1630.
  116. (a) Shen, Y.-C.; Liao, D.-L.; Lu, C.-L.; Chen, J.-Y.; Liou, Y.-J.; Chen, T.-T.; Chen, C.-H., Resequencing of the vesicular glutamate transporter 2 gene (VGLUT2) reveals some rare genetic variants that may increase the genetic burden in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **2010**, *121* (1), 179-186; (b) Malet, M.; Brumovsky, P., VGLUTs and Glutamate Synthesis—Focus on DRG Neurons and Pain. *Biomolecules* **2015**, *5* (4), 3416-3437.
  117. (a) Li, J. L.; Fujiyama, F.; Kaneko, T.; Mizuno, N., Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *457* (3), 236-249; (b) Oliveira, A. L.; Hydling, F.; Olsson, E.; Shi, T.; Edwards, R. H.; Fujiyama, F.; Kaneko, T.; Hokfelt, T.; Cullheim, S.; Meister, B., Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse* **2003**, *50* (2), 117-129.
  118. (a) Seal, R. P.; Edwards, R. H., The diverse roles of vesicular glutamate transporter 3. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, (175), 137-150; (b) Amilhon, B.; El Mestikawy, S., VGLUT3 and the mechanism of vesicular synergy. *Med. Sci. (Paris)* **2008**, *24* (12), 1009–1011; (c) Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroeck, J. M., et al., Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies non syndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am. J. Hum. Genet* **2008**, *83*, 278–292.
  119. (a) Amilhon, B., Lepicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., et al. (2010). , VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *30*, 2198–2210; (b) Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., et al; nn2052, he vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *T Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 292–300.
  120. (a) Thompson, C. M.; Davis, E.; Carrigan, C. N.; Cox, H. D.; Bridges, R. J.; Gerdes, J. M., Inhibitors of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Curr Med Chem* **2005**, *12* (18), 2041-2056; (b) Winter, H. C.; Ueda, T., Glutamate uptake system in the presynaptic vesicle: glutamic acid analogs as inhibitors and alternate substrates. *Neurochem. Res.* **1993**, *18* (1), 79-85; (c) Winter, H. C.; Ueda, T., The Glutamate Uptake System in Presynaptic Vesicles: Further Characterization of Structural Requirements for Inhibitors and Substrates. *Neurochemical Research* **2007**, *33* (2), 223-231.
  121. (a) Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Thompson, C. M.; Bridges, R. J., Substituted quinolines as inhibitors of L-glutamate transport into synaptic vesicles. *Neuropharmacology* **1998**, *37* (7), 839-846; (b) Shigeri, Y.; Seal, R. P.; Shimamoto, K., Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* **2004**, *45* (3), 250-265.
  122. Carrigan, C. N.; Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Cybulski, K. A.; Tongcharoensirikul, P.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M., Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-

- dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (11), 2260-2276.
123. Carrigan, C. N.; Esslinger, C. S.; Bartlett, R. D.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M., Quinoline-2,4-dicarboxylic acids: synthesis and evaluation as inhibitors of the glutamate vesicular transport system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (17), 2607-2612.
124. Tamura, Y.; Ogita, K.; Ueda, T., A New VGLUT-Specific Potent Inhibitor: Pharmacophore of Brilliant Yellow. *Neurochemical Research* **2013**, *39* (1), 117-128.
125. (a) Favre-Besse, F.-C.; Poirel, O.; Bersot, T.; Kim-Grellier, E.; Dumas, S.; El Mestikawy, S.; Acher, F. C.; Pietrancosta, N., Design, synthesis and biological evaluation of small-azo-dyes as potent Vesicular Glutamate Transporters inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *78*, 236-247; (b) Omote, H.; Miyaji, T.; Hiasa, M.; Juge, N.; Moriyama, Y., Structure, Function, and Drug Interactions of Neurotransmitter Transporters in the Postgenomic Era. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2016**, *56* (1), 385-402.
126. Roseth, S.; Fykse, E. M.; Fonnum, F., Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J. Neurochem.* **1995**, *65* (1), 96-103.
127. Bole, D. G.; Ueda, T., Inhibition of vesicular glutamate uptake by Rose Bengal-related compounds: Structure-activity relationship. *Neurochem. Res.* **2005**, *30* (3), 363-369.
128. Pietrancosta, N.; Kessler, A.; Favre-Besse, F.-C.; Triballeau, N.; Quentin, T.; Giros, B.; Mestikawy, S. E.; Acher, F. C., Rose Bengal analogs and vesicular glutamate transporters (VGLUTs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (18), 6922-6933.
129. (a) Gegelashvili, G.; Schousboe, A., High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52* (1), 6-15; (b) Tamura, Y.; Ozkan, E. D.; Bole, D. G.; Ueda, T., IPF, a vesicular uptake inhibitory protein factor, can reduce the Ca<sup>2+</sup>-dependent, evoked release of glutamate, GABA and serotonin. *J. Neurochem.* **2001**, *76* (4), 1153-1164.
130. Patel, S. A.; Nagy, J. O.; Bolstad, E. D.; Gerdes, J. M.; Thompson, C. M., Tetrapeptide inhibitors of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17* (18), 5125-5128.
131. (a) Okenne, R., Thomes, R.D., Coumarins: Biology Application and Modes of Action. *Wiley & Sons, Chichester* **1997**; (b) Zahradnik, M., The production and application of fluorescent brightening agents. *Wiley & Sons: Chichester* **1992**.
132. (a) B. E. Evans; K. E. Rittle; M. G. Bock; R. M. DiPardo; R. M. Freidinger; W. L. Whitter; G. F. Lundell; D. F. Veber; P. S. Anderson; R. S. L. Chang; V. J. Lotti; D. J. Cerino; T. B. Chen; P. J. Kling; K. A. Kunkel; J. P. Springer; Hirshfieldt, J., Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235-2246; (b) Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R., Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14* (3), 347-361.
133. (a) Murray, R. D. H., Mendez, J., Brown, S.A., The Natural Coumarins. *Wiley, Chichester, UK* **1982**; (b) Stahmann, M. A., Miyoshi, I., Paul, L.K, 3-Substituted 4-hydroxycoumarin and process of making it. *U.S. Patent 2427578*. **1947**; (c) Yeh-Long Chen, T.-C. W., and Cherng-Chyi Tzeng, Geiparvarin Analogues: Synthesis and Anticancer Evaluation of a-Methylidene-g-butyrolactone-Bearing Coumarins. *Helvetica Chimica Acta* **1999**, *82*.
134. (a) Grandberg, I. I.; Denisov, L. K.; Popova, O. A., 7-Aminocoumarins, Chem. Heterocycl. Compd. (N.Y., NY, U.S.) **1987**, *23*, 117-142; (b) Nataliya Panchuk-Voloshina; Rosaria P. Haugland; Janell Bishop-Stewart; Mahesh K. Bhalgat; Paul J. Millard; Fei Mao, W.-Y. L.; Haugland, R. P., Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1999**, *47* (9), 1179-1188; (c) Luke D. Lavis; Raines, R. T., Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS chemical biology* **2008**, *3*, 142-155; (d) Akira TAKADATE; Toshinobu MASUDA; Chiyomi MURATA; TANAKA, T.; Mitsuru IRIKURA; GOYA, S. i., Fluorescence Characteristics of Methoxycoumarins as Novel Fluorophores. *ANALYTICAL SCIENCES* **1995**, *11*; (e) Patel, R. H. V. H. D., Recent Advances in

- the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. *Synthetic Communications* **2014**, *44* (19), 2756-2788; (f) Akira Takadate; MASUDA, T.; Chiyomi Murata; Miki Shibuya; Akihiko Isobe, Structural futures for fluorescing presents in methoxycoumarins derivates. *chem. pharm. bull* **2000**, *48*, 256-260; (g) Wei-Chuan Sun; Kyle R. Gee; Haugland, R. P., <Sun et al., 1998.pdf>. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 3107-3110.
135. Siegfried E. Drewes , N. D. E., Nazira Karodia & Georgia Loizou, Synthesis of Useful Intermediates from the Claisen-Rearrangement of  $\alpha$ -Hydroxy Alkyl Acrylate Precursors. *Synthetic Communications* **1990**, *20* (10), 1437-1443.
136. K. Sunitha; K. K. Balasubramannian; Rajagopalan, K., *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3125.
137. (a) Gubernator, N. G. Z., H.; Staal, R. G.; Mosharov, E. V.; Pereira, D. B.; Yue, M.; Balsanek, V.; Vadola, P. A.; Mukherjee, B.; Edwards, R. H.; Sulzer, D.; Sames, D., . *Science* **2009**, *324*, (5933), 1441-4., Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* **2009**, *324* (5933), 1441-1444; (b) Kathuria, A.; Gupta, A.; Priya, N.; Singh, P.; Raj, H. G.; Prasad, A. K.; Parmar, V. S.; Sharma, S. K., Specificities of Calreticulin Transacetylase to acetoxy derivatives of 3-alkyl-4-methylcoumarins: Effect on the activation of nitric oxide synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (4), 1550-1556; (c) Elgogary, S. R.; Hashem, N. M.; Khodeir, M. N., Synthesis and Photooxygenation of Linear and Angular Furocoumarin Derivatives as a Hydroxyl Radical Source: Psoralen, Pseudopsoralen, Isopseudopsoralen, and Allopsoralen. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2015**, *52* (2), 506-512.
138. Woods LL, S. J., A New One-Step Synthesis of Substituted Coumarins *J Org Chem* **1962**, *27* (3703).
139. Shirini, F.; Marjani, K.; Nahzomi, H. T.; Zolfigol, M. A., Silica triflate as an efficient reagent for the solvent-free synthesis of coumarins. *Chinese Chemical Letters* **2007**, *18* (8), 909-911.
140. Simmonis H, R. P., <Simonis\_et\_al-1914-Berichte\_der\_deutschen\_chemischen\_Gesellschaft.pdf>. *Chem Ber* **1914**, *47*, 2229.
141. Sethna SM, S. N., Shah RC *J Chem Soc* **1938**, 228.
142. Sethna, S. M. S., N. M., The chemistry of coumarins. *Chem. Rev.* **1945**, *36*, 1-62.
143. De, S. K.; Gibbs, R. A., An Efficient and Practical Procedure for the Synthesis of 4-Substituted Coumarins. *Synthesis-Stuttgart* **2005**, (8), 1231-1233.
144. D. Subhas Bose, A. P. R. a. M. H. B., The indium(III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 9195-9197.
145. Wirtz, L.; Kazmaier, U., A Mild Titanium-Catalyzed Synthesis of Functionalized Amino Coumarins as Fluorescence Labels. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *2011* (35), 7062-7065.
146. ISRAELSTAM, E. V. J. A. S. S., Use of Cation Exchange Resins in Organic Reactions. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 240-242.
147. Zareyee, B. K. a. D., Design of a Highly Efficient and Water-Tolerant Sulfonic Acid Nanoreactor Based on Tunable Ordered Porous Silica for the von Pechmann Reaction. *ORGANIC LETTERS* **2008**, *10* (18), 3989-3992.
148. (a) Antonio de la Hoz, A. M., Ester Vázquez, Use of Microwave Irradiation and Solid Acid Catalysts in an Enhanced and Environmentally Friendly Synthesis of Coumarin Derivatives. *Synlett* **1999**, *5*, 608-610; (b) Singh, V.; Kaur, S.; Sapehiya, V.; Singh, J.; Kad, G., Microwave accelerated preparation of [bmim][HSO] ionic liquid: an acid catalyst for improved synthesis of coumarins. *Catalysis Communications* **2005**, *6* (1), 57-60; (c) Manhas, M. S.; Ganguly, S. N.; Mukherjee, S.; Jain, A. K.; Bose, A. K., Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (14), 2423-2425.
149. (a) Dong, F.; Jian, C.; Kai, G.; Qunrong, S.; Zuliang, L., Synthesis of Coumarins via Pechmann Reaction in Water Catalyzed by Acyclic Acidic Ionic Liquids. *Catalysis Letters* **2007**, *121* (3-4), 255-259; (b) Mahesh K. Potdar, S. S. M. a. M. M. S., Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*,

- 9285–9287; (c) Potdar, M. K.; Rasalkar, M. S.; Mohile, S. S.; Salunkhe, M. M., Convenient and efficient protocols for coumarin synthesis via Pechmann condensation in neutral ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2005**, *235* (1-2), 249-252; (d) Gu, Y.; Zhang, J.; Duan, Z.; Deng, Y., Pechmann Reaction in Non-Chloroaluminate Acidic Ionic Liquids under Solvent-Free Conditions. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2005**, *347* (4), 512-516.
150. John, E. V. O.; Israelstam, S. S., Use of Cation Exchange Resins in Organic Reactions. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 240.
151. Zareyee, B. K. a. D., Design of a Highly Efficient and Water-Tolerant Sulfonic Acid Nanoreactor Based on Tunable Ordered Porous Silica for the vonechmann Reaction. *ORGANIC LETTERS* **2008**, *10* (18), 3989-3992.
152. (a) Liu, Y.; Xiang, K.; Guo, M.; Tian, B.; Zhang, J., A coumarin-based fluorescent probe for the fast detection of Pd0 with low detection limit. *Tetrahedron Letters* **2016**, *57* (13), 1451-1455; (b) Raju, B. C.; Tiwari, A. K.; Kumar, J. A.; Ali, A. Z.; Agawane, S. B.; Saidachary, G.; Madhusudana, K.,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (1), 358-365.
153. (a) B.H.M. Jayakumar Swamy, H. G. M. N., N. Pramod, SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF COUMARIN CARBOHYDRAZIDE CONTAINING QUINOLINE DERIVATIVES. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences* **2002**, *2* (2), 193-202; (b) MASHOOQ A. BHAT, N. S. a. S. A. K., SYNTHESIS OF NOVEL 3-(4-ACETYL-5H/METHYL-5-SUBSTITUTED PHENYL-4,5-DIHYDRO-1,3,4-OXADIAZOL-2-YL)-2H-HROMEN-2-ONES AS POTENTIAL ANTICONVULSANT AGENTS. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research* **2008**, *62* (2), 235-239.
154. Vekariya, R. H.; Patel, H. D., Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. *Synthetic Communications* **2014**, *44* (19), 2756-2788.
155. Mohareb, R. M. H., J. Z.; Mohamed, A. A., Uses of 1-Cyanoacetyl-4-phenyl-3-thiosemicarbazide in Heterocyclic Synthesis: Synthesis of Thiazole, Coumarin, and Pyridine Derivatives with Antimicrobial and Antifungal Activities. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2007**, *182* (8), 1661-1681.
156. Shaabani, A. G., R.; Rahmati, A.; Rezayan, A., Coumarin synthesis via Knoevenagel condensation reaction in 1,1,3,3-N,N',N',N'-tetramethylguanidinium trifluoroacetate ionic liquid. *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, *6* (4), pp 710–714.
157. Perry T. Kaye , M. A. M., Aloysius T. Nchinda & Xolani W. Nocanda, Novel Heterocyclic Analogues of the HIV-1 Protease Inhibitor, Ritonavir. *Synthetic Communications* **2004**, *24* (14), 575-2589.
158. McNab, G. A. C. a. H., Synthesis of Coumarins by Flash Vacuum Pyrolysis of 3-(2-Hydroxyaryl)propenoic Esters. *J. Chem. Research (S)* **1997**, 296-297.
159. Arnab K. Chatterjee, F. D. T., Steven D. Goldberg, and Robert H. Grubbs, Synthesis of coumarins by ring-closing metathesis. *Pure Appl. Chem* **2003**, *75* (4), 421–425.
160. Bernd Schmidt, S. K., Alexandra Kelling, and Uwe Schilde, Synthesis of 8-Aryl-Substituted Coumarins Based on Ring-Closing Metathesis and Suzuki–Miyaura Coupling: Synthesis of a Furyl Coumarin Natural Product from Galipea panamensis. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (5), 2360–2367.
161. K. Sasano; J. Takaya; N. Iwasawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10954-10957.
162. J. Ferguson; F. Zeng; H. Alper, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5602-5605.
163. Song, C. E.; Jung, D.-U.; Choung, S. Y.; Roh, E. J.; Lee, S.-G., *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6309-6311.
164. M. S. Reddy; N. Thirupathi; M. H. Babu; S. Puri, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5878-5888.
165. (a) Sethna, S. M.; Shah, N. M., The chemistry of coumarins. *Chem. Rev.* **1945**, *36*, 1–62; (b) Robertson, A. W., R. B.; Jones, E. T. , *J. Chem. Soc.* **1932**, 1681–1688; (c) Tyagi, B.; Mishra, M. K.; Jasra, R. V., Synthesis of 7-substituted 4-methyl coumarins by Pechmann reaction using nano-crystalline sulfated-zirconia. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, *276* (1-2), 47-56.

166. Daru, J.; Stirling, A., Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (21), 8749-8755.
167. Xingwei Guo; Rong Yu, H. L., and Zhiping Li, Iron-Catalyzed Tandem Oxidative Coupling and Annulation: An Efficient Approach to Construct Polysubstituted Benzofurans. *J. AM. CHEM. SOC.* **2009**, *131*, 17387–17393.
168. Bednarz, S.; Bogdal, D., Kinetic study of the condensation of salicylaldehyde with diethyl malonate in a nonpolar solvent catalyzed by secondary amines. *International Journal of Chemical Kinetics* **2009**, *41* (9), 589-598.
169. Lapworth, A. C. O. H. a. A., Optically Active Esters of p- Ketonic and b-Aldehydic Acids. Part J V. Condensation of Aldehydes with Menthyl Acetoacetate. *J. Chem. Soc.* **1904**, *85*, 46-56.
170. Katja Gräf, T. K., Stephan Kümmel, Mukundan Thelakkat, Synthesis of donor-substituted meso-phenyl and meso-ethynylphenyl BODIPYs with broad absorption. *Electronic Supplementary Material (ESI) for New Journal of Chemistry* **2013**.
171. Nicholas Cairns, L. M. H., David P. Astles, and Alex Orr, Regioselective Preparation of 6-Allyl-7-hydroxycoumarin from 7-Allyloxycoumarin via Boron Halide catalysed ortho-Claisen Rearrangement of 4'-Allyloxycoumaric Acid Derivatives. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 182-183.
172. (a) Taylor, R., *J. chem. Soc. B* **1966**, 727; (b) J. G. HOGGETT; MOODIE, R. B.; SCHOFIELD, J. R. P. K., Nitration and aromatic reactivity. *Cambridge University Press (book)* **1971**, (I), 199-203.
173. (a) Doran, T. M.; Anderson, E. A.; Latchney, S. E.; Opanashuk, L. A.; Nilsson, B. L., An Azobenzene Photoswitch Sheds Light on Turn Nucleation in Amyloid- $\beta$  Self-Assembly. *ACS Chemical Neuroscience* **2012**, *3* (3), 211-220; (b) Kawano, F.; Suzuki, H.; Furuya, A.; Sato, M., Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nature Communications* **2015**, *6*, 6256; (c) Yoonkyung Kim; Hye Hye-youn Jung; Bong Hyun Chung, Reversible fluorescence photoswitch based on dye-crosslinked dendritic nanoclusters for high-contrast imaging living biologic systems. *Patent N° US 8,697,813 B2*.
174. Charles F. Billera, T. B. D., David A. Barry, and Paul S. Engel, Thermolysis of Acylazo O-Trimethylsilyl Cyanohydrins: Azoalkanes Yielding Captodatively Substituted Radicals. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9763-9768.
175. Scher, K. D. a. W. T., Two-phase deshydrogenation of 1,2-substituted hydrazines diazenes (azo compounds). *Synthesis-Stuttgart* **1977**, 339-340.
176. Hinshelwood, B. a., The Kinetics of the Rearrangement and Oxidation of Hydrazobenzene in Solution. Part II: The Catalysed Oxidation. *J. Chem. Soc.* **1957**, 2906-2904.
177. D. H. R. Barton, D. J. L. a. S. V. L., Oxidation of Ketone and Aldehyde Hydrazones, Oximes, and Semicarbazones and of Hydroxylamines and Hydrazo-compounds, using Benzeneseleninic Anhydride. *J.C.S. Perkin* **1978**, *276*, 1272-1277.
178. Merino, E., Synthesis of azobenzenes: the coloured pieces of molecular materials. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (7), 3835.
179. A. Grirrane, A. C. a. H. G. a., Gold-Catalyzed Synthesis of Aromatic Azo Compounds from Anilines and Nitroaromatics. *Science* **2008**, *332* (5908), 1661-1664.
180. Zhang, C.; Jiao, N., Copper-Catalyzed Aerobic Oxidative Dehydrogenative Coupling of Anilines Leading to Aromatic Azo Compounds using Dioxygen as an Oxidant. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (35), 6174-6177.
181. Yu, B.-C.; Shirai, Y.; Tour, J. M., Syntheses of new functionalized azobenzenes for potential molecular electronic devices. *Tetrahedron* **2006**, *62* (44), 10303-10310.
182. Clark-Braun, B. P. a. K. R., Efficient Preparation of Nitrosoarenes for the Synthesis of Azobenzenes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (6), 2350-2352.
183. Zollinger, H., Azo Coupling Reactions. In *Diazo Chemistry I*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2004; pp 346-383.
184. (a) Williams, D. L. H., *Nitrosation*. Cambridge University Press: Cambridge, 1988; (b) Hughes, E. D.; Ingold, C. K.; Ridd, J. H., 13. Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part I. Principles, background, and method for the kinetic study of diazotisation. *J. Chem. Soc.* **1958**,

- 58-65; (c) Hughes, E. D.; Ingold, C. K.; Ridd, J. H., 14. Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part II. Second- and third-order diazotisation of aniline in dilute perchloric acid. *J. Chem. Soc.* **1958**, 65-69; (d) Ridd, J. H., Nitrosation, diazotisation, and deamination. *Chem. Soc. Rev.* **1961**, 15 (4), 418-441.
185. Ridd, J. H., *J. Soc. Dyers Colour.* **1965**, (81), 355.
186. Nicholas Cairns; Laurence M. Harwood; P., D.; Astles, a. A. O., Regioselective Preparation of 6-Allyl-7-hydroxycoumarin from 7-Allyloxycoumarin via Boron Halide catalysed orlho-Claisen Rearrangement of 4'-Allyloxycoumaric Acid Derivatives. *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.*, **1986**, 182-183.
187. Kaminski, R.; Lauk, U.; Skrabal, P.; Zollinger, H., Mechanism of Azo Coupling Reactions XXXIII. pH-dependence and micromixing effects on the product distribution of couplings with 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid. Evidence for N-coupling of a naphthylamine derivative. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66 (7), 2002-2017.
188. Sabino, A. A.; Machado, A. H. L.; Correia, C. R. D.; Eberlin, M. N., Probing the Mechanism of the Heck Reaction with Arene Diazonium Salts by Electrospray Mass and Tandem Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (19), 2514-2518.
189. Wolfgang A. Herrmann, M. E., Jakob Fischer, Christian Kocher, and Georg R. J. Artus, Metal Complexes of N-Heterocyclic Carbenes- A New Structural Principle for Catalysts in Homogeneous Catalysis. *Angewandte Chemie* **1995**, 34 (21), 2371 - 2374.
190. Sonogashira, K., Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp<sup>2</sup>-carbon halides. *journal of organometallic chemistry* **2002**, 653, 46-49.
191. (a) Fahmi Himo; Timothy Lovell; Robert Hilgraf; Vsevolod V. Rostovtsev; Louis Noodleman; K. Barry Sharpless, a. V. V. F., Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. AM. CHEM. SOC.* **2005**, 127, 210-216; (b) Stefan Chassaing; Mayilvasagam Kumarraja; Abdelkarim Sani Souna Sido; Patrick Pale, a. J. S., Click Chemistry in CuI-zeolites: The Huisgen [3 + 2]-Cycloaddition. *Org. Lett.* **2007**, 9 (5), 883-886.
192. (a) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F., Isolation of a Copper(I) Triazolide: A "Click" Intermediate. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46 (12), 2101-2103; (b) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angewandte Chemie* **2005**, 117 (15), 2250-2255; (c) Straub, B. F.,  $\mu$ -Acetylidene and  $\mu$ -alkenylidene ligands in "click" triazole syntheses. *Chemical Communications* **2007**, (37), 3868.
193. (a) NAGY, A.; BAKER, R. R.; WHITTAKER, S. J. M. A. V. P., The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res.* **1976**, 109 (2), 285-309; (b) ZURGIL, N. Z. a. N., STUDIES ON SYNAPTIC VESICLES IN MAMMALIAN BRAIN CHARACTERIZATION OF HIGHLY PURIFIED SYNAPTIC VESICLES FROM BOVINE CEREBRAL CORTEX. *Brain Research* **1979**, 178, 297-310; (c) W. B. HUTTNER; W. SCHIEBLER; P. GREENGARD, a. P. D. C., Synapsin I (Protein I), a Nerve Terminal-Specific Phosphoprotein. III. Its Association with Synaptic Vesicles Studied in a Highly Purified Synaptic Vesicle Preparation. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* **1983**, 96, 1374-1388.
194. Daniels, R. W.; Collins, C. A.; Chen, K.; Gelfand, M. V.; Featherstone, D. E.; DiAntonio, A., A Single Vesicular Glutamate Transporter Is Sufficient to Fill a Synaptic Vesicle. *Neuron* **2006**, 49 (1), 11-16.
195. (a) Jutabha, P.; Anzai, N.; Kitamura, K.; Taniguchi, A.; Kaneko, S.; Yan, K.; Yamada, H.; Shimada, H.; Kimura, T.; Katada, T.; Fukutomi, T.; Tomita, K.; Urano, W.; Yamanaka, H.; Seki, G.; Fujita, T.; Moriyama, Y.; Yamada, A.; Uchida, S.; Wempe, M. F.; Endou, H.; Sakurai, H., Human Sodium Phosphate Transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a Common Renal Secretory Pathway for Drugs and Urate. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285 (45), 35123-35132; (b) Ueda, S. N. a. T., Characterization of Glutamate Uptake into Synaptic Vesicles. *J. Neurodiem* **1985**, 44 (1), 99-109.

196. Ferreira, S. B.; Sodero, A. C. R.; Cardoso, M. F. C.; Lima, E. S.; Kaiser, C. R.; Silva, F. P.; Ferreira, V. F., Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Studies of 1H-1,2,3-Triazole Derivatives of Carbohydrates as  $\alpha$ -Glucosidases Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (6), 2364-2375.
197. (a) Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y.-C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V., Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (9), 1435-1439; (b) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006* (1), 51-68.
198. Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P., Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (6), 1449-1454.
199. (a) Lauria, A.; Delisi, R.; Mingoia, F.; Terenzi, A.; Martorana, A.; Barone, G.; Almerico, A. M., 1,2,3-Triazole in Heterocyclic Compounds, Endowed with Biological Activity, through 1,3-Dipolar Cycloadditions. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, *2014* (16), 3289-3306; (b) Francesca Pagliai, T. P., Erika Del Grosso,; Riccardo Di Brisco, G. C. T., Giovanni Sorba, and; Genazzani, A. A., Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 467-470.
200. Christina N. Carrigan; Richard D. Bartlett; C. Sean Esslinger; Kimberly A. Cybulski; Pakamas Tongcharoensirikul; Richard J. Bridges, a. C. M. T., Synthesis and in Vitro Pharmacology of Substituted Quinoline-2,4-dicarboxylic Acids as Inhibitors of Vesicular Glutamate Transport. *J. Med. Chem* **2002**, *45*, 2260-2276.
201. (a) Chen, K.; Guo, Y.; Lu, Z.; Yang, B.; Shi, Z., <Novel Coumarin-based Fluorescent Probe for Selective Detection of Bisulfite Anion in Water.pdf>. *Chinese journal of chemistry* **2010**, *28*, 55 - 60; (b) Mizukami, S.; Watanabe, S.; Hori, Y.; Kikuchi, K., <Covalent Protein Labeling Based on Noncatalytic b-Lactamase and a Designed FRET Substrate.pdf>. *American Chemical Society* **2009**, *131*, 5016-5017; (c) Zhang, B.; Ge, C.; Yao, J.; Liu, Y.; Xie, H.; Fang, J., Selective Selenol Fluorescent Probes: Design, Synthesis, Structural Determinants, and Biological Applications. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (2), 757-769.
202. (a) Corma, A.; Serna, P., Chemoselective hydrogenation of nitro compounds with supported gold catalysts. *Science* **2006**, *313* (5785), 332-334; (b) Garcia-Amoros, J.; Nonell, S.; Velasco, D., Photo-driven optical oscillators in the kHz range based on push-pull hydroxyazopyridines. *Chem Commun* **2011**, *47* (13), 4022-4024.
203. Xie, J.; Seto, C. T., A two stage click-based library of protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (1), 458-473.







## **Résumé**

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central. Avant sa libération par exocytose, le glutamate est accumulé dans les vésicules synaptiques par les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3). Les VGLUTs sont des biomarqueurs spécifiques de la neurotransmission glutamatergique et leur implication dans les désordres neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, a été établie au cours des 10 dernières années. Ils représentent des cibles thérapeutiques clés pouvant être utilisés spécifiquement pour les études physiopathologiques ou le diagnostic des maladies impliquant le système glutamatergique. Toute fois, malgré leur importance, la pharmacologie de ces transporteurs reste très pauvre et limite les investigations. Les modulateurs développés, à ce jour, se limitent à quelques analogues du substrat naturel et les colorants tels que le Rose Bengale et le Bleu Trypan. Nous avons développé des bioisostères affins, sélectifs, fluorescents et post-fonctionnalisables du Bleu Trypan en pharmacomodulant les motifs polaires naphtyles par des fluorophores coumariniques. Les activités biologiques de ces composés ont été mesurées *in vitro* sur des vésicules synaptiques purifiées à partir de cerveaux de rats. Ces modulateurs seront utilisés comme outils pharmacologiques pour mieux comprendre l'implication des VGLUTs dans les désordres neurologiques.

## **Abstract**

Vesicular Glutamate Transporters (VGLUTs) allow the loading of presynaptic glutamate vesicles and thus play a crucial role in glutamatergic synaptic transmission. The implication of VGLUTs in several major neuropathologies as Alzheimer or Parkinson's disease have characterized during the last decades. Moreover, VGLUTs represent the best biomarker for glutamatergic neuropathologies and key biological target for their diagnostic or treatment. Despite the pivotal role of VGLUTs, their pharmacology appears quite limited. Known competitive inhibitors are restricted to some dyes such as Trypan Blue and glutamate analogs. The lack of pharmacological tools has heavily hampered VGLUTs investigations. To better understand VGLUTs implications, we proposed to synthesize specific VGLUTs inhibitors with high selectivity and improved pharmacological properties. In particular, we focused our attention in the design of fluorescent analogs. These modulators could be used as imaging biomarkers to study glutamatergic neurotransmission in physio-pathological context. We selected fluorescent scaffolds, such as coumarins to perform scaffold hopping of Trypan Blue naphthyl moiety. These compounds have been evaluated for their ability to block glutamate uptake into isolated presynaptic vesicles purified from rat brain.