



HAL
open science

Synthèse d'antidotes multi-cibles contre les intoxications par des neurotoxiques organophosphorés.

Pierre Dubois-Geoffroy

► **To cite this version:**

Pierre Dubois-Geoffroy. Synthèse d'antidotes multi-cibles contre les intoxications par des neurotoxiques organophosphorés.. Chimie organique. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR096 . tel-04642674

HAL Id: tel-04642674

<https://theses.hal.science/tel-04642674>

Submitted on 10 Jul 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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Synthèse d'antidotes multi-cibles contre les intoxications par des neurotoxiques organophosphorés

Présentée et soutenue par
Pierre DUBOIS-GEOFFROY

Thèse à caractère confidentiel soutenue le 14 décembre 2021
devant le jury composé de

Pr. José MARCO CONTELLES	Professeur, Institut de Chimie Organique Générale – Centre National Espagnol de la Recherche	Rapporteur
Pr. Delphine JOSEPH	Professeur, Université Paris Saclay	Rapporteuse
Pr. Sylvie DUCKI	Professeur, Clermont Auvergne INP – SIGMA Clermont	Examinatrice
Dr. José DIAS	Chercheur en biochimie et biologie structurale, Institut de Recherche Biomédicale des Armées	Examineur
Dr. Rómulo ARAOZ	Chargé de recherche, Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot – CEA Saclay	Examineur
Pr. Thomas LECOURT	Professeur, INSA de Rouen	Examineur
Pr. Ludovic JEAN	Professeur, Université de Paris	Examineur Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	Examineur Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr. Ludovic JEAN et le Pr. Pierre-Yves RENARD, laboratoire COBRA UMR 6014

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier tous les membres du jury, le Pr. José Marco-Contelles, la Pr. Delphine Joseph, la Pr. Sylvie Ducki, le Pr. Thomas Lecourt, le Dr. José Dias, le Dr. Rómulo Aráoz et bien sûr mes deux directeurs de thèse, pour avoir bien voulu juger ces travaux en me faisant profiter de leur expertise dans leurs domaines respectifs.

Mes remerciements vont ensuite à mes deux directeurs de thèse, les professeurs Ludovic Jean et Pierre-Yves Renard. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ce projet qui m'a passionné et surtout de m'avoir laissé cette si grande autonomie, sans pression d'aucune sorte, qui, si elle peut parfois mener à des erreurs, est justement très formatrice pour un futur chercheur et très stimulante.

Ludo, tu as été un directeur de thèse idéal, ouvert, disponible, et ça a été pour beaucoup dans le fait que ces trois années se sont bien déroulées. Merci aussi de m'avoir fait participer à de nombreux congrès quand c'était encore possible, et encore félicitations pour ton nouveau poste où je te souhaite de mener à bien de nouveaux beaux projets.

Je voudrais remercier aussi tous nos collaborateurs des projets CNS antidote et Multidote, en particulier les membres de l'IRBA, dont les Dr. José Dias et Guihem Calas, avec qui c'est un plaisir de travailler, toujours dans la bonne humeur, et du CEA, les Dr. Denis Servent et Rómulo Aráoz qui avez gentiment accepté de m'accueillir dans votre laboratoire quelques jours. Merci Rómulo de m'avoir formé aux mesures d'électrophysiologie, c'était très intéressant.

A l'IRCOF, je voudrais remercier les membres des services analytiques sans qui rien ne serait possible, notamment Tiatia et Emilie. Merci pour votre bonne humeur, merci de m'avoir permis d'utiliser du TFA ! et d'être aussi disponibles malgré les hordes de doctorant venant vous voir ;)

Je voudrais remercier également tous les membres de l'institut qui participent à son bon fonctionnement et toutes les personnes à qui j'ai pu demander à un moment donné une information ou du matériel, ou qui m'ont formé à leur utilisation. En particulier je voudrais remercier les bons conseils du Pr. Thomas Lecourt et du Dr. Sébastien Balieu, et pour ce dernier les histoires folles et drôles qui pimentent les journées au labo.

Merci aussi à Maxime Henoc, tu as été le stagiaire rêvé pour ce premier encadrement, et merci aussi Brice.

Merci à tous les doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer, les anciens et les nouveaux. Merci à Pierrick et Mégane pour votre super accueil quand je suis arrivé dans cette demi-cellule 256. L'ambiance n'aurait aussi pas été la même sans vous Maxime, Alexis et Margot, et encore bravo pour vos postes.

Et merci Madeleine, Steven de vivre avec moi cette aventure commencée (presque) en même temps, ainsi que les amis plus récents : Antoine bien sûr, et Vincent, Stifler et Valentin. Avec ces repas du midi et les discussions géniales qu'il y a pu y avoir ;) et notre découverte de Rouen et de ses atouts qui va continuer je l'espère bien ! mais aussi du Havre, oui Antoine ! c'était top. Merci de m'avoir fait (re)découvrir les échecs (un club ? quel club ?) ou encore le rugby.

Vous tous mettez une super ambiance, Chloé, Mathieu et Guillaume, et tous les autres du 2^{ème} étage. Et bonne chance pour la suite, Romain et Blaise, sur ces fameux réactivateurs.

Merci à ma famille qui m'a toujours soutenu, à toi Adrien, à papi mamie, sur qui je pourrai toujours compter.

Enfin, merci à toi maman, de m'avoir toujours soutenu dans mes projets, dans les bons et moins bons moments, je te dois énormément pour là où j'ai pu arriver, tu es la maman parfaite, ne changes pas, MERCI !

Abréviations, formules et acronymes

5-HT	5-hydroxytryptamine receptor
2-PAM	Pralidoxime
AcCoA	Acétylcoenzyme A
AChBP	Acetylcholine binding protein
ACN	acétonitrile
AID	Agence de l'Innovation de Défense
Ac	acétique
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADOC	4-amino-2-(diéthylaminométhyl)phénol
AGO-PAM	Agonist – positive allosteric modulator
Ala	Alanine
ANR	Agence nationale de la recherche
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
BBB	Blood Brain barrier
BChE	Butyrylcholinestérase
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BINAP	2,2'-Bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyl
Bn	Benzyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
CEA	Commissariat à l'énergie atomique
ChAT	Choline acétyltransférase
ChE	Cholinestérase
CNS-MPO	Central nervous system multiparameter optimization

Cu(acac) ₂	Copper(II) acetylacetonate
DCM	Dichlorométhane
DEMP	Diéthylméthylphosphate
DFT	Density functional theory
DIBAL	Diisobutylaluminium hydride
DMA	Diméthylacétamide
DMF	Diméthylformamide
DMMP	Diméthylméthylphosphate
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
dppf	1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocene
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
ED ₅₀	Dose efficace médiane
EP	Ether de pétrole
équiv	équivalent
EtOAc	Acétate d'éthyle
f _{u,brain}	Fraction de produit dans le cerveau et non liée à ses tissus
GA	Tabun
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Cyclosarin
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
hAChE	Acétylcholinestérase humaine
HBA	H-bond acceptor / nombre de groupes accepteurs de liaisons hydrogène

hBChE	Butyrylcholinestérase humaine
HBD	H-bond donor / nombre de groupes donneurs de liaisons hydrogène
HI-6	Asoxime
His	Histidine
HPLC	High pressure liquid chromatography / Chromatographie liquide en haute pression
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
HTS	High-throughput screening (criblage à haut rendement)
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IP	Intrapéritonéal
IP	Indice de protection
IRBA	Institut de recherche biomédicale des armées
K _D	Constante de dissociation
k _{obs}	Constante cinétique observée à une concentration donnée
k _r	Constante cinétique de réactivation
k _{r2}	Efficacité de réactivation
LCT ₅₀	Concentration létale médiane par inhalation
DL ₅₀	Dose létale médiane
Leu	Leucine
Log(BB)	Pénétration de la barrière hémato-encéphalique à l'équilibre
LogD	Distribution coefficient
LogP	Partition coefficient
LogPS	Permeability surface / Vitesse de diffusion passive à travers la BHE
LTMB	Laboratoire de toxicologie moléculaire et biotechnologies
LüH-6	Obidoxime
mAChR	Récepteur muscarinique
MeSO ₃ H / MsOH	Acide méthanesulfonique

MINA	Monoisonitrosoacétone
MMB-4	Méthoxime
MMFF	Merck Molecular Force Field
MRT	Mean residence time
Ms	Méthanesulfonate / mésylate
MsCl	Chlorure de méthanesulfonate
MTDA	Multi-target directed antidote / antidote multi-cibles
MTDL	Multi-target directed ligand / ligand multi-cibles
MW	Molecular weight / Masse molaire
mw	Microwave
NAM	Negative allosteric modulator / modulateur allostérique négatif
nAChR	Récepteur nicotinique
NCS	N-chloro succinimide
ND	Non déterminé
NEDPA	4-Nitrophényl Ethyl Diméthyl phosphoramidate
NEMP	4-Nitrophényl Ethyl Méthyl phosphonate
NIMP	Nitrophényl Isopropyl méthyl Phosphonate
NMDA	Récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate
NOP	Neurotoxique organophosphoré
NTf ₂ ⁻	Bis(trifluorométhylsulfonyl)imide
OIAC	Organisation pour l'interdiction des armes chimiques
OP	Organophosphoré
OX	oxime
PAM	Positive allosteric modulator / Modulateur allostérique positif
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
PAS	Peripheral anionic site
PDB	Protein Data Bank
Pd/C	Palladium sur charbon

P _e	Perméabilité
P-gp	Glycoprotéine P
Ph	Phényl
PIQ	Phényltétrahydroisoquinoline
PON	Paraoxonase
Pox	Paraoxon
POX	Oxime phosphylée
PPTS	Pyridinium paratoluenesulfonate
PS	Produit de perméabilité – surface spécifique
pTsOH	Acide paratoluenesulfonique
QM/MM	Quantum mechanics / molecular mechanics
QNB	3-quinuclidinyl benzoate
RB	Rotative bond / liaisons rotatives
RMN	Résonance magnétique nucléaire
r.t.	Room temperature
SA	Sulfate d'atropine
SAM	Silent allosteric modulator / Modulateur allostérique silencieux
Ser	Sérine
SNAPS	Synaptosome-associated proteins
SNC	Système nerveux central
t.a.	Température ambiante
TBDPS	Tertbutyldiphénylsilyle
t-BuOH	Tert-butanol
TcAChE	<i>Torpedo californica</i> acétylcholinestérase
TFA	Acide trifluoroacétique
TfO	Triflate
THF	Tétrahydrofurane
THP	Tétrahydropyranyle

TLC	Thin-layer Chromatography (CCM)
TMB-4	Trimedoxime
TMSN ₃	Azoture de triméthylsilyle
TPSA	Topological polar surface area
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UHPLC	Ultra-high pressure liquid chromatography / Chromatographie à ultra-haute pression
UV	Ultra-violet
Val	Valine
VE	(2-(diéthylamino)éthyl) O-éthyl éthylphosphonothioate
VG	(2-(diéthylamino)éthyl) O,O-diéthyl phosphorothioate
VM	(2-(diéthylamino)éthyl) O-éthyl O-méthyl phosphorothioate
VR	(2-(diéthylamino)éthyl) O-isobutyl méthylphosphonothioate
VX	(2-(diisopropylamino)éthyl) O-éthyl méthylphosphonothioate
Xantphos	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène

Table des matières

PREAMBULE	29
INTRODUCTION. CONTROLE DE LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE LORS D'INTOXICATIONS AUX NOPS.	39
1. HISTORIQUE DES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES	41
1.1. Structure générale.....	41
1.2. Les pesticides.....	42
1.3. Les armes chimiques	43
1.3.1. Développement	43
1.3.2. Utilisations	45
2. LES EFFETS D'UNE INTOXICATION AUX OPS	47
2.1. Rôle de l'AChE au sein des synapses et des jonctions neuro-musculaires	48
2.2 Rôle de la butyrylcholinestérase	50
2.3. Structure et mécanisme des cholinestérases.....	50
2.3.1 Structure et mécanisme de l'AChE	51
2.3.1.1. Site périphérique.....	52
2.3.1.2. Gorge.....	52
2.3.1.3. Site d'acylation.....	53
2.3.2 Structure de la BChE	54
2.3.2.1. Site périphérique.....	55
2.3.2.2 Gorge.....	56
2.3.2.3 Site d'acylation.....	56

2.3. Inhibition des cholinestérases par les organophosphorés	56
2.4. Conséquences physiologiques et pathologiques	60
3. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES ORGANOPHOSPHORES	63
3.1. Prophylaxie	63
3.1.1. Ligands des cibles biologiques	63
3.1.2. Bioépurateurs	65
3.1.2.1. Cages moléculaires.....	66
Cyclodextrines.....	66
Autres cages moléculaires	66
3.1.2.2. Bioépurateur protéique stoechiométrique	67
3.1.2.3. Bioépurateur protéique pseudo-catalytique	68
3.1.2.4. Bioépurateur protéique catalytique	69
3.2. Traitement pharmacologique d'urgence	71
3.3. Réactivation de l'AChE – mécanisme	72
3.4. Pharmacologie des réactivateurs de référence	74
3.4.1. Efficacité <i>in vitro</i>	74
3.4.2. Relation structure – activité	76
3.4.3. Pharmacodynamique des réactivateurs	77
3.4.4. Pharmacocinétique et stabilité des réactivateurs	79
3.4.5. Efficacité <i>in vivo</i>	80
3.5. Limites des réactivateurs de référence et spécificités attendues	81
3.5.1. Phénomène de recapture	82
3.5.2. Equilibre affinité/inhibition de l'AChE	82

3.5.3. Toxicité.....	83
3.5.4. Passage de la barrière hémato-encéphalique	83
3.5.5. Cahier des charges du réactivateur idéal	85
3.6. Développement de nouveaux réactivateurs	86
3.6.1. Pyridinium aldoximes et autres fonctions réactivatrices chargées.....	86
3.6.2. Bispyridinium aldoximes	89
3.6.3. Fonctions réactivatrices neutres	90
3.6.4. Conclusion.....	93
3.7. Travaux précédents du laboratoire	94
3.7.1. La fonction réactivatrice 3-hydroxy pyridine aldoxime.....	94
3.7.2. Fonctionnalisation pour obtenir une meilleure affinité et le passage de la BHE. 95	
3.7.3. Conclusion et perspectives	96
4. LUTTE CONTRE LES SYMPTOMES CHOLINERGIQUES	97
4.1. L'arsenal imparfait des traitements symptomatiques	97
4.2. Les récepteurs nicotiniques.....	98
4.2.1. Intérêts du contrôle de l'activité des nAChRs	98
4.2.2. Structure et fonctionnement des nAChRs	99
4.2.3. Modulation allostérique des nAChRs	103
4.2.4. Développement de nouveaux traitements.....	106
4.2.4.1. Antagonistes compétitifs des nAChRs des jonctions neuro-musculaires... 106	
4.2.4.2. Antagonistes des nAChRs neuronaux	107
4.2.4.3. Modulateurs allostériques négatifs	107
4.2.4.4. Ligands multi-cibles.....	109

4.2.5. Conclusion.....	110
5. L'APPROCHE MULTI-CIBLE	111
5.1. Avantages du concept multi-cibles	111
5.2. Conditions de l'efficacité d'un ligand multi-cibles	111
5.3. Conception du ligand multi-cibles.....	112
5.4. Défis d'un antidote multi-cibles AChE/nAChR	112
6. CONCLUSION - OBJECTIF.....	114
CHAPITRE I : SYNTHÈSE DE REACTIVATEURS NON CHARGES ET LEUR EVALUATION <i>IN VIVO</i>	117
1. TRAVAUX PRECEDENTS SUR LES REACTIVATEURS NEUTRES	119
1.1. Etapes de conception des nouveaux réactivateurs neutres	119
1.2. Résultats <i>in vitro</i> et sélection	121
1.3. RM048 : résultats <i>in vivo</i> partiels	125
1.3.1. Indices de protection	126
1.3.2. Pharmacocinétique	127
1.4. Objectif	129
2. SYNTHÈSE	129
2.1. Rétrosynthèse.....	129
2.2. Synthèse de l'intermédiaire 8	131
2.3. Synthèse du RM048	132
2.4. Synthèse du AB745	135
2.5. Synthèse du AB647	138

2.6. Purification et formulation	140
2.6.1. Ancienne et nouvelle méthode	140
2.6.1. Difficultés de purification et d'analyse de la pureté	141
2.6.3. Analyse UHPLC/MS	142
2.6.4. Sels d'hexafluorophosphate et de bis(trifluorométhylsulfonyle)imide	144
3. EVALUATION <i>IN VIVO</i>	144
3.1. AB647 TFA	144
3.2. AB745 TFA	145
3.3. RM048	145
3.3.1. Pharmacocinétique	145
3.3.2. Dose létale médiane	146
3.3.3. Dose sans effet nocif observable	146
3.3.4. Indices de protection	146
3.3.4.1. Sans atropine	147
3.3.4.2. Avec sulfate d'atropine	148
4. ELECTROPHYSIOLOGIE DU RM048 SUR LES RECEPTEURS NICOTINIQUES ALPHA7	149
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	150
CHAPITRE II : SYNTHÈSE D'ANTIDOTES MULTI-CIBLES (MTDA), REACTIVATEURS DES CHOLINESTERASES ET ANTAGONISTES DES RECEPTEURS NICOTINIQUES	155
1. CONCEPT DES MTDAS REACTIVATEURS DE CHOLINESTERASES ET ANTAGONISTES DES NACHRS	157
1.1. Effet antagoniste des réactivateurs avec un ligand aminé	157

1.2. Choix d'un ligand ammonium quaternaire	158
1.2.1. Avantages et inconvénients.....	158
1.2.2. Quaternarisation de RM048 et AB639	159
1.2.3. Choix du ligand quinuclidinium	160
2. CRITERES DE SELECTION <i>IN SILICO</i>	164
2.1. Passage de la BHE et propriétés physico-chimiques.....	164
2.1.1. Critères CNS+	164
2.1.2. Score CNS MPO	165
2.1.3. Prédiction par le logiciel Percepta	166
2.1.4. Calculs et détermination des différents paramètres.....	167
2.2. Affinité et positionnement dans l'AChE phosphylée : amarrage moléculaire	168
2.2.1. Préparation du site de liaison	169
2.2.2. Préparation du ligand	170
2.2.3. Résultats.....	170
3. SELECTION <i>IN SILICO</i>	171
3.1. Passage de la BHE	171
3.1.1. Percepta	171
3.1.2. Modèles basés sur les propriétés physico-chimiques	172
3.1.2.1. Score CNS MPO et critères CNS+	172
3.1.2.2. Autres propriétés	173
3.2. Etude d'amarrage moléculaire sur l'AChE inhibée.....	174
4. OBJECTIF.....	177

5. SYNTHÈSE	177
5.1. Concept multi-cibles : synthèse de la fonction réactivatrice seule	177
5.2. Synthèse du MTDA 26 portant le ligand méthylmorpholinium	179
5.3. Synthèse du MTDA 29 portant le ligand quinuclidinium et un bras espaceur de 5 carbones	184
5.4. Synthèse du MTDA 28 portant le ligand quinuclidinium et un bras espaceur de 4 carbones	185
5.5. Synthèse du MTDA 27 portant le ligand diméthylpiperazinium	187
5.6. Efficacité de synthèse : comparaison avec la littérature	189
6. PURIFICATION ET FORMULATION	193
7. EVALUATIONS BIOLOGIQUES	195
7.1. Evaluation <i>in vitro</i> sur l'hAChE inhibée	195
7.2. Evaluation <i>in vitro</i> sur l'hBChE inhibée	197
7.3. Electrophysiologie sur les récepteurs nicotiques	198
7.3.1. $\alpha 7$	198
7.3.1.1. Fonction réactivatrice	198
7.3.1.2. MTDAs	200
7.3.2. nAChR musculaire ($\alpha 1$) ₂ $\beta 1\gamma\delta$	202
7.4. Action multi-cibles : affinité et sélectivité	203
7.5. Sélection pour évaluation <i>in vivo</i>	205
8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	206

CHAPITRE III : ACCES A DES ANTIDOTES MULTI-CIBLES (MTDA), REACTIVATEURS DES CHOLINESTERASES ET MODULATEURS ALLOSTERIQUES DES RECEPTEURS

NICOTINIQUES	211
1. EFFETS DES MODULATEURS ALLOSTERIQUES SUR LES RECEPTEURS NICOTINIQUES ET SELECTION DES STRUCTURES CIBLES	213
1.1. Intérêt des PAMs et des NAMs.....	213
1.2. Critères de sélection	215
1.3. PAM de type II sélectionnés	216
1.3.1. TQS et GAT107	216
1.3.2. PNU-120596.....	218
1.3.2.1. Effet in vitro et site de liaison	218
1.3.2.2. Effet in vivo	220
1.3.2.3. NS-1738	220
1.3.3. SB-206553	221
1.3.3.1. Effet in vitro et site de liaison	221
1.3.3.2. Effet in vivo	222
1.4. NAM sélectionnés.....	223
1.4.1. Physostigmine.....	223
1.4.1.1. Effet in vitro et site de liaison	223
1.4.1.2. Affinité pour l'ACHé.....	226
1.4.1.3. Effet in vivo	227
1.4.2. Mécamylamine	227
2. CONCEPTION DES MTDAS ET PREMIERE SELECTION <i>IN SILICO</i>	228

2.1. Contraintes sur les pharmacophores des modulateurs allostériques	228
2.2. MTDA avec bras espaceur	229
2.2.1. Structures envisageables	229
2.2.2. Sélection avec Percepta®	230
2.3. MTDA intégré ou combiné	230
2.3.1. Stratégie basée sur les similitudes de structure	230
2.3.2. Structures basées sur le PNU-120596	232
2.3.3. Structures basées sur le SB-206553.....	233
2.3.4. Structures basées sur la physostigmine	234
3. SELECTION <i>IN SILICO</i>	234
3.1. Passage de la BHE	234
3.1.1. Percepta	234
3.1.2. Modèle CNS+ et score CNS MPO	236
3.1.3. Autres propriétés	237
3.2. Etude d'amarrage moléculaire	238
4. OBJECTIF.....	242
5. SYNTHÈSE	242
5.1. Rétrosynthèse.....	242
5.2. Réaction d'hydroxycarbonylation	243
5.2.1. Mécanisme.....	243
5.2.2. Optimisations du protocole	246
5.3. Synthèse du PNU-120596 et du MTDA 63 correspondant	247

5.3.1. Synthèse du PNU-120596	247
5.3.2. Validation de la liaison ligand-fonction réactivatrice par une fonction urée.....	248
5.3.3. Sélection du groupement protecteur du phénol.....	249
5.3.3.1. Protection du phénol par un groupe protecteur silylé	249
5.3.3.2. Intérêt du groupe orthonitrobenzyle.....	250
5.3.4. 1 ^{ère} voie de synthèse.....	251
5.3.5. 2 ^{ème} voie de synthèse.....	254
5.3.6. Conclusion.....	260
5.4. Synthèse du SB-206553 et du MTDA 66 correspondant.....	260
5.4.1. Voie de synthèse de 66.....	260
5.4.2. Synthèse du fragment 119.....	261
5.4.3. Synthèse du fragment 90.....	263
5.4.4. Synthèse du SB-206553 et du composé 66	265
5.4.5. Conclusion.....	268
5.5. Efforts synthétiques déployés pour la synthèse du MTDA 67 dérivé de la physostigmine	269
5.5.1. Voie de synthèse de 67	269
5.5.2. Synthèse du noyau pyridine fonctionnalisé	270
5.5.2.1. 1 ^{ère} voie de synthèse	270
5.5.2.2. 2 ^{ème} voie de synthèse.....	271
5.5.3. Synthèse du fragment 129.....	272
5.5.4. Couplage des fragments 129 et 127 et dernières étapes.....	276
5.6. Conclusion	278
6. FORMULATION DES COMPOSES TESTES.....	278

6.1. Composé dérivé de la physostigmine	278
6.2. Composés dérivés du PNU-120596	279
6.3. Composés dérivés du SB-206553	280
6.4. Hydrosolubilité des urées en chimie médicinale	281
7. EVALUATION BIOLOGIQUE	283
7.1. Evaluation <i>in vitro</i> sur l'hAChE inhibée	283
7.2. Electrophysiologie sur les récepteurs nicotiques.....	283
7.2.1. Modulateurs allostériques.....	283
7.3. Evaluation <i>in vivo</i>	285
7.3.1. Modulateurs allostériques.....	285
7.3.2. MTDAs.....	286
8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	286
CONCLUSION GENERALE	295
1. RESULTATS	297
2. PERSPECTIVES	308
PARTIE EXPERIMENTALE	315
1. BIOLOGY	317
1.1. <i>In vitro</i> evaluations	317
1.1.1. Blood-brain barrier permeability tests	317
1.1.1.1. Human Blood-brain barrier model setting up	317
1.1.1.2. Endothelial permeability coefficient evaluation.....	317
1.1.2. In vitro inhibition and reactivation	318

1.1.2.1. Chemicals.....	318
1.1.2.2. Inhibition of hAChE	318
1.1.2.3. IC50 Measurements	318
1.1.2.4. Oxime reactivation of OP-inhibited hAChE.....	319
1.1.3. Electrophysiology on nAChRs	320
1.1.3.1. Two-electrodes voltage clamp (TEVC) electrophysiology	320
1.1.3.2. Concentration – inhibition analysis of ACh Currents.....	321
1.2. <i>In vivo</i> evaluations	321
1.2.1. Ventilatory Effect Measurement Using Double-Chamber Plethysmography – NOAEL dose.....	321
1.2.2. LD ₅₀ Estimation and Protective Index Using the Up-and-Down Method	322
2. CHEMISTRY.....	323
2.1. Chemical and reagents	323
2.2. Instruments	323
2.2.1. Purification.....	324
2.2.2. NMR	324
2.2.3. Chromatography analysis	324
2.2.4. Mass spectra	325
2.3. Analytical and purification methods	325
2.3.1. Quantitative NMR calibration curve of the CF ₃ concentration	325
2.3.2. HPLC/UHPLC methods	326
2.3.3. UHPLC-MS methods :.....	327
2.3.4. Preparative HPLC method.....	327

2.4. General synthetic procedures	328
BIBLIOGRAPHIE.....	399

PREAMBULE

Utilisés comme armes chimiques notamment par l'armée irakienne durant le conflit Iran-Iraq (1980-1988), à la fois sur les troupes militaires adverses et les populations civiles, les neurotoxiques organophosphorés (NOP) comme le tabun, le sarin et le cyclosarin firent de nombreuses victimes, décédées ou intoxiquées.



Figure 1 : Bombes chimiques en attente de destruction dans le sud-est de l'Irak¹

A la fois inodores et incolores, les NOPs sont les composés parmi les plus toxiques et provoquent des symptômes particulièrement éprouvants, pouvant laisser de graves séquelles neurologiques. C'est pourquoi l'opinion publique considère leur utilisation comme armes chimiques particulièrement immorale. Mais malgré la signature de la Convention sur l'interdiction des armes chimiques à Paris en 1993 par tous les pays du globe (excepté, en 2019, la Corée du Nord, l'Égypte, le Soudan du sud et Israël, qui a signé mais pas ratifié ladite convention)², les NOPs ont malheureusement encore été utilisés durant la dernière décennie : à de multiples reprises par le gouvernement syrien durant la guerre civile (2011 à aujourd'hui) et lors de tentatives d'assassinats attribuées au gouvernement russe sur les personnes de Sergueï Skripal en mars 2018 (composé Novichok) et d'Alexeï Navalny en août 2020 (composé Novichok).

En outre, le plus grand nombre de victimes d'intoxications par les organophosphorés se trouve dans la société civile et en particulier dans l'agriculture car des OPs sont utilisés comme pesticides, et, bien que les plus toxiques aient été progressivement bannis par les pays développés, certains sont encore largement utilisés dans les pays en voie de développement (**Figure 2**). Durant les deux dernières décennies, on estime qu'environ 100 000 morts et 2 millions d'admissions à l'hôpital dans le monde sont dues chaque année à des intoxications par des pesticides ou insecticides organophosphorés (une partie significative étant liée à des tentatives de suicide).³

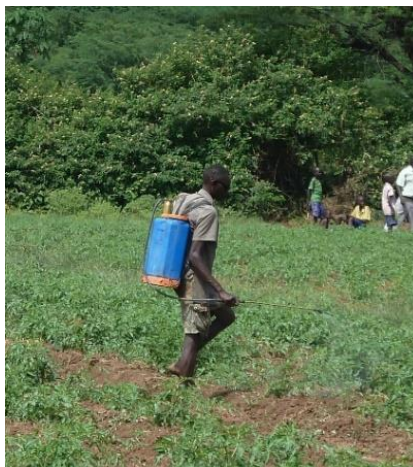


Figure 2 : agriculteur pulvérisant des pesticides dans une ferme au Kenya, sans équipements de protection adaptés⁴

Cette famille de composés constitue donc toujours un véritable problème de santé publique mondiale, dans les domaines militaires et civils. C'est pourquoi, à partir des années 50, peu après leur développement comme pesticides et armes chimiques, la recherche scientifique internationale s'est attelée à chercher des contre-mesures médicales aptes à guérir efficacement les patients qui seraient intoxiqués par des doses létales d'un composé de cette famille, quel qu'il soit, mais aussi à réduire les désordres neurologiques pour les intoxications avec des doses non létales.

Les NOPs sont des molécules organiques dérivées du phosphore pentavalent, possédant un bon groupe partant, et donc d'efficaces agents phosphylant, dont font partie par exemple l'agent innervant sarin (représentatif des phosphonates utilisés comme armes de guerre chimique, avec un atome de fluor comme groupe partant) et le dichlorvos (représentatif des phosphates utilisés comme pesticides, le groupe partant étant un éther d'énol) présentés ci-dessous (**Figure 3**).

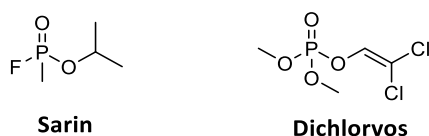


Figure 3 : structures de l'agent de guerre chimique sarin et du pesticide dichlorvos

Leur structure leur permet, par phosphylation, d'inhiber de façon irréversible plusieurs hydrolases, dont deux cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Or l'AChE en particulier est indispensable à l'étape de terminaison de la transmission de l'influx nerveux en hydrolysant le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) en choline et acide acétique. Dès lors, avec l'inhibition de l'AChE, l'acétylcholine s'accumule dans les fentes synaptiques et les jonctions neuromusculaires, provoquant la saturation des récepteurs cholinergiques (récepteur nicotinique et

récepteur muscarinique) responsables de la transmission de l'influx nerveux électrique dans le neurone ou le muscle. L'accumulation d'acétylcholine sature les récepteurs et provoque une série de réactions en cascade, responsables des symptômes cholinergiques et de la mort par arrêt du muscle respiratoire.⁵

Le traitement actuel destiné à contrer l'effet de ces NOPs est constitué d'un cocktail de trois molécules. Les deux premières diminuent ces symptômes en contrecarrant la surstimulation cholinergique : l'atropine (antagoniste compétitif) diminue l'activité des récepteurs muscariniques et le diazepam ou sa prodrogue l'avizafone (modulateur allostérique positif) est un anticonvulsant qui augmente l'action inhibitrice des récepteurs GABA_A sur le passage de l'influx nerveux. La troisième molécule a pour but de restaurer l'activité de l'ACHé en déphosphylant la sérine catalytique de son site actif (on parle de réactivateur). Si plusieurs nucléophiles ont été évalués, ce sont les nucléophiles alpha comme les oximes qui ont donné les meilleurs résultats. Les réactivateurs les plus efficaces, découverts et utilisés depuis les années 50, font tous partie de la famille des pyridiniums aldoxime (comme le 2-PAM) ou des bispyridiniums aldoxime comme le HI-6 (**Figure 4**).

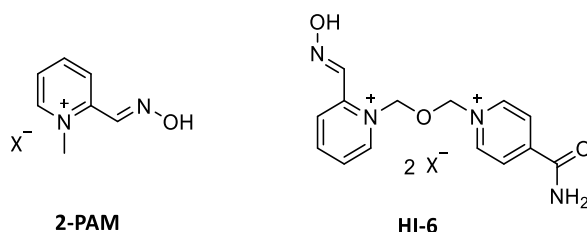


Figure 4 : structure des réactivateurs 2-PAM et HI-6

Malheureusement ces réactivateurs ont deux défauts majeurs : leur efficacité est très hétérogène en fonction du NOP utilisé – voire totalement inefficace contre certains NOPs comme le tabun – et leur charge permanente les empêche de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans des proportions suffisantes pour avoir un effet sur les désordres neurologiques causés par les NOPs au niveau du système nerveux central, laissant de potentielles séquelles neurologiques à long terme, comme il a été observé sur les victimes militaires ou civiles de la guerre Iran-Iraq ou des attentats perpétrés par la secte Aum dans le métro de Tokyo. L'objectif des chercheurs, ces 60 dernières années, a donc été de développer des réactivateurs qui soient plus efficaces, fonctionnant sur tous les NOPs (réactivateur à large spectre), et aptes à traverser la BHE. A ce jour aucune molécule ne répond à tous ces critères.

C'est pour répondre à cet objectif que notre équipe a développé depuis plus de 10 ans plusieurs familles de composés basés sur le noyau 3-hydroxy pyridine aldoxime (**Figure 5**). Si les premières

molécules obtenues se sont révélées efficaces pour déphosphyler l'AChE, via l'ajout d'un ligand du site actif de l'enzyme sur l'oxime non chargée, leur manque d'hydrosolubilité a obéré leur utilisation *in vivo*. Dernièrement, la Dr. Anissa Braïki (Thèse DGA 2014-2017), a pu concilier hydrosolubilité et affinité de ces composés envers l'acétylcholinestérase grâce à l'ajout, via un bras espaceur, d'une amine tertiaire protonable à pH physiologique, cyclique ou non, agissant comme ligand du site périphérique ou de la gorge de son site actif. Suivant ce design, les molécules neutres synthétisées ont démontré leur efficacité pour le passage de la BHE, comme le composé **JR-595**⁶, et pour la réactivation des cholinestérases, avec des efficacités souvent équivalente ou supérieure aux réactivateurs standards, mais elles ne présentent pas encore d'efficacité à large spectre.⁷

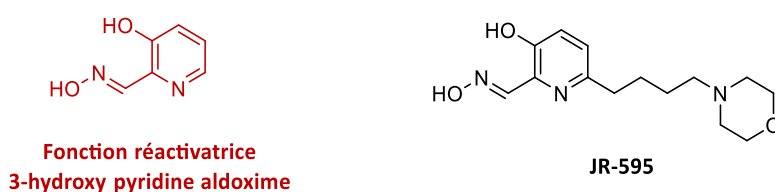


Figure 5 : Fonction réactivatrice et structure du réactivateur JR-595

Cependant certaines molécules de cette famille ont aussi présenté une propriété intéressante : l'antagonisme des récepteurs nicotiques, propriété que nous attribuons en grande partie à l'amine tertiaire protonable, qui se rapproche structurellement de l'ammonium de l'acétylcholine. Or diminuer les effets liés à la surstimulation de ces récepteurs, qui ne sont ciblés par aucun des trois composants des contre-mesures médicales actuelles, pourrait augmenter le taux de survie et diminuer les séquelles du système nerveux central (SNC), de la même façon que le fait l'atropine pour les récepteurs muscariniques. S'il est conceptuellement possible de rajouter un tel antagoniste des récepteurs nicotiques comme quatrième molécule du cocktail médicamenteux, cet ajout semble une gageure compte tenu du nombre de facteurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques qu'il faudrait alors prendre en compte. Face à ce genre de situation, le concept de ligand multi-cibles (MTDL, Multi-Target Directed Ligand) a émergé cette dernière décennie, permettant à une molécule avec un seul profil pharmaceutique d'avoir deux (voire plus) actions distinctes sur des enzymes ou récepteurs impliqués dans des pathologies complexes comme les maladies neurodégénératives.

L'hypothèse à l'origine de ce projet de thèse est qu'une molécule pouvant à la fois limiter la surstimulation des récepteurs nicotiques et réactiver l'AChE aurait une efficacité supérieure, grâce à la synergie des ces deux effets.

Deux éléments plaident pour la faisabilité de ce projet, d'une part l'expertise forte de l'équipe pour la synthèse des réactivateurs de cholinestérases et de ligands multi-cibles touchant notamment les

récepteurs nicotiniques dans le cadre du traitement de la maladie d'Alzheimer⁸, et le fait que certains des réactivateurs développés dans l'équipe, et ayant donné des résultats *in vivo* prometteurs (comme JR595) possèdent déjà dans une certaine mesure ce caractère multi-cibles avec un effet antagoniste sur les récepteurs nicotiniques, et une augmentation significative de cet effet semble accessible.

L'objectif qui m'a été fixé pour cette thèse est donc la conception et la synthèse d'antidotes multi-cibles (multi-target directed antidotes MTDA) afin d'évaluer *in vitro* et *in vivo* leur capacité à réactiver les cholinestérases inhibées par des NOPs et à réguler l'activité des récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ et /ou musculaires.

Cette thèse a été financée par l'Agence de l'Innovation pour la Défense (AID) et par la région Normandie et s'est déroulée au sein de l'équipe de chimie bio-organique du laboratoire COBRA (UMR 6014) de l'université de Rouen Normandie, sous la direction du professeur Ludovic Jean et la co-direction du professeur Pierre-Yves Renard. Cette thèse, en particulier l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des composés obtenus, a été réalisée dans le cadre du projet Astrid Multidote (ANR-17-ASTR-0012) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), qui a permis de financer le salaire de Julien Gasnot, stagiaire postdoctoral qui a également participé à l'élaboration et la synthèse de MTDA. Ce projet se déroulait en partenariat avec deux équipes de biologistes : l'équipe du Dr. Denis Servent et du Dr. Rómulo Aráoz d'abord, du Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologie (LTMB) au sein du CEA Saclay pour les tests d'électrophysiologie réalisés sur les récepteurs nicotiniques. Le Dr. Nicolas Lamassiaude a été recruté, dans le cadre du projet ANR, comme stagiaire postdoctorant dans cette équipe pour réaliser les tests. Ensuite l'équipe dirigée par le Dr. Florian Nachon du Département de Toxicologie et Risques Chimiques de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) avec le Dr. José Dias et la doctorante Ophélie Da Silva pour les tests *in vitro* sur l'AChE et la BChE phosphorylées et les Dr. Guilhem Calas et Année-Sophie Hanak pour les tests *in vivo*.

Cette thèse s'articulera autour de quatre parties. Dans la première partie, les effets pharmacologiques des neurotoxiques organophosphorés seront d'abord décrits, suivis d'une étude bibliographique non exhaustive des composés développés jusqu'à aujourd'hui visant à traiter une intoxication par les NOPs au travers des deux cibles biologiques choisies : AChE et récepteur nicotinique. Le cahier des charges ainsi établi mettra en perspective les travaux précédents réalisés dans notre équipe ou reportés dans la littérature et les antidotes multi-cibles conçus et synthétisés dans le cadre de cette thèse.

La deuxième partie présentera la resynthèse de molécules précédemment synthétisées par notre équipe et ayant présenté un profil d'activité *in vitro* prometteur, afin d'effectuer leur évaluation *in vivo*

(**Figure 6**). Ces molécules présentent dans leur structure la fonction réactivatrice 3-hydroxy pyridine aldoxime, reliée à différentes amines tertiaires cycliques par une chaîne alkyle linéaire (comportant entre 3 et 5 atomes de carbones). Les premiers résultats *in vivo* obtenus seront présentés en fin de chapitre.

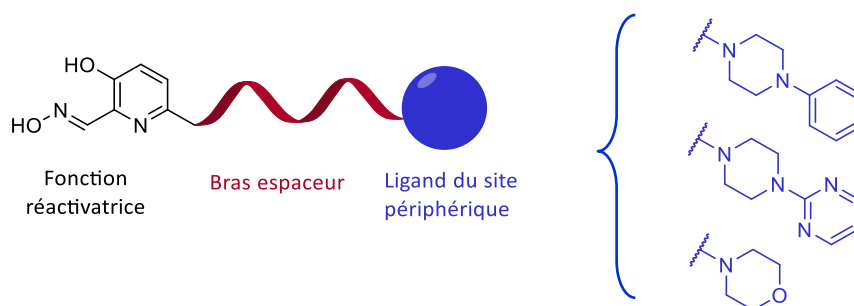


Figure 6 : Structure générale des réactivateurs neutres évalués *in vivo*.

Dans la troisième partie nous aborderons la synthèse d'antidotes multi-cibles dérivés des molécules précédentes dont la structure est fondée sur le remplacement de l'amine tertiaire du ligand par un ammonium quaternaire supposé accentuer le caractère antagoniste compétitif de ces composés vis-à-vis des récepteurs nicotiques, grâce à une plus forte similitude avec la structure de l'acétylcholine. Les ligands utilisés sont le groupe quinuclidinium et le groupe N-méthyl morpholinium (**Figure 7**). Les difficultés rencontrées ainsi que les résultats des test biologiques seront aussi présentés.

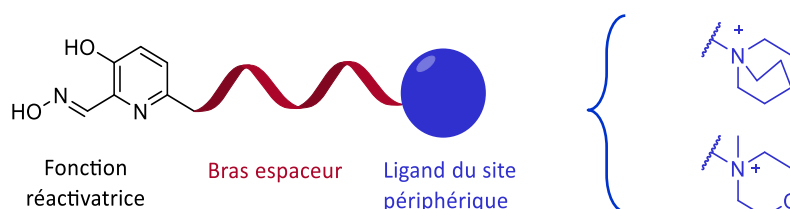


Figure 7 : structure des antidotes multi-cibles avec ligand ammonium quaternaire

La quatrième partie sera consacrée à la conception d'antidotes multi-cibles basés sur la structure de modulateurs allostériques positifs ou négatifs connus de certains récepteurs nicotiques, principalement le **PNU-120596**, le **SB-206553** et la **physostigmine (Figure 8)**, dont la structure a été combinée avec celle du noyau 3-hydroxy pyridine aldoxime. Là encore, le choix des modulateurs allostériques, les difficultés synthétiques rencontrées et les tests biologiques seront discutés.

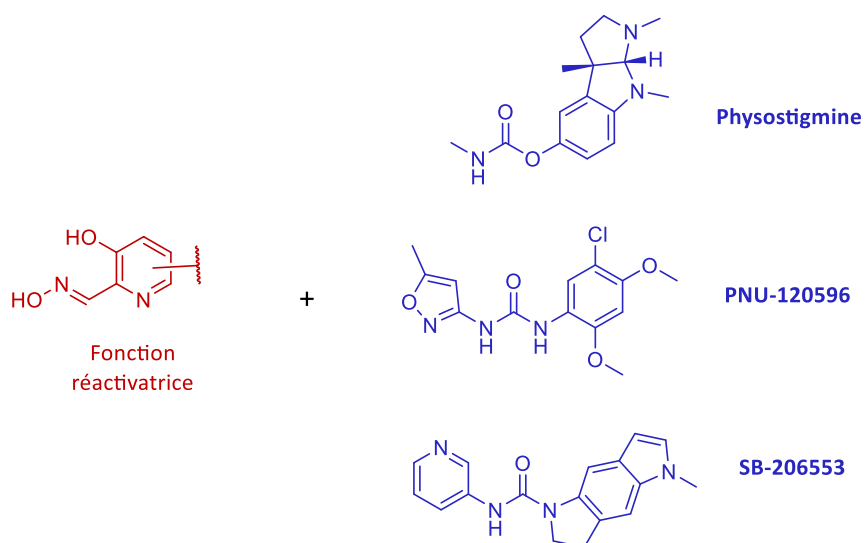


Figure 8 : structures de PNU-120596, SB-206553 et de la physostigmine à assembler avec celle de la fonction réactivatrice

Enfin, une conclusion présentera les principaux résultats obtenus, et permettra de proposer des perspectives à ces travaux.

**INTRODUCTION. CONTROLE DE LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE
LORS D'INTOXICATIONS AUX NOPS.**

1. HISTORIQUE DES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES

1.1. Structure générale

Les neurotoxiques organophosphorés (formule générale **Figure 9**) sont des molécules organiques constituées d'un phosphore pentavalent comportant une liaison phosphoryle P=O (ou P=S ou P=Se) et substitué par au moins un groupe partant (CN, F, OR, SR ...) et deux substituants de structure très diverse, l'un d'entre eux étant fréquemment un alkoxye.

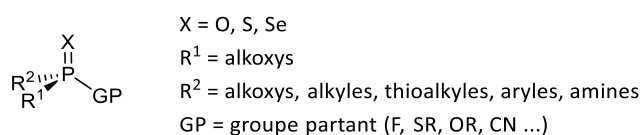


Figure 9 : Structure générale des molécules organophosphorées

Sans compter les dérivés comportant un atome de sélénium ou de soufre doublement liés au phosphore, une grande variété d'organophosphorés (OP) existe parmi les phosphoryles, dont les plus courants sont présentés dans le tableau suivant :

Phosphate	Phosphonate	Phosphinate	Phosphoramidate	Phosphorofluoridate	Phosphonofluoridate
Phosphorothioate	Phosphonothioate	Phosphorodithioate	Phosphorotrithioate	Phosphoramidothioate	

Tableau 1 : Différentes classes de molécules organophosphorées, R représentant un dérivé alkyle ou aryle⁹

Ces composés ont trouvé plusieurs applications dans l'industrie plastique, ainsi que comme retardateur de flammes, mais également, dans une moindre mesure, en médecine vétérinaire et humaine.⁹ Mais ces composés sont essentiellement utilisés dans l'industrie phytosanitaire (insecticides et pesticides) mais ont aussi été développés comme armes chimiques, via leur capacité à inhiber une enzyme ubiquitaire dans le règne animal, et jouant un rôle clef dans la transmission de l'influx nerveux : l'acétylcholinestérase.

1.2. Les pesticides

Le premier OP à avoir été synthétisé est le triéthyl phosphate, par Franz Anton Voegeli en 1848¹⁰. Mais le premier organophosphoré à avoir démontré une capacité d'inhiber l'acétylcholinestérase fut le tétraéthyl pyrophosphate (TEPP, **Figure 10**) synthétisé par Philippe de Clermont et Wladimir Petrovitch Moschnin en 1854, qui fut largement commercialisé comme pesticide dans les décennies suivantes.¹¹ Cependant, les avancées les plus importantes dans le développement de ces composés dans l'industrie phytosanitaire proviennent des recherches menées par le chimiste allemand Gerhard Schrader dans les années 1930, qui continua ensuite ses travaux au profit de l'armée allemande. De nombreux dérivés furent également développés comme pesticides après-guerre (exemples **Figure 10**).

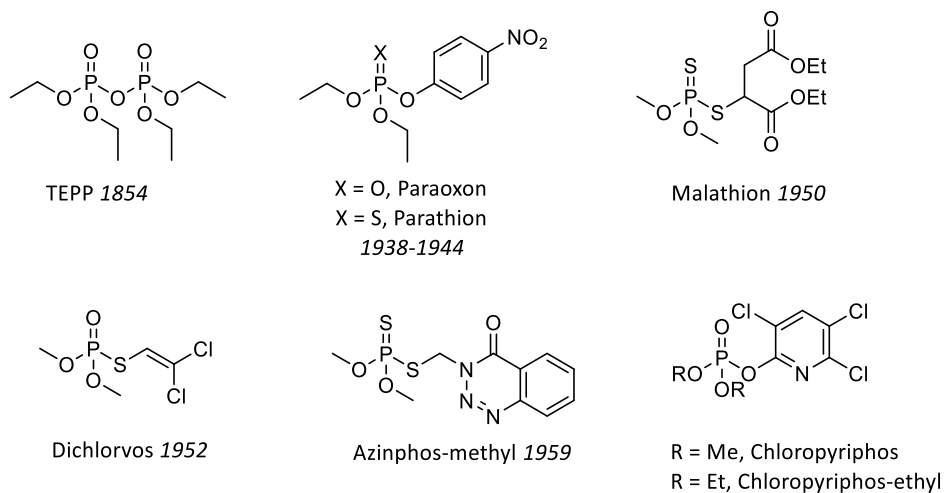


Figure 10 : Structures de différents OPs utilisés comme pesticides et dates de leurs découvertes

Cependant, les recherches académiques sur les différents effets des OPs se sont accélérées à partir des années 70¹² et ont permis de mieux comprendre leur toxicité, ce qui a abouti à l'interdiction de nombre d'entre eux, ne laissant que 10 molécules autorisées en France aujourd'hui, dont le malathion et les chloropyrifos (**Figure 10**). Les restrictions sont bien moins importantes dans les pays en voie de développement où certains OPs très toxiques restent utilisés, avec des conséquences sanitaires graves.

Les cas d'intoxication par exposition aux OPs dans ces pays sont d'abord liés à des tentatives de suicide parmi les populations pauvres¹³, le reste étant dû soit à des accidents de manipulation, au manque de formation sur les gestes et les équipements à adopter ou à l'accumulation de ces composés dans l'environnement.¹⁴ Les pesticides organophosphorés sont, par exemple, devenus, durant la dernière décennie, la cause dominante des quelques 16000 morts par intoxication aux pesticides en Inde, dont la source a été identifiée dans des publications scientifiques entre 1999 et 2018.¹⁵ Le dichlorvos est

aussi à l'origine de centaines de morts entre 2017 et 2020 au Népal.¹⁶ Ces chiffres étant globalement sous-estimés.

De plus, l'exposition chronique à des doses sublétales d'OPs peut induire différentes pathologies telles que des maladies neurodégénératives comme Parkinson ou Alzheimer, une neurotoxicité développementale chez l'enfant, certains cancers pour certains OPs et d'autres risques encore.^{12,17} Ces pesticides posent donc aussi la question de leur persistance dans l'environnement et des doses contenues dans l'air, l'eau, et les fruits et légumes et par voie de conséquence dans la population en général.¹⁸

1.3. Les armes chimiques

1.3.1. Développement

Au cours de ses recherches sur de nouveaux insecticides, le chimiste allemand Gerhard Schrader synthétisa le neurotoxique organophosphoré tabun en 1936 dont le potentiel meurtrier chez les mammifères, l'Homme compris, fut identifié et incorporé dans l'arsenal des agents de guerre chimique potentiels par l'armée du régime nazi. Dans les années suivantes d'autres NOPs furent développés : le sarin (1938), le soman (1944), et le cyclosarin (**Figure 11**).⁵ Le régime nazi synthétisa par exemple 12000 tonnes de tabun dans son usine de Duhernfurth, qui ne furent cependant jamais utilisées.

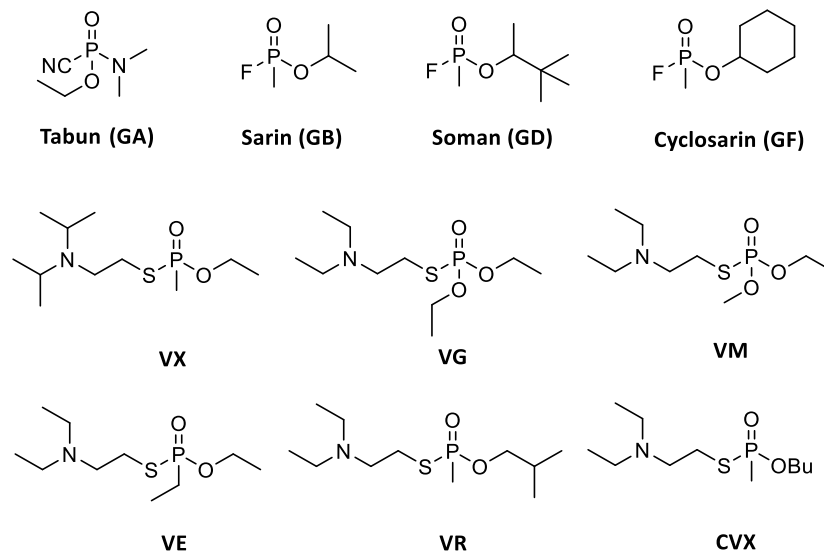


Figure 11 : Structures des agents G et V

A la fin de la guerre, le régime soviétique, les Américains et les Anglais récupérèrent les connaissances acquises ainsi que certains savants allemands pour développer leurs propres arsenaux d'armes

chimiques durant la guerre froide qui suivit : les composés allemands furent nommés agents G, et ceux développés par les Anglais agents V, pour « venomous » ou « victory » : le VX, VG, VE, VM ainsi que le VR (VX russe)¹⁹ et le CVX (VX chinois) font partie de ces agents V. Entre les années 70 et 90 les Soviétiques développèrent de nouveaux composés nommés Novichok ou encore série A qui devaient être encore plus toxiques que les séries précédentes. Ils avaient aussi l'avantage, compte tenu de leur structure de type phosphoramidofluoridates et phosphonamidofluoridates, de ne pas être inclus dans la Convention sur l'interdiction des armes chimiques où seuls les phosphonates étaient listés. Différentes structures furent rapportées par un chimiste russe qui avait travaillé pour l'armée russe : A-230, A-232, A-234, A-242 (**Figure 12**).²⁰

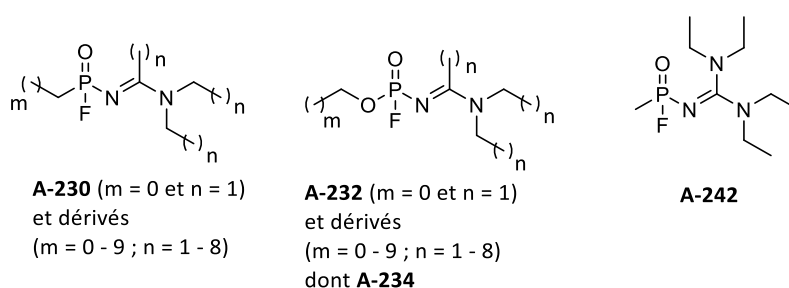


Figure 12 : Structure des NOPs de la famille des Novichoks désormais intégrées dans la Convention pour l'interdiction des armes chimiques

Les doutes demeurant autour des structures des Novichoks ont été levés quand celles-ci ont été ajoutées dans une mise à jour de la Convention sur l'interdiction des armes chimiques en juin 2020, ce qui a mis fin à l'impunité qui existait quant à leur utilisation.²¹ Cependant d'autres structures plausibles de Novichoks ont été présentées dans la littérature sans que l'on puisse être certains que ces composés existent bel et bien.^{22,23} Le dernier développement connu de ces armes est leur version binaire : deux réactifs non toxiques qui peuvent être mis à réagir au dernier moment pour produire le composé léthal. Le sarin, le soman, le VX, le VR et le A-232 ont connu un tel développement.²⁰

Tous ces NOPs sont des liquides incolores et pratiquement inodores. Les agents G sont particulièrement volatils (**Tableau 2**), c'est pourquoi le sarin, qui dans les conditions de température et pression usuelles se présente sous forme d'un liquide, a pu être dénommé à tort « gaz sarin ». Même si une partie de sa toxicité est liée à l'inhalation de ses vapeurs, sa toxicité par contact est importante. Les agents V comme le VX sont beaucoup moins volatils mais sont cependant beaucoup plus toxiques, notamment à cause d'une plus grande stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse. Ils sont donc plus persistants sur la peau ou les surfaces contaminées, et leur toxicité est liée à leur capacité à être absorbés par contact au niveau de la peau.

Agent	Demi-vie par hydrolyse à pH = 7 et à 20 °C ²⁴ (heures)	DL ₅₀ percutanée ²⁵ (mg/individu)	Volatilité à 25 °C ²⁴ (mg/m ³)	CL ₅₀ inhalée ²⁵ (mg.min/m ³)
Sarin (GB)	39 - 41	1700	22000	100
Tabun (GA)	8.5	1000	610	400
Soman (GD)	80 - 83	100 - 350 ²⁰	3900	50 - 70 ²⁶
VX	400 - 1000	10	10.5	15 ²⁰
A-232 ²⁶	« sensible à l'humidité »	1 - 2	« volatile » P _{eb} = 70 °C	6 - 10

Tableau 2 : Valeurs physico-chimiques et toxicologiques chez l'être humain des principaux NOPs

Peu de données sont disponibles sur les Novichoks, qui ont des résistances à l'hydrolyse et des volatilités très variables suivant la taille des chaînes de leurs substituants. Il n'en reste pas moins que certains Novichoks sont les plus toxiques de tous les OPs, que ce soit par contact ou par inhalation, exemplifié ici par le A-232. Tous ces OPs sont relativement simples à synthétiser mais les risques d'intoxication accidentelle des manipulateurs lors des étapes de synthèse, de purification et de manipulation rendent leur utilisation et stockage problématiques.

1.3.2. Utilisations

Les neurotoxiques organophosphorés ont été utilisés comme armes chimiques lors de guerres civiles et inter-étatiques, d'attentats et de tentatives d'assassinats (**Figure 13**). Ils ont malheureusement démontré en chaque occasion leur potentiel destructeur, même utilisés dans des conditions « non optimales » (en particulier liées à une faible pureté), à la fois par le nombre de victimes le jour même et par les conséquences sur le long terme, les personnes intoxiquées développant dans les mois et années suivantes différentes (neuro)pathologies plus ou moins graves directement liées à leur exposition.

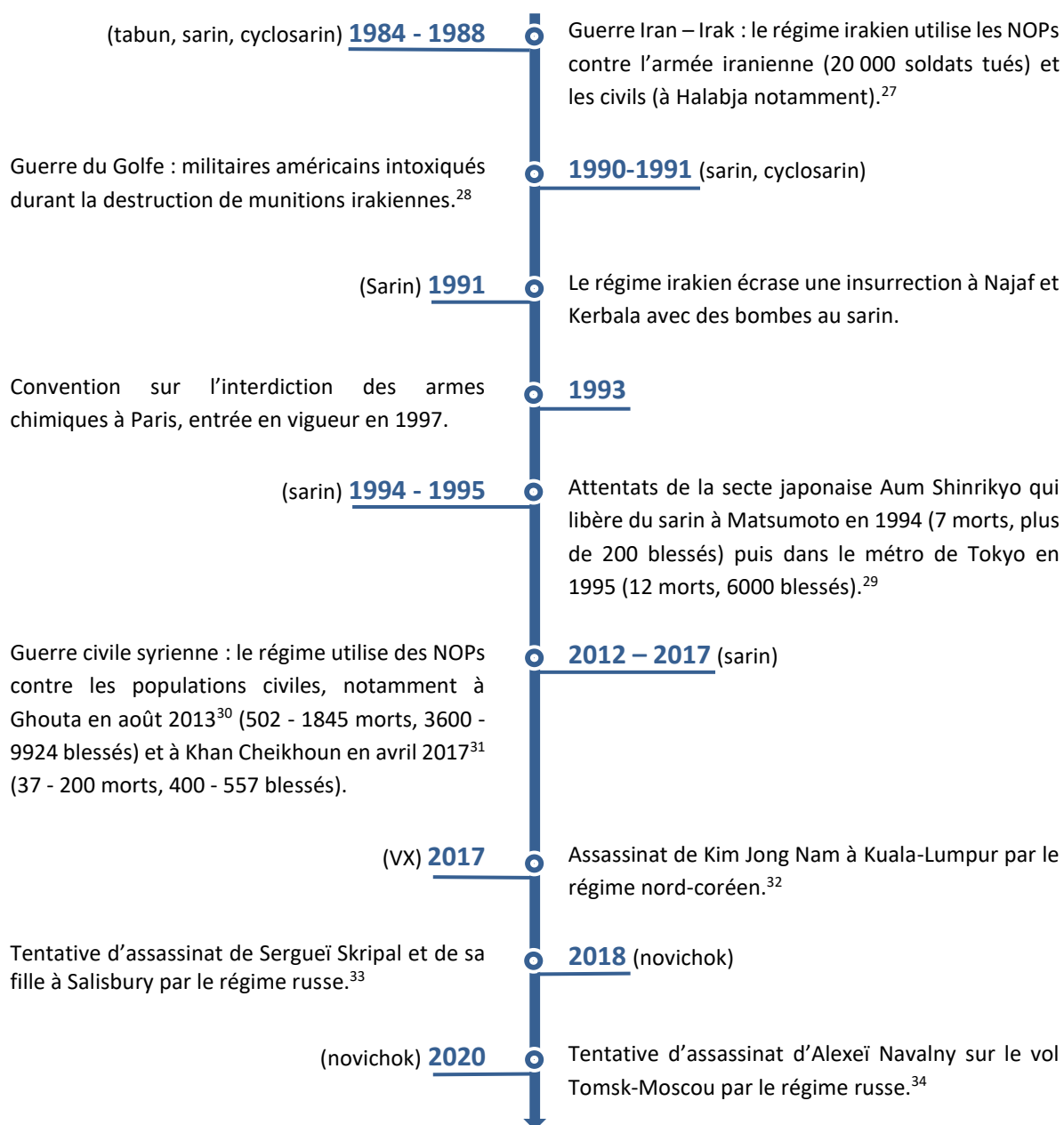


Figure 13 : Chronologie des évènements ayant trait à l'usage des NOPs comme armes chimiques

Devant le danger que représentent ces composés et leur potentielle prolifération dans des organisations étatiques ou terroristes, les états du monde entier se sont engagés, au travers de la Convention pour l’Interdiction des Armes Chimiques (déclarée en 1993 et entrée en vigueur en 1997), à ne plus produire aucun de ces composés, excepté pour développer des contre-mesures médicales, à déclarer et détruire les stocks qu’ils pourraient encore posséder et à laisser l’Organisation de l’Interdiction des Armes Chimiques (OIAC) contrôler ces destructions et tout évènement qui semblerait suspect vis-à-vis de leur utilisation. En 2019, la Corée du Nord, l’Egypte et le Soudan du sud ne l’ont pas encore signée et Israël ne l’a pas encore ratifiée. Cependant, la signature de cette convention n’a

malheureusement pas empêché la Syrie et la Russie d'en faire usage de façon massive ou pour des assassinats ciblés.

2. LES EFFETS D'UNE INTOXICATION AUX OPS

70 ans de recherche ont permis de mieux comprendre l'effet des organophosphorés sur le corps et en particulier sur leur cible principale : le système nerveux via l'inhibition des cholinestérases. Les cholinestérases sont des enzymes ubiquitaires catalysant l'hydrolyse des esters de choline : l'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) et la butyrylcholinestérase (EC 3.1.1.8). Les deux enzymes ont en commun environ 54% de leur séquence d'acides aminés et ont des structures tridimensionnelles et des mécanismes catalytiques analogues, cependant l'AChE a une meilleure affinité pour le neurotransmetteur acétylcholine que la BChE.

Tissu	BChE (mg/kg d'organe)	BChE (% total)	AChE (mg/kg d'organe)	AChE (% total)
Plasma	4,6	27,6	0,0009	0,1
Foie	8.7 - 9,3	22,4	0,067 - 0.071	2,3
Peau	1.4 - 1,8	12,1	0,15 - 0.19	17,6
Muscle	1,7	10,3	0,66	52,6
Intestin grêle	4.4 - 5,0	6,9	0,16 - 0.18	3,2
Poumons	7,5	5,2	0,15	1,4
Cortex cérébral	2,5	5,2	0,38	10,5
Estomac	6,0	3,1	0,17	1,1
Rate	5.0 - 6,7	1,7	0,25 - 0.33	1,1
Rein	6.3 - 7,7	1,7	0,13 - 0.15	0,5
Cervelet	5,3	1,4	1,7	5,7
Coeur	2,0	1,0	0,20	1,4
Bulbe rachidien	3.4 - 4,3	0,1	3,2 - 4.0	1,8
Thyroïde	0,4	0,01	0,10	0,05
Masse totale (mg)	58	100	4.37	100

Tableau 3 : Concentration massique des cholinestérases dans chaque organe et répartition de la quantité d'enzyme dans les différents organes chez l'être humain³⁵

Ces deux enzymes sont réparties différemment dans le corps : la BChE est circulante et se trouve principalement dans le plasma, le foie, la peau et les muscles, tandis que l'AChE est associée aux fentes synaptiques et se trouve principalement dans les muscles, la peau et le cerveau (**Tableau 3**).³⁵ De plus, bien qu'il y ait une quantité massique dix fois plus importante de BChE que d'AChE, c'est bien l'AChE qui est essentielle au bon fonctionnement du système nerveux : il a en effet été observé que certaines personnes ne possédaient pas du tout de BChE sans que cela cause un dysfonctionnement physiologique. La BChE n'a donc pas de fonction vitale mais peut participer à diverses autres fonctions

(y compris pallier dans certains cas les déficiences ou inhibitions de l'AChE). Ainsi, lors d'une intoxication aux OPs, les deux enzymes sont également touchées mais c'est l'inhibition de l'AChE qui provoque les symptômes dramatiques.

2.1. Rôle de l'AChE au sein des synapses et des jonctions neuro-musculaires

L'acétylcholinestérase a pour rôle principal d'hydrolyser l'acétylcholine dans les fentes synaptiques (synapse neuronale ou jonction neuro-musculaire) afin de réguler la quantité de ce neurotransmetteur et de permettre le bon fonctionnement de la transmission chimique des influx nerveux.

Lors de la transmission d'un influx nerveux, l'acétylcholine (ACh) est d'abord synthétisée dans le neurone pré-synaptique à partir de choline et d'acétylcoenzyme A (AcCoA) grâce à la catalyse de l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) (**1, Figure 14**).³⁶ L'ACh étant chargée, elle est intégrée dans des vésicules grâce à des protéines transportrices transmembranaires ; chaque vésicule contient de 5000 à 50000 molécules d'ACh en moyenne et on compte environ 300 000 vésicules par axone. Lorsqu'un potentiel d'action provenant du corps cellulaire du neurone parvient à l'extrémité de son axone (**2**), la dépolarisation de la membrane provoque l'entrée massive d'ions Ca^{2+} via des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la tension. Ce flux de Ca^{2+} induit la fusion des vésicules (jusqu'à 300) avec la membrane pré-synaptique et l'exocytose des molécules d'acétylcholine dans l'espace inter-synaptique (**4**).³⁷ Une synapse axo-axonique placée en amont peut avoir une action excitatrice ou bien inhibitrice sur la propagation du signal en activant différents types de récepteurs sur la membrane pré-synaptique, qui augmentent ou au contraire réduisent le flux ionique engendré par le potentiel d'action, comme les récepteurs GABA_B par exemple (action inhibitrice) (**3**).

Une fois dans l'espace inter-synaptique, d'environ 50 nm de large, l'acétylcholine (dont la concentration peut atteindre 100 mmol/L) peut se fixer sur les récepteurs cholinergiques sur la membrane post-synaptique, qui appartiennent soit à un autre neurone (pour une synapse), soit à une cellule musculaire (pour une jonction neuro-musculaire) (**5**). Cependant, au moins 50% des molécules d'ACh est directement hydrolysée par l'acétylcholinestérase ou diffuse en dehors de la fente synaptique.³⁸ Selon le type de jonction, les récepteurs cholinergiques sont soit des récepteurs nicotiques (nAChR), soit des récepteurs muscariniques (mAChR). Ceux-ci sont des récepteurs transmembranaires aux mécanismes différents. La liaison de l'ACh sur les mAChRs fait indirectement varier la polarisation de la cellule postsynaptique alors que la liaison de l'ACh sur les nAChRs provoque l'ouverture de ces canaux ioniques et le passage direct de Na^+ ou K^+ (et Ca^{2+} pour certains). Si suffisamment de vésicules ont libéré le neurotransmetteur, le potentiel à l'intérieur de la cellule post-

synaptique, qui est largement négatif au repos, peut finir par atteindre une valeur positive, inversant ainsi la polarisation transmembranaire et provoquant la formation d'un nouveau potentiel d'action ou la contraction des fibres musculaires.

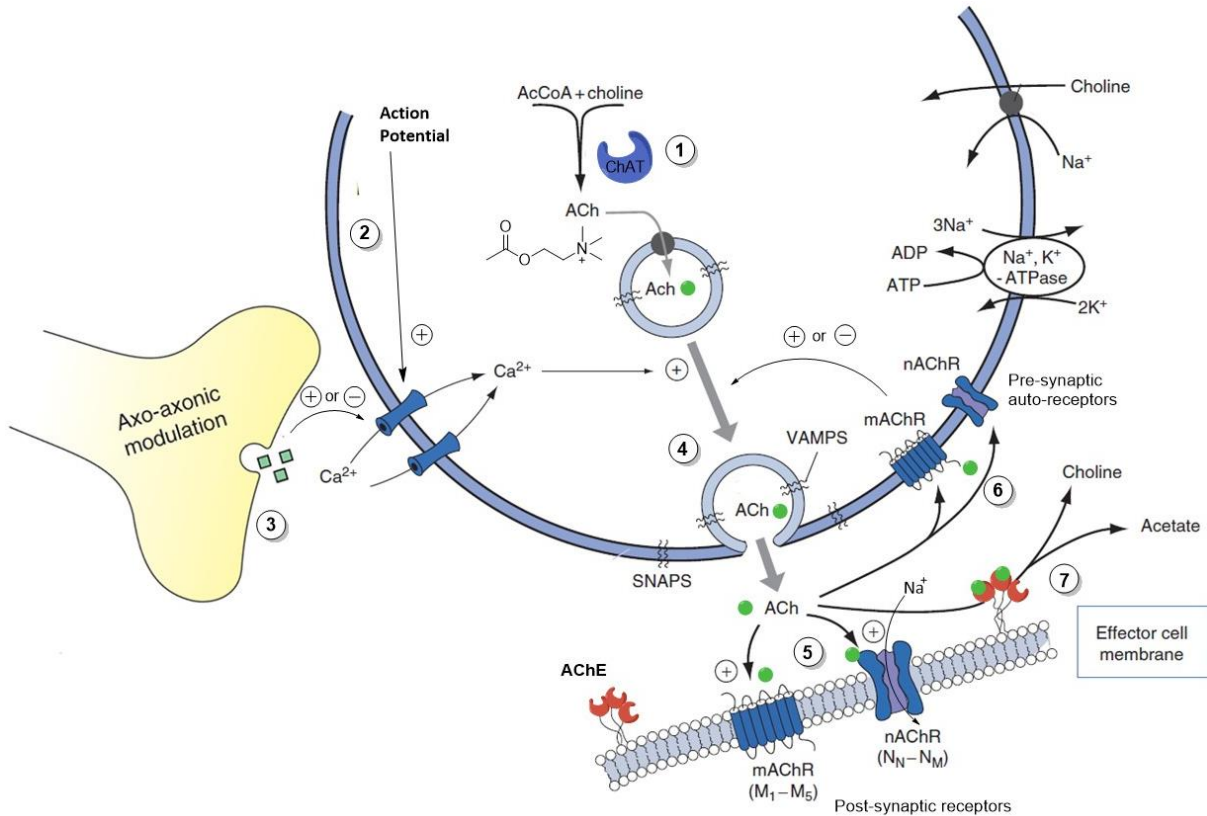


Figure 14 : Schéma général simplifié de la transmission cholinergique (adapté de Westfall, T. C. 2009)³⁹

L'acétylcholine peut aussi se lier à des auto-récepteurs (muscariniques ou nicotiniques) présents sur la membrane pré-synaptique. Ceux-ci ont pour fonction d'effectuer un rétro-contrôle positif ou négatif sur l'exocytose de l'ACh (6). Enfin, l'ACh présente dans la fente synaptique est hydrolysée en choline et acide acétique par l'AChE dans son site actif, mettant fin au signal (7). La réaction fait partie des réactions enzymatiques les plus rapides du corps humain avec l'hydrolyse de plus de 10^4 molécules d'acétylcholine par seconde ; l'hydrolyse de l'ACh dans cette fente est donc cinétiquement limitée par sa diffusion et non par le taux de roulement de l'enzyme.⁴⁰ 50 % environ de la choline est récupérée par la cellule pré-synaptique pour resynthétiser de l'ACh.

En dehors de la transmission cholinergique, l'AChE joue aussi un rôle dans la régulation du système immunitaire.⁴¹ L'enzyme a, de plus, une fonction dans le développement des organes : celui des muscles, des axones et des synapses, dans l'hématopoïèse et dans celui du système squelettique.^{42,43} De façon surprenante, ces fonctions seraient assurées non seulement par son rôle catalytique sur

l'acétylcholine mais aussi par un rôle non catalytique, agissant sur le processus de reconnaissance et d'adhésion entre les cellules.^{43,44} D'autres fonctions de l'enzyme ont été identifiées et sont étudiées.⁴⁵

2.2 Rôle de la butyrylcholinestérase

Bien que 10 fois plus abondante que l'AChE, la BChE n'a pas de rôle vital puisque certains individus n'en possèdent pas. Cependant, différentes études ont montré que la butyrylcholinestérase pouvait pallier l'absence ou l'inhibition de l'AChE pour effectuer la transmission nerveuse : en effet, des souris privées d'AChE (knock_out pour le gène codant pour cette enzyme) sont capables de vivre sans problème majeur, mais meurent de symptômes cholinergiques si leur BChE est inhibée.^{46,47}

D'autres fonctions biologiques de la BChE ont pu être mises en évidence au travers des études sur son implication dans certaines maladies neurodégénératives. Ainsi, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, elle faciliterait la maturation des plaques amyloïdes, augmenterait le phénomène d'inflammation (qui est en partie médié par l'acétylcholine)⁴¹ et, à un stade avancé de la maladie, le trop faible taux d'acétylcholinestérase fonctionnelles est compensé par une plus forte expression de la BChE dans le cerveau.^{48,49} Il a été déduit qu'en situation normale, la BChE peut agir comme co-régulateur du taux d'ACh pour la transmission nerveuse et pour la régulation des signaux inflammatoires.⁴⁹

Cependant, la BChE a une bien moins grande affinité pour l'acétylcholine que l'AChE et n'a pas de substrat spécifique : elle est capable d'hydrolyser les esters de choline (butyrylcholine, acétylcholine ou succinylcholine utilisée comme curare dépolarisant) ainsi que d'autres esters tels que l'aspirine, le bambuterol (pro-drug de la terbutaline, bronchodilatateur), l'héroïne ou la cocaïne.^{50,51}

La BChE est aussi impliquée dans la régulation du poids : elle est capable d'hydrolyser et ainsi d'inactiver la ghréline, hormone impliquée dans l'augmentation de l'appétit et dans le stockage des graisses dans les tissus (ainsi que dans le comportement) ; de plus, d'autres études utilisant la modification de l'expression de la BChE dans des souris ont montré qu'elle serait impliquée dans le métabolisme des graisses. Des recherches sont aussi menées sur ses liens possibles avec l'insuline et l'homéostasie du glucose.⁵²

2.3. Structure et mécanisme des cholinestérases

L'acétylcholinestérase comme la butyrylcholinestérase font partie de la famille des α/β hydrolases à sérine composés notamment d'un feuillet β entouré de plusieurs hélices α .⁵³ Elles possèdent toutes un site actif comportant trois acides aminés responsables de la catalyse (histidine, glutamate/aspartate et sérine) : la triade catalytique.

2.3.1 Structure et mécanisme de l'AChE

L'AChE est une enzyme ellipsoïdale de 45 x 60 x 65 Å composée de 535 acides aminés organisés en un feuillet β mixte central environné de 12 brins et entouré de 14 hélices α .⁵⁴ La structure quaternaire de la protéine peut varier, avec des associations oligomériques diverses (monomère soluble, dimère attaché à la membrane post-synaptique ...), comme par exemple un tétramère au niveau de la jonction neuromusculaire.⁴³

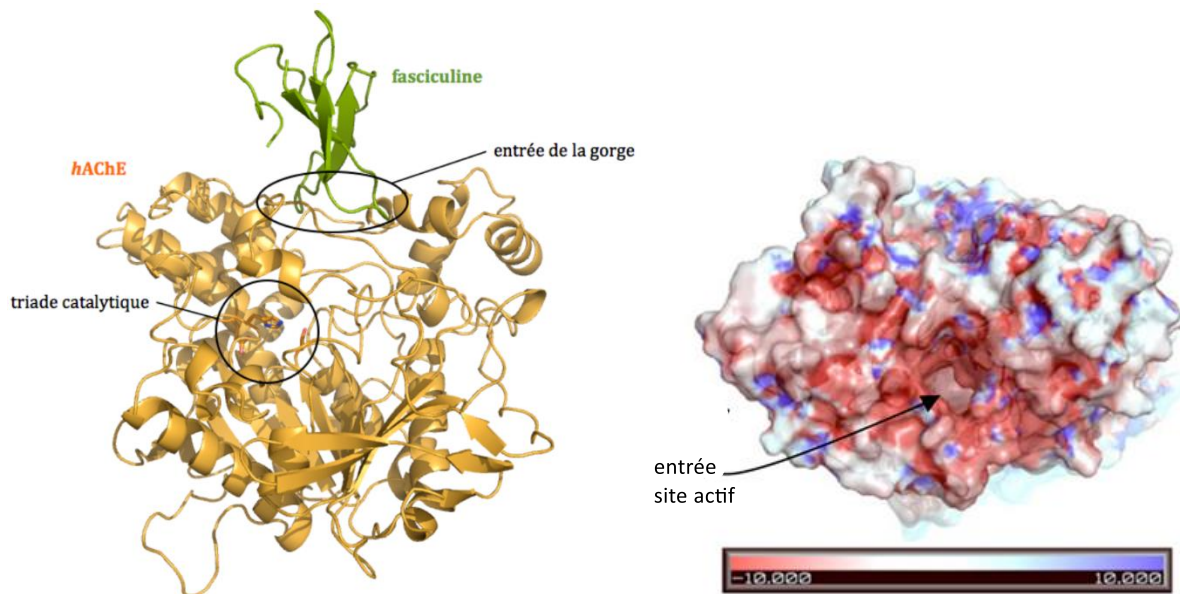


Figure 15 : Structure du complexe entre l'hAChE (orange) et la fasciculine (vert) (PDB 1B41) (gauche)⁵⁵ et distribution de charge sur le pourtour du site actif de la TcAChE, colorée en fonction de la charge exprimée en kT (droite) (adapté de Colletier, 2006)⁵⁶

L'AChE de *Torpedo Californica* (TcAChE) fut la première à voir sa structure tridimensionnelle résolue par diffraction des rayons X sur des monocristaux de l'enzyme, par Sussman *et al.* en 1991.⁵⁷ Les cristallisations de l'AChE d'autres espèces ont été réalisées : entre autres, la souris⁵⁸, la drosophile⁵⁹, le poisson *Electrophorus electricus*⁶⁰ ou le serpent *Bungarus fasciatus*⁶¹, ce qui permet d'avoir accès à sa diversité structurale suivant sa source. Celle de l'espèce humaine a d'abord été obtenue par cristallisation du complexe de l'enzyme avec la toxine fasciculin II en 2000 (**Figure 15**).⁶² L'étude de ces structures a permis de comprendre le mécanisme de l'hydrolyse de l'ACh et les différentes zones du site actif qui y sont associées. Ainsi, l'analyse du site actif de l'enzyme, une poche hydrophobe (40⁵⁷ à 68 %⁶³ de surface aromatique) de 20 Å de profondeur, a mis en évidence trois sous-parties : un site périphérique donnant sur une gorge large de 5 Å qui se finit sur une cavité appelée site d'acylation où se produit l'hydrolyse de l'ACh.

2.3.1.1. Site périphérique

La zone entourant l'entrée du site actif est globalement chargée négativement, ce qui attire les ligands chargés positivement passant à proximité (**Figure 15**). Une fois attirée, l'acétylcholine est complexée temporairement au niveau de l'entrée du site actif afin de la guider vers l'intérieur de celui-ci. En effet, outre le site d'acylation, la zone entourant l'entrée de la gorge forme aussi un site de complexation pour les ligands chargés positivement, comme l'ont montré Taylor *et al.*, et qui a donc été nommé Site Périphérique Anionique (SPA).⁶⁴ Cependant, contrairement à l'appellation, ce site est essentiellement composé de résidus aromatiques : Trp286, Tyr72, Tyr 124, Tyr341, avec seulement deux résidus chargés et non aromatiques : Asp74 et Glu285 (**Figure 16**).⁶⁵ La complexation de l'acétylcholine implique l'attraction de son ammonium quaternaire par la charge opposée du carboxylate d'Asp74, ainsi que l'effet de synergie des trois liaisons cation- π que l'ammonium forme avec les résidus aromatiques Tyr72, Tyr124 et Trp286.^{65,66}

De plus, Asp74 et Trp286 sont impliqués dans une autre fonction du site périphérique : la modulation allostérique du pouvoir catalytique de l'enzyme. Lorsqu'un substrat se lie au SPA, cela augmente la cinétique de l'hydrolyse du substrat se trouvant dans le site d'acylation par des changements conformationnels⁶⁷, qui sont transmis d'un site à l'autre par la chaîne flexible omega de la protéine. Cela influence notamment l'augmentation du diamètre de la gorge pour laisser passer le substrat.⁶⁸ Cependant, un effet inhibiteur (inhibition par excès de substrat) lié en partie à une augmentation de l'encombrement stérique apparaît lorsque la concentration d'acétylcholine augmente : à concentration modérée la molécule substrat liée au SPA gêne la sortie de la choline et à plus forte concentration deux molécules substrat liées au SPA peuvent empêcher l'acétate de sortir, ce qui réduit la cinétique d'hydrolyse enzymatique.^{69,70}

2.3.1.2. Gorge

La gorge est profonde de 15 Å⁷¹ et large de 5 Å à sa partie la plus étroite (**Figure 16**). Ce diamètre réduit, qui devrait difficilement laisser passer un ammonium quaternaire comme celui de l'ACh, est agrandi de façon dynamique à chaque passage d'un substrat grâce aux interactions allostériques.⁶⁸ De plus, sa surface, constituée majoritairement de résidus aromatiques (Phe, Tyr, Trp), qui peuvent établir des liaisons cation- π avec l'ammonium de l'ACh, permet un passage aisé du site périphérique vers le site d'acylation. En effet, le passage par la gorge entre ces deux sites (tous deux minima du potentiel électrostatique de l'ACh dans l'AChE) constitue une barrière énergétique très faible, de l'ordre de l'énergie cinétique de la molécule.⁷²

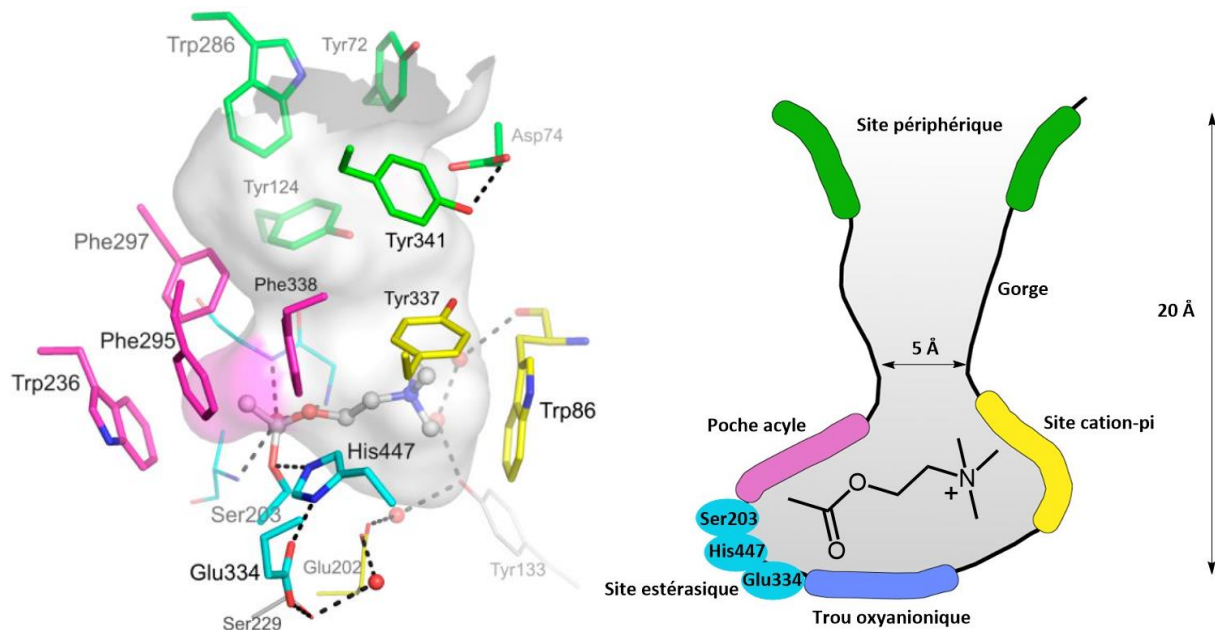


Figure 16 : Site actif de l'hAChE incluant l'ACh (PDB 4EY4) avec en vert le site périphérique, en jaune le site cation- π , en magenta la poche acyle, en cyan la triade catalytique et le trou oxyanionique et les molécules d'eau constitutionnelles représentées sous forme de sphères rouges (gauche)⁷³, version schématique (droite)

2.3.1.3. Site d'acylation

Une fois en bas de la gorge, l'ammonium de l'ACh est complexé via des liaisons cation- π par trois résidus aromatiques : Trp86, Tyr337, Phe338, composant **le site cation- π (Figure 16)**.⁷⁴ Il permet de stabiliser et d'orienter la molécule vers trois autres sites où a lieu son hydrolyse. L'ensemble forme une cavité qui enveloppe parfaitement chaque partie de la molécule et participe à la sélectivité de l'enzyme pour son substrat.⁷⁵

Parmi ces trois sites, **la poche acyle** stabilise par interactions de Van der Waals le méthyle de la partie acyle de l'ACh. Il est composé des résidus aromatiques Trp236, Phe295 et Phe297.⁷⁶

Le site estérasiqque, ou triade catalytique, réalise l'hydrolyse de l'acétylcholine. Comme son nom l'indique, trois acides aminés la composent : une sérine (Ser203), une histidine (His447) et un glutamate (Glu334). Le système histidine-glutamate sert à exacerber la nucléophilie de l'alcool de la sérine pour provoquer son attaque nucléophile sur l'ester de l'ACh (libérant alors la choline), puis pour exacerber la nucléophilie d'une molécule d'eau, attaquant à son tour l'ester pour l'hydrolyser en acide acétique et libérer l'alcool de la sérine (**Schéma 1**). L'acide acétique est à son tour éjecté du site actif.

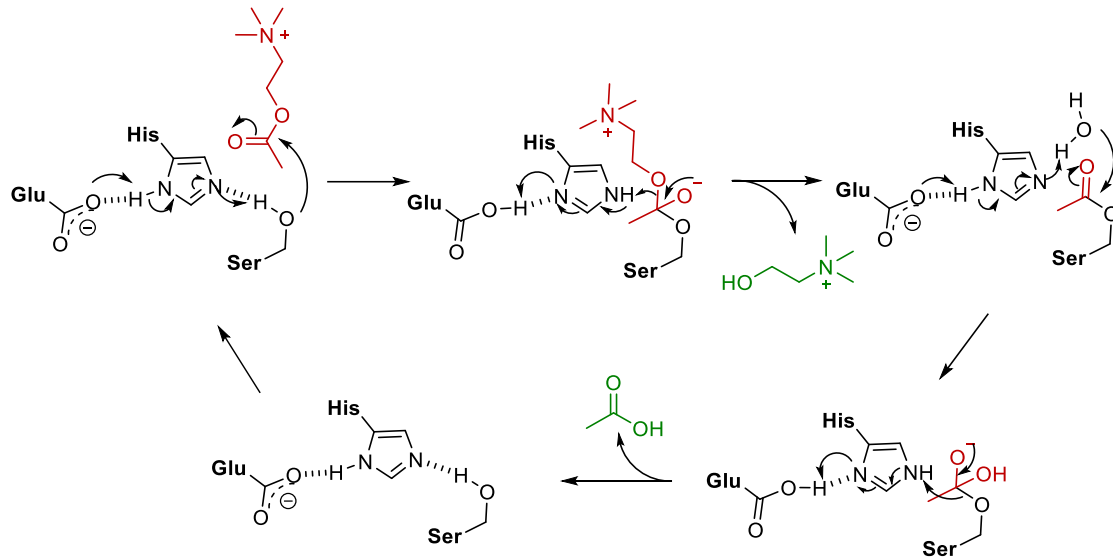


Schéma 1 : mécanisme de l'hydrolyse de l'ACh par la triade catalytique

Enfin, durant tout le mécanisme, le troisième site appelé **trou oxyanionique** (composé des résidus Gly121, Gly122 et Ala204, **Figure 16**) a pour fonction d'activer l'ester par des liaisons hydrogène avec leurs fonctions aminées, puis de stabiliser l'oxyanion de l'intermédiaire réactionnel tétraédrique. Cette activation-stabilisation étant nécessaire pour les deux additions successives des nucléophiles sur l'ester (**Schéma 1**).^{77,78}

2.3.2 Structure de la BChE

La butyrylcholinestérase, composée de 574 acides aminés, a une structure très semblable à celle de l'AChE, avec la même organisation tridimensionnelle de son site actif, cavité profonde de 20 Å : le site périphérique donne sur une gorge menant au site catalytique (**Figure 17**).^{79,80} Ses formes oligomériques sont également variées, avec une forme tétramérique prédominante, sous forme de dimère de dimère.⁸¹ Cependant, sa vitesse d'hydrolyse de l'ACh est moins grande que celle de l'AChE, ce qui est dû à une moins bonne affinité pour le substrat.⁵² Cela s'explique notamment par le volume de son site actif qui est, quelque soit le mode de calcul choisis, largement plus grand : 502 ou 690 Å³ pour l'hBChE contre 302 ou 410 Å³ respectivement, pour l'AChE de torpille, soit 200 à 280 Å³ de différence.⁸²⁻⁸⁴ Ce volume plus important vient notamment d'un remplacement de 6 des 10 résidus aromatiques ayant des interactions avec le ligand dans le site actif de l'AChE par des résidus aliphatiques, plus petits et flexibles.⁷³ De plus, au contraire des aromatiques, ceux-ci ne permettent pas la stabilisation de l'ammonium par liaison cation- π .

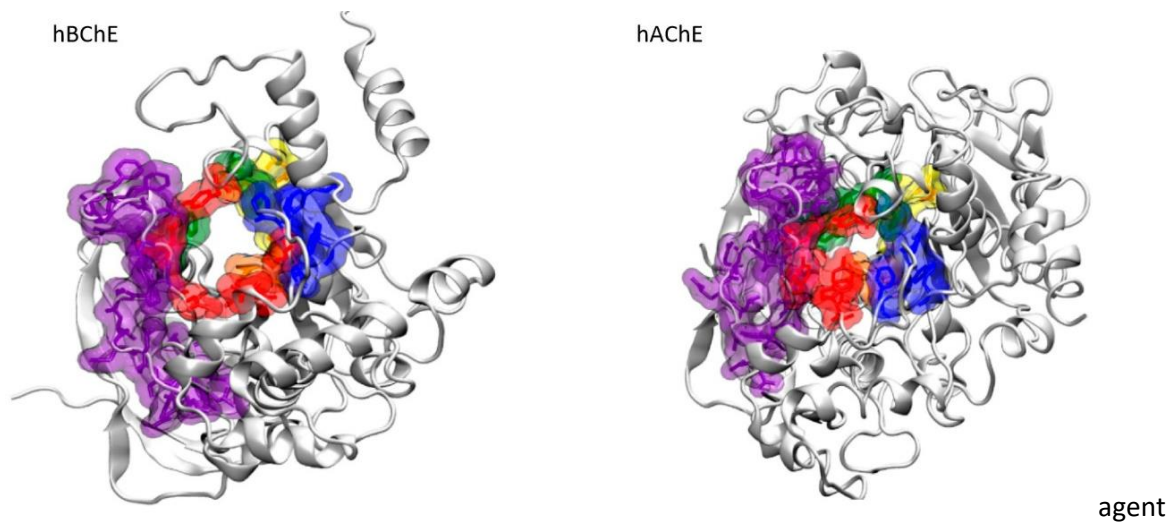


Figure 17 : Structures de la hBChE (PDB 1P0I) et de l'AChE (PDB 1B41) avec en violet la chaîne omega, en rouge le site périphérique, en bleu la poche acyle, en vert le site cation- π et en orange le trou oxyanionique (adapté de De Boer, 2021)⁸⁵

2.3.2.1. Site périphérique

Ainsi, trois résidus aromatiques du site périphérique de l'AChE (Tyr72, Tyr124 et Trp286, en orange **Figure 18**) sont remplacés par deux résidus comportant une fonction amide : Gln119 et Asn68 et un résidu aliphatique (Val277) qui participent très peu à la complexation de l'ACh à cet endroit. Seuls les résidus Asp70 et Tyr332 (**Figure 19**) correspondent à ceux du site périphérique de l'AChE et stabilisent de la même façon son ammonium quaternaire.⁸⁶ De plus, leur liaison avec l'ACh participe aussi à la régulation allostérique de la vitesse d'hydrolyse, via la chaîne omega qui les relie au site d'acylation.⁷³ Mais contrairement à l'AChE, une concentration plus élevée de substrat n'induit pas d'effet d'inhibition par excès de substrat : une deuxième molécule d'ACh ne gêne pas la sortie des produits d'hydrolyse et peut au contraire venir stabiliser l'intermédiaire tétrahédrique de la première molécule.⁸⁷

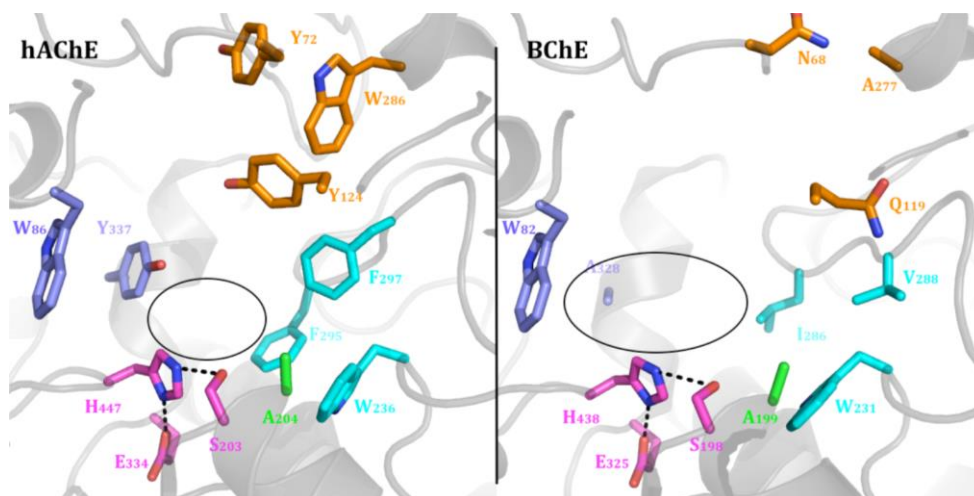


Figure 18 : Différences des acides aminés au niveau du site actif de l'hAChE et de l'hBChE⁵⁵

2.3.2.2 Gorge

La gorge de la BChE est bien plus large que celle de l'AChE, ce qui permet de faire entrer des esters plus volumineux que l'ACh, d'où une moins grande sélectivité. Comme dit précédemment, la cause prépondérante est le remplacement de résidus aromatiques par des résidus aliphatiques.

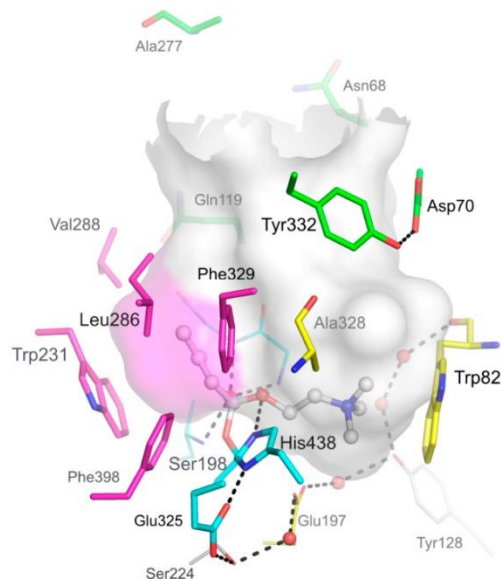


Figure 19 : Site actif de l'hBChE incluant l'ACh (PDB 1P0I) avec en vert le site périphérique, en jaune le site cation- π , en magenta la poche acyle, en cyan la triade catalytique et le trou oxyanionique et les molécules d'eau constitutionnelles représentées sous forme de sphères rouges⁷³

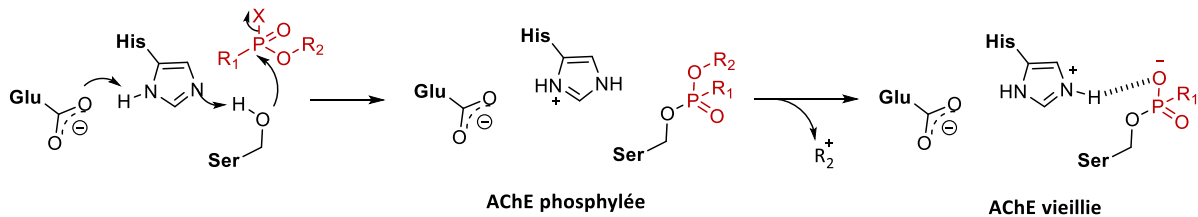
2.3.2.3 Site d'acylation

Le tryptophane (Trp82) conservé au niveau du site cation- π permet, comme pour l'AChE, la stabilisation de l'ammonium. Le trou oxyanionique (Gly116, Gly117, Ala199) ainsi que le site estérasique (Ser198, His438, Glu325) comportent les mêmes résidus (**Figure 19**).⁷³ La différence majeure vient de la poche acyle où les deux résidus phénylalanine de l'AChE sont remplacés par deux résidus aliphatiques (Leu286 et Val288) qui contraignent beaucoup moins la taille du groupement acyle de l'ester (cercles **Figure 18**), ce qui rend la BChE capable d'hydrolyser des esters plus volumineux.⁸⁸

2.3. Inhibition des cholinestérases par les organophosphorés

La nature lipophile des OPs leur permet de passer les différentes barrières biologiques, en particulier la barrière cutanée ou la barrière hémato-encéphalique, de se distribuer dans l'ensemble du corps et d'atteindre les cholinestérases, quelque soit leur localisation. De façon similaire à l'acétylcholine, les OPs forment un complexe de Michaelis-Menten avec l'enzyme avant d'atteindre son site actif, où la

triade catalytique joue le même rôle : l'histidine et le glutamate activent la nucléophilie de l'alcool de la sérine qui peut alors attaquer le phosphore électrophile de l'OP. Il s'ensuit l'élimination du groupe partant de l'OP et la phosphorylation de l'enzyme (**Schéma 2**).⁸⁹ Par la suite, deux réactions spontanées peuvent se produire : la déphosphorylation de la sérine par hydrolyse d'une molécule d'eau, de façon similaire à l'hydrolyse de l'acétate lors du mécanisme enzymatique, et aboutir ainsi à la réactivation de l'enzyme, ou la déalkylation du phosphonate, phénomène appelé vieillissement de l'enzyme.^{90,91}



Schema 2 : réactions de phosphorylation de la sérine catalytique et de déalkylation du phosphonate formé

L'hydrolyse du phosphonate est en revanche une réaction beaucoup moins favorable que celle de l'acétate, et donc très lente, car l'eau n'est pas assez nucléophile pour attaquer le phosphore de cet adduit très stable, c'est pourquoi la phosphorylation de l'enzyme est considérée comme irréversible. Seule l'histidine catalytique peut favoriser la réaction en exacerbant la nucléophilie d'une molécule d'eau, mais leurs positions respectives, l'une par rapport à l'autre et par rapport au phosphore, dans le site actif phosphorylé de l'enzyme, sont rarement favorables et dépendent des substituants de l'OP.

Ainsi le soman ne provoque presque aucun changement de la position de l'histidine mais s'interpose entre le résidu et la molécule d'eau, empêchant toute réactivation et favorisant au contraire la déalkylation.⁹² Au contraire, le VX et le tabun provoquent un changement radical de position de l'histidine catalytique durant la phosphorylation, mais avec des conséquences différentes. Le groupement éthoxy du tabun force l'histidine à prendre une position où son imidazolium ne peut plus être activé par une liaison hydrogène avec le glutamate catalytique, ne permettant aucune hydrolyse. Tandis que la conformation de l'imidazolium dans l'enzyme phosphorylée par le VX lui permet de faire une liaison hydrogène avec un autre glutamate du site actif et avec une molécule d'eau, mais dans une orientation moins favorable par rapport à l'accès au phosphore, rendant l'hydrolyse aussi lente que la déalkylation.^{93,94}

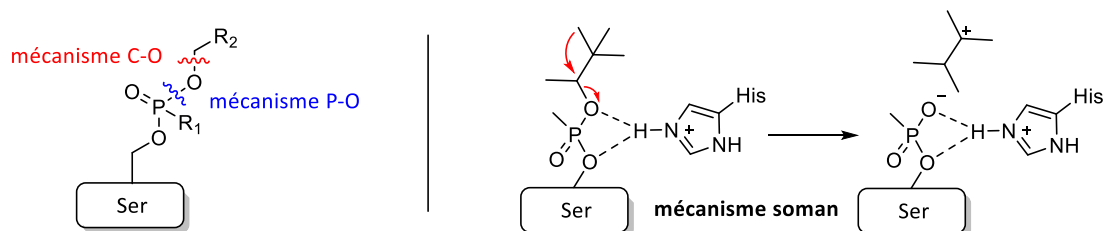
Globalement, aucune réactivation spontanée n'est observée chez les agents G, mais elle peut avoir lieu chez le VX et ses dérivés (VR, CVX) et chez une grande partie des pesticides, avec des durées de demi-vie qui restent souvent très longues (**Tableau 4**).⁹⁵⁻⁹⁷

OP	t _{1/2} réactivation spontanée (h)	t _{1/2} vieillissement (h)
VX	33,0	36,5
VR	17,8	138,6
Soman	aucune	0,07
Sarin	aucune	3,0
Cyclosarin	aucune	7,0
Tabun	aucune	19,2
Methyl paraoxon	0,7	3,7
Ethyl paraoxon	31,5	31,5
DFP	aucune	3,1
Fenamiphos	aucune	138,6

Tableau 4 : Demi-vies des réactions de réactivation et de vieillissement spontanés de l'hAChE erythrocytaire phosphylée (37 °C, pH = 7,4)⁹⁸

Le vieillissement de l'enzyme a lieu quelque soit l'OP considéré, et le phosphonate déalkylé obtenu est d'une extrême stabilité grâce au pont salin formé entre son oxyanion et l'imidazole protoné de l'histidine catalytique, ainsi que grâce à la répulsion électrostatique qu'exerce cet oxyanion vis-à-vis d'un potentiel nucléophile chargé négativement (**Schéma 2**).

Deux mécanismes sont envisageables pour cette O-déalkylation : soit la rupture de la liaison P-O, soit la rupture de la liaison C-O (**Schéma 3**).⁹⁹ Les structures cristallines des enzymes vieilles obtenues par diffractions aux rayons X et des mesures de spectrométrie de masse d'enzymes vieilles en présence de H₂O¹⁸ (permettant de vérifier l'incorporation de l'isotope O¹⁸ sur le phosphore ou non), ont permis de conclure que le mécanisme le plus courant était la rupture de la liaison C-O. Cela a été vérifié sur l'hBChE pour le dichlorvos, l'échotiophate, le DFP, le sarin, le soman et le cyclohexylsarin et sur l'hAChE pour le tabun et le soman.^{92,94,100} Cependant, le mécanisme précis n'est pas connu : qu'il s'agisse d'une attaque d'une molécule d'eau sur le carbone en alpha, déclenchant la rupture de la liaison C-O, ou bien de la rupture préalable de la liaison C-O et l'hydratation consécutive du carbocation formé.



Schema 3 : mécanismes possibles pour le vieillissement de l'enzyme (gauche) et première étape du mécanisme de vieillissement pour l'enzyme phosphylée par le soman (droite)¹⁰¹

Le soman est un des seuls OPs pour lesquels le mécanisme a été totalement établi sur l'AChE, par cristallographie de l'enzyme phosphorylée et par des simulations moléculaires dynamiques QM/MM (quantum mechanical/molecular mechanical), corroborées par des données expérimentales.^{92,101,102} Il en ressort que deux paramètres importants influent sur la cinétique de la réaction de dé-alkylation, qui va de quelques minutes (pour le soman), à plus d'une centaine d'heures, suivant les OPs (**Tableau 4**) : la position de l'histidine catalytique dans l'enzyme phosphorylée et la capacité du substituant alkylé à se stabiliser sous forme de carbocation. En effet, le mécanisme de vieillissement de l'AChE phosphorylée par le soman fait intervenir en premier lieu la rupture spontanée de la liaison C-O immédiatement suivie d'une stabilisation des deux produits : l'oxyanion du phosphonate par l'histidine catalytique et le carbocation par la migration d'un méthyle de l'isopropyle pour mieux répartir la charge (**Schéma 3**). Ce carbocation est ensuite hydraté par une molécule d'eau. Or le soman est un des rares OPs avec lequel l'histidine catalytique peut à la fois rester activée par le glutamate et être alignée sur le phosphore dans l'enzyme phosphorylée, contrairement au VX ou au tabun. De plus, le soman est le seul à posséder un substituant où un méthyle peut migrer pour stabiliser la charge du carbocation. Il est à noter que les cinétiques de réactivation spontanée et de vieillissement pour un OP donné peuvent être différentes entre l'AChE et la BChE, car contrairement à l'AChE, l'histidine de la BChE est immobile, stabilisée par le résidu adjacent Phe398. Cela explique notamment pourquoi la BChE phosphorylée vieillit généralement plus rapidement que l'AChE.⁹⁴

Enfin, un mécanisme de *N*-déalkylation par attaque SN_2 d'une molécule d'eau sur le phosphore suivie de la rupture de la liaison P-N a été démontré dans le cas d'un OP analogue au tabun et de l'insecticide mipafox (doublement N-alkylé).^{103,104}

Pour retrouver une enzyme fonctionnelle à partir de la forme vieillie, il serait alors nécessaire de réalkyler le phosphonate pour ensuite cliver sélectivement la liaison P-O de la sérine phosphorylée. Selon une étude de simulation QM/MM et de calculs DFT, la barrière énergétique pour effectuer cette réalkylation est très élevée, cependant des optimisations d'agents alkylants restent envisageables.¹⁰⁵ Malheureusement, l'exceptionnelle stabilité de cette forme a contrecarré, jusqu'à aujourd'hui, les efforts entrepris, même si certaines pistes ont été développées.^{106,107} C'est pourquoi les efforts de la recherche se sont surtout concentrés sur la réactivation de l'enzyme avant son vieillissement, laissant de ce fait le cas du soman à part.

D'autres protéines estérasiques peuvent être touchées par les OPs, tel que la « neuropathy target esterase » dont la phosphorylation de la sérine et son vieillissement engendrent son inhibition et l'apparition d'un syndrome neuropathique retardé.¹⁰⁸

2.4. Conséquences physiologiques et pathologiques

Une fois phosphorylée, l'acétylcholinestérase est totalement inhibée et l'acétylcholine qui n'est plus hydrolysée s'accumule sur toutes ses cibles biologiques, principalement les jonctions synaptiques et neuromusculaires. Les récepteurs cholinergiques y sont alors surstimulés en continu par des concentrations trop élevées en ACh. Les conséquences sont différentes suivant l'organe touché et le type de jonction synaptique et de récepteur qui y sont associés. Le fonctionnement de ces derniers est d'autant plus dérégulé que certains OPs ont une action directe sur ces récepteurs.^{109,110}

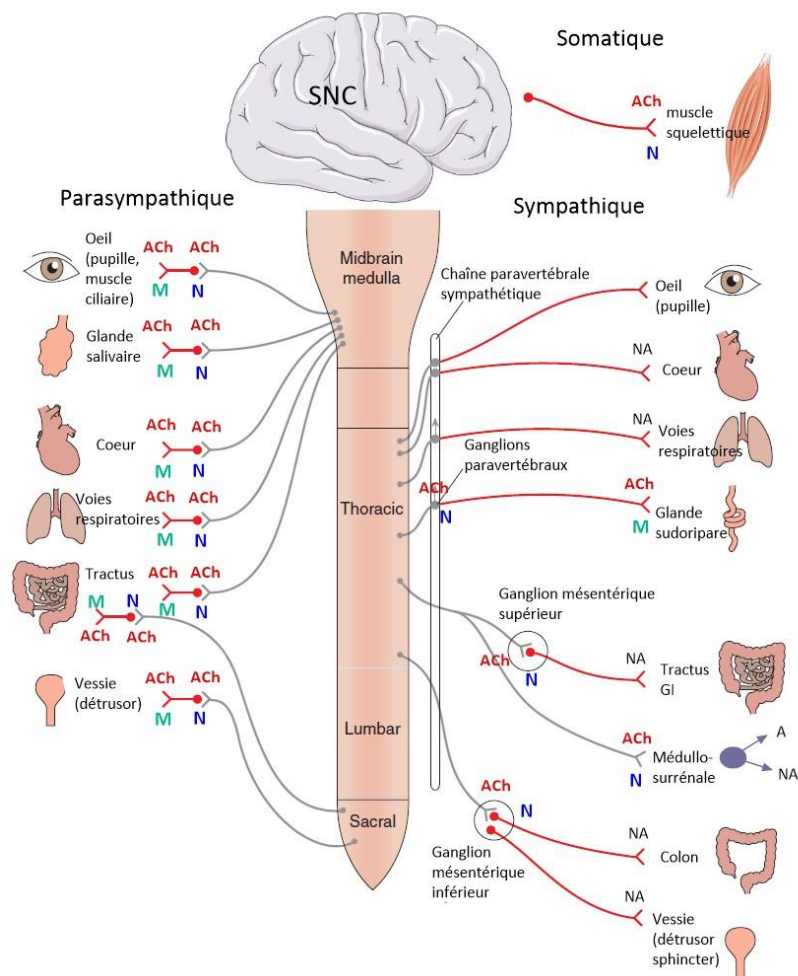


Figure 20 : Schéma général simplifié du SNC (système nerveux central) et du système nerveux périphérique incluant le système nerveux somatique et le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique), M : récepteur muscarinique, N : récepteur nicotinique, NA : noradrénaline, A : adrénaline, Tractus GI : Tractus gastrointestinal. (adapté de Waller et Sampson, 2018)³⁷

La perturbation de la transmission cholinergique touche les quatre grandes parties du système nerveux, comprenant le système nerveux central (SNC) où nAChRs et mAChRs sont présents, le

système somatique (mouvements volontaires), dont la transmission est assurée par les nAChRs, et le système autonome incluant le système sympathique, partiellement touché, et le système parasympathique, où les effets sont essentiellement muscariniques (**Figure 20**). Les symptômes produits dépendent de la gravité de l'intoxication comme de la voie d'entrée du toxique (cutanée, respiratoire, gastro-intestinale). Elle influe sur la bio-distribution, qui est par exemple bien plus lente par voie cutanée, avec un décalage des effets aigus.^{25,111,112} On peut aussi observer de profondes différences entre une intoxication par un agent neurotoxique organophosphoré et un pesticide : l'intoxication par le premier sera causée par une toute petite quantité de produit très inhibant, par voie respiratoire ou cutanée, tandis que l'intoxication par le deuxième sera causée par de grandes quantités de produit (intoxication volontaire) peu inhibant, par voie orale, influençant grandement la pharmacocinétique consécutive de l'OP.¹¹³

Les symptômes muscariniques périphériques comportent des larmoiements, spasmes ciliaires et myosis oculaire, de l'hypersécrétion : salivation et hypersudation, et la perturbation du système gastro-intestinal : nausée, vomissements, douleur abdominale et diarrhée, et cardio-vasculaire : bradychardie et hypotension, ainsi que de l'incontinence urinaire.

Les symptômes nicotiniques provoqués au niveau sympathique sont la dilatation des pupilles, la stimulation d'adrénaline et de noradrénaline, de la tachycardie et de l'hypertension, tandis qu'au niveau somatique on observe des crampes, contractions involontaires, et faiblesse et paralysie des muscles.

Les symptômes du SNC sont très variés et dépendent de la gravité de la situation avec : anxiété, fatigue, dépression, insomnie, trouble de l'élocution, altération du jugement, confusion, agitation, amnésie, ataxie, perte de réflexes, crises convulsives intenses, jusqu'au coma, voire la mort.

La cause principale de décès est l'arrêt respiratoire qui dépend des trois voies de signalisation, muscarinique, nicotinique et centrale. Ainsi les symptômes muscariniques provoquent de l'hypersécrétion bronchiale, de la bronchoconstriction, des bronchospasmes et de la détresse respiratoire, tandis que les symptômes nicotiniques provoquent la paralysie des muscles respiratoires (diaphragme, intercostal) et de l'arythmie respiratoire. Enfin, au niveau central, la dépression du contrôle de la respiration provoque de l'apnée. Le caractère décisif d'une des trois voies dans l'arrêt respiratoire est discuté et semble notamment dépendre du stade de l'intoxication.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Suite à la phase cholinergique aiguë, les pesticides sont connus pour causer, dans environ 20% des cas, un syndrome intermédiaire dans les 2 à 4 jours suivants. Il provoque une faiblesse des muscles

proximaux incluant les muscles respiratoires et du cou. Sans intubation il évolue rapidement vers un arrêt respiratoire fatal.¹¹⁷

Au niveau du système nerveux central, les OPs induisent des effets destructeurs de court jusqu'à long terme. En effet, on distingue plusieurs phases, la première étant les crises convulsives causées par l'hyperstimulation des jonctions cholinergiques. Ensuite, cette hyperexcitation se transmet aux autres réseaux neuronaux gérés par d'autres neurotransmetteurs, provoquant des crises à forme épileptique. La répétition de celles-ci provoque entre autres un afflux trop important de Ca^{2+} à l'intérieur des cellules et la formation de radicaux libres, perturbant le fonctionnement des mitochondries qui mène, notamment par du stress oxydatif, au dysfonctionnement de la cellule et à sa mort. L'augmentation de l'apoptose des cellules et les dysfonctionnements métaboliques provoquent des réponses inflammatoires et nerveuses, comme l'augmentation des cellules gliales, qui induisent à long terme des processus neurodégénératifs.¹¹⁸⁻¹²³ D'autant que les systèmes de régulation de la réponse inflammatoire, cholinergique et non cholinergiques, sont aussi très perturbés par l'intoxication aux OPs.¹²⁴⁻¹²⁶

Une autre neuropathologie, plus rare, peut être provoquée par les OPs : le syndrome neurotoxique retardé, qui survient 2 à 5 semaines après la phase initiale. Il est principalement causé par l'inhibition de l'enzyme Neurotoxicity Target Esterase, intervenant dans le métabolisme lipidique des neurones, et provoque la dégénérescence des axones neuronaux et secondairement leur démyélinisation, aux niveaux périphérique et central. Cela se traduit par des crampes et des douleurs dans les membres inférieurs, ainsi que des engourdissements, une paresthésie et une faiblesse progressive pouvant évoluer vers leur paralysie. Le rétablissement du bon fonctionnement des nerfs périphériques peut être total ou partiel suivant la sévérité de l'intoxication.^{108,127}

Pour lutter contre les effets des organophosphorés, différents moyens de lutte ont été développés, dont les contre-mesures médicales.

3. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES ORGANOPHOSPHORES

Quatre champs de recherche ont été investis ces dernières décennies pour faire face à une utilisation d'organophosphoré et à ses conséquences :

- Détection
- Décontamination
- Protection
- Antidote

Les deux premiers points ne seront pas développés dans cette thèse. Pour la protection des personnes, outre les équipements de protection tels que masque à gaz et combinaison, un outil important est la prophylaxie.

3.1. Prophylaxie

Un agent prophylactique a pour objectif d'empêcher l'OP d'atteindre ses cibles biologiques. Cela peut être soit un ligand de cette cible, l'AChE ici, qui bloque la liaison de l'OP avec elle, soit une protéine ou une molécule qui neutralise l'OP avant qu'il ne l'atteigne. Cette stratégie paraît particulièrement intéressante pour le cas du soman, puisque cela fait abstraction des problèmes de vieillissement de l'AChE (qui n'est plus réactivable sous cette forme). Cependant elle ne s'adresse qu'aux populations militaires, qui sont les seules à avoir la possibilité de prévoir en amont un risque accru.

3.1.1. Ligands des cibles biologiques

Dans ce cadre, un inhibiteur réversible du site actif de l'AChE peut être utilisé en prétraitement pour bloquer l'accès de l'OP à l'enzyme durant la période d'intoxication, de façon covalente ou non. Cette stratégie est sensée laisser le temps suffisant pour administrer un second traitement plus adapté pour neutraliser l'OP, qui sinon reste fonctionnel dans le corps. Lors de l'intoxication, un pourcentage suffisant de la quantité totale d'enzyme doit être inhibé de façon réversible pour sauvegarder un fonctionnement cholinergique satisfaisant, tandis qu'avant l'intoxication, une quantité suffisante d'enzyme doit rester fonctionnelle pour ne pas provoquer un blocage de la transmission cholinergique.¹²⁸ Ainsi, le problème principal de ce traitement réside dans le dosage délicat de l'inhibiteur et dans les effets secondaires qu'il peut produire. Cela a notamment été le cas pour le

bromure de pyridostigmine, qui est utilisé dans les armées occidentales (**Figure 21**).¹²⁹ Ce carbamate réagit transitoirement avec la sérine catalytique qui est carbamoylée. Ce carbamate sur la sérine est ensuite hydrolysable par une molécule d'eau. Il produit de nombreux effets secondaires et il est suspecté d'être une des causes du syndrome de la guerre du Golfe chez les soldats américains l'ayant utilisé pour se protéger de potentielles attaques chimiques.¹³⁰⁻¹³² De plus, la charge permanente de la pyridostigmine l'empêche de traverser efficacement la barrière hémato-encéphalique (BHE), et donc de protéger l'AChE au niveau du SNC.¹³³ D'autres carbamates ont été étudiés, sans pour autant être sélectionnés comme potentiel nouveau traitement prophylactique. Certains traversent cependant bien mieux la BHE, tel que la rivastigmine ou la physostigmine.¹³⁴⁻¹³⁶

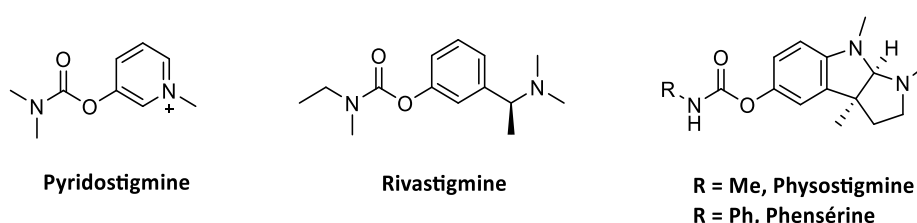


Figure 21 : Structures des carbamates étudiés en prophylaxie

Des inhibiteurs non covalents provenant de traitements de la maladie d'Alzheimer ont aussi été étudiés. Ils ont notamment l'avantage d'avoir une sélectivité entre la BChE et l'AChE, celle-ci étant la cible privilégiée à protéger. Ces molécules traversent aussi facilement la BHE et ont démontré la capacité à protéger le SNC des dégâts habituellement causés par les OPs, en particulier la galantamine et l'huperzine A en présence de soman (**Figure 22**).¹³⁷⁻¹⁴¹ De plus la galantamine possède une bonne pharmacocinétique par voie orale.

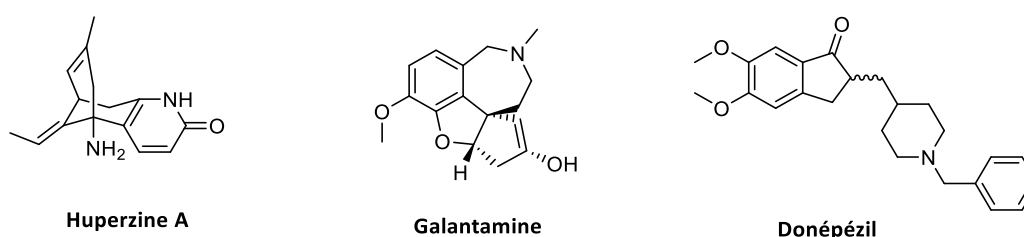


Figure 22 : Structures des inhibiteurs non covalents de l'AChE issus de la recherche sur Alzheimer

Cependant, la toxicité de l'huperzine et de la galantamine aux doses thérapeutiques devrait être réévaluée compte tenu des deux publications présentant des conclusions contradictoires sur l'avantage de l'un par rapport à l'autre.^{134,142} En outre, les études de ces composés devraient être approfondies sur un plus large spectre d'OPs pour démontrer leur efficacité par rapport à la pyridostigmine, en particulier l'huperzine A (galantamine testée sur le sarin, le paraoxon et le VX¹⁴³).

Car même si certains chercheurs considèrent l'inhibition réversible de l'AChE par ces composés indépendante de l'OP et les résultats obtenus sur le soman généralisables¹³⁵, la compétition entre ces deux types d'inhibiteurs peut pourtant varier suivant la nature de l'OP, ainsi que sa voie d'entrée, cutanée ou inhalatoire.¹³² Enfin, la toxicité des OPs ne provient pas uniquement de leur action sur les cholinestérases et des mécanismes moins prévisibles compromettant l'efficacité du traitement ne sont jamais à exclure.

La gestion de la toxicité intrinsèque de ces composés est donc un défi particulièrement difficile à relever. Malgré cela, la recherche d'autres composés se poursuit dans ce domaine.^{144,145}

3.1.2. Bioépurateurs

Un bioépurateur a pour but de neutraliser l'OP avant qu'il n'atteigne l'AChE. Il doit avoir une action très rapide, irréversible et spécifique, qui permette d'augmenter significativement la LD₅₀ d'un OP en présence du bioépurateur, sans effets immunitaires ni effets secondaires trop importants.^{146,147} Cela peut être une petite molécule ou une protéine, et la neutralisation de l'OP peut se faire de façon stoechiométrique, pseudo-catalytique ou catalytique (**Figure 23**).

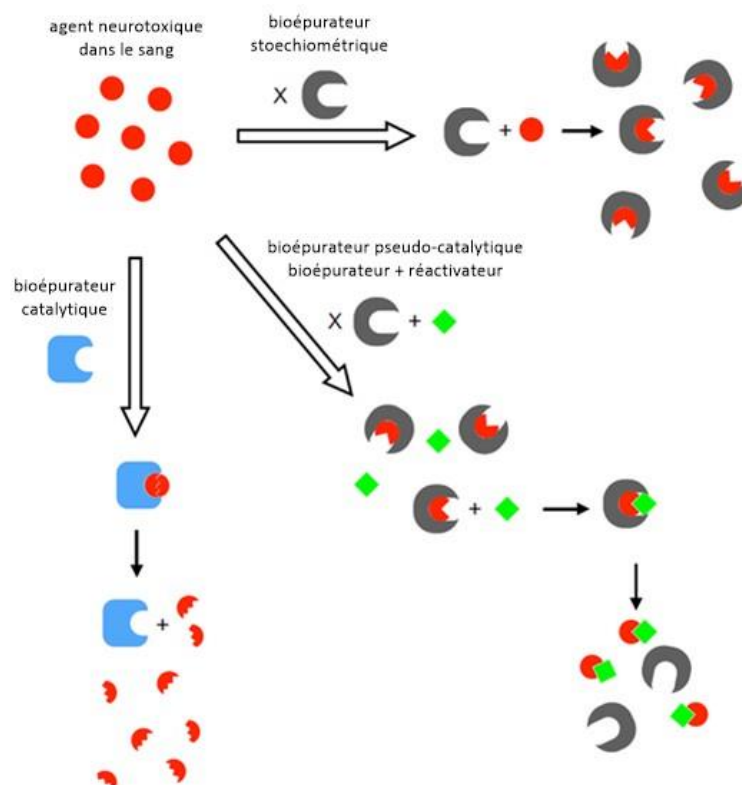


Figure 23 : Bioépurateurs stœchiométriques : un bioépurateur réagit avec un seul OP, Bioépurateur pseudo-catalytique : l'ajout d'une deuxième molécule permet de réactiver le bioépurateur, Bioépurateur catalytique : il hydrolyse les molécules d'OP en continu (adapté de Masson, 2017)¹⁴⁶

3.1.2.1. Cages moléculaires

La recherche sur les bioépurateurs a récemment investi le champ des macrocycles moléculaires, dont la forme et la nature chimique peuvent être modulées pour capturer les petites molécules d'OP. La fonctionnalisation de ces molécules peut permettre aussi de les neutraliser. Des études plus poussées, notamment *in vivo*, sont encore cependant nécessaires sur ces nouveaux outils.

Cyclodextrines

Dans les années 70, le piégeage du sarin et du soman par les α - et β - cyclodextrines a été démontré *in vitro*.¹⁴⁸ L'ajout de groupes nucléophiles sur le macrocycle a ensuite permis la neutralisation catalytique d'une large variété d'OPs, agents neurotoxiques et pesticides, avec des efficacités pour la plupart modérées.^{149–151} Cependant, cette fonctionnalisation reste un défi synthétique. De plus, le principal inconvénient de ces composés est que leur affinité pour tel ou tel OP dépend de la taille du cycle et de ses substituants, limitant leur spectre d'action, notamment vis-à-vis des agents V.¹⁵² Ce type de composé a tout de même prouvé une certaine efficacité *in vivo* en diminuant la mortalité de cochons d'Inde intoxiqués par du cyclosarin.¹⁵³

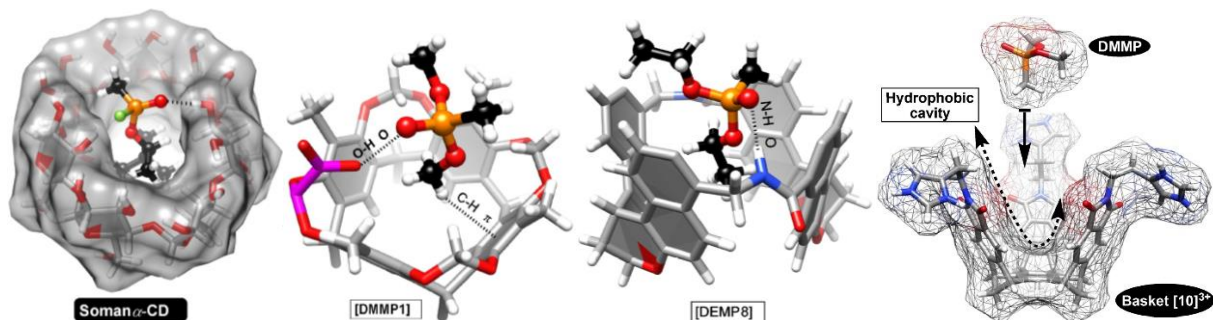


Figure 24 : Structures et surfaces de Van Der Waals d' α -cyclodextrine complexant une molécule de soman (gauche), de résorcinarène comportant un groupe carboxylique complexant une molécule de DMMP (milieu gauche), de naphthotube complexant une molécule de DEMP (milieu droite), et de panier moléculaire complexant une molécule de DMMP. DMMP : diméthyl méthylphosphonate, DEMP : diéthyl méthylphosphonate (adapté de Finnegan, 2021)¹⁵⁴

Autres cages moléculaires

Les pillarènes, resorcinarènes et calixarènes ont aussi été développés dans ce but. Des calixarènes substitués ont ainsi pu démontrer leur capacité à neutraliser plusieurs agents V *in vitro* dans des conditions physiologiques (37 °C, pH 7,4).¹⁵⁵ D'autres cages moléculaires sont envisagées, parmi lesquelles les cucurbituriles, naphthotubes, des structures organométalliques (MOF) et des paniers moléculaires (molecular basket) (**Figure 24**).¹⁵⁴ Les bioépurateurs protéiques d'origine biologique sont néanmoins pour l'instant nettement plus efficaces pour hydrolyser les OPs.

3.1.2.2. Bioépurateur protéique stoechiométrique

Différentes protéines, endogènes ou exogènes, ont démontré une capacité à hydrolyser les molécules d'OPs, dont l'AChE, la BChE, la carboxylestérase, l'albumine plasmique, la paraoxonase et la phosphotriestérase.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ Chacune a cependant un inconvénient qui peut être une cinétique trop lente, un empoisonnement par l'OP, un spectre d'action incomplet, des quantités naturelles trop faibles, une purification difficile, une mauvaise stabilité dans le plasma sanguin, une immunogénicité trop importante ou la survenue de réactions toxiques.

Les cholinestérases ont bien sûr fait l'objet des recherches les plus intenses, car ce sont les cibles directes des OPs, et elles couvrent l'ensemble des OPs, puisqu'un OP incapable de phosphoryler ces enzymes ne devrait pas être toxique. En revanche, compte tenu de la phosphorylation irréversible de la sérine catalytique, l'inconvénient majeur de l'utilisation de ces enzymes comme épurateur des OPs est la nécessité d'utiliser une molécule de protéine pour neutraliser une molécule d'OP (et donc d'en utiliser une quantité stoechiométrique). L'AChE présente également la meilleure stéréosélectivité pour les OPs chiraux comme les agents V.^{160,161} L'AChE exogène présente ainsi des cinétiques d'hydrolyse élevées vis-à-vis de différents OPs et un essai préclinique sur des humains a montré que l'injection d'AChE produite à partir d'une plante génétiquement modifiée était sûre et bien tolérée.¹⁶² Néanmoins, l'AChE est peu stable dans le sang. La pégylation de la protéine ou encore son encapsulation en nanoparticules (ce qui permet son relargage sur plusieurs jours) ont permis d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques.¹⁶³⁻¹⁶⁵

L'hBChE est, elle, en revanche, naturellement beaucoup plus stable, jusqu'à une semaine dans le sang. Bien que moins sélective que l'AChE, elle ne provoque pas d'effets secondaires et ne présente pas d'immunogénicité lorsqu'elle est à forte dose. Les nombreuses études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré une bonne efficacité, car un prétraitement avec cette enzyme permet d'augmenter les DL₅₀ des différents OPs d'un facteur de 1,5 à 8.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ Son développement industriel est ainsi le plus avancé, un essai clinique de phase 1 ayant été validé.^{170,171} Pour autant, dans les deux cas, il s'agit donc d'une réaction stoechiométrique entre l'OP et l'enzyme, qui est ensuite empoisonnée de façon pratiquement irréversible, ce qui nécessite l'utilisation de quantités importantes : il a été par exemple établi qu'une dose de 200 mg d'hBChE était nécessaire pour multiplier par deux la DL₅₀ du soman pour un être humain de 70 kg.⁵² Or la purification de l'hBChE extraite du plasma humain est une opération complexe, et qui nécessite plusieurs étapes de chromatographie, ce qui en fait une source largement insuffisante d'hBChE (280 mg pour 80 L).^{172,173}

Les efforts se sont donc concentrés sur les moyens de produire et de purifier de plus grandes quantités d'enzyme. Parmi toutes les cellules, plantes et animaux génétiquement modifiés étudiés pour produire de la BChE humaine recombinante, le lait de chèvres génétiquement modifiées est la source la plus prometteuse (5 g/L) mais il reste cependant des problèmes liés à la lactation.^{80,174-176} Récemment, les travaux menés au laboratoire ont permis le développement de résines greffées avec des analogues d'huprine (inhibiteur efficace de l'hAChE, et qui montre une affinité adéquate pour la purification d'hBChE), ce qui a permis d'améliorer significativement l'efficacité de la purification, et de limiter à une seule les étapes de chromatographie (cette résine est commercialisée par la société ChemForAse, spin-off du laboratoire).^{177,178} Malheureusement la stabilité dans le plasma de ces enzymes recombinantes reste limitée. Pour améliorer cette stabilité, les mêmes types de solutions que pour l'AChE exogène ont été proposés. L'augmentation de la taille de la protéine (pégylation) ou l'amélioration de son oligomérisation ont été évaluées, ainsi que son encapsulation.¹⁷⁹⁻¹⁸³ Malgré cela, ce traitement stoechiométrique reste excessivement onéreux au regard des quantités nécessaires. Avant de trouver une source d'enzyme bon marché, une piste consiste à rendre le traitement pseudo-catalytique en rajoutant un réactivateur capable de déphosphoryler l'enzyme pour qu'elle puisse neutraliser plus d'une seule molécule d'OP, ce qui diminuerait la quantité nécessaire à injecter.

3.1.2.3. Bioépurateur protéique pseudo-catalytique

Le facteur limitant de ce type de traitement est la vitesse de réactivation de l'enzyme phosphorylée, et l'efficacité de ces réactivateurs quelque soit l'OP utilisé. Or les réactivateurs existants ont majoritairement été développés pour réactiver l'AChE, qui est la cible biologique fondamentale. Il s'avère donc que la vitesse de réactivation de la BChE par ces composés est beaucoup trop lente, à cause des différences structurales entre les deux enzymes.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ Plusieurs équipes ont travaillé sur le design de nouveaux réactivateurs, destinés à réactiver efficacement l'hBChE phosphorylée, ou dans l'idéal chacune des deux cholinestérases, certains ayant été testés *in vivo*.¹⁸⁷⁻¹⁹¹ Dans ce contexte, le projet ANR PseudoScav 2019-2023 (ANR-19-CE39-0009), impliquant l'équipe de chimie bio-organique du laboratoire COBRA, une équipe strasbourgeoise de l'ICPEES, dirigée par le Dr. Rachid Baati, l'équipe du Dr. Florian Nachon du Département de Toxicologie et Risques Chimiques de l'IRBA et une équipe de biologie structurale de l'IBS de Grenoble, dirigée par le Dr. Martin Weik, a pour objectif de développer de tels réactivateurs de butyrylcholinestérase afin d'obtenir un système de bioépurateur pseudo-catalytique (**Figure 23**).

L'équipe de Zhang *et al.* a publié en 2020 ses travaux sur des BChEs fonctionnalisées avec de nombreuses chaînes polymères comportant des fonctions réactivatrices.¹⁹² Les composés obtenus peuvent se réactiver à hauteur de 55 à 84% en 5-6 h, ce qui reste encore trop lent. Cependant cette équipe a montré que trois cycles d'inhibition-réactivation pouvaient être réalisés.

En utilisant un bioépurateur pseudo-catalytique à base d'AChE, il est possible d'utiliser les réactivateurs qui ont été développés jusqu'ici, qui bien que significativement meilleurs que sur la BChE, n'en restent pas moins inégalement efficaces en fonction de l'OP (voir partie 3.4.). De plus, le phénomène de vieillissement qui empêche la réactivation de l'enzyme compromet l'utilisation de cette méthode, en particulier contre le soman. Des travaux de mutagenèse dirigée sur l'AChE ont été entrepris et ont montré à la fois une diminution de la vitesse de vieillissement contre le soman, et une augmentation de la vitesse de réactivation, notamment avec la mutation Y337A qui permet d'élargir la gorge du site actif de l'enzyme.¹⁹³

Comme précédemment, de telles AChEs mutées présentent des problèmes de stabilité, qui peuvent être réduits là encore par la pégylation de l'enzyme. De plus, des études *in vivo* ont souligné l'importance de réactiver à la fois l'enzyme mutée et l'endogène, ce qui complique l'obtention d'un réactivateur ayant de bonnes cinétiques de réactivation sur les deux enzymes structurellement différentes. En outre, la clairance des réactivateurs est souvent très forte, ce qui nécessiterait des injections très régulières : l'encapsulation du réactivateur a été proposée comme solution. La fixation du réactivateur directement sur l'enzyme, comme ce qui a été fait pour la BChE, pourrait en être une autre. Finalement, il apparaît que la complexité des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques en jeu compromet les chances de succès de tels traitements prophylactiques. Le concept de bioépurateur catalytique apparaît donc comme le traitement le plus prometteur puisque l'hydrolyse catalytique des OPs permettrait l'injection d'une quantité limitée d'un seul type de composé.⁵²

3.1.2.4. Bioépurateur protéique catalytique

L'efficacité d'un bioépurateur catalytique est mesurée par son taux de roulement k_{cat} (nombre de molécules d'OP hydrolysées par minute) et par sa constante de Michaelis-Menten K_m qui peut être associée à l'efficacité de formation du complexe OP-enzyme. Il a été estimé que pour offrir une neutralisation efficace d'un OP (détoxification complète en quelques minutes), l'enzyme doit présenter un $k_{cat}/K_m > 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.¹⁹⁴ Parmi toutes les enzymes identifiées comme étant capables d'hydrolyser les OPs, qu'elle soit d'origine humaine, bactérienne, végétale ou animale, aucune n'a à la

fois le pouvoir de se réactiver spontanément et une telle efficacité. Les enzymes présentant le meilleur profil nécessitent donc d'être modifiées par mutagenèse dirigée dans le but d'améliorer leurs propriétés.

Les enzymes endogènes ont pour avantage de présenter de longs temps de séjour sans provoquer de réaction immunitaire. La butyrylcholinestérase humaine a ainsi fait l'objet d'une attention soutenue depuis les années 90. Parmi les plus de 60 variants de l'enzyme développés, le variant BChE-G117H s'est montré le plus prometteur en augmentant sa vitesse de réactivation spontanée d'un facteur 100 à 1000 selon l'OP, tout en conservant une bonne affinité pour les OPs. Son efficacité prophylactique s'est vérifiée *in vivo* contre une intoxication à l'échothiophate, cependant elle reste globalement encore trop faible.⁵² De plus ce variant reste sensible au vieillissement face au soman. Pour cela la mutation du résidu Glu197, qui est impliqué dans ce phénomène, a permis d'obtenir le variant BChE-G117H/E197Q, qui est alors capable de réactivation spontanée avec le soman.¹⁹⁵ Enfin, des études consistant à imiter la structure de la BChE porcine et à comprendre le mécanisme impliqué pour cette enzyme est une des dernières pistes d'amélioration étudiée car celle-ci présente des cinétiques de réactivation spontanée bien meilleures que l'humaine sous sa forme naturelle.¹⁹⁶

En ce qui concerne l'AChE, malgré de multiples travaux de mutagenèse dirigée entrepris, aucun n'a permis d'améliorer sa faible réactivation spontanée ni sa forte propension au vieillissement. Une autre enzyme humaine possède une affinité naturelle pour les OPs : la paraoxonase PON-1.¹⁸⁴ Les mutations de certains de ses résidus ont permis d'obtenir de très bonnes efficacités d'hydrolyse des OPs (k_{cat}/K_m), supérieures à $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ pour le cyclosarin et le soman, qui se sont confirmées *in vivo* avec la survie à 100 % de cochons d'Inde intoxiqués par 2 LD₅₀ de cyclosarin et traités 1 h avant par 0.2 à 1 mg/kg de bioépuration. Malheureusement cette enzyme est inefficace contre les agents V. Deux autres enzymes humaines ont été envisagées comme bioépuration : la carboxylestérase 1 et la carboxylestérase intestinale.

Deux autres carboxylestérases d'insecte et de bactérie ont aussi été étudiées, sans que les mutations effectuées permettent d'atteindre des efficacités (k_{cat}/K_m) de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Parmi les enzymes bactériennes, l'enzyme phosphotriestérase (PTE) présente à l'état naturel les réactivations spontanées les plus efficaces parmi toutes les enzymes évaluées jusqu'à maintenant. L'efficacité étant inégale selon les OPs, de très nombreuses études de mutagenèse ont été publiées pour en faire un bioépuration à large spectre, d'autant que leur origine bactérienne en facilite la production. Les variants PTE C23 et C23AL se sont révélés prometteurs, avec une efficacité $k_{cat}/K_m = 1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ pour le deuxième contre le VX, et avec une détoxification efficace *in vivo*.^{197,198} Leur efficacité contre

les agents G reste cependant limitée. Au contraire, le variant Mut1 de l'enzyme DFPase de calmar est très prometteur contre les agents G (efficacité de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ainsi que les variants obtenus à partir de l'enzyme organophosphate acid anhydrolase.¹⁸⁴ Pour autant, pour la plupart de ces enzymes exogènes, il est nécessaire d'opérer des modifications chimiques (pégylation) ou de les encapsuler pour contrecarrer leur mauvaise pharmacocinétique et leur immunogénicité.

Malgré de nombreux progrès, un traitement prophylactique de référence n'est donc pas encore prêt, d'autant que la production et la purification de ces enzymes aux normes GMP peut s'avérer très difficile et coûteux.^{199,200} Cependant l'action détoxifiante de ces enzymes peut aussi être utilisée dans un traitement pharmacologique d'urgence en cas d'intoxication.

3.2. Traitement pharmacologique d'urgence

Sans mesure prophylactique, il faut faire appel à des antidotes de l'intoxication aux organophosphorés. Pour cela, plusieurs modes d'actions sont possibles, qui sont complémentaires : contrebalancer les symptômes provoqués par l'inhibition de l'AChE et préserver l'activité de l'enzyme.

Les moyens d'action pour réguler les symptômes peuvent consister à :

- Limiter la production et l'exocytose de l'ACh pour limiter son excès synaptique
- Rétablir une activité normale des récepteurs nicotiniques et muscariniques en présence de l'excès d'ACh
- Rétablir une activité normale des autres récepteurs neuronaux et de leurs neurotransmetteurs associés pour lutter contre la surexcitation neuronale dans le SNC.

Les moyens d'action pour préserver l'activité de l'AChE peuvent passer soit par la capture et la neutralisation de l'OP (mêmes outils qu'en prophylaxie), soit par la réactivation de l'AChE phoshylée.

Le traitement pharmacologique d'urgence standard utilisé actuellement est un cocktail de trois molécules agissant sur ces différents aspects : l'atropine, le diazépam ou sa prodrogue hydrosoluble avizafone et un réactivateur de l'AChE (**Figure 25**). L'atropine est un antagoniste compétitif des récepteurs muscariniques qui permet de limiter les symptômes associés. Le diazépam est une benzodiazépine modulateur allostérique positif (PAM) des récepteurs GABA_A accentuant leur effet inhibiteur sur l'activité neuronale et limitant ainsi la surexcitation neuronale. Les crises convulsives responsables de dégâts irréversibles au cerveau sont ainsi limitées. Ces traitements symptomatiques seront développés dans la partie 4, en incluant les récepteurs nicotiniques dont les symptômes ne sont jusqu'à ce jour pas traités.

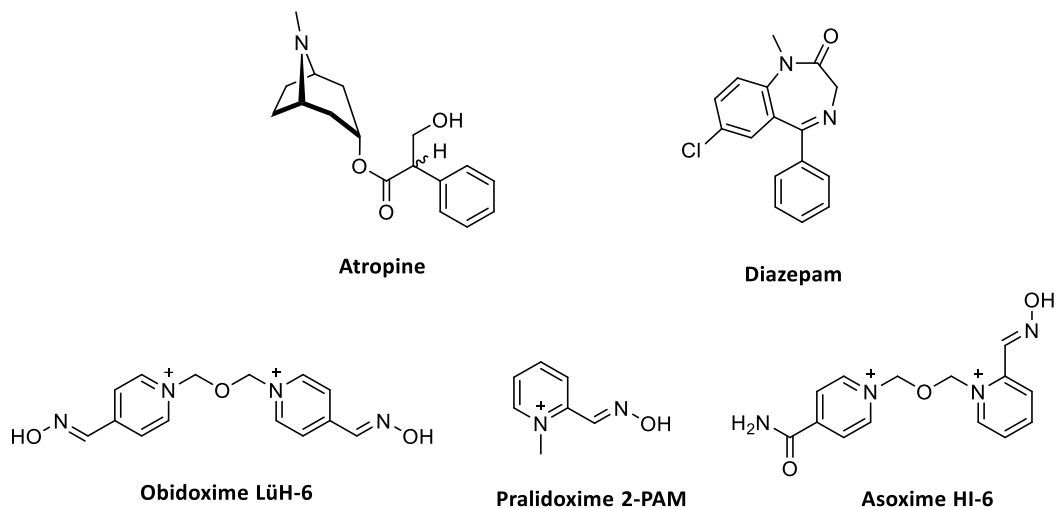
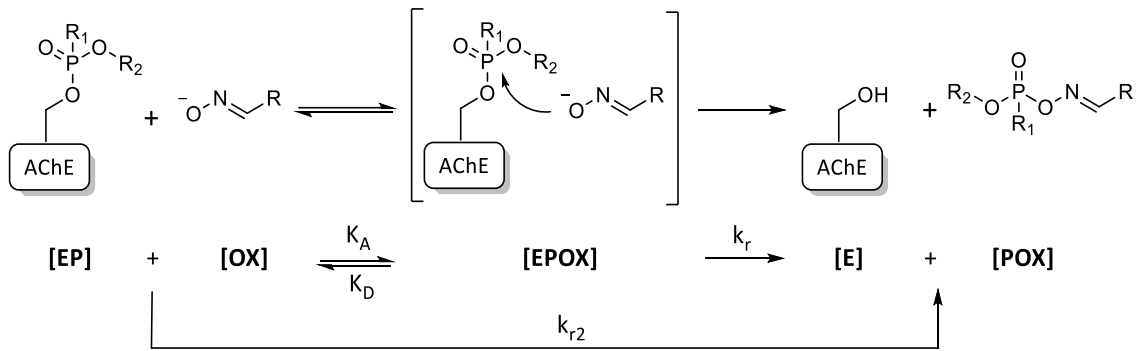


Figure 25 : structures des réactivateurs, de l'atropine et du diazepam utilisés comme traitement pour une intoxication aux OPs

Le réactivateur a une fonction chimique nucléophile permettant de s'additionner au phosphore électrophile de l'AChE phosphorylée et de la déphosphyler. Les trois réactivateurs autorisés actuellement dans le monde pour un usage médical comportent la fonction aldoxime, il s'agit du pralidoxime (2-PAM), de l'obidoxime (LüH-6) et de l'asoxime (HI-6). Le pralidoxime est notamment utilisé en France, en combinaison avec les autres molécules dans un auto-injecteur fabriqué par la pharmacie centrale des armées (INEUROPE®).^{201,202} Son remplacement par le HI-6 est cependant envisagé. En effet ces réactivateurs de référence n'ont pas une action thérapeutique universelle face à tous les OPs existants et souffrent d'autres faiblesses qui ont rendu indispensable leur remplacement par de meilleurs réactivateurs.

3.3. Réactivation de l'AChE – mécanisme

La déphosphylation ne peut être faite que par une molécule possédant une fonction chimique suffisamment nucléophile pour attaquer le phosphore électrophile. Pour atteindre une telle nucléophilie, les recherches se sont portées sur les fonctions chimiques nucléophiles profitant d'un effet alpha : deux hétéroatomes adjacents possédant chacun au moins un doublet non liant, ce qui accroît la réactivité de l'ensemble. Parmi les fonctions potentielles, les oximes font figures de référence dans la recherche sur les réactivateurs.



Schema 4 : mécanisme et paramètres réactionnels de la réactivation de l'AChE

Le mécanisme de réactivation passe par la formation d'un complexe de Michaelis-Menten [EPOX] réversible, entre l'enzyme phosphorylée [EP] et le réactivateur portant l'oxime [OX], celui-ci étant en équilibre acido-basique entre formes oxime et oximate à pH physiologique (**Schéma 4**). Ce complexe est caractérisé par une constante d'association K_A et une constante de dissociation K_D mesurant l'affinité entre le réactivateur et l'enzyme phosphorylée en mmol/L. L'oximate peut ensuite réaliser une addition nucléophile sur le phosphore, suivie de l'élimination de l'oxyme phosphorylé [POX], ce qui libère l'alcool de la sérine catalytique de l'enzyme [E]. La vitesse de cette réaction est caractérisée par la constante cinétique k_r exprimée en min^{-1} . Dans le cas où la concentration en oxime est largement supérieure à la concentration initiale en enzyme inhibée : $[OX] \gg [EP]_0$, et que la réactivation est complète, l'équation cinétique peut se simplifier en une équation de vitesse de pseudo-ordre 1 de constante k_{obs} , pour une concentration donnée d'oxime.⁹⁸

$$k_{obs} = \frac{k_r [OX]}{K_D + [OX]}$$

Cette constante peut être obtenue expérimentalement pour différentes concentrations d'oxime, ce qui permet ensuite d'en déduire k_r , puis K_D , puisque $\lim_{[OX] \rightarrow \infty} [k_{obs}] = k_r$. De plus, dans le cas où $[OX] \ll K_D$, l'équation peut se simplifier pour donner la constante de vitesse d'ordre 2 de la réaction de réactivation k_{r2} (en $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$) :

$$k_{r2} = \frac{k_r}{K_D}$$

Cette constante traduit l'efficacité globale de la réaction, incluant à la fois l'affinité du réactivateur pour l'enzyme phosphorylée (K_D) et la vitesse de réaction (k_r). Les trois constantes sont donc utilisées pour comparer les performances des différents réactivateurs développés. Néanmoins, il peut être difficile d'effectuer de telles comparaisons entre les résultats de différents laboratoires car certaines équipes ne fournissent parfois pas ces constantes mais plutôt les valeurs de pourcentage d'enzyme

réactivée en un temps donné avec une concentration d'oxime donnée. La valeur de k_{r2} dépend aussi de facteurs expérimentaux tels que l'origine de l'AChE utilisée pour ces tests, sa séquence exacte en acides aminés et son mode de préparation et de purification.²⁰³

3.4. Pharmacologie des réactivateurs de référence

3.4.1. Efficacité *in vitro*

La recherche sur les réactivateurs a débuté dans les années 50 avec l'identification de l'hydroxylamine et des acides hydroxamiques comme nucléophiles potentiellement aptes à effectuer cette déphosphylation.²⁰⁴ Ces travaux ont ensuite permis la découverte de l'efficacité supérieure des oximes et l'affinité des motifs pyridiniums pour le site actif de l'AChE, conduisant à la découverte en 1955 du seul mono-pyridinium aldoxime encore utilisé : le pralidoxime (2-PAM) (**Figure 26**).²⁰⁵ Puis à partir de la fin des années 50, ont été synthétisés les bis-pyridiniums aldoximes, qui montraient de meilleures efficacités de réactivation grâce à une plus grande affinité pour le site actif. Les premiers leads furent des bis oximes symétriques avec le trimedoxime (TMB-4), le méthoxime (MMB-4), et l'obidoxime (LüH-6), suivis de leurs analogues asymétriques avec l'asoxime (HI-6) en 1968 et le HLö-7 en 1986.²⁰⁶⁻²¹⁰

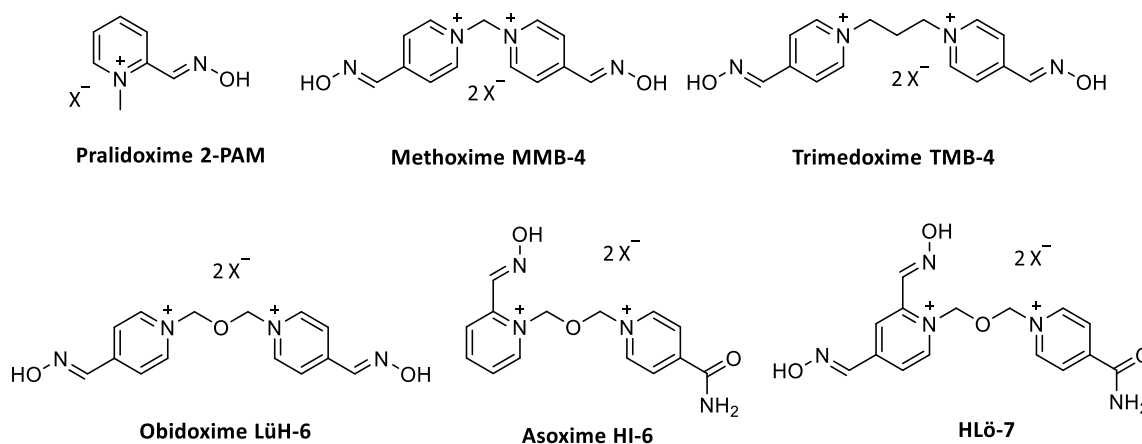


Figure 26 : structures des réactivateurs de référence

Ces six composés ont été pendant très longtemps les meilleurs réactivateurs décrits dans la littérature, et restent les références à partir desquelles s'opèrent les comparaisons. Pour cela, l'équipe de Worek *et al.* s'est attaché à mesurer les constantes de réactivation de ces réactivateurs pour un grand nombre de neurotoxiques et de pesticides (**Tableau 5**).^{211,212}

Il faut d'abord observer que le soman n'est pas testé car le vieillissement très rapide de l'enzyme qu'il génère rend difficile la mesure de la réactivation *in vitro*. Cependant l'équipe de Worek a montré que

le HI-6 et le MMB-4 échouent à réactiver l'enzyme *in vitro*, alors que des effets protecteurs de certains oximes, notamment le HI-6, ont été observés *in vivo* dans plusieurs publications.²¹³ Ces oximes sont donc suspectés d'être impliqués dans d'autres mécanismes biologiques apportant une certaine protection.

Oxime	OP	K _D (μM)	k _r (min ⁻¹)	K _{r2} (mM ⁻¹ min ⁻¹)
2-PAM 1955	Tabun	706	0.01	0.01
	Cyclosarin	3159	0,182	0,06
	Sarin	27,6	0.25	9,1
	VX	28,1	0,215	7,7
	Paraoxon	187,3	0,17	0,9
MMB-4 1958	Tabun	1252	0.011	0.009
	Cyclosarin	370,6	0,85	2,3
	Sarin	78,4	0,18	2,3
	VX	241,9	0,328	1,4
	Paraoxon	264,3	0,36	1,4
TMB-4 1958	Tabun	111	0,1	0,9
	Cyclosarin	343	0,21	0,62
	Sarin ^a	ND	ND	ND
	VX	∅	∅	∅
	Paraoxon	62	0,97	17,4
LüH-6 1964	Tabun	203	0,046	0,23
	Cyclosarin	582	0,39	0,68
	Sarin	31,3	0,937	29,9
	VX	27,4	0,893	32,6
	Paraoxon	65	1,22	19,98
HI-6 1968	Tabun	∅	∅	∅
	Cyclosarin	123	2,75	22,41
	Sarin	50,1	0,677	13,5
	VX	11,5	0,242	21,0
	Paraoxon	478	0.16	0.34
HLö-7 1986	Tabun	106,5	0,02	0,2
	Cyclosarin	17,9	1,663	92,9
	Sarin	24,2	0,849	35,1
	VX	7,8	0,49	62,8
	Paraoxon	47,8	0,34	7,1

Tableau 5 : Constantes associées à la réaction de réactivation *in vitro* de l'hAChE inhibée par 5 neurotoxiques et un pesticide organophosphorés, par les 6 réactivateurs de référence, les meilleures valeurs sont indiquées en gras.^{211,212} a : données établies sur l'AChE d'*Electrophorus electricus*²¹⁶

Sans prendre en compte le soman, donc, aucun des réactivateurs de référence n'offre une efficacité de réactivation à large spectre, ce qui constitue leur principal défaut. Excepté le TMB-4, ces réactivateurs ont notamment tous une capacité de réactivation très faible ou nulle de l'AChE

phosphylée par le tabun. Malheureusement, le TMB-4 est en revanche incapable de réactiver l'enzyme inhibée par le VX et réactive très faiblement l'AChE inhibée par le cyclosarin.

Le 2-PAM est le moins efficace de tous ces réactivateurs, avec des valeurs satisfaisantes uniquement pour le sarin et le VX, tandis que le MMB-4, le LÜH-6, le HI-6 et le HLÖ-7 sont les meilleurs. Parmi ceux-ci les résultats *in vitro* indiquent le HLÖ-7 comme le meilleur réactivateur, avec un large spectre d'action et une réactivité faible, mais non nulle pour le tabun. Le MMB-4 présente dans une bien moindre mesure les mêmes caractéristiques. L'avantage du HLÖ-7 semble venir de son affinité pour l'enzyme phosphylée qui est systématiquement la plus grande parmi ces réactivateurs et les OPs présentés. A l'inverse le LÜH-6 réactive très bien l'enzyme inhibée par le VX, le sarin et le paraoxon grâce aux meilleures cinétiques de réaction sur ces OPs. Enfin, le TMB-4 est le réactivateur avec le spectre d'action le plus large pour la réactivation des pesticides et insecticides.^{214,215} Cependant nous verrons que les résultats *in vivo* ne sont pas toujours directement corrélables aux résultats *in vitro*, car d'autres paramètres sont également à prendre en compte (ADME, pharmacodynamique), ce qui rend difficile la sélection des leads pour le développement de nouvelles contre-mesures médicales à partir des seules valeurs de réactivation *in vitro* (le HLÖ-7 montrant par exemple une faible stabilité métabolique *in vivo*).

3.4.2. Relation structure – activité

L'oximate étant la forme la plus réactive pour réagir sur l'adduit phosphylé, une part significative du réactivateur doit être sous cette forme à pH physiologique 7,4. Cependant il est préférable que le réactivateur entre dans le site actif de l'enzyme sous forme protonée car le coût énergétique de la désolvatation de l'oximate pour y entrer serait trop grand. En outre, plus le pKa de l'oxime est inférieur au pH physiologique, plus la désolvatation de l'oximate précédant une attaque nucléophile est difficile, ce qui réduit sa réactivité. Son pKa ne doit donc pas non plus être trop bas. Le pKa de l'oxime est donc un facteur important qui doit idéalement être légèrement supérieur au pH physiologique, autour de 8.²¹⁷

La structure du réactivateur est ensuite importante pour la formation du complexe de Michaelis-Menten avec l'enzyme phosphylée. Les motifs pyridiniums des réactivateurs de type bis-pyridiniums peuvent ainsi former des interactions favorables de type cation- π ou π - π avec les groupements aromatiques du site périphérique ou de la gorge, ce qui stabilise leur positionnement avant la réactivation.^{218,219} Cela explique en partie leur meilleure efficacité comparée au 2-PAM plus petit.

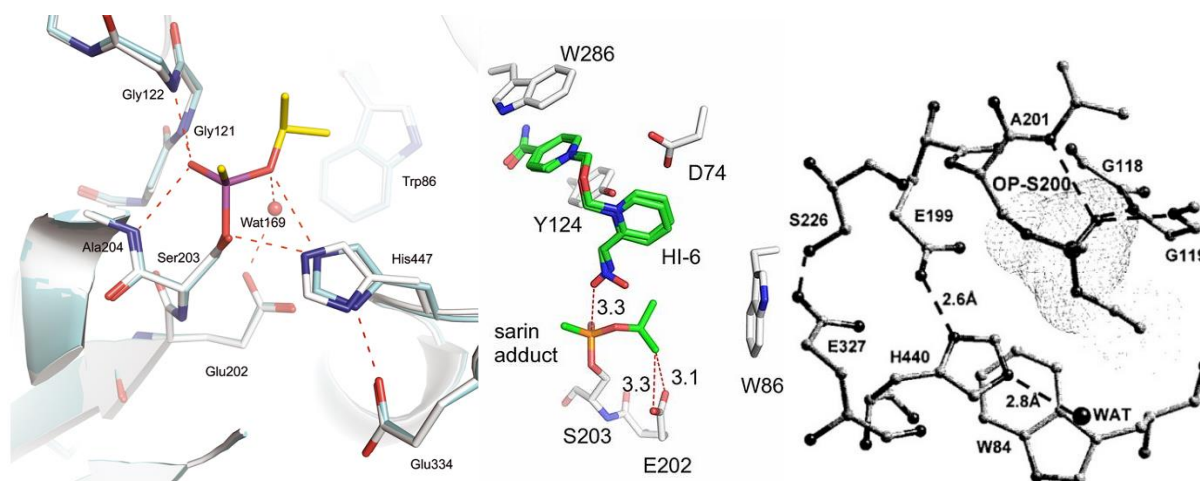


Figure 27 : Structure du site catalytique de l'AChE de souris phosphorylée par le sarin avec les liaisons hydrogène Glu334-His447 et une molécule d'eau proche (gauche)²²⁰, puis avec l'attaque du réactivateur HI-6 et l'assistance du résidu E202 (milieu)²²¹. Structure du site catalytique de TcAChE phosphorylée par le VX et réseau E199-H440-H₂O (droite).⁹³

Pour que la réaction de réactivation se produise, le réactivateur doit pouvoir se positionner de sorte que la distance soit faible entre l'oxygène de l'oxime et le phosphore.

De plus le réactivateur doit aussi être proche de l'histidine catalytique qui peut, via une molécule d'eau, déprotoner l'oxime pour exacerber sa nucléophilie. Pour cela des études cristallographiques et de modélisation moléculaire ont montré que l'histidine était impliquée dans un réseau de liaisons hydrogène formé par l'association glutamate – histidine catalytique – H₂O (**Figure 27**). Le résidu Glu334 de la triade catalytique est impliqué dans le cas du sarin et du pesticide fenamiphos.^{220,222} Mais l'autre glutamate proche de la sérine catalytique, Glu202, a aussi été observé dans un tel réseau de liaisons hydrogène dans la TcAChE inhibée par le VX, où l'His447 adopte une autre conformation.⁹³ De plus, Glu202 peut aussi stabiliser l'adduit phosphorylé lors de l'attaque du réactivateur, dans le cas du sarin.²²¹ Ainsi, His447, Glu202 et Glu334 sont les résidus clés du mécanisme de réactivation.²²³ Néanmoins la position et la mobilité de l'histidine catalytique dépendent de la structure de l'OP comme nous l'avons vu dans la partie 2.3. consacrée à l'inhibition par les OPs.

Ces deux points expliqueraient donc la réactivation très difficile dans le cas du tabun : son encombrement stérique réduit la mobilité de l'histidine et la place dans une position défavorable, tout en empêchant le réactivateur d'approcher suffisamment du phosphore.^{94,224}

3.4.3. Pharmacodynamique des réactivateurs

Les études *in vivo* ont montré que les réactivateurs de référence pouvaient avoir des effets de protection significatifs sur des OPs alors qu'ils sont très peu efficaces sur ceux-ci *in vitro*, tel que le HI-

6 sur le soman ou sur le tabun, qui ont respectivement tendance à vieillir rapidement l'AChE ou à la rendre très difficilement réactivable. Or l'action hydrolytique directe des réactivateurs sur les OPs *in vivo* ne présente qu'un effet favorable très marginal.²²⁵ De nombreuses études ont donc identifié d'autres cibles biologiques de ces oximes pouvant jouer un rôle favorable sur la survie et les symptômes de l'intoxication. Toutes les oximes ne partagent cependant pas les mêmes cibles et effets.

Des effets favorables sur la transmission cholinergique ont ainsi été démontrés en l'absence de réactivation de l'AChE.^{226,227} Le HI-6, le HLö-7 et des analogues peuvent diminuer la quantité d'acétylcholine libérée par exocytose en présence d'un OP comme le soman et ainsi limiter son excès synaptique. Le mécanisme d'action de ces bispyridiniums est très probablement la modulation allostérique des récepteurs cholinergiques pré-synaptiques qui influencent l'exocytose de l'ACh.²²⁸⁻²³¹

Composé	mAChR IC ₅₀ (mM)	nAChR neuronal IC ₅₀ (mM)	nAChR musculaire IC ₅₀ (mM)
TMB-4	0,063	0,501	0,501
LüH-6	0,016	1,84	1,05
2-PAM	0,60	1,62	0,623
HI-6	0,193	2,24	1,05
MMB-4	0,208	1,73	9,37
Atropine	0,000054	ND	ND
Mécamylamine	ND	0.000288	ND

Tableau 6 : IC₅₀ des réactivateurs de référence et de deux antagonistes de référence sur les récepteurs muscariniques et nicotiniques neuronaux et musculaires.²³²

Il est également aujourd'hui bien établi que les réactivateurs ont un effet antagoniste sur les récepteurs cholinergiques post-synaptiques, ce qui permet de limiter leur sur-stimulation, les plus puissants étant le TMB-4 et le LüH-6 (**Tableau 6**).^{231,233,234} Cependant cet effet reste extrêmement modéré avec des IC₅₀ 100 à 1000 fois supérieures à celle des antagonistes de référence, l'atropine pour les mAChRs et la mécamylamine pour les nAChRs.²³² Un effet toxique impliquant le blocage des jonctions neuromusculaires peut seulement survenir à de très forts dosages supérieurs aux doses thérapeutiques, qui peuvent parfois être injectés en début d'intoxication.²³⁵ De plus, le mécanisme d'action des bispyridiniums sur les nAChRs étant selon toute évidence allostérique, il a aussi pour effet de limiter la désensibilisation des récepteurs nicotiniques, ce qui peut permettre une reprise de l'influx nerveux.^{236,237} Des modulateurs allostériques sans oximes ont ainsi été développés pour servir d'antidotes sur les nAChRs à partir de ces résultats (voir partie 4.3.4.).²³⁸ Même s'il sont très faibles, ces effets sur d'autres cibles cholinergiques que l'AChE représentent un premier élément en faveur d'un potentiel antidote multi-cibles du système cholinergique.

3.4.4. Pharmacocinétique et stabilité des réactivateurs

Le 2-PAM, le LüH-6 et le HI-6 atteignent un pic de concentration plasmatique de 20 à 30 min après leur injection. La vitesse d'élimination peut varier suivant l'oxime mais la demi-vie d'élimination se situe en général autour de 2 heures chez un patient intoxiqué, dont le fonctionnement des reins est altéré.^{239–243} Surtout, la concentration minimale requise pour permettre une réactivation suffisante est rapidement atteinte.²⁴⁴ Ces durées relativement courtes nécessitent donc des injections répétées du traitement car l'intoxication peut durer jusqu'à plusieurs semaines suivant sa gravité, les OPs pouvant être relargués très longtemps de compartiments lipophiliques dans le corps. Il est donc ainsi généralement conseillé d'administrer un premier bolus fortement dosé, suivi d'une perfusion continue tout au long du traitement.²⁴⁵

La biodistribution des réactivateurs se fait essentiellement dans le liquide extra-cellulaire pour une personne saine tandis que pour une personne intoxiquée la majorité de la quantité de réactivateur injectée se trouve stockée par des liaisons ioniques dans les tissus conjonctifs, comme le cartilage, d'où ils sont relargués très lentement.²⁴³ De plus, les réactivateurs de référence ne traversent pas ou très peu la barrière hémato-encéphalique, ne leur permettant pas de diminuer efficacement les symptômes centraux, qui peuvent être graves (voir partie 3.5.4).

A pH supérieur à 4 les oximes se dégradent principalement en nitrile pouvant donner de l'acide cyanhydrique entre autres sous-produits, sans que cela représente une toxicité problématique.²⁴⁶ Les autres mécanismes de dégradation sont essentiellement dûs à la déshydratation et à l'hydrolyse, avec peu d'intervention métabolique.²⁴⁷ Les réactivateurs ont des stabilités aqueuses très différentes. Le 2-PAM, le TMB-4, le MMB-4 et le LüH-6 peuvent se conserver en solution aqueuse à un pH autour de 3 et à 25°C au minimum plus d'un an.^{248–251} Au contraire le HLö-7 est le plus instable avec une demi-vie en milieu physiologique (pH 7,4, 37 °C) de seulement 12 h.²⁴⁷ Cela a été une des raisons de son élimination des traitements potentiels, bien qu'il possède les meilleures efficacités de réactivation *in vitro*. Malgré une dégradation similaire, le HI-6 a une meilleure stabilité permettant son utilisation et son stockage.²⁵² Il est à noter que la nature des contre-ions de ces pyridiniums influence significativement leur stabilité et leur solubilité (les chlorures et mésylates de 2-PAM ont par exemple une plus grande solubilité aqueuse que l'iodure de 2-PAM).

3.4.5. Efficacité *in vivo*

Wilhelm *et al.* ont publié en 2014 une étude sur l'efficacité *in vivo* des réactivateurs de référence sur les principaux OPs sur des cochons d'inde. A partir d'une intoxication par une LD₈₅ de chaque OP suivie de l'administration 1 min plus tard d'atropine et d'une quantité équimolaire de réactivateur, ils ont pu mesurer les taux de mortalité à 24 h et d'inhibition d'AChE et de BChE sanguines périphériques par rapport au contrôle sans traitement.²⁵³ Le score de qualité de vie a aussi été mesuré, valant 1 ou 2 si des symptômes légers ou modérés persistaient et allant jusqu'à 12 suivant le nombre de symptômes graves persistants. Bien qu'il s'agisse d'AChE et de BChE de cochon d'inde, la comparaison avec les résultats *in vitro* de cholinestérase humaine (voir **tableau 5**, partie 3.4.1. et **Figure 28**) permet plusieurs observations.

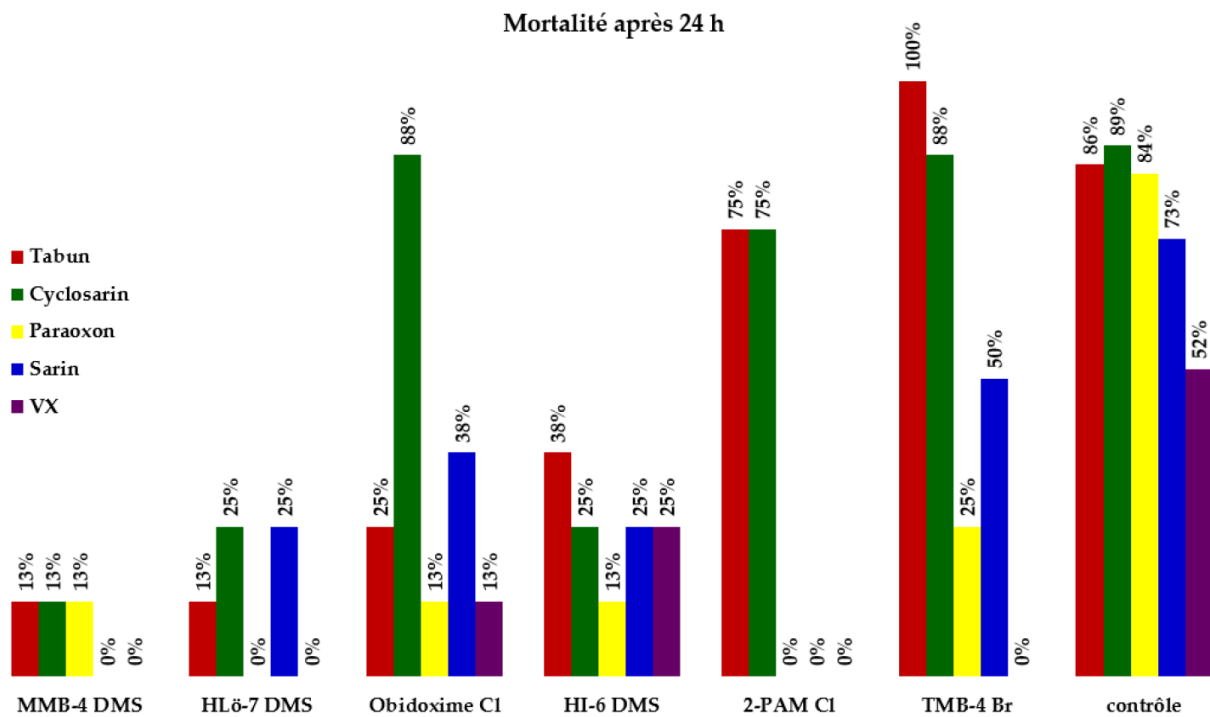


Figure 28 : Taux de mortalité à 24 h après l'intoxication suivant l'OP et le réactivateur administrés.²⁵⁴ (adapté de Wilhelm 2014)²⁵³

Globalement les résultats sont cohérents entre résultats *in vitro* et *in vivo*. Le MMB-4, le HLö-7 et le HI-6 sont, comme en *in vitro*, les trois meilleurs réactivateurs. Suivant l'ordre MMB-4 > HLö-7 > HI-6, leurs taux de mortalité et leurs scores de qualité de vie sont meilleurs que ceux du contrôle et ce, à large spectre. Au contraire les autres réactivateurs ont des taux de survie et des scores hétérogènes, comme pour le 2-PAM, ce qui en fait un mauvais traitement de ce point de vue. L'inefficacité du 2-PAM a été confirmée plus globalement par des méta-analyses compilant les nombreuses études sur

ce réactivateur.^{255,256} Cependant deux types de corrélations ne peuvent pas systématiquement être faites et rendent l'évaluation *in vitro* complexe à interpréter.

La première corrélation est celle entre un classement selon les valeurs de k_{r2} *in vitro* et l'efficacité *in vivo* à laquelle on trouve de nombreuses exceptions. En effet, alors que le MMB-4 est largement moins efficace *in vitro* sur le cyclosarin, le sarin et le VX que le HLö-7 et le HI-6, son efficacité *in vivo* est équivalente ou supérieure à celles de HLö-7 et du HI-6 pour ces OPs. De même l'efficacité du 2-PAM et du HI-6, très limitée sur le paraoxon *in vitro*, est bien plus grande *in vivo* avec une réduction significative de la mortalité. Enfin, on observe aussi des cas extrêmes où la réactivation de l'AChE se produit *in vivo*, associée à un très bon taux de survie, alors qu'il n'y en a pas ou quasiment pas *in vitro* : le MMB-4 pour le tabun et le TMB-4 pour le VX. Le critère essentiel *in vitro* est donc l'observation d'un large spectre d'action avec une valeur minimum de k_{r2} , l'obtention de valeurs plus élevées que celles des oximes de référence apparaissant secondaire.

La seconde corrélation est celle entre la réactivation de l'AChE et son incidence sur l'amélioration du taux de mortalité, qui ne se vérifie pas toujours. Ainsi, *in vitro* comme *in vivo*, le HLö-7 et l'obidoxime (LüH-6) réactivent très peu ou pas du tout l'AChE et la BChE inhibées par le tabun. Pourtant ils améliorent le taux de mortalité : de 86% pour le contrôle à 25% pour l'obidoxime et 13% pour le HLö-7, avec de très bons scores de qualité de vie. Bien que ces observations doivent être relativisées par les variations inhérentes aux modèles animaux, cela illustre que, indépendamment de la réactivation des cholinestérases, tous les mécanismes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des réactivateurs peuvent avoir un effet très significatif sur la protection qu'ils apportent face à une intoxication donnée.

Enfin, le HI-6 et le HLö-7 ont de bonnes capacités de réactivation contre le soman *in vivo*.²⁵⁷ Le HI-6 apparaît donc comme le meilleur réactivateur du groupe, en plus du MMB-4.

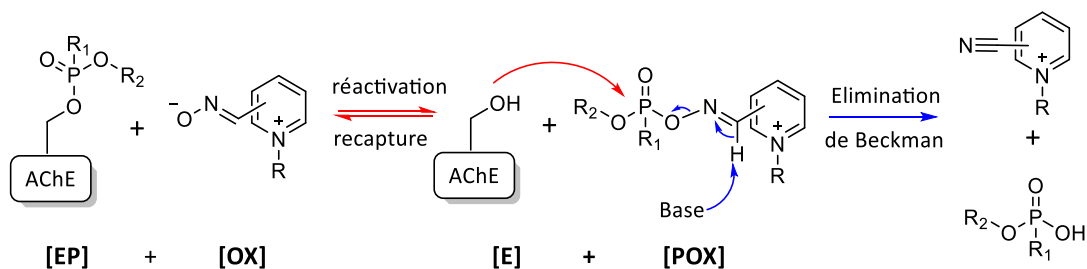
3.5. Limites des réactivateurs de référence et spécificités attendues

Néanmoins, aucun de ces réactivateurs, en combinaison avec l'atropine, ne produit un effet contre-poison suffisamment puissant et agit de façon universelle contre les intoxications. Il a aussi été vu précédemment que le HLö-7 n'était pas assez stable. En outre, ils présentent d'autres limitations : au niveau moléculaire, un phénomène de recapture faisant suite à la réactivation (où l'oxime phosphorylée est elle-même un agent neurotoxique), et un équilibre délicat entre affinité et inhibition de l'AChE ; au

niveau pharmacologique, leur toxicité et le passage très difficile de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

3.5.1. Phénomène de recapture

La réactivation de l'AChE par l'oxime produit une phosphoxyoxime [POX] qui peut devenir à son tour un inhibiteur de l'enzyme avec l'addition de la sérine sur le phosphore et le départ de l'oxime (**Schéma 5**).²⁵⁸ La phosphoxyoxime a une affinité pour l'enzyme qui dépend à la fois de l'OP et de l'oxime mais qui peut être équivalente voir largement supérieure à celle de l'OP de départ.²⁵⁹ Cet équilibre compromet donc l'efficacité des oximes. Cependant les phosphoxyoximes ont aussi tendance à se dégrader rapidement en nitrile par une élimination de Beckman, qui est plus ou moins favorisée selon la stabilité du [POX].²⁶⁰ Les formes de résonance du pyridinium ainsi que l'acidité du proton de l'oxime, qui dépendent de la position de l'oxime sur le pyridinium, influencent cette stabilité. Ainsi la position 2 de l'oxime rend le [POX] instable tandis que la position 3 est la plus stable et la position 4 donne une stabilité intermédiaire.²⁶¹



Schema 5 : réactions de réactivation de l'AChE, recapture de la phosphoxyoxime et de sa dégradation par élimination de Beckman

Ce phénomène est donc assez peu problématique pour les oximes en position 2 du pyridinium comme le 2-PAM mais n'est pas négligeable pour les réactivateurs incluant l'oxime en position 4 comme le TMB-4, le LüH-6, ou le MMB-4. Néanmoins, des enzymes telles que des phosphoestérases ou paraoxonases peuvent hydrolyser le [POX] pour redonner l'oxime de départ et l'acide organophosphonique.²⁶²⁻²⁶⁴ En limitant ainsi le phénomène de recapture, la cinétique globale de réactivation en est accélérée.

3.5.2. Equilibre affinité/inhibition de l'AChE

L'affinité de l'oxime pour l'enzyme phosphorylée est un paramètre important pour favoriser la formation du complexe de Michaelis-Menten entre les deux partenaires. Pour obtenir une bonne efficacité de réactivation, cela peut se traduire par une constante de dissociation K_D au moins inférieure à 100

μM .²⁶⁵ Cependant cette valeur ne doit pas non plus devenir trop basse. En effet les différences de conformation entre l'enzyme phosphorylée et l'enzyme native sont assez faibles.²⁶⁶ Donc plus un réactivateur est affiné de l'enzyme inhibée plus il y a de risque qu'il soit également un bon inhibiteur de l'enzyme native ($\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$). Or cela augmenterait la toxicité du réactivateur et limiterait sa potentielle dose maximale thérapeutique et donc sa fenêtre thérapeutique vis-à-vis de chaque OP.

3.5.3. Toxicité

En effet un écart trop faible entre la dose médiane effective (ED_{50} , effet thérapeutique pour 50% d'une population) et la dose létale médiane (DL_{50} , 50% de mortalité parmi une population) du réactivateur limite la quantité qui peut être injectée sans qu'il y ait de trop forts effets secondaires. Cela peut être mesuré par l'indice thérapeutique qui est le ratio des deux dosages : plus il est grand, plus les doses administrées peuvent être fortes sans effet nocif.²⁵⁷

Réactivateur	TMB-4	LüH-6	2-PAM	MMB-4	HI-6	HLö-7	
DL₅₀ (mg/kg) <i>Souris, i.m.</i>	102	188	263	441	671	671	
Indice thérapeutique DL ₅₀ /ED ₅₀ <i>rats</i>	cyclosarin	/	3,6	< 2,2	32	1420	2068
	sarin	/	4	< 2,2	199	1166	1166
	soman	/	< 1,6	< 2,2	< 6,4	39	98

Tableau 7 : Doses léthales médianes et indice thérapeutiques des réactivateurs de référence, respectivement sur la souris par injection intramusculaire et sur le rat.²⁶⁷⁻²⁷⁰

Une intoxication par des réactivateurs présente généralement les mêmes symptômes cholinergiques : modification de la pression sanguine, goût altéré, vertige, nausée, vision floue et faiblesse musculaire.²⁷¹ De plus des doses de 0.5 DL₅₀ de HI-6 ou d'obidoxime (LüH-6) provoquent des dommages aux organes viscéraux et aux tissus musculaires sur des rats ; des doses de 0.1 DL₅₀ étant plus sûres.^{272,273} En outre l'obidoxime est hépatotoxique à forte dose.²⁷⁴

De nombreuses études *in vitro* ont été menées pour déterminer la DL₅₀ des différents réactivateurs (souris, chien, cochon d'Inde, rat, lapin).²⁷¹ Le TMB-4 est le réactivateur le plus toxique et le LüH-6 et le 2-PAM ont de faibles indices thérapeutiques (**Tableau 7**). Au contraire les indices thérapeutiques du MMB-4, du HI-6 et du HLö-7 sont satisfaisants sur les OPs testés.

3.5.4. Passage de la barrière hémato-encéphalique

La nature lipophile des organophosphorés leur permet d'investir tous les organes, et notamment de traverser la barrière hémato-encéphalique pour pénétrer dans le système nerveux central (SNC).

L'inhibition des cholinestérases au niveau central a une influence significative sur la mortalité puisqu'elle induit des crises convulsives pouvant être mortelles et la dépression du système respiratoire.^{116,275} De plus les séquelles neurologiques peuvent être importantes sur le long terme (en années) : effets sur la vision, altération de l'apprentissage, de la mémoire, de l'attention, états dépressifs, changements morphologiques et histopathologiques du cerveau, neurodégénérescence ...^{17,123,276-278} dont les mécanismes sont de mieux en mieux appréhendés.^{118,121,122} Le cas le plus documenté sur l'être humain, les attentats au sarin dans le métro au Japon, le démontre aussi amplement, et ce malgré le traitement des victimes par du 2-PAM les heures et jours suivant l'intoxication.²⁷⁹⁻²⁸³ Il apparaît donc indispensable de réactiver l'AChE au niveau central. Il a été montré sur des animaux que seulement 5% d'activité résiduelle de l'AChE centrale suffisait à assurer la survie à ce niveau.²⁸⁴

Les études sur le passage de la BHE par les réactivateurs de référence sont relativement contradictoires car elles font appel à différentes méthodes dont les résultats dépendent de différents facteurs qui varient souvent d'une étude à l'autre. Deux méthodes semblent les plus pertinentes pour évaluer ce passage : soit la mesure directe de l'activité de l'AChE dans le cerveau d'animaux intoxiqués, traités puis sacrifiés, comparée à un contrôle ; soit la mesure de la concentration de l'oxime dans le cerveau grâce à un traceur radioactif, à de la spectrophotométrie ou par LC/MS. Les méthodes indirectes évaluant l'évolution de marqueurs biologiques spécifiques au SNC ne sont pas autant pertinentes puisque l'amélioration des symptômes périphériques peut avoir un effet bénéfique sur le SNC.²⁸⁵ La répartition de la dose d'oxime entre le plasma et le cerveau est influencée par la dose d'OP, la dose d'oxime²⁸⁶, qui augmente la concentration sanguine et par ricochet celle dans le cerveau, la zone du cerveau analysée²⁸⁷ et les dommages que peut subir la BHE lors de l'intoxication, ce qui peut la rendre partiellement perméable.^{288,289}

Toutes choses égales par ailleurs, la ou les charges permanentes des réactivateurs leur procurent une forte hydrophilie qui les empêche de passer efficacement la BHE. Globalement, les études font état de 0 à 10% de la quantité d'oxime se retrouvant au cerveau, avec quelques cas allant jusqu'à 20%.^{112,286,290,291} Ils ne sont donc pas aptes à procurer une protection efficace du SNC, d'autant que l'augmentation de la proportion de 2-PAM ou d'HI-6 au SNC via leur encapsulation dans des nanoparticules a justement montré une amélioration de la survie et de la réactivation de l'AChE centrale par rapport au traitement habituel.²⁹²⁻²⁹⁴

3.5.5. Cahier des charges du réactivateur idéal

60 ans de recherche ont mis en évidence que les réactivateurs utilisés jusqu'à maintenant devaient être remplacés par de nouveaux composés possédant certaines propriétés que nous venons de mettre en évidence et qu'a rappelées Franz Worek dans sa publication « Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair ». ²⁶⁵ Toutes ces observations permettent de dresser le cahier des charges d'un réactivateur qui se voudrait idéal.

- Au niveau moléculaire, ce réactivateur doit posséder une fonction suffisamment nucléophile pour réactiver l'AChE, comme une oxime. Le pKa de cette oxime doit se situer entre 7,3 et 8 pour limiter le coût énergétique de la réaction. Celle-ci doit se faire avec une vitesse rapide : k_r au minimum supérieur à 1 min^{-1} . De plus le réactivateur doit tout à la fois posséder une bonne affinité pour l'enzyme phosphorylée avec un K_D au minimum inférieur à $100 \mu\text{M}$. Mais cette affinité ne doit pas être trop forte pour éviter l'inhibition de l'enzyme native qui induirait la toxicité du composé ($\text{IC}_{50} \geq 1 \mu\text{M}$). Le réactivateur ne doit pas non plus être sujet au phénomène de recapture qui limiterait ses performances. Cette réactivation *in vitro* doit être à large spectre : les NOPs et les pesticides. Enfin dans l'idéal la structure du réactivateur doit lui permettre de réactiver à la fois l'AChE et la BChE.

- Au niveau pharmacodynamique, le réactivateur ne doit pas avoir d'autres cibles biologiques affines qui limiteraient son action sur les cholinestérases ou induiraient une toxicité. Il doit produire le moins d'effets secondaires possibles.

- Au niveau pharmacocinétique, le lent relargage des OPs à partir de compartiments lipophiles implique que le réactivateur doit avoir une longue durée d'action. Donc sa pharmacocinétique doit consister en un pic de concentration sanguine rapide grâce à une bonne biodisponibilité suivie d'une décroissance la plus lente possible de cette concentration (clairance lente des reins, peu ou pas de métabolisation etc). La biodistribution doit se faire essentiellement dans le plasma et dans le SNC, grâce à un passage aisé de la barrière hématoencéphalique.

- Au niveau clinique les résultats *in vivo* doivent confirmer un large spectre d'action qui protège des symptômes cholinergiques et des séquelles neurologiques. Sa LD_{50} ne doit pas être trop basse pour avoir un bon indice thérapeutique ($\text{DL}_{50}/\text{ED}_{50}$).

- Les propriétés physico-chimiques du réactivateur doivent lui permettre d'avoir une stabilité d'au moins plusieurs semaines en conditions physiologiques pour éviter sa dégradation durant le traitement et pendant son stockage. Il doit être soluble dans l'eau mais doit aussi être assez lipophile pour pouvoir passer la BHE.

- Au niveau de sa production, sa synthèse ne doit être ni onéreuse ni excessivement longue (nombre d'étapes) et le produit doit pouvoir être purifié sans difficulté particulière.

3.6. Développement de nouveaux réactivateurs

De nombreuses équipes travaillent sur le développement de nouveaux réactivateurs qui se rapprocheraient de cet idéal. Un aperçu général non exhaustif sera présenté ici, se concentrant sur les réactivateurs les plus prometteurs, publiés généralement dans la dernière décennie, en reprenant la subdivision entre réactivateurs chargés, bi-chargés et neutres établie dans l'état de l'art publié il y a une dizaine d'années par le consortium français travaillant sur les contre-mesures médicales aux OPs, dont notre équipe fait partie.²⁹⁵ Les méthodologies très variées (comme le modèle animal choisi) des différentes équipes rendent les comparaisons difficiles, notamment si l'évaluation ne s'appuie pas sur les valeurs de k_r , K_D et k_{r2} *in vitro*. *In vivo* le problème peut venir d'un cadre de comparaison inadapté ou trop limité avec les oximes de référence, sans suffisamment de valeurs quantitatives comparables dans l'absolu. Un nouveau réactivateur pourra par exemple être bien meilleur que le 2-PAM mais pourtant être moins performant qu'un autre réactivateur de référence tel que le HI-6 ou le MMB-4, ce qui restera difficile à déterminer si suffisamment de données ne sont pas connues.

3.6.1. Pyridinium aldoximes et autres fonctions réactivatrices chargées

Un grand nombre d'analogues du pyridinium aldoxime 2-PAM ont été synthétisés et testés. D'abord, tel quel, la position 2 de l'oxime sur le cycle aromatique est la plus favorable : le 3-PAM et le 4-PAM sont de moins bons réactivateurs.²⁹⁶ Ensuite, la fonctionnalisation du carbone de l'oxime pour en faire un cétoxime, avec des groupes électro-attracteurs et des groupes alkyles, n'a pas donné de meilleur réactivateur : soit la valeur du pKa est trop éloignée de la valeur recommandée et la nucléophilie insuffisante, soit l'encombrement stérique engendré empêche d'atteindre facilement le phosphore.^{297,298} Les aldoximes sont donc les nucléophiles à privilégier sur les noyaux pyridiniums.

Des résultats mitigés mais parfois encourageants ont été obtenus avec la fonctionnalisation de l'azote du pyridinium. Tout d'abord sa fonctionnalisation avec une chaîne alkyl, un phényl, benzyl, benzophenone ou autre groupe aromatique ne donne pas de meilleurs résultats que le 2-PAM, soit à cause d'un encombrement stérique quand ces groupes ne sont pas dirigés vers la gorge, soit à cause du manque de flexibilité pour bien orienter la fonction oxime adjacente, ce qui cause en général un manque d'affinité.^{299,300} De même, des 4-PAM similairement substitués par une chaîne courte avec un

ligand isatine ne sont pas plus performants que le 2-PAM.³⁰¹ D'autres tentatives similaires de fonctionnalisation de 4-PAM ou de 2-PAM n'ont pas donné de résultats plus fructueux.^{302,303}

Au contraire, des pyridiniums avec l'oxime en position 2 ou 4, reliés à un groupe phenyltetrahydroisoquinoline (connu pour être un bon ligand du site périphérique) par une chaîne alkyle de 11 à 14 liaisons incluant un triazole (**Figure 29**), présentent une bonne affinité pour l'AChE et à un degré moindre pour la BChE, grâce à une bonne flexibilité.³⁰⁴ Cependant leur capacité à réactiver l'AChE inhibée est moins bonne que celle du HI-6 sur les OPs testés, mais deux composés font au moins jeu égal sur la BChE inhibée par le sarin et le cyclosarin. D'autre part, on observe que la fonctionnalisation de pyridiniums 4-PAM par une chaîne flexible alkoxy liée à un ligand (une amine cyclique tertiaire pour De Koning³⁰⁵ ou un cycle phényl substitué pour Chambers³⁰⁶) rendent ces réactivateurs meilleurs que le 2-PAM, sans atteindre cependant les performances du HI-6 pour l'AChE inhibée par le VX ou le sarin.

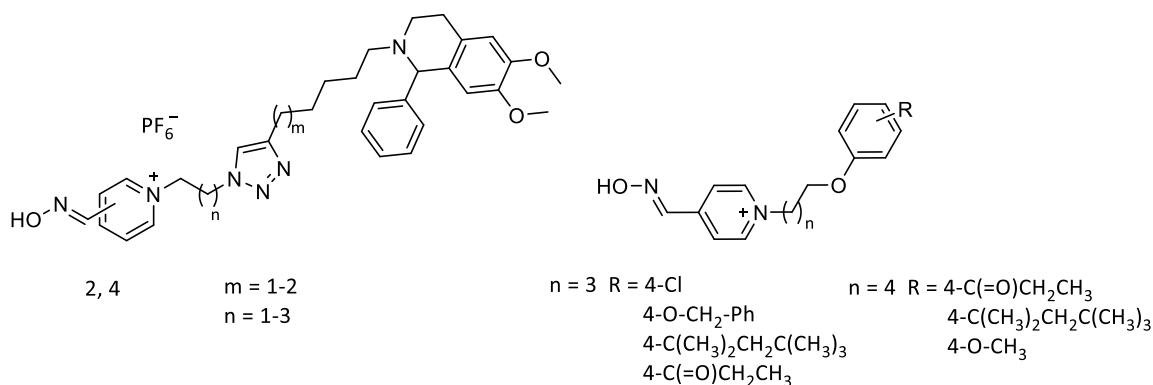


Figure 29 : structures des réactivateurs pyridiniums aldoximes substitués par un bras espaceur lié à un ligand du SPA.^{191,304}

Sur les composés développés par Chambers *et al.*, le cycle phényl est espacé du pyridinium par 4 à 5 liaisons, ce qui favorise des interactions avec des résidus aromatiques du site périphérique (**Figure 29**). De plus, l'augmentation de la lipophilie induite par la chaîne alkoxy et le ligand est censé améliorer le passage de la BHE pour atteindre l'enzyme au SNC.³⁰⁶ Une réduction de l'inhibition de l'AChE au niveau central allant jusqu'à 35% en 2 h est ainsi observée pour quelques uns de ces composés, ce qui n'est pas le cas pour le 2-PAM.³⁰⁷ Cependant, d'autres progrès observés en neuroprotection sur certains de ces composés par rapport au 2-PAM, comme la réduction des dommages au cerveau de rats intoxiqués et la diminution modérée de la durée des crises convulsives, sont des preuves indirectes et peuvent être le reflet de leur plus grande capacité de réactivation plutôt qu'un passage intensif de la BHE.^{308,309} Il est intéressant de noter que la lipophilie croissante des trois meilleurs réactivateurs, mesurée par le coefficient de partage eau/octanol LogP (négatif : hydrophile, positif : lipophile), peut être corrélée à

l'augmentation de leur temps de demi-vie (13,8 h pour le plus lipophile) et la réduction conséquente de leur clairance, ce qui est un avantage certain.³¹⁰ Enfin, les tests sur ces composés ont confirmé qu'il est nécessaire (mais évidemment non suffisant) qu'un réactivateur ne soit pas un substrat reconnu par la glycoprotéine P (P-gp) pour avoir une action efficace au SNC.³¹¹ Cette protéine transmembranaire présente à la surface de la BHE agit comme une pompe pour expulser du SNC toutes les molécules qui en sont le substrat.

L'effet bénéfique de l'ajout d'un ligand du site périphérique (SPA) se retrouve sur les réactivateurs basés sur un imidazolium à la place du pyridinium : les résultats de l'imidazolium aldoxime seul ne sont pas meilleurs que ceux des réactivateurs de référence³¹², mais en le fonctionnalisant par une chaîne amidée liée à des aromatiques qui peuvent se lier au SPA, la constante k_{r2} devient meilleure pour la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun et le cyclosarin. Outre cet apport d'affinité par le ligand, l'encombrement stérique limité du cycle imidazolium est probablement un avantage pour atteindre le phosphore d'adduits phosphorylés encombrés comme ceux du tabun ou du cyclosarin.³¹³ Le composé lead de la série est le **Ugi-15c**. Ce réactivateur semble avoir un effet positif sur le SNC, avec moins de crises convulsives et une plus forte activité des cholinestérases du cerveau que le 2-PAM sur des rats intoxiqués au sarin. L'avantage de ce composé est la facilité de son obtention via une réaction multicomposant (Ugi), ce qui permet facilement d'envisager des modifications structurales. Malheureusement il présente aussi une certaine toxicité.

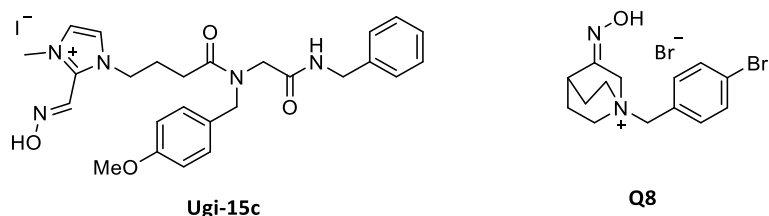


Figure 30 : structures des leads de la série des quinuclidiniums cétoxime **Q8** et des imidazoliums aldoxime **Ugi-15c**.^{313,314}

Enfin, le bicyclic non aromatique chargé quinuclidinium a aussi été envisagé pour supporter la fonction cétoxime en position 3 (**Figure 30**).³¹⁴ L'ammonium est lié par une chaîne courte à un groupement phényle substitué pour augmenter l'affinité de la molécule pour l'enzyme inhibée. Les résultats sont mitigés, étant moins bons que le HI-6 sur l'AChE inhibée par le VX et équivalents sur le paraoxon. Ils sont en revanche légèrement meilleurs que le HI-6 sur la BChE inhibée par le VX et le cyclosarin. Le composé **Q8** est donc envisagé comme bioépurateur car il peut rétablir à 100% l'activité de BChE inhibée par une quantité de cyclosarin 100 fois supérieure à celle de l'enzyme en 2 à 3 h. Une autre oxime basée sur le motif de cinchonidine (inhibiteur de cholinestérase) et incluant aussi un

quinuclidinium est d'ailleurs envisagée comme réactivateur de la BChE, avec un large spectre d'action.³¹⁵ Sa synthèse efficace reste à être finalisée.

3.6.2. Bispyridinium aldoximes

Une grande part des très nombreuses études publiées dans le domaine des bispyridiniums se concentre sur la variation de leur structure : la position et le nombre de fonctions oxime, la longueur³¹⁶ et la structure du bras espaceur (saturé/insaturé, incluant un hétéroatome ou non^{212,317}), la position et la nature des substituants^{318,319} (amide, halogène) et les effets consécutifs de ces changements sur leurs propriétés thermodynamiques et cinétiques dans la réaction de réactivation. Toutes ces études montrent que ces différentes parties du réactivateur, substituant, bras espaceur, oxime, offrent des interactions favorables avec respectivement le SPA, la gorge et le site catalytique d'une façon mutuellement dépendante les uns des autres. Ainsi chaque modification de l'un de ces éléments requière une nouvelle optimisation des autres. En revanche, la variation de leurs propriétés pharmacocinétiques est en général modérée.^{320,321}

S'agissant des molécules avec un bras espaceur contenant un hétéroatome, aucune n'a démontré un large spectre d'action mais le bispyridinium **K127** montre une bonne réactivation (comparable au TMB-4) contre le tabun (**Figure 31**).³²⁰ Un autre réactivateur notable est le **K203** qui présente aussi une bonne réactivation de l'hAChE inhibée par le tabun avec un k_{r2} de $2 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, ce qui est supérieur à tous les réactivateurs de référence, cependant les concentrations efficaces sont très élevées (100 μM environ).³²² La réactivation *in vitro* de l'AChE inhibée par le paraoxon et le DFP est également meilleure que le HI-6 et le TMB-4. La molécule est malheureusement très toxique. Enfin, la molécule **K027**, bispyridinium mono-oxime comportant un substituant amide et un bras espaceur saturé, présente de bons résultats *in vitro* et *in vivo* (**Figure 31**). *In vitro*, ses valeurs de k_{r2} sont supérieures à celles du 2-PAM mais restent en-dessous de celles du HI-6 pour le VX, le sarin et le cyclosarin. *In vivo* la protection qu'il apporte est notablement meilleure que les réactivateurs de référence sur le tabun mais n'est pas satisfaisante pour le soman et le cyclosarin. D'autre part il est plus protecteur que le 2-PAM et le LüH-6 pour les pesticides DFP, ethyl- et methyl-paraoxon, dichlorvos et l'azinphos-methyl.^{321,323,324} Ce dernier point a mené à l'étude de son potentiel comme traitement prophylactique contre l'intoxication aux pesticides.³²⁵

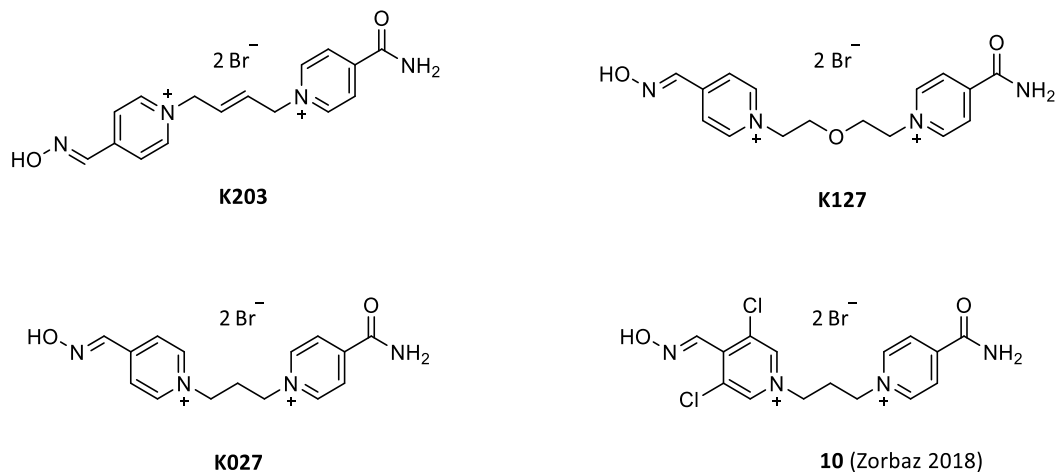


Figure 31 : Structures de réactivateurs bispyridiniums prometteurs.^{320,322-324}

Néanmoins, tous ces composés sont incapables de traverser efficacement la BHE pour réactiver l'AChE centrale (la proportion d'oxime passant du plasma au cerveau étant par exemple de 2% pour **K027**). Le bras espaceur n'accroît pas suffisamment la lipophilie de ces composés pour contrebalancer leur double charge positive, qui est la raison de leur trop grande hydrophilie. Pour s'attaquer à ce problème Zorbaz *et al.* ont rapporté la synthèse de l'analogue de **K027** où les deux positions adjacentes à l'oxime sont chlorées, dénommé composé **10** (Figure 31).³²⁴ L'addition des deux atomes de chlore à côté de l'oxime a un double effet : ils appauvrissent électroniquement le pyridinium, ce qui diminue le pKa de 8,23 pour **K027** à 7,53 pour la molécule **10**, et augmentent l'affinité, car la constante de dissociation K_D du complexe entre l'oxime et l'enzyme phosphorylée par le sarin, cyclosarin et VX diminue par rapport aux analogues mono- et non chlorés. Ainsi, les constantes k_{r2} pour la réactivation de l'AChE inhibée au sarin, cyclosarin et VX sont meilleures que celles de **K027**. Au contraire, la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun, qui était parmi les meilleures rapportées, est totalement supprimée, probablement à cause de l'encombrement stérique lié aux deux atomes de chlore. Excepté pour le tabun, cette molécule est donc un candidat très prometteur. Cependant, l'augmentation de la lipophilie accordée par les deux halogènes ne produit qu'une faible amélioration du potentiel de pénétration de la BHE, selon les mesures faites par test PAMPA (« parallel artificial membrane permeability assay » : détermine la perméabilité d'une membrane artificielle donnée, ici semblable à la BHE, pour une substance donnée, en mesurant la quantité passée au travers en fonction du temps).

3.6.3. Fonctions réactivatrices neutres

Dans l'objectif de procurer une pénétration accrue de la BHE pour pouvoir réactiver l'AChE au SNC, des réactivateurs neutres censés posséder une plus forte lipophilie ont été développés. La majorité

comporte toujours des fonctions oximes mais récemment des réactivateurs sans oximes ont émergé. Issues d'un criblage à haut débit de molécules autorisées à être mises sur le marché comme médicaments, les amodiaquines ont montré des propriétés de réactivation. Une étude consécutive de structure-activité a permis le développement de la famille de molécules **ADOC** par De Koning et son équipe (**Figure 32**). La structure commune se compose d'une aniline avec un groupe hydroxy en position para et une amine tertiaire en position meta.^{326,327} Le lead présente une meilleure réactivation que le 2-PAM sur l'AChE-VX et l'AChE-VR, et une moins bonne pour les autres OPs. Le mécanisme de réactivation n'est pas encore bien compris, ce qui limite les possibilités d'optimisation de ces molécules.

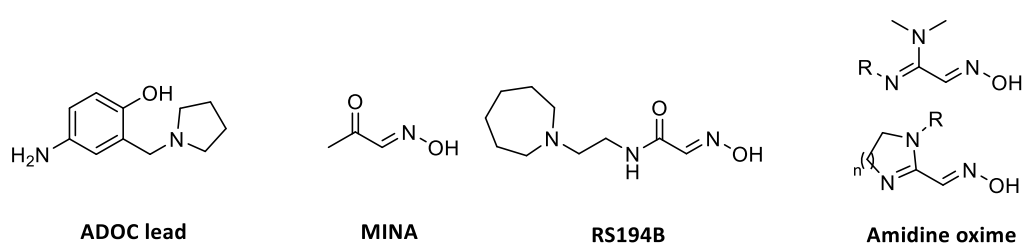


Figure 32 : Structure de l'ADOC, réactivateur sans oxime et de réactivateurs basé sur une fonction oxime aliphatique.^{326,328-330}

En se basant sur l'activation électrophile que peut procurer un groupe carboxyle en alpha de la fonction oxime et le potentiel de réactivation du **MINA**, le plus simple de ces composés, les alpha-oxo-oximes ont aussi été développées.³²⁹ Cependant les résultats sont mitigés, ce qui peut être lié en grande partie aux difficultés de synthèse, aucune alpha oxo oxime n'ayant été synthétisée, au mieux des dérivés possédant une fonction amide et non cétone en alpha ont été obtenus, ce qui diminue nettement l'activation de l'oxime par rapport au MINA. Parmi ces réactivateurs à structure amido-oximes, le lead **RS-194B** décrit par Radić *et al.* présente des résultats *in vitro* et *in vivo* similaires au 2-PAM contre une large variété d'OPs (**Figure 32**). Le pKa des oximes de cette famille de molécule est cependant un peu trop haut, entre 8,7 et 9 et **RS-194B** ne pénètre pas suffisamment dans le SNC, ce qui montre l'importance d'évaluer les paramètres physico-chimiques pouvant influencer sur la capacité d'une molécule à passer la BHE car la neutralité d'une molécule n'est pas une propriété suffisante en elle-même. Néanmoins, l'optimisation de ce lead par amarrage moléculaire, tests *in vitro* et *in vivo* se poursuit.^{328,331-333} Les résultats *in vitro* d'analogues bis-oximes de ces réactivateurs, présentant de meilleurs positionnements dans le site actif par amarrage moléculaire, ne se sont malheureusement pas révélés meilleurs.³³⁴

D'autre part, une autre fonction non aromatique comporte des propriétés intéressantes : le motif amidine oxime développé par Cashman *et al.* (**Figure 32**).³³⁰ Sa protonation à pH physiologique mime la charge portée par un pyridinium comme le 2-PAM et améliore sa solubilité aqueuse malgré une forte lipophilie apte à lui faire traverser la BHE. Ce type de composé pénètre donc très bien dans le SNC. Malgré des résultats *in vitro* ne dépassant pas ceux des réactivateurs de référence, des effets protecteurs significatifs *in vivo* ont été observés, cette différence illustrant peut-être l'importance de protéger le système nerveux central pour guérir efficacement une intoxication.

Enfin, un grand nombre d'aryl-oximes neutres ont été synthétisés et testés. D'abord, différents types d'hétérocycles ont été testés *in vitro* mais aucun n'a de meilleures propriétés de réactivation que le 2-PAM.^{335,336} Néanmoins, le positionnement des hétéroatomes N, O et S dans les cycles à 5 permet une modulation de la lipophilie et du pKa de l'oxime (et des autres positions acides). L'introduction d'un ligand du SPA peut améliorer l'efficacité de ces réactivateurs, en augmentant leur affinité avec l'enzyme inhibée. Cette stratégie a été choisie pour les noyaux imidazoles par Wei et ses collaborateurs avec des ligands du SPA de type tetrahydroisoquinoline et phenylhydroisoquinoline, précédemment introduits par notre équipe (**Figure 34**).³³⁷ Malheureusement, peu de molécules sont efficaces, seul **wei-7h** (**Figure 33**) est un réactivateur prometteur, étant aussi efficace que le HI-6 pour réactiver l'AChE-VX et l'AChE-sarin et aussi efficace que le TMB-4 pour l'AChE-tabun (qui est le meilleur réactivateur de référence pour cet OP).

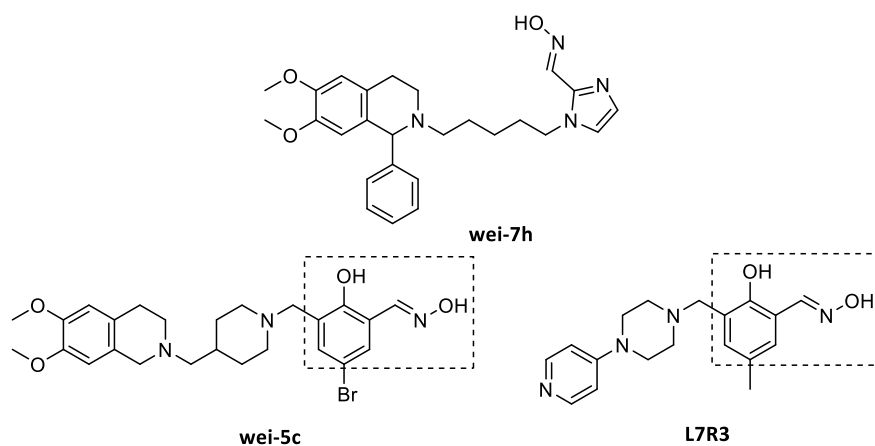


Figure 33 : Structures de réactivateurs neutres prometteurs basés sur les fonctions imidazole aldoxime ou hydroxy-phenyl aldoxime liées à des ligands du site actif.³³⁷⁻³³⁹

Parmi les aryl-oximes, une grande variété de benzaldoximes ont été synthétisés, généralement substitués par des halogènes pour diminuer le pKa de l'oxime et atteindre les valeurs optimales.³⁴⁰ Sur ce type de composés également, l'équipe de Wei a proposé des structures prometteuses. L'affinité de leur fonction réactivatrice 2-hydroxy benzaldoxime pour l'enzyme inhibée a été améliorée en

l'associant à un ligand du site périphérique : un dérivé du donépézil, qui est un inhibiteur réversible de l'AChE.³³⁹ Trois de ces réactivateurs (dont **wei-5c**, **Figure 33**) ont une efficacité au moins aussi bonne que le HI-6 ou l'obidoxime pour la réactivation de l'AChE inhibée par le VX et le tabun, mais pas pour le sarin. Cependant ces molécules semblent hydrophobes avec un partage octanol/eau supérieur à 3,5 et nécessitent l'utilisation d'une solution à 2,5% d'acide acétique et 10% de PEG-400 pour les dissoudre à 10 mM dans l'eau. Cela souligne le potentiel problème de solubilité des réactivateurs neutres et le délicat équilibre entre lipophilie et hydrophilie.

L'équipe de Wei a aussi très récemment publié des réactivateurs possédant la même fonction 2-hydroxy benzaldoxime mais avec un ligand plus petit en se basant sur des études d'amarrage moléculaire. Les molécules ont été sélectionnées en fonction de la position de la fonction réactivatrice dans le site actif qui correspondrait le mieux à la pose pré-réactivation, c'est-à-dire le moment de l'attaque de l'oxime sur le phosphore.³⁴¹ Parmi les structures obtenues, le **L7R3** est prometteur, avec une réactivation observée pour tous les OPs testés, se rapprochant donc du réactivateur à large spectre (**Figure 33**). L'efficacité est égale au HI-6 et à l'obidoxime pour le sarin et supérieure pour le VX. L'efficacité est aussi supérieure à l'obidoxime sur les pesticides (paraaxon, parathion, dichlorvos) avec de très bonnes affinités (K_D entre 0.6 et 1 μ M), et se rapproche de celle du TMB-4 pour le tabun. Ces résultats seront donc à vérifier *in vivo*.

3.6.4. Conclusion

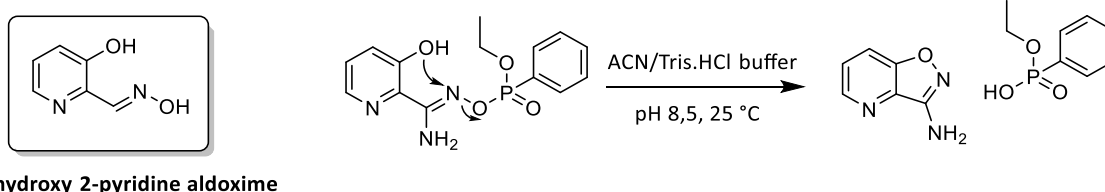
Après 70 ans de recherche, aucun nouveau réactivateur totalement efficace sur tous les OPs (*i.e.* à large spectre) n'a encore été trouvé. Cependant l'accélération des projets de recherche, ces 20 dernières années, ont permis d'appréhender de manière beaucoup plus fine les paramètres régissant l'efficacité d'un réactivateur. Plusieurs observations peuvent donc être faites. Tout d'abord, exception faite des amidines oximes, il semble qu'un noyau aromatique et hétéroaromatique soit le plus à même d'activer suffisamment la fonction oxime pour atteindre une valeur de pKa satisfaisante et obtenir une fonction réactivatrice efficace. De plus, il apparaît que toutes les molécules prometteuses possèdent un ligand pouvant avoir des interactions favorables avec les résidus de la gorge ou du site périphérique. Le défi est de définir la structure optimale de ce ligand et la distance optimale le séparant de la fonction réactivatrice en fonction de la structure de celle-ci. En outre, le passage de la BHE, s'il semble possible pour un composé mono-chargé, est largement favorisé pour un composé neutre, mais ceux-ci peuvent présenter en contre-partie des problèmes de solubilité. Le défi est donc l'équilibre entre la lipophilie et l'hydrophilie du réactivateur. D'autre part, des réactivateurs prometteurs *in vitro* sont

régulièrement compromis *in vivo* sur le plan de leur pharmacocinétique, du passage de la BHE ou de leur toxicité, et ces activités biologiques sont encore très difficiles à prévoir. Enfin, l'objectif d'obtenir un réactivateur à large spectre apparaît néanmoins réalisable car certains réactivateurs s'en rapprochent fortement, incluant la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun, cas réputé le plus difficile. De plus, le large spectre d'action du réactivateur reste encore aujourd'hui une nécessité absolue car les techniques d'analyse, bien qu'elles se développent fortement dans le domaine de la recherche,³⁴² sont encore loin de pouvoir déterminer rapidement en routine le type d'OP ayant intoxiqué une victime civile³⁴³ ou militaire. Avec tous ces défis en tête, et en participant activement à leur reconnaissance, notre équipe s'est donc attelée à la recherche du prochain réactivateur depuis plus de 10 ans maintenant.

3.7. Travaux précédents du laboratoire

3.7.1. La fonction réactivatrice 3-hydroxy pyridine aldoxime

Notre stratégie consiste à utiliser une fonction réactivatrice neutre pour s'assurer d'un meilleur passage de la BHE et qui inclue un groupe hydroxy adjacent à la fonction aldoxime pour, à la fois, améliorer la valeur de son pKa et limiter le phénomène de recapture. En effet, il a été montré qu'un tel motif, une fois l'oxime phosphorylée, peut conduire à une cyclisation intramoléculaire rapide qui permet l'élimination consécutive de la partie phosphyle et évite que la phosphoxyde puisse être réattaquée par la sérine, ce qui limite le phénomène de recapture (**Schéma 6**).³⁴⁴ Parmi les motifs identifiés dans un HTS (High-throughput screening, criblage à haut rendement), le noyau 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime, analogue neutre du 2-PAM, a été choisi car ses capacités à hydrolyser des analogues du VX et ses valeurs cinétiques de k_r pour la réaction de réactivation sont jusqu'à 8 fois supérieures à celles du 2-PAM, l'affinité n'étant pas un critère pertinent à ce stade.³⁴⁵ De plus, l'azote de la pyridine procure une certaine hydrophilie qui manque aux benzaloximes neutres citées précédemment. Le pKa de l'oxime est 8,2, légèrement supérieur aux valeurs recommandées.



*Schéma 6 : structure de la fonction réactivatrice développée par notre équipe et réaction de cyclisation de l'oxime phosphorylée limitant le phénomène de recapture.*³⁴⁴

3.7.2. Fonctionnalisation pour obtenir une meilleure affinité et le passage de la BHE

Afin d'obtenir une réactivation efficace l'affinité devait être améliorée. Ce développement a donné naissance à une large famille de 3-hydroxy 2-pyridine aldoximes conjugués à des ligands choisis pour leur bonne affinité pour le site périphérique grâce à un bras espaceur flexible (une simple chaîne alkyle de 4 à 5 atomes en général). Les études d'amarrage moléculaire et les résultats *in vitro* ont montré que les positions de l'oxime et du bras espaceur devaient être toutes les deux adjacentes à l'azote de la pyridine (positions 2 et 6). Pour atteindre des valeurs de K_D satisfaisantes, les premiers ligands choisis sont des dérivés de molécules connues pour être de bon ligands du SPA et du site actif de l'AChE, tels que le donépézil, la tacrine ou le phenyltetrahydroisoquinoline.³⁴⁶⁻³⁴⁸ Bien que montrant des résultats probants, la plupart des molécules ne dépassent pas l'efficacité du HI-6 ou de l'obidoxime sur les OPs testés. Mais deux réactivateurs se sont montrés très prometteurs : le **GM113** ayant pour ligand le phenyltetrahydroisoquinoline et un autre réactivateur ayant pour ligand la 7-chloro-tacrine (**Figure 34**).

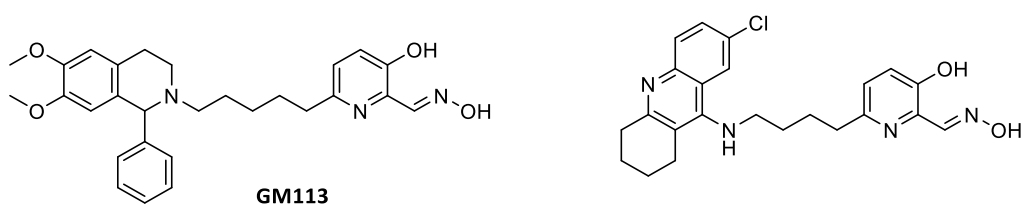


Figure 34 : Structure de deux réactivateurs basés sur le noyau 3-hydroxy pyridine aldoxime lié à un bon ligand du SPA et montrant une bonne réactivation *in vitro*.^{349,350}

Celui-ci montre une réactivation *in vitro* avec un spectre d'action exceptionnel, les k_{r2} étant supérieurs à $10 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ pour le paraoxon, le VX, un analogue du sarin et même le tabun.³⁴⁹ Cependant son affinité pour l'enzyme est si forte qu'elle peut poser un potentiel problème d'inhibition à forte dose avec une IC_{50} de $2,3 \mu\text{M}$ (qui est déjà 10 fois supérieure à celle du composé non chloré).³⁴⁷ Le **GM113** n'a pas cette limitation avec une IC_{50} supérieure à $100 \mu\text{M}$. Il se montre également meilleur que tous les réactivateurs de référence sur le tabun, est aussi efficace sur le paraoxon que l'obidoxime et presque aussi efficace sur le VX que le HLö-7, qui est le meilleur *in vitro* sur cet OP.³⁵⁰ Malheureusement les résultats *in vivo* se sont révélés décevants, offrant moins de protection que tous les réactivateurs de référence, ceci étant certainement dû à des problèmes d'hydrosolubilité et une clairance trop rapide.³⁵¹

La lipophilie de ces composés peut donc limiter leur biodisponibilité *in vivo*. Dans le cadre des projets ANR « ReAChE » et « CNS Antidotes », la synthèse d'une famille variée de nouveaux réactivateurs a été initiée par le Dr. Julien Renou et développée par le Dr. Anissa Braïki, où le ligand est une amine

tertiaire de structure moins complexe, et protonable à pH physiologique, ce qui doit améliorer son hydrophilie (**Figure 35**).⁷ Cela permet aussi de formuler le réactivateur sous forme de sel pour accroître son hydrosolubilité.³⁵²

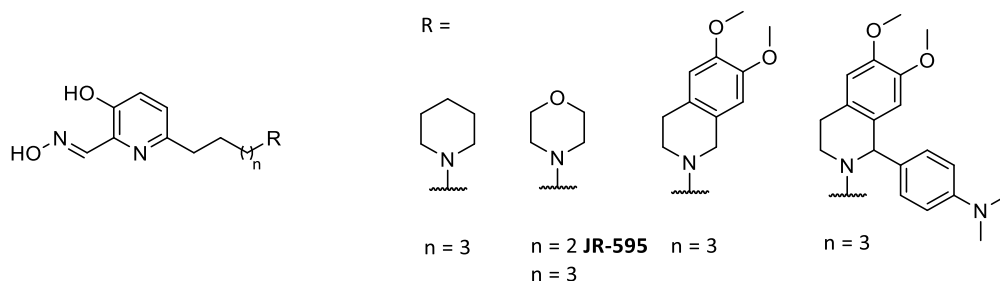


Figure 35 : Structures des réactivateurs avec un ligand amine tertiaire cyclique.⁷

Cette stratégie porte ses fruits puisque l'une des molécules lead, le **JR-595**, est une molécule amphiphile qui traverse très bien la BHE avec 40% de l'oxime dans le SNC, sans être un substrat de la glycoprotéine P.⁶ Malgré une lente dégradation par le foie, la molécule est malheureusement éliminée presque totalement en 1 h. La pharmacocinétique doit donc être optimisée. Cependant son efficacité est presque à large spectre, avec une efficacité moindre contre le tabun.⁷ Bien que la réactivation montre des performances modérées *in vitro*, le **JR-595** réactive *in vivo* l'AChE phosphorylée par les OPs dans la fenêtre thérapeutique définie pour atteindre une efficacité clinique (au moins 30% d'AChE réactivée en moins de 25 min).

3.7.3. Conclusion et perspectives

La poursuite des recherches sur les réactivateurs possédant un ligand aminé sera présentée dans le chapitre 1, avec la resynthèse de certains composés prometteurs pour leur étude *in vivo*.

De plus, une propriété intéressante partagée par certaines de nos molécules possédant un ligand aminé a été mise en évidence : l'inhibition des récepteurs nicotiques, qui est totale à 100 μ M pour les plus puissants. D'autres réactivateurs de la littérature présentent de telles propriétés antagonistes, comme les bis-pyridiniums, dont le mécanisme d'action est probablement allostérique tandis que nos composés ont une activité a priori compétitive. Face à ces observations, l'idée a donc émergé d'accroître ce potentiel pour tenter de synthétiser des molécules antidotes qui pourraient à la fois réactiver l'AChE et avoir un effet régulateur favorable sur les récepteurs nicotiques surstimulés dans le contexte d'une intoxication aux OPs. En effet, il n'existe pas encore de traitement ciblant ce récepteur lors d'une intoxication et nous verrons que traiter les symptômes cholinergiques semble autant, voire plus, important que réactiver l'acétylcholinestérase. Cet effet cholinergique pourrait

permettre de combler la différence d'efficacité régulièrement observée sur les réactivateurs entre les expériences *in vitro* et *in vivo* sur le taux de survie et la qualité de vie.

4. LUTTE CONTRE LES SYMPTOMES CHOLINERGIQUES

4.1. L'arsenal imparfait des traitements symptomatiques

Outre le réactivateur, le traitement actuel fait appel à l'atropine, antagoniste compétitif des récepteurs muscariniques pour lutter contre les symptômes dûs à leur hyperstimulation au niveau périphérique comme au niveau central, ainsi qu'au diazepam ou sa prodrogue l'avizafone, un modulateur allostérique positif des récepteurs GABA_A permettant d'accentuer son action inhibitrice sur l'activité neuronale et ainsi de limiter les crises convulsives. De tels traitements symptomatiques apparaissent à la fois indispensables, en complément du réactivateur de l'AChE, mais insuffisants sous leur forme actuelle.

En effet il peut souvent y avoir un délai conséquent entre le moment de l'intoxication et la mise en place du traitement adéquat, pendant lequel la majeure partie des cholinestérases peuvent se trouver inhibées et les symptômes cholinergiques apparaître. Ceci est d'autant plus critique dans certains cas de figure, comme par exemple l'ingestion d'une grande quantité de pesticide qui nécessite des quantités similairement considérables d'oxime pour détoxifier l'organisme, ce qui prend d'autant plus de temps. Ou bien encore le cas du soman où l'AChE est presque déjà totalement vieillie et non réactivable. Enfin, il y a bien sûr le fait que les réactivateurs actuels peuvent ne pas être efficaces pour certains organophosphorés. Il est donc indispensable de limiter les symptômes pour laisser le temps au réactivateur de régénérer une quantité suffisante d'AChE ou bien que le corps en reproduise suffisamment. De plus, les symptômes cholinergiques déclenchent une cascade d'autres dommages directs ou indirects dans l'organisme : des dommages à des organes importants comme les reins, des phénomènes inflammatoires qui peuvent persister ensuite, la mauvaise oxygénation de l'organisme, les dommages neurologiques et l'état épileptique et neuropathologique qui se développent en plusieurs étapes au fur et à mesure de l'intoxication etc. Ainsi, limiter les symptômes cholinergiques le plus tôt possible permettrait de stopper cette cascade d'effets délétères, qui, s'ils sont trop avancés, peuvent persister malgré une certaine réactivation du système cholinergique. D'autre part, cela permettrait d'éviter les neuropathologies qui peuvent durer des années après l'intoxication et être plus ou moins invalidantes.

Cette approche systémique a récemment été illustrée dans une publication de Lumley *et al.* au niveau du système nerveux central.³⁵³ En effet il a été observé qu'une pharmacorésistance aux benzodiazépines se développait suite aux crises convulsives, causant l'inefficacité du diazepam seulement 40 min après le début des crises. Cela serait dû à la diminution des récepteurs GABA_A mais aussi à l'augmentation des récepteurs NMDA, qui sont suractivés. Ainsi l'association du diazepam avec le valproate, un autre anti-convulsant, et surtout avec la ketamine, qui est à la fois un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, permettant de limiter leur activité, un antagoniste des récepteurs muscariniques (mAChR) M1 et des récepteurs nicotiniques ganglioniques (nAChR), se révèle beaucoup plus efficace. Dans le cas du soman, la mortalité, la perte neuronale, la réponse neuro-inflammatoire et le déficit spatio-temporel sont réduits et il n'y a plus de crises et d'épilepsie. Enfin, leur usage simultané dès le début de l'intoxication est bien plus efficace que leur utilisation séquentielle qui peut laisser le temps aux symptômes de se développer. Cet effet synergique favorable observé entre ces médicaments, qui régulent simultanément l'activité des différentes cibles biologiques touchées par l'intoxication, pourrait donc être aussi une stratégie gagnante pour le système cholinergique : la régulation simultanée des récepteurs cholinergiques, muscariniques et nicotiniques, et la réactivation des cholinestérases. Comme aucun traitement ciblant les nAChRs n'existe actuellement dans le cas des intoxications aux OPs, nous faisons donc l'hypothèse que réguler leur activité en même temps que celle des mAChRs (par l'atropine) peut avoir un effet synergique très favorable.

4.2. Les récepteurs nicotiniques

4.2.1. Intérêts du contrôle de l'activité des nAChRs

En effet, les récepteurs nicotiniques transmettent les signaux nerveux vers les muscles squelettiques, dont les muscles respiratoires, dont la paralysie est une des causes de la mortalité. Ils sont aussi impliqués dans la régulation du cycle respiratoire au SNC et la régulation de leur activité à ce niveau peut donc avoir un effet bénéfique pour contrecarrer la dépression respiratoire (apnée) induite par l'intoxication.^{116,354} Leur présence au niveau des ganglions sympathiques et parasympathiques ainsi que dans certaines parties du cerveau incite aussi à penser que la régulation de leur activité peut avoir des effets bénéfiques, tant centraux³⁵⁵ que périphériques.³⁵⁶ Enfin, leur participation au contrôle cholinergique du système immunitaire peut être un levier intéressant pour réguler les phénomènes inflammatoires présents lors d'une intoxication, comme la neuroinflammation.^{126,357}

4.2.2. Structure et fonctionnement des nAChRs

Le récepteur nicotinique est une protéine appartenant à la superfamille des canaux ioniques pentamériques à ligand. Cette famille inclut aussi les récepteurs 5-HT₃, canaux cationiques, et les récepteurs activés par le GABA (acide gamma-aminobutyrique) ou la glycine, canaux anioniques. Leurs structures similaires peuvent induire des problèmes de sélectivité pour le développement et l'utilisation de ligands dirigés contre un de ces récepteurs. Les récepteurs nicotiniques post-synaptiques induisent la contraction des muscles squelettiques au niveau des jonctions neuromusculaires (ou plaque motrice) et transmettent l'influx nerveux au niveau des synapses centrales et ganglioniques.³⁷ En temps normal, l'activation par une molécule d'acétylcholine provoque l'ouverture du canal et permet le passage de cations Na⁺ et K⁺ (ou Ca²⁺) au travers de la membrane post-synaptique, ce qui ramène son potentiel négatif vers un potentiel neutre. Lorsque suffisamment de canaux ont été ouverts, le potentiel négatif atteint une valeur seuil à partir de laquelle d'autres canaux ioniques dépendant de ce potentiel s'ouvrent à leur tour. L'afflux de cations rend le potentiel post-synaptique positif et cela crée un nouveau potentiel d'action ou bien la contraction d'une fibrille musculaire.³⁹

Mais les nAChRs, comme les mAChRs, se trouvent aussi sur la membrane pré-synaptique, comme auto-récepteurs : leur activation par l'acétylcholine induit une accélération ou la réduction de l'exocytose d'ACh, soit un rétrocontrôle négatif ou positif.^{358,359} Les nAChRs se trouvent aussi dans plusieurs types de cellules et de mécanismes physiologiques non neuronaux, comme la réponse immunitaire au sein de laquelle ils peuvent potentialiser un effet anti-inflammatoire.^{360,361} La régulation de leur activité immunitaire pourrait être bénéfique si l'on considère notamment la capacité des nAChRs $\alpha 7$ à moduler l'expression de cytokines anti-inflammatoires au niveau neuronal et que l'une des causes des pathologies à long terme dûes aux intoxications par un OP est l'inflammation provoquée par l'altération rapide et persistente de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.^{124,125,357}

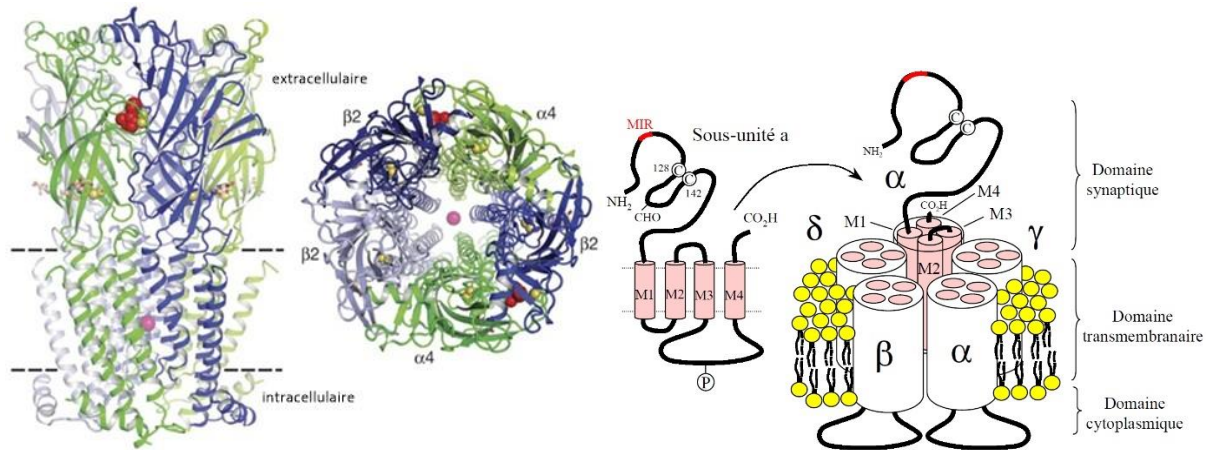


Figure 36 : Structure du nAChR $\alpha 4\beta 2$ avec la nicotine représentée sous forme de sphères rouges, vue parallèle à la membrane cellulaire (gauche) et vue à partir de l'espace extracellulaire (milieu) (adapté de Morales-Perez, 2016)³⁶², Schéma du nAChR musculaire (droite)³⁶³

Le récepteur est un pentamère constitué de cinq sous-unités symétriquement arrangées autour d'un canal ionique central. Chaque sous-unité (α , β , γ , ϵ et δ) est un polypeptide de 450 à 700 acides aminés composés d'un long segment extracellulaire N-terminal, de quatre segments hydrophobes transmembranaires arrangés en hélices (nommés M1-M4), d'un long segment cytoplasmique et d'une courte partie C-terminale extracellulaire (Figure 36)³⁶⁴. 17 sous-unités différentes ont été identifiées. Les nAChRs de la plaque motrice ont la combinaison $\alpha 1, \beta 1, \delta, \alpha 1, \epsilon$ pour le muscle fœtal ou dénervé et $\alpha 1, \beta 1, \delta, \alpha 1, \gamma$ pour la forme adulte, arrangés dans le sens des aiguilles d'une montre en regardant depuis la fente synaptique. Les nAChRs neuronaux sont composés de 11 sous-unités ($\alpha 2$ – $\alpha 7, \alpha 9, \alpha 10$, et $\beta 2$ – $\beta 4$) combinés de façon homomérique (les 5 sous-unités sont identiques) pour $\alpha 7$ et $\alpha 9$, et de façon hétéromériques avec $\alpha 2$ – 6 et $\beta 2$ – 4 , généralement avec un seul type de sous-unité α et un seul type de β , selon une stoechiométrie de 2α pour 3β . $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ sont les nAChRs neuronaux les plus abondants dans le système nerveux central tandis que $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 3\beta 2$ sont les plus abondants dans le système nerveux périphérique (respectivement dans les ganglions et dans les jonctions neuromusculaires comme auto-récepteurs).

Les travaux de recherche s'intensifient depuis deux décennies pour améliorer la compréhension du mode d'action de ces récepteurs, avec notamment l'établissement de leur structure par diffraction des rayons X, établie récemment pour l' $\alpha 7$ et l' $\alpha 4\beta 2$ par l'équipe de Noviello *et al.*^{362,365} Tous ces différents types de nAChRs présentent un large spectre de propriétés pharmacologiques et cinétiques.³⁶⁶

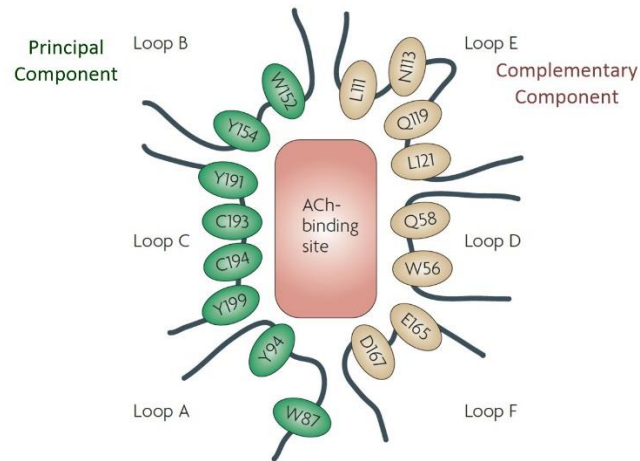


Figure 37 : Représentation schématique du site de liaison de l'acétylcholine de l' $\alpha 7$ (adapté de Taly, 2009)³⁶⁷

Le site de liaison agoniste (site orthostérique) se situe dans le domaine extracellulaire à l'interface entre une sous-unité de type α (le composant principal) et une sous-unité non α (le composant complémentaire). Ainsi, le nombre de sites de liaisons dépend du nombre de sous-unités α : de 2 pour les nAChRs musculaires et certains hétéromériques à 5 pour les nAChRs homomériques comme le $\alpha 7$. Cette interface forme une poche entourée de 6 boucles d'acides aminés : les boucles A, B et C venant du composant principal et les boucles D, E et F venant du composant complémentaire (**Figure 37**).³⁶⁴

Dans ce site, les résidus aromatiques tryptophane et tyrosine des boucles A, B, C et D stabilisent un ammonium grâce à des interactions cation- π dans une « box » aromatique, cet ammonium est donc un pharmacophore clé pour un ligand du site orthostérique. Ainsi, suivant la nature du composant complémentaire, les sites orthostériques ont des affinités différentes pour les agonistes, dont l'acétylcholine : pour les nAChRs musculaires par exemple, l'interface α - δ est un site de haute affinité tandis que l'interface α - ϵ/γ a une faible affinité. Pour autant, pour tous les types de nAChRs, le canal a la plus forte probabilité d'être ouvert lorsqu'au moins deux sites sont activés.

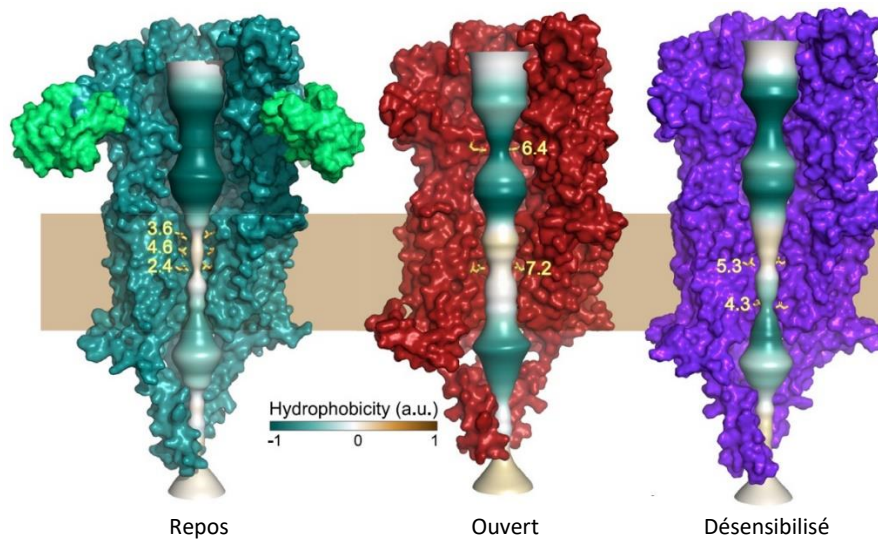


Figure 38 : Voie de pénétration des cations au travers du canal ionique du nAChR $\alpha 7$ à l'état de repos (gauche), ouvert (milieu) et désensibilisé (droite) (adapté de Noviello, 2021)³⁶⁵

Le récepteur nicotinique a trois états majeurs différents : fermé (au repos), ouvert et désensibilisé, ce dernier présentant une forte affinité pour l'agoniste tout en étant imperméable aux ions (**Figure 38**). A l'état de repos, un nombre suffisant de sites orthostériques activés par un agoniste cause l'ouverture du canal par une cascade de changements conformationnels (exemples d'agonistes et d'antagonistes **Tableau 8**). Le récepteur devient ensuite désensibilisé : l'agoniste est toujours lié mais le canal est fermé et réfractaire à d'autres activations. Finalement, l'agoniste est relâché et le récepteur retourne à l'état de repos.

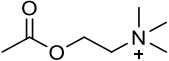
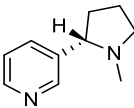
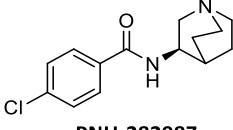
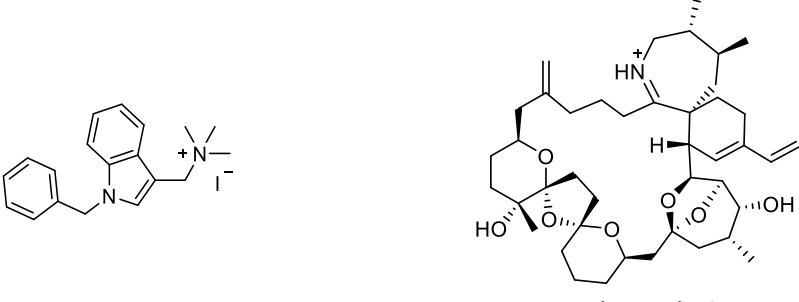
Agoniste	 Acétylcholine	 Nicotine	 PNU-282987
Antagoniste compétitif	 Pinnatoxin-G		

Tableau 8 : Exemples de structures d'agonistes et d'antagonistes des nAChRs. (Pinnatoxin G³⁶⁸)

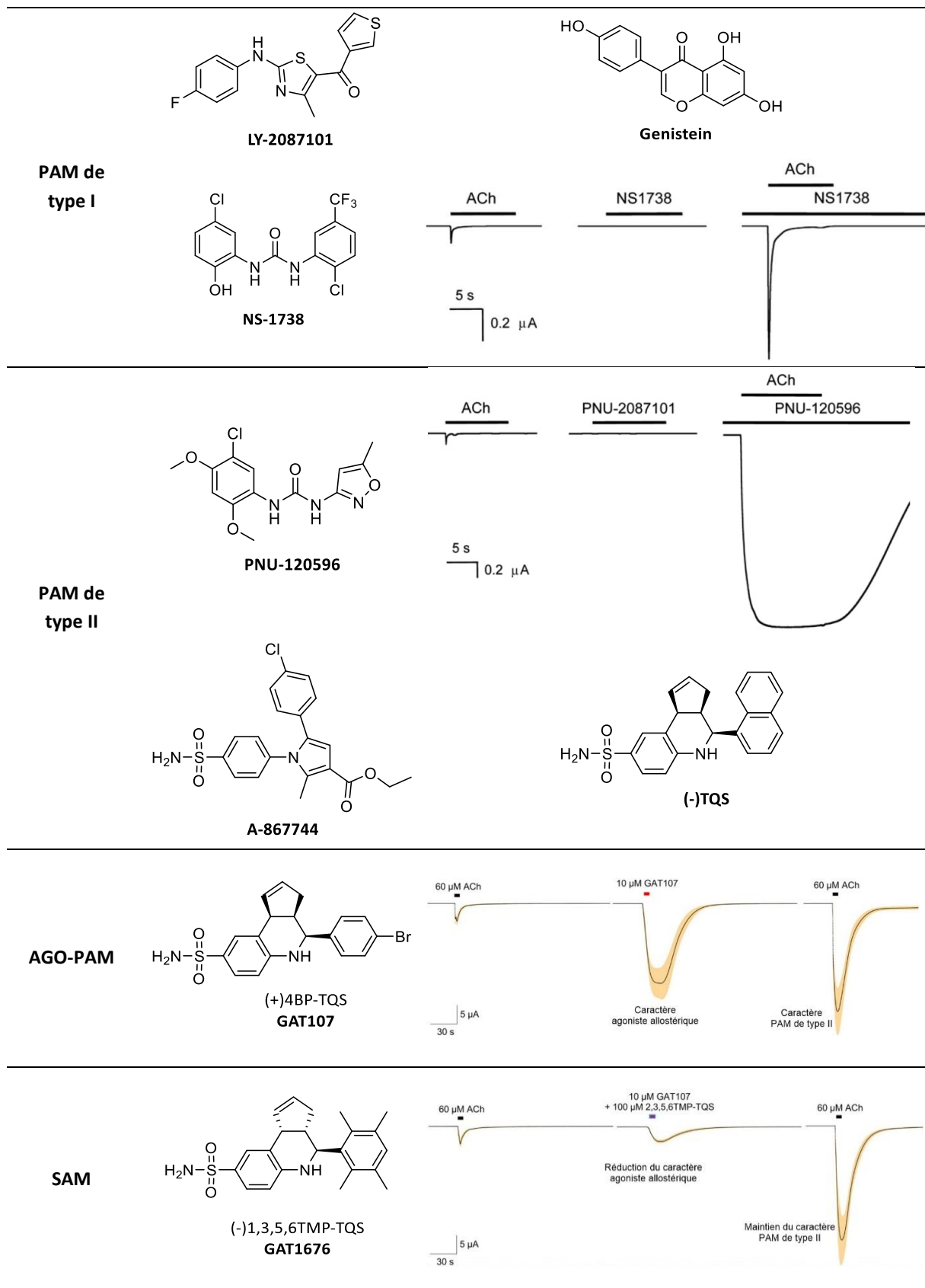
Plusieurs états désensibilisés existent, dépendant des conditions. En particulier dans le cas d'une intoxication aux OPs, l'exposition prolongée à de hautes concentrations d'acétylcholine cause l'activation répétée du nAChR, menant à terme à sa désensibilisation prolongée, qui peut paralyser les

muscles.^{369,370} Mais tous les nAChRs réagissent différemment à l'accumulation d'acétylcholine à cause de leurs différences de comportement thermodynamique et cinétique. L' $\alpha 7$ homomérique est ainsi connu pour se désensibiliser très rapidement (l'état désensibilisé est le plus stable si les tous les 5 sites de liaisons sont occupés par une molécule d'ACh) tandis que l' $\alpha 4\beta 2$ est beaucoup moins sensible à la désensibilisation. Ces différences sont suspectées d'être à l'origine d'une désensibilisation des récepteurs nicotiniques selon une certaine chronologie durant une intoxication par un OP, bloquant les fonctions physiologiques associées les unes après les autres.³⁷¹

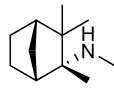
Au niveau des jonctions neuromusculaires la paralysie du muscle provient d'abord de son incapacité à répondre à de nouveaux stimuli à cause de sa dépolarisation persistente suite à l'activation prolongée causée par l'acétylcholine. Puis avec la poursuite de la stimulation d'acétylcholine, les nAChRs se désensibilisent et ne répondent plus à la présence de l'ACh.^{238,372} Le blocage des jonctions neuromusculaires est donc une combinaison de ces deux processus qui se suivent. La désensibilisation apparaît comme un mécanisme de protection puisque cela peut laisser le temps à la cellule musculaire de se repolariser.

4.2.3. Modulation allostérique des nAChRs

Cependant, la stabilité thermodynamique des différents états des nAChRs et le coût énergétique de la transition entre ceux-ci peuvent être influencés par des modulateurs allostériques.³⁶¹ Ces molécules peuvent se lier à des sites de liaison allostériques présents sur les domaines extra- et transmembranaires, différents des sites de liaison orthostériques où se lient les agonistes et antagonistes (**Tableau 8**). Cinq effets électrophysiologiques différents ont été observés jusqu'à maintenant, provoqués par l'action non compétitive d'une large variété de molécules allostériques en présence d'agonistes ou d'antagonistes (**Tableau 9**). Mais, excepté pour une des catégories de modulateurs, ces molécules ne peuvent pas activer par elles-mêmes l'ouverture du canal.



NAM



Mecamylamine

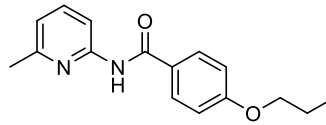


Tableau 9 : Exemples de modulateurs allostériques des nAChRs, PAM de type I,³⁷³⁻³⁷⁵ PAM de type II,³⁷⁵⁻³⁷⁷ AGO-PAM,³⁷⁸ SAM,³⁷⁹ NAM,³⁸⁰⁻³⁸² et les mesures électrophysiologiques caractéristiques des PAM de type I, PAM de type II, AGO-PAM et SAM.

Les modulateurs allostériques négatifs (Negativ Allosteric Modulator NAM) réduisent de façon non compétitive, partiellement ou totalement, le signal produit par un agoniste.³⁸³ Les modulateurs allostériques positifs (Positiv Allosteric Modulator PAM) de type I augmentent l'intensité du signal produit par un agoniste donné.³⁷⁵ Les PAM de type II augmentent l'intensité du signal mais aussi sa durée, même si l'agoniste est enlevé du milieu entre-temps. Les agonistes allostériques (AGO-PAM) ont les propriétés d'un PAM de type II et peuvent activer l'ouverture du canal par eux-mêmes, sans la présence concomitante d'un agoniste dans le site orthostérique, contrairement aux autres modulateurs.³⁸⁴ Enfin, les modulateurs allostériques silencieux (Silent Allosteric Modulator SAM) réduisent ou augmentent les effets d'autres modulateurs allostériques, de façon compétitive avec ceux-ci ou non.³⁸⁵

Parmi tous les modulateurs allostériques, seuls les PAM de type II ont démontré la capacité à resensibiliser les nAChRs durant un contact prolongé avec une forte concentration d'ACh. Les PAM de type II se lient dans leur site allostérique préférentiellement lorsque le nAChR est dans l'état désensibilisé et facilitent sa transition vers l'état ouvert, qui peut durer jusqu'à une heure suivant la molécule. Cependant si l'application du PAM de type II se prolonge, un autre mécanisme de compensation peut être observé : l'apparition d'un autre état désensibilisé devenu insensible au PAM, réversible si le PAM est enlevé du milieu.³⁸⁶ Or un potentiel problème de l'utilisation de ces PAM de type II, encore en débat dans la littérature, est le flux trop important de Ca²⁺ dans la cellule post-jonctionnelle durant cette ouverture très longue, ce qui peut être cytotoxique pour la cellule. Or c'est un mécanisme qui a déjà lieu dans le cas de l'intoxication aux OPs et qui doit justement être évité.

Les sites de liaison allostériques sont malheureusement presque tous encore inconnus, avec seulement des présomptions entre différents sites possibles, malgré certaines structures de nAChR résolues.³⁸⁷⁻³⁹¹ Cela limite les possibilités d'étude d'amarrage moléculaire pour optimiser la structure d'un modulateur dans le cadre d'un traitement contre une intoxication aux OPs.

La recherche de nouveaux modulateurs allostériques est très intense ces dernières années car c'est une piste très prometteuse pour agir sur les récepteurs nicotiques dans le cadre de l'amélioration

des capacités cognitives pour des maladies neurodégénératives comme Alzheimer par exemple, sans provoquer d'effets secondaires trop importants comme peuvent en produire les agonistes ou antagonistes compétitifs. Des effets très significatifs et prometteurs *in vivo* ont déjà été obtenus en ce sens avec certaines molécules et certaines font l'objet de test cliniques.^{387,392-395} Mais après un certain désintérêt durant de nombreuses années, les récepteurs nicotiques sont aussi redevenus une cible d'intérêt pour l'intoxication aux OPs. Différents types de ligands, agoniste partiel, antagoniste compétitif, modulateur allostérique négatif, ont déjà été évalués, avec des résultats très divers.

4.2.4. Développement de nouveaux traitements

4.2.4.1. Antagonistes compétitifs des nAChRs des jonctions neuro-musculaires

Historiquement, les antagonistes des nAChRs post-jonctionnels (musculaires) ou pré-jonctionnels (neuronaux $\alpha 3\beta 2$) de la jonction neuro-musculaire ont d'abord été testés. Ils étaient supposés réduire l'activation et la désensibilisation consécutive des nAChRs et ainsi la paralysie des muscles. Premièrement, le pancuronium a échoué à montrer un bénéfice clinique significatif, malgré l'observation *in vivo* de la réduction des signes neurophysiologiques anormaux au niveau de la jonction neuro-musculaire induits par l'intoxication (impulsions nerveuses antidromiques, décharges répétitives de potentiels d'action et décroissance de leur intensité causée par les stimulations répétées).³⁹⁶⁻³⁹⁸ Ensuite, la tubocurarine est aussi capable d'éliminer ces phénomènes (**Figure 39**).³⁹⁹ De plus, elle présente une protection comparable à l'atropine contre les inhibiteurs d'AChE, utilisée seule en prophylaxie ou en thérapeutique, ainsi qu'un effet synergique favorable en combinaison avec l'hexamethonium, antagoniste sélectif des nAChRs neuronaux (pré-jonctionnel).⁴⁰⁰

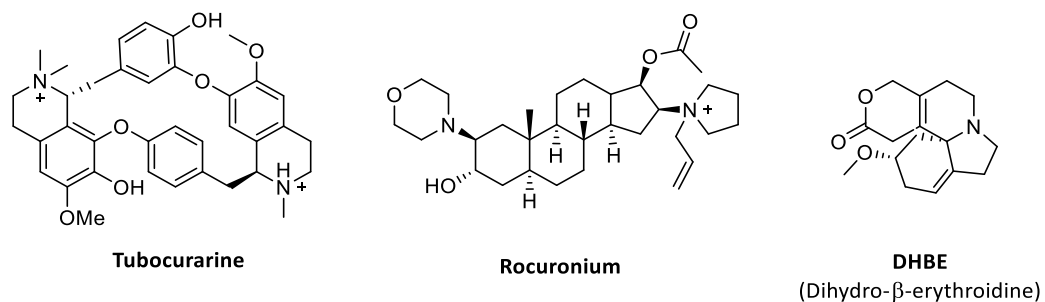


Figure 39 : Structures d'antagonistes compétitifs et non compétitifs des nAChRs.

Enfin, un traitement prophylactique de rocuronium (**Figure 39**) réduit les dommages induits par un OP sur les jonctions neuromusculaires de cochons d'Inde.⁴⁰¹ Néanmoins, un essai clinique récent sur des patients intoxiqués par des pesticides montre au contraire une augmentation de la durée d'intubation

quand le rocuronium est ajouté au traitement standard durant 5 jours.⁴⁰² Cet effet délétère pourrait provenir des doses utilisées ou de la durée du traitement par rapport à la durée d'action de l'OP.

On observe donc globalement une décorrélation entre des effets bénéfiques au niveau de la jonction neuromusculaire et des effets cliniques insatisfaisants. En effet l'utilisation d'antagonistes compétitifs des nAChRs musculaires est compromise par leur fenêtre thérapeutique étroite entre des doses assez faibles pour ne pas bloquer la jonction neuromusculaire et des doses assez fortes pour contrecarrer la concentration excessive d'ACh. Finalement, l'usage des antagonistes compétitifs sur les nAChRs est sujet à controverse, certains chercheurs proposant, par exemple, de les utiliser à large dose, quitte à paralyser tous les muscles, pour préserver les nAChRs de l'ACh en excès durant toute la durée de l'intoxication.⁴⁰³ Mais, leur effet au niveau des muscles respiratoires impliquerait alors le besoin d'une ventilation mécanique, ce qui n'est pas toujours possible.

4.2.4.2. Antagonistes des nAChRs neuronaux

Ce problème de dosage est en revanche considérablement réduit pour les antagonistes compétitifs des nAChRs neuronaux du système nerveux central car les conséquences physiologiques sont beaucoup moins directes. Le DH β E (dihydro- β -erythroidine) (**Figure 39**), qui est un antagoniste sélectif des $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 4\beta 4$, est notamment capable de contrecarrer la réduction d'ARN messenger des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ observée dans des cellules PC12 exposées à du paraoxon.⁴⁰⁴

4.2.4.3. Modulateurs allostériques négatifs

Cependant, les NAM sont plus prometteurs que les antagonistes compétitifs parce qu'ils réduisent seulement l'activité causée par l'ACh sans bloquer totalement les récepteurs. Parmi ceux-ci, les NAM dénommés bloqueurs du canal ouvert sont caractérisés par un effet dépendant du voltage. Le site de liaison des molécules connues pour avoir un tel effet NAM n'est pas élucidé, ce qui empêche d'être sûr de leur mécanisme d'action.⁴⁰⁵ Il semblerait qu'ils bloquent le passage des cations quand le canal est ouvert en se liant sur un site situé à l'intérieur du canal, alors que les autres NAM ont un effet antagoniste en provoquant des changements conformationnels quand ils se lient sur un site à l'extérieur du canal. C'est un mécanisme intéressant car l'antagonisme ne devient important que si l'activation des récepteurs augmente. Ainsi, le fonctionnement du récepteur n'est pas bloqué mais modulé, et les successions rapides d'états ouverts et bloqués éviteraient sa désensibilisation.

La chlorpromazine, un neuroleptique dérivé de la phenothiazine, est un bloqueur du canal ouvert utilisé dans plusieurs études par Nazardinov *et al.* Administrée plusieurs jours à des patients intoxiqués

par un OP, elle réduit significativement les symptômes nicotiques. Cependant ce composé a potentiellement des effets secondaires forts à cause de ses autres cibles neurologiques.^{406,407}

La mécamylamine est un bloqueur du canal ouvert plus intéressant car elle antagonise un large spectre de nAChRs : les neuronaux $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7$ et les musculaires.^{380,408,409} Sa capacité à traverser la BHE fournit des effets neuronaux protecteurs *in vivo* contre les dommages causés par le paraoxon dans le cerveau de rats similaires à ceux précédemment cités pour le DH β E *in vitro*.^{404,404} Sa combinaison avec de l'atropine et un inhibiteur réversible de l'AChE en prophylaxie augmente considérablement le taux de survie de rats intoxiqués au soman, comparativement à chacune des molécules seules ou à leur combinaison par paires.⁴¹⁰

Néanmoins il n'a pas été reporté si ces molécules pourraient améliorer le taux de récepteurs désensibilisés en présence d'un excès d'ACh. Il semble en effet nécessaire de pouvoir resensibiliser les nAChRs, car le traitement est généralement administré au moins plusieurs dizaines de minutes après l'intoxication, moment où la paralysie des muscles peut déjà apparaître, impliquant la désensibilisation en cours des nAChRs. C'est le cas du NAM le plus prometteur, développé par Worek *et al.* : la molécule **MB327** (Figure 40). Ce bispyridinium est un dérivé du réactivateur TMB-4 où les deux oximes sont remplacées par un groupe isopropyle, les bispyridiniums ayant, en effet, démontré de légers effets antagonistes.²³⁵

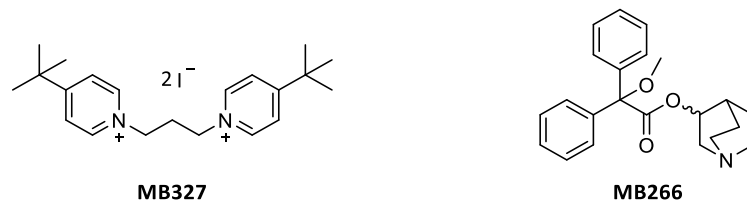


Figure 40 : Structure de MB327, bloqueur du canal ouvert des nAChRs au repos et PAM de type II des nAChRs désensibilisés, et de MB266, antagoniste des mAChRs et nAChRs.

Dans les études électrophysiologiques sur des nAChRs neuronaux et musculaires,²³⁸ le blocage rapide et intermittent des canaux ioniques causé par **MB327** forme une succession très rapide d'évènements fermés et ouverts au passage des ions lors de l'activation du récepteur par l'agoniste, au lieu d'un seul évènement ouvert dans les conditions du contrôle. C'est la somme de tous ces évènements qui montre une diminution globale de l'intensité du signal sur toute la jonction, synaptique ou musculaire.¹¹³ En plus de cette activité antagoniste, la molécule présente les propriétés des PAM de type II : celles permettant de restaurer l'activité de nAChRs $\alpha 7$ désensibilisés, d'une façon dépendante de la concentration (de 10 μ M à 10 mM), tout en potentialisant l'activation faite par l'agoniste, avec une réponse plus longue et plus intense (jusqu'à 4 fois) que celle observée sans le modulateur allostérique

sur un récepteur au repos.⁴¹¹⁻⁴¹³ Néanmoins ces résultats restent inférieurs à ceux obtenus par le meilleur PAM de type II PNU-120596 dans les mêmes conditions (à partir de 1 μM). Cette combinaison de bloqueur du canal ouvert vis-à-vis des récepteurs au repos et de PAM de type II vis-à-vis des récepteurs désensibilisés semble idéale dans le cas d'une intoxication aux OPs.

MB327 restaure la transmission neuromusculaire des muscles respiratoires de rats et de cochons d'Inde ainsi que des muscles intercostaux humains après un empoisonnement au soman (10-100 μM).^{414,415} De plus, administré 1 min après l'intoxication par une LD₉₅ de soman, avec un prétraitement d'atropine, une dose de 17,6 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ de **MB327** (P62 dans la publication) réduit la mortalité à 50%. Enfin, la molécule possède une fenêtre thérapeutique acceptable avec des effets thérapeutiques efficaces autour de 200 μM et une IC₅₀ de 600 μM pour l'inhibition réversible de l'AChE. Des composés homologues ont aussi été synthétisés dans le but d'améliorer ses propriétés.⁴¹⁶ Malheureusement, l'inconvénient majeur de ces composés est que malgré leur action potentielle sur les nAChRs neuronaux, leur double charge positive les empêche de traverser la BHE.

4.2.4.4. Ligands multi-cibles

Finalement, deux autres composés ont été récemment développés comme ligands multi-cibles avec une action antagoniste contre les mAChRs et les nAChRs. **MB266 (Figure 40)** a été conçu à partir de la structure du benzilate de 3-quinuclidinyle (QNB), dont l'effet anti-muscarinique (structure proche de l'atropine) a montré des effets bénéfiques contre l'intoxication aux OPs. Le remplacement d'un groupe hydroxyle tertiaire du QNB par un groupe méthoxy dans le **MB266** réduit l'antagonisme pour les mAChRs, mais augmente en même temps l'activité sur les nAChRs, lui permettant d'agir sur les deux cibles.⁴¹⁷ Mais, malgré un effet antagoniste à la fois sur les nAChRs neuronaux et sur les nAChRs périphériques, le composé échoue à améliorer l'activité d'une jonction neuromusculaire d'une préparation d'hémi-diaphragme de cochon d'Inde empoisonnée par du soman. Il est donc plutôt envisagé pour une action anti-convulsante. Ces résultats illustrent la difficulté d'agir à la fois au niveau central et au niveau périphérique.

La benthiaztine (« benzilate thio S-2-diethylamino ethyl ester hydrochloride ») a aussi été synthétisée par Luo *et al.* pour ses effets anti-muscariniques et anti-nicotiniques à partir d'un programme de criblage de molécules. Son IC₅₀ est de 4,9 μM et de 7,5 μM envers respectivement l' $\alpha 4\beta 2$ et l' $\alpha 4\beta 4$, et supérieure pour l' $\alpha 7$.⁴¹⁸ Malgré une action plus faible que l'atropine sur les mAChRs, la benthiaztine offre une meilleure protection que l'atropine contre le VX et le sarin sur des souris, ce qui tendrait à

démontrer que l'action sur les deux récepteurs est plus efficace que sur un seul, aussi efficace soit-elle.

4.2.5. Conclusion

La recherche sur des traitements dirigés sur les nAChRs dans le cadre d'une intoxication aux OPs est restée éparsée malgré un certain regain dans la dernière décennie. Le difficile dosage des antagonistes compétitifs a en effet découragé la poursuite de cette voie. Pourtant ceci peut être évité avec l'utilisation de ligands aux niveaux ganglionique et central ou bien l'utilisation de modulateurs allostériques, parmi lesquels les bloqueurs de canal ouvert semblent rassembler les propriétés idéales pour une intoxication aux OPs. De plus les effets bénéfiques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* observés avec ces composés démontrent le potentiel de cette voie thérapeutique.

Néanmoins, excepté pour le **MB266** et la benthiactzine, on observe qu'entre le réactivateur, les anti-convulsants, l'anti-muscarinique et l'anti-nicotinique, le cocktail de molécules deviendrait de plus en plus complexe à manipuler pour les médecins, vis-à-vis des dosages, des interactions médicamenteuses, pharmacodynamiques et pharmacocinétiques etc. Il apparaît donc que le traitement de l'intoxication aux OPs, qui est multi-factorielle, pourrait passer par une approche multi-cibles, concept qui se développe fortement en chimie médicinale pour traiter ce type de pathologie,⁴¹⁹ et qui a aussi été essayé pour l'intoxication aux OPs.⁴²⁰ Le traitement des nAChRs pourrait donc se faire en liant cette propriété à une fonction réactivatrice de l'AChE dans un ligand multi-cible. De plus l'effet anti-nicotinique observé sur les réactivateurs bispyridiniums de référence ainsi que sur les réactivateurs de notre laboratoire, composés de la fonction 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime et d'un ligand aminé, nous incitait à approfondir cette double propriété dans un antidote multi-cibles (Multi-Target Directed Antidote MTDA), à la fois réactivateur de l'AChE inhibée par les OPs et régulateur de l'activité des nAChRs surstimulés par un excès d'ACh.

5. L'APPROCHE MULTI-CIBLE

5.1. Avantages du concept multi-cibles

Le concept consiste à associer deux pharmacophores (voire plus) dans la structure d'une seule molécule pour que celle-ci puisse agir simultanément sur les cibles biologiques correspondantes au lieu d'utiliser deux molécules. L'utilisation de ce concept est particulièrement utile pour les maladies multi-factorielles comme certaines maladies neuro-dégénératives. En effet l'utilisation de plusieurs molécules signifie plusieurs études pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et cliniques, ainsi que l'analyse de leurs interactions médicamenteuses, tandis que l'utilisation d'une seule molécule simplifie grandement le développement du traitement. En réduisant le cocktail de molécules utilisées, le nombre d'effets secondaires potentiels est réduit et la production du traitement est simplifiée. Ainsi, en développant une molécule agissant à la fois sur l'AChE inhibée et sur les nAChRs, le cocktail médicamenteux reste composé de trois molécules, tout en augmentant potentiellement les effets synergiques bénéfiques.

5.2. Conditions de l'efficacité d'un ligand multi-cibles

La stoechiométrie 1/1 des motifs associés dans un ligand multi-cibles impose que la molécule ait, à une concentration donnée, le même niveau d'affinité pour chacune des cibles biologiques. Dans le cas contraire, l'efficacité de la molécule sur la cible la moins affine peut être compromise. Il est donc préférable que l'IC₅₀ ou l'EC₅₀ pour chacune des cibles soient du même ordre de grandeur. Néanmoins, cette condition semble potentiellement moins problématique dans le cas d'une molécule multi-cibles sur l'AChE et les nAChRs car ces deux cibles sont extrêmement proches spatialement au sein d'une jonction neuronale, ce qui peut faciliter le passage de l'une à l'autre.

De plus, pour obtenir des effets comparables, il est aussi préférable que l'affinité du composé multi-cibles pour chacune des cibles soit au moins au même niveau que celles des motifs biologiquement actifs de départ. Ce point est complexe car les changements structurels induits par la fusion des différents motifs peuvent aussi bien augmenter l'affinité sur chacune des cibles en créant de nouvelles interactions favorables, que les compromettre, et nécessitent de faire des analyses de relations structure-activité.⁴²¹

Le composé multi-cibles doit aussi avoir une pharmacocinétique et les propriétés physico-chimiques associées permettant d'atteindre les deux cibles de façon optimale.

5.3. Conception du ligand multi-cibles

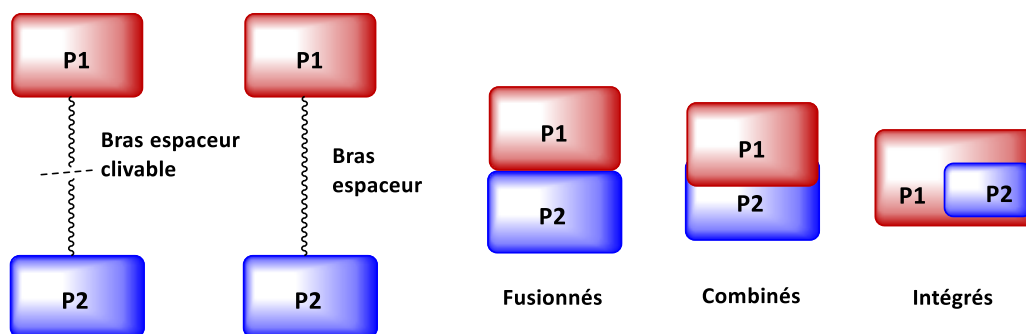


Figure 41 : Différentes conceptions de ligands multi-cibles

Il y a 5 façons de lier ensemble les deux pharmacophores P1 et P2, qui dépend notamment de leurs similitudes structurelles (**Figure 41**).⁴²² En les liant par un bras espaceur, il est beaucoup plus simple de garder les structures des deux pharmacophores proches de leur structure de départ mais la molécule finale peut avoir un poids moléculaire trop important et une structure complexe à synthétiser. De plus, plus la structure moléculaire est grande et plus il peut être plus difficile d'obtenir les propriétés physico-chimiques voulues. A l'inverse les formes fusionnées, combinées ou intégrées peuvent donner un ligand de poids moléculaire plus faible. En revanche il est beaucoup plus difficile de conserver la même affinité pour les différentes cibles avec de tels changements de structures.

5.4. Défis d'un antidote multi-cibles AChE/nAChR

Du point de vue de l'affinité, les sites de liaison des nAChRs se révèlent problématiques. Pour le site orthostérique, plusieurs acides aminés se conservent mais le changement de composant complémentaire induit des changements d'affinité entre les différents sous-types de nAChR. Pour les sites allostériques, quasiment aucun n'est connu avec certitude dans la littérature. Aucune étude d'amarrage moléculaire n'a donc été faite durant cette thèse sur cette cible biologique. Au contraire pour l'AChE inhibée par les différents OPs, l'amarrage moléculaire peut être réalisé et l'affinité idéale du réactivateur est connue : elle ne doit pas être inférieure à 1 μM pour ne pas inhiber l'enzyme native et une affinité d'un ordre de grandeur de 10 μM semble idéale. Le ligand du nAChR devrait donc avoir une affinité similaire pour son site de liaison sur celui-ci.

Pour le nAChR, l'autre défi est le choix du ligand.

- Un antagoniste compétitif peut présenter une structure simple et petite, proche de celle de l'acétylcholine, qui aura en outre une bonne affinité pour l'AChE puisque l'acétylcholine est

leur ligand commun. C'est, de plus, une propriété observée sur les réactivateurs déjà synthétisés par notre équipe, il est donc envisageable d'optimiser cet effet à partir de leur structure. Enfin, l'antagonisme des nAChRs peut permettre de les resensibiliser en stoppant momentanément leur activation par l'ACh, mais cela n'est pas totalement prouvé. En revanche, les antagonistes compétitifs peuvent provoquer des effets secondaires, étant donné que les quantités nécessaires pour la réactivation sont conséquentes et peuvent potentiellement bloquer les récepteurs nicotiniques de façon excessive, ce qui peut nécessiter l'utilisation d'un motif ayant des propriétés d'antagoniste partiel. D'autre part la compétition avec les quantités en excès d'acétylcholine peuvent compromettre son efficacité au début de l'intoxication tandis que la diminution de la quantité d'ACh au fur et à mesure que la réactivation progresse peut ensuite augmenter de manière nocive l'effet de l'activité antagoniste.

- Les PAM, en particulier de type II, peuvent permettre d'augmenter le signal des récepteurs encore au repos pour contrecarrer la réduction de la transmission nerveuse, tout en resensibilisant les récepteurs désensibilisés. Cependant l'ouverture prolongée des récepteurs peut potentiellement laisser passer de manière excessive les ions Ca^{2+} , ce qui peut avoir un effet cytotoxique sur les cellules post-synaptiques. De plus la structure de ces composés peut être plus difficile à combiner avec celle de la fonction réactivatrice.
- Les NAM ont l'avantage de présenter de façon beaucoup moins prononcée le problème d'inhibition des antagonistes compétitifs car leur effet ne dépend pas autant de la concentration de l'acétylcholine. De plus, leur antagonisme peut aussi potentiellement permettre d'éviter la désensibilisation des nAChRs. En revanche, excepté **MB327**, les NAM ne peuvent pas resensibiliser les nAChRs désensibilisés.

Malgré tout, ce concept multi-cibles s'est déjà concrétisé avec succès en chimie médicinale, notamment dans la recherche sur de potentiels traitements contre la maladie d'Alzheimer en liant la structure d'un ligand de l'acétylcholinestérase avec celui d'une autre cible impliquée dans la maladie.⁴²³⁻⁴²⁷ Dans ce cadre, notre équipe a participé au projet de développement de plusieurs ligands multi-cibles. Il y a eu, notamment, l'association des motifs de type tacrine, inhibiteur de l'AChE, et des valmerins I et III, inhibiteurs de kinases, dont a résulté des ligands ayant une affinité nanomolaire pour les deux cibles, meilleure que celle des composés de départ.⁸ La fonction inhibitrice de la tacrine pour l'AChE a aussi été associée à une structure agoniste des nAChRs $\alpha 7$ basée sur la quinuclidine.⁴²⁸ Les ligands multi-cibles obtenus ont bien conservé ces deux propriétés, avec cependant des variations d'affinité.

6. CONCLUSION - OBJECTIF

L'objectif de ma thèse est donc la conception et la synthèse d'antidotes multi-cibles (multi-target directed antidotes MTDA), à la fois réactivateurs de cholinestérase et régulateurs de l'activité des récepteurs nicotiques, pour leur évaluation biologique sur les cholinestérases inhibées par des NOPs et sur les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ et /ou musculaire.

Mon doctorat est financé par l'Agence de l'Innovation pour la Défense (AID) et par la région Normandie et s'est déroulé dans l'équipe de chimie bio-organique au sein du laboratoire COBRA (UMR 6014) de l'Université de Rouen Normandie, sous la direction du professeur Ludovic Jean et la co-direction du professeur Pierre-Yves Renard. Cette thèse s'inscrit dans le contexte du projet Astrid Multidote (ANR-17-ASTR-0012) financé par l'Agence de l'Innovation pour la Défense (AID), via l'ANR, qui a permis de financer le salaire d'un stagiaire postdoctoral, le Dr. Julien Gasnot, qui a participé à l'élaboration de MTDA. Ce projet se déroule en partenariat avec deux équipes de biologistes : l'équipe du Dr. Denis Servent et du Dr. Rómulo Aráoz du Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologie (LTMB) au sein du CEA Saclay pour les tests d'électrophysiologie réalisés sur les récepteurs nicotiques. Le Dr. Nicolas Lamassiaude a été recruté, dans le cadre du projet ANR, comme stagiaire postdoctorant dans cette équipe pour réaliser les tests ; et l'équipe dirigée par le Dr. Florian Nachon du Département de Toxicologie et Risques Chimiques de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) avec le Dr. José Dias et la doctorante Ophélie Da Silva pour les tests *in vitro* sur l'AChE et la BChE et les Dr. Guilhem Calas et Anne-Sophie Hanak pour les tests *in vivo*.

Les résultats de cette thèse s'articuleront en trois parties. Le premier chapitre présentera les résultats obtenus dans la synthèse et la formulation de molécules précédemment conçues par notre équipe, pour effectuer leur évaluation *in vivo* ; leur évaluation *in vitro* ayant démontré des résultats prometteurs.

Dans le deuxième chapitre nous aborderons la synthèse d'antidotes multi-cibles dérivés des molécules précédentes avec le remplacement de l'amine tertiaire du ligand par un ammonium quaternaire supposé accentuer le caractère antagoniste compétitif de ces composés vis-à-vis des récepteurs nicotiques, grâce à une plus forte similitude avec la structure de l'acétylcholine. Les difficultés rencontrées ainsi que les résultats des test biologiques seront aussi présentés.

Le troisième chapitre sera consacré à la conception d'antidotes multi-cibles basés sur les modulateurs allostériques positifs et négatifs de certains récepteurs nicotiques, dont la structure a été combinée

avec celle du noyau 3-hydroxy pyridine aldoxime. Là encore, difficultés synthétiques, tests biologiques et choix des modulateurs allostériques choisis seront discutés.

Enfin, tous ces résultats seront résumés dans la conclusion générale où seront également exposés les perspectives de ces travaux.

**CHAPITRE I : SYNTHÈSE DE REACTIVATEURS NON CHARGES ET LEUR
EVALUATION *IN VIVO***

1. TRAVAUX PRECEDENTS SUR LES REACTIVATEURS NEUTRES

L'objectif de cette première partie de ma thèse de doctorat était de re-synthétiser trois réactivateurs précédemment conçus par la Dr. Anissa Braïki lors de sa thèse au sein de notre équipe et qui présentaient des résultats intermédiaires prometteurs (*in vitro* et/ou *in vivo*), pour poursuivre leur évaluation *in vivo*.

1.1. Etapes de conception des nouveaux réactivateurs neutres

Comme cela a été rappelé dans l'introduction, notre équipe a d'abord sélectionné, parmi la vaste gamme de structures imaginées, la fonction réactivatrice qui présentait les meilleures propriétés. La fonction 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime a été retenue pour plusieurs raisons : le groupe hydroxy permet d'éviter le phénomène de recapture ; ce groupe permet également d'induire un pKa de 8,2 pour l'oxime, proche des valeurs idéales décrites dans la littérature, ce qui permet d'avoir, à pH physiologique, un bon équilibre entre une forme neutre dont le caractère lipophile peut favoriser le passage de la BHE et des formes chargées plus hydrophiles, parmi lesquelles l'azote protoné de la pyridine peut mimer la charge du 2-PAM, tandis que l'oximate est assez nucléophile pour réactiver l'enzyme phosphorylée, ce qui se traduit par de très bonnes constantes de vitesse k_r pour la réactivation, toutes supérieures (jusqu'à 8 fois) à celles du 2-PAM, quelque soit l'OP utilisé.³⁴⁴

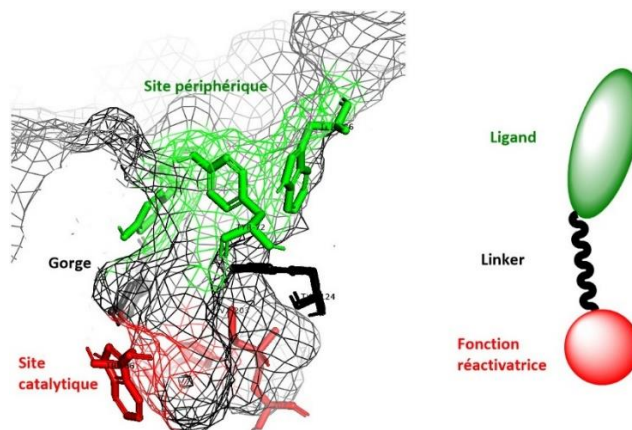


Figure 42 : Schéma simplifié de conception des réactivateurs pour améliorer l'affinité avec le site actif de l'AChE.

Notre équipe s'est ensuite attachée à améliorer l'affinité de ce réactivateur envers l'AChE inhibée par les différents OPs, afin de diminuer la constante de dissociation K_D du complexe de Michaelis-Menten qu'il forme avec l'enzyme phosphorylée juste avant de la réactiver, ce qui améliore son efficacité. En plus de l'affinité, il est aussi indispensable de vérifier que le réactivateur soit bien positionné dans le site actif car, dans la position énergétiquement la plus stable, la fonction oxime n'est pas forcément bien

dirigée vers le phosphore. Pour cela, de nombreuses études d'amarrage moléculaire ont mis en évidence qu'il est favorable de lier à la fonction réactivatrice un ligand pouvant établir des interactions de type cation- π ou π - π avec les résidus aromatiques du site périphérique (**Figure 42**). Les deux motifs doivent aussi être reliés par une chaîne alkyle flexible de 3, 4 ou 5 atomes attachée sur la position 6 du noyau pyridine de la fonction réactivatrice. Il ne faut néanmoins pas que l'affinité devienne trop grande, au risque que le réactivateur devienne un inhibiteur de l'enzyme native. De plus, la structure résultante doit toujours posséder des propriétés physico-chimiques permettant à la fois le passage de la BHE et une bonne hydrosolubilité et biodisponibilité. Or, par exemple, le ligand phenyltétrahydroisoquinoline (PIQ), positionné sur le réactivateur GM113, malgré une bonne affinité, s'est révélé trop lipophile, ce qui limite sa solubilité en milieu aqueux.

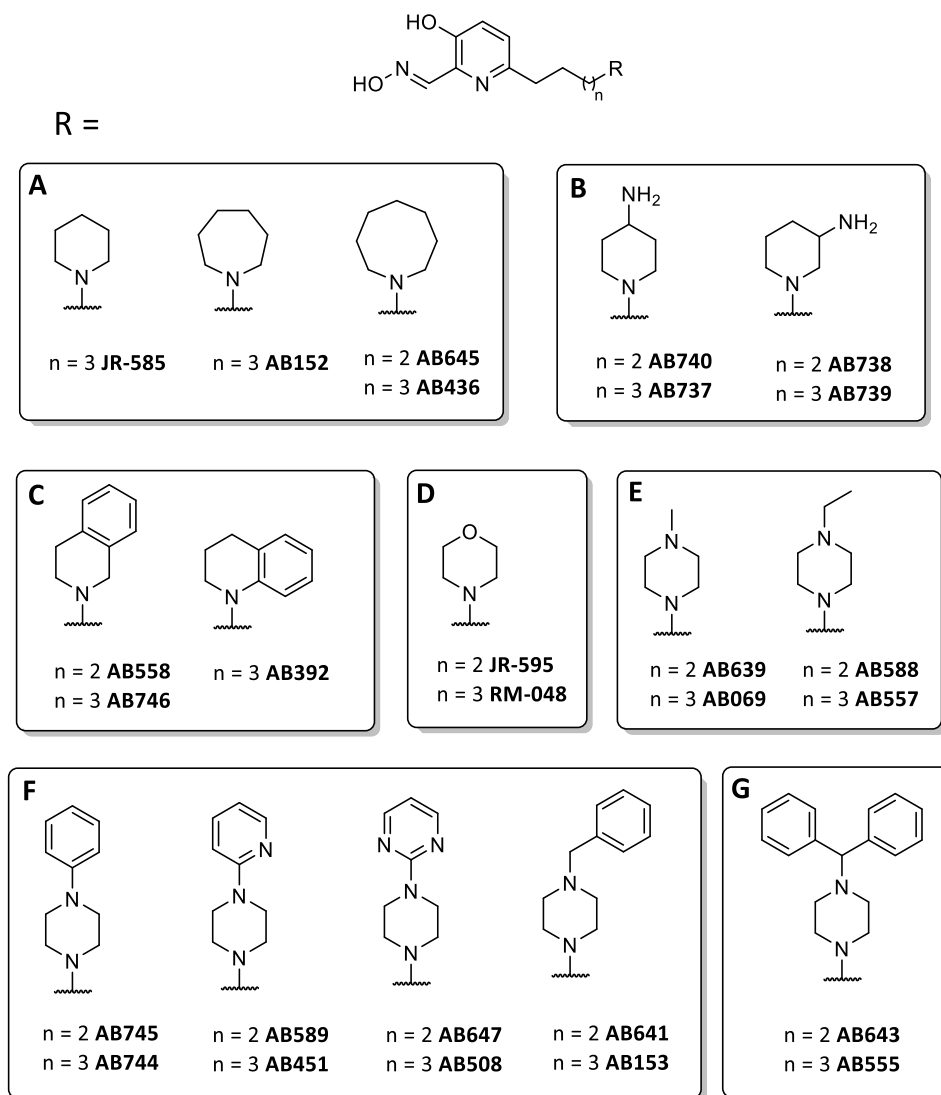


Figure 43 : Structures des réactivateurs incluant un ligand aminé précédemment conçus par notre équipe, en particulier par la Dr. Anissa Braïki lors de sa thèse.

Des amines tertiaires plus simples sont alors apparues plus intéressantes : leur pKa permet d'avoir un équilibre entre formes neutres et chargées à pH physiologique, dotant le réactivateur à la fois d'un caractère hydrophile nécessaire à la solubilisation et un caractère lipophile nécessaire au passage de la BHE. Le logiciel Percepta® a aussi permis de simuler ces propriétés pour opérer une sélection *in silico*.⁴²⁹ Ces outils seront développés dans le chapitre II. De plus, ces ligands basés sur des amines tertiaires (protonées) peuvent avoir des interactions cation- π ou π - π avec les résidus aromatiques du site périphérique ou de la gorge. Enfin, cette fonctionnalisation de la fonction réactivatrice repose sur le même type de suite de réactions chimiques pour chacun des ligands aminés, elle a donc permis à Anissa Braïki, qui m'a précédé au laboratoire, de synthétiser une large librairie de réactivateurs possédant divers ligands aminés : amines cycliques simples, dont la pipéridine (groupe A), pipéridine aminée (B), amines cycliques reposant sur le pharmacophore simplifié des tetrahydroisoquinolines (C), morpholine (D), dilakyle pipérazines (E), aryle pipérazine (F), diaryle pipérazine (G) (**Figure 43**).

1.2. Résultats *in vitro* et sélection

Nos partenaires à l'IRBA ont effectué les mesures de réactivation *in vitro* de ces réactivateurs sur les différents OPs, en utilisant des analogues du sarin, du VX et du tabun,^a qui ont des capacités inhibitrices proches des originaux et forment sur la sérine du site actif des adduits de structure identique : respectivement le NIMP, le NEMP et le NEDPA (**Figure 44**). De plus, ils sont beaucoup moins volatils, permettant une manipulation plus aisée en laboratoire.

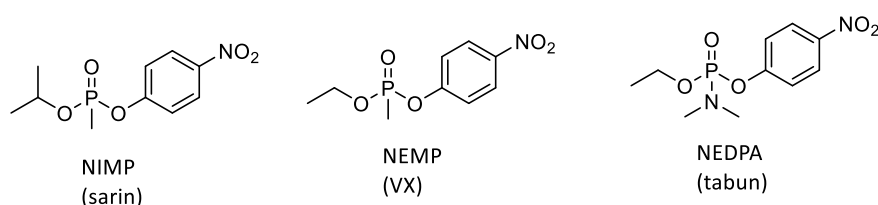


Figure 44 : Structures des analogues de NOPs pour la recherche de contre-mesures médicales.

Les mesures sur RM048, JR595 (morpholine, groupe D) et JR585 ont été faites par l'équipe de Zrinka Kovarik à Zagreb sur les NOPs originaux (**Tableau 10**). Les deux molécules **JR595** et **RM048** ont été sélectionnées pour des tests *in vivo* à une étape moins mûre du projet, où, en plus des constantes de réactivation *in vitro* sur l'AChE, certains paramètres n'étaient pas encore pris en compte (i.e. avant la thèse d'Anissa Braïki), notamment dans les études *in silico*, comme percepta. Le **JR595** avait cependant aussi été sélectionné en prenant en compte ses résultats de réactivation sur la BChE.

a : Ces analogues ont été utilisés par l'IRBA suite au déménagement à Brétigny-sur-Orge en attendant d'avoir à nouveau l'autorisation d'utiliser les vrais OPs.

oxime	K_D (μM)				k_r (min^{-1})				k_{r2} ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)				IC_{50} (μM)
	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	
HI-6	60	170	∞	590	0,33	0,9	∞	0,026	5,74	5,42	∞	0,05	nd
A													
JR585	90	160	110	200	0,17	0,075	0,06	0,07	1,9	0,5	0,03	0,34	630
D													
JR595	300	270	410	850	0,68	0,29	0,016	0,16	2,3	1,1	0,04	0,43	nd
RM048	120	220	310	620	0,57	0,12	0,014	0,27	4,9	0,56	0,045	0,44	683 ^a

Tableau 10 : Résultats de réactivations *in vitro* des réactivateurs incluant un ligand aminé sur l'AChE inhibée par les NOPs originaux et le paraoxon réalisés par l'équipe de Zrinka Kovarik.⁷ a : mesures réalisées par l'équipe de José Dias à l'IRBA.

Or, malgré des résultats *in vitro* sur l'AChE présentant des efficacités de réactivation faibles, excepté pour le VX, le **JR595** et le **RM048** ont démontré des résultats très satisfaisants *in vivo* (paragraphe suivant).⁶ Comme nous l'avons déjà vu, ces deux composés montrent que la corrélation entre les résultats *in vitro* et *in vivo* n'est pas toujours bonne et le choix des paramètres de sélection *in vitro* s'avère donc parfois difficile et peut avoir parfois un caractère partiellement arbitraire.

Afin de compléter les tests *in vivo* déjà réalisés, un des objectifs de cette thèse, parallèlement aux développements des antidotes multi-cibles, a été également de resynthétiser de grandes quantités de **RM048** pour poursuivre son évaluation *in vivo* (**Figure 45**).

Les résultats *in vitro* obtenus pour les autres molécules à l'IRBA (**Tableau 11**) sont prometteurs car la majorité des molécules présentent un large spectre de réactivation avec une efficacité souvent égale ou supérieure au HI-6. De plus, 12 molécules présentent une efficacité de réactivation k_{r2} supérieure ou égale à $10 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ sur l'hAChE phosphorylée par le NEDPA, ce qui en fait des réactivateurs potentiellement très efficaces contre l'intoxication au tabun, dont l'adduit phosphorylé formé avec la sérine est parmi les plus difficiles à réactiver. La pertinence de l'utilisation de ligands aminés se vérifie aussi avec de très bonnes affinités ($K_D < 100 \mu\text{M}$) obtenues par la majorité des réactivateurs des groupes C, E, F et G avec le site actif phosphorylé par les différents OPs. Cela montre notamment l'affinité particulière apportée par le motif pipérazine et par l'ajout de groupements aromatiques. Le cas le plus emblématique étant **AB451** (F, violet) qui présente une efficacité exceptionnelle de réactivation sur tous les OPs grâce à une très forte affinité, K_D étant toujours inférieure à $1 \mu\text{M}$. De plus, malgré cela, son IC_{50} reste à un ordre de grandeur de $10 \mu\text{M}$, qui ne devrait pas poser de problèmes d'inhibition de l'enzyme native, contrairement à **AB436** et **AB153**.

oxime	K_D (μM)				k_r (min^{-1})				k_{r2} ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)				IC_{50} (μM)
	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	
2-PAM	60	205	∅	8,6	0,36	0,76	∅	0,04	6	3,7	∅	4,6	580
HI-6	30	78	nd	28	0,5	1,05	nd	0,024	17	13,5	0,45	0,86	82
A													
AB152	216	69	∅	nd	1,3	0,66	∅	nd	6	9	∅	3	25
AB645	81	33	nd	136	0,7	0,4	nd	1,8	9	12	14	13	13
AB436	392	nd	nd	185	1	nd	nd	1	2	3	9	6	2
B													
AB740	163	13	nd	83	2,6	1,2	nd	2,5	16	9	19	30	73
AB737	688	224	737	257	1,9	0,37	2,6	1,7	3	2	3	7	620
AB738	266	38	732	476	1,1	0,16	4,9	3,4	4	4	7	7	720
AB739	29	7	246	144	0,2	0,1	1	0,67	6	15	4	5	837
C													
AB558	562	129	∅	478	3,34	0,65	∅	7,7	6	5	∅	25	48
AB746	17	20	129	73	0,30	0,2	2,5	2	17	11	19	28	47
AB392	1	8	4	8,2	0,07	0,07	0,11	0,24	72	9	27	29	104
E													
AB639	617	44	247	277	1,9	0,34	2,4	2	3	8	10	7	96
AB069	40	66	∅	49	0,19	0,25	∅	0,09	5	4	∅	2	67
AB588	88	24	77	170	0,26	0,12	1	1	3	5	13	6	296
AB557	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2,3
F													
AB745	43	26	10	161	0,49	0,18	0,47	4,1	11	7	45	25	99
AB744	13	7	nd	52	0,19	0,12	nd	1,2	15	18	8	23	64
AB589	44	23	11	54	0,42	0,19	0,56	1,9	10	8	49	35	23
AB451	0,6	0,2	0,9	0,7	0,13	0,08	0,09	0,14	218	403	107	193	13
AB647	123	127	108	nd	1,22	0,84	3,51	nd	10	7	32	28	44
AB508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB641	23	904	13	184	0,25	1,5	0,3	3,3	11	2	23	18	32
AB153	0,9	76	∅	36	0,06	0,41	∅	0,07	66	5	∅	2	2.6
G													
AB643	14	17	11	6	0,15	0,09	0.6	0,9	11	5	54	150	714
AB555	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 11 : Résultats de réactivations *in vitro* des réactivateurs incluant un ligand aminé sur l'AChE inhibée par les analogues des NOPs et le paraoxon réalisés par l'équipe de José Dias à l'IRBA. Les résultats en rouge indiquent les réactivateurs sélectionnés pour être développés plus avant.

A partir de ces résultats *in vitro* et des résultats *in silico*, une sélection des meilleures molécules de chaque groupe a pu être réalisée pour continuer leur évaluation *in vivo* (en rouge, **Tableau 11** et **tableau 10**) en prenant en compte : leurs résultats d'amarrage moléculaire, le passage de la BHE simulé par Percepta, leur IC_{50} , une réactivation *in vitro* large spectre, et permettant de réactiver 30% de l'AChE en 5 min (voir ci-après). Les sept molécules obtenues étaient : AB647, AB744, AB746, AB739, AB645,

AB745 et AB639 (en rouge dans le tableau 11). Parmi celles-ci, mon objectif était donc de synthétiser au moins 300 μmol de **AB647** et **AB745** pour que leur protection contre les OPs originaux soit évaluée *in vivo* par Guilhem Calas et Anne-Sophie Hanak, chercheurs à l'IRBA (**Figure 45**). A large spectre, ces molécules sont particulièrement efficaces pour réactiver l'AChE inhibée par le tabun et le paraoxon. Les autres molécules devaient être synthétisées par les Dr. Nicolas Probst et Julien Gasnot, post-doctorants dans l'équipe.

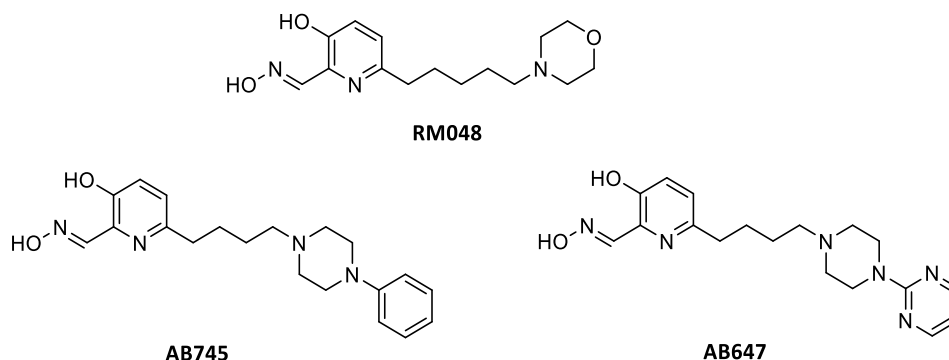


Figure 45 : Structure des trois molécules à synthétiser pour être testées *in vivo*.

Afin d'affiner la sélection des molécules, il est possible de tirer des résultats des tests *in vitro*, en plus des seules constantes de réactivation, un autre outil : la zone d'efficacité thérapeutique. Elle correspond à la capacité d'un réactivateur à réactiver 30% de l'AChE inhibée par un OP en moins de 5 min et à une concentration inférieure ou égale à 100 μM (zone verte en bas à gauche du graphe, **Figure 46**).

Les molécules retenues (dont **AB745** et **AB647**) présentent donc des propriétés leur permettant d'être dans cette zone d'efficacité thérapeutique pour quasiment tous les OPs, au contraire du 2-PAM et du HI-6. L'efficacité de **AB647** et **AB745** se confirme contre le tabun et le paraoxon, elle est en revanche en retrait contre le sarin. Surtout, on remarque que malgré de faibles k_{r2} contre le sarin et le paraoxon, bien inférieures aux constantes des deux autres réactivateurs, le **RM048** a une courbe d'efficacité thérapeutique équivalente. Le tabun reste cependant le point faible de ce réactivateur. Cet outil liant dose et cinétique de réactivation semble donc un complément très pertinent aux valeurs brutes des constantes de la réaction pour mieux prévoir l'effet protecteur *in vivo*.

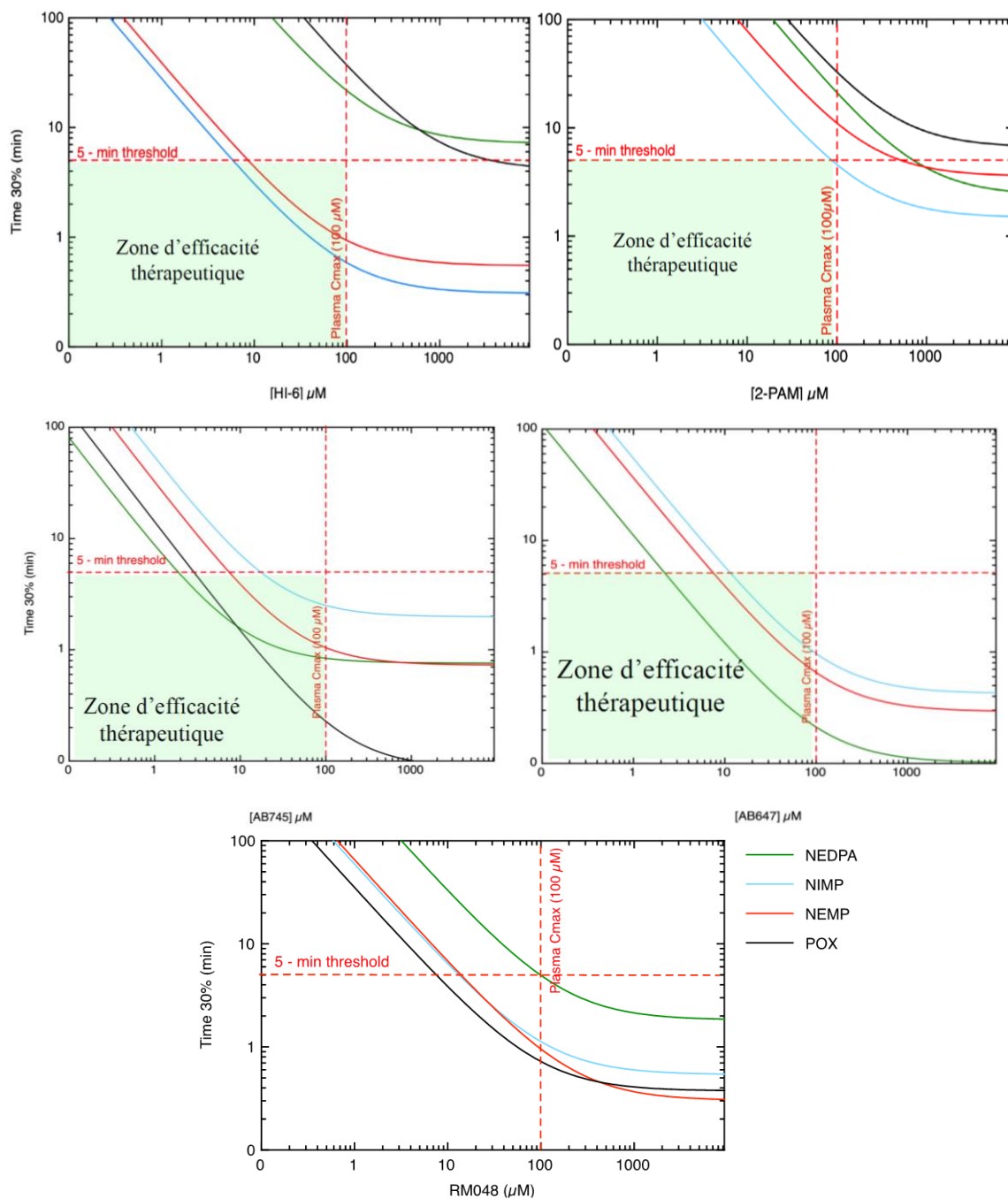


Figure 46 : Durée nécessaire à la réactivation de 30% des AChEs en fonction de la concentration en réactivateur. Pox : paraoxon

1.3. RM048 : résultats *in vivo* partiels

Au début de ma thèse, les premiers résultats *in vivo* du **RM048** présentés ci-après se sont révélés prometteurs et ont motivé la poursuite de son évaluation *in vivo*. Dans un premier temps, nous exposerons la définition de l'indice de protection et des paramètres pharmacocinétiques.

1.3.1. Indices de protection

Pour rappel, la dose létale médiane (DL_{50}) est la dose d'un produit pour laquelle 50% d'une population qui y est exposée meurt et l'indice de protection d'un réactivateur ou d'un cocktail médicamenteux pour un OP donné est défini comme le rapport de la DL_{50} de l'OP avec administration conjointe du réactivateur ou du cocktail médicamenteux sur celle de l'OP seul. Cet indice correspond donc au facteur par lequel la DL_{50} de cet OP est multipliée en présence du réactivateur. Ainsi, plus l'indice est élevé, plus le réactivateur est protecteur.

$$IP = \frac{DL_{50\ OP+antidote}}{DL_{50\ OP}}$$

L'indice de protection a été mesuré pour le RM048 et les oximes de référence par Guilhem Calas et Anne-Sophie Hanak dans le cadre d'intoxications sous-cutanées de souris Swiss mâle par les analogues respectifs du VX et du sarin : le NEMP et le NIMP, ainsi que par le paraoxon. La mesure a été faite pour le réactivateur seul sous forme de sel d'acide méthanesulfonique (mésylate) à 100 $\mu\text{mol/kg}$ ou en combinaison avec de l'atropine à 10 mg/kg injectés par voie intrapéritonéale (**Tableau 12**).

Réactivateur	Sans atropine			Atropine 10 mg/kg		
	NIMP	NEMP	Paraoxon	NIMP	NEMP	Paraoxon
\emptyset	1	1	1	1,7	1,83	2,43
2-PAM	1,07	1,43	2,58	2,04	4,03	4,95
HI-6	2,63	3	1,6	7,03	7,63	4,3
Obidoxime	2,85	2,27	3,79	nd	nd	nd
RM048 MeSO ₃ H	1,27	2,56	6,1	3,87	6,57	14,23

Tableau 12 : Indices de protection du RM048 MeSO₃H et de trois réactivateurs de référence (2-PAM, HI-6 et obidoxime) injectés seuls à la dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ ou en combinaison avec de l'atropine (10 mg/kg) contre une intoxication sous-cutanée par un composé organophosphoré (NIMP, NEMP, paraoxon)(nd = non déterminé).

Le RM048 procure une protection supérieure au 2-PAM pour tous les OPs testés et une protection supérieure à tous les réactivateurs de référence testés pour le paraoxon. Cette protection est cependant inférieure au HI-6 pour le NIMP et légèrement plus faible pour le NEMP. On observe aussi qu'en présence d'atropine, qui apporte par elle-même un effet protecteur, la protection n'est pas cumulative mais synergique : l'effet protecteur des réactivateurs est décuplé. Le RM048 devient très efficace contre l'intoxication au paraoxon. Tous les tests *in vivo* qui ont fait suite à ceux-ci ont été réalisés avec du sulfate d'atropine car, sans atropine, l'intoxication par les agents G originaux en injection sous-cutanée était trop rapide et les réactivateurs seuls, quels qu'ils soient, étaient inefficaces. De plus, cette combinaison thérapeutique mime plus fidèlement le cocktail médicamenteux administré aux patients aujourd'hui. Du point de vue de la protection il fallait donc

tester le RM048 sur les neurotoxiques originaux avec une dose rationalisée de 3 mg/kg de sulfate d'atropine en comparant avec les réactivateurs de référence. De plus, Guilhem Calas voulait comparer l'indice de protection des différents réactivateurs non plus à une dose équimolaire de 100 $\mu\text{mol/kg}$ mais à une dose équitoxique, à savoir leur NOAEL (Non Observed Adverse Effect Level ou dose sans effet nocif observable) qui correspond à la dose maximale de réactivateur qui n'induit pas d'effet nocif. Cette NOAEL permet de mesurer la protection d'un réactivateur à une dose optimisée car elle est maximale tout en étant affranchie de la toxicité intrinsèque du réactivateur, qui peut contrebalancer son efficacité. L'objectif était donc de déterminer la dose NOAEL ainsi que la DL_{50} du RM-048.

1.3.2. Pharmacocinétique

Le **RM-048** a été formulé sous trois formes : neutre, sel de chlorhydrate (RM-048 HCl) et sel de mésylate (RM048 MeSO_3H). Trois paramètres pharmacocinétiques de ces différentes formulations à 100 $\mu\text{mol/kg}$ ont été déterminés sur des souris suivant une méthode développée par Guilhem Calas et présentée dans la publication (Calas, 2017).³⁵¹ Le temps de résidence moyen MRT (mean residence time) dans le plasma, qui doit être le plus long possible, a été déterminé, ainsi que le pourcentage de réactivation maximum $\%_{\text{react max}}$ et la durée t_{max} nécessaire pour atteindre ce pourcentage. Les sels étaient directement dissous, tandis que la forme neutre était dissoute dans du DMSO (1% final) puis dans une solution de crémophor (tensioactif) (10% final) et enfin dans le sérum physiologique.

Réactivateur	MRT (min)	t_{max} (min)	$\%_{\text{react max}}$
2-PAM	31	4,5	51
HI-6	45,1	5,8	117,7
RM048	14	7,5	48,5
RM048 HCl	14,5	6	48,7
RM048 MeSO_3H	20,5	3,5	59,1

Tableau 13 : Paramètres pharmacocinétiques de différents réactivateurs administrés à 100 $\mu\text{mol/kg}$ à une souris par voie intrapéritonéale. 100% de réactivation a été fixé arbitrairement à la réactivation maximale fournie par le HI-6 à 200 μM , une valeur supérieure est donc possible.

Entre la forme neutre et la forme chlorhydrate du **RM048**, il n'y a quasiment pas de différence, si ce n'est une réactivation maximale atteinte plus rapidement (**Tableau 13**). Cependant la formulation sous forme de sel de mésylate apporte un effet favorable significatif en augmentant le pourcentage maximum de réactivation de 10% dans un temps réduit de moitié et en augmentant le temps de résidence moyen de 46%. Malgré tout le HI-6 reste plus de deux fois plus longtemps dans le plasma et la réactivation atteinte au maximum avec ce réactivateur est deux fois plus élevée. Cet effet de la

formulation étant prometteur, mon objectif était de formuler le **RM048** selon ces différents sels et les besoins des biologistes, ainsi qu'avec deux autres sels qu'il nous paraissait intéressant de tester : sel d'hexafluorophosphate (PF_6^-) et sel de bis(trifluorométhylsulfonyl)imide (NTf_2^-). En effet le type de sel peut grandement influencer les propriétés physico-chimiques du composé telles que son hydrosolubilité, son hygroscopie, sa cristallisation et sa forme solide, sa stabilité etc.⁴³⁰ De très nombreux sels sont utilisés en chimie médicinale. Les sels de chlorhydrate et de mésylate utilisés ici représentent respectivement 56,6% et 53,4% des formulations orales de médicament et 4,4% et 3,9% des formulations injectables.⁴³¹ L'effet de la formulation sur la pharmacocinétique a d'ailleurs aussi été observé sur un autre réactivateur du projet ANR CNS Antidotes, le KM297, où les formes neutre et sels de chlorhydrate, mésylate et acétate ont des différences significatives sur le pourcentage de réactivation au fil du temps et sur leur temps de résidence moyen.⁴³²

Un autre élément rendait le RM048 intéressant : il a été montré par deux équipes de recherche, l'équipe de la professeure Marie-Pierre Dehouck de l'Université d'Artois et celle de la professeure Belen Perez de l'Université autonome de Barcelone, que le **RM048** sous forme de base libre neutre pouvait très facilement traverser la barrière hémato-encéphalique. Le test PAMPA réalisé par l'équipe croate donne une perméabilité de $8,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s, largement supérieure à la valeur de $5,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s à partir de laquelle un composé est considéré comme ayant une très bonne capacité de passage à travers la BHE.⁷

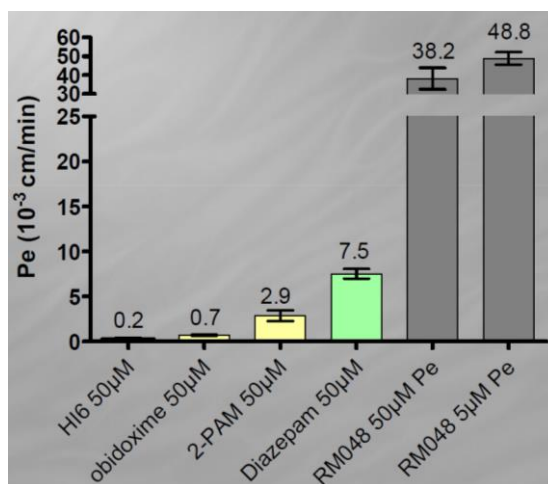


Figure 47 : Coefficient de perméabilité P_e des différents réactivateurs et du diazépam, molécule de référence connue pour bien traverser la BHE, obtenu par test PAMPA sur cultures de cellules endothéliales humaines reproduisant *in vitro* une BHE telle qu'elle peut être *in vivo*.

Dans le test réalisé par l'équipe de M.-P. Dehouck, la vitesse de diffusion P_e des réactivateurs est mesurée à travers des cellules endothéliales cultivées reproduisant une BHE humaine, qui sont

dérivées de cellules souches humaines de sang ombilical. Le **RM048** passe très bien la BHE puisque sa perméation est largement supérieure à celle du diazépam (**Figure 47**), molécule prise comme référence pour le passage de la BHE, et ce, sans effet de concentration. Comme attendu, les réactivateurs de référence passent beaucoup moins bien la BHE.

Enfin, l'équipe de Zrinka Kovarik a montré que le **RM048** était très peu cytotoxique sur des modèles de cellules neuronales et d'astrocyte *in vitro* avec des IC₅₀ supérieures à 800 µM.⁶

1.4. Objectif

Tous ces résultats positifs font du **RM048** un des réactivateurs phare pour notre équipe. Je devais donc synthétiser en grande quantité du **RM048** et le formuler suivant les besoins sous forme de sel de chlorhydrate ou de mésylate, ainsi que de PF₆⁻ et de NTf₂⁻. Cela doit permettre de déterminer la NOAEL du RM048, sa DL₅₀, les indices de protection et sa pharmacocinétique.

Je devais aussi synthétiser au moins 300 µmol de **AB647** et **AB745** et les formuler sous forme de sel de trifluoroacétate (TFA), forme choisie précédemment par Anissa Braïki pour les mesures *in vitro*, pour déterminer leurs indices de protection.

Ces travaux se faisaient dans le cadre du projet ANR CNS Antidote impliquant notre équipe, celle de l'IRBA, celle de la Pr. M.-P. Dehouck à l'Université d'Artois (Laboratoire de la BHE) et celle du Dr. Rachid Baati à l'Université de Strasbourg.

2. SYNTHÈSE

2.1. Rétrosynthèse

La voie de synthèse suivie pour préparer ces trois composés a été développée par le Dr. Nicolas Probst, postdoctorant impliqué dans le projet CNS-Antidote, et a déjà été présentée dans la littérature pour la synthèse du **JR595**.⁶ Elle diffère de la synthèse développée par Anissa Braïki par la nature et l'ordre des étapes de protection et déprotection au cours de la synthèse sur les groupes phénol et aldéhyde du noyau pyridine.³⁴⁸ Ici, la fonction phénol de **7** est protégée sous forme d'éther benzylique et l'aldéhyde sous forme d'acétal pour l'intermédiaire **8** qui est l'intermédiaire-clé commun à toutes les préparations des réactivateurs conçus au laboratoire (**Schéma 7**). La voie de synthèse utilisée précédemment nécessitait également la protection de la fonction phénol sous forme d'éther benzylique, mais

impliquait aussi la transformation d'un ester méthylique en aldéhyde lors des dernières étapes de synthèse, nécessitant ainsi une série d'étapes de protection/déprotection tardive. Ainsi, bien que les deux voies de synthèse comportent le même nombre d'étape (9 ou 10), la synthèse de chaque produit final nécessitait précédemment 6 ou 7 étapes à partir de l'intermédiaire clé, tandis que cette nouvelle voie n'implique plus que 4 ou 5 étapes à partir de l'intermédiaire clé **8**. Cette fonctionnalisation plus tardive constitue l'avantage essentiel de cette nouvelle voie pour synthétiser une large gamme de réactivateurs comportant des ligands variés.

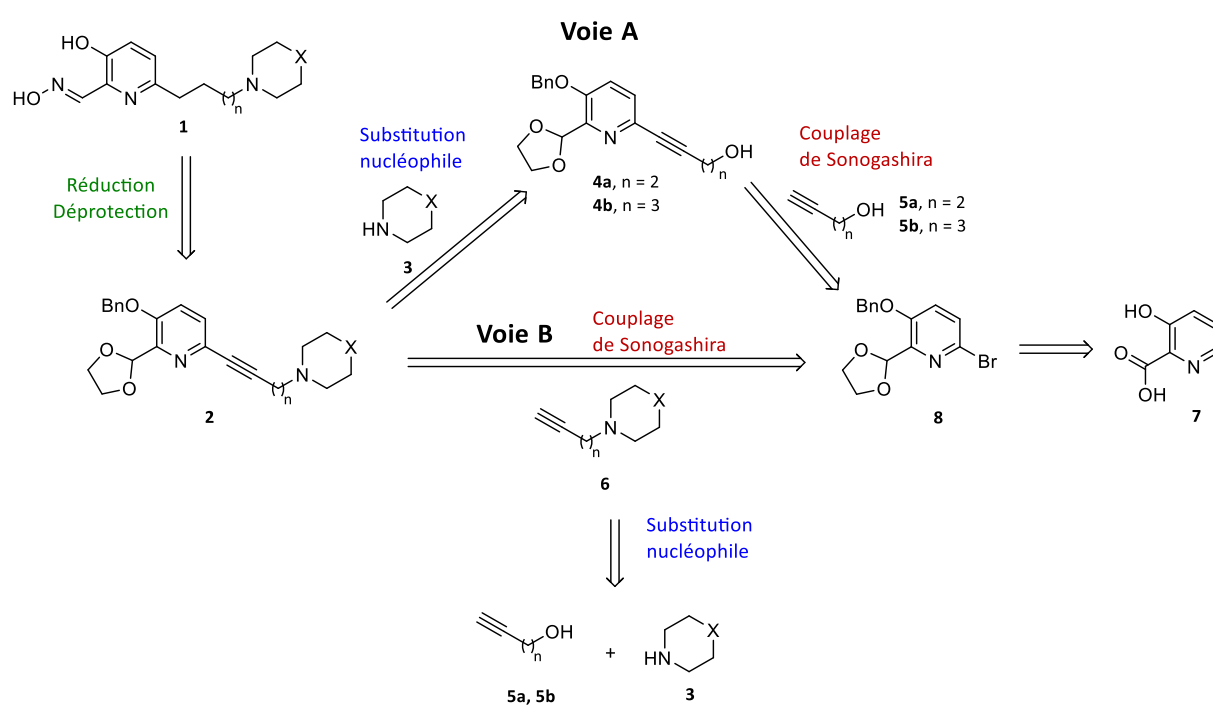
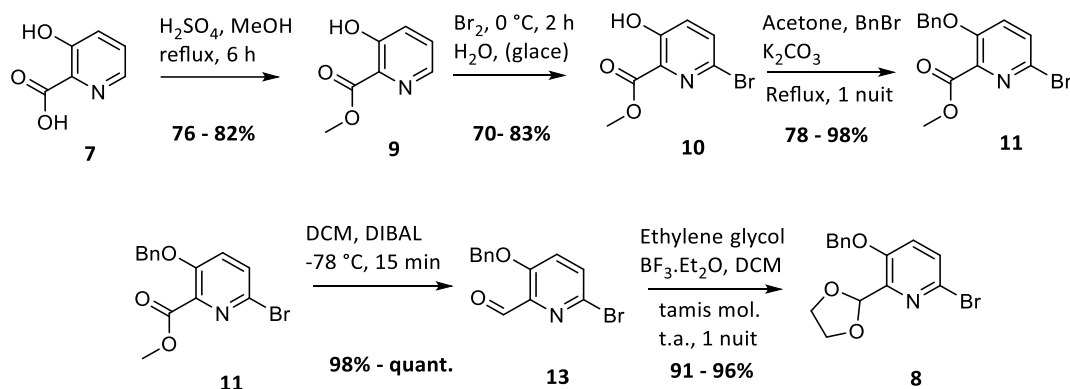


Schéma 7 : schéma de rétrosynthèse des réactivateurs RM048, AB647 et AB745.

Afin d'obtenir la structure finale des réactivateurs, deux voies de synthèses peuvent être proposées. La voie A qui consiste à réaliser une réaction de couplage de Sonogashira entre la pyridine bromée **8** et le butyn-1-ol **5a** ou pentyn-1-ol **5b**, suivie d'une réaction de substitution nucléophile avec l'amine secondaire **3** après avoir converti l'alcool des composés **4a** ou **4b** en groupe partant. Cette voie a été utilisée pour la synthèse du **RM048** et de l'**AB745**. La voie B – plus convergente – consiste en une réaction de couplage de Sonogashira entre la pyridine **8** et l'alcyne **6**, ce dernier étant préparé par substitution nucléophile entre l'amine secondaire **3** et le pentyn-1-ol ou du butyn-1-ol. Cette seconde alternative a été utilisée pour la synthèse d'**AB647**.

2.2. Synthèse de l'intermédiaire **8**

L'intermédiaire de synthèse **8** est un intermédiaire clé pour la synthèse de ces trois réactivateurs mais aussi pour celle des réactivateurs des chapitres II et III. Il a donc été synthétisé plusieurs fois en très grande quantité selon un protocole qui avait précédemment été optimisé. Au cours de ma thèse, trois lots du composé **8** de respectivement 13,3, 15,1 et 22,2 g ont donc été obtenus en 5 étapes avec un rendement global de 46 à 51%, à partir de l'acide 3-hydroxy picolinique **7**, qui a un prix d'environ 105 euros pour 25 g chez le fournisseur Fluorochem (**Schéma 8**). L'avantage de cette voie synthétique est que, sur les 5 étapes de synthèse, seule l'étape de benzylation du composé **10** nécessite une purification sur colonne de silice, qui se révèle de surcroît simple car elle consiste à séparer le bromure de benzyle en excès du produit final **11**, qui ont des polarités nettement distinctes. Pour les autres étapes, le produit obtenu est suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante sans purification.



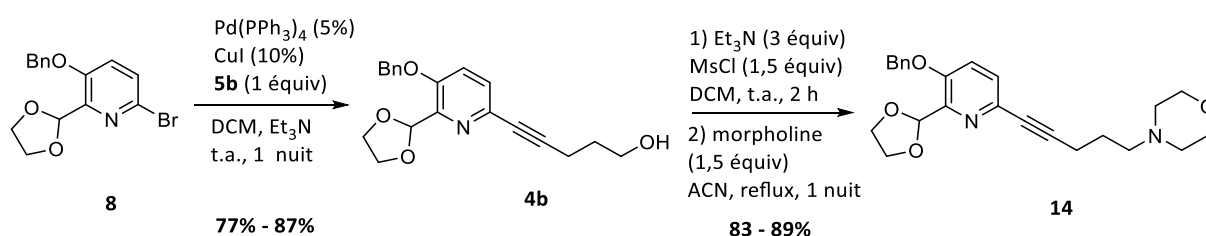
Schema 8 : Synthèse en 5 étapes de l'intermédiaire clé de la synthèse des réactivateurs RM048, AB647 et AB745.

L'estérification de l'acide 3-hydroxy picolinique **7** en condition acide a été réalisée avec de bons rendements autour de 80%, en prenant la précaution de neutraliser lentement la solution aqueuse avec du NaHCO_3 jusqu'à atteindre un pH de 8,4 pour pouvoir extraire efficacement l'ester méthylique **9** avec du dichlorométhane (DCM). Le protocole de l'étape suivante de bromation avait précédemment nécessité une optimisation pour éviter la formation du produit secondaire di-bromé en positions 4 et 6. L'addition de 1,2 équivalent de dibrome se fait donc en 4 ajouts espacés de 30 min dans la solution aqueuse refroidie par un bain de glace et contenant elle-même de la glace pour garder la température du milieu réactionnel à 0 °C de façon optimale, ainsi que pour faciliter la réaction sous l'effet de l'agitation, car le dibrome Br_2 est peu soluble dans l'eau. De cette façon seul le produit mono-bromé a été obtenu. Après benzylation quasi quantitative du phénol **10** en présence de bromure de benzyle en condition basique (K_2CO_3), l'ester **11** obtenu a été réduit quantitativement par 2 équivalents de DIBAL (hydrure de diisobutylaluminium) à -78 °C en seulement 15 minutes pour éviter toute réduction

supplémentaire. Le DIBAL est neutralisé par du méthanol ajouté à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, suivi de l'addition de solution de NaOH aqueuse à 1 M. Enfin, la protection de l'aldéhyde **13** en acétal a été réalisée aussi avec de très bons rendements, en présence d'éthylène glycol et de l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en conditions anhydres. Le grand nombre d'équivalents d'éthylène glycol nécessite en revanche de nombreux lavages aqueux et un séchage intensif sous pression réduite. Le composé **8** est donc obtenu en grandes quantités sur 5 étapes avec un rendement global de 46 à 51%.

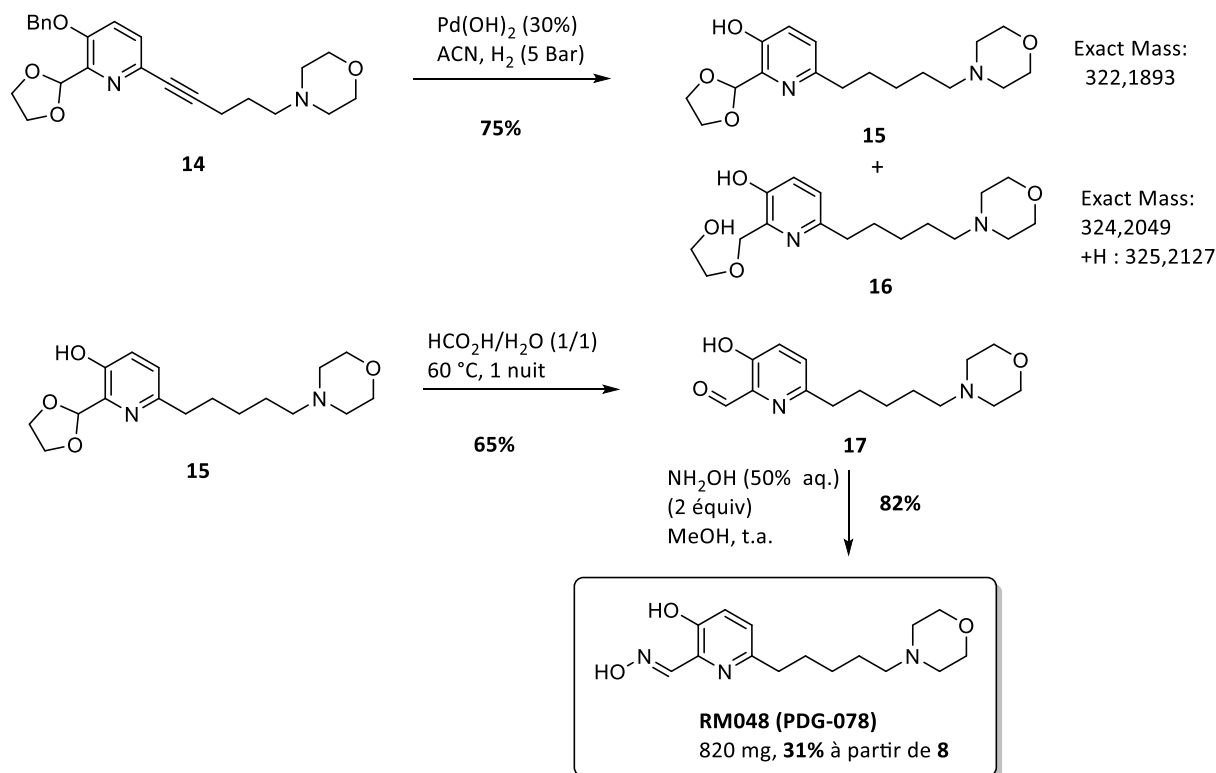
2.3. Synthèse du RM048

La synthèse du RM-048 débute par le couplage pallado-catalysé de Sonogashira entre le pentyn-1-ol et la pyridine bromée **8** (Schéma 9). L'utilisation du catalyseur tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) nécessite de faire la réaction à l'abri de la lumière et sous argon. La solution est préalablement dégazée par un bullage d'argon pendant 15 min pour éviter la potentielle formation du produit secondaire issu de l'homocouplage de Glaser. Ces conditions ont été utilisées pour tous les couplages de Sonogashira réalisés lors de cette thèse. La purification, qui avait été réalisée dans un premier temps selon un gradient EP/AcOEt (éther de pétrole/acétate d'éthyle) 1/1 \rightarrow 0/1, a ensuite été changée en utilisant un gradient DCM/MeOH 1/0 \rightarrow 95/5, qui donne une meilleure séparation des impuretés en moins de temps. Le produit de couplage **4b** a été obtenu avec de bons rendements, autour de 80%.



Schema 9 : Les deux premières étapes de la synthèse de RM048.

L'ajout du motif morpholine se fait ensuite en deux étapes successives : d'abord l'activation de l'alcool sous forme de mésylate, directement utilisé après un lavage aqueux, puis la substitution nucléophile de la morpholine sur celui-ci à reflux dans l'ACN. Là encore les rendements sont très bons et peu de produits secondaires sont observés par chromatographie sur couche mince (CCM). La diminution de la polarité de **14** rend de nouveau favorable l'utilisation d'un éluant EP/AcOEt pour le purifier par chromatographie sur gel de silice.



Schema 10 : Dernières étapes de synthèse du RM048.

L'étape suivante de la synthèse est avantageuse car elle permet de réaliser simultanément la réduction de l'alcyne en alcane correspondant ainsi que l'hydrogénolyse de l'éther benzylique (**Schéma 10**). Cependant cette hydrogénolyse peut provoquer l'apparition d'un produit secondaire qui sera observée pour plusieurs autres synthèses de réactivateurs faisant aussi appel à cette réaction.

En effet, la première hydrogénolyse réalisée sur le composé **14** a été faite avec $\text{Pd}(\text{OH})_2$ et H_2 à pression atmosphérique durant 19 h. Bien que l'analyse du spectre RMN du brut réactionnel semblait satisfaisante et correspondre au produit **15** attendu, la réaction suivante consistant à déprotéger l'aldéhyde n'a pas permis d'obtenir le produit déprotégé **17**. La purification à cette étape a au contraire permis d'isoler un produit majoritaire qui s'est révélé être le produit secondaire **16**, contenant l'alcool correspondant à l'ouverture de l'acétal. L'analyse RMN confirme cette hypothèse ainsi que l'analyse du produit par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) qui indique un produit correspondant à un pic m/z à 325,2136. La durée de l'hydrogénolyse a donc dû être trop longue, laissant le temps à ce produit de se former ; la durée de cette réaction d'hydrogénation a donc été réduite à 2h – 2h30, tout en réalisant la réaction sous 5 bar de pression de H_2 pour accélérer la réaction. Cette stratégie est assez efficace puisqu'un rendement de 75% a été obtenu. Il s'avère cependant difficile de déterminer le bon moment pour arrêter la réaction, entre la conversion optimale du produit de départ et l'apparition du composé **16**, d'autant que le suivi CCM est plus difficile à réaliser avec un réacteur sous

pression. Pour obtenir le rendement mentionné il a ainsi fallu remettre sous hydrogénolyse une fraction de mélange obtenue après purification car elle contenait encore du produit de départ.

La déprotection de l'acétal se fait ensuite dans une solution 1/1 d'acide formique et d'eau. Plusieurs essais (notamment pour la synthèse de l'**AB745**) ont montré que 60 °C était une température de réaction suffisante pour obtenir une conversion complète sans conduire à des produits de dégradation. De plus, le suivi CCM étant quasiment impossible (un co-spot du produit de départ avec de l'acide formique comparé au mélange réactionnel n'étant pas concluant), nous avons aussi conclu qu'une nuit était une durée suffisante pour avoir une conversion totale. La solution est ensuite doucement neutralisée par NaHCO₃ pour être extraite et purifiée par chromatographie sur gel de silice. La concentration sous vide du produit doit cependant se faire rapidement, en dessous de 30 °C, car tous les aldéhydes de ce type (chapitres I et II) noircissent à la chaleur. L'aldéhyde **17** a ainsi été obtenu avec un rendement de 65% et a été converti en quelques heures en l'oxime correspondante en présence de 2 équivalents d'hydroxylamine aqueuse dans le méthanol. Après purification sur gel de silice avec un gradient DCM/MeOH 100/0 -> 95/5, 820 mg de **RM048** ont été obtenus sous forme d'un solide blanc avec un rendement global de 31% sur 5 étapes à partir de l'intermédiaire **8**. Malgré quelques difficultés, cette synthèse est donc efficace et permet la synthèse de grandes quantités de produit à l'échelle du gramme.

Par comparaison, la synthèse employée par Anissa Braïki permettait d'obtenir le réactivateur désiré avec un rendement global d'environ 20% à partir de l'acide 3-hydroxy picolinique **7**, tandis que cette synthèse incluant une fonctionnalisation plus tardive, a permis de préparer **RM048** avec un rendement global similaire de 16%.

2.4. Synthèse du **AB745**

La synthèse de l'**AB745** suit les mêmes étapes que pour **RM048**. Le couplage de Sonogashira entre l'intermédiaire **8** et le butyn-1-ol est ainsi aussi efficace qu'avec le pentyn-1-ol pour obtenir le produit de couplage **4a**, avec de très bons rendements, supérieurs à 80% (**Schéma 11**).

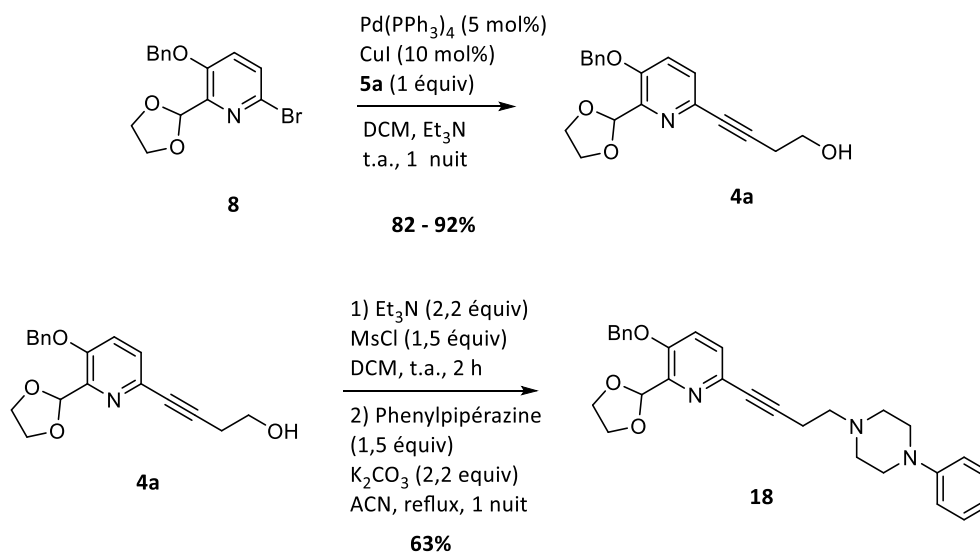
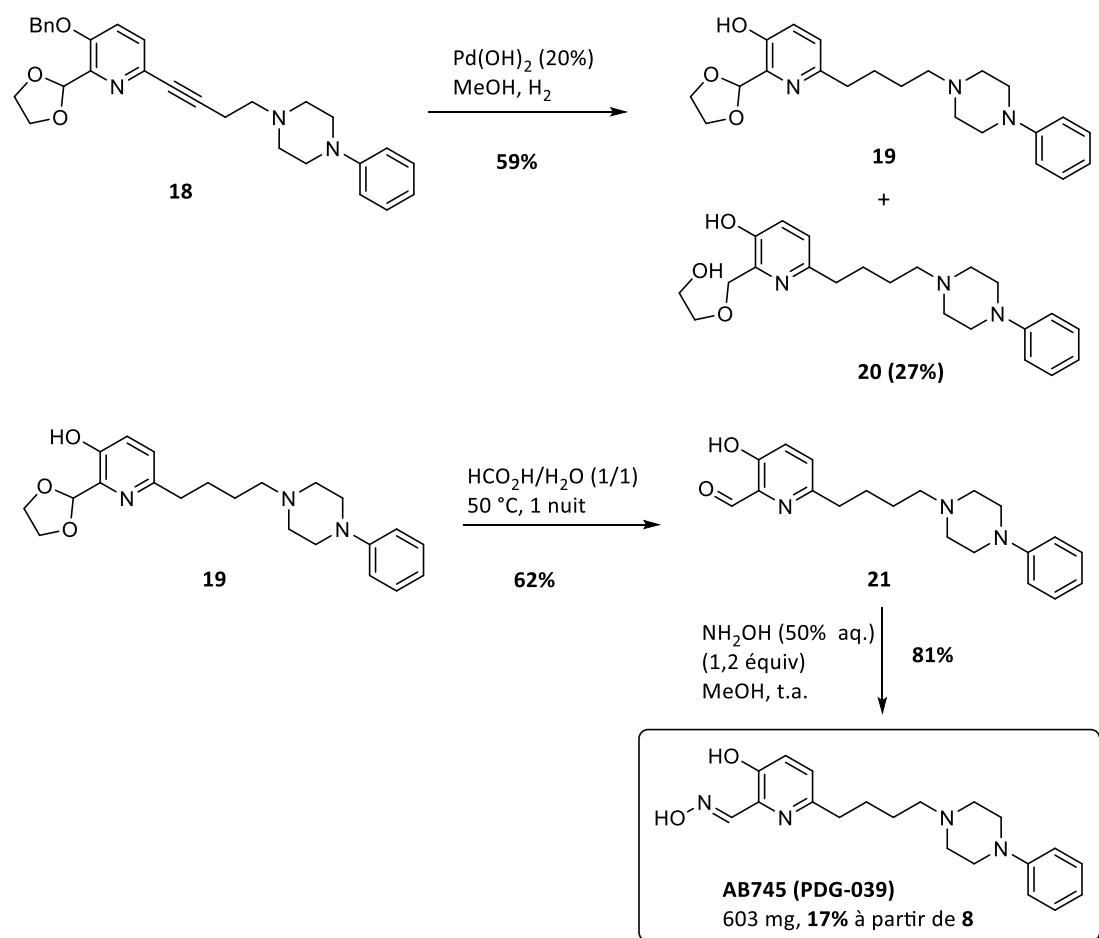


Schéma 11 : Premières étapes de la synthèse de AB745.

Cependant, l'étape suivante de substitution nucléophile de la phénylpipérazine sur l'alcool activé sous forme de mésylate est plus délicate, le mésylate et l'amine finale étant beaucoup plus sujet à une élimination suivie de la formation d'un alcène terminal sur cette chaîne à 4 carbones, grâce à la conjugaison stabilisante avec l'alcyne en position β . Or la formation d'un produit secondaire présentant une polarité proche du produit désiré **18** a été observée. Une chromatographie flash sur colonne de silice utilisant un gradient AcOEt/EP 0/10 \rightarrow 65/35 n'a pas permis de séparer les produits et l'analyse de spectre RMN montrait une impureté présentant un système de doublets de doublets entre 5,5 et 6,0 ppm, qui peuvent correspondre aux signaux des protons portés par l'alcène de ce produit d'élimination. En considérant la présence de cette impureté, le rendement de la réaction de substitution nucléophile peut être ramené à 63%.

Le rendement global de la synthèse pourrait être amélioré si l'amine était directement greffée sur le pentynol en amont de la réaction de Sonogashira (voie B **Schéma 7**), forts de cette expérience, c'est cette stratégie que nous avons suivie pour la synthèse de **AB647**.



Schema 12 : Dernières étapes de synthèse de AB745.

La réaction d'hydrogénation et d'hydrogénolyse de **18** utilisant $\text{Pd}(\text{OH})_2$ à 20% molaire sous H_2 à pression atmosphérique s'est ensuite révélée très lente (**Schéma 12**). Le suivi CCM était de plus assez difficile car les rapports frontaux des produits de départ et d'arrivée sont proches et que la tâche de ce dernier peut se dédoubler à l'élution et peut donc se confondre avec un reste de produit de départ, comme l'a vérifié l'analyse des pics m/z de chaque tâche CCM par TLC-MS. Celle-ci a permis de montrer que la conversion était totale au bout de 9 jours, mais un suivi RMN aurait pu être plus efficace. Malheureusement, avec une telle durée de réaction, le même produit secondaire que dans la synthèse de **RM048**, résultant de l'ouverture de l'acétal (**20**), a eu le temps de se former simultanément au produit désiré **19**. La séparation par chromatographie flash sur gel de silice a été délicate mais a permis de montrer que 27% du composé **20** avait été formé, contre 59% pour le composé désiré **19**. L'hydrogénolyse de l'éther benzylique et la réduction de l'alcyne sous pression utilisée pour **RM048** pourrait donc être envisagée, mais la quantité de produit obtenue étant suffisante, la réaction n'a pas eu à être répétée.

La configuration spatiale de l'azote de la pyridine et de l'acétal adjacent, ainsi que l'ouverture de l'acétal observée à cette étape pour toutes ces synthèses, laissent penser que l'azote de la pyridine et l'un des atomes d'oxygène de l'acétal soient impliqués dans la complexation du palladium durant la réaction. La comparaison avec les résultats d'Anissa Braïki semble confirmer cette hypothèse car la réaction d'hydrogénolyse fournissait des rendements quantitatifs et se faisait sur les mêmes substrats, excepté l'acétal qui était alors remplacé par un ester méthylique. Cette complexation expliquerait donc la relative difficulté de cette réaction sur ce type de substrat. De plus la cinétique plus lente de la réaction sur **18** par rapport à **14** (**Schéma 10**), qui s'est aussi vérifiée sur **23** (**Schéma 14**), pourrait s'expliquer par une participation notable du motif pipérazine à la complexation du palladium.

Ensuite, la déprotection de l'acétal a été réalisée à une température (50 °C) légèrement inférieure à celle de la synthèse du **RM048** (60 °C), et ceci afin de limiter au maximum l'apparition de produits de dégradation. Le résultat montre que des rendements similaires (65% pour **RM048** et 62% pour **AB745**) sont obtenus à cette température. Cependant, l'extraction a aussi été particulièrement difficile : lors de la neutralisation de la solution acide le produit a précipité sous forme de solide marron qui était très peu soluble dans la phase organique. De multiples extractions avec du DCM et du chloroforme (CHCl₃) ont donc été nécessaires.

Enfin, comme pour la majorité des synthèses de cette thèse, la réaction de formation de l'oxime à partir de l'aldéhyde **21** a été réalisée avec une très bonne conversion. En revanche une impureté jaune avec une polarité extrêmement proche de **AB745** a nécessité deux purifications successives avec un gradient DCM/MeOH 100/0 -> 95/5 pour en être débarassé. Finalement, les fractions récupérées ont représenté un rendement de 81%, ce qui a permis d'obtenir 603 mg de **AB745** sous forme de solide blanc à partir de l'intermédiaire **8** en 5 étapes avec un rendement global de 17%.

Pour comparaison, la voie de synthèse utilisée par Anissa Braïki a permis d'obtenir le produit désiré avec un rendement global de 10% en 9 étapes, tandis qu'il a été obtenu ici avec un rendement global similaire de 9% sur 10 étapes. En ramenant également cette voie de synthèse à 9 étapes grâce à la voie B (**Schéma 7**) et en optimisant les étapes d'hydrogénolyse/réduction et de déprotection de l'acétal de façon similaire à la synthèse de **RM048**, cette synthèse devrait être plus efficace pour obtenir de grandes quantités du produit.

2.5. Synthèse du **AB647**

Compte tenu de la réaction d'élimination du mésylate observée pour **AB745**, la synthèse de **AB647** a été réalisée selon la voie B, plus convergente que celle utilisée pour les deux précédents réactivateurs (voie A) (**Schéma 13**).

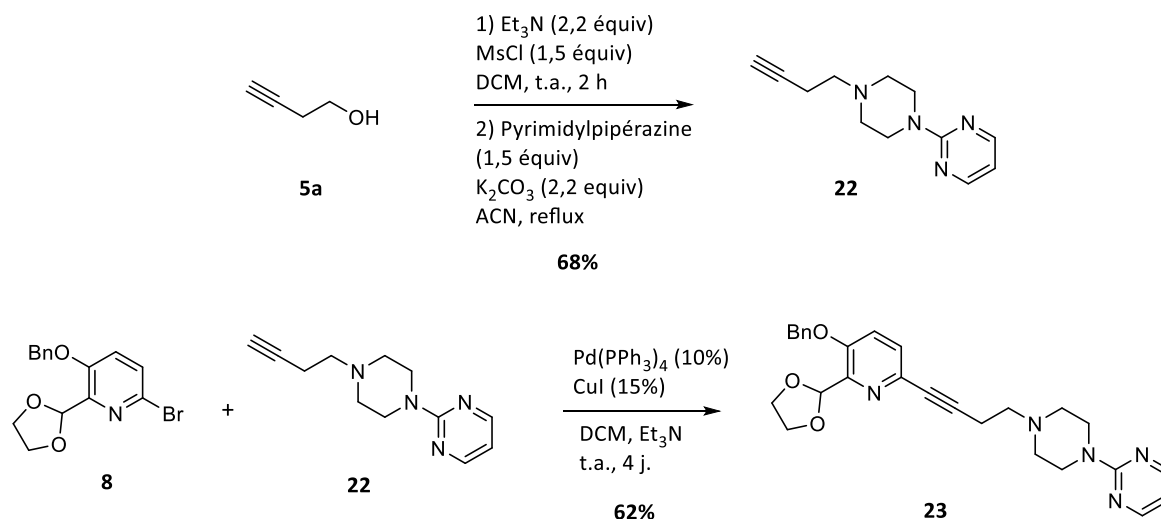
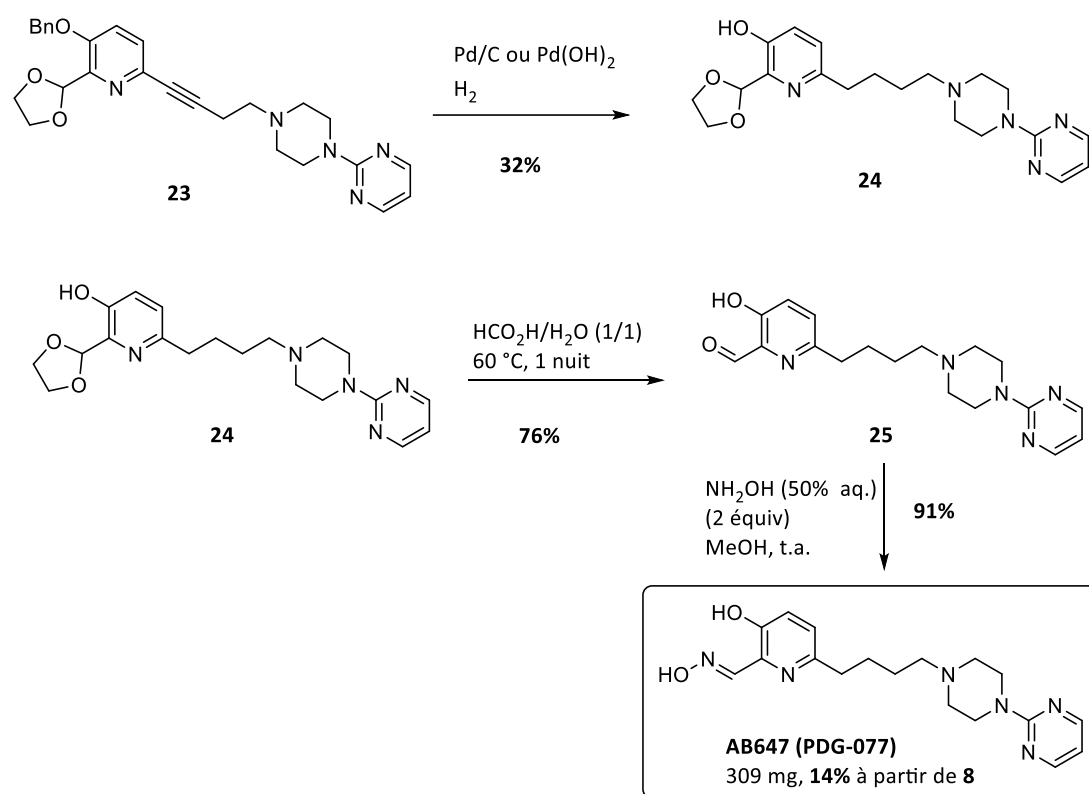


Schéma 13 : Premières étapes de la synthèse de AB647.

La première étape consistait donc en la substitution nucléophile de la 1-(2-pyrimidyl)pipérazine sur le mésylate du butyn-1-ol **5a**. Le rendement modeste de 68% obtenu pour cette réaction peut s'expliquer par la réaction d'élimination, comme expliquée précédemment, et par une évaporation importante du solvant due à une fuite dans le montage. Après purification par chromatographie flash, l'alcyne fonctionnalisé **22** a été engagé dans une réaction de couplage de Sonogashira avec la bromo pyridine **8**. Nous préparons nous-même le catalyseur Pd(PPh₃)₄ à partir de PdCl₂ et le conservons à -20 °C à l'abri de la lumière sous argon car ce composé se dégrade relativement vite. Malgré cela, la qualité des stocks baisse au fil du temps, le produit passant de jaune clair brillant à orange. L'utilisation d'un lot plus ancien a donc rendu la réaction moins efficace pour cette étape et a nécessité de rajouter 5% molaire de Pd(PPh₃)₄ ainsi que de CuI, et de rallonger la réaction de 3 jours, pour obtenir finalement le produit de couplage **23** avec 62% de rendement.

L'étape limitante de cette synthèse est l'hydrogénolyse/réduction, qui a été encore plus délicate que pour **AB745**. Différents lots de **23** (**Schéma 14**) ont été soumis à différentes conditions : 20 mol% de Pd/C avec 5 équivalents d'acide acétique (pour augmenter son efficacité et peut-être réduire le potentiel pouvoir complexant de la pipérazine ou de la pyridine en la protonant), pendant 4 heures, ou bien 20 mol% de Pd(OH)₂ pendant 20 h sous pression atmosphérique de H₂. Après filtration sur

célite, seule la réduction de l'alcyne a pu être observée, l'éther de benzyle n'ayant pas été touché. Des conditions sous pression, soit 20 mol% de Pd(OH)₂ sous 8 bars de dihydrogène pendant 24 h, soit 40 mol% de Pd(OH)₂ sous 15 bars durant 43 h, n'ont pas permis d'obtenir des quantités significatives du produit déprotégé, selon l'analyse du spectre RMN du brut réactionnel. Une partie de ce brut a été soumis à 10 bars de H₂ durant 24 h avec 30 mol% de Pd/C, sans amélioration notable. Finalement, tous les lots ont été rassemblés pour subir une dernière hydrogénolyse à 3 bar de pression toute une nuit avant d'être purifié pour obtenir le produit débenzylé **24** avec seulement 32% de rendement.



Schema 14 : Dernières étapes de la synthèse de AB647.

La déprotection de l'aldéhyde dans le mélange eau/acide formique a en revanche été réalisée avec un rendement de 76%. L'extraction a été moins difficile que pour **AB745** mais l'utilisation d'un mélange DCM/AcOEt 4/1 (v/v) a semblé nécessaire pour augmenter la solubilité du produit. Enfin, la formation de l'oxime sur cet aldéhyde s'est faite avec un très bon rendement de 91% après purification par chromatographie sur gel de silice par un gradient DCM/MeOH 100/0 -> 95/5. 309 mg de **AB647** ont donc été obtenus sous forme d'un solide blanc en 4 étapes à partir de l'intermédiaire **8** avec un rendement global de 14%. En considérant l'étape fortement limitante de l'hydrogénolyse/réduction, la voie convergente choisie s'est avérée un choix avantageux.

La synthèse employée par Anissa Braïki permettait d'obtenir le réactivateur en 10 étapes avec un rendement global d'environ 8% à partir de l'acide 3-hydroxy picolinique de départ (mais n'est pas tout à fait représentatif du fait de la perte de matière à une des étapes par la casse d'un ballon) tandis que cette synthèse le fournit avec un rendement global similaire de 7% sur 9 étapes. L'optimisation de l'étape limitante d'hydrogénéolyse rendrait cette voie plus avantageuse, outre la fonctionnalisation plus tardive qu'elle permet.

2.6. Purification et formulation

2.6.1. Ancienne et nouvelle méthode

Avant d'être envoyés aux biologistes de l'IRBA, ces réactivateurs devaient être formulés sous forme de sels pour augmenter leur solubilité et devaient avoir présenté une pureté d'au moins 95% par analyse HPLC. Pour effectuer une bonne comparaison, AB745 et AB647 devaient être formulés pour les tests *in vivo* sous forme de sel de trifluoroacétate qui était la formulation utilisée par Anissa Braïki pour les tests *in vitro*. Pour obtenir ces sels la méthode précédente consistait à purifier les produits finaux par chromatographie flash automatique, en phase inverse, avec une phase mobile TFA 0.1% aq./ACN puis de vérifier, après lyophilisation, le nombre d'équivalents de TFA liés au produit par analyse élémentaire. La pureté était vérifiée par analyse HPLC en phase inverse avec pour phase mobile ACN/TFA 0,1% aq. avec détection UV à la longueur d'onde d'absorbance maximale (max plot).

Cependant cette méthode n'était en pratique plus possible au laboratoire, notamment la phase mobile composée de TFA à 0,1% qui détériorait trop rapidement les phases stationnaires des colonnes disponibles au laboratoire en raison du pH trop bas, autour de 2. De plus il était difficile d'obtenir des analyses élémentaires correctes en raison des propriétés hydrophiles de ces sels de trifluoroacétates et des différents sites de protonation présents sur les molécules, afin de donner la composition exacte des échantillons envoyés à l'IRBA. Le dosage acido-basique avait aussi été envisagé comme alternative pour mesurer la quantité d'acide ajoutée, mais le pKa des amines étant très proches de ceux de l'oxime ou du phénol, un seul saut de pH était observable, duquel il n'était pas possible d'en déduire les informations voulues.

Pour ces différentes raisons il nous semblait plus précis de faire la formulation sur un produit déjà pur en ajoutant de façon précise le nombre d'équivalents d'acide souhaité avec le produit en solution. Après évaporation dans un vial taré, la différence de masse permet une vérification approximative du nombre d'équivalents ajoutés. La pureté du produit est ensuite revérifiée par analyse LC/MS avec détection UV, généralement aux longueurs d'onde de 230, 254 et 270 nm, les spectres d'absorption

des différents pics étant en outre disponibles si besoin. Pour les sels d'autres acides que le TFA utilisés sur les autres produits finaux, la même méthode est utilisée, excepté pour les contre-ions PF_6^- et NTf_2^- utilisés sur des sels de **RM048**, faisant appel à une métathèse ionique.

Pour **AB647** et **AB745**, pour effectuer une seconde vérification plus précise du nombre d'équivalents de trifluoroacétates ajoutés, nous avons aussi réalisé une courbe d'étalonnage quantitative de la concentration en groupe CF_3 (avec le produit de qualité HPLC dichlorobenzotrifluorure) en fonction de l'intégration du pic correspondant en RMN du fluor (voir protocole en partie expérimentale).

Néanmoins la mise au point d'une formulation et d'une purification sûres et fiables se sont heurtées au début de la thèse à de sérieuses difficultés sur les premiers produits synthétisés, dont **AB745**.

2.6.1. Difficultés de purification et d'analyse de la pureté

La vérification de la pureté des premiers sels de TFA du composé **AB745** ont révélé plusieurs pics secondaires en HPLC analytique utilisant pour phase mobile de l'acétonitrile en mélange avec soit de l'acide formique à 0,1 ou 0,2%, soit de l'acétate d'ammonium à 20 mM, et la détection UV. Si certains pics pouvaient être de véritables impuretés présentes dans le produit, il ne nous est apparu que tardivement que les pics les plus importants étaient aussi le produit désiré, présent soit dans un état de protonation différent, soit avec un contre-ion différent du pic majoritaire, ce qui change son temps de rétention. En effet, l'acide formique comme l'acétate d'ammonium, quelque soit leur concentration, ne permettent pas de fournir le produit sous une seule forme et de remplacer totalement le TFA, notamment à cause d'un pH trop élevé.

Mais dans un premier temps, croyant que la pureté n'était pas suffisante par purification en phase normale, le produit a été passé sur HPLC préparative en phase inverse, possédant normalement une meilleure résolution de purification. Malheureusement cette purification posait plusieurs problèmes identifiés les uns après les autres : la faible solubilité du produit dans l'eau pour l'injection (le méthanol étant donc nécessaire), la résolution de la séparation qui n'était satisfaisante qu'avec l'injection de quelques dizaines de mg de produit maximum sur les colonnes ayant la plus grande capacité de charge disponibles au laboratoire, et la dégradation de l'oxime en nitrile en phase aqueuse acide qui compromet toute la purification. Malgré tout, la pureté était améliorée pour certaines fractions, sans pour autant atteindre 95%, car le dédoublement des pics du produit était toujours présent en HPLC analytique. Durant ces optimisations de purification, une part non négligeable de produit a été perdue.

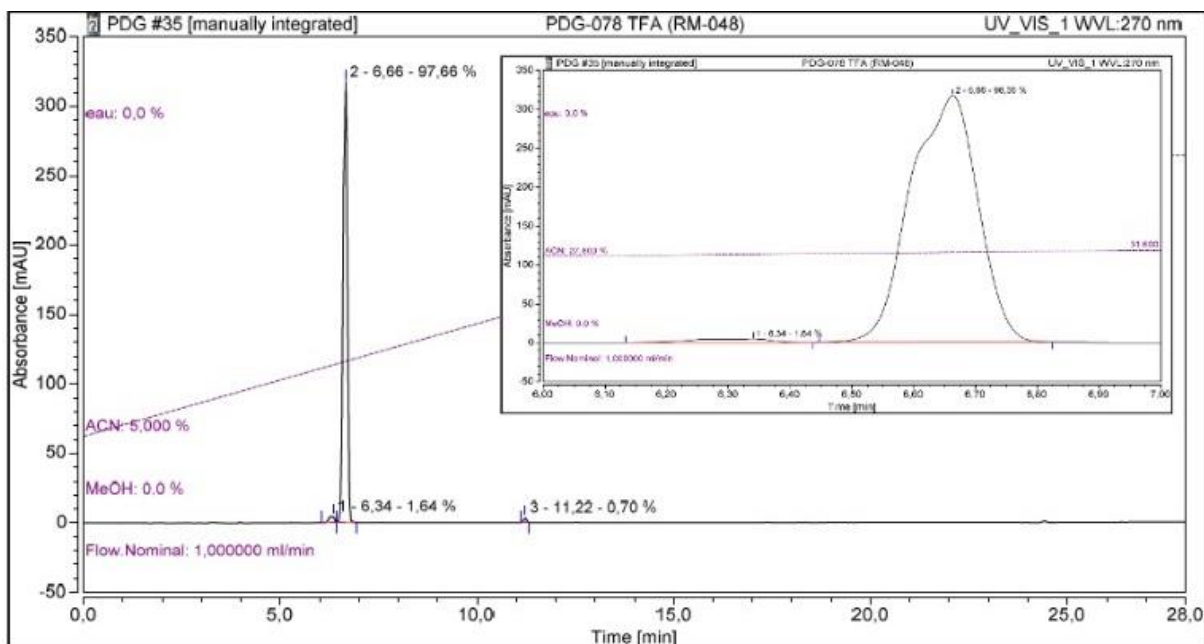


Figure 48 : analyse HPLC de RM048 (droite) en phase inverse avec pour phase mobile ACN/TFA 0,1% aq. Un léger dédoublement du pic est observable.

Finalement, lorsque l'hypothèse des différentes formes acido-basiques a été posée, l'utilisation d'une phase mobile ACN/TFA 0,1% aq. a été réautorisée de façon exceptionnelle en HPLC analytique au laboratoire. Un resserrement net des pics a alors été observé, plus efficace sur **RM048** que sur **AB746** (qui possède un plus grand nombre de formes chargées possibles) (comparaison **RM048** et **AB647** **Figure 48** et **49**, et comparaison phases mobiles acide formique 0,1% aqueux et TFA 0,1% aqueux pour le **AB746** **Figure 49**). Cela a aussi permis de montrer que la purification en phase normale suffisait pour atteindre des puretés supérieures à 95%. Sauf cas spécial, la purification en phase inverse a donc été abandonnée pour utiliser des colonnes de silice sphérique de granulométrie 15 µm en phase normale.

Cette vérification de la pureté utilisant du TFA a permis d'assurer une pureté HPLC de 97,7% à un lot de sel de mésylate de **RM048** (1,1 équivalent) de 495 mg.

2.6.3. Analyse UHPLC/MS

Cependant, un appareil de UHPLC/MS est ensuite arrivé à l'institut, permettant de ne plus avoir aucune incertitude vis-à-vis du dédoublement des pics et d'utiliser les phases mobiles plus courantes comme l'acide formique ou l'acétate d'ammonium, car la masse de chaque pic pouvait être vérifiée, fournissant une plus grande certitude sur la nature du composé que la comparaison des spectres d'absorption des différents pics (**Figure 49**).

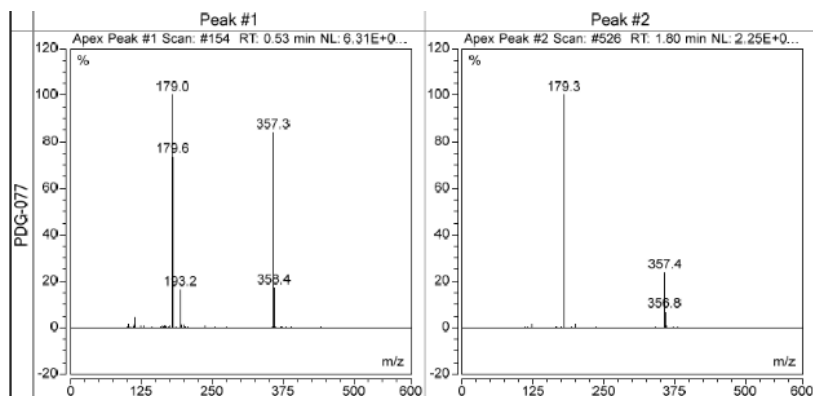
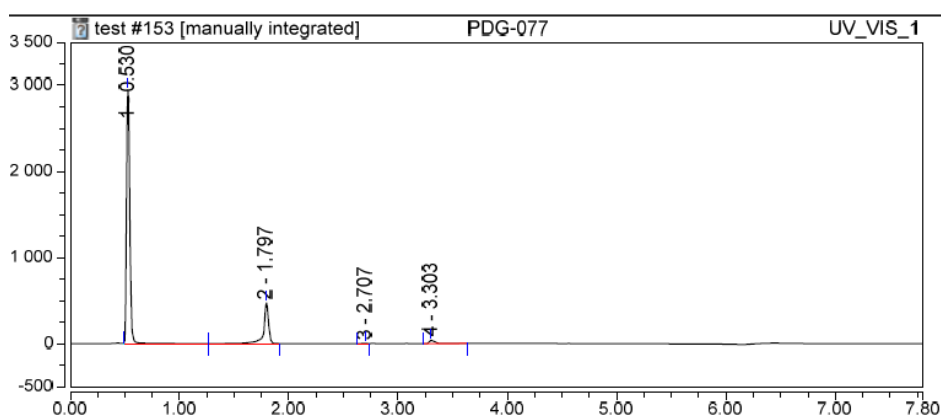
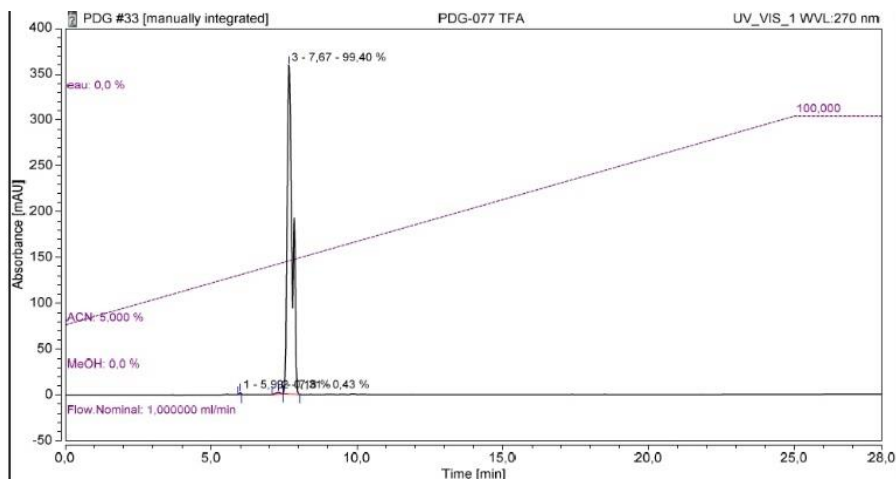


Figure 49 : Analyse HPLC de AB746 avec pour phase mobile ACN/TFA 0,1% aq. (haut) et analyse UHPLC/MS de AB647 avec pour phase mobile ACN/Ac. formique 0,1 % aq. (milieu), les masses des pics 1 et 2 correspondent au produit AB647 de masse exacte 356,2 (bas).

Grâce à cette analyse, ont pu être vérifiées les puretés des lots suivants :

- Sel de TFA (0.9 équivalent) de **AB745** de 478 mg de pureté 99,3%.
- Sel de TFA (0,94 équivalent) de **AB647** de 143 mg de pureté 98%.
- Sel de chlorhydrate (1,2 equivalent) de **RM048** de 19 mg de pureté 97,2%.

2.6.4. Sels d'hexafluorophosphate et de bis(trifluorométhylsulfonyl)imide

Les sels de **RM048** avec pour contre-ion PF_6^- et NTf_2^- ont été synthétisés par métathèse ionique entre le sel de chlorhydrate de **RM048** (1 équivalent) et AgPF_6 ou AgNTf_2 , pour provoquer la précipitation de AgCl selon un protocole utilisé par les équipes de Zrinka Kovarik et Zoran Radic (**Figure 50**).⁴³³ La solution est ensuite filtrée sur un filtre de 0,2 μm , lyophilisée, le produit repris dans le méthanol (qualité HPLC) et refiltré sur filtre de 0,2 μm .

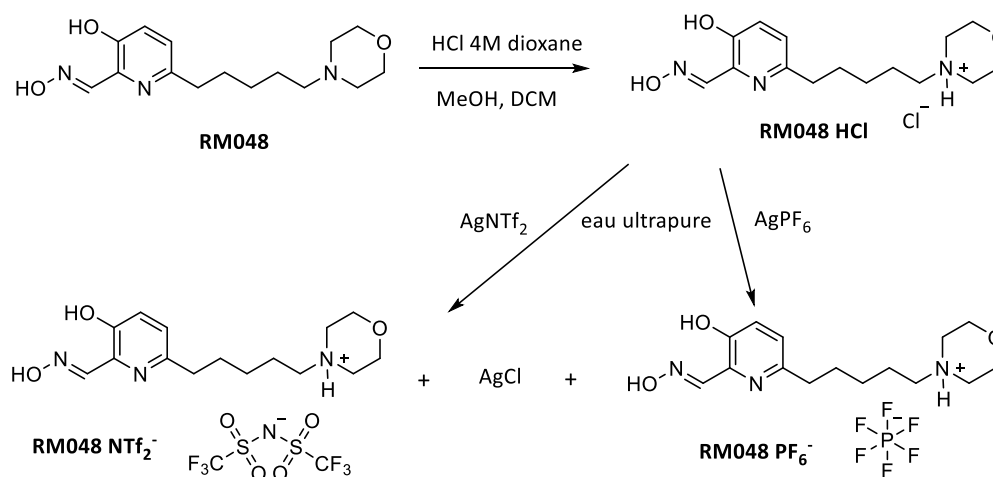


Figure 50 : Synthèse des sels de PF_6^- et NTf_2^- de **RM048** par métathèse ionique.

Les lots suivants ont pu être envoyés :

- Sel de NTf_2^- (1 équivalent) de **RM048** de 195 mg de 99,2% de pureté, lot 1.
- Sel de NTf_2^- (1 équivalent) de **RM048** de 58 mg de 96,3% de pureté, lot 2.
- Sel de PF_6^- (1 équivalent) de **RM048** de 149 mg de 99,2% de pureté, lot 1.
- Sel de PF_6^- (1 équivalent) de **RM048** de 24 mg de 100% de pureté, lot 2.

3. EVALUATION *IN VIVO*

3.1. AB647 TFA

Le sel de TFA d'**AB647** a nécessité un chauffage à 75°C et une dissolution dans l'eau pour préparation injectable (eau ppi) à la place de la solution à 0,9% en NaCl où la solubilité était encore plus faible. La protection *in vivo* a d'abord été évaluée contre le toxique pour lequel la réactivation *in vitro* était la plus prometteuse, soit le tabun. En combinaison avec du sulfate d'atropine à 3mg/kg et à une dose de 10 mM, ce réactivateur a un indice de protection de 1,27 avec un intervalle de confiance à 95% de

[1,24 ; 1,36]. Comme cette protection est faible et la solubilité du produit difficile, les protections contre les autres toxiques n'ont pas été réalisées.

La formulation du réactivateur peut être la cause de ces difficultés. En effet, il a été observé après-coup que le lot de réactivateur qui avait été testé précédemment *in vitro* comportait 1,68 équivalents de TFA, plus que les 0,94 équivalents ajoutés sur ce lot. Cette différence de charge peut induire une différence de solubilité. De plus, malgré cela, il a été rappelé que la dissolution pour les mesures *in vitro* a été réalisée dans le méthanol pur à 40 mM suivi de la dilution dans l'eau, indiquant déjà une solubilité modeste dans l'eau. Le produit va donc être neutralisé, repurifié et reformulé avec un plus grand nombre d'équivalents d'acide. La nature de cet acide pour améliorer l'hydrosolubilité est à l'étude.

3.2. AB745 TFA

Le sel de ce réactivateur a posé le même problème de solubilité et n'était absolument pas soluble pour les conditions *in vivo*. Là aussi la formulation de ce lot était de 0,9 équivalents de TFA contre 3,48 équivalents rapportés précédemment par Anissa Braïki pour les mesures *in vitro*. De plus il avait aussi dû être solubilisé dans une solution mère à 40 mM dans le méthanol avant sa dilution dans l'eau. Il va aussi être neutralisé, repurifié et reformulé pour espérer augmenter suffisamment son hydrosolubilité.

3.3. RM048

3.3.1. Pharmacocinétique

RM048 NTf₂⁻ n'a malheureusement pas pu être testé car il n'était pas soluble dans l'eau à 0,9% de NaCl, nécessaire à l'injection *in vivo*, à 50 °C pendant 1 h. Cela peut s'expliquer par la forte lipophilie de ce contre-ion.

RM048 PF₆⁻ n'a en revanche présenté aucun problème de solubilité, mais ses paramètres pharmacocinétiques n'ont pas encore été mesurés, les expériences sont prévues pour les mois à venir.

Aucune autre donnée supplémentaire que celles présentées en début de chapitre n'est donc disponible sur la pharmacocinétique du **RM048**, qui est sensible à la nature du sel utilisé.

3.3.2. Dose létale médiane

La mesure de la DL₅₀ du **RM048** MeSO₃H a été déterminée par Guilhem Calas de l'IRBA en suivant une méthode dite « up and down » basée sur la publication de Rispin et al.^{432,434} Une dose correspondant à la meilleure estimation de la DL₅₀ est administrée à une souris puis, suivant qu'elle survive ou meurt, la dose est augmentée ou réduite d'un facteur arbitrairement fixé à 1,1. De proche en proche, la DL₅₀ est ainsi établie. La DL₅₀ du **RM048** MeSO₃H pour une souris est de 750 µmol/kg à 95% de [667,7 ; 870]. Le réactivateur est donc assez peu toxique, ce qui permet d'utiliser des doses thérapeutiques assez élevées comme le confirme la NOAEL.

3.3.3. Dose sans effet nocif observable

Pour rappel, cette dose correspond à la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe aucun effet toxique. L'équipe de l'IRBA se base sur l'hypothèse que la respiration est le paramètre physiologique le plus sensible aux inhibitions des cholinestérases (y compris par les réactivateurs suffisamment affins pour les cholinestérases et les récepteurs). Le suivi des paramètres de la respiration d'une souris se fait donc par pléthysmographie double-chambre, qui permet de distinguer la ventilation nasale de la ventilation thoracique de la souris pour gagner en sensibilité. Des doses décroissantes de réactivateurs sont administrées avec un pas de 1,1 et dès que les altérations respiratoires disparaissent, la NOAEL est atteinte. La mesure est répétée sur plusieurs souris. La NOAEL obtenue pour le **RM048** MeSO₃H est de 166,7 µmol/kg, dose 4,5 fois inférieure à la DL₅₀. La mesure des indices de protection se fait ensuite avec cette dose de **RM048**. Cela permet de prendre en compte la toxicité du produit et d'évaluer l'efficacité du réactivateur à la dose thérapeutique la plus haute possible.

Parmi les réactivateurs de référence, seule la NOAEL du HI-6 a pour l'instant été établie, à 68,3µmol/kg.

3.3.4. Indices de protection

Pour rappel, l'indice de protection est : $IP = \frac{DL_{50\ OP+antidote}}{DL_{50\ OP}}$. Les DL₅₀ de l'OP seul et de l'OP en combinaison avec le réactivateur et/ou l'atropine sont évaluées de la même façon que pour celle du réactivateur seul précédemment expliquée, en faisant varier la dose d'OP par un facteur de 1,1 selon la méthode « up and down ».

3.3.4.1. Sans atropine

Les indices de protection des réactivateurs de référence et du **RM048** ont d'abord été mesurés à une dose isomolaire de 100 $\mu\text{mol/kg}$, sans atropine, sur des souris intoxiquées par les OPs originaux, dans le but de voir l'efficacité intrinsèque des réactivateurs (**Tableau 14**).

Réactivateur (100 $\mu\text{mol/kg}$ sans atropine)	VX	Sarin	Tabun	Paraoxon
2-PAM	0,91	0,93	nd	2,58
Obidoxime	3,85	1,45	1,24	3,79
HI-6	nd	nd	nd	1,6
RM048 MeSO ₃ H	2,17	1,23	0,94	6,1

Tableau 14 : indices de protection des réactivateurs à 100 $\mu\text{mol/kg}$ par voie intrapéritonéale sans atropine sur des souris intoxiquées par différents OPs par voie sous-cutanée (nd = non déterminé).

Dans ces conditions le **RM048** procure de faibles protections contre le VX et le sarin, et aucune contre le tabun. Bien qu'également faibles, les protections offertes par l'obidoxime sont supérieures. Cependant le **RM048** est très efficace contre le paraoxon car la protection offerte par le réactivateur seul est haute (6,1) et largement supérieure aux réactivateurs de référence de type bis-pyridinium. Ces valeurs et leur hiérarchie sont cohérentes avec l'efficacité de réactivation mesurée *in vitro* contre les analogues des OPs VX, sarin et tabun (**Tableau 10**). En revanche l'indice de protection *in vivo* contre le paraoxon est de façon étonnante largement supérieur à ce qui pouvait être attendu des résultats *in vitro* avec un k_{r2} de seulement 0,44 $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ contre cet OP, contre 0,4 $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ pour le HI-6 et 1 $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ pour le 2-PAM, qui ont des indices de protection bien plus faibles. Cependant, ce résultat devient cohérent si l'on considère les courbes d'efficacité thérapeutique (**Figure 46**) où le paraoxon est l'OP sur lequel le **RM048** est le plus efficace.

Néanmoins, l'absence d'atropine de ces tests compromet l'efficacité du réactivateur dont la vitesse de réactivation peut ne pas être assez rapide face à la progression des symptômes de l'intoxication. C'est ainsi le cas du 2-PAM qui n'offre aucune protection contre le sarin et le VX. Les indices de protection ont donc ensuite été mesurés en combinaison avec 3 mg/kg de sulfate d'atropine, pour être plus proche des conditions cliniques réelles.

Le **RM048** étant le plus efficace contre le paraoxon, les indices de protection de ses différentes formulations ont été comparés sur cet OP (**Figure 51**).

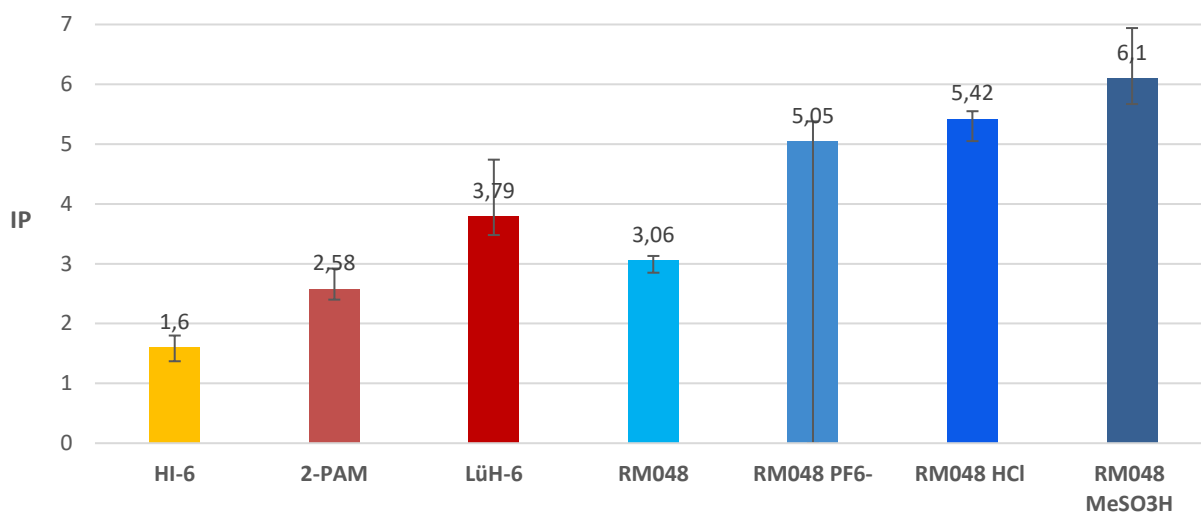


Figure 51 : Indices de protection des réactivateurs et du RM048 sous ses différentes formulations à 100 $\mu\text{mol/kg}$ sans atropine sur des souris intoxiquées par le paraoxon.

On observe une importante augmentation de l'indice de protection entre la forme neutre du **RM048**, dont la protection est inférieure à celle de l'obidoxime (LüH-6), et ses sels. Ceux-ci offrent tous une protection supérieure à tous les réactivateurs de référence contre le paraoxon. Les sels de PF_6^- et de HCl ont un indice de protection similaire, tandis que le sel de mésylate offre la meilleure protection avec un indice de 6,1. Cela corrobore le fait que ce sel possède la meilleure pharmacocinétique (voir partie 1.3.2.) et on peut donc supposer que la pharmacocinétique du sel de PF_6^- ne devrait pas la surpasser. C'est pourquoi le sel de mésylate a été choisi pour les autres mesures d'indices de protection en combinaison avec du sulfate d'atropine.

3.3.4.2. Avec sulfate d'atropine

Comme cela a été rapporté dans la littérature,⁴³⁵ la combinaison réactivateur/atropine crée un effet synergique dont la protection est non seulement supérieure à celle du réactivateur ou de l'atropine seuls, comme on le voit pour le 2-PAM (**Tableaux 14 et 15**), mais peut aussi être sans commune mesure à celle de leur somme. Par exemple, pour l'obidoxime, ses indices de protection contre le VX et le paraoxon passent de moins de 4 pour le réactivateur seul à plus de 20 en combinaison avec 3 mg/kg de sulfate d'atropine, alors que le sulfate d'atropine seul n'offre aucune protection ou très peu contre ces deux OPs.

L'importance et la difficulté de la prise en compte de la fenêtre thérapeutique sont aussi mises en évidence par la réduction de l'indice de protection du HI-6 contre le VX et le sarin entre la dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ et sa NOAEL de 68,3 $\mu\text{mol/kg}$ (**Tableau 14**). L'obidoxime ayant une DL_{50} plus de 3 fois

inférieure à celle du HI-6 (**Tableau 7**), il est raisonnable de supposer que la même réduction de ses indices de protection s’observera lorsqu’ils seront mesurés à la NOAEL de l’obidoxime.

Sulfate d’atropine (3 mg/kg) avec :		VX	Sarin	Tabun	Paraoxon
∅		0,97	1	0,91	1,62
100 μmol/kg	2-PAM	1,82	1,49	0,95	7,1
	Obidoxime	20,91	1,82	2,42	22,44
	HI-6	34,53	4,72	1,69	7,59
NOAEL	HI-6	25,21	3,63	nd	7,59
	RM048 MeSO ₃ H	16,82	2,86	1,4	18,2

Tableau 15 : Indices de protection des réactivateurs en combinaison avec de l’atropine à 3 mg/kg à une dose de 100 μmol/kg ou à leur NOAEL pour le HI-6 et le RM048 MeSO₃H sur des souris intoxiquées par différents OPs.

Le **RM048** est plus protecteur sur tous les OPs que le 2-PAM et contrairement à son administration sans atropine, il offre cette fois une faible protection contre le tabun. Il est aussi plus protecteur que l’obidoxime contre le sarin et offre de très bonnes protections contre le VX et le paraoxon, proches de celles de l’obidoxime. Enfin, que ce soit à une dose de 100 μmol/kg ou à la NOAEL, le **RM048** offre une protection inférieure à celle du HI-6 contre le VX et le sarin. En résumé le **RM048** MeSO₃H est très efficace contre le VX et le paraoxon, moyennement efficace contre le sarin et peu efficace contre le tabun (comme le sont les réactivateurs de référence contre ce toxique).

4. ELECTROPHYSIOLOGIE DU **RM048** SUR LES RECEPTEURS

NICOTINIQUES ALPHA7

Précédemment à ma thèse, l’action du **RM048** sous forme neutre a été testée sur les récepteurs nicotiniques α7 par l’équipe des Dr. Denis Servent et Dr. Rómulo Aráoz au CEA. Pour cela, de l’ARN messenger exprimant le nAChR α7 humain (préalablement synthétisé à partir de plasmide codant pour cette protéine, qui est extrait d’*Escherichia Coli* où il est amplifié) est introduit dans des ovocytes de grenouille sud-africaine *Xenopus laevis*. Les mesures d’électrophysiologie sont réalisées sur les ovocytes deux jours après leur injection, lorsque suffisamment de récepteurs ont été synthétisés sur la membrane cellulaire par l’ovocyte. Ces tests sont réalisés par la technique de voltage-clamp à deux

electrodes automatisée (HiClamp, Multi Channel Systems) avec une tension transmembranaire imposée de -60 mV. Lorsque les récepteurs s'ouvrent, le courant peut circuler entre la solution saline et l'intérieur de la cellule, qu'il est possible d'enregistrer avec les deux électrodes. L'intensité du signal créé par la combinaison réactivateur-ACh sur les nAChRs est comparée à la valeur normalisée de l'ACh seule (moyenne des trois premières applications d'ACh à 100 μ M, sa EC_{50}).

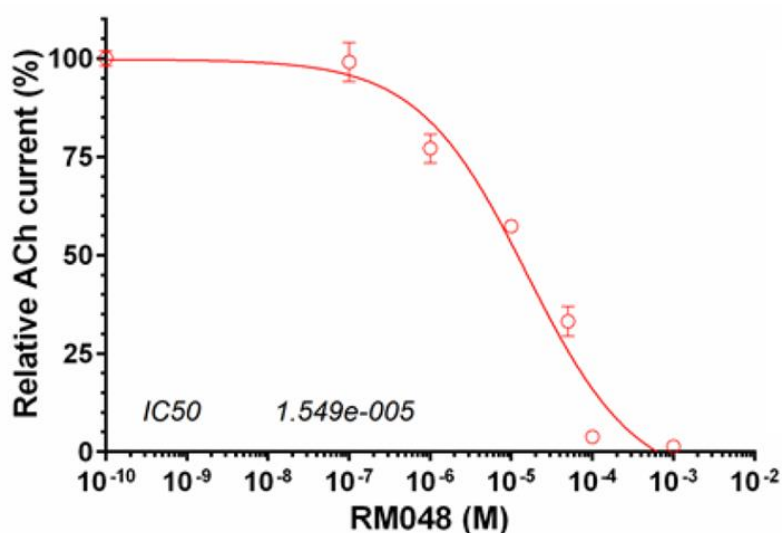


Figure 52 : Courbe du courant cholinergique normalisé par rapport à la moyenne de trois applications d'ACh à 100 μ M (EC_{50}) en fonction de la concentration de RM048 coappliquée avec l'ACh à 100 μ M. Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. Laevis* exprimant le nAChR $\alpha 7$ sur leur membrane cellulaire.

L'action du **RM048** est antagoniste sur le nAChR $\alpha 7$, avec une IC_{50} de 15,49 μ M (**Figure 52**). L'effet antagoniste apparaît à partir de 0,1 μ M et inhibe à 100% le récepteur entre 100 μ M et 1 mM. Cet effet est réversible en réappliquant l'ACh seule après un lavage. C'est un effet antagoniste bien plus fort que celui des réactivateurs de référence car, parmi ceux-ci, l' IC_{50} du TMB-4, qui est le plus inhibiteur sur les nAChRs neuronaux et musculaires, est de 501 μ M sur les deux sous-types (**Tableau 6**).²³² Cet effet est partagé par nos autres réactivateurs ayant une amine tertiaire comme ligand et peut donc provenir de l'interaction de cette amine, en partie protonée à pH physiologique, avec le site orthostérique, affiné avec les ammoniums. L'antagonisme est donc supposé compétitif. L'idée d'accentuer cet effet pour développer de nouveaux réactivateurs multi-cibles sera développée au chapitre II.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif était de synthétiser **RM048** à l'échelle du gramme et de synthétiser au moins 300 μ mol de **AB647** (107 mg) et de **AB745** (106 mg) pour effectuer les tests *in vivo* de ces réactivateurs, sur la base

de résultats précédents prometteurs. Ces réactivateurs devaient être fournis aux biologistes avec une pureté HPLC supérieure à 95% et selon la formulation voulue. Les nouveaux sels d'hexafluorophosphate et de bis(trifluorométhylsulfonyl)imide du **RM048** devaient être aussi synthétisés.

La synthèse de dizaines de grammes du fragment **8**, noyau pyridine fonctionnalisé, s'est faite en suivant des protocoles optimisés et reproductibles permettant d'avoir chaque produit intermédiaire avec de très bons rendements, son rendement global sur 5 étapes allant jusqu'à 51%. Ces grandes quantités du fragment **8** ont ensuite permis de synthétiser les trois réactivateurs de ce chapitre en 5 ou 4 étapes supplémentaires, mais aussi plusieurs autres réactivateurs qui seront présentés dans les chapitres suivants.

820 mg de **RM048** ont été obtenus en 5 étapes à partir de cet intermédiaire avec un bon rendement global de 31%. L'étape simultanée de réduction de l'alcyne et de débenzylation a été optimisée en faisant l'hydrogénolyse sous pression sur une durée réduite, ce qui permet de réduire la formation du produit secondaire. Les quatre autres réactions fonctionnent bien et permettent d'avoir chaque produit intermédiaire avec un bon rendement.

Les synthèses de **AB745** et **AB647** se sont faites en respectivement 5 et 4 étapes à partir de **8**, avec des rendements globaux de 17 et de 14%. Ces rendements sont inférieurs à celui obtenu pour **RM048** car la nature de ces substrats pose un problème au niveau des deux premières étapes. D'abord, la longueur de la chaîne alkyle servant de bras espaceur, à quatre carbones, conduit à une compétition entre l'élimination de l'alcool activé (par conjugaison avec l'alcyne) et la substitution de l'amine. Les rendements restent satisfaisants (entre 60 et 70%) mais pourraient potentiellement être améliorés en changeant de réactif limitant : non plus 1,5 équivalent d'amine, mais 1,5 équivalent d'alcool activé par rapport à 1 équivalent d'amine.

L'optimisation faite à l'étape d'hydrogénolyse pour la synthèse du **RM048** devrait aussi améliorer celle de la synthèse de l'**AB745** où le même type de produit secondaire se forme à cause d'une cinétique trop lente. En revanche, une étude plus approfondie de la débenzylation pour **AB647** est nécessaire. Pour ces deux réactivateurs, l'approche convergente consistant à lier ensemble d'abord le bras espaceur et l'amine secondaire semble profitable pour compenser ces inconvénients sur la totalité de la synthèse.

Néanmoins, les quantités nécessaires aux tests *in vivo* ont été obtenues pour ces deux réactivateurs, avec notamment 603 mg d'**AB745**.

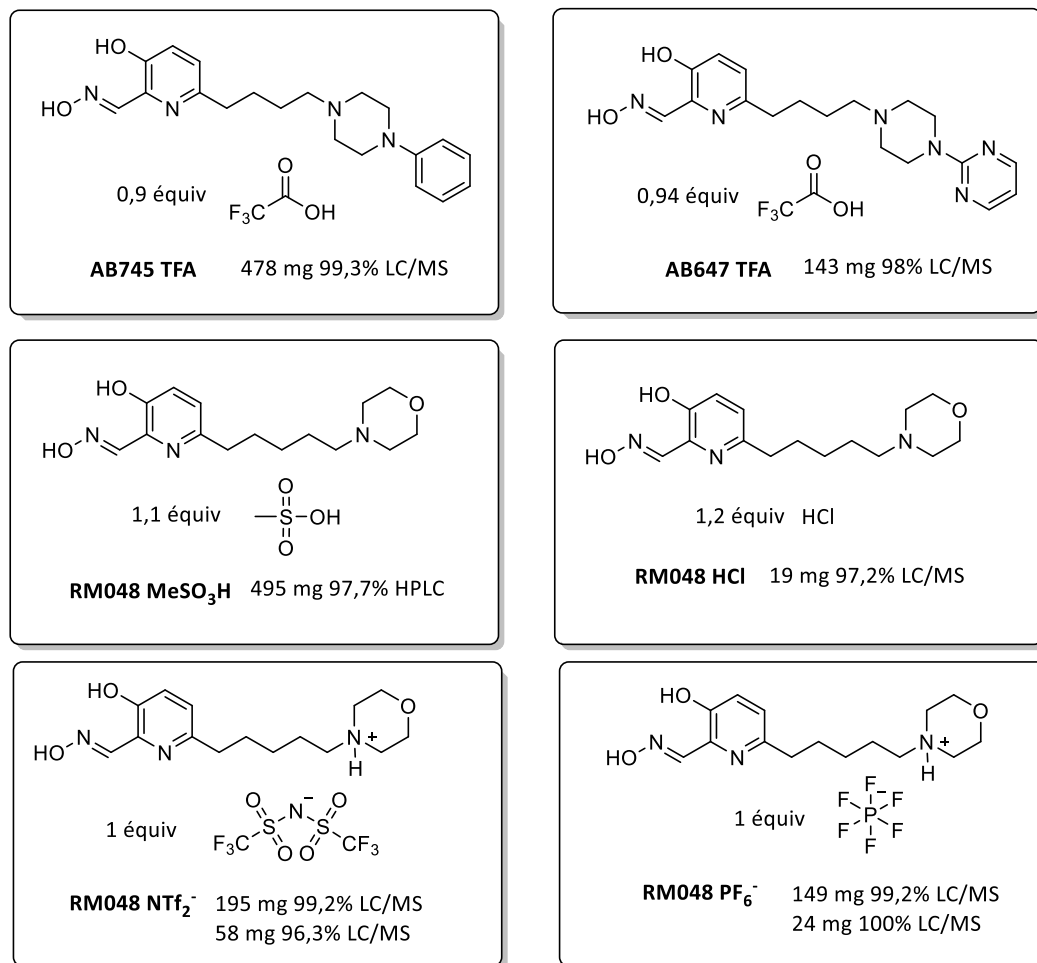


Figure 53 : Structures des sels de réactivateurs synthétisés dans ce chapitre.

La méthode de purification et de formulation a été développée pour pouvoir purifier de grandes quantités de produit et de vérifier leur pureté de façon fiable. Le produit final sous forme neutre est purifié en phase normale sur colonne de silice sphérique de 15 μm de granulométrie et sa pureté est vérifiée par LC/MS avec détection UV, en vérifiant la masse de chacun des pics, ce qui permet de s'affranchir des multiples formes protonées possibles de ces produits multi-aminés, qui possèdent des temps de rétention différents. Si cette pureté est supérieure à 95%, le sel de ce réactivateur est synthétisé en solution en ajoutant le nombre précis d'équivalents de l'acide souhaité. Après séchage intensif sous vide, le nombre d'équivalents ajoutés peut être vérifié approximativement par la différence de masse entre forme neutre et forme chargée, ainsi que, dans le cas des sels de TFA, par RMN quantitative du fluor. La pureté du sel obtenu est revérifiée par RMN et LC/MS.

Cette méthode a permis d'obtenir avec de très bonnes puretés les lots envoyés à nos collaborateurs des différents sels de ces trois réactivateurs (**Figure 53**) :

La solubilité est malheureusement trop faible pour les tests *in vivo* pour les deux réactivateurs **AB745** et **AB647** et leur formulation sera ré-étudiée en espérant augmenter cette solubilité.

Le **RM048** est un réactivateur qui présente de sérieux atouts : il passe fortement la BHE et peut donc stopper les symptômes du système nerveux central en réactivant l'AChE à ce niveau et en évitant potentiellement les séquelles de long terme ; son sel de mésylate offre, en combinaison avec du sulfate d'atropine, une protection efficace contre le paraoxon et le VX, proche de celle de l'obidoxime sur ces deux OPs, modérée contre le sarin et faible contre le tabun. Les mesures de cytotoxicité *in vitro*, sa DL₅₀ et sa NOAEL montrent que sa faible toxicité permet l'utilisation de doses thérapeutiques conséquentes sans effets secondaires. Toute cette étude sur le **RM048** fera l'objet d'une publication en cours d'écriture.

Enfin, son effet antagoniste modéré sur les nAChRs $\alpha 7$ lui permet d'avoir une action probablement bénéfique sur les symptômes nicotiques associés, en limitant l'hyperstimulation de ces récepteurs. Cette propriété a donné l'idée à notre équipe de concevoir des antidotes multi-cibles, régulant l'activité des nAChRs et réactivant l'AChE, en accentuant notamment l'antagonisme de tels réactivateurs possédant un ligand aminé. Cette conception d'antidotes multi-cibles – financé par le programme ANR Astrid et qui est l'objectif principal de cette thèse sera développée dans le chapitre II.

**CHAPITRE II : SYNTHÈSE D'ANTIDOTES MULTI-CIBLES (MTDA),
REACTIVATEURS DES CHOLINESTERASES ET ANTAGONISTES DES
RECEPTEURS NICOTINIQUES**

1. CONCEPT DES MTDAS REACTIVATEURS DE CHOLINESTERASES ET ANTAGONISTES DES NACHRS

1.1. Effet antagoniste des réactivateurs avec un ligand aminé

Comme nous l'avons vu précédemment, certains des réactivateurs conçus par notre équipe, basés sur la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime et possédant un ligand aminé, ont un effet antagoniste sur les récepteurs nicotiques $\alpha 7$. Le RM048 a ainsi une IC_{50} de 15,49 μM et le AB069 est encore plus efficace avec une IC_{50} de 4,75 μM (Figure 54).

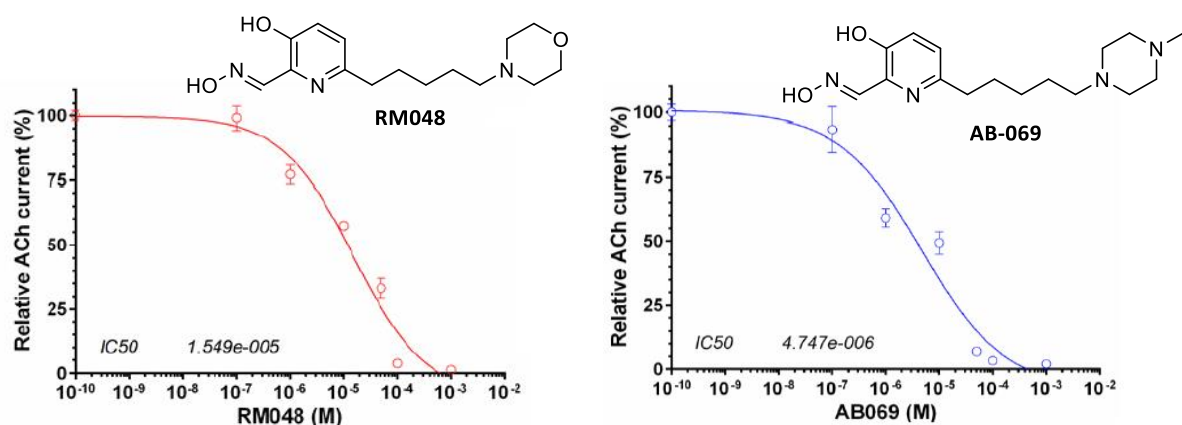


Figure 54 : Courbes du courant cholinergique normalisé par rapport à la moyenne de trois applications d'ACh à 100 μM (IC_{50}) en fonction de la concentration de RM048 et de AB069 coappliquées avec l'ACh à 100 μM . Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. laevis* exprimant le nAChR $\alpha 7$ sur leur membrane cellulaire.

Nous supposons que l'amine tertiaire du ligand, que ce soit la morpholine du RM048 ou le motif pipérazine du AB069, et qui est partiellement protonée à pH physiologique, peut interagir avec le site orthostérique du nAChR où se lie normalement l'agoniste, telle que l'acétylcholine qui possède un ammonium quaternaire. De plus, la liaison avec un groupe aromatique comme la pyridine, espacée de 4 ou 5 liaisons pourrait expliquer l'effet antagoniste par rapport à un effet agoniste, total ou partiel, selon les suggestions faites par Hibbs *et al.* sur le lien entre la structure du ligand et le changement de conformation du site orthostérique qu'il induit (Figure 55).⁴³⁶

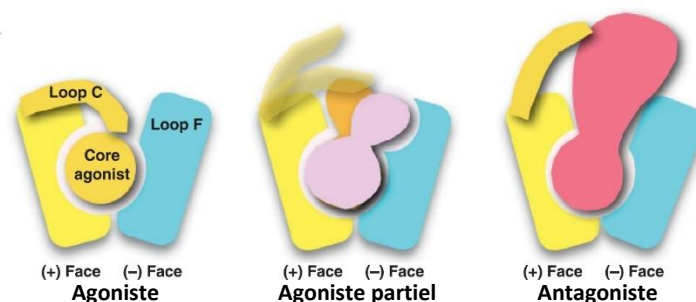


Figure 55 : Représentation schématique des modes de liaison d'un agoniste nicotinique total ou partiel et d'un antagoniste nicotinique sur le site orthostérique de l'AChBP, proposée par Hibbs et al (adapté de Hibbs, 2009)⁴³⁶

1.2. Choix d'un ligand ammonium quaternaire

1.2.1. Avantages et inconvénients

Notre objectif était de renforcer cet effet antagoniste en remplaçant l'amine tertiaire par un ammonium quaternaire, pour mimer plus fidèlement la structure de l'acétylcholine et son ammonium. En effet les ammoniums sont particulièrement bien stabilisés dans une « box aromatique » au sein du site orthostérique des nAChRs, formée par des résidus aromatiques tryptophane et tyrosine qui peuvent établir des liaisons cation- π avec ces fonctions chimiques. L'affinité des antidotes multi-cibles (multi-target directed antidotes MTDA) pour les nAChRs serait donc probablement augmentée s'ils portent une charge positive permanente sous forme d'un ammonium. De plus comme les cholinestérases et les nAChRs partagent le même ligand, c'est-à-dire l'acétylcholine, un ligand ammonium devrait aussi augmenter l'affinité pour l'AChE et la BChE. En effet des interactions favorables de type cation- π peuvent se former entre l'ammonium et les résidus aromatiques du site périphérique ou de la gorge. C'est notamment le cas pour les réactivateurs chargés comme le HI-6 pour lequel une forte interaction avec le résidu Asp74 existe,⁴³⁷ mais aussi avec les résidus aromatiques de la gorge ou encore du site cation- π du site actif. En outre, des ligands ammoniums quaternaires non aromatiques ont déjà été intégrés dans la conception de réactivateurs bi-chargé à partir d'études computationnelles, qui se sont révélés expérimentalement au moins aussi efficaces que le 2-PAM contre plusieurs OPs de type pesticides.⁴³⁸

Cette charge positive peut aussi augmenter l'hydrophilie du MTDA et donc augmenter sa solubilité aqueuse, qui n'est parfois pas suffisante pour les réactivateurs neutres ayant une trop grande lipophilie. En outre cela pourrait potentiellement améliorer la pharmacocinétique de ces composés.

Cependant, une telle charge pourrait aussi compromettre le passage de la BHE, pour lequel les réactivateurs neutres, le JR595 ou le RM048, se sont montrés très efficaces. Il faut néanmoins noter

que le 2-PAM, mono-chargé, passe malgré tout faiblement la BHE (voir **Figure 47**). Or, ces composés devraient posséder une lipophilie bien supérieure au 2-PAM : il est donc envisageable qu'ils puissent conserver une capacité satisfaisante à traverser la BHE, bien que probablement amoindrie. Pour avoir une idée un peu plus précise des futures propriétés des molécules visées, nous avons systématiquement réalisé des études *in silico* grâce à différents outils qui seront présentés un peu plus loin.

1.2.2. Quaternarisation de RM048 et AB639

Les premiers MTDA potentiels sont logiquement basés sur la structure du RM048 et du AB069, en quaternarisant simplement l'amine tertiaire de la morpholine ou de la pipérazine par un groupe méthyle. Un effet antagoniste a ainsi été observé pour le motif pipérazinium diversement substitué, selon deux mécanismes : par blocage du canal des nAChRs musculaires ou par compétition avec l'acétylcholine sur le site orthostérique du nAChR $\alpha 7$ avec une IC_{50} pouvant atteindre $17 \mu M$.^{439,440}

Cependant la longueur du bras espaceur pour le MTDA incluant le motif pipérazinium se discute. En effet, les résultats *in vitro* du AB069 montrent que ce réactivateur est très peu efficace pour réactiver l'AChE inhibée par le tabun, dont l'encombrement stérique est la principale limitation à la réactivation (**Tableau 16**). En revanche, le réactivateur analogue AB639, qui possède un bras espaceur à 4 carbones, contre 5 pour AB069, a une efficacité large spectre ainsi qu'une inhibition de l'AChE native légèrement moins prononcée.

oxime	K_D (μM)				k_r (min^{-1})				k_{r2} ($mM^{-1}min^{-1}$)				IC_{50} (μM)
	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	
2-PAM	60	205	∅	8,6	0,36	0,76	∅	0,04	6	3,7	∅	4,6	580
HI-6	30	78	nd	28	0,5	1,05	nd	0,024	17	13,5	0,45	0,86	82
AB639	617	44	247	277	1,9	0,34	2,4	2	3	8	10	7	96
AB069	40	66	∅	49	0,19	0,25	∅	0,09	5	4	∅	2	67

Tableau 16 : Résultats comparatifs de réactivations *in vitro* des réactivateurs incluant un ligand méthylpipérazine sur l'AChE inhibée par les analogues des NOPs et le paraoxon réalisés par l'équipe de José Dias à l'IRBA, en comparaison avec deux réactivateurs de référence.

Supposant que l'action antagoniste du motif pipérazine sur les nAChRs ne serait pas significativement altérée par ce bras espaceur plus court, la structure du MTDA correspondant **27** a donc été proposée en se basant sur celle du AB639 (**Figure 56**).

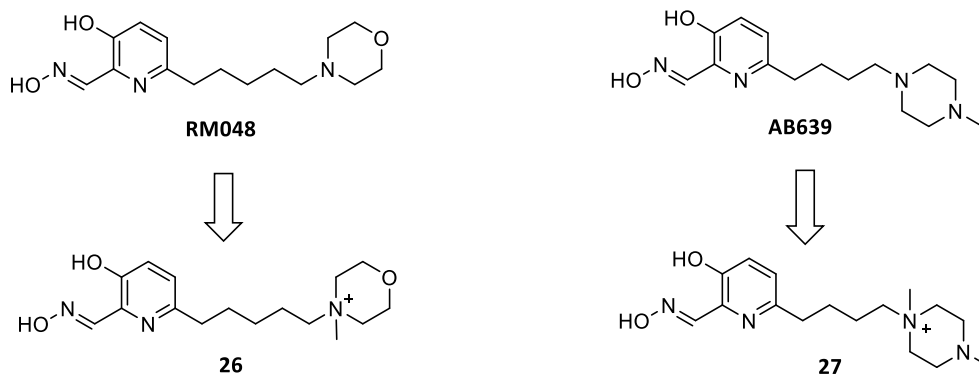


Figure 56 : Structures des MTDAs cibles fondés sur le RM048 et le AB639

1.2.3. Choix du ligand quinuclidinium

Le motif quinuclidinium nous a aussi semblé être un ligand intéressant à plusieurs titres. En effet la quinuclidine comme sa version chargée quinuclidinium sont des motifs qui se retrouvent dans beaucoup de molécules affines (agoniste ou antagoniste) à la fois des cholinestérases et des récepteurs nicotiniques.

Au niveau de l'AChE et surtout de la BChE, qui possède un site actif plus volumineux, l'important encombrement stérique de ce bicyclic peut accentuer la stabilisation du MTDA à l'intérieur du site actif, à la façon d'une ancre. Cela se vérifie avec des dérivés quinuclidiniums d'alcaloïdes naturels extraits des plantes du genre *Cinchona* : quinine, cinchonidine, quinidine, cinchonine, qui possèdent un motif quinuclidine (**Figure 57**). Les dérivés quinuclidinium de ces molécules montrent des constantes de dissociation avec l'AChE de l'ordre de 10 μM et avec la BChE de l'ordre de 1 à 0,01 μM .⁴⁴¹ Cette double affinité pour les cholinestérases, avec une certaine sélectivité pour la BChE, se retrouve sur les réactivateurs synthétisés à partir de ces structures naturelles, en quaternarisant l'ammonium de la quinuclidine et en rajoutant une fonction oxime. De plus ces réactivateurs présentent une cytotoxicité modeste sur des cellules hépatiques et neuronales avec une IC_{50} de 800 μM .³¹⁵ De même, des molécules basées sur un noyau quinuclidinium substitué par un carbamate ou par un amide sont des inhibiteurs de l'AChE et de la BChE avec des constantes de dissociation K_i de l'ordre de 1 – 10 μM .^{442,443} Sans surprise, les études d'amarrage moléculaire ont montré que des quinuclidiniums substitués par un ester étaient stabilisés au niveau du site cation- π par des interactions cation- π dans le site actif de la BChE lors de l'hydrolyse de l'ester.⁴⁴⁴ Enfin, des bisquinuclidiniums comportant un bras espaceur aromatique entre les deux motifs sont des inhibiteurs des deux cholinestérases avec une IC_{50} autour de 1 μM .

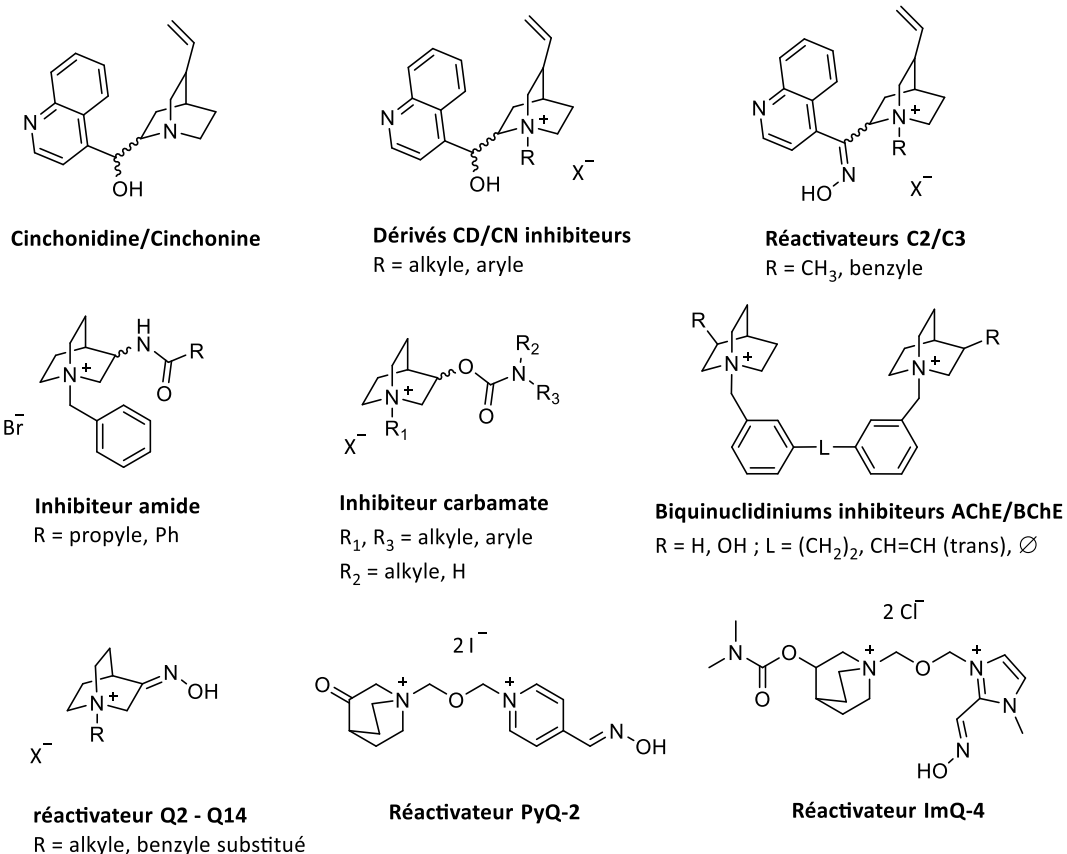


Figure 57 : Structures de la Cinchonine et de la Cinchonidine et structures générales comprenant un motif quinuclidinium d'inhibiteurs d'AChE et de BChE et de réactivateurs d'AChE et de BChE inhibées par un OP, ainsi que deux exemples de réactivateurs.^{312,314,315,441-443}

Des réactivateurs ont déjà été synthétisés avec le motif quinuclidinium, qui est soit utilisé comme fonction réactivatrice portant une oxime, soit comme ligand chargé de réactivateurs basés sur un pyridinium aldoxime ou un imidazolium aldoxime (**Q2-14**, **PyQ-2** et **ImQ-4** Figure 58). Ces derniers, en combinaison avec de l'atropine, présentent des indices de protection contre le soman et le tabun autour de 3 et allant jusqu'à 4.^{312,445,446} Les réactivateurs portant l'oxime sur le quinuclidinium ont des efficacités de réactivation très modestes sur l'AChE inhibée par le VX et le paraoxon mais sont au contraire meilleurs que le HI-6 pour réactiver la BChE inhibée par le VX et le cyclosarin.^{314,447}

Tous ces éléments portent à croire que le motif quinuclidinium pourrait permettre aux MTDAs l'incluant d'avoir une bonne affinité pour l'AChE mais aussi pour la BChE, augmentant ainsi son efficacité thérapeutique.

Au niveau des récepteurs nicotiques, de nombreuses molécules portant un motif quinuclidine ont été développées comme agonistes des nAChRs, certaines atteignent des phases avancées de tests cliniques, notamment dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (exemples Figure 58).⁴⁴⁸ Le PNU-282987

comportant un motif quinuclidine est aussi un agoniste de référence utilisé dans de nombreuses publications d'électrophysiologie sur le nAChR $\alpha 7$.⁴⁴⁹

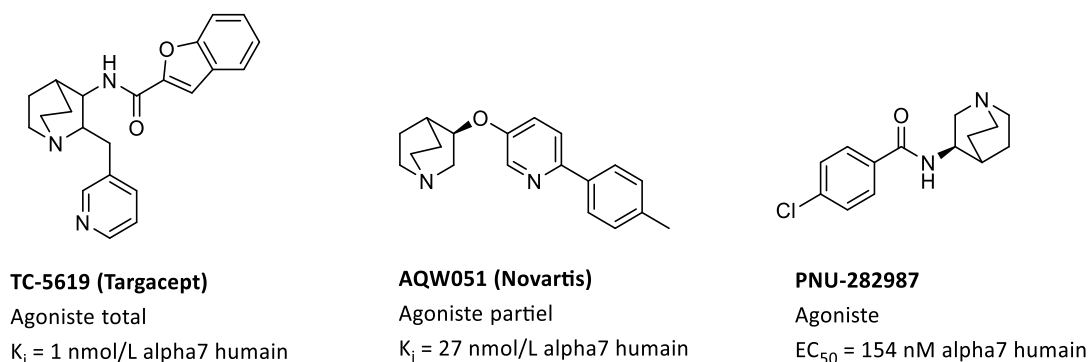


Figure 58 : Structures d'agonistes du nAChR $\alpha 7$ comportant un motif quinuclidine.^{448,449}

La quaternarisation de la quinuclidine provoque en revanche un effet antagoniste plus ou moins prononcé suivant la taille du groupe N-alkyle, comme il a été démontré par Papke *et al.* dans une étude très complète sur les différents pharmacophores du site orthostérique.⁴⁵⁰ Ainsi, des bisquinuclidiniums comportant une grande variété de structures possèdent la capacité de bloquer les jonctions neuromusculaires ou ganglioniques.⁴⁵¹ L'effet antagoniste sur les nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ a été précisé par une étude d'Arias *et al.* sur des quinuclidiniums diversement substitués, dont les IC_{50} varient de 0,4 à 18 μM .⁴⁵²

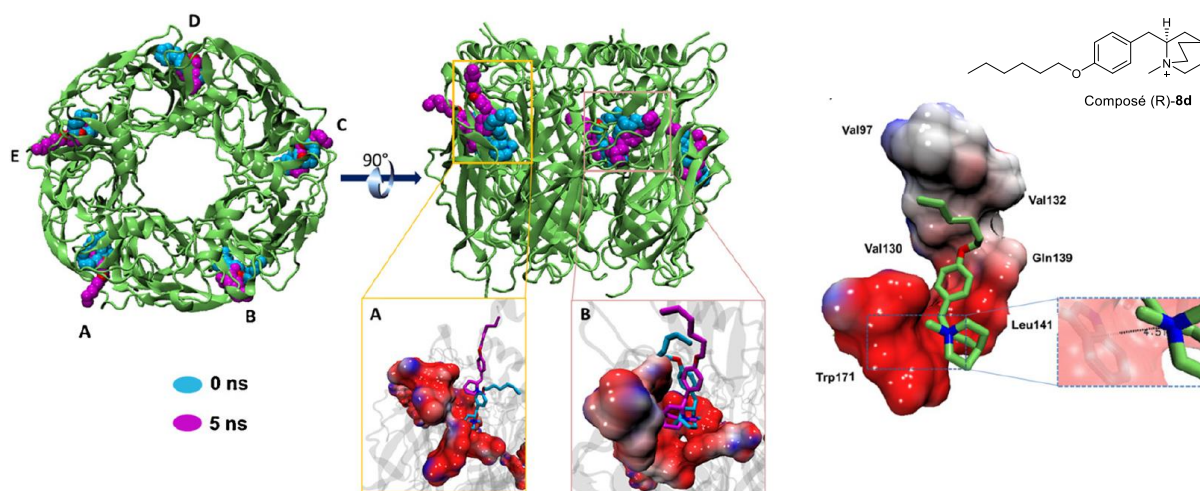


Figure 59 : Interaction entre le quinuclidinium (R)-8d et les 5 sites orthostériques du nAChR $\alpha 7$ humain à $t = 0$ (cyan) et $t = 5 \text{ ns}$ (violet) de la simulation moléculaire dynamique. Zoom (milieu) : Les interactions sont défavorables pour le site A (distance cation- $\pi > 4 \text{ \AA}$ après 5 ns) et favorables pour le site B. A droite : détail moléculaire sur l'interaction entre le composé et le composant principal d'un des sites orthostériques : liaison cation- π de 4,5 \AA avec la zone rouge électriquement riche et en particulier le Trp171. La zone blanche correspond à une zone hydrophobe (adapté de Arias, 2013)⁴⁵²

Deux sites de liaisons pour le motif quinuclidinium ont été mis en évidence par étude d'amarrage moléculaire : le site orthostérique où le quinuclidinium vient se loger dans la « box » aromatique (**Figure 59**) et un site allostérique à l'intérieur du canal. L'action est principalement compétitive sur $\alpha 7$ tandis qu'elle est plutôt allostérique sur $\alpha 4\beta 2$.

De plus, une récente étude a mis en évidence le caractère antagoniste et fortement affin de composés possédant un motif quinuclidinium pour les récepteurs muscariniques de sous-type M1, M2 et M3, avec des constantes de dissociation au niveau nanomolaire et subnanomolaire.⁴⁵³ Ce motif quinuclidinium pourrait donc avoir aussi un effet favorable sur les récepteurs muscariniques.

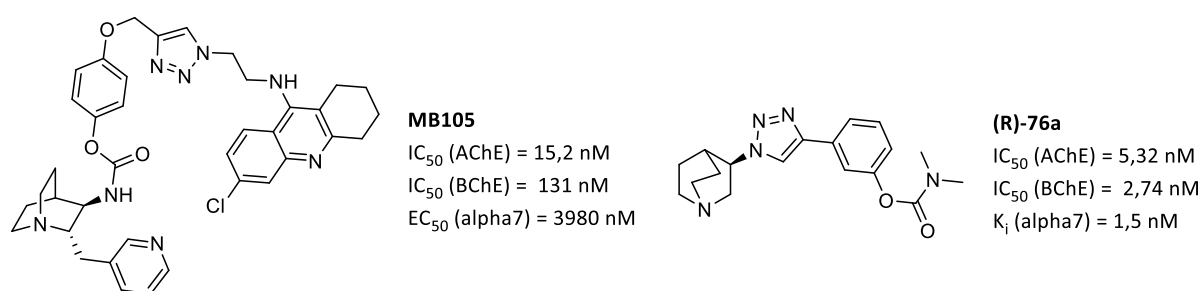


Figure 60 : Structures de composés multi-cibles phares de notre équipe, ayant pour cibles les cholinestérases et le nAChR $\alpha 7$.^{428,454}

Enfin, la conception de composés multi-cibles à la fois inhibiteurs des cholinestérases et agonistes des $\alpha 7$, grâce à l'inclusion d'un fragment comprenant le motif quinuclidine, a été démontré par notre équipe et nos partenaires, avec les travaux de la Dr. Monika Cieslikiewicz-Bouet et des travaux de thèse de la Dr. Mégane Pons.^{428,454} Le composé phare de la première étude est le **MB105** qui montre un effet inhibiteur au niveau nanomolaire sur les cholinestérases et un effet agoniste au niveau micromolaire sur les nAChRs $\alpha 7$, en combinant la structure de l'inhibiteur tacrine à l'agoniste basé sur la quinuclidine (**Figure 60**). Dans le second projet, la structure d'un autre agoniste basé sur la quinuclidine a été combinée avec celle de la rivastigmine, inhibiteur de l'AChE, donnant un composé multi-cibles inhibiteur des cholinestérases au niveau nanomolaire et ayant une constante de dissociation de 1,5 nM avec le nAChR $\alpha 7$.

Tous ces éléments convergents nous ont donc amenés à concevoir la synthèse des deux MTDAs **28** et **29** (**Figure 61**), possédant le motif quinuclidinium lié à la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime par une chaîne alkyle de 4 ou de 5 carbones.

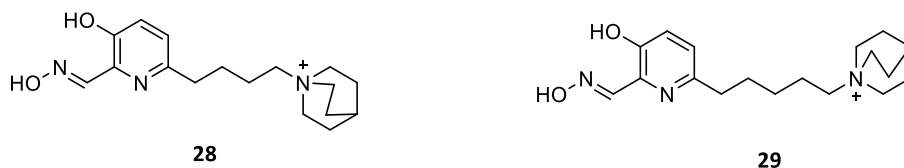


Figure 61 : Structures des MTDAs envisagés avec le motif quinclidinium.

2. CRITERES DE SELECTION *IN SILICO*

Pour affiner la sélection de ces structures comme pour celles du chapitre suivant, notre équipe utilise différents outils permettant d'avoir une simulation *in silico* des propriétés pharmacologiques des molécules visées et d'éliminer certaines structures dont les caractéristiques dévient trop fortement des valeurs attendues pour des molécules bioactives. Nous évaluons quelques propriétés physico-chimiques et pharmacologiques, le potentiel passage de la BHE et des études d'amarrage moléculaire permettent également d'évaluer si l'affinité et le positionnement de la molécule dans le site actif de l'hAChE inhibée par des OPs sont favorables à la réaction de réactivation.

2.1. Passage de la BHE et propriétés physico-chimiques

2.1.1. Critères CNS+

Plusieurs propriétés physico-chimiques des molécules ont été associées à des règles empiriques permettant d'augmenter leur potentiel médicamenteux, dont l'une des premières et la plus connue est celle de Lipinski se rapportant à la biodisponibilité orale.⁴⁵⁵ De nombreuses autres ont été élaborées par la suite, notamment sur la capacité à traverser la BHE, et ont été raffinées par des comparaisons statistiques se basant sur les bases de données des médicaments déjà approuvés et connus pour passer ou non la BHE.⁴⁵⁶ Un état des lieux fait en 2005 résume les conditions favorisant le passage d'une molécule au système nerveux central (molécule CNS+), qui se basent notamment sur la masse molaire (MW), le nombre de liaisons rotatives (RB), le nombre de donneur de liaison hydrogène (HBD), le nombre d'accepteur de liaison hydrogène (HBA), le coefficient de partage octanol/eau LogP, le plus haut pKa des groupements basiques s'il y en a, la surface polaire topologique de la molécule (TPSA), sa solubilité aqueuse, et l'affinité de la structure visée pour la glycoprotéine P (P-gp).

Pour qu'une molécule ait de bonnes chances de passer la BHE (CNS+), elle doit répondre aux critères suivants :

- MW < 450 g/mol
- RB < 8
- HBD < 3
- HBA < 7
- $7,5 < pK_a < 10,5$
- TPSA < 70 \AA^2
- LogP < 5
- solubilité > $60 \mu\text{g/mL}$
- ne pas être un substrat efficace de la P-gp

2.1.2. Score CNS MPO

En 2010 l'équipe de Wager *et al.* a publié une méthode de calcul basée sur six paramètres physico-chimiques des molécules candidates : LogP, LogD (coefficient de partage octanol/eau des différentes espèces chimiques en équilibre d'un composé à un pH donné, ici à pH 7,4), MW, TPSA, HBD et le plus haut pKa des groupements basiques s'il y en a.^{457,458} A chaque paramètre est associée certaines conditions qui déterminent un score entre 0 et 1 suivant la valeur calculée pour le composé en question. Un score CNS MPO (central nervous system multi-parameter optimization) est ainsi obtenu entre 0 et 6, 6 étant la valeur idéale.

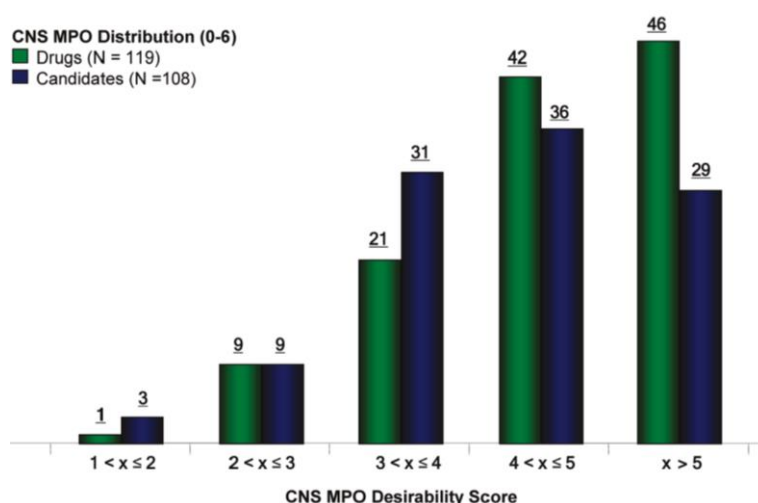


Figure 62 : Score CNS MPO de molécules candidates et de médicaments.⁴⁵⁷

Cette équipe a ensuite comparé les scores de molécules candidates et ceux de médicaments acceptés et a montré que la grande majorité des médicaments avaient un score supérieur ou égal à 4, tandis que les molécules candidates avaient des scores plus faibles (**Figure 62**). D'après cette évaluation rétrospective, avoir un score au moins égal à 4 permettrait donc d'augmenter les chances pour le candidat médicament de passer les études de phase clinique.

L'avantage de cet algorithme est qu'il permet de ne pas éliminer une molécule dont certaines propriétés auraient des valeurs ne correspondant pas aux valeurs attendues, comme pour la méthode précédente, mais au contraire de prendre en compte globalement la contribution de chacun de ces paramètres.

En effet, les méthodes de sélection par validation de chacun des paramètres choisis est remise en cause ces dernières années. Ces chercheurs font observer que les pools de médicaments ont changé entre les années 90 et 2010 et que les valeurs limites pour certains paramètres s'en trouvent statistiquement changées.⁴⁵⁹ Certains paramètres ne seraient même finalement pas corrélés au potentiel médicamenteux d'une molécule, tel que le critère sur la masse molaire. Ainsi, quelque soit la taille de la molécule, il serait plutôt conseillé de s'attacher à l'équilibre entre la solubilité aqueuse et la perméabilité de la molécule, dépendant surtout de la lipophilie ($\log D$ à pH 7,4) et du nombre de donneur de liaison hydrogène.

2.1.3. Prédiction par le logiciel Percepta

Notre équipe utilise en complément un logiciel spécifique à la prédiction du passage de la BHE : Percepta, édité par la compagnie ACD/labs. Ce logiciel fournit un graphique en deux dimensions où sont projetés en ordonnée le LogBB et en abscisse le $\text{Log}(PS \cdot f_{u, \text{brain}})$.⁴⁶⁰

Le LogBB représente l'étendue de la pénétration dans le cerveau à l'équilibre (**Figure 63**). Il est défini comme le logarithme du rapport de la concentration du composé dans le cerveau sur celle dans le sang, en faisant l'hypothèse d'une diffusion passive à travers la BHE. Les fractions totales dans le sang et dans le cerveau de la molécule sont estimées à partir d'un algorithme développé sur la base de 470 LogBB expérimentales.⁴⁶¹

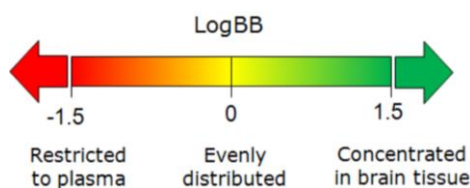


Figure 63 : Echelle de valeur de LogBB (adapté d'un document technique d'ACD/Lab).

Le $\text{Log}(\text{PS} \cdot f_{u,\text{brain}})$ correspond à la vitesse d'équilibration entre cerveau et plasma. En effet, la durée nécessaire à l'équilibration entre les deux a été mesurée *in vivo* et l'inverse du logarithme de cette durée (vu comme une vitesse) a une bonne corrélation avec le logarithme de $\text{PS} \cdot f_{u,\text{brain}}$: la fraction de produit dans le cerveau non liée à ses tissus $f_{u,\text{brain}}$, multipliée par le produit Perméabilité-Surface spécifique (PS).⁴⁶² Ce résultat tend à montrer que la molécule doit avoir le moins d'interactions non spécifiques possible avec les tissus du cerveau pour atteindre une vitesse d'équilibration rapide.

Le LogPS , qui correspond à la vitesse de pénétration dans le cerveau, est estimé par un algorithme développé à partir de 178 composés qui traversent la BHE par diffusion passive.⁴⁶³ Sa valeur est comprise entre -5 et -1, où -1 correspond à une diffusion rapide et -5 à l'absence de diffusion.

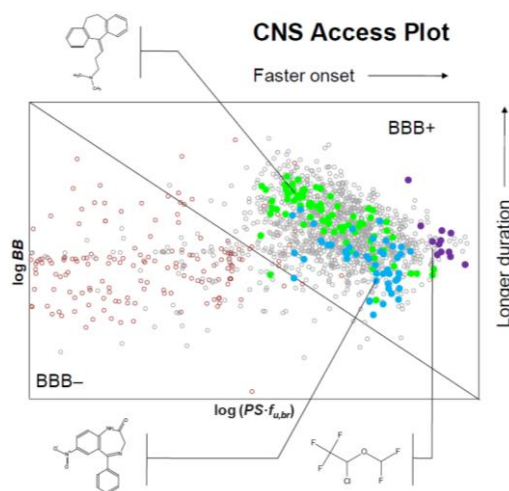


Figure 64 : Exemple de graphique de résultat fourni par le logiciel Percepta.⁴⁶⁰

Le positionnement des valeurs estimées pour la molécule visée sur le graphique LogBB fonction de $\text{Log}(\text{PS} \cdot f_{u,\text{brain}})$ permet donc la visualisation des composantes thermodynamiques et cinétiques de l'équilibre sang/cerveau permis par cette molécule (**Figure 64**). De plus, des molécules de la base de données du logiciel possédant des similarités de structure sont aussi positionnées sur le graphique pour comparaison.

Percepta fournit aussi des estimations de la toxicité via notamment une DL_{50} intrapéritonéale sur des souris de la molécule choisie, sur la probabilité que la molécule soit prise en charge par la glycoprotéine P, ainsi que sa solubilité aqueuse.

2.1.4. Calculs et détermination des différents paramètres

Les données physico-chimiques sont calculées à partir de Percepta, du site internet <https://chemicalize.com> et du site internet www.swissadme.ch (**Tableau 17**). SwissADME calcule

notamment la solubilité aqueuse, suivant trois modèles basés sur des relations entre celle-ci et les autres paramètres physico-chimiques.⁴⁶⁴ La solubilité est donnée ici sous forme de fourchette entre la valeur la plus basse et la plus haute des trois modèles. A ces critères, il nous est apparu logique d'ajouter une évaluation de la valeur du pKa de l'oxime, puisqu'il s'est avéré que c'était un critère déterminant pour les réactivateurs possédant ce nucléophile alpha (Introduction, partie 3.5.5.).

Paramètre		Chemicalize	Percepta	SwissADME
Nombre de liaisons rotatives	RB	X	X	
Nombre de donneurs de liaisons hydrogène	HBD	X	X	
Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène	HBA	X	X	
Surface polaire topologique	TPSA	X	X	
pKa oxime		X		
pKa le plus élevé des fonctions basiques		X		
Coefficient de partage octanol/eau à pH 7,4	LogD	X		
Coefficient de partage octanol/eau	LogP	X	X	
Fraction de produit au cerveau, non liée aux tissus	f_{u,brain}		X	
Pénétration de la BHE à l'équilibre	LogBB		X	
Vitesse de diffusion passive à travers la BHE	LogPS		X	
Log (PS*f_{u,brain})			X	
Substrat de la glycoprotéine P			X	
Dose létale médiane intrapéritonéale sur des souris	DL₅₀		X	
Solubilité aqueuse		X (sauf composé chargé)	X	X (fourchette basée sur trois résultats)

Tableau 17 : Outils de calculs utilisés pour estimer les valeurs des différents paramètres des structures de MTDA visées.

2.2. Affinité et positionnement dans l'AChE phosphylée : amarrage moléculaire

Nous avons choisi de procéder à des études d'amarrage moléculaire uniquement sur l'AChE humaine (hAChE) car c'est la cible principale d'une intoxication. De plus, pour le récepteur nicotinique $\alpha 7$, qui est le nAChR sur lequel nos MTDA sont d'abord testés (les nAChRs musculaires sont testés dans un deuxième temps), sa structure n'a été résolue qu'en 2021.³⁶⁵ Avant cela les études d'amarrages réalisées dans la littérature ont été faites sur l'AChBP qui est une protéine soluble dans l'eau libérée

dans la fente synaptique chez certaines espèces de mollusque où elle se lie avec l'acétylcholine.³⁸⁹ Or sa structure est homologue à la partie extracellulaire des nAChRs homomériques, pentamères de cinq chaînes identiques. Le site orthostérique est donc semblable, à l'interface entre deux chaînes. Cependant nous manquons d'expérience sur les études d'amarrage sur le site orthostérique de cette protéine : en particulier, pour que les études d'amarrage moléculaire puissent avoir de bonnes chances d'être proches du mode effectif de liaison de la molécule et de ses interactions avec la protéine cible, il faut effectuer un certain nombre de choix permettant de limiter les temps de calcul, comme le choix de la position et de la taille de la « boîte », qui correspond à la partie de la protéine où les ligands seront positionnés pour ces études de simulation d'énergie de liaison.

La structure tridimensionnelle d'une protéine offrant une certaine flexibilité quant au positionnement des chaînes latérales des acides aminés, il est primordial de connaître, parmi les résidus présents dans la « boîte », les acides aminés dont la position des chaînes latérales ne changent que peu (acides aminés statiques), et ceux qui offrent plus de flexibilité, qui seront les seuls pour lesquels le logiciel d'amarrage moléculaire considérera plusieurs poses possibles (acides aminés flexibles). Il faut aussi avoir une bonne évaluation de leur état de protonation, et des molécules d'eau constitutionnelles, etc. Enfin, pour les modulateurs allostériques, aucun site de liaison n'est encore connu avec certitude pour les molécules choisies.

Les études d'amarrage moléculaire ont été réalisées par le Dr José Dias et la doctorante Ophélie Da Silva à l'IRBA sur l'hAChE inhibée par différents OPs, l'équipe de l'IRBA possédant l'expérience nécessaire sur l'AChE.

2.2.1. Préparation du site de liaison

La structure 3D de l'hAChE inhibée par un OP, obtenue par co-cristallisation (ou trempage) et résolue par diffraction aux rayons X, est d'abord choisie comme structure de départ. La zone d'amarrage doit ensuite être préparée en enlevant notamment les molécules d'eau. Les coordonnées 3D de la boîte où se déroulera l'étude d'amarrage doivent inclure le site actif et sont déterminées pour qu'elle ne soit pas trop petite, ce qui fournirait des résultats moins précis avec certaines interactions manquantes, ni trop grande, ce qui augmenterait la longueur des temps de calcul. Les acides aminés sont ensuite protonés suivant l'état des connaissances sur leur forme acido-basique prédominante à pH physiologique. L'étude peut être faite avec des acides aminés statiques ou bien flexibles. Il a en effet été montré en comparant des structures cristallographiques de l'AChE que certains résidus montraient une certaine flexibilité suivant le ligand associé, en particulier au niveau du site périphérique et de la

gorge.^{224,465,466} Dans ce cas les résidus sont divisés en deux groupes : ceux restant statiques et ceux pouvant être flexibles (Tyr72, 124, 341 et 337 et Trp286). Cette méthode allonge cependant grandement les temps de calcul. Le site de liaison est enfin converti dans un format utilisable par le logiciel de simulation.

2.2.2. Préparation du ligand

La structure est générée sur Chembiodraw et différentes formes ioniques du ligand à pH physiologique peuvent être testées s'il y en a, pour analyser l'impact des formes protonées ou déprotonées sur l'affinité pour le site actif. La structure 3D est ensuite obtenue par minimisation de l'énergie de la molécule grâce à l'application d'un champ de force, ici le MMFF94 (Merck Molecular Force Field).⁴⁶⁷ Le ligand est ensuite converti dans un format utilisable par le logiciel de simulation.

2.2.3. Résultats

Les calculs d'amarrage moléculaire sont réalisés avec le logiciel AutodockVina à partir des deux fichiers précédents. A la fin du processus, le logiciel présente les conformations différentes les plus stables du ligand dans le site, dont le nombre peut être choisi, 10 conformations étant en général demandées. A chaque conformation est associée une énergie de liaison négative en kcal/mol. Plus celle-ci est basse, plus la conformation est stable et donc la molécule affine. Cependant des ligands présentant des énergies de liaison particulièrement basses ne seront pas forcément choisis pour être synthétisés car cela pourrait signifier une affinité trop importante pour l'enzyme, risquant potentiellement d'en faire un inhibiteur de l'enzyme native, malgré les différences structurelles.

Les différentes conformations peuvent être visualisées avec Pymol (<https://pymol.org/2/>) ou Discovery studio (<https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>) pour analyser comment est positionné l'oxime dans le site actif, s'il est bien dirigé vers le phosphore et la distance l'en séparant, ainsi que les différentes interactions possibles entre le ligand et les résidus du site actif. Plus le nombre de conformations présentant un positionnement favorable de l'oxime sur les 10 obtenues est grand, plus celle-ci a de chances d'advenir lorsque ce ligand entrera réellement dans le site actif. Une des conformations est en général choisie pour sa valeur représentative de la majorité des conformations favorables obtenues.

3. SELECTION *IN SILICO*

3.1. Passage de la BHE

3.1.1. Percepta

Le logiciel Percepta prévoit qu'aucune des quatre structures de MTDAs envisagées ne puisse agir au niveau du système nerveux central (SNC) (**Tableau 18** et **Figure 65**). Pourtant, le passage à travers la BHE du réactivateur 2-PAM, lui aussi mono-chargé, a été mesuré et, bien que faible, n'est pas négligeable. Or son LogP calculé est de -3,3, il est donc bien moins lipophile que les structures envisagées. Ces résultats de Percepta sont donc à prendre avec précaution. Le passage de la BHE n'en sera pas moins difficile pour ces molécules à cause de leur hydrophilie qui se traduit par un LogP négatif et rend leur vitesse de diffusion passive à travers la BHE LogPS très faible. Au contraire, à l'équilibre, ces molécules peuvent être partagées de façon égale entre plasma et cerveau puisque LogBB est de 0.

Composé	Substrat de P-gp		LogP	LogBB	f _{u,brain}	LogPS	Log(PS* f _{u,brain})	Pénétration au cerveau
	Probabilité (%)	Indice de Confiance						
26	Oui à 62%	limite	-2,19	-0,01	0,99	-4,7	-4,7	Non suffisante
27	Oui à 65%	limite	-2,46	0	0,99	-4,8	-4,8	Non suffisante
28	Oui à 69%	limite	-1,31	-0,01	0,98	-4,3	-4,3	Non suffisante
29	Oui à 70%	limite	-1,31	-0,02	0,97	-4,1	-4,1	Non suffisante

Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques déterminées par le logiciel Percepta pour estimer l'activité des molécules de ce chapitre au SNC. P-gp : glycoprotéine P

Le ligand pipérazinium semble le plus hydrophile, ce qui fait du composé **27** le moins apte à traverser efficacement la BHE. En revanche, comme attendu, le ligand quinuclidinium apporte une plus grande lipophilie qui permet aux composés **28** et **29** d'avoir une vitesse de pénétration de la BHE LogPS plus grande.

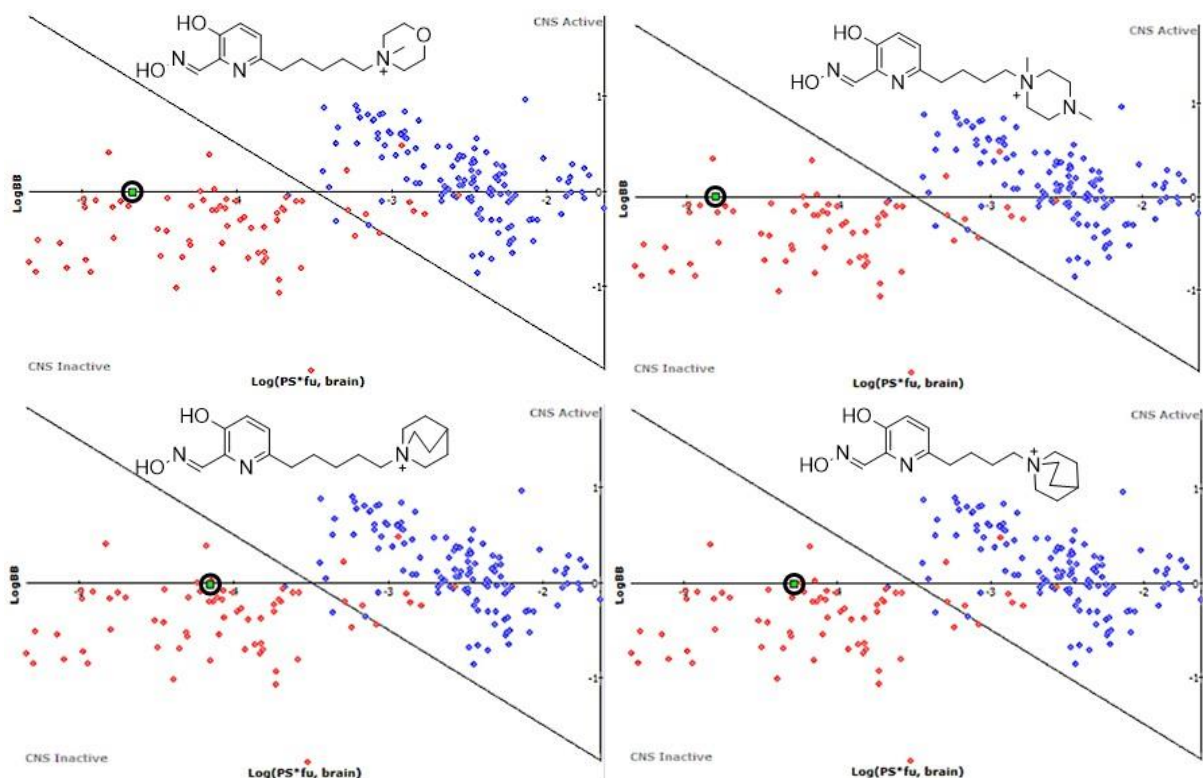


Figure 65 : Résultats de prédiction de pénétration dans le cerveau pour les molécules **26**, **27**, **28** et **29**. La partie gauche du graphique \log_{BB} fonction de $\log(PS^*f_{u,brain})$ représentent les molécules inactives au SNC (molécules rouges) et la partie droite les molécules actives au SNC (molécules bleues).

Ces structures semblent aussi être de potentiels substrats de la glycoprotéine P mais la confiance donnée sur les probabilités annoncées est faible. Cependant, si ces molécules atteignent les tests *in vivo*, ce devrait être un point à vérifier.

3.1.2. Modèles basés sur les propriétés physico-chimiques

3.1.2.1. Score CNS MPO et critères CNS+

Ces résultats négatifs issus du logiciel percepta du point de vue du passage de la BHE peuvent être relativisés avec l'analyse des propriétés physico-chimiques des quatre composés qui permettent de calculer leur score CNS MPO et de vérifier leur caractère CNS+ (**Tableau 19**). Là aussi la charge permanente de ces composés les empêche de valider le critère CNS+ d'un pKa entre 7,5 et 10,5, puisque ce paramètre sert à mesurer l'ionisation à pH physiologique, qui est totale pour ces composés. Cependant, excepté une valeur très légèrement excessive pour la TPSA du composé **26**, tous les autres critères CNS+ sont remplis par ces composés. Le passage de la BHE reste donc envisageable.

En ce qui concerne le score CNS MPO, cet algorithme a été conçu pour des molécules neutre ionisables, les valeurs sont donc données à titre indicatif, en ayant considéré un score de 0 pour le critère sur le

pKa du groupement basique de la molécule, qui mesure l'ionisation de la molécule, puisqu'elles sont totalement ionisées.

Composé	MW (g/mol)	pKa base	RB	HBD	HBA	TPSA (Å ²)	LogP		LogD à pH 7,4	Score CNS MPO	CNS+
							P	C			
26	308.4	⊕	7	2	5	74,94	-2,19	-2,10	-0,5	4,45	X
27	307.4	⊕	6	2	5	68,95	-2,46	-2,47	-0,83	4,45	X
28	304.4	⊕	6	2	4	65,71	-1,31	-1,66	-0,01	4,45	X
29	318.4	⊕	7	2	4	65,71	-1,31	-1,21	0,38	4,45	X
Critères CNS+	< 450	> 7,5 < 10,5	< 8	< 3	< 7	< 70	< 5				

Tableau 19 : Propriétés physico-chimiques déterminées par Chemicalize (C) et Percepta (P) des molécules de ce chapitre, ainsi que leur score CNS MPO et leur respect des critères CNS+ pour évaluer leur activité au SNC. ⊕ : charge permanente.

De plus, en regardant le coefficient de partage octanol/eau logD qui prend en compte les différentes formes des composés à pH physiologique, on peut noter que leur hydrophilie est bien moins prononcée à pH 7,4 que ne le laisse supposer le LogP. Le ligand quinuclidinium permet là aussi un surcroît de lipophilie qui permet aux composés **28** et **29** d'avoir un équilibre entre hydrophilie et lipophilie.

3.1.2.2. Autres propriétés

Si l'hydrophilie de ces composés peut poser un problème pour le passage de la BHE, il leur permet d'avoir de bonnes solubilités aqueuses, assurant de ne pas avoir de problèmes de solubilisation pour les tests *in vitro* (Tableau 20). On peut noter la différence d'échelle d'un facteur 100 entre les modèles utilisés par SwissADME et celui de Percepta. Cependant la tendance reste la même entre les différents composés.

Structure	pKa oxime	Solubilité LogS à pH 7,4 (mg/mL)		DL ₅₀ IP (souris) (mg/kg)
		Percepta	SwissADME	
26	10,4	39,4	0,017 – 0,98	67
27	7,97	157	1 - 4	56
28	7,97	20,4	0,014 -0,24	65
29	10,4	11,4	0,006 – 0,15	60

Tableau 20 : Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques supplémentaires déterminées par Chemicalize, Percepta et SwissADME.

Le pKa de l'oxime est simulé par Chemicalize, qui indique néanmoins que les calculs pour ce type de fonction chimique sont à prendre avec précaution. Ils sont donc indiqués pour observer des tendances plus que des valeurs précises. Il semblerait donc que la longueur du bras espaceur influence le pKa de l'oxime, avec des valeurs dans l'ordre de grandeur désiré pour **27** et **28**, comportant un bras espaceur de 4 carbones, et des valeurs plus éloignées pour **26** et **29**, comportant un bras espaceur de 5 carbones.

Enfin, la toxicité de ces composés apparaît potentiellement non négligeable au vu de leur DL₅₀, même si le logiciel Percepta indique une confiance modérée dans ces résultats. Pour comparaison, la DL₅₀ de 220 mg/kg établie au premier chapitre pour le RM048, qui est considéré comme peu toxique, est 4 fois supérieure. Ce point devrait donc être aussi vérifié lors de potentiels tests *in vivo*.

Nous avons jugé que ces éléments étaient suffisamment satisfaisants pour envisager la synthèse des quatre composés à ce stade, bien que le passage de la BHE pour ces composés chargés reste un défi, en particulier avec le ligand pipérazinium.

3.2. Etude d'amarrage moléculaire sur l'ACHé inhibée

L'étude d'amarrage moléculaire a été réalisée par José Dias et Ophélie Da Silva à l'IRBA pour les quatre structures sur l'hACHé phosphorylée par le VX et le sarin, avec résidus flexibles. Les poses représentatives des conformations favorables à la réactivation de l'enzyme parmi les dix poses obtenues sont présentées dans le **Tableau 21**, avec les énergies de stabilisation associées et la distance entre le phosphore et l'oxygène de l'oxime. Sur les **Figures 67** et **68** n'apparaissent que les acides aminés flexibles, excepté le Trp86 avec le composé **27**.

Composé	hACHé-VX			hACHé-sarin			
	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°	Conformations favorables
26	-8,3	4,3	3	-8,5	7,2	4	5/10
27	-8,3	4,2	1	-7,6	7,1	3	4/10
28	-9,5	7,5	2	-8,6	11,8	3	3/10
29	-9,2	5,6	4	-9,5	6,7	2	2/10

Tableau 21 : Résultats d'étude d'amarrage moléculaire des ligands **26** à **29** sur l'ACHé phosphorylée par le VX et le sarin, réalisée à l'IRBA. ΔG : énergie de stabilisation.

Globalement, les énergies de stabilisation des ligands sont satisfaisantes, proches des valeurs idéales de -10/-11 kcal/mol. On peut cependant noter que le composé **27** présente des énergies de

stabilisation plutôt faibles, en particulier avec le sarin, conséquence d'un faible nombre d'interactions spécifiques.

Quatre poses sont néanmoins favorables à la réactivation de l'enzyme. De plus, son positionnement dans l'hAChE-VX, à l'instar du composé **26**, lui permet aussi d'avoir une distance idéale entre l'oxime et le phosphore de 4,2 Å (**Figure 67**). En revanche, dans les autres cas, tous les composés échouent à se positionner dans le site actif pour avoir une telle distance entre l'oxygène de l'oxime et le phosphore (entre 4 et 5 Å) lorsque la pyridine est dirigée vers le site catalytique, avec plutôt des valeurs autour de 7 Å, ce qui n'est cependant pas rédhibitoire. Dans les conformations non productives, on observe en général la pyridine au niveau du site périphérique et l'ammonium au niveau de la gorge, stabilisé par des interactions de type cation- π .

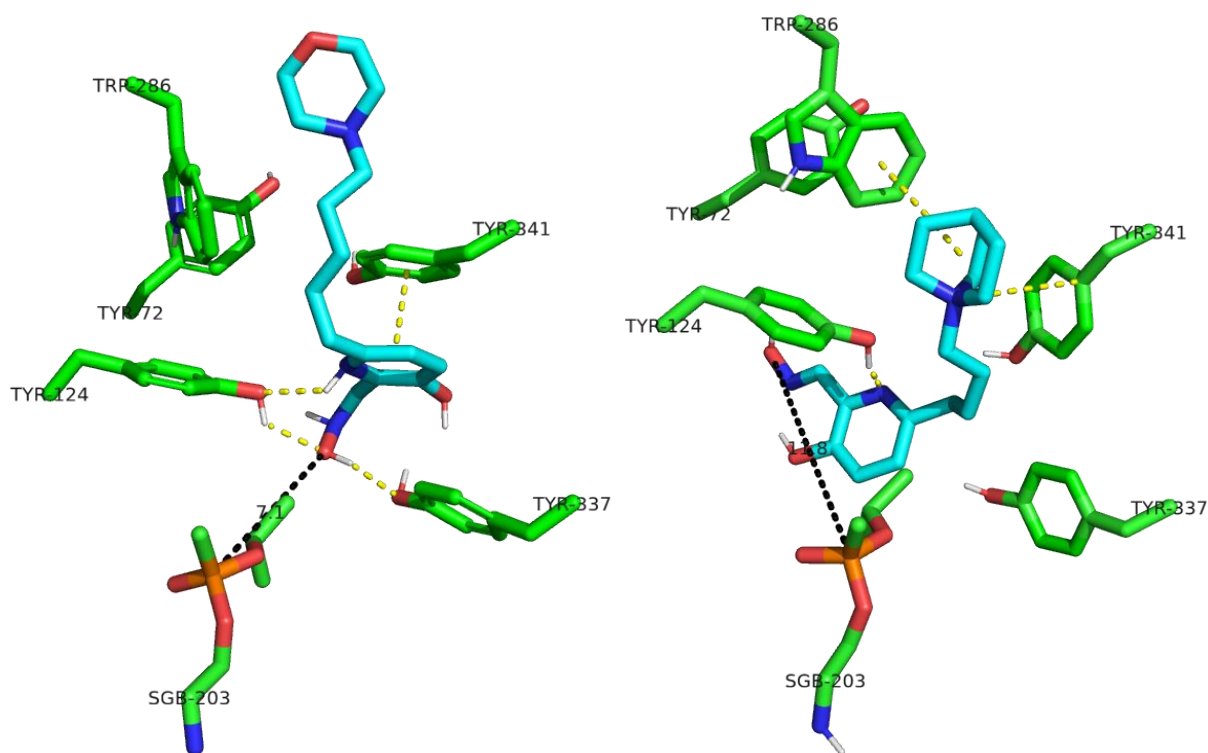


Figure 66 : Conformations respectives n°7 et n°1 de **26** et de **28** dans le site actif de l'hAChE phosphylée par le sarin.

Ces distances P-O excessives sont plus marquées pour le sarin où l'on observe que le groupement O-isopropyle bloque en partie l'accès de l'oxime au phosphore. Le composé **26** est malgré tout prometteur pour réactiver l'enzyme inhibée par cet OP, avec 5 conformations productives sur 10. Les conformations favorables présentent la pyridine au niveau de la gorge, stabilisée par π -stacking avec la tyrosine 341, ce qui dirige l'oxime vers l'adduit phosphylé (**Figure 66**). Celui-ci peut, de plus, être stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène.

Un tel positionnement est aussi observé pour deux conformations du composé **28** avec l'hAChE-sarin, mais à des distances malheureusement encore plus grandes de l'adduit. La conformation la plus favorable de **28** présente cependant bien la pyridine positionnée au fond du site catalytique, mais l'oxime est dirigée à l'opposé de l'adduit phosphorylé, avec une potentielle liaison hydrogène entre le résidu Tyr124 et la pyridine, ainsi que des interactions hydrophobe et cation- π pour le ligand quinuclidinium (**Figure 66**). Etant donné que les distances P-O obtenues pour ces trois conformations sont supérieures à 10 Å et que les sept autres conformations sont défavorables, l'efficacité de réactivation de **28** dans le cas du sarin serait potentiellement faible.

Le rallongement du bras espaceur entre **28** et **29** permet des positionnements plus favorables en permettant à la pyridine de contourner l'isopropyle de l'adduit du sarin tandis que son ligand quinuclidinium est potentiellement stabilisé par une liaison cation- π avec le résidu Tyr341. Cependant, seules deux conformations sur dix sont favorables à la réactivation de l'enzyme.

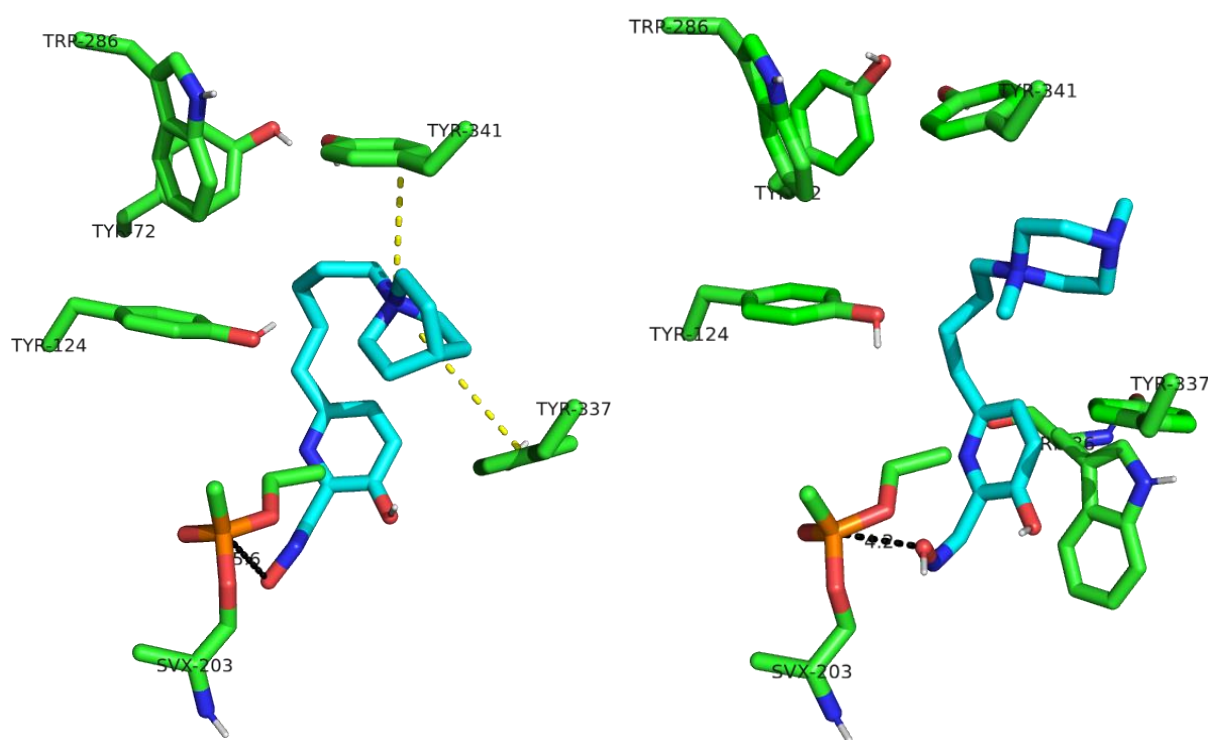


Figure 67 : Conformations respectives n°4 et n°1 de **29** et de **27** dans le site actif de l'hAChE phosphorylée par le VX.

Dans le cas du VX, le composé **29** retrouve cette interaction entre le quinuclidinium et le résidu Tyr341, à laquelle peut s'ajouter une interaction hydrophobe avec Tyr337 (**Figure 67**). La distance P-O de 5,6 Å qui en résulte promet une réactivation plus efficace qu'avec le sarin.

La conformation la plus favorable observée pour **26** sur l'hAChE-VX est en tout point similaire et permet d'obtenir une distance P-O encore plus courte.

De plus, cette interaction avantageuse du ligand chargé avec le résidu Tyr341 place aussi la pyridine du composé **28** vers l'adduit phosphorylé du VX dans la majorité des 10 conformations, ce qui est prometteur.

En conclusion, les ligands ammonium de ces quatre structures leur permettent d'avoir de bonnes affinités pour le site actif et un positionnement favorable à la réactivation de l'hAChE inhibée par le VX. L'accès au phosphore est plus difficile dans le cas du sarin, mais la réactivation est un phénomène dynamique et les positionnements étudiés restent donc satisfaisants pour envisager l'attaque nucléophile à partir d'un complexe de Michaelis-Menten suffisamment stable. Les résultats de **28** et **29** laissent cependant penser que leurs réactivations pourraient être un peu moins efficaces sur cet OP.

4. OBJECTIF

Les éléments disponibles dans la littérature sur les ammoniums quaternaires nous permettent de penser qu'ils peuvent être des ligands prometteurs pour les cholinestérases comme pour les nAChRs. De plus, les études *in silico*, si elles ont pu soulever certains points d'attention, ne permettent d'éliminer aucune des structures envisagées, **26**, **27**, **28** et **29**, et confirment des interactions favorables avec le site actif de l'AChE.

Le premier objectif était de vérifier quel effet pouvait avoir la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime sur la deuxième cible envisagée : les nAChRs. Ensuite, une quantité suffisante de produit devait être synthétisée pour les tests *in vitro* sur l'hAChE (10 -20 mg) et sur les nAChRs (au moins 1 mg), avec une pureté supérieure à 95% et une solubilité convenable dans l'eau. En cas de tests *in vitro* prometteurs, au moins 300 µmol de produit devaient être à nouveau synthétisés pour les tests *in vivo*.

5. SYNTHÈSE

5.1. Concept multi-cibles : synthèse de la fonction réactivatrice seule

Le développement de composés multi-cibles nécessite de mesurer l'action de chaque ligand sur la cible pour laquelle il n'est pas destiné au départ, afin de vérifier qu'il ne compromettra pas de façon rédhibitoire l'effet du composé dans sa globalité sur cette cible (il faut noter qu'il est aussi possible

que le motif puisse au contraire améliorer l'effet du composé multi-cible en ajoutant des interactions favorables). La fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime a donc été synthétisée pour mesurer son effet sur les récepteurs nicotiniques.

La synthèse a été réalisée à partir de l'acide 3-hydroxy picolinique **7** et a démarré par son estérification, avec un bon rendement de 76% (**Schéma 15**). Le phénol a ensuite été protégé par benzyltion pour pouvoir procéder à la réduction consécutive de l'ester. Cette benzyltion a été faite selon le protocole déjà établi, avec là aussi un bon rendement.

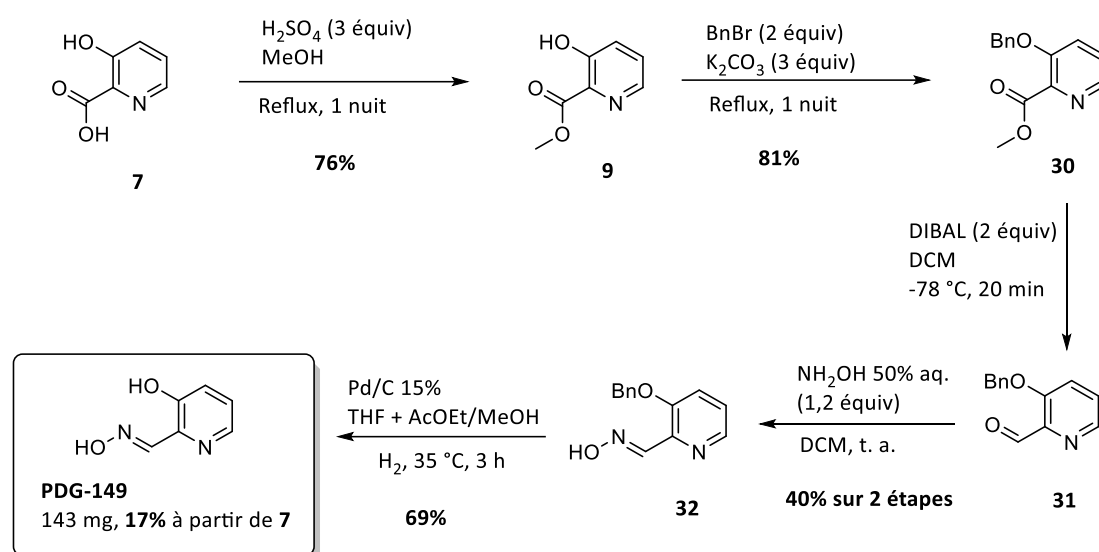


Schéma 15 : Voie de synthèse de la fonction réactivatrice seule.

La réduction au DIBAL à -78 °C de l'ester **30** a semblé se réaliser quantitativement mais malheureusement, des traces de l'ester **30** ont été observées lors du contrôle CCM de l'étape suivante, ce qui explique sans doute le rendement assez faible obtenu lors de la transformation de l'aldéhyde **31** en oxime. L'ester **30** restant, ayant un rapport frontal très proche de celui de l'oxime **32** sur CCM, a pu en être séparé avec un éluant DCM/EtOH 9/1 par chromatographie flash.

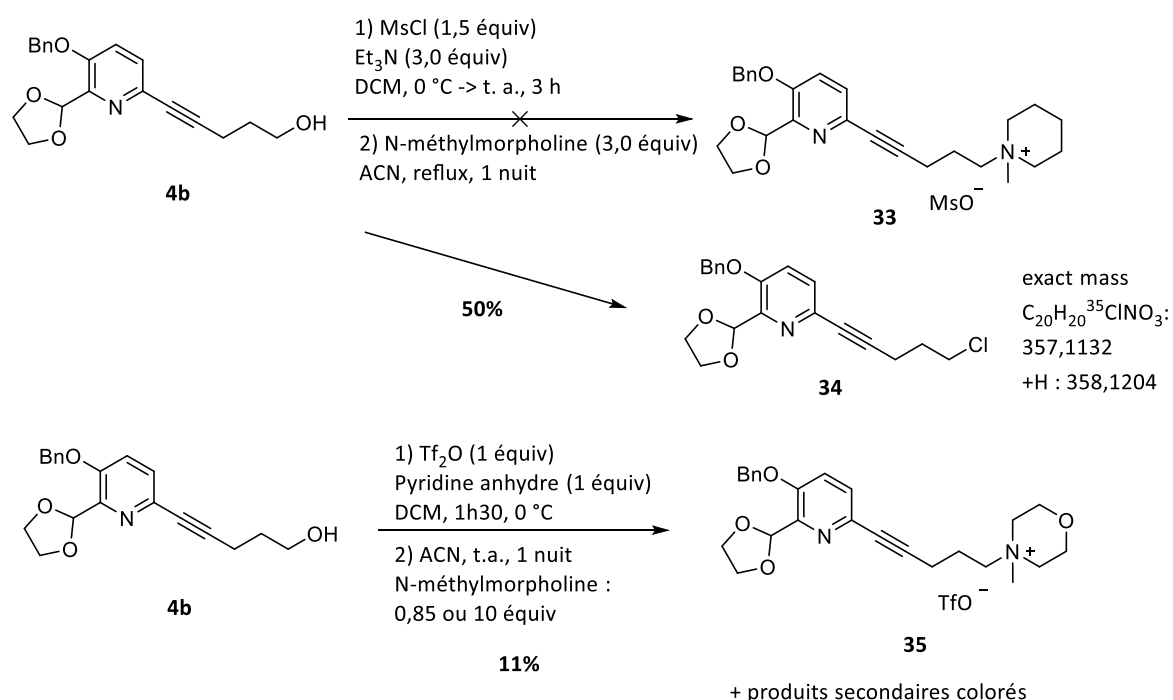
L'oxime **32** a alors pu être engagé dans la dernière étape de synthèse, la débenzylation du phénol par hydrogénolyse. Lors d'une hydrogénolyse, la présence d'une fonction oxime non protégée peut potentiellement conduire à des rendements faibles en raison du manque de stabilité de cette fonction chimique dans ces conditions. Néanmoins, des résultats présentés par l'équipe de Rachid Baati lors d'une réunion d'avancement du projet ANR CNS antidotes, montraient que cela était possible avec des rendements satisfaisants. Un contrôle par TLC-MS régulier sur les 3 h de réaction a donc permis d'obtenir **PDG-149** avec 69% de rendement après purification par chromatographie flash. Il faut cependant noter que le produit benzylé **32** était insoluble dans le méthanol et a donc dû être solubilisé

dans du THF, avec 10% de (AcOEt/MeOH 1/1), à 35 °C. Cette synthèse a donc permis d'obtenir 143 mg du composé **PDG-149** en 5 étapes avec un rendement global de 17%.

5.2. Synthèse du MTDA **26** portant le ligand méthylmorpholinium

Les synthèses des MTDA ont été envisagées selon les voies de synthèse développées pour les réactivateurs non chargés présentés dans le chapitre précédent. Deux voies sont là aussi possibles : l'une plus convergente, en liant séparément le bras espaceur avec le ligand avant de coupler le fragment obtenu sur la pyridine, et l'autre plus linéaire, en ajoutant le ligand sur la pyridine déjà fonctionnalisée par une chaîne de 4 ou 5 carbones (**Schéma 7**, page 130).

Dans un premier temps, la voie linéaire a été testée pour la synthèse du composé **26**, à partir de l'intermédiaire **4b**, dont la synthèse a été présentée au **Schéma 9**, page 132. Pour effectuer l'étape suivante de substitution nucléophile de la N-méthylmorpholine en excès sur le composé **4b** (**Schéma 16**), l'activation de cet alcool a d'abord été envisagée avec du chlorure de mésyle. La conversion en mésylate de **4b** est quasiment totale en 3 h mais l'étape suivante n'a pas permis de former le produit désiré **33**.



*Schéma 16 : Tentatives de substitution nucléophile de la N-méthylmorpholine sur l'alcool **4b** activé soit par un mésylate soit par un triflate.*

Le contrôle CCM montrait la formation d'un produit moins polaire que le produit de départ, ce qui ne correspondait pas au produit **33**. L'analyse RMN du brut réactionnel n'a pas permis de conclure quant

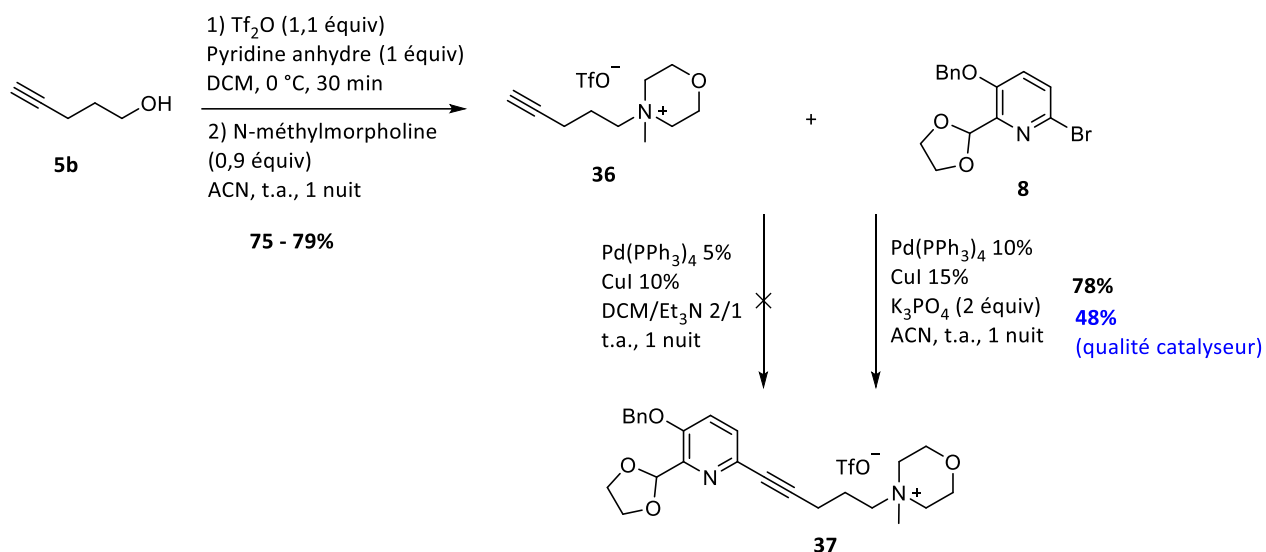
à la formation du produit **33** tandis que la purification par chromatographie flash a permis d'isoler un produit dont l'analyse RMN et HRMS (trouvée : 358,1193) correspondent au produit **34**. Ce produit est formé avec un rendement de 50%, très probablement par substitution nucléophile entre l'ion Cl⁻ libéré lors de la réaction et le mésylate formé. Même avec un excès, la nucléophilie de la *N*-méthylmorpholine ne semble pas suffisante pour réagir sur le mésylate ou le dérivé chloré **34** généré *in situ*.

Nous avons donc envisagé une autre activation de l'alcool **4b**, en formant le triflate correspondant par réaction avec de l'anhydride triflique, le triflate étant un meilleur groupe partant que le mésylate. Afin de générer le triflate, nous nous sommes basés sur le protocole utilisé par Quagliotto *et al.*, qui consiste à ajouter goutte à goutte une solution anhydre équimolaire de l'alcool et de pyridine à une solution d'anhydride triflique.⁴⁶⁸ L'acide triflique qui se dégage au cours de la réaction peut ainsi former un sel avec la pyridine, qui est facilement éliminé à la fin de la réaction par un simple traitement aqueux. Ce protocole avantageux en termes de purification et d'efficacité a également été utilisé par la suite pour toutes les synthèses des produits intermédiaires de type ammonium. Le triflate obtenu a ensuite été immédiatement mis en solution dans l'ACN sec sous argon avec un défaut de *N*-méthylmorpholine (0,85 équiv) pour conduire à un mélange brut particulièrement complexe de produits de couleurs différentes et de polarités croissantes. Il a été néanmoins possible d'isoler par chromatographie le produit **35** avec un rendement de seulement 11%.

La réaction a été à nouveau réalisée avec un large excès d'amine (10 équiv) et une solution 20 fois plus diluée, malheureusement ces conditions n'ont pas permis d'obtenir le produit **35** avec un meilleur rendement (11%), les autres fractions isolées étant des produits de dégradation, correspondant notamment à des dimères de **4b** selon l'analyse HRMS effectuée dessus. Nous en avons conclu que ce faible rendement provenait d'une concurrence entre la triflation de l'alcool et de l'azote de la pyridine, menant à cette variété de produits.

Au vu des problèmes rencontrés, nous avons envisagé la seconde voie de synthèse plus convergente, qui a permis d'obtenir le composé **37** avec plus de succès (**Schéma 17**). La formation du sel de morpholinium, dès le début de la synthèse, était de plus supposée éviter des étapes de protection/déprotection de la pyridine, qui auraient été nécessaires si la formation de l'ammonium était réalisée dans les dernières étapes. Cependant, la protection de la pyridine n'apparaît pas forcément nécessaire suivant les substrats, selon les résultats d'une publication rapportant la formation de réacteurs chargés très semblables aux nôtres,⁴⁶⁹ qui seront discutés à la fin de cette partie.

La synthèse globale du composé **26** a été répétée une seconde fois pour obtenir les quantités nécessaires aux tests *in vivo* (en bleu sur les schémas).



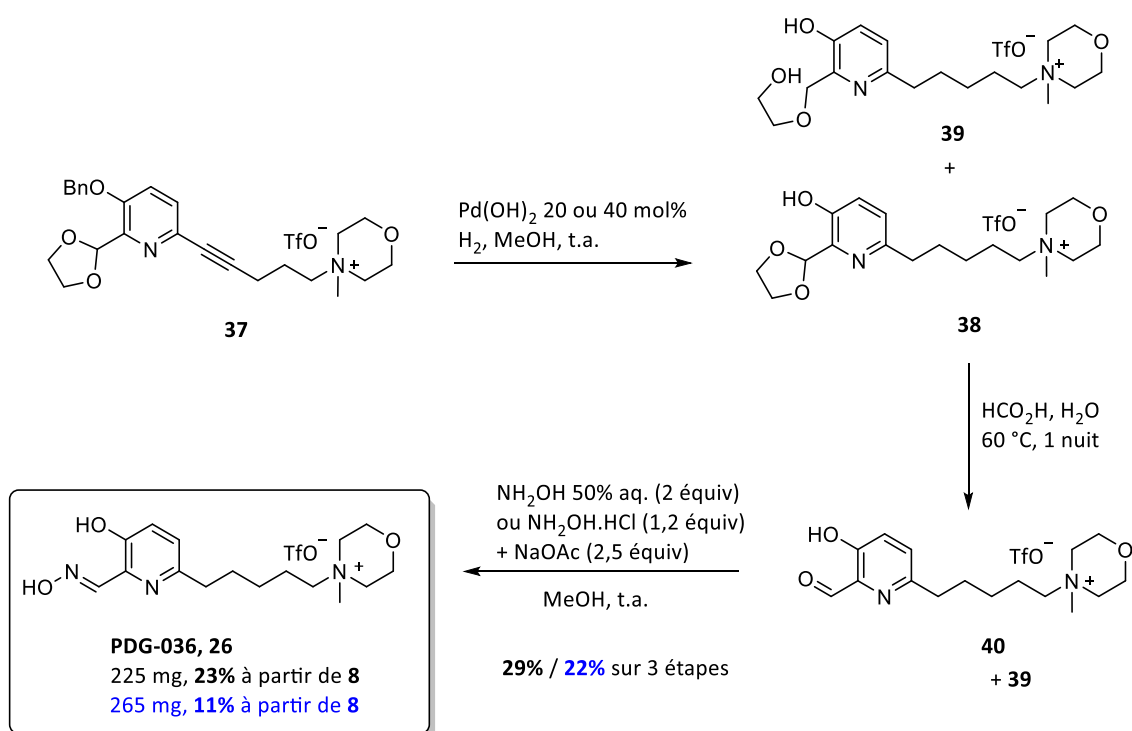
Schema 17 : Premières étapes de la synthèse de **26**

Le même protocole a été utilisé avec la N-méthylmorpholine et le pentynol **5b** (via la formation du triflate) et fournit cette fois le produit attendu **36** avec de bons rendements de 75-79%. Il est de plus adaptable sur de grandes quantités puisque 1,8 g de **36** ont pu être obtenus en une fois avec 75% de rendement. La purification par chromatographie nécessite néanmoins des conditions précises d'éluion en utilisant un gradient lent de 100/0 à 95/5 en DCM/MeOH. La conservation de ces sels d'ammonium s'est faite à température ambiante dans un dessiccateur dédié sous vide en présence de produit desséchant, où, sauf exception, ils étaient généralement très stables, sur plusieurs mois au moins pour certains.

Le couplage de Sonogashira a ensuite été testé avec les conditions classiques entre cet alcyne fonctionnalisé **36** et l'intermédiaire **8** (dont la synthèse a été présentée au chapitre précédent, **Schéma 8**, page 131). Malheureusement, la réaction n'a pas fonctionné et les deux produits de départ ont été en partie récupérés en fin de réaction. Comme un précipité apparaissait dans la solution de DCM, nous avons supposé que la mauvaise solubilité de ces sels dans ce solvant compromettrait la réaction. De plus, il a été observé que les sels de triéthylamine avaient la même polarité que les sels de triflate d'ammonium, ce qui rend impossible leur purification.

Le DCM a donc été remplacé par l'ACN, au plus grand pouvoir dissociant, et la triéthylamine par K_3PO_4 , dont le pKa de l'acide conjugué de 12,3 est proche de celui de la triéthylamine, à 10,8. Bien que cette base agisse de manière hétérogène et avec un nombre d'équivalents considérablement amoindri, ces

conditions ont alors permis d'obtenir le produit de couplage **37** avec un bon rendement. Ces conditions ont donc été utilisées par la suite pour les réactions de couplage de Sonogashira des autres sels de triflate d'ammonium. Comme il a été dit précédemment, la qualité du catalyseur Pd(PPh₃)₄ est importante pour obtenir de bons rendements. Avec un lot plus ancien de catalyseur, le rendement obtenu a chuté à 48%, permettant d'obtenir néanmoins 1,5 g de produit.



Schema 18 : Dernières étapes de synthèse de **26**.

Lors de l'étape d'hydrogénolyse de **37**, nous avons rencontrés les mêmes problèmes que ceux observés lors des synthèses des réactivateurs neutres (chapitre I) à savoir la formation du produit secondaire **39** (voir aussi **Schéma 10**, page 133). Il est difficile de déterminer le temps de réaction optimum, d'autant que les rapports frontaux sur CCM de **37** et **38** sont proches et qu'il n'est pas possible de suivre la réaction par TLC-MS sans risquer de polluer le spectromètre de masse. Au vu des quantités obtenues du composé **38**, en mélange avec **39**, dont la proportion a pu être estimée par RMN à l'étape suivante (voir ci-après), nous avons pu estimer une conversion modérée de **37** vers **38**, qui fait de cette étape l'étape limitante de la synthèse.

La déprotection de l'acétal se fait comme précédemment dans une solution d'acide formique/eau. Comme il n'est pas possible d'extraire le produit de la solution aqueuse, celle-ci est lyophilisée après neutralisation, et les sels obtenus sont filtrés par une solution DCM/MeOH 8/2 dont le résidu est purifié par chromatographie sur colonne. Après purification, un produit secondaire est systématiquement

observé sur l'analyse RMN à ce stade de la synthèse des triflates d'ammoniums. Ce produit secondaire comporte tous les signaux du produit désiré, excepté celui de l'aldéhyde. De plus, les signaux des protons aromatiques de la pyridine ainsi que du CH₂ lié à la pyridine sont blindés par rapport à ceux de l'aldéhyde désiré. L'analyse spectrométrique montre en général un pic de masse supérieure de 46 à la masse de l'aldéhyde désiré, ce qui correspondrait donc au produit **39** qui coéluerait avec **38**, puis avec **40**. Cette coélution n'avait pas lieu pour les produits neutres du premier chapitre, en raison d'une polarité différente. C'est pourquoi les rendements sont indiqués de façon globale pour les trois dernières étapes. Cependant, au vu des quantités obtenues du mélange **39/40** et de la proportion du produit **40**, on peut estimer une bonne conversion du composé **38** vers le produit **40** à cette étape.

L'étape de formation de l'oxime a permis d'obtenir le MTDA **26** (**PDG-036**) avec un rendement de 22 à 29% sur trois étapes à partir de **37** et on peut estimer que la conversion de l'aldéhyde **40** en l'oxime **26** à cette dernière étape est excellente, au vu des quantités obtenues. Le produit secondaire **39** est de plus facilement éliminé lors de la purification par chromatographie.

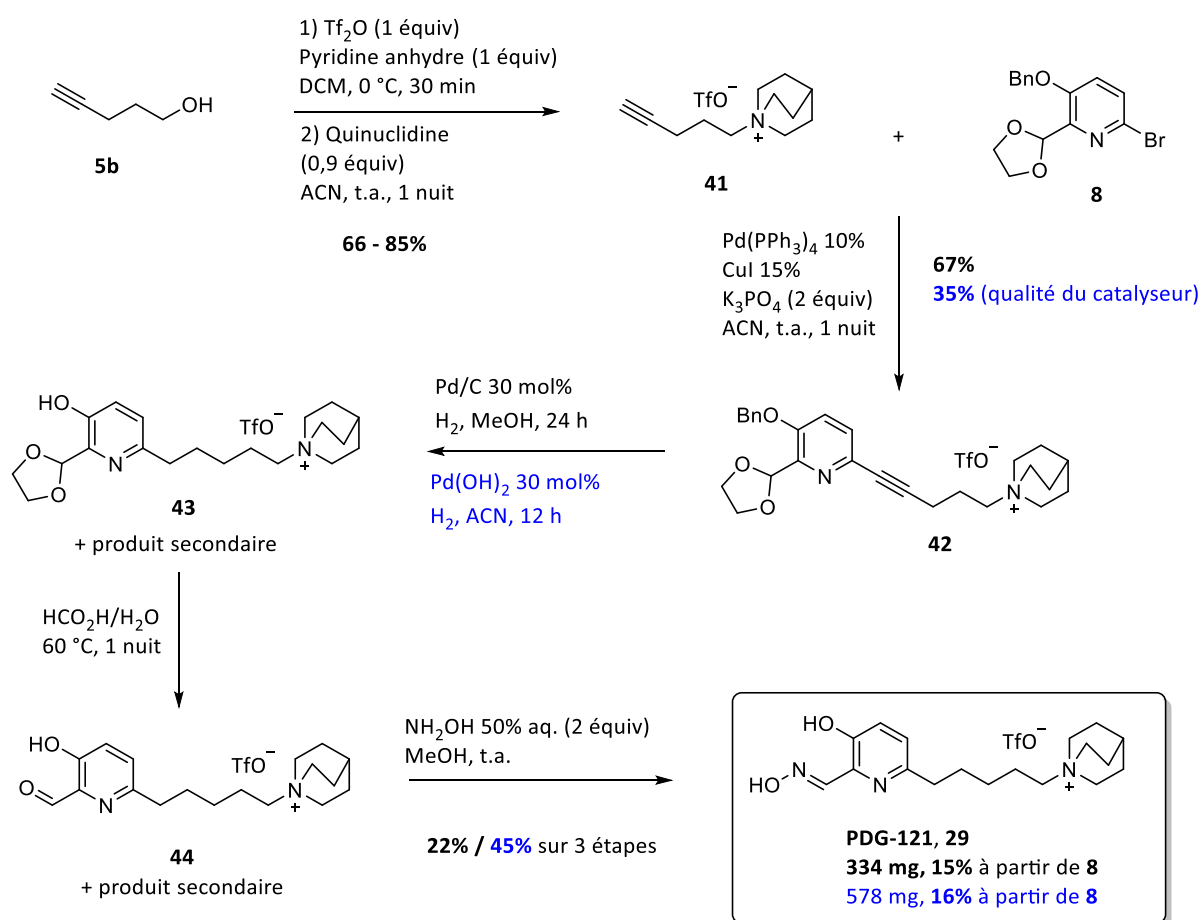
Lors de la première synthèse, 225 mg du produit **26** ont donc été obtenus avec un rendement global sur 4 étapes de 23% à partir de l'intermédiaire **8**. Malheureusement, après coup, le produit a été contaminé par des sels de triéthylamine qu'il a été impossible de séparer par chromatographie en phase normale. Sa purification en phase inverse a été tentée mais a occasionné des difficultés qui seront explicitées lors de la partie 6.

Lors de la deuxième synthèse du MTDA **26**, pour la réalisation de tests *in vivo*, 265 mg de produit ont été obtenus avec un rendement de 22% sur trois étapes à partir de **37**. La baisse de rendement par rapport à la première synthèse (29%) provient de la difficulté de la purification par chromatographie après l'étape de formation de l'oxime, qui a cette fois nécessité deux purifications successives et a occasionné des pertes.

Nous avons pu remarquer que le contre-ion triflate restait associé à l'ammonium, quelque soit les conditions et les purifications, même en solution dans l'acide formique dilué, car le signal quadruplet du carbone du groupe CF₃ du triflate se retrouvait systématiquement sur les analyses RMN ¹³C de tous les produits intermédiaires. Nous supposons donc que la liaison entre les deux ions présente un caractère significativement covalent. L'avantage de cette particularité est de ne pas avoir d'incertitude sur la masse molaire, à cause d'une éventuelle métathèse ionique imprévue au niveau d'une étape de la synthèse, ce qui pourrait plus facilement se produire avec des halogénures ou des acides faibles par exemple (l'utilisation de ces sels de triflate ayant de plus permis d'estimer empiriquement qu'ils ont une faible hygroscopie, sans compter les précautions de stockage mentionnées précédemment).

5.3. Synthèse du MTDA **29** portant le ligand quinuclidinium et un bras espaceur de 5 carbones

La synthèse du composé **29** utilise exactement la même voie développée précédemment pour le composé **26**. Il a été obtenu une première fois, à un stade du projet où la purification était encore réalisée en phase inverse, ce qui a induit d'importantes pertes. La synthèse a donc été répétée une deuxième fois (en bleu **Schéma 29**). Les différentes étapes de la synthèse du MTDA **29** avec le motif quinuclidinium ont été réalisées avec des rendements et des conversions de même ordre de grandeur que celles de la synthèse du MTDA **26** avec le motif morpholinium.



Schema 19 : Voie de synthèse du composé **29**.

L'étape d'hydrogénolyse/réduction a là aussi été l'étape limitante de la synthèse et a également généré le produit secondaire (possédant l'acétal ouvert), qui n'est éliminé qu'à l'étape de purification du produit final **29** (le rendement est donc donné sur les 3 dernières étapes). La conversion estimée à l'étape d'hydrogénolyse lors de la première synthèse a été faible et explique le rendement de 22% sur les trois étapes à partir du produit **42**. Cependant, lors de la deuxième synthèse, nous avons pu suivre

plus facilement et plus régulièrement la réaction par CCM, ce qui a permis de limiter la durée de la réaction et d'augmenter significativement la conversion de cette étape. De plus, excepté le produit secondaire en question, le brut de la réaction était relativement propre et a donc été engagé directement dans la réaction de déprotection de l'aldéhyde lors de la deuxième synthèse sans purification intermédiaire, ce qui ne compromet pas son rendement. La purification à la suite de l'étape d'hydrogénolyse/réduction pourrait donc être avantageusement omise pour toutes les synthèses similaires.

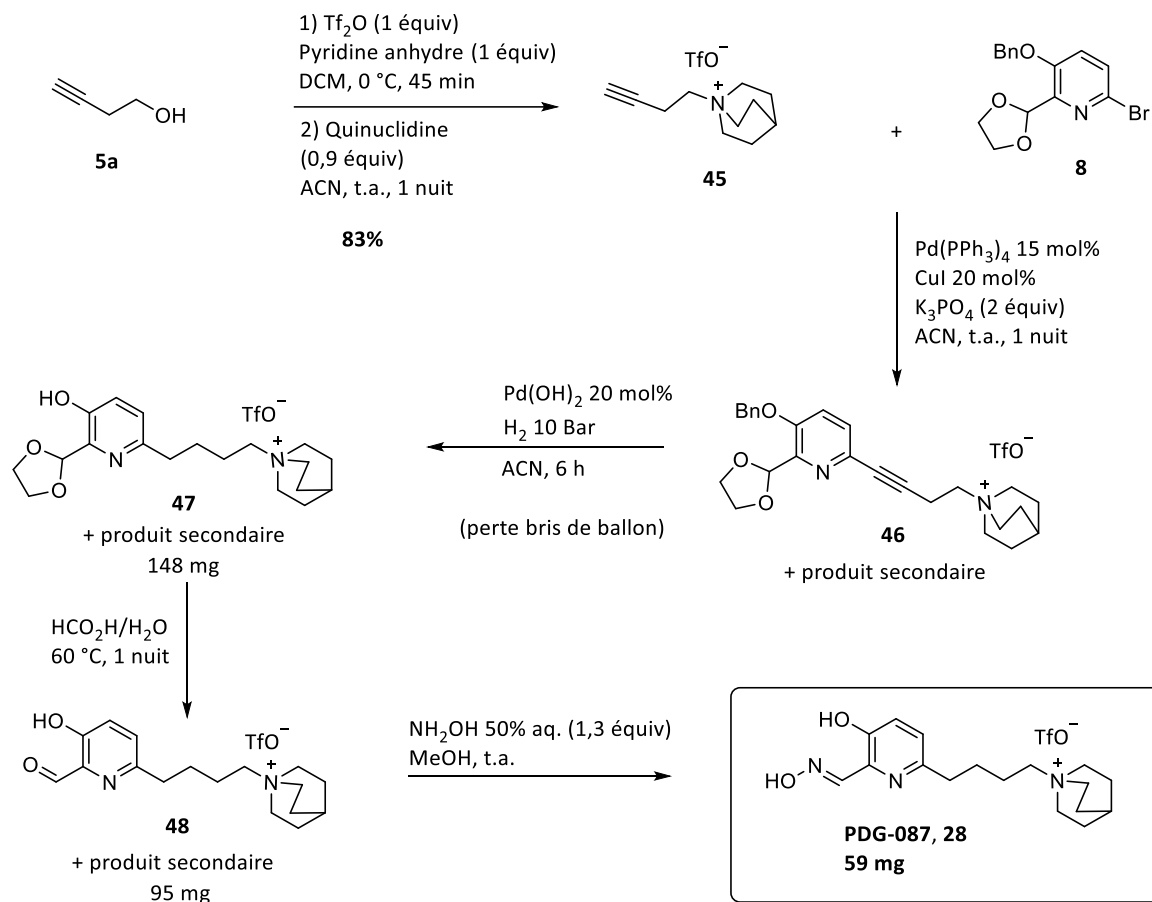
Nous avons pu estimer, au vu des quantités de produit obtenues à chaque étape et de la proportion du produit secondaire, que les conversions des deux dernières étapes étaient similaires à celles obtenues à la synthèse précédente de **26** : bonne pour la déprotection de l'acétal et excellente pour la formation de l'oxime.

Les purifications de l'aldéhyde **44** et de l'oxime **29** se sont faites sans difficulté particulière et ont permis d'obtenir le produit final **29 (PDG-121)** avec la pureté nécessaire (pureté HPLC > 95%). Les rendements globaux obtenus sur les 4 étapes à partir de l'intermédiaire **8** sont de 15 et de 16% pour les deux synthèses, avec des quantités conséquentes de produit à la clé (578 mg pour la 2^{ème} synthèse).

5.4. Synthèse du MTDA **28** portant le ligand quinuclidinium et un bras espaceur de 4 carbones

La synthèse du composé **28** a été réalisée selon la même voie de synthèse, mais a été plus compliquée, notamment en raison du couplage de Sonogashira qui s'est avéré beaucoup moins efficace avec l'alcyne **45 (Schéma 20)**. Malgré plusieurs essais, les conversions obtenues sont faibles. En particulier, la conversion a été inférieure à 15% pour la réaction réalisée à plus grande échelle, ayant permis d'obtenir une fraction de 0,41 g après purification par chromatographie flash. Cependant, cette purification n'a pas permis de séparer le produit **46** d'un produit secondaire qui co-élue avec celui-ci, et qui semble être un dérivé de quinuclidine, car l'analyse RMN de cette fraction montrait une intégration excessive des pics correspondant au motif quinuclidine.

Les quantités obtenues paraissant suffisantes pour la suite de la synthèse, la réaction n'a pas été retentée mais elle devra être optimisée (nature de catalyseur, température, solvant...) afin de synthétiser des quantités plus importantes pour les tests *in vivo*.



Schema 20 : Voie de synthèse du composé **28**.

Plusieurs pistes pourraient expliquer cette conversion plus faible. Le raccourcissement de la chaîne alkyle de 5 à 4 carbones pour **45** pourrait appauvrir l'alcyne et le rendre moins réactif pour ce couplage. Ce composé pourrait être aussi plus sensible au couplage de Glaser : un dégazage plus intensif par des cycles de congélation-réchauffement sous vide pourrait éliminer cette hypothèse.

Mais la piste la plus probable est l'instabilité de l'ammonium dans les conditions basiques utilisées. En effet, la proximité de l'alcyne sur ce bras espaceur à 4 carbones augmente le caractère acide des protons en position propargylique par rapport à un bras espaceur de 5 carbones, comme le montre la différence de 5 unités de pKa observée pour ces protons sur une simulation réalisée sur **41** et **45** (pKa de 39 et 34) (**Figure 68**). En milieu basique, il pourrait donc y avoir déprotonation d'un de ces protons qui conduirait à une réaction d'élimination irréversible avec départ de la quinuclidine et du vinylacétylène.

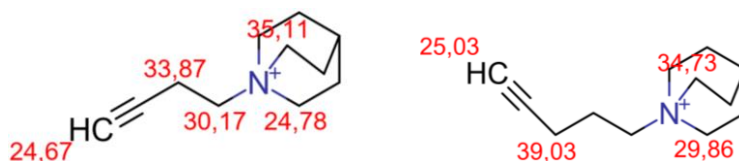


Figure 68 : Simulation des pKa par MarvinSketch des protons à caractère acide des composés **41** et **45**.

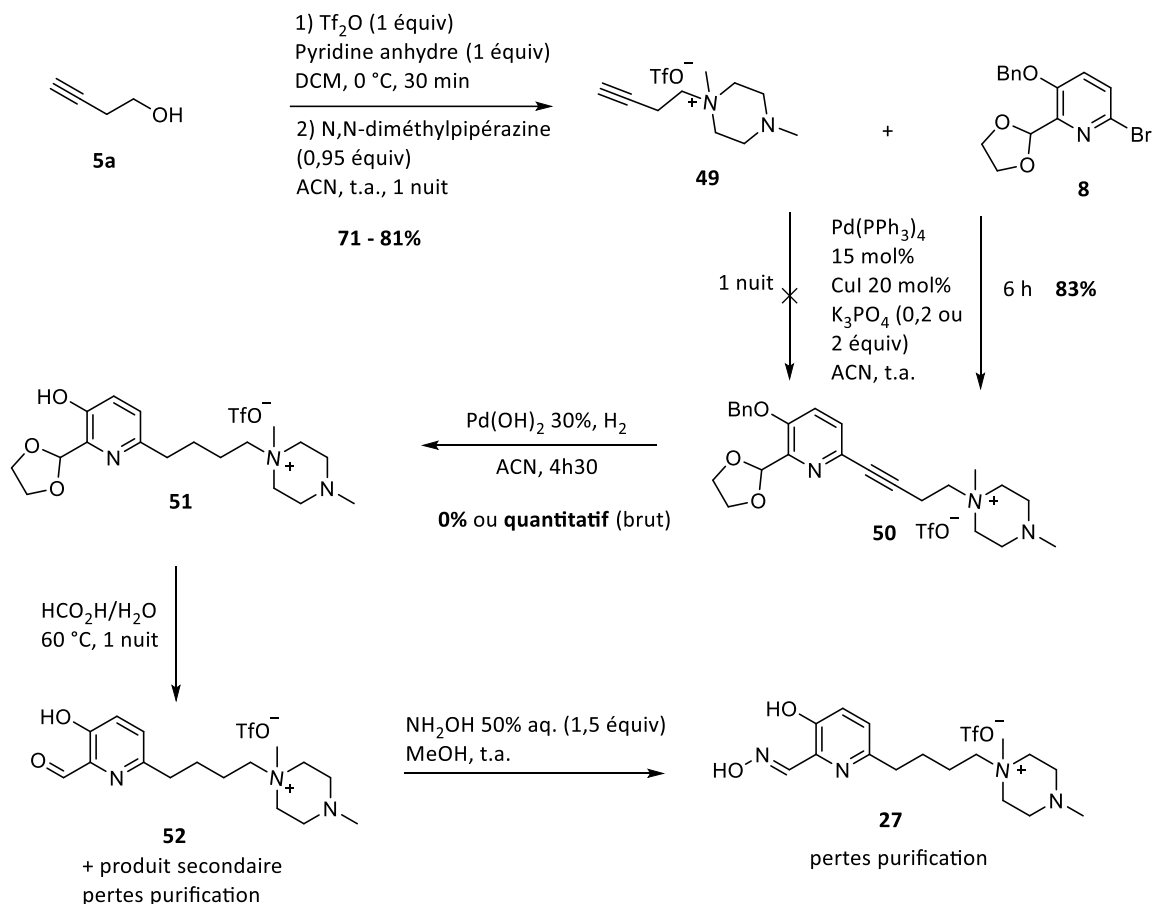
Les observations faites pour le couplage de Sonogashira avec le triflate de diméthylpipérazinium semblent de plus confirmer cette hypothèse (partie 5.5.). Nous verrons que dans ce cas, la durée de la réaction est le facteur critique, or pour cette synthèse, les trois tentatives ont duré au minimum 12 h. La nature et la force de la base utilisée pourrait être également adaptées. Des tests supplémentaires pourraient être réalisés dans les mêmes conditions pour isoler et analyser tous les produits secondaires afin de mieux comprendre les mécanismes en question.

La réaction suivante d'hydrogénolyse/réduction a été menée sous pression (10 bars de H₂) avec un suivi par CCM régulier afin de contrôler la formation du produit secondaire contenant l'acétal ouvert. La difficulté de ce suivi s'est manifestée ici par la découverte après purification par chromatographie d'une fraction conséquente de produit de départ. Toutes les fractions ont été rassemblées et la réaction a été relancée pour quelques heures. Au vu du suivi CCM la conversion devait avoir été nettement améliorée par cette procédure sous pression, par rapport au protocole sous atmosphère de H₂ à pression atmosphérique. Malheureusement, la présence du produit secondaire dérivé de la quinuclidine dans le mélange de départ avec **46**, et ensuite la présence du produit secondaire possédant l'acétal ouvert co-éluant avec le produit d'arrivée **47** (comme pour les synthèses précédentes), empêchent de se baser sur des valeurs sûres pour estimer le rendement de la réaction. En outre, la casse du ballon a conduit à des pertes du produit **47**.

On peut estimer, par rapport aux quantités obtenues et à la proportion de produit secondaire mesurable par analyse RMN, que les deux étapes suivantes de déprotection de l'acétal et de formation de l'oxime ont présenté respectivement une bonne et une excellente conversion, comme pour les synthèses précédentes. Elles ont permis d'obtenir 59 mg du composé **28 (PDG-087)** avec une pureté HPLC supérieure à 95%. Les différentes incertitudes sur les quantités réelles de produit obtenues au cours de cette synthèse de **28** ne permettent pas en revanche de calculer un rendement global.

5.5. Synthèse du MTDA **27** portant le ligand diméthylpipérazinium

Comme pour le composé **28** précédent, la formation du sel **49** s'est faite sans difficulté tandis que son couplage de Sonogashira avec l'intermédiaire **8** s'est avéré très délicat (**Schéma 21**). Les deux premiers essais réalisés selon les conditions décrites sur le schéma n'ont pas permis d'obtenir le produit **50**, malgré des quantités de réactifs suffisamment importantes et la recherche du produit dans les différentes fractions obtenues après purification par chromatographie. Un 3^{ème} essai avec une quantité catalytique de K₃PO₄, afin de réduire le caractère basique du mélange réactionnel, n'a pas été plus fructueux.



Schema 21 : Voie de synthèse tentée pour obtenir le composé **27**.

Finalement, le contrôle du temps de réaction semble être un élément crucial pour cette réaction. Le fait de diminuer le temps de réaction d'une nuit à 6 h a, en effet, permis d'obtenir le produit **50** avec un rendement de 83% après purification par chromatographie flash. Un dernier essai, dont le temps de réaction a été prolongé au-delà de 6 h (une nuit) pour tenter de faire progresser l'avancement de la réaction, incomplet par suici sur CCM, a conduit à nouveau à la formation de produits de dégradation, sans pouvoir ensuite isoler le produit **50** par chromatographie. Par corrélation avec les résultats obtenus lors de la synthèse du MTDA **28** (Schéma 20) portant le motif quinuclidinium, une instabilité en conditions basiques du composé intermédiaire **50** (et **46** pour le MTDA **28**), dûe à la longueur de son bras espaceur à 4 carbones, semble donc se confirmer. Nous pouvons noter une instabilité plus forte pour le composé **50** compte tenu de sa cinétique de dégradation plus rapide, avec également un caractère acide marqué des protons propargyliques possédant un pKa simulé de 33,6. Ces informations nous amènent à penser que le produit de dégradation obtenu dans les couplages de Sonogashira aurait la structure du composé **53** (Figure 69).

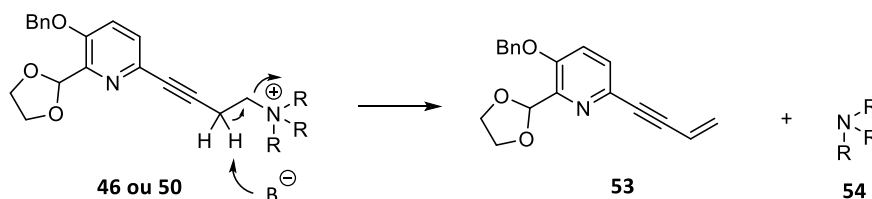


Figure 69 : structure envisagée pour le produit de dégradation **53** et mécanisme

L'hydrogénolyse de **50** a montré sur deux essais une non-reproductibilité, dans les mêmes conditions. Le contrôle CCM n'a pas montré l'apparition d'une tâche correspondant au composé **51** sur le premier essai tandis que la conversion semblait déjà bien avancée au bout d'une heure de réaction pour le deuxième. Le rendement basé sur le brut réactionnel a semblé quantitatif pour cette 2^{ème} réaction. Néanmoins, un des pics caractéristiques du produit secondaire découlant de l'ouverture de l'acétal à cette étape a été observé sur l'analyse RMN du composé **52**, il devait donc être déjà présent avec **51**.

Malgré de bonnes conversions, les deux dernières étapes n'ont pas permis d'obtenir le composé **27** en quantité suffisante et avec la pureté voulue à cause de pertes considérables à la purification par chromatographie en phase normale, dues à la trop forte polarité du produit. Le produit **52** aurait notamment pu être engagé directement dans la réaction suivante sans purification intermédiaire. La dernière purification aurait aussi dû être tentée directement par chromatographie en phase inverse. Cependant, celle-ci reste particulièrement difficile car les analyses LC/MS et HPLC montrent que le produit **27** et ses produits secondaires analogues secondaires ont des temps de rétention très proches et très courts, même avec un plateau 100% eau en début de séquence sur une colonne adaptée. La tentative de purification du produit sur colonne Hypersilgold C18 AQ (250*0,46 mm) avec un éluant acide formique 0,1% aq./ACN n'a donc pas permis d'améliorer la pureté des 2 mg de produit restant.

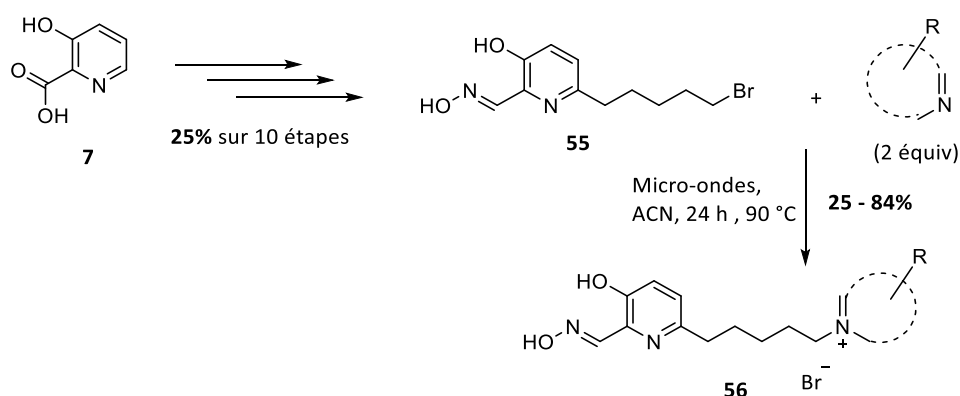
Au vu de ces difficultés de synthèse, une autre voie apparaît nécessaire pour ce produit et pourrait être aussi profitable à tous les MTDA's comprenant un ligand ammonium avec un bras espaceur de 4 carbones.

5.6. Efficacité de synthèse : comparaison avec la littérature

Différentes équipes de chimistes et de biologistes tchèques ont publié en 2021 la synthèse et l'évaluation biologique de réactivateurs basés sur la fonction 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime développée par notre équipe et liée à différents ligands chargés (ammonium aromatique) par un bras espaceur de 5 carbones (**Schéma 22**).⁴⁶⁹

Leur choix d'un ligand chargé s'explique au travers de leur publication datant de 2018 qui portait sur la synthèse et l'évaluation de réactivateurs neutres.⁴⁷⁰ En effet ils avaient émis de sévères critiques sur les réactivateurs neutres (comme ceux du chapitre I) en pointant plusieurs inconvénients par rapport aux réactivateurs chargés : une plus forte lipophilie qui présente des risques de plus grande toxicité et peut poser des problèmes de solubilité pour l'injection *in vivo*, ainsi que, sur les structures testées, une faible affinité pour les cholinestérases. Ce dernier point pouvait être vrai sur les structures testées dans leur publication mais n'est pas généralisable puisque nous avons vu au chapitre I que les réactivateurs neutres peuvent avoir une grande affinité pour l'hAChE, suivant le ligand. Si les deux premiers points ne sont pas dénués de fondement, ils ne sont pas non plus universels car la nature du ligand et la formulation peuvent être la solution à la toxicité et à la solubilité de la molécule dans son ensemble.

Ils ont donc choisi de synthétiser ces réactivateurs en ajoutant une charge pour améliorer ces différents points. Pour cela ils ont développé une nouvelle voie de synthèse dont les premières étapes sont basées sur celles que notre équipe a déjà publiées.⁴⁷¹ L'efficacité de cette voie de synthèse peut être comparée à celle développée dans ce chapitre, puisque les produits finaux sont extrêmement similaires, avec également un ligand chargé (ammonium et pyridinium). Il faut cependant noter que l'optique n'était pas la même : avec quatre molécules à synthétiser dans notre projet, développer une nouvelle méthodologie de synthèse apparaissait moins pertinent que de s'accommoder de certaines insuffisances de la voie utilisée ; tandis que leur publication fait état d'une véritable librairie de molécules synthétisées (15), et la nature des ligands diffère également (amines tertiaires vs. Hétéroaromatiques).



Schema 22 : Voie de synthèse développée par Gorecki et al. pour des réactivateurs basés sur la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime, un bras espaceur à 5 carbones et un ligand hétéroaromatique chargé.⁴⁶⁹

Ils synthétisent l'intermédiaire **55** en 10 étapes à partir de l'acide 3-hydroxy picolinique **7** avec un rendement global de 25%. La dernière étape est la formation de la liaison avec le ligand : une pyridine,

une quinoléine ou une isoquinoléine, diversement substituées. La formation de l'ammonium se fait par substitution nucléophile de ces composés hétéroaromatiques sur l'intermédiaire **55** grâce à une activation par micro-onde contrôlée à 90°C dans l'ACN pour 24 h. Les rendements obtenus pour cette réaction vont de 25 à 84%.

Néanmoins, dans le détail, seulement trois ligands permettent de dépasser 55% de rendement. La réaction avec les isoquinoléines et les quinoléines sont comprises à une exception près entre 25 et 45% et celle avec les pyridines, à deux exceptions près, entre 41 et 55%. Les rendements sont donc largement impactés par la nucléophilie modérée de la plupart de ces ligands, à cause d'un encombrement stérique ou d'un appauvrissement électronique du cycle aromatique. Trois ligands testés n'ont d'ailleurs pas permis de réaliser la substitution : quinoléine, 2-phenylquinoléine, et 4-carbamoylquinoléine. On peut en outre supposer qu'augmenter l'électrophilie de **55** par un meilleur groupement partant que le brome pourrait mener aux mêmes problèmes de sélectivité entre fonctions nucléophiles que celles observées au début de ce chapitre (**Schéma 16**). La sélectivité présentée ici entre la nucléophilie du ligand, de la pyridine de **55** et de son oxime est déjà remarquable en soi, cependant c'est peut-être cette concurrence entre ces différentes fonctions qui abaisse le rendement lorsque le ligand est moins nucléophile, plutôt qu'une conversion simplement plus faible. Cette voie paraît donc plus limitée pour obtenir certains ammoniums que la voie présentée dans ce chapitre où ils sont obtenus lors des premières étapes de synthèse.

Néanmoins cette voie synthétique pourrait représenter une solution pour la synthèse du composé **27**. La synthèse de **27** paraît certes possible en apportant des optimisations aux purifications des dernières étapes et aux conditions de réaction du couplage de Sonogashira et de l'hydrogénolyse/réduction, mais semble aussi peu reproductible, notamment sur la réaction d'hydrogénation et d'hydrogénolyse. En effet la voie développée par Gorecki *et al.* pourrait s'appliquer aux ligands N-méthylmorpholine, quinuclidine et N,N-diméthylpipérazine dont l'alkylation par des chaînes alkyles halogénées sous activation thermique a déjà été rapportée (supporting information).⁴⁷²⁻⁴⁷⁴ Néanmoins ces conditions assez dures (90 °C pour 24 h) à la dernière étape de synthèse peuvent aussi être un facteur limitant pour certains ligands.

Du point de vue de la voie de synthèse globale, les rendements globaux obtenus selon leur voie de synthèse vont de 6 à 21% à partir de l'acide picolinique **7** de départ (autour de 9% pour les ligands quinoléines et isoquinoléines et autour de 12% pour les ligands pyridines) et sont similaires à ceux obtenus pour les MTDA **26** et **29** avec respectivement 12% et 8% de rendement global.

De plus la voie de synthèse utilisée pour nos composés implique 9 étapes de synthèse contre 11 pour la voie développée par Gorecki *et al.* Cependant ce point est compensé par la fonctionnalisation à la toute dernière étape de l'intermédiaire **55** qui permet de synthétiser plus rapidement une librairie de molécules.

La structure des trois meilleurs réactivateurs obtenus dans leur publication est présentée à la **Figure 70**. Leurs résultats *in vitro* seront comparés à ceux des trois MTDA **26**, **28** et **29** dans la partie suivante.

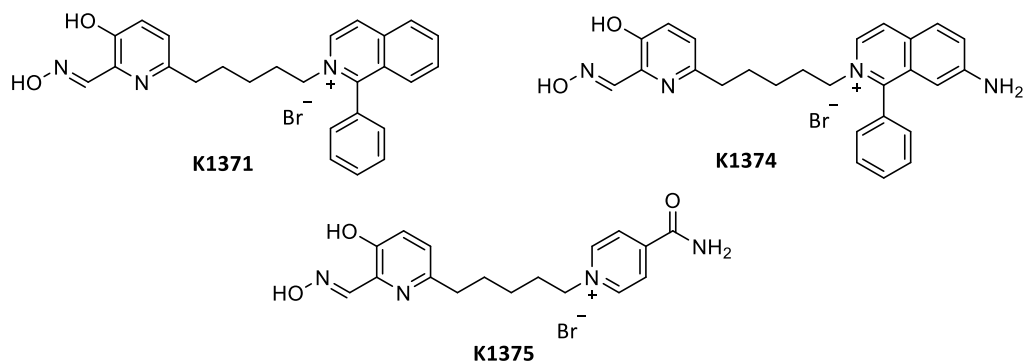


Figure 70 : Composés leads obtenus par Gorecki *et al.* et testés *in vitro* comme *in vivo*.⁴⁶⁹

Pour conclure sur notre voie de synthèse, il apparaît pour le futur que comme pour les synthèses décrites dans le premier chapitre, l'étape d'hydrogénolyse et d'hydrogénation doit être optimisée car l'ouverture de l'acétal catalysée par le palladium constitue la principale limitation de ces synthèses. Le remplacement de l'acétal par un autre groupement remettrait malheureusement en cause toute la voie de synthèse. Si l'azote de la pyridine et l'oxygène de l'acétal forment bien une fonction complexante du palladium, il se peut que la protection du doublet non liant de l'azote de la pyridine puisse améliorer le rendement.

Pour les composés avec un ammonium et un bras espaceur à 4 carbones, plus fragiles dans les conditions basiques nécessaires au couplage de Sonogashira, une base plus douce que K_3PO_4 comme Cs_2CO_3 peut être envisagée. Cette base est relativement soluble dans les solvants organiques aprotiques polaires et est probablement aussi réactive que K_3PO_4 grâce à la taille du cation césium et sa grande polarisabilité qui le rendent « nu », ainsi que son anion, et donc plus réactifs.

6. PURIFICATION ET FORMULATION

Les MTDAs **26** et **29** ont été synthétisés une première fois alors que la méthode d'analyse par LC/MS n'était pas encore mise en place au laboratoire. Pour atteindre au moins 95% de pureté, la purification en phase inverse a donc été tentée. Les phases mobiles ACN/acide formique 0,1% aq. ou ACN/acétate d'ammonium 20 mM n'ont pas permis d'obtenir des fractions de cette pureté sur colonne de chromatographie préparative. Une phase mobile ACN/TFA 0,1% aq. a donc été testée, qui améliorerait la séparation des différents impuretés sur le chromatogramme analytique. Malheureusement sa trop grande acidité a catalysé la déshydratation de la fonction oxime en nitrile pendant et après la purification, ce qui a été vérifié par RMN, HRMS et LC/MS. Les deux produits étant très semblables, leur séparation était ensuite impossible. C'est pourquoi une deuxième synthèse de **29** a été réalisée.

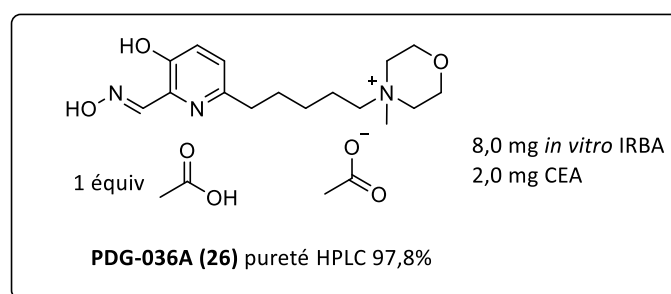


Figure 71 : Formulation de **26** pour les tests *in vitro* à l'IRBA et d'électrophysiologie au CEA.

Pour le composé **26**, la purification en phase inverse était également nécessaire à cause de sa contamination par des sels de triéthylamine inséparables en phase normale. La purification d'un lot de 25 mg sur une colonne Thermo Scientific Acclaim polar advantage II (5 μ m, 250 \times 20 mm) avec un éluant ACN/acétate d'ammonium 20 mM a permis d'obtenir une fraction de 10 mg de pureté HPLC 97,8%. La RMN a permis de déterminer la présence de deux contre-ions acétate associés à l'ammonium et au pyridinium, provenant de la phase mobile utilisée. Le produit a donc pu être envoyé pour les tests *in vitro* de réactivation et pour les tests d'électrophysiologie sur les nAChRs sous cette forme (**Figure 71**). Cependant, sous cette formulation, le produit se présentait comme un solide pateux orange hygroscopique dont la conservation pouvait s'avérer plus problématique que le triflate d'ammonium, solide jaune clair poudreux très peu hygroscopique.

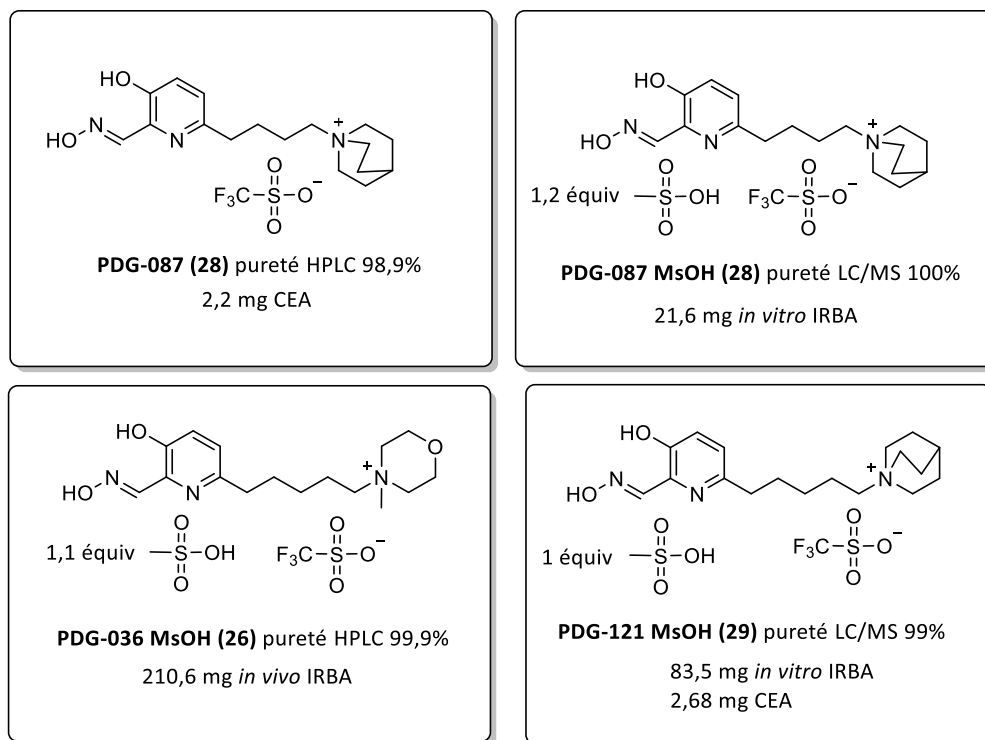


Figure 72 : Formulation de **26** pour les tests *in vivo* à l'IRBA et de **28** et **29** pour les tests *in vitro* à l'IRBA et d'électrophysiologie au CEA.

Lors de leur deuxième synthèse, les composés **26** et **29** ont donc pu être purifiés en phase normale, de même que le composé **28**. Il s'est cependant avéré que **28**, qui apparaissait sous forme de solide jaune cristallin et brillant, était insoluble dans l'eau tel quel, et l'était seulement après dissolution dans le méthanol et dilution dans l'eau. Cette insolubilité provient sûrement de la force de la liaison entre ces ammoniums et l'anion triflate évoquée précédemment. La dissolution dans le méthanol a pu être utilisée au CEA pour les tests d'électrophysiologie sur les nAChRs où un certain pourcentage de méthanol n'est pas problématique pour les tests (1% ou moins de méthanol dans la solution finale testée), un lot du composé y a donc été envoyé. Pour les tests de réactivation sur l'hAChE il était au contraire préférable d'utiliser une solution 100% aqueuse, la présence de méthanol pouvant entraîner une inhibition de l'enzyme.⁴⁷⁵ Pour cela, les composés **28** et **29** ont été formulés avec un équivalent d'acide méthanesulfonique, de même que **26** pour les tests *in vivo* (**Figure 72**).

Enfin, le composé **PDG-149** s'est révélé aussi insoluble dans l'eau et a donc été transformé en sel de mésylate pour les tests d'électrophysiologie que j'ai réalisés sur ce produit au CEA, ce qui l'a rendu hydrosoluble (**Figure 73**).

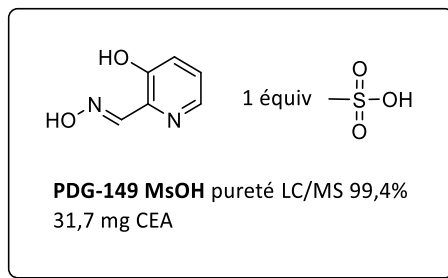


Figure 73 : Formulation de PDG-149 pour les tests d'électrophysiologie au CEA.

7. EVALUATIONS BIOLOGIQUES

7.1. Evaluation *in vitro* sur l'hAChE inhibée

Les résultats des tests *in vitro* de réactivation de l'hAChE inhibée par les NOPs et le paraoxon par les réactivateurs de référence, le **RM048**, les MTDAs de ce chapitre ainsi que les réactivateurs de Gorecki *et al.* sont rassemblés dans le **Tableau 22** (tests réalisés par ces derniers, nos partenaires de l'IRBA et par l'équipe de Zrinka Kovarik pour le **RM048**).

Il est possible de comparer dans un premier temps l'effet de la quaternarisation de la morpholine portée par le **RM048** avec le **PDG-036A (26)**, en gardant cependant à l'esprit que les mesures ont été faites dans deux laboratoires différents. Le ligand morpholinium du **PDG-036A** améliore de beaucoup les capacités de réactivation par rapport au **RM048** en augmentant nettement l'affinité pour l'enzyme inhibée, quelque soit l'OP : les différents K_D sont diminués d'un facteur allant de 4 pour le VX à 100 pour le paraoxon ; ce qui se traduit également par une IC_{50} sur l'hAChE presque 10 fois inférieure.

Les vitesses de réactivation k_r restent elles similaires, excepté pour le tabun où elle est multipliée par près de 6. Le cas du tabun est d'ailleurs remarquable car, avec ces effets combinés, l'efficacité de réactivation se voit améliorée plus de 300 fois sur l'enzyme phoshyllée par cet OP, connue pour être difficile à réactiver. Le **PDG-036A (26)** est également plus efficace contre le paraoxon que l'obidoxime (LüH-6), qui est le meilleur réactivateur de référence contre cet OP. Cela fait du **PDG-036A** un réactivateur à large spectre avec de bonnes efficacités de réactivation sur les quatre OPs testés, bien meilleur *in vitro* que le **RM048**.

oxime	K_D (μM)				k_r (min^{-1})				k_{r2} ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)				IC_{50} (μM)
	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	
2-PAM	76	103	63	8,6	0,23	0,37	0,038	0,04	3	3,6	0,6	4,6	580
HI-6	22	60	0	28	0,55	0,95	0	0,024	25	15,8	0	0,86	82
LüH-6 ^b	27	31	97	32	0,89	0,97	0,04	0,81	33	31	0,4	25	nd
RM048 ^a	120	220	310	620	0,57	0,12	0,014	0,27	4,9	0,56	0,045	0,44	683
PDG-036A (26)	31	9	4	6	0,5	0,25	0,06	0,2	16	28	15	33	74
PDG-121 MsOH (29)	259	78	13	70	2	0,3	0,03	0,2	8	4	2	9	58
PDG-087 MsOH (28)	43	6	0,1	0,2	1	0,2	0,3	0,3	23	33	333	1500	12
K1371 ^b	13	10	7,9	5,8	0,3	0,17	0,02	0,4	25	17	2,4	78	16
K1374 ^b	10,4	29	8,9	5,5	0,7	0,5	0,04	0,51	72	19	4,7	92	10
K1375 ^b	27	34	62	73	0,16	0,14	0,02	0,6	5,9	4,2	0,4	8,5	75

Tableau 22 : Résultats de réactivations *in vitro* sur l'hAChE inhibée par les NOPs et le paraoxon réalisés par l'équipe de José Dias à l'IRBA sur les MTDAs de ce chapitre et b : résultats des mêmes tests pour les trois composés .leads de Gorecki et al.⁴⁶⁹ a : Zorbaz.⁷ \emptyset : pas de réactivation.

L'effet positif d'un ligand chargé sur la réactivation se retrouve sur les réactivateurs de Gorecki *et al.* avec de très bonnes efficacités de réactivation pour **K1371** et **K1374**. Ce dernier réactive notamment particulièrement efficacement l'hAChE phosphorylée par le VX et le paraoxon, mieux que tous les réactivateurs de référence testés et que le **PDG-036A (26)**. Cependant l'efficacité de leur réactivation de l'enzyme inhibée par le tabun reste en retrait.

En ce qui concerne le ligand quinuclidinium, on observe une différence drastique de l'efficacité de réactivation suivant la longueur du bras espaceur. Celle-ci doit donc influencer fortement les possibilités d'interactions entre le ligand et les différents résidus du site actif ainsi que les positionnements du ligand dans celui-ci. L'affinité pour le site actif phosphorylé est considérablement augmentée en passant d'un bras espaceur à 5 carbones pour **PDG-121 MsOH (29)**, à un bras espaceur à 4 carbones pour **PDG-087 MsOH (28)** : les valeurs de K_D sont divisées par plus de 100 pour le tabun

et le paraoxon et par au moins 6 pour le VX et le sarin. Alors que le **PDG-121 MsOH** présente des efficacités de réactivation modérées pour tous les OPs, celles du **PDG-087 MsOH** sont bonnes sur le VX et le sarin et exceptionnelles sur le tabun et le paraoxon, ce qui en fait un réactivateur de l'AChE très prometteur.

Tous ces résultats sont relativement cohérents avec les études d'amarrage moléculaire, bien que les résultats obtenus pour le composé **28 (PDG-087 MsOH)** sur le sarin ne laissent pas penser à une réactivation si efficace pour cet OP.

7.2. Evaluation *in vitro* sur l'hBChE inhibée

Nos partenaires de l'IRBA ont aussi testé la réactivation *in vitro* sur l'hBChE des trois MTDAs et du **RM048 (Tableau 23)** car leurs études les fondent à croire qu'une réactivation des deux cholinestérases permettrait une détoxification encore plus efficace.

On peut noter que la réactivation de l'hBChE inhibée par le tabun est encore plus difficile que pour l'hAChE puisqu'aucun réactivateur n'est capable de la réactiver. De plus, excepté le paraoxon pour le 2-PAM, les réactivateurs de référence sont peu efficaces sur l'hBChE inhibée.

oxime	K_D (μM)				k_r (min^{-1})				k_{r2} ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)				IC_{50} (μM)
	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	VX	Sarin	Tabun	Pox	
2-PAM	1551	2885	∅	65	1	4	∅	0,35	0,7	1,4	∅	5,4	nd
HI-6	307	409	∅	∅	0,03	0,3	∅	∅	0,1	0,8	∅	∅	nd
RM048	205	∅	∅	3	0,1	∅	∅	0,14	0,5	∅	∅	47	270
PDG-036A (26)	194	∅	∅	0,7	0,2	∅	∅	0,08	1	∅	∅	114	879
PDG-121 MsOH (29)	23	∅	∅	∅	0,2	∅	∅	∅	10	∅	∅	∅	174
PDG-087 MsOH (28)	2	10	∅	1	0,3	0,2	∅	0,2	150	20	∅	200	136

Tableau 23 : Résultats de réactivations *in vitro* sur l'hBChE inhibée par les NOPs et le paraoxon réalisés par l'équipe de José Dias à l'IRBA sur les MTDAs de ce chapitre et le RM048. ∅ : pas de réactivation.

Le **RM048** n'est réellement efficace contre aucun OP hormis le paraoxon. Comme pour la réactivation de l'hAChE, on observe que le passage du ligand morpholine au ligand morpholinium pour **PDG-036A**

(26) permet une nette augmentation de l'affinité pour l'enzyme phosphylée par le paraoxon. Ce MTDA possède donc une très bonne efficacité de réactivation à la fois sur l'hAChE et sur l'hBChE pour cet OP.

Ensuite, la longueur du bras espaceur joue ici également un rôle prépondérant pour obtenir des interactions favorables entre le ligand quinuclidinium et le site actif phosphylé de l'hBChE. Alors que le **PDG-121 MsOH (29)** ne procure qu'une réactivation modérément efficace de l'hBChE inhibée par le VX, le raccourcissement du bras espaceur sur le composé **PDG-087 MsOH (28)** lui procure non seulement une réactivation 15 fois plus efficace pour cet OP, mais aussi de très bonnes efficacités de réactivation pour le sarin et le paraoxon. L'affinité du quinuclidinium pour la BChE grâce à son fort encombrement stérique, qui est observé dans la littérature (partie 1.2.3.), se vérifie donc bien ici.

Ces résultats exceptionnels font du MTDA **PDG-087 MsOH** un réactivateur très efficace pour quasiment tous les OPs et pour les deux cholinestérases.

7.3. Electrophysiologie sur les récepteurs nicotiques

Les tests d'électrophysiologie ont été menés au CEA par le Dr. Rómulo Aráoz et le Dr. Nicolas Lamassiaude (post-doctorant) en premier lieu sur les récepteurs nicotiques $\alpha 7$, puis sur les récepteurs nicotiques musculaires.

7.3.1. $\alpha 7$

7.3.1.1. Fonction réactivatrice

J'ai effectué un séjour de trois jours au sein du laboratoire du Dr. Denis Servent et du Dr. Rómulo Aráoz afin d'être formé à la réalisation des tests d'électrophysiologie. J'y ai donc réalisé avec l'aide du Dr Aráoz les tests de la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime seule (**PDG-149 MsOH**) sur les nAChRs $\alpha 7$. Ces tests visaient à mesurer l'effet que pouvait avoir cette fonction normalement dévolue aux cholinestérases sur la seconde cible visée : les récepteurs nicotiques.

Chaque ovocyte de xénope *Laevis* exprimant les nAChRs sur sa membrane subit une série de mesures de courant cholinergique, entrecoupées entre chacune d'un lavage : trois mesures du courant provoqué par une solution à 100 μM d'ACh (pour en faire la moyenne) ; trois mesures du courant provoqué par une solution d'ACh à 100 μM additionnée de **PDG-149 MsOH** à trois concentrations différentes croissantes ; puis à nouveau la mesure du courant provoqué par une solution d'ACh à 100 μM pour observer si l'effet du composé est réversible ou non, et dans quelle mesure. Les mesures sur

plusieurs ovocytes permettent d'obtenir au moins 5 mesures pour chaque concentration testée du composé. Un exemple représentatif des effets de **PDG-149 MsOH** est présenté **Figure 74**.

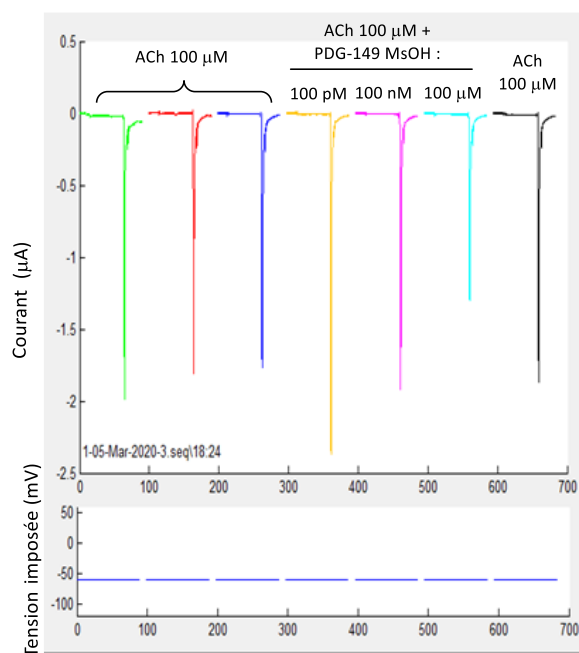


Figure 74 : Courants cholinergiques représentatifs des effets observés avec **PDG-149 MsOH**, avec une tension imposée de -60 mV. Chaque application est séparée par un lavage.

L'intensité des courants induits par le mélange d'ACh et de **PDG-149 MsOH** peut être normalisée par rapport à la valeur normalement produite par l'ACh sans le composé (100%) pour chaque concentration testée de **PDG-149 MsOH**. Cette courbe permet de déterminer ainsi les potentiels effets dose-dépendants du composé (**Figure 75**). On observe donc que le **PDG-149 MsOH** provoque des effets plutôt légers, avec une potentialisation du signal de 20% maximum entre 10 pM et 10 nM, puis un effet antagoniste léger à partir de 100 nM qui va jusqu'à réduire le signal de 29% à 100 μ m.

Ces effets sont intrigants mais restent légers, comme nous le supposions, car cette fonction n'est pas connue pour avoir un effet particulier sur les nAChRs. Il est donc maintenant possible de pouvoir certifier qu'un effet particulier mesuré sur un MTDA qui serait différent de celui observé ici serait dû principalement à l'ajout du ligand à la fonction réactivatrice et non proprement à celle-ci.

On peut notamment assurer que l'effet antagoniste provoqué par le **RM048** provient de l'ajout de la morpholine via le bras espaceur à cette fonction réactivatrice et non pas du motif de la fonction réactivatrice seul.

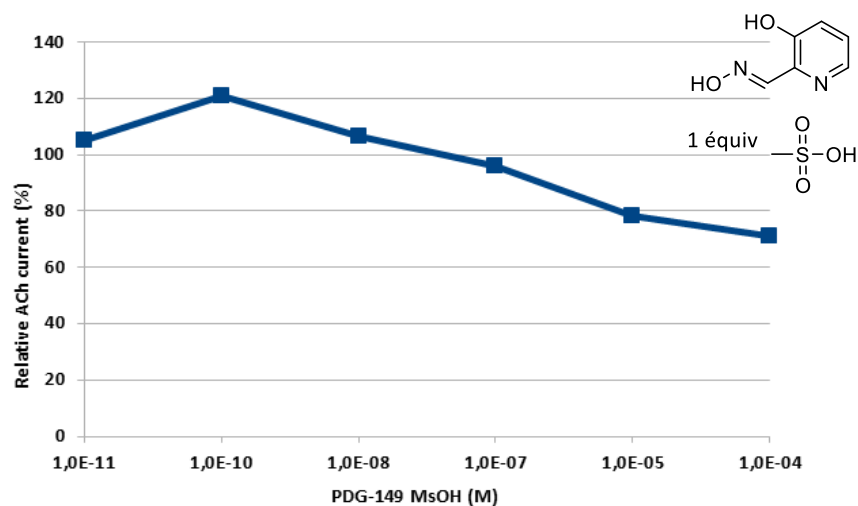


Figure 75 : Courbes du courant cholinergique normalisé par rapport à la moyenne de trois applications d'ACh à 100 μ M ($I'EC_{50}$) en fonction de la concentration de PDG-149 MsOH coappliquée avec l'ACh à 100 μ M. Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. laevis* exprimant le nAChR $\alpha 7$ sur leur membrane cellulaire.

7.3.1.2. MTDAs

L'effet des trois MTDAs **PDG-036A (26)**, **PDG-087 (28)** et **PDG-121 MsOH (29)** a été mesuré sur le récepteur nicotinique $\alpha 7$ en co-application avec de l'acétylcholine. Comme nous le souhaitons, les trois molécules ont un effet antagoniste sur ce sous-type de nAChR neuronal.

Par rapport au **RM048**, le changement de la morpholine en morpholinium chargé sur le **PDG-036A** augmente légèrement le pouvoir antagoniste du composé en passant d'une IC_{50} de 15,5 μ M à une IC_{50} de 10.9 μ M pour le **PDG-036A (Figure 76)**. L'étendue de la gamme de concentration permettant de passer d'une absence d'effet à une inhibition totale semble aussi se resserrer pour le composé chargé par rapport au composé neutre : l'effet antagoniste du **RM048** débute dès 0,5 μ M et inhibe totalement le nAChR à au moins 500 μ M tandis que pour le **PDG036A** l'effet antagoniste apparaît à au moins 1 μ M de concentration mais l'inhibition est totale dès la concentration de 100 μ M.

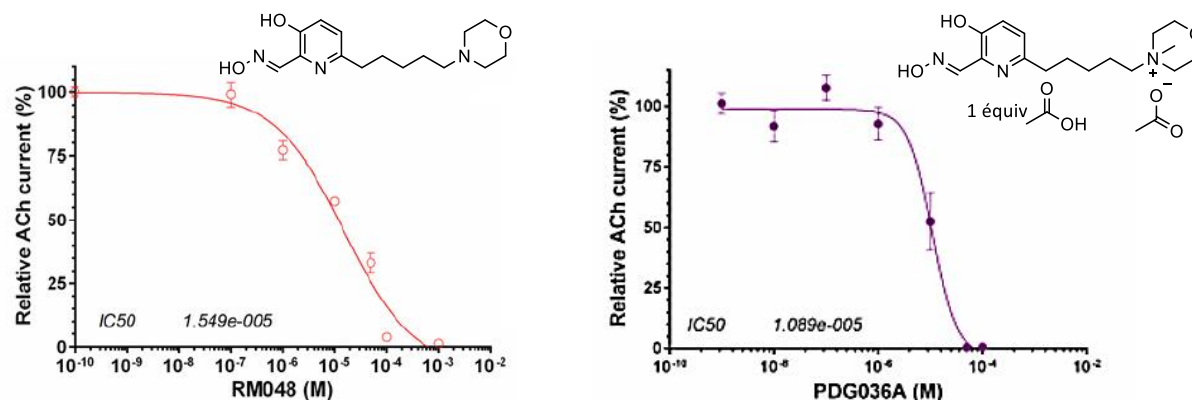


Figure 76 : Courbes du courant cholinergique normalisé par rapport à la moyenne de trois applications d'ACh à 100 μ M ($I'_{EC_{50}}$) en fonction de la concentration de RM048 et de PDG-036A coappliqués avec l'ACh à 100 μ M. Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. Laevis* exprimant le nAChR α 7 sur leur membrane cellulaire.

Les composés comportant un ligand quinuclidinium semblent aussi avoir cette gamme de concentration resserrée autour de leur IC_{50} (Figure 77). Celle du PDG-121 MsOH (29) est de 16,1 μ M tandis que celle du PDG-087 (28) est de 5,4 μ M. Là encore le raccourcissement du bras espaceur apporte donc un effet favorable en augmentant le pouvoir antagoniste du composé.

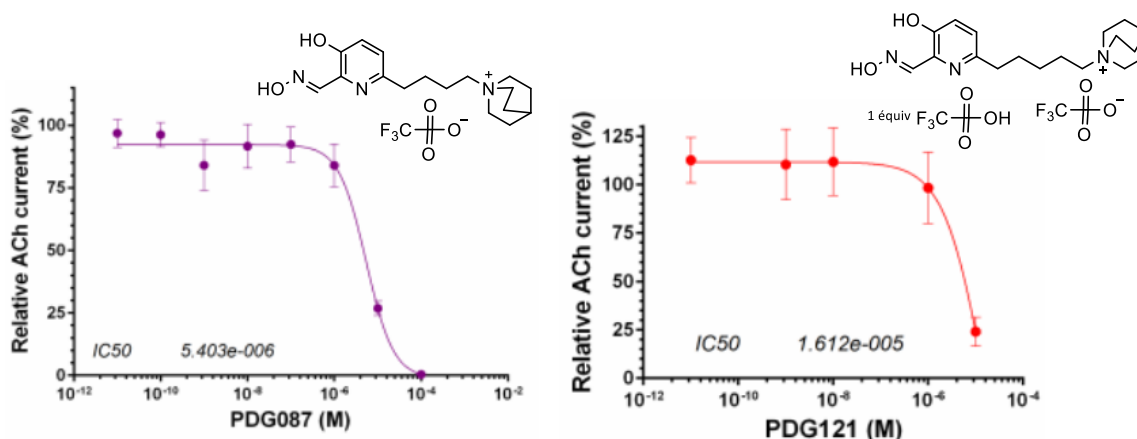


Figure 77 : Courbes du courant cholinergique normalisé par rapport à la moyenne de trois applications d'ACh à 100 μ M ($I'_{EC_{50}}$) en fonction de la concentration de RM048 et de PDG-036A coappliqués avec l'ACh à 100 μ M. Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. Laevis* exprimant le nAChR α 7 sur leur membrane cellulaire.

De plus, les IC_{50} mesurées sur ces deux composés correspondent bien à celles mesurées pour d'autres composés simples portant un motif quinuclidinium par Arias *et al.* avec des valeurs comprises entre 0,5 et 18 μ M.⁴⁵²

Les trois composés peuvent donc avoir un effet antagoniste au niveau ganglionique ou central (s'ils passent bien la BHE). Cependant l'augmentation de l'effet antagoniste par rapport aux réactivateurs neutres n'est pas aussi forte qu'attendue et ces valeurs d' IC_{50} restent relativement hautes, ce qui les

rend difficile à atteindre *in vivo*. Il n'est cependant pas possible à ce stade de savoir si l'effet antagoniste apporté par les doses thérapeutiques *in vivo* aura l'impact nécessaire sur les nAChRs pour apporter un surplus de protection.

7.3.2. nAChR musculaire (α_1) $_2\beta_1\gamma\delta$

Les composés sont testés dans un deuxième temps sur les nAChRs musculaires pour déterminer si en plus d'un effet ganglionique et central, ces composés pourraient agir au niveau des jonctions neuromusculaires. Pour cela les membranes de l'organe électrique de torpilles (*Torpedo marmorata*) chargées en récepteurs musculaires embryonnaires (α_1) $_2\beta_1\gamma\delta$ sont injectées dans des ovocytes de grenouille sud-africaine *Xenopus laevis* qui vont pouvoir les exprimer.

Cette fois aucun effet n'a été observé pour le **PDG-036A (26)** en appliquant une concentration de 10 μM pendant 45 secondes avec co-application finale d'ACh à 50 μM (n=8-16), dont un tracé représentatif est représenté **Figure 78**.



Figure 78 : Tracé représentatif de l'application successive d'ACh à 50 μM pendant 20 s et de l'application pendant 45 s de PDG-036A co-appliqué sur les 20 dernières secondes avec de l'ACh à 50 μM .

Les publications de Hu *et al.* pourraient expliquer ce résultat.^{476,477} Leur équipe a modélisé le nAChR musculaire de souris à partir de la structure de l'AChBP de mollusque et du nAChR α_7 de souris en se basant sur leurs homologies de séquence et de conformation. Les études d'amarrage moléculaire ont alors permis de montrer que le site orthostérique à l'interface α_1/δ avait deux sites où peut se lier un ammonium quaternaire : celui où se lie l'ammonium de l'acétylcholine et un second éloigné de 11 à 14 Å du premier. Les résultats de tests d'inhibition d'un héli-diaphragme de souris innervé par le nerf phrénique par des dérivés de stéroïdes (comprenant deux ammoniums quaternaires séparés de ladite distance) leur a permis de déduire plusieurs éléments supplémentaires en les corrélant au logP de ces composés : le site de l'acétylcholine est particulièrement hydrophobe et la force de la liaison augmente

avec l'hydrophobie du ligand, de plus la charge positive devrait être la plus concentrée possible sur l'azote pour avoir une bonne interaction. Ils supposent donc que le motif morpholinium est trop hydrophile pour se fixer efficacement dans ce site. Le composé possédant deux motifs morpholiniums a ainsi le plus bas logP et la plus forte IC₅₀ de tous les composés testés. Pour espérer agir sur les nAChRs musculaires, il faudrait donc augmenter la lipophilie de ce motif.

Le **PDG-121 MsOH (29)** n'a pas encore été testé sur le nAChR musculaire.

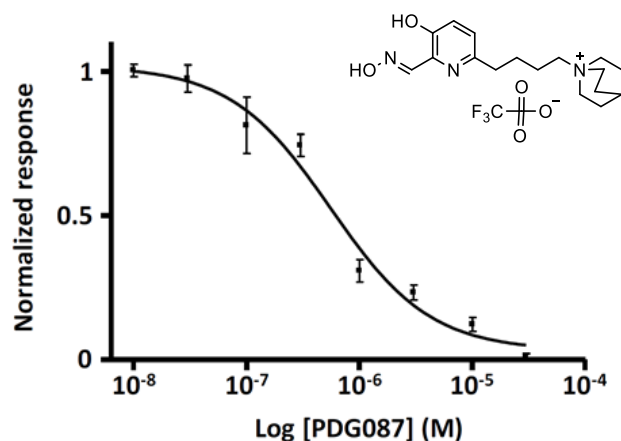


Figure 79 : Courbes du courant cholinergique normalisé par rapport à la moyenne de trois applications d'ACh à 100 μ M (l'EC₅₀) en fonction de la concentration de PDG-087 coappliqué avec l'ACh à 100 μ M. Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. Laevis* exprimant le nAChR (α 1) β 1 γ δ sur leur membrane cellulaire.

En revanche le **PDG-087 (28)** a une forte affinité pour les nAChRs musculaires avec une IC₅₀ de 558 \pm 112 nM qui en fait un inhibiteur efficace de ces récepteurs (**Figure 79**). Ce résultat est cohérent avec le blocage de jonctions neuro-musculaires évoquée au début de ce chapitre⁴⁵¹ et avec les résultats de Hu *et al.* précédemment cités, car le motif quinuclidinium est particulièrement lipophile. La capacité du **PDG-087** à inhiber les récepteurs neuronaux α 7 comme les nAChRs musculaires en fait un MTDA très prometteur pour espérer contrer l'hyperstimulation des récepteurs nicotiques lors d'une intoxication aiguë aux OPs.

7.4. Action multi-cibles : affinité et sélectivité

Les résultats précédents montrent bien que les trois molécules de ce chapitre sont multi-cibles : elles possèdent de bonnes ou très bonnes capacités de réactivation de l'hAChE inhibée par les quatre OPs testés ainsi qu'une action antagoniste sur les nAChRs α 7. De plus elles peuvent aussi réactiver l'hBChE inhibée par certains OPs, et le **PDG-087 (28)** a également une action antagoniste sur les nAChRs musculaires.

Néanmoins, pour le développement de composés multi-cibles, il est indispensable de vérifier, dans la mesure du possible, si ceux-ci n'ont pas une affinité plus importante pour l'une de leurs cibles, ce qui les empêcherait d'agir sur l'autre.

MTDA	K _D (hAChE) / K _D (hBChE)		
	VX	Sarin	Pox
PDG-036A (26)	0,16	∅	8,6
PDG-121 MsOH (29)	11,2	∅	∅
PDG-087 MsOH (28)	21,5	0,6	0,2

Tableau 24 : Sélectivité de l'affinité des MTDAs pour l'hBChE ou l'hAChE.

En ce qui concerne la sélectivité entre les deux cholinestérases, le rapport des constantes de dissociation K_D du complexe de Michaelis-Menten entre le MTDA et chacune des enzymes phosphorylées montre des écarts d'affinité raisonnables dépassant rarement un facteur 10 (Tableau 24).

Les IC₅₀ de chaque composé envers chaque cible sont récapitulées dans le Tableau 25. On peut d'abord observer qu'aucune valeur n'est assez faible pour induire l'inhibition des cholinestérases natives ou l'inhibition totale des nAChRs aux doses thérapeutiques.

MTDA	IC ₅₀ hAChE (μM)	IC ₅₀ hBChE (μM)	IC ₅₀ α7 (μM)	IC ₅₀ (α1) ₂ β1γδ (μM)
PDG-036A (26)	74	879	10,9	∅
PDG-087 / PDG-087MsOH (28)	12	136	5,4	0,558
PDG-121 (29)	58	174	16,1	nd

Tableau 25 : tableau récapitulatif des concentrations inhibitrices médianes sur les différentes cibles biologiques.

Ensuite il est favorable que toutes les IC₅₀ des nAChRs soient inférieures à celles des cholinestérases natives car il faut pouvoir antagoniser les récepteurs nicotiques sans pour autant inhiber les cholinestérases natives.

De plus cette affinité supérieure des MTDAs pour les nAChRs augmente leurs chances que celle-ci soit au même niveau d'affinité que pour l'AChE phosphorylée par les OPs, car celle-ci est également supérieure à celle qu'ils ont pour l'enzyme native, puisque ces composés sont conçus pour l'AChE

phosphylée. Avec un même niveau d'affinité on évite une sélectivité des MTDA entre leur action sur les nAChRs et sur l'AChE phosphylée.

Cependant, compte tenu des changements structurels modérés entre l'enzyme native et l'enzyme phosphylée, l'écart d'affinité pour les deux formes de l'enzyme ne doit en général probablement pas être trop élevé. Or l'écart d'affinité reste bien modéré ici puisque l'IC₅₀ de l' $\alpha 7$ est seulement inférieure d'un facteur 2 à 7 à celle de l'hAChE native, suivant le MTDA.

En revanche il est possible que le **PDG-087 (28)** ait une légère sélectivité d'action en faveur du nAChR musculaire.

Cet équilibre entre sélectivité pour chacune des deux cibles et inhibition des cholinestérases natives peut donc s'avérer délicat.

7.5. Sélection pour évaluation *in vivo*

Le **PDG-036A (26)** a été sélectionné pour être testé *in vivo* car il améliorerait très fortement les résultats *in vitro* du **RM048**, notamment sur le tabun, ce qui en fait potentiellement un réactivateur à large spectre. Il est aussi très efficace pour réactiver l'hBChE inhibée par le paraoxon et a une action antagoniste plus forte que le **RM048** sur le nAChR $\alpha 7$. Il a donc été synthétisé une deuxième fois et le produit obtenu a été envoyé à l'IRBA : **PDG-036 MsOH (Figure 72)**. Il sera testé *in vivo* dans les mois à venir.

Le **PDG-087 (28)** a aussi été sélectionné pour être testé *in vivo* compte tenu de ses résultats exceptionnels, tant du point de vue du nombre de cibles touchées (4) que de l'efficacité de son effet sur celles-ci, réactivation et antagonisme. Cette seconde synthèse n'a pas encore été réalisée et peut être l'occasion d'optimiser les étapes difficiles.

Le **PDG-121 (29)** n'a pas fait l'objet d'une sélection pour des tests *in vivo* car ses résultats sont moins efficaces que les deux produits précédents, mais n'en restent pas moins satisfaisants. Les stocks restants peuvent d'ores et déjà permettre des tests *in vivo* sans nouvelle synthèse, ceux-ci seront donc peut-être envisagés ultérieurement.

On peut noter que les produits analogues de Gorecki *et al.*, le **K1374** et **K1375**, ont été testés *in vivo* en combinaison avec de l'atropine sur des souris intoxiquées au tabun et leurs indices de protection ont été comparés à celui de l'obidoxime en combinaison avec de l'atropine. L'indice de protection du **K1374** (1,49) est alors inférieur à celui de l'obidoxime (1,87) alors que son efficacité de réactivation *in*

vitro est 10 fois supérieure à celle de l'obidoxime (**Tableau 22**). Comme nous le soulignons depuis l'introduction de cette thèse, il faut donc rester prudent pour effectuer une corrélation entre les résultats *in vitro* et *in vivo*.

8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette partie de mon projet était de concevoir et de synthétiser des antidotes multi-cibles aux intoxications par des organophosphorés, qui puissent à la fois réactiver les cholinestérases et avoir un effet antagoniste sur les récepteurs nicotiques.

Les données de la littérature ont confirmé que la quaternarisation des ligands aminés (morpholine et N,N-diméthylpipérazine) des réactivateurs possédant un effet antagoniste sur les nAChRs $\alpha 7$ pouvait accentuer cet effet, tout en augmentant leur affinité pour le site actif phosphorylé des cholinestérases. De plus la littérature a rapporté également un fort pouvoir antagoniste sur les nAChRs pour le motif quinuclidinium, qui s'avère aussi un bon ligand des cholinestérases et en particulier de la BChE. En outre cette charge du ligand peut avoir un effet bénéfique sur la solubilité du produit, sa biodisponibilité et sa toxicité.

Quatre structures ont donc été envisagées et analysées *in silico*. Le logiciel Percepta ne prévoit pas de passage de la BHE pour ces quatre composés mais l'analyse de leurs caractéristiques physico-chimiques, sur lesquelles se base leur score CNS MPO supérieur à 4, indique au contraire que l'hydrophilie liée à leur charge permanente ne semble pas être un obstacle à leur passage de la BHE. Cependant Percepta® indique aussi que la toxicité de ces produits et leur affinité pour la glycoprotéine P devront être des points de vigilance à vérifier au niveau des tests *in vivo*. Enfin, les études d'amarrage moléculaire ont fourni des énergies de stabilisation satisfaisantes des composés dans le site actif de l'hAChE phosphorylée par le sarin et le VX. Les positionnements permettant à l'oxime de pointer vers le phosphore à une courte distance étaient quasiment toujours obtenus, le cas du sarin étant cependant plus délicat. De plus ces structures permettaient de former des interactions spécifiques avec les résidus du site actif de type hydrophobe, π - π , cation- π ou encore des liaisons hydrogène.

La synthèse de la fonction réactivatrice seule **PDG-149 MsOH** s'est faite sans difficultés avec un rendement de 17% en 5 étapes à partir du produit de départ **7**. Les tests d'électrophysiologie effectués ont permis de montrer que ce motif avait peu d'effet sur les nAChRs $\alpha 7$. Les effets antagonistes des

composés synthétisés dans ce chapitre proviennent donc de l'association de cette fonction avec des ligands formant des interactions avec le site orthostérique.

La voie de synthèse choisie pour les composés **26**, **27**, **28** et **29** a été la voie convergente B (**Schéma 7**, page 130) car la voie linéaire A ne permettait pas d'associer la fonction réactivatrice et le ligand avec de bons rendements. Les sels de triflate d'ammonium peuvent en outre être facilement synthétisés à l'échelle de plusieurs grammes au début de la synthèse. Les produits incluant un bras espaceur de 5 carbones, **26 (PDG-036)** et **29 (PDG-121)**, ont pu être obtenus à raison de plusieurs centaines de mg avec un rendement global de 23% sur 4 étapes pour **26** et de 16% pour **29** à partir de l'intermédiaire **8**. Excepté la formation du produit secondaire à l'étape d'hydrogénolyse/réduction, cette synthèse est donc efficace pour obtenir ces produits.

La synthèse des composés incluant une chaîne de 4 carbones s'est avérée plus compliquée car la proximité de l'alcyne rend ces ammoniums plus instables dans les conditions du couplage de Sonogashira qui doivent donc être optimisées. 59 mg du composé **28 (PDG-087)** ont cependant pu être obtenus, qui ont permis de faire les différents tests biologiques.

A cet inconvénient s'est ajouté un manque de reproductibilité pour la synthèse du composé **27**. De plus les pertes lors des purifications des dernières étapes n'ont malheureusement pas permis d'obtenir le produit. La nécessité de purifier en phase inverse sur ces dernières étapes et la difficulté de ces purifications peut limiter la synthèse de **27** à plus grande échelle.

Il apparaît aussi que le contre-ion triflate est avantageux tant du point de vue de la synthèse, puisqu'il est résistant aux métathèses ioniques, que de la conservation des produits finaux qui sont très stables sous cette forme, alors qu'ils peuvent être beaucoup plus hygroscopiques en association avec des ions acétates. Ils rendent néanmoins les produits peu ou pas soluble, ce qui nécessite une formulation sous forme de sel de mésylate, ce qui ne pose pas d'inconvénient.

Les tests biologiques ont ensuite validé la double action, antagoniste des nAChRs $\alpha 7$ et réactivation à large spectre de l'hAChE, pour les trois produits synthétisés. Les résultats de **29** sont à cet égard juste satisfaisants tandis que ceux de **26** sont plus prometteurs. Ils permettent aussi de démontrer que la transformation de l'amine tertiaire en ammonium quaternaire améliore beaucoup l'affinité du composé pour le site actif de l'hAChE comme de l'hBChE, ainsi que pour le nAChR puisque l'effet antagoniste est aussi accentué.

Le composé **28** est enfin un antidote multi-cibles extrêmement prometteur : il réactive à large spectre l'hAChE, avec des efficacités exceptionnelles contre le tabun et le paraoxon, il réactive tous les OPs testés sur l'hBChE, excepté le tabun, avec de très bonnes efficacités contre le VX et le paraoxon, il a un effet antagoniste sur le nAChR neuronal $\alpha 7$, ainsi que sur le nAChR musculaire, avec une concentration inhibitrice médiane sub-micromolaire. L'amélioration des résultats obtenus par diminution de la longueur du bras espaceur de 5 à 4 carbones est ici spectaculaire entre **29** et **28**.

Les affinités des trois composés pour les différentes cibles ne permettent pas en l'état de penser que leur action sur chacune des cibles puisse être compromise par une sélectivité plus prononcée pour l'une d'elles, ce qui est encourageant vis-à-vis du concept multi-cibles développé et de la synergie des effets qui pourrait apparaître *in vivo*.

PDG-036 MsOH (26) sera testé *in vivo* dans les mois à venir et le composé **28** doit être à nouveau synthétisé pour des tests *in vivo*, ce qui pourrait donner lieu à une optimisation de la synthèse. Il paraît aussi envisageable de retenter la synthèse du composé **27**, avec les éléments de compréhension en main. De plus, compte tenu de l'effet antagoniste sur les récepteurs muscariniques de composés incluant un motif quinuclidinium, rapportés par Fischer *et al.*, il pourrait être intéressant de tester l'effet de **28** et **29** sur ces récepteurs muscariniques.⁴⁵³ Enfin, compte tenu de l'effet radical de la longueur du bras espaceur sur les effets des MTDAs, la synthèse de l'analogue du composé **26** avec un bras espaceur de 4 carbones pourrait être envisagée, après une validation par une étude *in silico*.

La synthèse et les résultats *in vitro* obtenus sur ces composés feront l'objet d'une publication. De plus les capacités de réactivation de ces trois composés de l'hBChE inhibée par les OPs font déjà partie intégrante d'un brevet intitulé « BUTYRYLCHOLINESTERASE REACTIVATORS » dont je suis co-inventeur.

Il ne faut cependant pas oublier que les antagonistes compétitifs des nAChRs se sont révélés difficiles à utiliser en thérapeutique contre les intoxications aux organophosphorés comme nous l'avons vu dans l'introduction. Leur fenêtre thérapeutique est en effet étroite à cause des effets secondaires de l'inhibition excessive des nAChRs. A cet égard l'utilisation d'une dose NOAEL *in vivo* pourra s'avérer intéressant. Mais c'est aussi pourquoi nous nous sommes intéressés à la conception d'antidotes multi-cibles basés sur des modulateurs allostériques des nAChRs, soit positifs, soit négatifs, dont l'action modulatrice ne provoque pas ce genre de problèmes. Les effets de ces composés peuvent de plus permettre de resensibiliser les nAChRs désensibilisés par l'hyperstimulation continue durant l'intoxication. Cette partie sera présentée dans le chapitre III.

Cependant, les recherches menées par l'équipe de Papke *et al.* durant la dernière décennie permettent d'envisager une piste pour éviter l'inhibition excessive des nAChRs par nos MTDAs et les symptômes associés, par exemple après que la phase aigüe de l'intoxication soit passée.

En effet, son équipe a découvert les agonistes silencieux : ces molécules sont des ammoniums quaternaires qui se lient aussi dans le site orthostérique des nAChRs mais sans promouvoir l'ouverture du canal, et sont donc en compétition avec l'acétylcholine, ce qui en fait des antagonistes. Cependant, ils induisent malgré tout un changement de conformation du récepteur, qui le met dans un état désensibilisé réceptif à l'action des PAMs de type II. Ainsi, lorsqu'un PAM de type II est co-appliqué avec un agoniste silencieux, le canal peut s'ouvrir et l'agoniste silencieux qui était un antagoniste devient du même coup un agoniste. Ils sont dénommés silencieux car cette propriété ne peut être déterminée que par l'association avec un PAM de type II.⁴⁷⁸ La différence entre un motif ammonium agoniste et un motif ammonium agoniste silencieux tient à leur taille : en dessous de 130 Å³, ils agissent majoritairement comme des agonistes et au-dessus de cette taille ils agissent plutôt comme des agonistes silencieux.

Or il a été démontré que les motifs quinuclidiniums et N,N-diméthylpipérazinium ont la taille nécessaire pour être des agonistes silencieux.^{450,479,480} Nos composés sont donc potentiellement des agonistes silencieux. Si cela se confirmait, l'action du composé pourrait potentiellement être intervertie « sur commande » pour passer d'un antagoniste à un agoniste par l'injection d'un PAM de type II et ainsi éviter les effets secondaires à certaines étapes du traitement.

Il semble en revanche que l'accentuation potentielle de l'état désensibilisé des récepteurs par ce type de composé ne soit pas forcément souhaitable lors d'une intoxication aux OPs, puisque cet état provoque en partie la perte de transmission des influx cholinergiques après une trop longue activation par l'ACh s'accumulant. En l'état des connaissances il n'est pas évident de déterminer quel mécanisme d'action serait le meilleur pour un antagoniste dans le cas d'une intoxication : promouvoir un état désensibilisé du récepteur ou bien un état fermé de repos.

**CHAPITRE III : ACCES A DES ANTIDOTES MULTI-CIBLES (MTDA),
REACTIVATEURS DES CHOLINESTERASES ET MODULATEURS
ALLOSTERIQUES DES RECEPTEURS NICOTINIQUES**

1. EFFETS DES MODULATEURS ALLOSTERIQUES SUR LES RECEPTEURS NICOTINIQUES ET SELECTION DES STRUCTURES CIBLES

1.1. Intérêt des PAMs et des NAMs

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les récepteurs nicotiniques ont principalement trois états : fermé (au repos), ouvert et désensibilisé (forte affinité pour l'agoniste mais canal cependant fermé). Les modulateurs allostériques peuvent favoriser un de ces états thermodynamiques par rapport aux autres et faciliter leur transition vers cet état en se liant à un site allostérique sur le récepteur. Les changements conformationnels dans la structure tridimensionnelle du récepteur qui découlent de cette interaction avec le modulateur allostérique sont à l'origine de ces variations. La nature de ces changements de conformation et la force de la liaison du modulateur allostérique envers son site de liaison peuvent donc changer la durée de l'ouverture du canal et/ou le changement d'état du récepteur lorsqu'un ligand interagit avec ses sites orthostériques, par rapport à la réponse habituelle du récepteur à ce ligand.

Cette modulation présente plusieurs avantages par rapport à une action sur le site orthostérique : l'effet est beaucoup moins dépendant de la concentration d'acétylcholine, et la fenêtre thérapeutique est moins limitée par rapport aux antagonistes compétitifs qui peuvent devenir toxiques à partir d'une certaine dose en supprimant complètement la transmission nicotinique.

Lors d'une intoxication aux OPs la stimulation continue par de fortes concentrations d'acétylcholine active d'abord de façon prolongée les nAChRs puis va progressivement les placer dans un état désensibilisé qui va bloquer le passage des signaux aux jonctions synaptiques ou neuro-musculaires. Parmi les différents types de modulateurs allostériques découverts à ce jour, seul l'effet des modulateurs allostériques négatifs (NAM) a été testé, à notre connaissance, dans le cas d'une intoxication aux OPs, avec notamment le MB327 développé par Worek *et al.*^{414,415} Il appartient à un type de NAM appelé bloqueur de canal ouvert dont l'action inhibitrice dépend du voltage de la tension transmembranaire, ce qui évite une inhibition totale du nAChR. Les inhibitions successives sont aussi supposées éviter la désensibilisation des récepteurs, en passant constamment d'un état fermé à un état ouvert. Les tests effectués par cette équipe ont montré des effets bénéfiques de ce NAM (MB327) dans le cas de l'inhibition de l'AChE.

Les NAM ont donc fait partie des molécules parmi lesquelles nous avons recherché une structure pouvant donner lieu à la synthèse d'un ligand multi-cibles. Cependant, excepté MB327, les NAM ne peuvent pas resensibiliser les nAChRs déjà désensibilisés.

L'autre propriété intéressante de MB327 est donc justement de pouvoir resensibiliser les récepteurs nicotiques désensibilisés, qui repassent dans un état ouvert lorsque la molécule interagit avec eux, tout en augmentant l'intensité et la durée du signal ainsi créé. Cette propriété normalement dévolue aux modulateurs allostériques positifs dénommés PAM de type II pourrait donc avoir un effet bénéfique. En effet, lors d'une intoxication aux OPs, les symptômes les plus graves aux niveaux périphériques (paralysie des muscles squelettiques) et centraux (crises convulsives) surviennent notamment lorsque les jonctions synaptiques ou neuro-musculaires sont bloquées, à la fois par la dépolarisation persistante des cellules post-synaptiques et par la désensibilisation d'une grande partie des nAChRs. Les PAM de type II pourraient donc être utiles à ce niveau en resensibilisant les nAChRs pour rétablir le passage d'un signal au niveau des cellules suffisamment repolarisées, jusqu'à ce que suffisamment d'AChE redevienne fonctionnelle pour diminuer la quantité d'acétylcholine intra-jonctionnelle. De plus, les PAM de type II maintiennent les nAChRs dans un état ouvert plus longtemps, ce qui augmente l'intensité et la durée des signaux. Cette propriété pourrait donc aussi contrecarrer la réduction de la transmission nerveuse.

Les PAM de type II décrits dans la littérature ont donc aussi fait partie des molécules parmi lesquelles nous avons recherché une structure pouvant donner lieu à la synthèse d'un ligand multi-cibles. Cependant l'ouverture prolongée des nAChRs provoquée par ce type de composé pourrait potentiellement compromettre d'au moins deux façons ce mode d'action : la cellule post-synaptique pourrait rester dépolarisée sans pouvoir former de nouveaux potentiels d'action, et un afflux trop important de Ca^{2+} vers l'intérieur de celle-ci pourrait devenir cytotoxique pour la cellule.⁴⁸¹ Néanmoins, ces effets pourraient être minimisés par un mécanisme de compensation observé au moins sur le nAChR $\alpha 7$, faisant apparaître un état désensibilisé du récepteur insensible au modulateur allostérique, dont la proportion augmente avec la durée d'application du PAM et de l'acétylcholine, et le niveau de leurs concentrations respectives (qui seraient toutes deux élevées dans le cas du traitement d'une intoxication).³⁸⁶ Cet effet est réversible en l'absence du PAM de type II mais pose la question de la durée d'action de celui-ci. Ces questions font toujours l'objet de recherches à l'heure actuelle dans ce domaine.

Les PAM de type I, qui augmentent uniquement l'intensité du signal, car ils n'ont pas d'action sur la désensibilisation, pourraient éviter ces potentiels effets secondaires et ont donc aussi été considérés.

1.2. Critères de sélection

La recherche sur les modulateurs allostériques des nAChRs est intense et a donné lieu à la découverte de nombreuses molécules ayant des propriétés de PAM de type I, de type II, ou de NAM.^{387,450,482} Les structures sont très variées et nous nous sommes donc basés sur quelques critères pour en choisir certaines et approfondir leur potentielle combinaison avec la fonction réactivatrice de l'ACHÉ :

- Premier critère : le modulateur allostérique doit avoir une action sur les nAChRs $\alpha 7$, et/ou sur les $\alpha 4\beta 2$, et/ou sur les nAChRs musculaires et si possible sur d'autres sous-types de nAChRs. En effet les $\alpha 7$ et les $\alpha 4\beta 2$ sont les nAChRs les plus abondants au SNC, il est donc primordial d'avoir un effet sur ces sous-types pour espérer réguler l'activité nerveuse à ce niveau.^{483,484} De plus les $\alpha 7$ se trouvent aussi au niveau du système nerveux périphérique et modulent aussi la réponse immunitaire.^{360,361} En outre ce sous-type homomérique est connu pour se désensibiliser très rapidement par rapport aux autres sous-types, ce qui en fait potentiellement une cible intéressante dans le cas d'une intoxication aux OPs car ce sont probablement les premiers nAChRs susceptibles d'être désensibilisés.³⁷¹ Les nAChRs musculaires sont quant à eux indispensables pour retrouver un fonctionnement normal des jonctions neuromusculaires, notamment au niveau des muscles respiratoires. De plus, ces trois types de nAChR pouvaient être testés chez notre partenaire au CEA. Agir simultanément sur tous ces types de nAChR est intéressant mais n'apparaissait pas primordial car il existe assez peu de modulateurs allostériques ayant un aussi large spectre d'action, pour deux raisons principales. La première est que les sites allostériques sont beaucoup plus sensibles aux variations de structure entre les différents sous-types de nAChR que le site orthostérique, c'est pourquoi les modulateurs allostériques sont en général beaucoup plus sélectifs pour un sous-type de récepteur. La deuxième est que les recherches menées sur ces composés ont pour principal objectif le traitement des maladies neurodégénératives ou psychiatriques et ne s'orientent logiquement que vers des modulateurs allostériques ayant une action spécifique sur les nAChRs neuronaux, et non musculaires, voire sur un sous-type en particulier, pour limiter les effets secondaires.^{448,485,486}
- Deuxième critère : le mécanisme d'action du modulateur allostérique doit avoir été bien étudié et largement documenté. De cette façon, la comparaison entre les résultats d'électrophysiologie obtenus pour nos composés et ceux de la littérature permettra d'obtenir une analyse fine des potentielles différences observées et de pouvoir identifier les mécanismes en cause.

- Troisième critère : la synthèse du modulateur allostérique doit être décrite et ne pas être trop complexe pour limiter les étapes de synthèse.
- Quatrième critère : le modulateur allostérique doit pouvoir atteindre le cerveau, ce qui augmente les chances de ne pas compromettre le passage de la BHE pour l'antidote multi-cibles correspondant.
- Cinquième critère : la structure du modulateur allostérique doit être compatible avec le site actif de l'AChE et doit pouvoir former des interactions favorables avec les résidus essentiellement aromatiques de la gorge ou du site périphérique. La structure peut donc par exemple comprendre des cycles aromatiques pour former des liaisons π - π , ou bien une amine ou un ammonium pour former des liaisons cation- π .
- Sixième critère : des tests *in vivo* doivent dans l'idéal avoir déjà été publiés, pour vérifier le potentiel médicamenteux du modulateur allostérique en question et vérifier que les effets observés au niveau moléculaire se concrétisent bien par des effets significatifs au niveau d'un organe entier et de l'état de santé global d'un animal.

Pour tenir compte de ces six critères, une analyse des différents modulateurs décrits dans la littérature nous a conduit à sélectionner les molécules suivantes.

1.3. PAM de type II sélectionnés

1.3.1. TQS et GAT107

Le TQS (**Figure 80**) est un modulateur allostérique sélectif du récepteur $\alpha 7$ et fait partie des plus puissants PAM de type II : il augmente jusqu'à 4,2 fois l'intensité du signal provoqué par de l'ACh à 100 μ M sur des ovocytes de *Xenopus Laevis* exprimant le récepteur, avec une EC_{50} de 3,2 μ M, tout en diminuant fortement le phénomène de désensibilisation.³⁷⁵ Des études d'amarrage moléculaire ont permis de proposer un potentiel site de liaison qui se situerait au niveau de l'interface de deux sous-unités au niveau du domaine transmembranaire, ainsi que le mode de liaison de la molécule en fonction de l'état du récepteur.^{384,487}

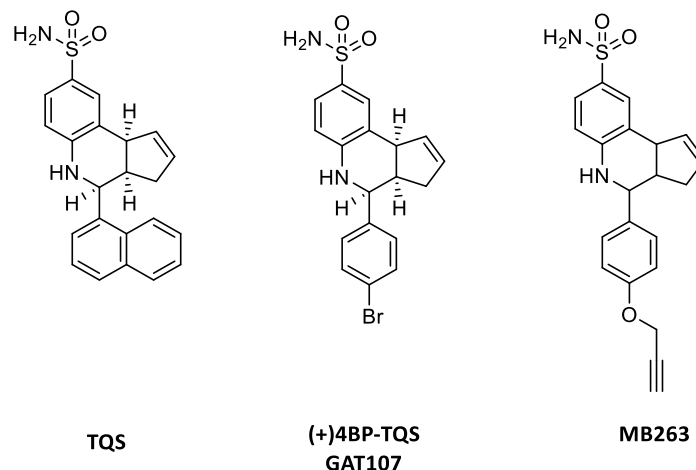


Figure 80 : Structures du PAM de type II TQS et de l'AGO-PAM GAT107, de structures similaires

Un composé possédant une structure dérivée du TQS, le GAT107, conserve ces effets de PAM de type II tout en étant capable de déclencher par lui-même l'ouverture du canal de façon non compétitive, donc sur un site différent du site orthostérique. Un tel type de composé a été appelé AGO-PAM.⁴⁸⁸⁻⁴⁹⁰ Les études d'amarrage moléculaire ont permis de proposer un nouveau site de liaison potentiellement à l'origine de cette fonction agoniste allostérique, extracellulaire cette fois.^{378,379} Cependant aucun des sites de liaison n'a pu être identifié de façon certaine, malgré la récente publication de la structure résolue par cryo-microscopie électronique du nAChR $\alpha 7$ humain (structures PDB 7KOO, 7KOQ, 7KOX).³⁸⁷

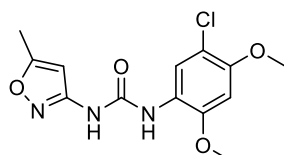
La structure du GAT107 est intéressante car sa synthèse a été décrite en une seule étape, ainsi que les méthodes de purification par HPLC chirale pour séparer les différents énantiomères.⁴⁹¹ La position bromée apparaît intéressante pour effectuer différents couplages avec un bras espaceur, permettant de lier la structure à notre fonction réactivatrice. Cette position peut aussi être fonctionnalisée sur le fragment correspondant avant l'étape de synthèse one-pot. La stagiaire post-doctorante Monica Cieslikiewicz-Bouet avait déjà précédemment synthétisé ainsi trois dérivés du GAT107 au laboratoire, avec soit un fluor, un groupe nitro ou un groupe propargyl à la place du brome (MB263 **Figure 80**) (non publié). Ce dernier dérivé en particulier permettait d'envisager la liaison avec la fonction réactivatrice par une cycloaddition de Huisgen.

Le stagiaire post-doctorant Julien Gasnot a entièrement travaillé sur ce projet en proposant des structures de MTDA basées sur le GAT107, dont les interactions potentielles avec l'AChE ont été évaluées ensuite par étude d'amarrage moléculaire à l'IRBA, puis en développant des voies de synthèse originales pour accéder aux structures retenues. Malheureusement, les purifications de ce type de composé se sont révélées extrêmement délicates et certaines étapes de synthèse ont présenté

un défi considérable pour atteindre les produits finaux, qui n'ont pas pu être obtenus dans les temps impartis, seuls des intermédiaires très avancés ont été synthétisés. Ces travaux ne seront pas détaillés dans cette thèse.

1.3.2. PNU-120596

1.3.2.1. Effet *in vitro* et site de liaison



PNU-120596

Figure 81 : Structure du PAM de type II PNU-120596

Le PNU-120596 est le PAM de type II sélectif du récepteur $\alpha 7$ le plus puissant sur ce récepteur et celui qui a probablement été le plus étudié. Il a été développé par Pfizer en 2005 à partir d'un criblage à haut débit dans le but de traiter des maladies neurologiques telles que la schizophrénie, Alzheimer, ou des traumatismes crâniens, pour lesquelles des études ont suggéré que ce nAChR pouvait jouer un rôle favorable.³⁷⁶ Ce composé augmente jusqu'à 4,5 fois l'intensité du signal provoqué par de l'ACh à 100 μM sur des ovocytes de *Xenopus Laevis* exprimant le récepteur $\alpha 7$, avec une EC_{50} de 1,6 μM , tout en diminuant considérablement le phénomène de désensibilisation (tracés représentatifs **Figure 82**).^{375,492}

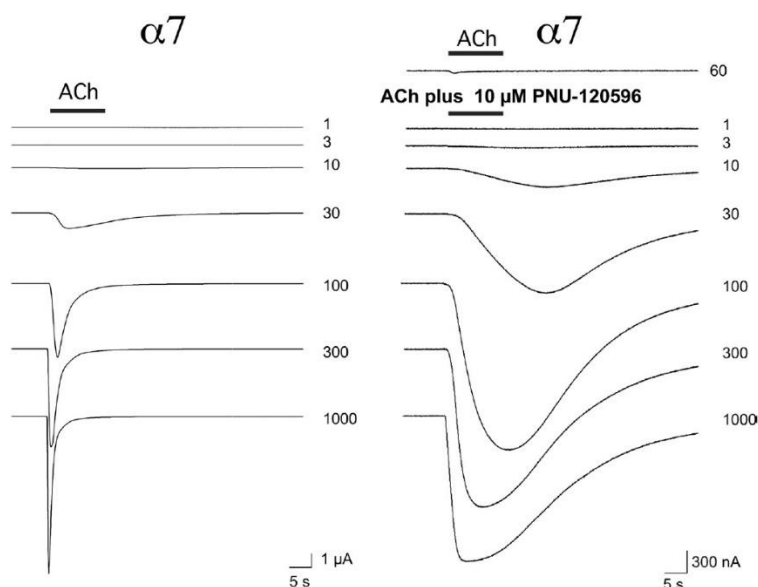


Figure 82 : Courants mesurés par des mesures d'électrophysiologie sur des ovocytes de *Xenopus Laevis* exprimant les récepteurs $\alpha 7$ humains, à différentes concentrations d'Acétylcholine (en μM), seule ou en co-application avec le PNU-120596 à 10 μM (protocole détaillé : Williams 2011).³⁸⁶

Le mécanisme d'action du PNU-120596 a été étudié en détails par l'équipe de Papke *et al.*, notamment le mécanisme par lequel le modulateur allostérique influence la cinétique du passage d'un état du récepteur à un autre et les équilibres entre ces différents états. L'influence simultanée de différents types de composé sur ces deux paramètres du récepteur fait aussi l'objet d'intenses recherches (comme la combinaison d'un PAM de type II et d'un antagoniste) et permettent de mieux comprendre comment manipuler la réponse du récepteur dans le sens voulu par les chercheurs.^{386,493} Comme il a été dit précédemment, un de ces résultats a montré l'apparition d'un état désensibilisé devenant insensible au PNU-120596 avec l'augmentation de sa fréquence d'application comme de sa concentration et de la concentration d'ACh.

Malgré cela, un résultat d'une étude de Herman *et al.* semble suggérer que le PNU-120596 pourrait, à partir d'une certaine concentration, potentialiser trop longuement l'ouverture des récepteurs dans le cadre d'une application longue durée, comme ce serait le cas lors du traitement d'une intoxication aux OPs, et induire un effet nocif sur les cellules.⁴⁹⁴ En effet, la viabilité de cellules SH-SY5Y exprimant les nAChRs $\alpha 7$ passe de 100% à 30% lorsqu'elles sont mises en solution avec la molécule agoniste choline à 100 μM et le PNU-120596 à 3 ou 10 μM pendant 24 h, cependant la viabilité reste de 100% pour une concentration de 1 μM en PNU-120596. Néanmoins, pour notre étude, cet effet n'est pas rédhibitoire, car, non seulement il est dose-dépendant, mais les changements de structure sur les modulateurs allostériques, même faibles, peuvent induire des différences considérables sur l'effet que produit le composé dérivé, et son ampleur, comme nous le verrons dans le point 2.1. Les modifications structurelles pour réaliser un MTDA à partir du PNU-120596 peuvent donc rendre potentiellement caduques ces préoccupations pour le MTDA en question.

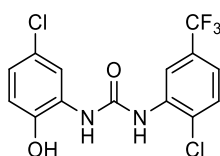
Des études d'amarrage moléculaire approfondies ont permis de proposer deux sites de liaison potentiels pour le PNU-120596 au niveau transmembranaire du récepteur $\alpha 7$: un site à l'intérieur d'une sous-unité $\alpha 7$ et un second à l'interface entre deux sous-unités. Le premier serait le site privilégié pour les effets de potentialisation du composé.³⁹⁰ Cependant, malgré l'observation par cryo-microscopie électronique du nAChR $\alpha 7$ humain en présence des ligands épibatidine et PNU-120596 ((PDB 7KOQ and 7KOX), aucun site de liaison n'a pu être précisément établi.⁴⁹⁵

Enfin, les deux groupements aromatiques de ce composé permettent d'envisager des interactions favorables avec les résidus du site actif de l'AChE.

1.3.2.2. Effet *in vivo*

Le PNU-120596 a montré une efficacité *in vivo* sur quatre phénomènes neuronaux : les désordres neurologiques d'ordre schizophrénique, l'apprentissage et la mémoire, l'état dépressif et les douleurs neuropathiques. La publication de Pfizer montrait en effet une amélioration significative sur des rats des déficits de filtrage sélectif auditif causés par de l'amphétamine, qui reflètent les désordres neurologiques schizophréniques.³⁷⁶ De plus la molécule a également montré des effets favorables dans un autre modèle animal de schizophrénie induite par de l'acétate de methylazoxyméthanol chez le rat.⁴⁹⁶ Les concentrations atteintes au cerveau étaient donc assez élevées pour permettre un effet systémique. Le PNU-120596 augmente aussi le potentiel thérapeutique de l'inhibiteur réversible de l'AChE donépézil pour améliorer les capacités de rats ou de singes à effectuer des tâches reliées à l'apprentissage et la mémoire.⁴⁹⁷ Ici, cependant, il ne démontrait aucun effet notable quand il était injecté seul. Cette expérience montre une similitude, toute proportion gardée, avec celle d'une intoxication aux OPs et montre donc un potentiel effet favorable. Le PNU-120596 induit également un effet anti-dépresseur sur des souris et l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs nicotiques $\alpha 7$ montre que cet effet passe bien par la potentialisation des signaux transmis par ces récepteurs.³⁹⁴ Enfin, le composé permet d'atténuer significativement les douleurs et les œdèmes dans des modèles de douleurs neuropathiques, respectivement chroniques ou inflammatoires, chez des souris.⁴⁹⁸

1.3.2.3. NS-1738



NS-1738

Figure 83 : Structure du PAM de type I NS-1738

Ce composé, qui est un PAM de type I des nAChRs $\alpha 7$ (Figure 84) développé par Neurosearch en 2007⁴⁹⁹, n'a pas été choisi comme motif de base pour la conception d'un MTDA mais a orienté une partie des réflexions sur la conception des MTDAs, comme nous le verrons dans la partie 2.3. Il est intéressant de considérer sa structure car elle comporte des similitudes avec celle du PNU-120596 et celle du SB-206553 (voir ci-après).

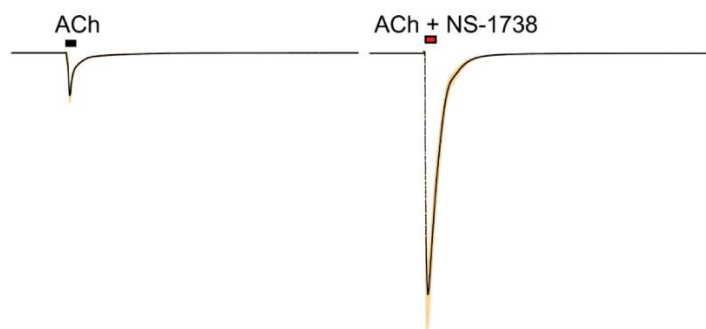
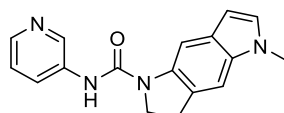


Figure 84 : Tracé représentatif de mesures d'électrophysiologie sur des ovocytes de *Xenopus Laevis* exprimant les nAChRs $\alpha 7$ en présence d'acétylcholine à $60 \mu M$ seule ou en co-application avec le NS-1738 à $10 \mu M$.⁴⁸⁸

De plus ce PAM de type I a aussi été bien étudié et a démontré des effets significatifs *in vivo*.³⁷⁴ De façon similaire au PNU-120596 en combinaison avec un agoniste du récepteur $\alpha 7$, il démontre un effet synergique en combinaison avec un agoniste du nAChR $\alpha 7$ ou de NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) sur des cellules neuronales CA1 de l'hippocampe de rat, en augmentant le taux de décharge post-synaptique induit.⁵⁰⁰ Ce composé a aussi démontré des effets anti-dépresseur sur des souris.³⁹⁴

1.3.3. SB-206553

1.3.3.1. Effet *in vitro* et site de liaison



SB-206553

Figure 85 : Structure du PAM SB-206553

Le SB-206553 a d'abord été découvert par Forbes *et al.* en 1995 comme antagoniste des récepteurs sérotoninergique 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B} avec une bonne sélectivité vis-à-vis des autres récepteurs 5-HT.^{501,502} Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G et participent entre autres fonctions aux effets sur le comportement au niveau central. Une étude de Dunlop *et al.* a ensuite permis de montrer l'effet potentialisant sélectif du récepteur $\alpha 7$ de ce composé par des expériences FLIPR (Fluorescent imaging plate reader) permettant de mesurer le flux de Ca^{2+} dans des cellules exprimant ces récepteurs.⁵⁰³ Sur ces tests le SB-206553 a une EC₅₀ de $1,5 \mu M$ quand il est co-appliqué avec une dose EC₂₀ de nicotine, et augmente l'intensité du signal à 82% de celle produite par une EC₁₀₀ de nicotine. Pour comparaison le PNU-120596 présente une EC₅₀ de $0,1 \mu M$ et augmente l'intensité à 203% de celle de l'EC₁₀₀ de nicotine dans les mêmes conditions.

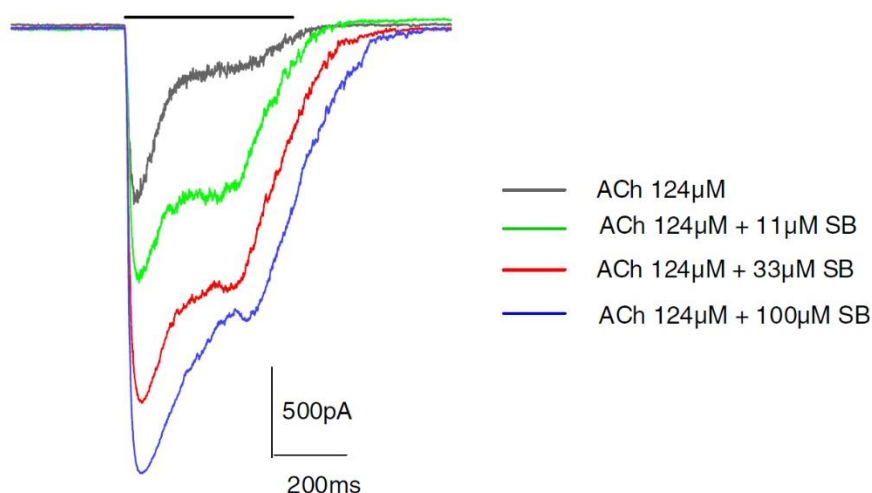


Figure 86 : mesures d'électrophysiologie sur des cellules GH4C1 exprimant le nAChR $\alpha 7$ en présence d'ACh à une dose EC_{100} , seule ou en combinaison avec le SB-206553 à différentes concentrations.⁵⁰³

L'effet PAM a aussi été vérifié par électrophysiologie et permet de voir qu'une réduction de la désensibilisation du récepteur devient significative à partir d'une concentration de 10 μM en SB-206553 (**Figure 86**). A des concentrations plus faibles ce composé est donc un PAM de type I, et à des concentrations supérieures il comporte un effet modéré de PAM de type II.

Des sites potentiels de liaison ont aussi été proposés par étude d'amarrage moléculaire sur le nAChR $\alpha 7$.³⁹¹ Enfin, là aussi, les deux groupements aromatiques peuvent potentiellement former des interactions favorables avec les résidus du site actif de l'AChE. Le fragment pyridine est aussi potentiellement intéressant pour envisager la conception d'un MTDA de façon intégrée (**Figure 41**).

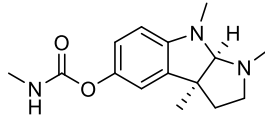
1.3.3.2. Effet *in vivo*

Les effets centraux de ce composé ont d'abord été montrés dans la perspective d'un effet sur les récepteurs 5-HT. Dans ce contexte le SB-206553 a montré des propriétés anxiolytiques *in vivo* sur le rat et le ouistiti.⁵⁰⁴ Son action sur ces récepteurs a aussi été testée pour traiter l'hyperactivité causée par la cocaïne sur des rats. Ici, une dose de 1 ou 2 mg/kg atténuait les effets périphériques et centraux de la cocaïne mais une dose de 4 mg/kg les accentuait au niveau périphérique.⁵⁰⁵ L'effet PAM sur les nAChRs $\alpha 7$ de ce composé a aussi été testé sur un modèle animal de rat mimant certains désordres neurologiques propres à la schizophrénie, et cet effet *in vivo* a été significativement favorable. De plus, l'utilisation simultanée d'un antagoniste sélectif des nAChRs $\alpha 7$ a pu montrer que cet effet était principalement dû à leur potentialisation et non pas à l'effet antagoniste sur les récepteurs 5-HT.

1.4. NAM sélectionnés

1.4.1. Physostigmine

1.4.1.1. Effet *in vitro* et site de liaison



Physostigmine

Figure 87 : Structures de l'inhibiteur d'AChE et NAM des nAChRs physostigmine

La physostigmine (**Figure 87**) est un inhibiteur covalent réversible de l'AChE bien connu. A partir des années 80, un effet modulateur allostérique de cette molécule sur les récepteurs nicotiques a été suspecté, puis démontré de plus en plus précisément. Un effet inhibiteur de la physostigmine sur les récepteurs nicotiques activés par de fortes concentrations d'acétylcholine a d'abord été suspecté via des expériences sur des cellules surrénales bovines et des cellules ganglioniques de lapin.^{506,507} Dans les années 90, deux équipes en collaboration ont beaucoup publié sur les effets modulateurs de la physostigmine, l'une de l'Université du Maryland (University of Maryland Medical School), l'autre de l'Université Johannes Gutenberg (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry) à Mainz. Ils ont observé un effet dual de la physostigmine. A de faibles concentrations, la physostigmine seule provoquait un léger effet agoniste, qui serait allostérique, ainsi qu'un léger effet potentialisateur des signaux provoqués par de faibles concentrations d'acétylcholine. En outre, à de plus fortes concentrations de physostigmine (ordre de grandeur 100 μM) et d'acétylcholine, un effet inhibiteur de la physostigmine apparaissait au contraire, qui ne serait pas compétitif. Les effets agoniste et potentialisateur ont été observés sur des tissus électriques de *Torpedo Marmorata*⁵⁰⁸⁻⁵¹⁰ ainsi que sur des nAChRs $\alpha 4\beta 2$ de poulet exprimés par des cellules M10.⁵¹¹ Ces effets, ainsi que les effets inhibiteurs, ont été observés avec des expériences sur des cellules neuronales de rat (PC12, phéochromocytome).⁵¹² De plus, dans ce dernier cas, ils observaient qu'une concentration de 10 μM de physostigmine pouvait réduire significativement la désensibilisation induite par une concentration désensibilisante d'ACh (environ 1 mM).

Une autre équipe a confirmé ces observations avec des ovocytes de *Xenopus Laevis* dans lesquels ont été injectées des membranes d'électroplaques de torpille (connues pour contenir un nombre considérable de nAChRs) : des concentrations de 1 à 100 μM de physostigmine inhibaient le signal

produit par de l'ACh, et l'effet désensibilisant produit par de fortes concentrations d'ACh était légèrement réduit par la physostigmine.⁵¹³

Au contraire, des expériences menées sur des nAChRs musculaires de souris ont montré que des concentrations de 1 à 100 μM de physostigmine augmentaient la désensibilisation induite par l'acétylcholine à différentes concentrations. En revanche, les autres effets observés précédemment ont été retrouvés sur ces récepteurs musculaires : les signaux provoqués par l'acétylcholine à faible concentration (100 nM à 1 μM) étaient modérément potentialisés par la physostigmine à 100 μM , tandis que pour des concentrations plus élevées d'ACh, la physostigmine démontrait un effet inhibiteur qui devenait total à 1 mM, avec une IC_{50} de 70 μM .⁵¹⁴⁻⁵¹⁷

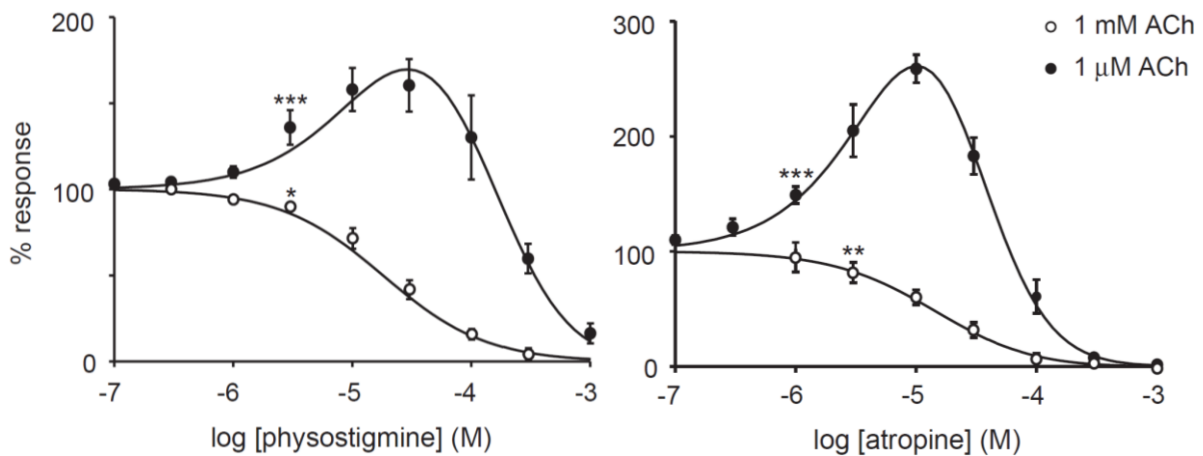


Figure 88 : Effet concentration-dépendant de la potentialisation et de l'inhibition provoquée par la physostigmine sur la réponse normalisée de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ humains exprimés par des ovocytes de *Xenopus laevis* à des concentrations de 1 mM ou 1 μM d'acétylcholine. Les astérisques indiquent les plus faibles concentrations pour lesquelles un effet significatif est obtenu par rapport au contrôle ($P < 0,05$, $0,01$, et $0,001$ indiqués respectivement par *, **, and ***)

C'est en 2005 que Smulders *et al.* ont montré que cet effet dual, potentialisateur puis inhibiteur, de la physostigmine se retrouvait bien chez les êtres humains, et ont élucidé de façon plus précise son mécanisme d'action sur des nAChRs $\alpha 4\beta 2$ humains exprimés par des ovocytes de *Xenopus laevis* (**Figure 88**). Sur ces récepteurs l'effet agoniste allostérique était cependant absent. L'intensité du signal provoqué par de l'acétylcholine à 1 μM (faible concentration) est augmentée par la physostigmine (de 10 à 100 μM) par un facteur maximum de 1,5. En revanche, à une concentration saturante de 1 mM d'acétylcholine (à des valeurs supérieures, un effet inhibiteur de l'ACh apparaît), la physostigmine a un effet antagoniste non compétitif avec une IC_{50} de 22 μM .⁵¹⁸ Ils déduisent de leurs observations que l'effet PAM serait compétitif : lorsque l'acétylcholine est à faible concentration, elle ne se lie majoritairement que dans un seul des deux sites orthostériques de ces nAChRs hétéromériques (à l'interface d'une sous-unité α et d'une autre sous-unité), la physostigmine pourrait alors se lier dans le

deuxième site orthostérique, ce qui augmenterait la probabilité d'ouverture du canal. En revanche, à haute concentration d'acétylcholine, les deux sites sont occupés et l'action antagoniste non compétitive de la physostigmine prendrait le dessus. Elle agirait alors comme un bloqueur du canal ouvert car il a été vu dans des travaux réalisés sur des nAChRs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 4\beta 4$ de rat que son action dépend du voltage imposé. Ces dernières études obtiennent aussi les mêmes observations et parviennent aux mêmes conclusions sur les effets de la physostigmine.^{519,520}

Enfin, l'équipe de Jin *et al.* est allée plus loin en montrant que la présence des effets potentialisateur ou antagoniste était dépendante de la stœchiométrie du nAChR $\alpha 4\beta 2$ humain (exprimé dans des ovocytes de xénope) : pour une stœchiométrie $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ l'effet potentialisateur est prépondérant tandis que pour une stœchiométrie $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ l'effet antagoniste est prépondérant.⁵²¹

Mozayan *et al.* ont également décrit le caractère purement antagoniste de la physostigmine sur les récepteurs $\alpha 7$ (espèce non indiquée) exprimés dans des ovocytes de *Xenopus Laevis*, avec une IC_{50} déterminée à 17,8 μM .⁵²² D'autres expériences sur des tissus nerveux de porc confirment par ailleurs cet effet antagoniste.

Cet effet dual sur les nAChRs neuronaux est intéressant dans le cas d'une intoxication aux OPs car lors de la phase aigüe de l'intoxication, lorsque l'acétylcholine atteint de très fortes concentrations, la physostigmine pourrait limiter l'hyperstimulation des nAChRs sans pour autant les inhiber totalement. Puis, lorsque la concentration en acétylcholine peut être redescendue à des niveaux acceptables, l'effet antagoniste de la physostigmine serait plus faible, ce qui pourrait éviter des effets secondaires si la réactivation de l'AChE doit être poursuivie. Les effets de la physostigmine sur les récepteurs musculaires humains n'ont malheureusement pas été étudiés à notre connaissance, ce qui ne permet pas de confirmer que la physostigmine a les mêmes effets que ceux observés pour les récepteurs musculaires de souris.

Le fait que l'atropine montre le même comportement que la physostigmine vis-à-vis des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ (**Figure 88**) n'est pas rédhibitoire car l'atropine a une IC_{50} de 14 μM sur ce récepteur alors qu'elle a une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire sur les récepteurs muscariniques, donc cette sélectivité très élevée permet de penser que son effet est négligeable sur les nAChRs. Au contraire, l' IC_{50} de la physostigmine est du même ordre de grandeur que l' IC_{50} des réactivateurs précédemment synthétisés au chapitre II pour l'AChE native, c'est donc une bonne molécule candidate pour un composé multi-cibles.

La boucle E du site orthostérique de la sous-unité $\alpha 4$ ainsi que deux résidus des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ ont été également identifiés comme faisant potentiellement partie du site de liaison de la

physostigmine.^{523,524} Trois autres équipes ont étudié les sites potentiels de liaison de la physostigmine : trois sites potentiels ont été trouvés par étude d'amarrage moléculaire et de photomarquage sur le nAChR de *Torpedo Californica*,⁵²⁵ des études d'amarrage moléculaire sur les nAChRs $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 7$ ont aussi permis de proposer différents sites potentiels de liaison.^{526,527}

La synthèse de la physostigmine et de ses dérivés a été décrite de multiples façons, de manière stéréosélective ou non. Nous avons choisi une voie permettant d'avoir le produit final en mélange racémique pour que la synthèse ne soit pas trop complexe et n'ait pas un nombre trop grand d'étapes. La séparation des deux énantiomères finaux par HPLC chirale pouvait en outre être envisagée si besoin.

1.4.1.2. Affinité pour l'AChE

L'inhibition de l'AChE par la physostigmine représente un avantage conséquent pour la conception d'un MTDA à partir de cette structure car son motif a de grandes chances de former des interactions favorables avec le site actif de l'AChE. La physostigmine a principalement des interactions hydrophobes avec le site actif de l'AChE.⁵²⁸

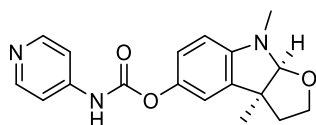


Figure 89 : Structure envisagée comme inhibiteur multi-cible de l'AChE et de la Neutral sphingomyelinase-2.⁵²⁹

De plus, au travers d'une étude visant à concevoir un composé multi-cible inhibiteur à la fois de l'AChE et de l'enzyme Neutral sphingomyelinase-2, le remplacement du méthyle du carbamate de la physostigmine par une pyridine substituée en position 4 (**Figure 89**) permet de conserver l'inhibition de l'AChE avec une IC_{50} de 7 μM , et donc de conserver une très bonne affinité.⁵²⁹ Cette pyridine pourrait donc être celle de notre fonction réactivatrice dans la conception d'un MTDA.

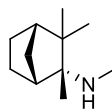
Il faut noter que pour la physostigmine et ses dérivés, l'inhibition se fait majoritairement par la formation d'une liaison covalente entre la sérine catalytique et le carbonyle du carbamate. Le changement de cette fonction carbamate permettrait de supprimer cette réaction chimique et de ne conserver que des interactions non covalentes entre l'enzyme et le composé, diminuant ainsi le potentiel inhibiteur de celui-ci. De plus, si l'affinité est encore trop forte, il est possible de jouer sur la stéréochimie car la (+)-physostigmine inhibe beaucoup moins l'AChE que la (-)-physostigmine.

Enfin, la physostigmine est formulée sous forme de sels pour les tests *in vivo*, notamment de tartrate, grâce à l'amine tertiaire présente sur le motif tricyclique. Cela représente un atout supplémentaire pour la solubilisation aqueuse du MTDA basé sur ce motif.

1.4.1.3. Effet in vivo

La physostigmine a atteint les tests cliniques pour la maladie d'Alzheimer, ou encore récemment pour réduire les douleurs post-opératoires.^{530,531} Ce composé a donc démontré des propriétés pharmacologiques satisfaisantes avec une très bonne biodisponibilité orale et un passage aisé de la BHE. Ce motif a donc des propriétés pharmacologiques optimales pour envisager la conception d'un MTDA qui l'inclurait.

1.4.2. Mécamylamine



Mécamylamine

Figure 90 : Structure du NAM mécamylamine

La mécamylamine est un NAM bien connu des récepteurs nicotiques. La priorité ayant été donnée à la synthèse du MTDA basé sur la physostigmine, la synthèse basée sur ce NAM n'a pas pu être faite faute de temps. Malgré tout, cette structure présente des propriétés intéressantes pour inclure ce motif dans la structure d'un MTDA. Les structures sélectionnées par étude d'amarrage moléculaire seront donc brièvement présentées comme perspectives à ces travaux.

En bref, la mécamylamine est un NAM avec un large spectre d'action avec une action efficace sur les nAChRs musculaires, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 2\beta 2$ et $\alpha 3\beta 2$ avec des IC_{50} entre 0,5 et 20 μM , et sur le récepteur $\alpha 7$ avec des concentrations plus élevées.^{380,409,532} Cette molécule peut donc avoir un effet périphérique comme central. C'est de plus un bloqueur de canal ouvert car son action est dépendante du voltage. Ses propriétés pharmacologiques sont également optimales car cette molécule a déjà été acceptée comme médicament, comme anti-dépresseur (Astrazeneca) et contre l'hypertension (Merck). Elle présente une bonne biodisponibilité avec une longue durée d'action et passe aisément la BHE.⁵³³ Des études de structure-activité sont également disponibles pour déterminer comment lier ce motif à la fonction réactivatrice.⁵³⁴⁻⁵³⁸ De façon similaire à la quinuclidine, ce motif peut faire un très bon ligand du site périphérique de l'AChE car l'amine secondaire protonée peut avoir des interactions favorables de type cation- π mais aussi apporter l'hydrophilie nécessaire à la solubilisation aqueuse du composé, tandis que le bicyclic apporterait la lipophilie nécessaire au passage de la BHE.

Enfin, la publication de Mangan *et al.* décrit la synthèse de chacun des deux énantiomères (la configuration absolue influe peu sur l'activité de la molécule).⁵³⁹

2. CONCEPTION DES MTDAS ET PREMIERE SELECTION *IN SILICO*

2.1. Contraintes sur les pharmacophores des modulateurs allostériques

L'action d'un modulateur allostérique sur un sous-type de nAChR peut dépendre de manière considérable des variations chimiques de sa structure.

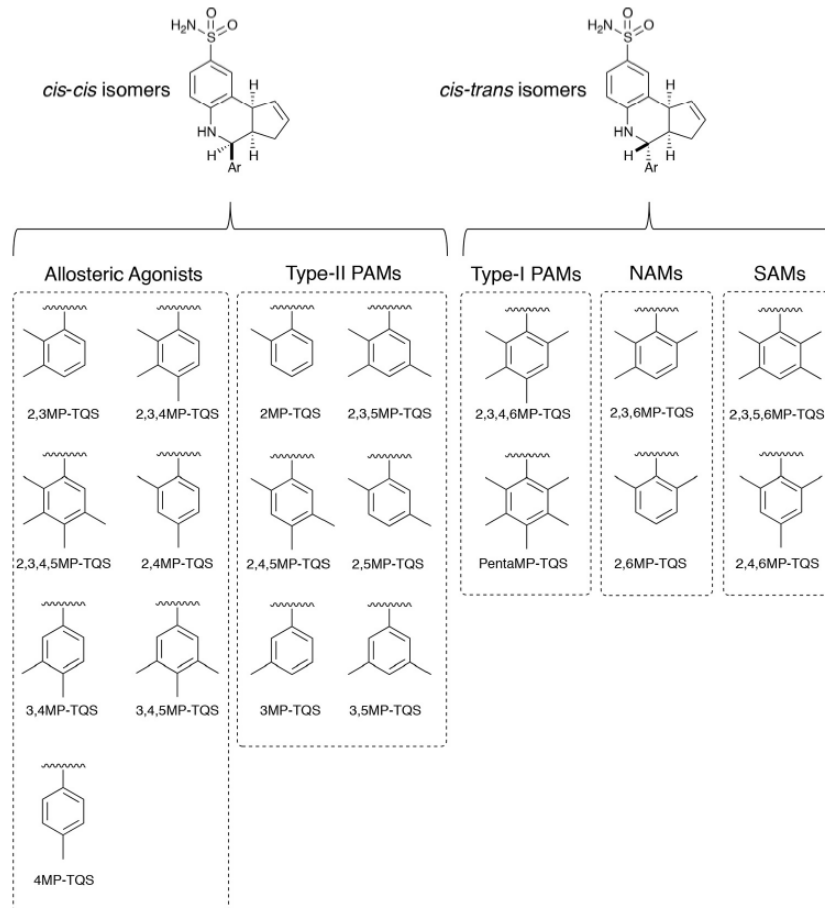


Figure 91 : Classification entre les différents types de modulateurs allostériques de molécules dérivées du TQS ne variant que par leur stéréochimie et la substitution par des méthyles du groupement phényl, selon les résultats de mesures d'électrophysiologie effectuées sur des cellules tsA201 de rein humain modifiées et exprimant le nAChR $\alpha 7$.⁵⁴⁰

Il semblerait en effet que des changements subtils dans les interactions produites entre le ligand et son site allostérique ou dans la façon dont le ligand s'y positionne puisse changer radicalement les modifications conformationnelles induites du récepteur et les équilibres thermodynamiques entre ses différents états qui en découlent. Ce phénomène est d'autant plus marqué que l'on ne connaît pas encore les sites allostériques de façon précise, ce qui ne permet pas d'identifier le pharmacophore minimal et les fonctions chimiques à conserver ou non.

L'exemple le plus frappant est celui des molécules dérivées du TQS (**Figure 91**). Suivant la stéréochimie de la molécule et la substitution du phényl par des méthyles, la structure change radicalement d'effet allostérique et peut provoquer toutes les modulations allostériques sur le nAChR $\alpha 7$ observés jusqu'à aujourd'hui dans la littérature (excepté AGO-PAM) : SAM, NAM, PAM de type I, de type II, agoniste allostérique. Devant ces contraintes et l'absence de site de liaison identifié avec certitude, nous avons essayé de conserver le plus possible la structure de départ des modulateurs allostériques choisis, tout en respectant les critères de sélection établis précédemment.

2.2. MTDA avec bras espaceur

2.2.1. Structures envisageables

Pour conserver la structure des modulateurs allostériques choisis, le meilleur moyen est de lier leur motif à la fonction réactivatrice grâce à un bras espaceur.

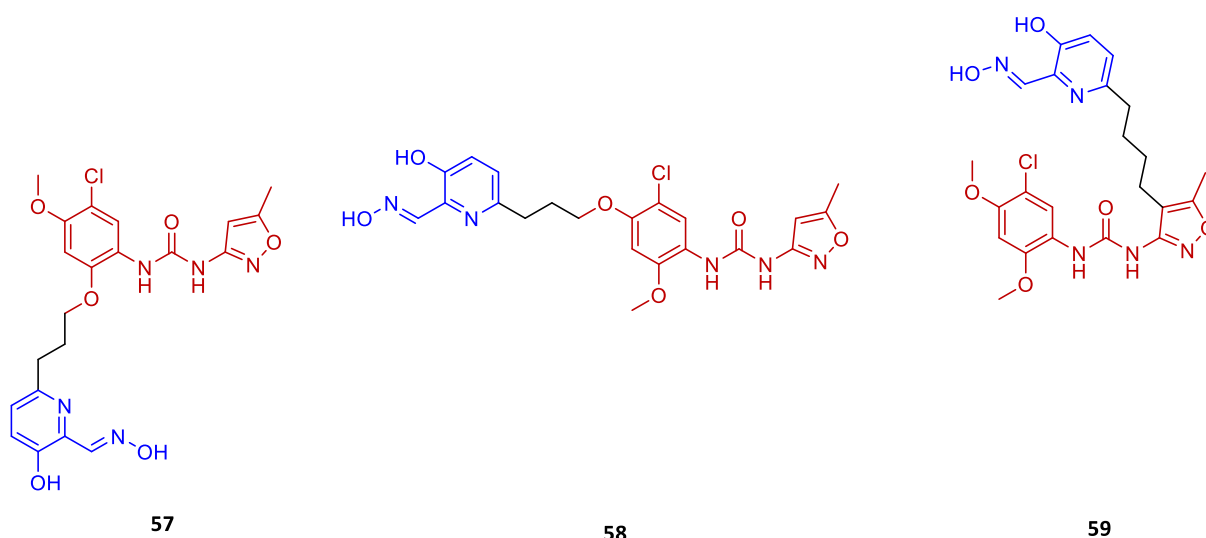


Figure 92 : Premières structures de MTDA considérées pour le PAM de type II PNU-120596 avec un bras espaceur, avec en rouge le motif du PNU-120596 et en bleu la fonction réactivatrice.

Une longueur de 4 atomes pour ce bras espaceur a été choisie car elle semble optimale au vu des résultats obtenus pour les réactivateurs des chapitres précédents incluant un bras d'une telle longueur. En étudiant les voies de synthèse possibles du PNU-120596, les structures ci-dessous basées sur ce PAM de type II ont donc parus envisageables d'un point de vue synthétique et ont été considérées dans un premier temps.

2.2.2. Sélection avec Percepta®

Le premier filtre de la sélection par étude *in silico* était la prédiction du passage de la BHE par le logiciel percepta. Or malheureusement, aucune de ces structures ne semble pouvoir traverser efficacement la BHE de manière passive selon le logiciel (**Figure 93**).

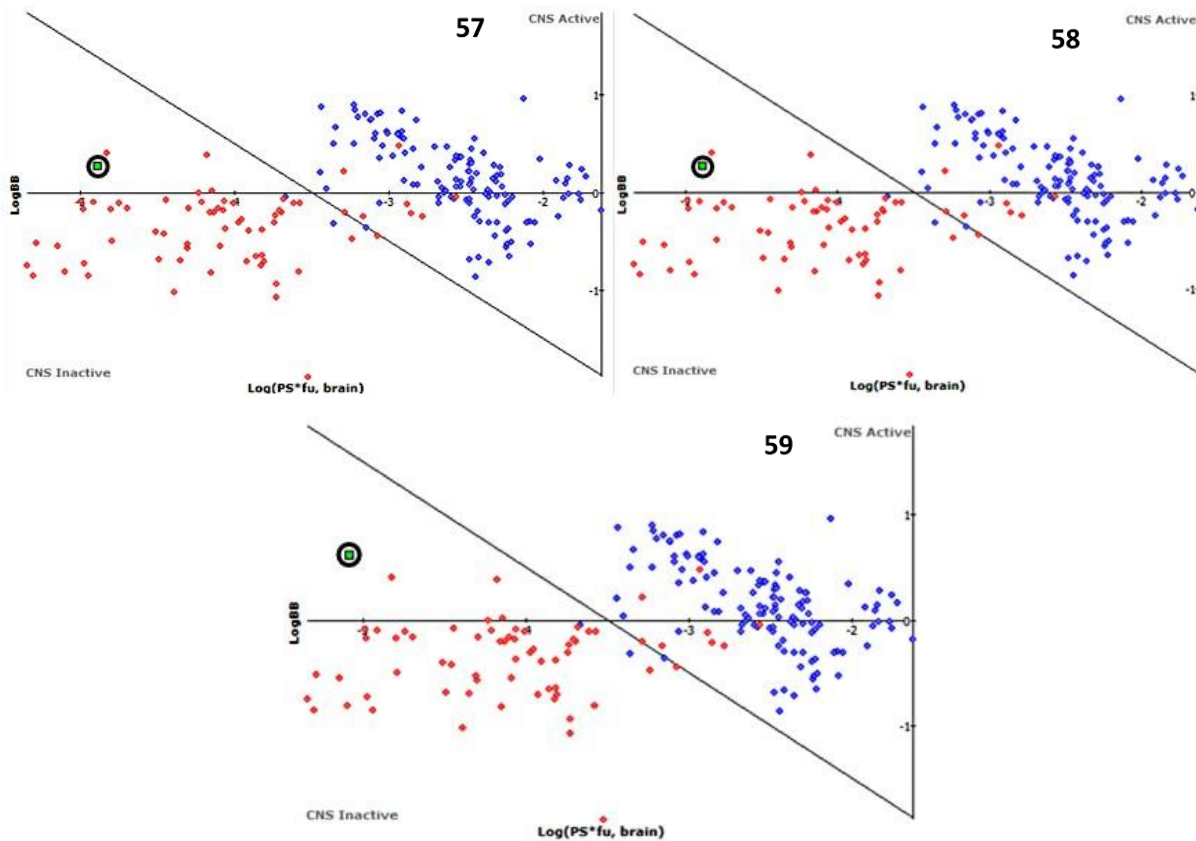


Figure 93 : résultats de Percepta pour le passage de la BHE pour les structures basées sur le PNU-120596, 57, 58 et 59.

Nous avons donc réfléchi à d'autres manières de lier la fonction réactivatrice aux différents motifs des modulateurs allostériques : fusionné, combiné ou intégré (**Figure 41**).

2.3. MTDA intégré ou combiné

2.3.1. Stratégie basée sur les similitudes de structure

Nous avons alors observé que les composés sélectionnés avaient des similitudes structurales (**Figure 94**). Tous les composés, excepté la physostigmine, comprennent une urée liée de part et d'autre à un groupement aromatique ou hétéroaromatique. La conception des MTDA pourrait donc se faire de

manière intégrée en remplaçant un des groupements aromatiques par la fonction réactivatrice, elle-même aromatique. La pyridine déjà présente dans la structure du SB-206553 plaide pour sa fonctionnalisation comme fonction réactivatrice. Pour le PNU-120596, le remplacement de chacun des deux aromatiques a été envisagé, mais l'hétérocycle azoté isoxazole semblait plus propice pour être remplacé par la pyridine de la fonction réactivatrice. Pour la physostigmine, le méthyle de son carbamate est remplacé par la fonction réactivatrice de façon analogue au composé multi-cible décrit précédemment qui conserve une bonne affinité pour l'AChE (**Figure 89**). En revanche, le carbamate est remplacé avantageusement par une urée comme pour les autres composés, ce qui modifie peu le motif tout en empêchant la formation d'une liaison covalente dans le site actif de l'AChE, par attaque de la sérine sur le carbamate.

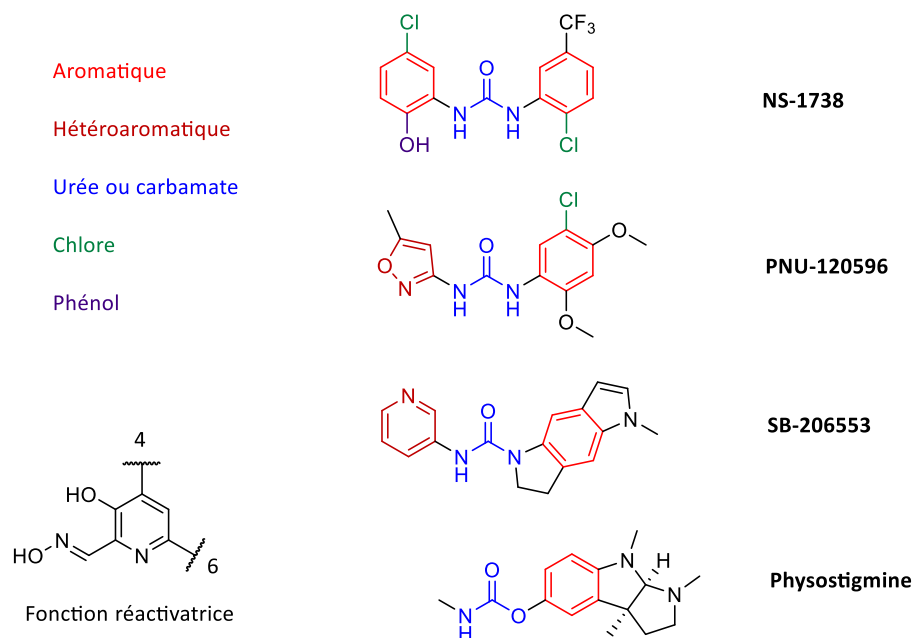


Figure 94 : Similitudes de structure entre les différents modulateurs allostériques de nAChR choisis, et positions 4 et 6 substituables de la fonction réactivatrice.

En utilisant ces similitudes structurales, il est possible d'augmenter les chances que les MTDAs obtenus puissent se lier dans un des sites de liaison de ces différents modulateurs. Pour augmenter ces chances, nous avons aussi considéré les atomes de chlore, commun au NS-1738 et au PNU-120596, pour en rajouter un ou non à la même position sur un des groupements aromatiques. De plus, la position du phénol du NS-1738 nous a fait envisager les deux substitutions possibles de l'urée sur la 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime : soit la position 6 habituelle, comme dans les chapitres précédents, soit la position 4, qui permet d'avoir le phénol dans la même position que celui du NS-1738.

Pour le SB-206553, la substitution à la position 3 de la pyridine telle que présente sur cette molécule n'étant pas possible, il était donc intéressant de considérer les deux positionnements adjacents 4 et 6. Cependant, sur les réactivateurs précédents développés par notre équipe, des études d'amarrage moléculaire ainsi que les résultats *in vitro* avaient montré que la substitution sur la position 6 était la plus favorable pour permettre au réactivateur de bien se positionner par rapport à la sérine phosphorylée. Cette observation a aussi guidé nos choix, pour autant elle s'avère finalement peut-être moins pertinente sur ces structures où le bras espaceur est une urée et non plus une chaîne alkyle, comme nous le verrons dans les études d'amarrage moléculaire.

L'ajout des fonctions polaires phénol et aldoxime, à la fois accepteurs et donneurs de liaisons H, est un facteur dont l'influence est très difficile à prévoir sur l'effet allostérique de ces composés, d'autant que ce type de fonction est peu présent sur les structures des modulateurs originaux.

Enfin, cette conception intégrée, ou combinée dans le cas de la physostigmine, permet une approche synthétique commune aux trois MTDAs envisagés : la fonction réactivatrice substituable en position 4 ou 6 d'une part, l'autre fragment aromatique d'autre part, et leur liaison par un bras espaceur urée.

2.3.2. Structures basées sur le PNU-120596

Le remplacement des deux groupements aromatiques du PNU-120596 a été envisagé (**Figure 95**). Lorsque le noyau phényle est remplacé par la fonction réactivatrice, (structures **60 – 62**) nous avons envisagé les positions 4 et 6 pour le positionnement de l'urée. Avec l'urée en position 4, le phénol peut se situer à la même position que celui du phénol de NS-1738, et l'ajout d'un atome de chlore a aussi été considéré pour correspondre encore plus au motif du NS-1738.

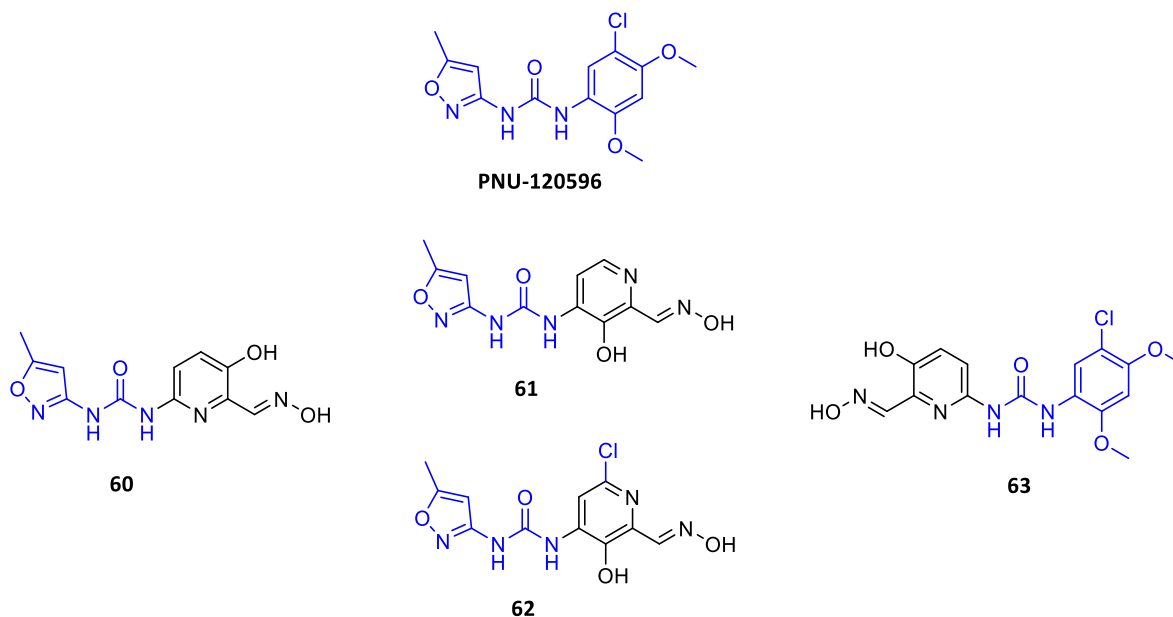


Figure 95 : Structures envisagées de MTDAs basés sur le motif du PNU-120596 (en bleu)

Lorsque le noyau isoxazole est remplacé par la fonction réactivatrice (structures **63**), nous avons seulement envisagé la position 6 pour l'urée, ce qui permettait à l'azote de la pyridine et à celui de l'isoxazole du PNU-120596 d'avoir la même position par rapport à l'urée.

2.3.3. Structures basées sur le SB-206553

Pour le SB-206553, seul le noyau pyridine déjà présent sur ce composé a été envisagé pour être remplacé par la fonction réactivatrice, grâce à la similitude entre les deux motifs (structures **64 – 66** Figure 96).

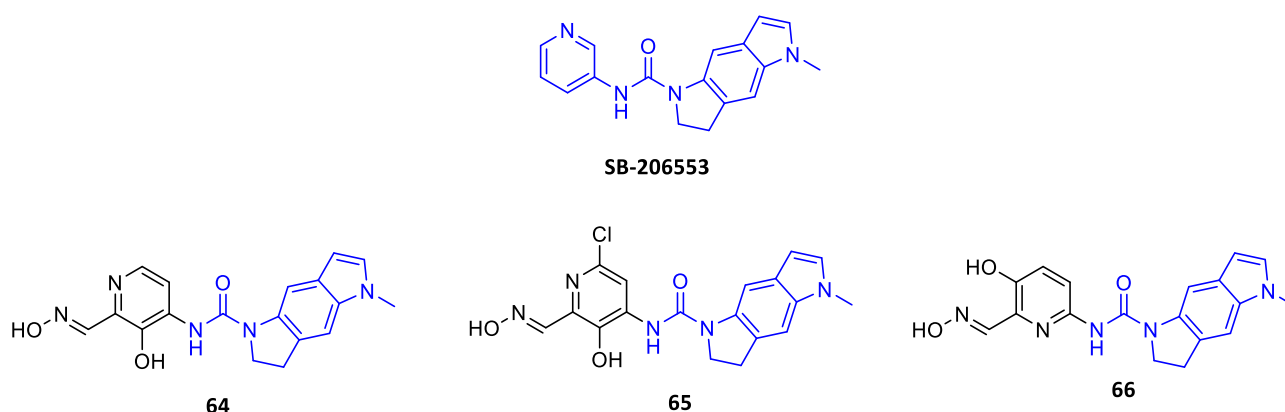


Figure 96 : Structures envisagées de MTDAs basés sur le motif du SB-206553 (en bleu)

La substitution de l'urée a été envisagée à la position 4 du noyau pyridine pour avoir les deux fonctions phénol et urée adjacentes, comme pour le NS-1738 (**64**), ainsi que l'atome de chlore (**65**).

2.3.4. Structures basées sur la physostigmine

Le méthyle du carbamate de la physostigmine est remplacé par la fonction réactivatrice tandis que le carbamate est remplacé par une fonction urée (**Figure 97**). Celle-ci a été envisagée aux positions 4 et 6 de la pyridine comme précédemment, avec ou sans atome de chlore pour l'analogue substitué en position 4, de façon similaire au NS-1738.

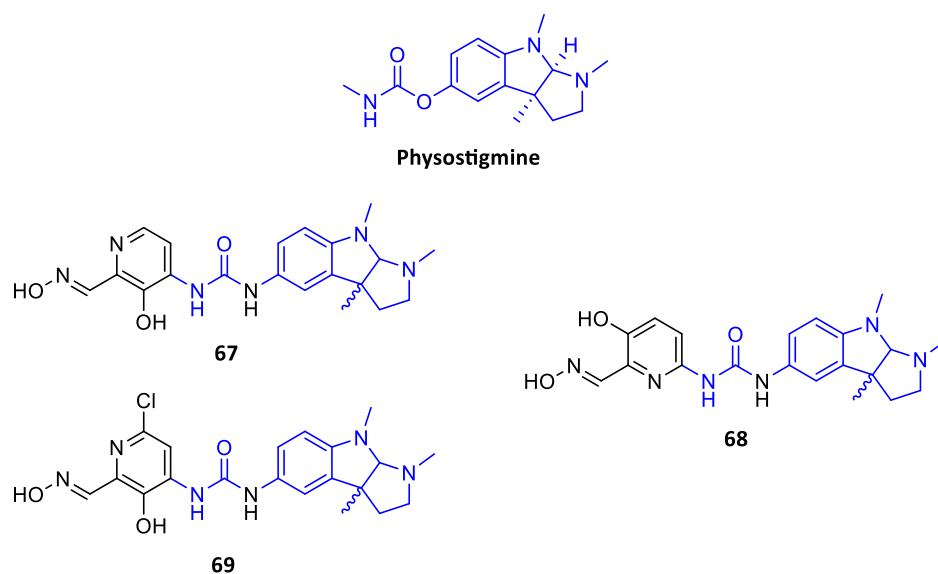


Figure 97 : Structures envisagées de MTDAs basés sur le motif de la physostigmine (en bleu)

3. SELECTION IN SILICO

3.1. Passage de la BHE

3.1.1. Percepta

Le potentiel passage de la BHE des différentes structures a été évalué avec le logiciel percepta. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous et les graphes des résultats positifs sont rassemblés **Figure 98**.

Modulateur	PNU-120596				SB-206553			Physostigmine		
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
Passage de la BHE	X	X	X	✓	✓	X	✓	✓	limite	✓

Tableau 26 : résultats de prédiction du passage de la BHE par percepta

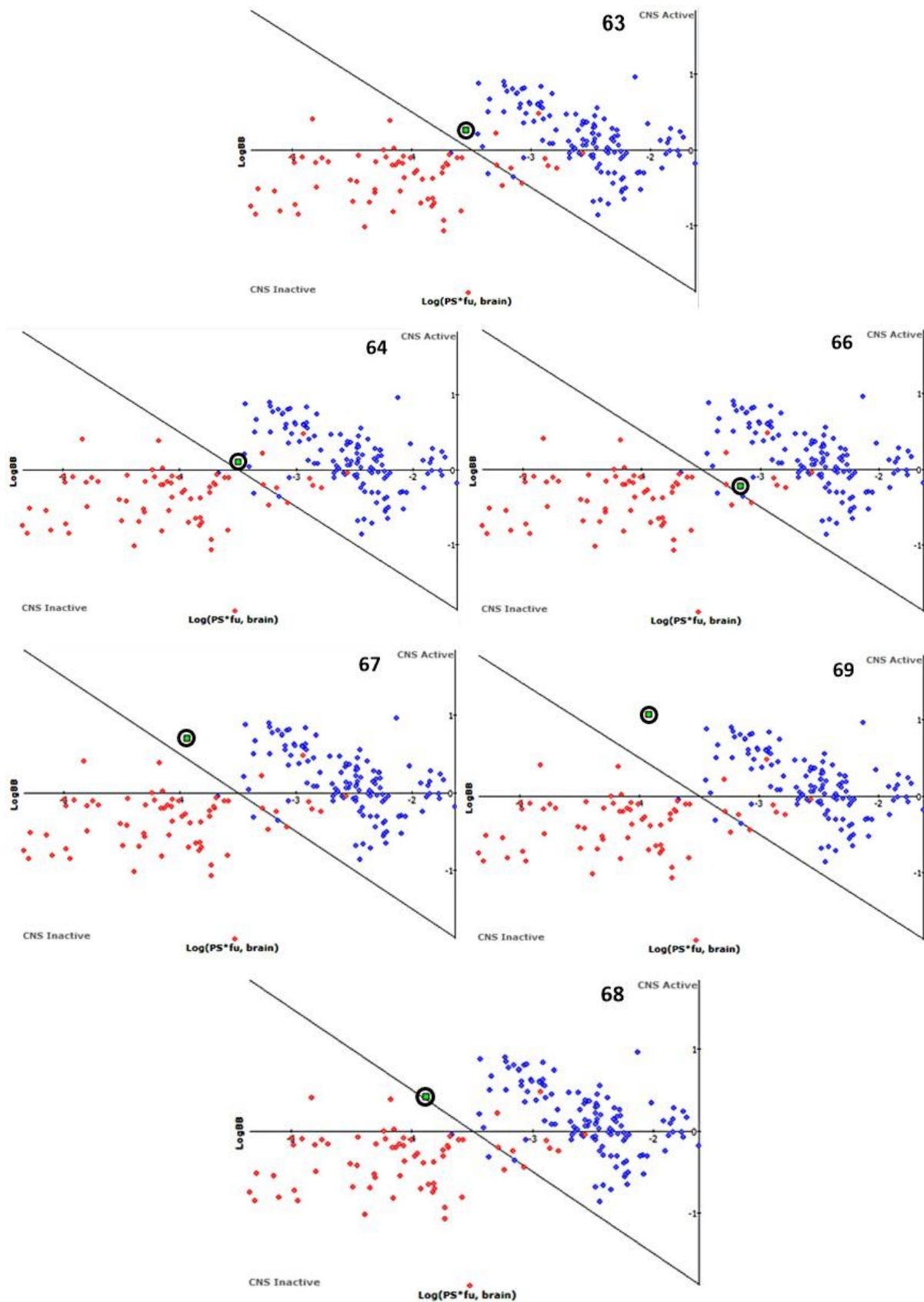


Figure 98 : résultats de Percepta pour le passage de la BHE pour les structures basées sur le PNU-120596 (64), sur le SB-206553 (65 et 66) et la physostigmine (69, 70 et 71)

Pour les MTDAs basés sur le PNU-120596, il semblerait que le remplacement du groupement phényl de ce PAM par la fonction réactivatrice ne soit pas favorable au passage de la BHE. Au contraire, le remplacement du groupement isoxazole par la fonction réactivatrice permettrait à la structure **63** de traverser la BHE selon percepta.

Pour les MTDAs basés sur le SB-206553, l'ajout d'un atome de chlore entre **64** et **65** se révèle très défavorable au passage de la BHE. Au contraire, l'ajout d'un atome de chlore entre la structure **67** et la structure **69**, toutes deux basées sur la physostigmine, semble améliorer le passage de la BHE. En outre, il semblerait que ces deux structures, où la pyridine est substituée à la position 4, soient légèrement plus favorables au passage de la BHE qu'à la position 6 (**68**).

Le logiciel Percepta prévoit aussi qu'aucune de ces structures ne devraient être des substrats de la protéine P-gp mais l'indice de confiance est toujours faible.

3.1.2. Modèle CNS+ et score CNS MPO

Les propriétés physico-chimiques prises en compte pour le passage de la BHE sont rassemblées dans le **Tableau 28**.

Composé	MW (g/mol)	pKa base	RB	HBD	HBA		TPSA (Å ²)	LogP		LogD à pH 7,4	Score CNS MPO	CNS+
					P	C		P	C			
60	277,2	1,9	3	4	9	6	132,9	0,9	1,75	1,39	4	X
61	277,2	3,9	3	4	9	6	132,9	1,12	1,15	0,61	4	X
62	311,7	0,8	3	4	9	6	132,9	2,55	1,98	1,11	4	X
63	366,8	1,9	5	4	9	7	125,3	3,02	2,46	2,47	3,7	X
64	351,4	3,9	2	3	8	5	103	2,75	2,22	1,79	4,2	X
65	385,8	0,9	2	3	8	5	103	4,21	3,05	2,32	3,5	X
66	351,4	1,9	2	3	8	5	103	2,34	2,82	2,6	3,9	X
67	396,4	6,7	3	4	9	7	113,3	2,53	2,34	2,25	3,6	X
68	396,4	6,7	3	4	9	7	113,3	2,11	3,04	3,05	3,2	X
69	430,9	6,5	3	4	9	7	113,3	3,80	2,97	2,8	2,9	X
Critères CNS+	< 450	> 7,5 < 10,5	< 8	< 3	< 7	< 70		< 5				

Tableau 27 : Propriétés physico-chimiques déterminées par Chemicalize (C) et Percepta (P) des structures envisagées dans ce chapitre, ainsi que leur score CNS MPO et leur respect des critères CNS+ pour évaluer leur activité au SNC. X : pas CNS+

Aucune molécule ne remplit tous les critères CNS+ car le pKa de la base est toujours trop bas et la surface polaire est toujours trop grande. Pour le pKa de la base, les structures basées sur la physostigmine ont l'avantage d'avoir une amine tertiaire dont une petite partie sera protonée à pH physiologique. Toutes ces structures sont cependant assez lipophiles (logP et logD), sans l'être excessivement, excepté les structures **65**, **68** et **69**, notamment à cause de l'atome de chlore.

Parmi les structures évaluées favorablement par le logiciel percepta, le score CNS MPO de **63** est légèrement inférieur à ceux des autres structures basées sur le PNU-120596, sans que cela soit fortement significatif, et ce score reste proche de 4 ; sa sélection se confirme donc à ce niveau. Pour le SB-206553, le score CNS MPO ne permet pas de trancher clairement entre **64** et **66**, qui ont des scores autour de 4. Cependant, l'élimination de **65** se confirme ici aussi avec un score inférieur aux deux autres structures. Les structures basées sur la physostigmine ont les moins bons scores CNS MPO. La structure **67**, qui a le meilleur score des trois structures avec 3,5, est donc à favoriser à ce niveau. Les structures **68** et **69** ont notamment des lipophilies (logP et logD) un peu trop élevées.

3.1.3. Autres propriétés

Il faut d'abord noter que les valeurs de solubilité ont été étudiées pour l'essentiel bien après avoir opéré le choix parmi les différentes structures car la comparaison des trois différents outils (percepta, SwissADME et chemicalize) ne pouvait être faite à ce moment-là. Or la prédiction de la solubilité nous apparaissait peu fiable avec un seul outil, et n'avait donc pas été autant analysée qu'ici. La comparaison des trois outils, bien que montrant des écarts considérables dans les valeurs obtenues, présente des tendances entre les différentes structures qui sont quasiment toujours les mêmes et font ressortir que quelque soit la structure, la position 4 de l'urée semble favoriser une bonne hydrosolubilité tandis que la substitution en position 6 semble la défavoriser. Ces tendances seront rappelées en conclusion de ce chapitre pour mettre en perspective les propriétés des composés obtenus.

Parmi les structures basées sur le PNU-120596, les structures **61** et **62** ont été définitivement écartées car, en plus des valeurs insuffisantes évaluées par le logiciel percepta pour le passage de la BHE, les pKa de leurs oximes ne sont pas dans les valeurs recommandées, ce qui semble être lié à la position 4 de l'urée sur la pyridine (**Tableau 28**). La structure **60** a aussi été écartée en se basant sur les prévisions du logiciel percepta pour le passage de la BHE. Pour autant une tendance claire se dégage, pointant une solubilité supérieure d'un facteur 10 à celle de **63**. Malgré tout celle-ci a été choisie pour être étudiée par amarrage moléculaire. La prise en compte d'une telle différence de solubilité aurait peut-être remis en cause ce choix, d'autant que le score CNS MPO de **60** est bon.

Structure	pKa oxime	Solubilité LogS à pH 7,4 (mg/mL)			DL ₅₀ IP (souris) (mg/kg)
		Percepta	SwissADME	Chemicalize	
60	7,35	3,3	0,3 – 2,6	7,8	290
61	9,29	76	0,5 - 4,2	42,4	610
62	6,63	8,3	0,07 – 0,8	4,1	630
63	7,5	0,13	0,02 – 0,2	0,23	870
64	9,40	7,4	0,06 – 0,3	2,2	510
65	8,83	20	0,02 – 0,05	0,2	530
66	7,58	0,8	0,06 – 0,19	0,37	480
67	7,33	77	0,03 – 0,38	16	390
68	7,67	14	0,03 – 0,23	3,3	340
69	8,86	7,7	0,007 – 0,06	1,1	380

Tableau 28 : Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques supplémentaires déterminées par les logiciels et sites internet Chemicalize, Percepta et SwissADME.

Parmi les structures proposées pour le SB-206553, l'oxime de **66** présente un bien meilleur pKa que celui de **64**. Celui-ci présente en revanche une meilleure hydrosolubilité. Les deux structures ont donc été étudiées par amarrage moléculaire.

Les données sont plus claires pour les structures basées sur la physostigmine car le choix fait sur la structure **67** à partir de son passage de la BHE (score CNS MPO et percepta) peut être confirmé ici : ce composé présente une très bonne hydrosolubilité et la valeur de son pKa est dans le bon ordre de grandeur.

3.2. Etude d'amarrage moléculaire

Pour les études d'amarrage moléculaire réalisées par nos partenaires à l'IRBA, les espèces chimiques majoritaires à pH 7,5 ont été chacune étudiées, soit l'oximate **63a** pour **63**, les trois structures **64a**, **64b** et **64c** pour **64** et l'oximate **66a** pour **66** (Figure 99). En raison de soucis techniques découverts tardivement, une telle étude d'amarrage moléculaire n'a pu être réalisée sur la structure exacte de **67**.

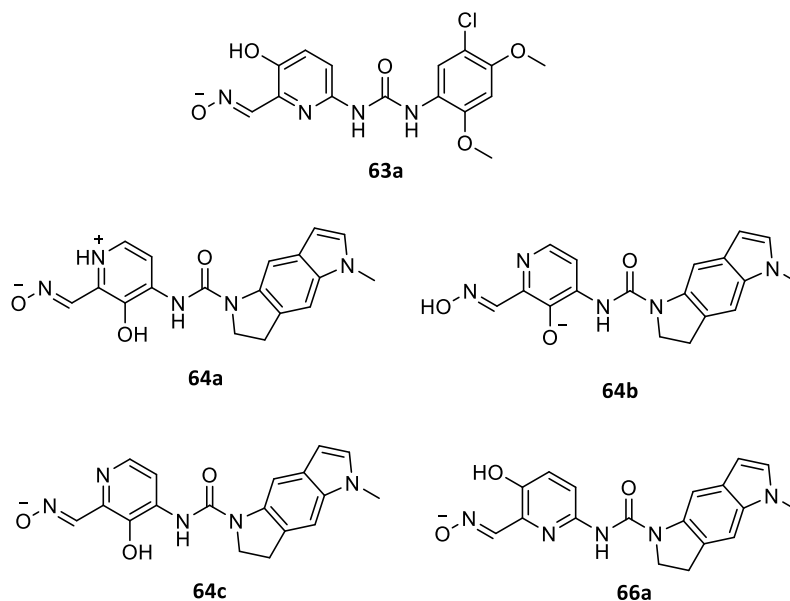


Figure 99 : Formes majoritaires à pH 7,5 des composés 63, 64 et 66 utilisées pour les études d'amarrage moléculaire

Les études ont été faites sur l'AChE phosphylée par le VX, le sarin et le tabun, avec 8 ou 10 poses, dont les résultats sont rassemblés dans le **Tableau 29**. Toutes les énergies de stabilisation de ces composés dépassent -9,4 kcal/mol, quelque soit l'OP, ce qui promet de très bonnes affinités entre ces structures et le site actif de l'AChE diversement phosphylé.

Pour le composé **63a**, que ce soit avec le VX ou le sarin, la moitié des poses montre la fonction réactivatrice vers le fond du site actif. Cependant l'oxime pointe souvent dans une direction différente que celle menant au phosphore, ce qui induit des distances P-O assez grandes. Elles restent cependant satisfaisantes pour les meilleures poses identifiées, autour de 6 Å, où l'oxime est bien dirigée vers le phosphore. Dans le site actif de l'AChE phosphylée par le VX, l'interaction principale qui permettrait de bien positionner la fonction réactivatrice est une interaction π - π entre le ligand aromatique et le résidu Tyr341 (**Figure 100**). A l'inverse, cette même interaction, qui est prépondérante parmi les différentes poses obtenues avec l'AChE phosphylée par le sarin, positionne beaucoup moins bien la fonction réactivatrice avec cet autre OP. La meilleure conformation obtenue à la pose 2 est stabilisée grâce à une interaction π - π entre le ligand et le résidu Trp286. Le résultat est en revanche prometteur pour le tabun puisque la première pose montre une conformation favorable à la réactivation avec une excellente énergie de stabilisation.

Au vu de ces résultats, le choix de synthétiser la structure **63** se confirme donc ici.

Composé	hAChE-VX			hAChE-sarin		
	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°
63a	-9,4	5,5	5	-9,5	6,7	2
64a	-11,8	4,3	1	-10,8	7,8	1
64b	-10,3	4,9	4	-10,2	6,3	3
64c	-10	7,2	4	-9,8	6,8	4
66a	-11,2	4,1	2	-10,5	6,8	3

hAChE-tabun			
Composé	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°
63a	-11,5	6,2	1
64a	-10,6	8,6	5
64b	-10,5	7,9	4
64c	-10,6	6,2	3
66a	-11,1	6,3	4

Tableau 29 : Résultats d'étude d'amarrage moléculaire des ligands 63a, 64a, 64b, 64c, 66a et 67 sur l'AChE phosphylée par le VX et le sarin, réalisée à l'IRBA. ΔG : énergie de stabilisation.

Les différentes formes de **64** montrent des résultats variés mais toujours avec de très bonnes énergies de stabilisation. On peut notamment observer que les conformations favorables à la réactivation sur le VX et le sarin se font potentiellement grâce à une interaction π - π entre le ligand cyclique aromatique et le résidu Trp286 (**Figure 100**). On peut aussi observer que, globalement, au moins deux formes protonées sur les trois ont une distance P-O satisfaisante sur les trois OPs testés, quand la troisième a de moins bons résultats : **64c** pour le VX et **64a** pour le sarin et le tabun. Ces distances sont globalement optimales pour le VX, satisfaisantes pour le sarin mais un peu en retrait pour le tabun, à l'encombrement stérique plus prononcé.

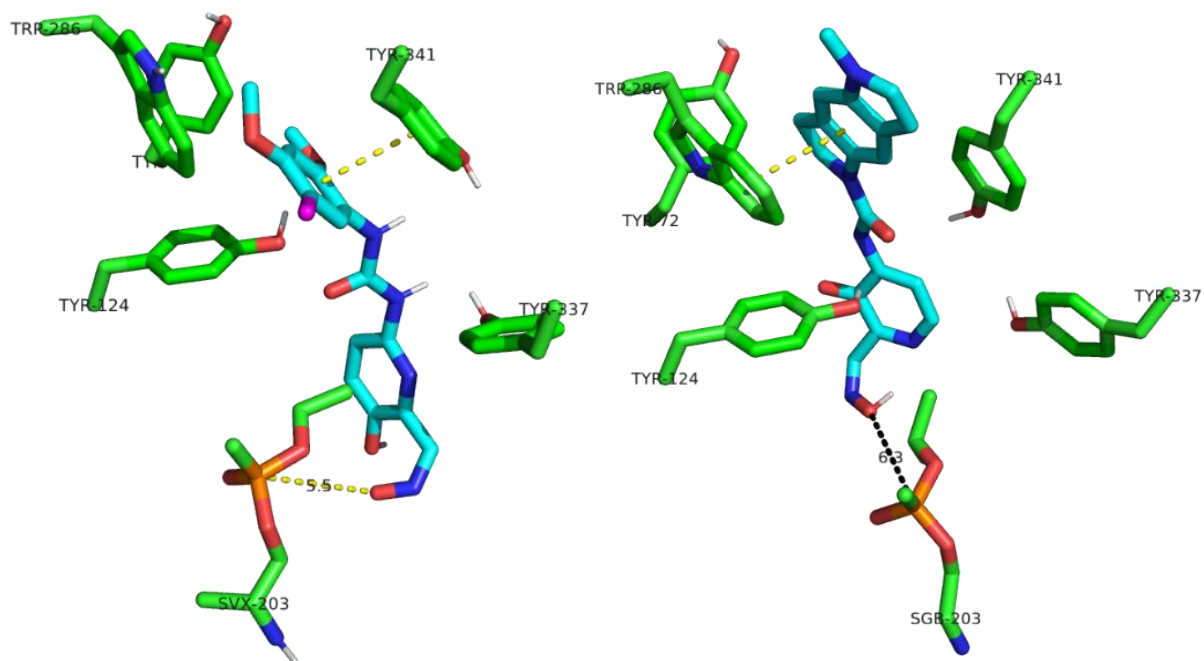


Figure 100 : Conformation n°5 de 63a (gauche) et n°3 de 64b (droite) dans le site actif de l'hAChE phosphorylée respectivement par le VX et le sarin.

Le composé **66a**, où la substitution de l'urée se fait à la position 6 au lieu de la position 4 pour **64**, a des résultats globalement similaires (légèrement meilleurs contre le tabun), ce qui montre une faible influence de la position du lien urée pour cette structure basée sur le SB-20653. Ces études d'amarrage moléculaire ne permettent donc pas de départager les structures **64** et **66** et le choix de synthétiser en priorité la structure **66** s'est faite de manière assez arbitraire, en se basant d'une part sur l'expérience acquise, qui permet de penser que la substitution de l'urée en position 6 peut malgré tout être plus favorable, et en considérant que le pKa de l'oxime de **66** est beaucoup plus proche des valeurs recommandées que celui de l'oxime de **64** (Tableau 28).

En résumé on peut observer que le bras espaceur urée permet au ligand aromatique de former des interactions favorables avec les résidus du site périphérique et que cette fonction polaire urée est accommodée dans le site actif par au moins une des trois fonctions phénols des résidus tyrosines Tyr124, Tyr341 et Tyr337, avec parfois de potentielles liaisons hydrogènes. Il en résulte de fortes énergies de stabilisation et des distances P-O satisfaisantes pour le tabun et le sarin et optimales pour le VX. Ce type de structure, tiré de celles des modulateurs allostériques des nAChRs, semble donc aussi intéressant sur l'AChE.

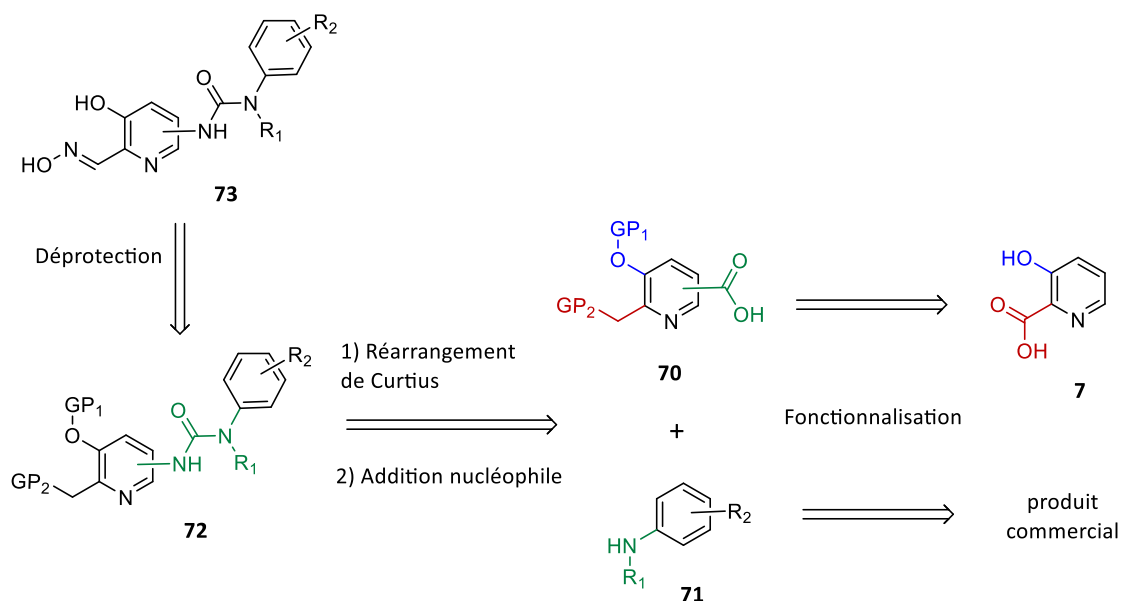
4. OBJECTIF

Compte tenu des éléments tirés des études *in silico*, l'objectif de cette partie de ma thèse était de synthétiser les structures **63**, **66** et **67** dans des quantités suffisantes (au moins 10 mg) et à une pureté HPLC supérieure à 95% pour pouvoir tester ces composés *in vitro* sur l'AChE inhibée par différents OPs ainsi que par électrophysiologie sur différents sous-types de nAChRs. Les modulateurs allostériques **PNU-120596** et **SB-206553** devaient aussi être synthétisés pour observer si leur ajout au traitement en cas d'intoxication a bien un effet bénéfique ou non, et en corrélant ces potentiels effets à ceux observés par électrophysiologie sur différents nAChRs.

5. SYNTHÈSE

5.1. Rétrosynthèse

La synthèse de ces composés peut se faire via une voie convergente entre le noyau pyridine **70** fonctionnalisé avec un acide carboxylique (à partir de l'acide 3-hydroxy picolinique **7** de départ) et une aniline **71** correspondant au fragment conservé de chaque modulateur allostérique, obtenue à partir d'un produit commercial adapté (**Schéma 23**). La formation de la liaison urée entre les deux fragments est alors réalisée par la transformation de l'acide carboxylique de **70** en isocyanate, par un réarrangement de Curtius, suivie de l'attaque nucléophile de l'aniline **71** sur celui-ci.



Schema 23 : schéma de rétrosynthèse des trois MTDAs de ce chapitre, 63, 66 et 67. GP : groupe protecteur, R_1 : H ou alkyle cyclique, R_2 : alkyle ou aryle cyclique, Cl, méthoxy.

L'acide carboxylique de **70** doit être en position 6 pour les structures **63** et **66** et en position 4 pour la structure **67**. Pour cela nous avons pensé faire la bromation sélective de la position souhaitée.

Une fois l'urée **72** obtenu, les fonctions carbonyles et phénol devaient être déprotégées pour obtenir les produits finaux désirés.

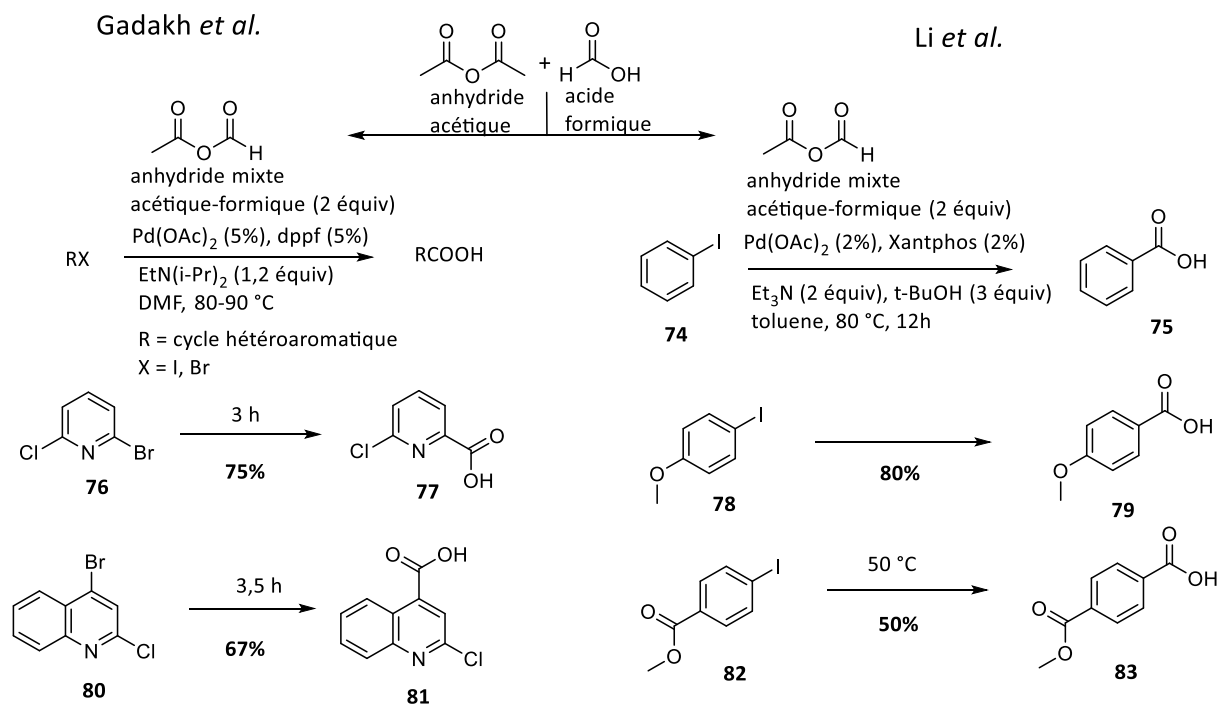
Cette voie de synthèse a l'avantage de faire appel à la même méthodologie de synthèse pour la formation de l'acide carboxylique sur le noyau pyridine et pour la formation de l'urée pour chacune des trois synthèses. Les autres étapes ont cependant été différenciées, suivant les structures de chaque substrat.

5.2. Réaction d'hydroxycarbonylation

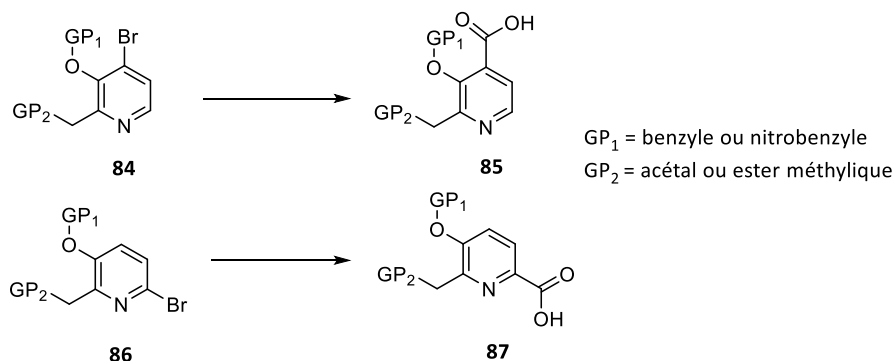
5.2.1. Mécanisme

Pour ajouter cette fonction acide carboxylique sur le noyau pyridine, nous avons utilisé la réaction d'hydroxycarbonylation qui peut se faire sur un cycle aromatique ou hétéroaromatique halogéné, avec incorporation pallado-catalysée du groupement CO. Nous nous sommes appuyés sur les méthodologies développées par Gadakh *et al.* et Li *et al* (**Schéma 24**).^{541,542}

Leur méthode permet la formation *in situ* de gaz CO qui est ensuite inséré sur le cycle aromatique par du palladium(0) (au départ acétate de palladium(II)) complexé avec soit du dppf (1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocene), soit du Xantphos. Le gaz est produit en excès à partir de la décomposition thermique de l'anhydride mixte acétique/formique, synthétisé en amont de la réaction par l'agitation à 30 °C pendant 1h30 d'acide formique et d'anhydride acétique. Cela permet d'utiliser des produits peu toxiques en évitant l'utilisation de bouteille de gaz sous pression. En revanche la réaction se fait dans un récipient sous pression pour éviter la fuite du gaz lors du chauffage, en conditions anhydres et sous argon.



r\u00e9actions envisag\u00e9es :

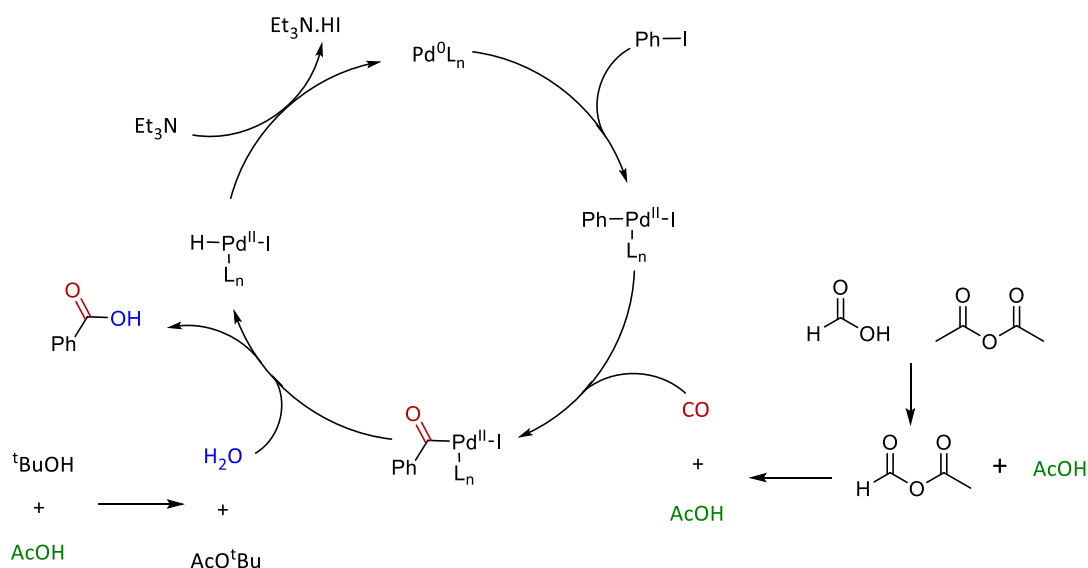


Schema 24 : R\u00e9actions d'hydroxycarbonylation d\u00e9velopp\u00e9es par les \u00e9quipes de Gadakh et al. et de Li et al. sur des cycles aromatiques ou h\u00e9teroaromatiques iod\u00e9s ou brom\u00e9s avec incorporation palado-catalys\u00e9e de CO produit in situ \u00e0 partir d'anhydride mixte ac\u00e9tique-formique.^{541,542} Exemples de substrats de r\u00e9action (milieu) permettant d'envisager les r\u00e9actions sur le noyau pyridine (bas).

Plusieurs \u00e9l\u00e9ments permettaient de penser que cette r\u00e9action pouvait s'appliquer sur les substrats **84** et **86**, comportant des groupes \u00e9lectrodonneurs (\u00e9ther benzylque) et \u00e9lectroattracteurs (ac\u00e9tal ou ester m\u00e9thylque) (**Sch\u00e9ma 24**). D'abord, cette r\u00e9action tol\u00e8re bien les h\u00e9t\u00e9rocycles azot\u00e9s, comme la pyridine, et permet d'ins\u00e9rer un acide carboxylique sur une position brom\u00e9e, \u00e0 la fois \u00e0 la position 6 pour **77** et \u00e0 la position 4 pour **81**. Ensuite, cette r\u00e9action tol\u00e8re les groupes \u00e9lectrodonneurs, comme un groupe m\u00e9thoxy pour **79**, et les groupes \u00e9lectroattracteurs, comme un ester m\u00e9thylque pour **83**, cependant, dans ce dernier cas, une baisse de rendement est observ\u00e9e qui est compens\u00e9e en baissant

la température de 80 à 50 °C. La réaction a donc été tentée avec succès sur les substrats **84** et **86**, diversement fonctionnalisées, en utilisant les conditions décrites par Li *et al.*

Selon le mécanisme qu'ils ont proposé (**Schéma 25**), le palladium(0) opère d'abord une addition oxydante sur la liaison aryle-halogène. Une fois lié au cycle aromatique, le complexe de palladium(II) peut insérer un ligand CO sur le cycle aromatique. Leurs conditions permettent ensuite de former l'acide carboxylique par attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur cette fonction CO en libérant du même coup le complexe de palladium(II). Ces molécules d'eau sont générées *in situ* en léger excès par réaction d'estérification entre le tert-butanol et l'acide acétique, résultant lui-même de la formation et de la décomposition thermique de l'anhydride mixte. Cela permet à la fois d'avoir une quantité d'eau contrôlée qui peut permettre, selon Li *et al.*, d'éviter des problèmes liés à de plus faibles stabilité et activité du catalyseur lorsque de plus grandes quantités d'eau sont ajoutées dès le départ ; et aussi de neutraliser par estérification les deux équivalents d'acide acétique produits lors de la réaction, pour éviter l'utilisation de trop larges excès de base.



Schema 25 : mécanisme de la réaction d'hydroxycarbonylation proposé par Li *et al.*⁵⁴²

L'ajout de cette base (diisopropyléthylamine chez Gadakh *et al.* ou triéthylamine chez Li *et al.*) permet ensuite de neutraliser l'acide HBr ou HI libéré lors de l'élimination réductrice du complexe de palladium(II) en palladium(0), ce qui permet de recommencer le cycle catalytique.

En revanche, les travaux réalisés sur ce type de réaction par Shao *et al.* leur font proposer une interversion des deux dernières étapes de ce mécanisme : au contraire d'une attaque nucléophile, l'eau opérerait un échange de ligand entre HO⁻ et I⁻ sur le palladium(II), puis l'élimination réductrice mènerait à la formation de l'acide carboxylique par liaison entre les deux ligands HO⁻ et Ph-C=O.⁵⁴³

5.2.2. Optimisations du protocole

Les conditions de Li *et al.* ont été reprises, avec différents ajustements successifs. En tenant compte du fait qu'en présence d'un groupement électro-attracteur, le rendement peut être amélioré en baissant la température, celle-ci a été fixée à 75 °C. Suivant les substrats et leur solubilité, le solvant utilisé était soit le DMF, soit le toluène, qui étaient utilisés dans chacune des publications. D'un point de vue pratique, nous avons pu remarquer que l'ajout final d'anhydride acétique directement dans le mélange réactionnel (contenant l'acide formique) n'influe pas sur le rendement obtenu et que l'anhydride mixte pouvait donc se former *in situ* sans être synthétisé au préalable. Cependant, l'ajout de l'anhydride acétique (ou mixte) dans le milieu réactionnel déclenche immédiatement le dégagement gazeux, cet ajout devait donc se faire au travers du septum bouchant le vial scellé pour éviter les pertes de gaz. Ces vials ayant une contenance limitée, il était nécessaire de faire de nombreuses réactions en parallèle pour obtenir des quantités de l'ordre du gramme. Une alternative avantageuse a été trouvée avec la procédure rapportée par Shao *et al.* qui utilise de l'acide oxalique à la place de l'acide formique comme source de CO.⁵⁴³ La nature solide de ce produit permet, sans agitation, d'ajouter tous les réactifs successivement sans que la réaction ne débute, ce qui permet d'utiliser des ballons de bien plus grande capacité avec un bouchon scellé. Ce protocole final permet donc d'opérer sur plusieurs grammes bien plus simplement que des systèmes de bullage de CO double chambre ou utilisant une bouteille de gaz comprimé.

Les rendements obtenus après purification pour les différents produits **85** et **87** (Schéma 24) se situent en général entre 40 et 50%. Cependant, des analyses RMN montrent que les conversions produites par la réaction devaient être supérieures, ce que corroboraient les suivis par CCM, où le produit de départ (**84** ou **86**) disparaissait totalement en fin de réaction.

Les pertes semblent donc provenir majoritairement des conditions de purification du brut réactionnel, cette purification pouvant être réalisée soit par une chromatographie sur gel de silice, soit par une suite de traitements acido-basiques et d'extractions. Les chromatographies se sont toujours avérées délicates à cause de la présence de produits secondaires au rapport frontal proche du produit désiré, dont le pic avait de plus tendance à avoir une mauvaise résolution. L'efficacité des traitements acido-basiques et des extractions pouvait être limitée par la nature amphiphile des substrats **85** et **87** et par la potentielle dégradation des substrats possédant une fonction acétal, sensible aux conditions acides.

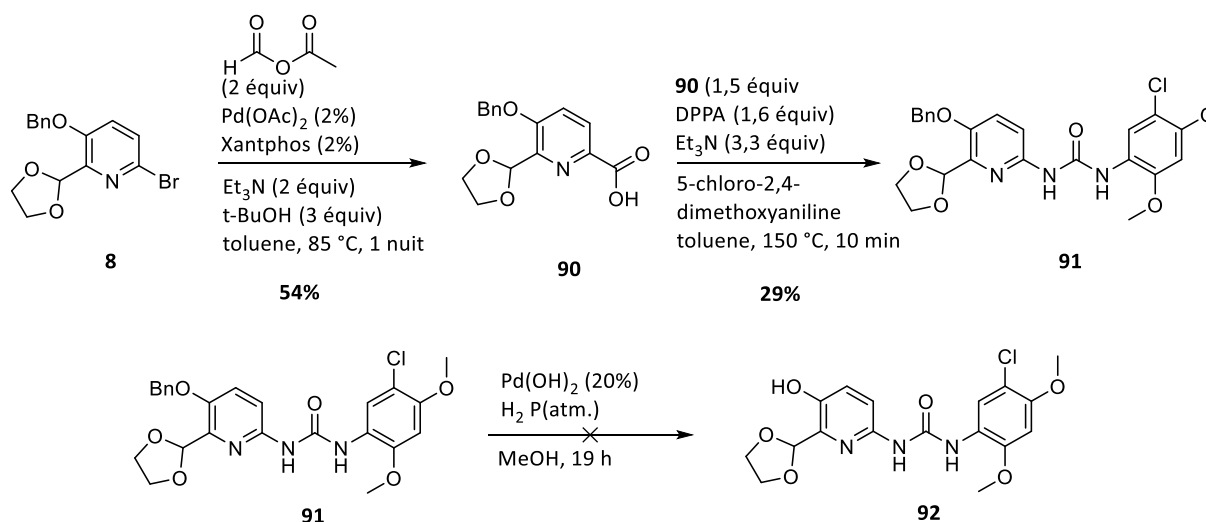
Enfin, l'augmentation du nombre d'équivalents de CO générés durant la réaction a été testée pour certaines réactions (4, 5 ou 6 équivalents). Ce plus large excès de CO ne semble cependant pas avoir

réaction rapide par micro-onde, vanté par la publication, nous avons essayé avec une plus haute température, 150 °C, sans que la conversion soit totale au bout d'une minute, selon le contrôle CCM. Après 4 min supplémentaires à 200 °C le rendement obtenu a été amélioré à 54% mais celui-ci restait modéré et inférieur à celui reporté. En outre, la formation de produits secondaires rendaient cette fois la purification plus difficile. Cette différence d'efficacité provenait peut-être du modèle de réacteur micro-onde utilisé.

Des conditions plus classiques ont donc été mises en oeuvre, en chauffant par voie thermique à 130 °C pendant 1 h et en augmentant l'excès d'acide carboxylique par rapport à l'amine. Cette fois, près d'un gramme de **PNU-120596** a pu être obtenu avec un rendement de 61% (avec des pertes dues à la purification pour obtenir une pureté HPLC > 95%). Des conditions similaires ont donc été utilisées pour les autres formations d'urée.

5.3.2. Validation de la liaison ligand-fonction réactivatrice par une fonction urée

Il était dans un premier temps nécessaire de vérifier la viabilité de la voie de synthèse proposée au **Schéma 23**, en s'assurant que l'addition de la fonction acide carboxylique sur le noyau pyridine puis la formation du lien urée avec le second fragment était possible.



Schema 28 : étapes de synthèse validant la formation d'un lien urée sur le noyau pyridine de la fonction réactivatrice

Pour cela nous avons vérifié la faisabilité de la réaction d'hydroxycarbonylation sur le composé **8**, qui était immédiatement disponible au laboratoire, puisque servant de base aux autres synthèses. Il était cependant attendu que le produit **63** ne pouvait être obtenu à partir de **8** car la débenzylation du phénol par hydrogénolyse pouvait conduire à une déhalogénéation du ligand aromatique chloré. La

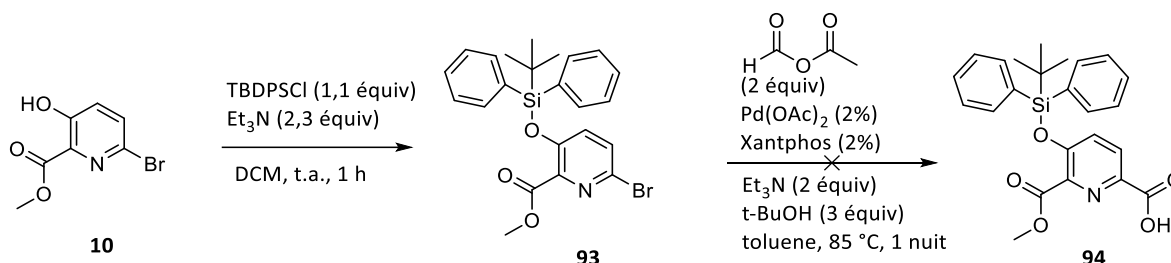
réaction d'hydroxycarbonylation a donné satisfaction à la première tentative avec un rendement correct de 54%. Puis la formation one-pot de l'urée avec l'aniline commerciale 5-chloro-2,4-dimethoxyaniline a permis d'obtenir l'urée **91** avec un rendement de 29%. Ce rendement s'explique par une conversion incomplète au bout de 10 min, malgré la disparition de la tâche correspondant à **90** lors du suivi CCM. Ces résultats étaient cependant suffisants pour envisager le développement d'une voie de synthèse basée sur ces deux réactions.

Nous avons en outre pu vérifier que l'hydrogénolyse du produit **91** ne permettait pas d'obtenir le phénol **92**, menant à un mélange complexe de produits de dégradation.

5.3.3. Sélection du groupement protecteur du phénol

5.3.3.1. Protection du phénol par un groupe protecteur silylé

La protection du phénol du noyau pyridine n'étant pas possible sous forme d'éther de benzyle, l'hydrogénolyse pour le déprotéger dégradant le produit, sa protection sous forme d'éther silylé a été essayée avec un groupement tert-butyldiphénylesilyle (TBDPS), dont l'encombrement stérique en fait un des groupements silylés les plus résistants.



Schema 29 : Protection du phénol par un groupe silylé et test de résistance aux conditions d'hydroxycarbonylation

Le phénol du produit **10** (Schéma 29) a donc été protégé par le groupement TBDPS. Les analyses RMN et spectrométrie de masse montrent qu'après un traitement aqueux, un mélange du produit désiré **93** (dont la quantité estimée correspond à une conversion de 90%) et de TBDPSOH est obtenue. Ce mélange a ensuite été engagé dans la réaction d'hydroxycarbonylation mais ne permet pas d'obtenir l'acide carboxylique **94**. Les étapes de protection et d'hydroxycarbonylation ont été répétées une seconde fois avec les mêmes résultats. Seuls des sous-produits comme le produit déprotégé **10** ou son analogue déhalogéné ont pu être identifiés parmi les fractions obtenues après purification par chromatographie. Les groupements silylés ne semblent donc pas résister aux conditions de la réaction.

Le groupement protecteur éther de tétrahydropyranyle (THP) nous a aussi semblé peu pertinent à cause de sa faible résistance aux conditions acides, qui risquait de produire les mêmes résultats qu'avec les groupements silylés. La protection sous forme d'éther d'alkyloxyméthyle ne nous semblait pas non plus la plus intéressante, à cause d'une sensibilité similaire aux acides.

5.3.3.2. Intérêt du groupe orthonitrobenzyle

Dans notre équipe de chimie bio-organique, d'autres projets ont fait appel à un groupement protecteur, qui nous a semblé intéressant également pour cette synthèse : l'éther de 2-nitrobenzyle. En effet, contrairement au benzyle précédent, la fonction nitro en position ortho de l'éther benzylique permet de déprotéger cette fonction par photoclivage sous UV, tandis que sa formation se fait dans des conditions similaires aux conditions de benzylation déjà utilisées sur nos substrats.⁵⁴⁵ Ce photoclivage pourrait donc permettre de déprotéger cette fonction sans dégrader le reste de la molécule.

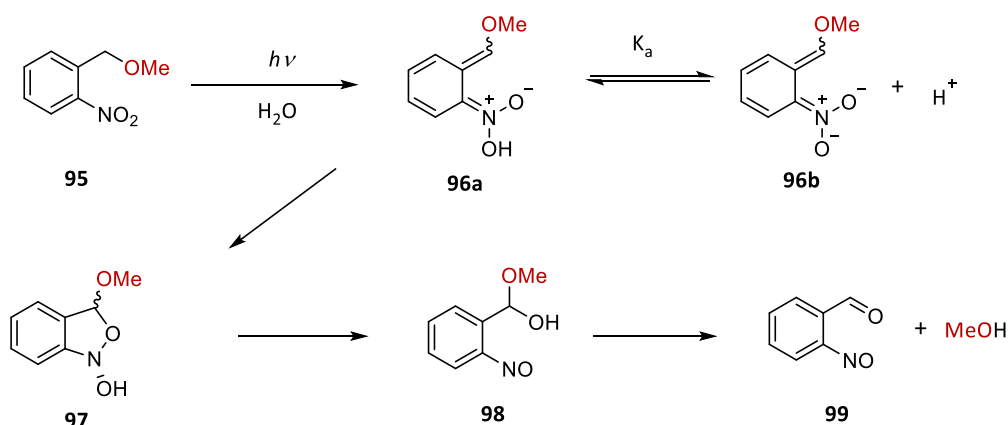


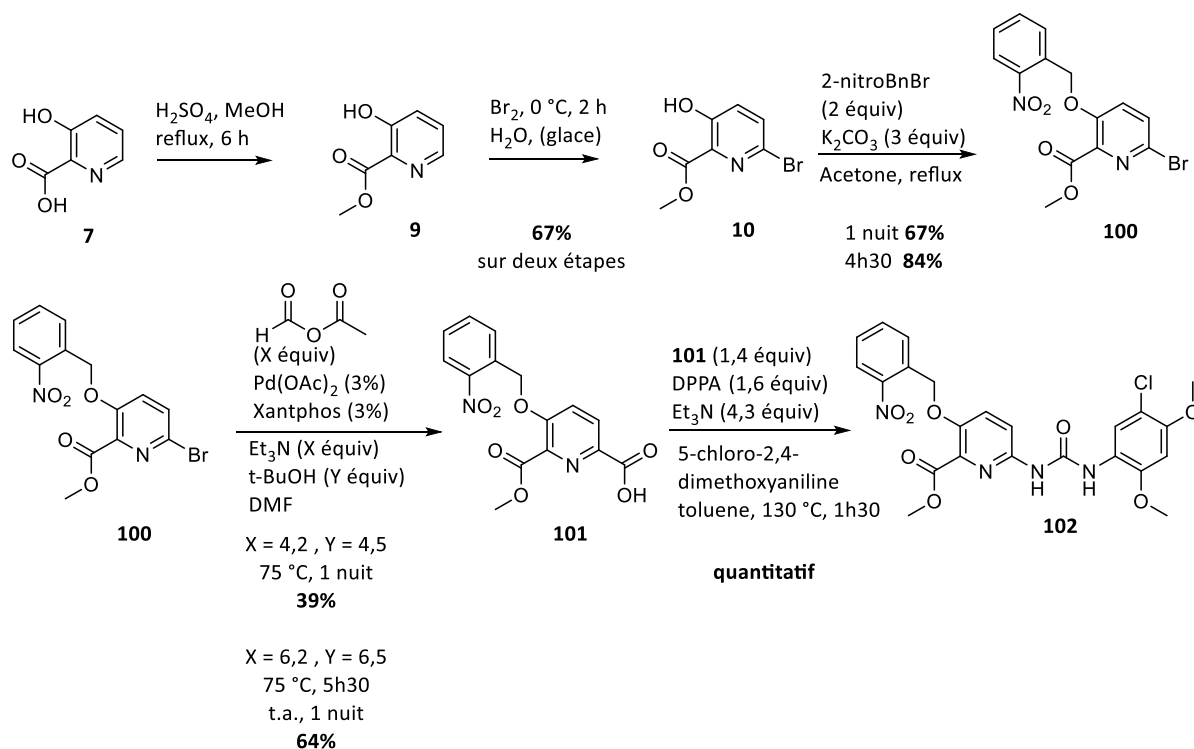
Schéma 30 : mécanisme de photoclivage de 95

Le mécanisme de photoclivage a été élucidé pour le 1-(methoxyméthyl)-2-nitrobenzène **95** (Schéma 30).⁵⁴⁵⁻⁵⁴⁹ L'irradiation UV produit l'intermédiaire réactionnel **96a** qui peut se cycliser de manière irréversible en 1,3-dihydrobenz-[c]isoxazol-1-ol **97**. Puis la dégradation de l'hémicétal **98** en aldéhyde est l'étape cinétiquement limitante pour donner l'alcool désiré à pH neutre. Il est donc potentiellement possible d'accélérer la réaction en conditions acides, selon ce mécanisme.

L'utilisation d'un éther de 2-nitrobenzyle pour protéger un phénol a été utilisée notamment pour des travaux de biologie cellulaire, où son photoclivage se déroulait en 30 min à 304 nm,⁵⁵⁰ ainsi que dans la recherche sur des biomatériaux, où il était clivé en 30 min à 365 nm.⁵⁵¹

5.3.4. 1^{ère} voie de synthèse

Le phénol **10**, obtenu avec 67% de rendement sur les deux premières étapes (**Schéma 31**), a donc été protégé par le groupe 2-nitrobenzyle dans les mêmes conditions que pour la simple benzylation précédemment effectuée, d'autant que ces conditions sont proches de celles trouvées dans la littérature.⁵⁵² Cependant, au contraire des benzylations précédentes, ce groupement particulier semble rendre le produit **100** plus sensible à la dégradation dans les conditions réactionnelles car plusieurs sous-produits sont observés par contrôle CCM. Leur formation a pu être réduite en diminuant le temps de réaction, ce qui améliore le rendement : de 67% sur une nuit à 84% sur 4h30. Enfin, les conditions de purification par chromatographie ont aussi dûes être adaptées car le produit peut cristalliser dans la colonne avec de faibles proportions d'AcOEt dans un éluant cyclohexane/AcOEt. L'utilisation d'un gradient DCM/cyclohexane (gradient 15/85 -> 90/10) avec 2% d'AcOEt permet alors d'améliorer à la fois la solubilité du produit **100** dans l'éluant et la résolution de son pic sur la colonne de chromatographie.



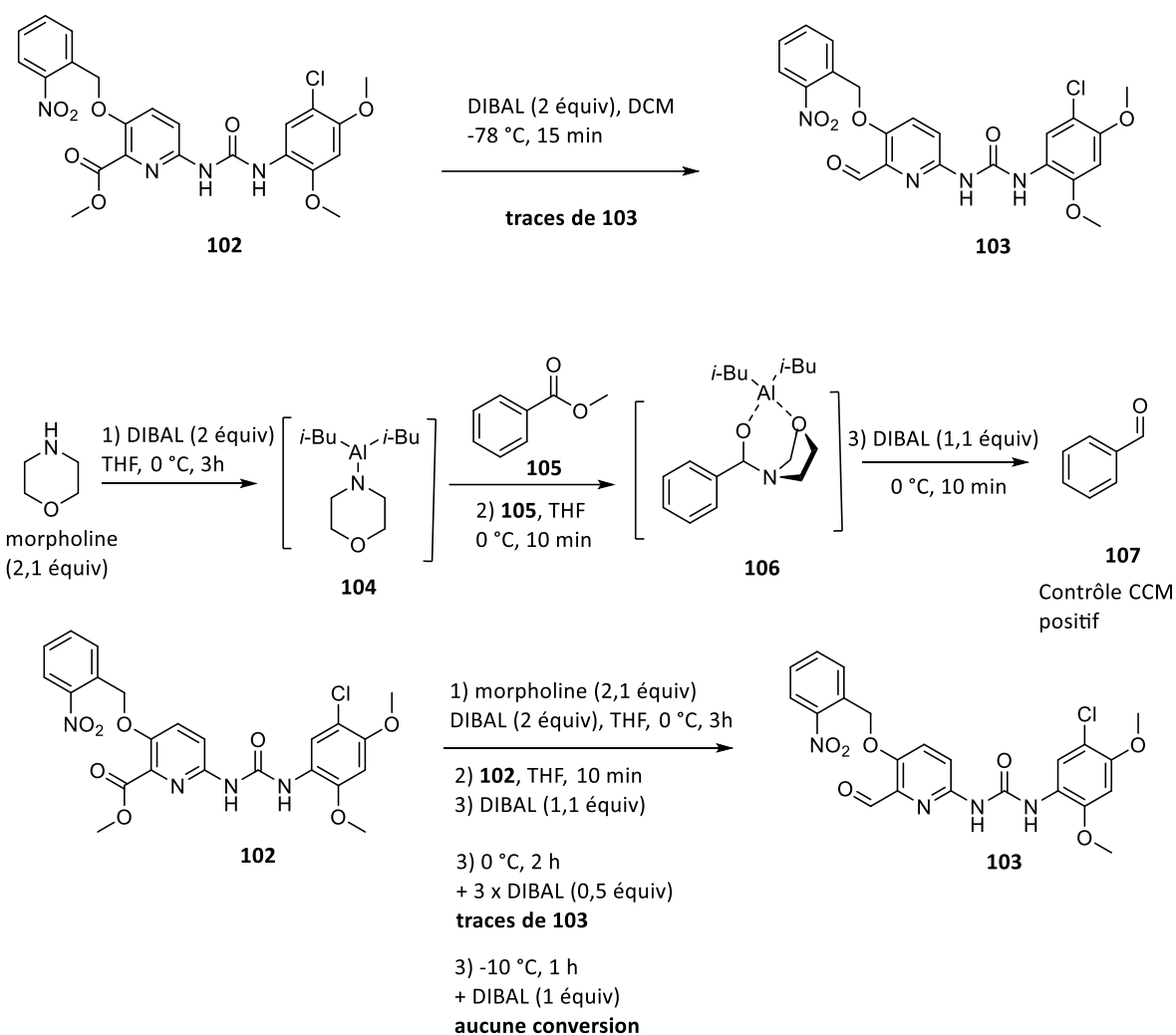
Schema 31 : Fonctionnalisation du noyau pyridine et formation du lien ur\u00e9e avec la 5-chloro-2,4-diméthoxyaniline

Cette tr\u00e8s faible solubilit\u00e9 dans les solvants organiques apolaires du compos\u00e9 **100** a eu \u00e9galement des r\u00e9percussions sur l'\u00e9tape suivante d'hydroxycarbonylation car la premi\u00e8re tentative r\u00e9alis\u00e9e dans le tolu\u00e8ne a \u00e9t\u00e9 un \u00e9chec li\u00e9 \u00e0 cette faible solubilit\u00e9. Ce solvant a donc \u00e9t\u00e9 remplac\u00e9 par le DMF, ce qui a permis d'obtenir l'acide carboxylique **101**, avec 39 ou 64% de rendement suivant les conditions (voir

Schéma 31). La purification de ce composé a également été délicate car il n'a pas pu être parfaitement isolé par chromatographie sur gel de silice, malgré l'utilisation d'un éluant DCM/EtOH 9/1, identifié sur CCM comme optimal parmi de nombreuses combinaisons testées. Une suite de traitements acido-basiques et d'extractions a donc été utilisée en remplacement et a permis d'isoler le produit avec une pureté satisfaisante (décrit en partie expérimentale). Néanmoins, ce traitement est également délicat car, lors de l'extraction par une phase aqueuse basique du composé **101** dans le DCM, ce produit sous forme carboxylate précipite à l'interface des deux phases. Il n'est en effet pas soluble dans le DCM et ne l'est que faiblement dans l'eau, ce qui nécessite l'utilisation de grandes quantités de solvant.

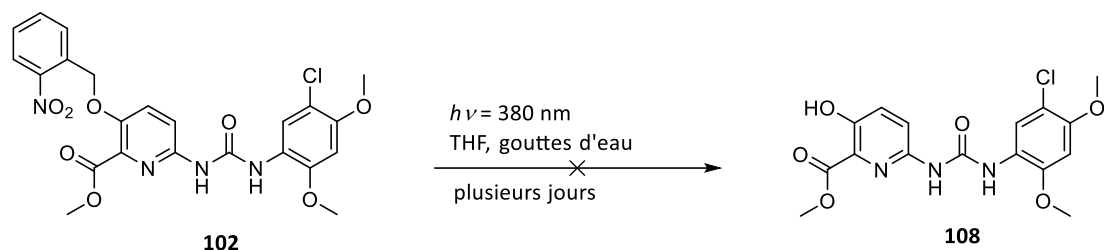
L'acide carboxylique **101** a ensuite été engagé dans la réaction de formation de l'urée selon les conditions utilisées pour la synthèse du **PNU-120596 (Schéma 27)**, et ce qui a permis d'obtenir l'urée **102** de façon quantitative. Les conditions d'élution ont aussi dû être optimisées ici car, comme dans le cas précédent, le produit peut, suivant l'éluant, cristalliser ou traîner fortement sur la colonne chromatographique : un gradient DCM/ACOEt 10/0->9/1 a permis d'améliorer la solubilité et la résolution.

Nous avons ensuite voulu réduire l'ester du composé **102** en aldéhyde correspondant en utilisant les conditions habituelles utilisées avec du DIBAL, dans le DCM à -78 °C (**Schéma 32**). Après traitement aqueux, un contrôle par TLC-MS a démontré la présence du produit désiré **103** mais il restait une majorité de produit de départ. De plus, la purification par chromatographie, très délicate, n'a pas permis d'isoler totalement le produit **103**. Cet échec s'explique par la solubilité très faible du produit **102** dans le DCM à -78 °C. En outre, le produit est très peu soluble à température ambiante dans le chloroforme et le toluène, solvants apolaires qui auraient pu remplacer le DCM pour cette réaction de réduction au DIBAL. A température ambiante, le composé **102** est surtout soluble dans le THF, nous avons donc cherché des conditions permettant la réduction de l'ester en aldéhyde dans ce solvant à des températures proches de la température ambiante. Les conditions développées par Jeon *et al.* semblaient optimales car elles permettent de réduire un ester en aldéhyde par le DIBAL à 0°C dans le THF grâce à la formation transitoire d'un amide de morpholine qui est supposé, selon Jeon *et al.*, stabiliser l'aluminium du DIBAL dans un cycle à 7 comme pour **106 (Schéma 32)**.^{553,554}



Schema 32 : Tentatives de r\u00e9duction de l'ester **102** en ald\u00e9hyde par le DIBAL et conditions d\u00e9velopp\u00e9es par Jeon et al.⁵⁵³

Ces conditions ont \u00e9t\u00e9 v\u00e9rifi\u00e9es sur le benzoate de m\u00e9thyle **105** dont le produit attendu, le benzald\u00e9hyde **107**, \u00e9tait disponible au laboratoire pour contr\u00f4ler l'avancement par CCM. Le benzald\u00e9hyde **107** \u00e9tant bien obtenu au bout de 10 min \u00e0 0 \u00b0C selon une conversion totale (CCM), nous avons appliqu\u00e9 ces conditions au compos\u00e9 **102**. Malheureusement le contr\u00f4le par TLC-MS a montr\u00e9 la conversion de l'interm\u00e9diaire organoaluminique **106** en un m\u00e9lange de l'ald\u00e9hyde **103** et de l'alcool correspondant. La conversion n'\u00e9tait pas totale au bout de 2 heures m\u00eame avec l'ajout suppl\u00e9mentaire et s\u00e9quentiel de 1,5 \u00e9quivalents de DIBAL. Pour \u00e9viter la formation de l'alcool, la r\u00e9action a \u00e9t\u00e9 r\u00e9p\u00e9t\u00e9e \u00e0 -10 \u00b0C, mais la conversion a \u00e9t\u00e9 encore plus faible, car la majorit\u00e9 du produit r\u00e9cup\u00e9r\u00e9 a \u00e9t\u00e9 le produit de d\u00e9part **102**, faute de solubilit\u00e9 suffisante \u00e0 cette temp\u00e9rature.



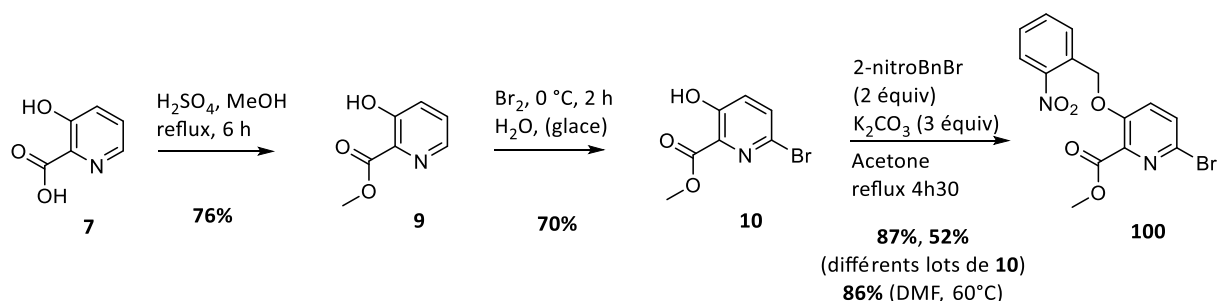
Schema 33 : tentative de photoclivage à 380 nm

Le produit **102**, fortement dilué dans le THF avec quelques gouttes d'eau, a alors été soumis à un rayonnement UV de 380 nm dans un réacteur Rayonet pour tenter de déprotéger le phénol (**Schéma 33**). La réaction n'a malheureusement pas été concluante et des produits de dégradation ont été obtenus. Nous verrons dans la deuxième voie de synthèse que l'application d'une irradiation à 300 nm est beaucoup plus efficace, expliquant ici une cinétique sûrement très lente, or les lampes à 300 nm n'étaient pas disponibles lors de cette première tentative. Cette étape n'a pas fait l'objet d'une étude plus approfondie car, compte tenu des difficultés rencontrées au niveau de la solubilité de l'ester **102**, il n'était pas sûr que les étapes suivantes puissent être également réalisées.

Nous avons donc envisagé une seconde voie de synthèse où la formation de l'aldéhyde serait réalisée plus tôt dans la synthèse, puis protégé sous forme d'acétal (**111**, **Schéma 35**), comme pour les synthèses décrites dans le chapitre I.

5.3.5. 2^{ème} voie de synthèse

La stratégie adoptée pour cette seconde voie de synthèse consistait donc à réduire l'ester en aldéhyde dès les premières étapes et le protéger sous forme d'acétal, de la même façon que dans les synthèses des chapitres précédents, avec simultanément un groupement 2-nitrobenzyle sur le phénol. En effet, la réaction de déprotection de l'acétal pouvant se faire à n'importe quelle concentration en milieu aqueux acide, il était raisonnable de penser qu'elle fonctionnerait mieux pour obtenir l'aldéhyde.



Schema 34 : synthèse de l'intermédiaire 100 en grandes quantités

L'intermédiaire **10** a été resynthétisé en grande quantité (17,7 g) avec un rendement de 53% sur deux étapes à partir de l'acide 3-hydroxypicolinique **7**. Puis l'étape suivante de benzilylation a démontré son efficacité à grande échelle avec l'obtention de 13,6 g de **100** avec 86% de rendement. Nous avons également observé que pour de telles quantités, la purification par chromatographie était trop délicate et que la précipitation et la cristallisation du produit dans le DMF permettait d'obtenir facilement une majorité de produit pur, le reste pouvant alors être purifié par chromatographie plus facilement.

La réduction de l'ester **100** a ensuite été tentée avec les conditions habituelles à -78 °C par du DIBAL (**Schéma 35**). Mais la faible solubilité du produit (soluble au maximum à 0.05 M dans le DCM à température ambiante) a encore drastiquement réduit la cinétique de la réaction car la concentration maximum utilisée était de 8 mM à -78 °C. Différents essais ont été menés et malgré plusieurs heures jusqu'à plusieurs jours à -78 °C, le contrôle par analyse RMN du brut réactionnel n'a montré que des conversions incomplètes ne dépassant pas 30% ainsi que l'apparition indésirable de l'alcool. L'ajout de 1 équivalent supplémentaire de DIBAL ou l'élévation de la température à -70 °C n'ont pas permis d'améliorer significativement cette conversion et ont augmenté la proportion de produits secondaires. Or le produit de départ **100** et l'aldéhyde **110** ayant quasiment le même rapport frontal, il était très difficile de les séparer par chromatographie, une conversion complète en aldéhyde était donc nécessaire.

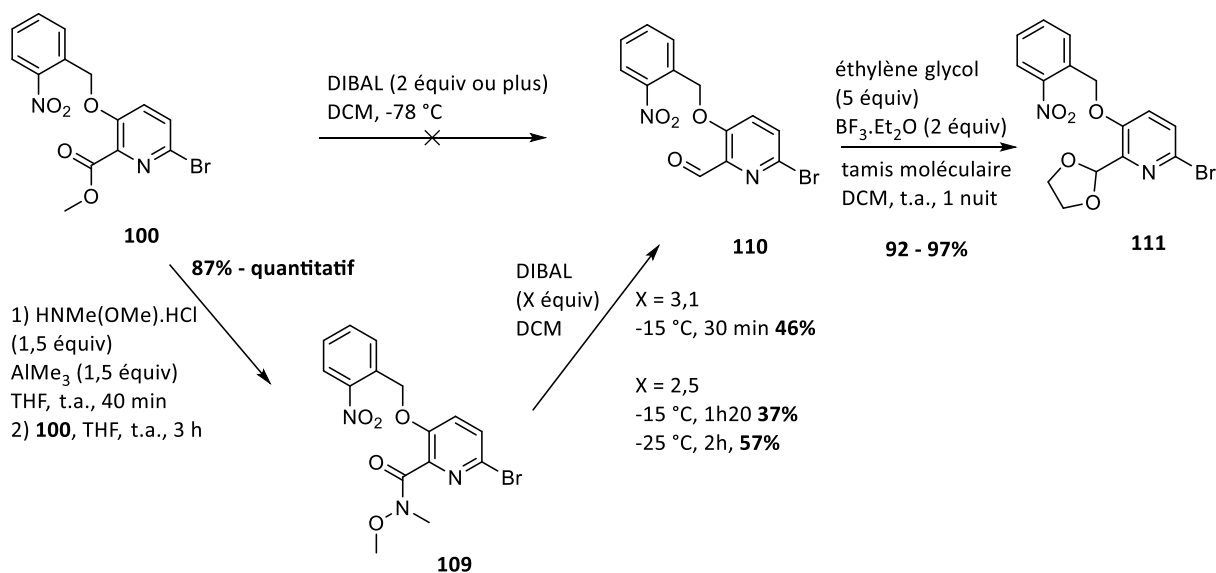


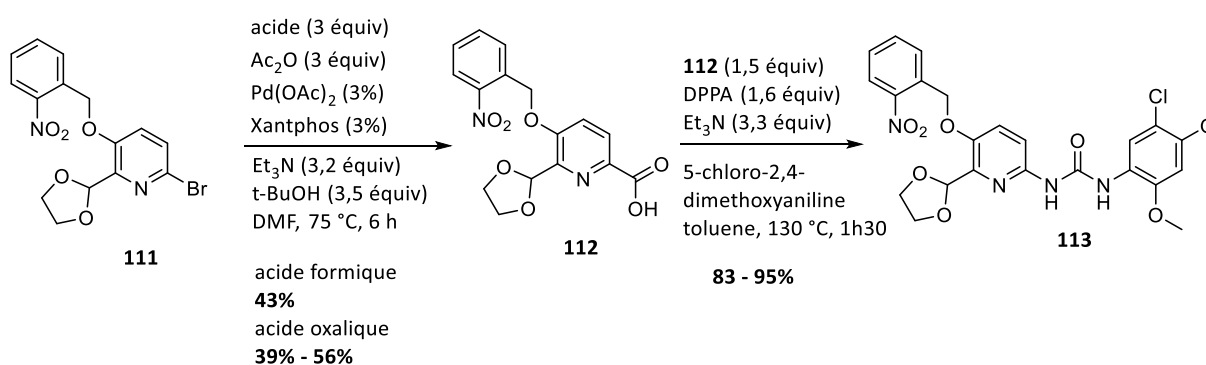
Schéma 35 : réduction en aldéhyde et protection sous forme d'acétal

Pour obtenir une conversion complète en utilisant un excès de DIBAL et à une température plus élevée – assurant une meilleure solubilité des produits – tout en évitant la formation de l'alcool, nous avons réalisé la réduction au DIBAL sur l'amide de Weinreb **109**, qui permet ce type de conditions.^{555,556} Les

conditions de formation de l'amide de Weinreb ont été tirées de deux publications où cet amide était formé à la même position 2 d'un noyau aromatique azoté. Elles permettent d'obtenir le composé **109**, purifié uniquement par un traitement aqueux, avec d'excellents rendements.^{557,558} Cet amide **109** est beaucoup plus soluble dans le DCM que l'ester de départ, ce qui a permis de faire la réaction suivante avec une concentration de 0,1 mol/L ; de plus, sa polarité est plus élevée, ce qui, en cas de conversion incomplète, permettrait de le séparer facilement de l'aldéhyde **110**.

Les conditions de cette réduction au DIBAL, en particulier le choix de la température initiale de -15 °C, a été effectuée sur la base de trois publications faisant référence à cette réduction sur un amide de Weinreb fonctionnalisé à la position 2, 3 ou 4 d'un noyau aromatique azoté similaire.⁵⁵⁹⁻⁵⁶¹ Le contrôle CCM a montré des conversions totales avec la disparition du produit **109** en 1 à 2 heures. Cependant, plusieurs produits secondaires apparaissent également, ce qui fournit l'aldéhyde **110** avec des rendements modérés et rend la purification par chromatographie délicate. Pour limiter cela, la température a été baissée de -15 °C à -25 °C, ce qui a permis d'améliorer significativement le rendement. Si la réaction devait être répétée, une température de -40 °C pourrait être tentée pour obtenir un rendement encore supérieur et éviter des pertes lors de la purification. En effet, à grande échelle (14 g de **109** pour 6,8 g de **110** récupéré), la purification par chromatographie s'est révélée trop difficile en premier lieu et une précipitation dans le DMF et cyclohexane a permis d'éliminer une partie conséquente des produits secondaires.

La protection de l'aldéhyde **110** en acétal a ensuite été réalisée de façon quasi-quantitative en utilisant les conditions utilisées dans les chapitres précédents.

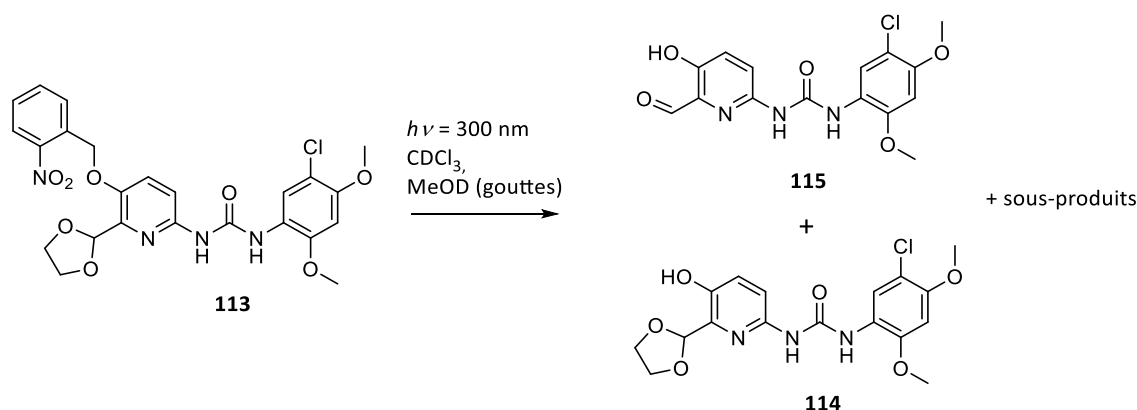


Schema 36 : réaction d'hydroxycarbonylation sur le substrat **111** et formation consécutive de l'urée

La formation de l'acide carboxylique **112** a ensuite été réalisée selon les conditions précédemment décrites partie 5.2., avec des rendements modérés, limités essentiellement par les conditions de

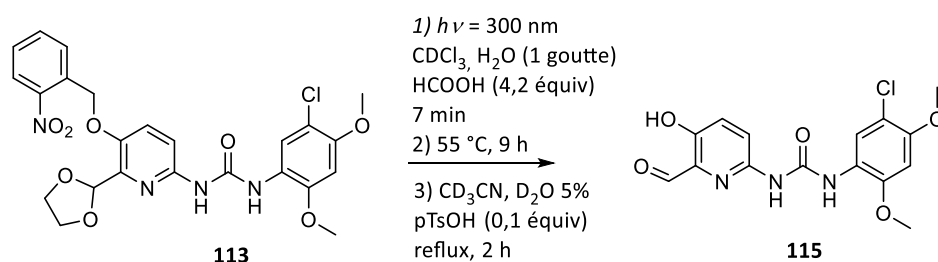
purification (traitement aqueux ou chromatographie) (**Schéma 36**). La formation consécutive de l'urée **113** se fait ensuite one-pot avec d'excellents rendements.

Afin de mettre au point les conditions de déprotection de l'éther de nitrobenzyle, nous avons réalisé les expériences sur petites quantités dans des solvants deutérés afin de suivre la réaction aisément par analyse RMN ^1H . Le composé **113** a d'abord été solubilisé dans $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (9/1) (faible solubilité, la solution est légèrement trouble) et irradié à 300 nm, ce qui s'est révélé plus efficace qu'à 380 nm (**Schéma 37**). Au bout d'une heure la solution était limpide et rouge : le phénol **114** est plus soluble que le produit de départ **113**. Le contrôle par RMN montrait que la conversion était largement avancée au bout d'une heure et quasiment achevée au bout de 2 heures. Cependant il se formait aussi en grandes quantités des sous-produits qu'il est difficile de déterminer comme intermédiaires réactionnels ou non : déterminer la durée optimale de la réaction est donc un défi pour limiter la formation de ces autres produits. Après purification, les produits **115** et **114** ont été identifiés par spectrométrie de masse et LC/MS. L'acétal est donc aussi dégradé dans ces conditions.



Schema 37 : réaction de déprotection du nitrobenzyle à 300 nm pour suivi RMN

Comme l'acétal est aussi partiellement déprotégé et que l'intermédiaire réactionnel limitant la cinétique de déprotection du nitrobenzyle est probablement un hémiacétal, selon le mécanisme reporté dans la littérature (**98 Schéma 30** et **116 Schéma 39**), qui se clive également en conditions acides, la double déprotection a donc été tentée one-pot ou séquentiellement.



Schema 38 : Réaction de déprotection successive du nitrobenzyle et de l'acétal, pour suivi RMN

Un autre suivi RMN a été réalisé en solubilisant le composé **113** dans le CDCl_3 avec 4,2 équivalents d'acide formique et une goutte d'eau, pour accélérer la réaction (**Schéma 38**). En effet, la cinétique est nettement accélérée car le pic singulet correspondant aux protons benzyliques (H_1 **Schéma 39**) ont quasiment disparus au bout de 7 min d'irradiation, tandis que les signaux correspondant à l'acétal (H_3 et potentiellement H_2) se voient décalés. Pourtant, cette observation ne permet pas de conclure à la débenzylation totale car il peut encore s'agir de l'intermédiaire **116**, de plus les signaux aromatiques sont beaucoup moins facilement interprétables. Néanmoins, il semble qu'à ce stade il n'y ait plus besoin d'irradiation pour que le composé **114** soit obtenu.

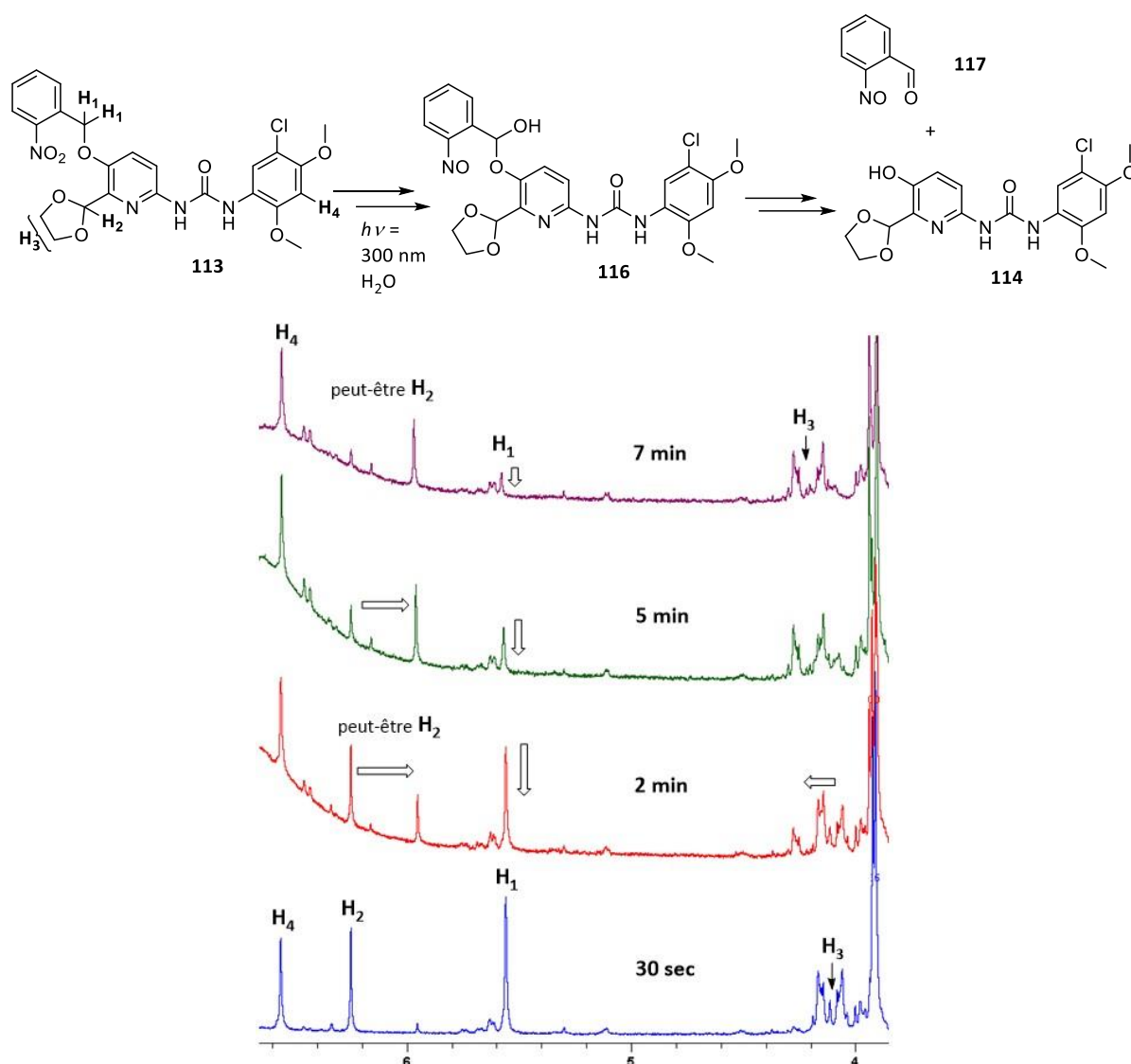
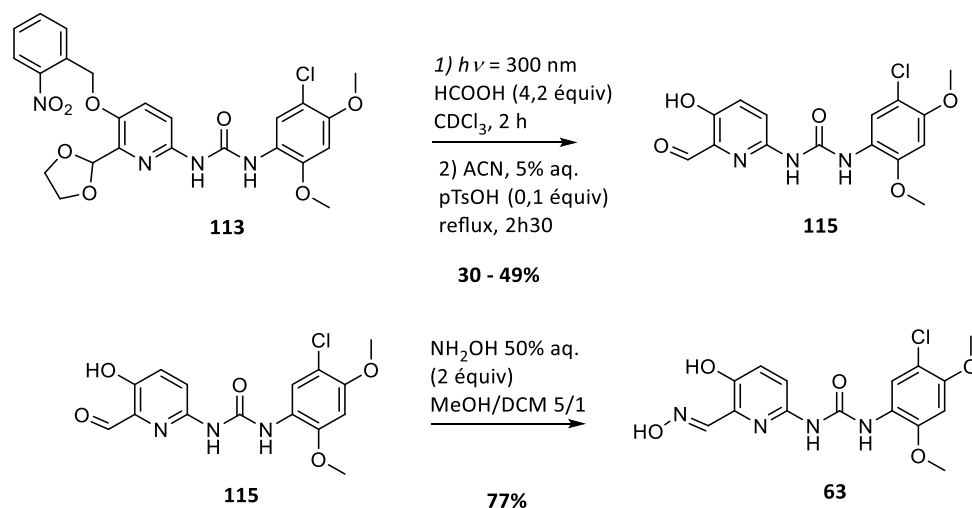


Schéma 39 : suivi RMN de la déprotection du nitrobenzyle de 113 dans le CDCl_3 , avec 4,2 équivalents d'acide formique et une goutte d'eau, et irradiation à 300 nm.

L'intégration du multiplet des protons H_3 est aussi nettement inférieure à 4 au bout de 7 min, ce qui montre que l'acétal commence à se déprotéger également. La solution a donc ensuite été chauffée à

55 °C pendant environ 9 heures pour espérer déprotéger l'acétal mais le contrôle RMN n'a pas révélé d'avancement significatif. Quatre équivalents d'acide formique sont donc peut-être insuffisants pour obtenir une cinétique de déprotection de l'acétal suffisamment rapide.

La solubilité des produits **115** et **114** étant faible dans beaucoup de solvants, nous avons voulu éviter des traitements acido-basiques en fin de réaction où il pourrait être difficile d'extraire les produits, et donc l'utilisation de grandes quantités d'acide. Nous avons donc utilisé le protocole de Dodd *et al.* où l'acétal (également en position 2 d'un noyau pyridine) est déprotégé par de l'acide paratoluènesulfonique (pTsOH) en quantité catalytique dans l'acétonitrile aqueux à reflux.⁵⁶² En outre, les résidus de l'étape précédente d'irradiation, incluant les composés **116** et **114**, étaient parfaitement solubles dans ces conditions à une concentration de 0,02 M. Des solvants deutérés ont été utilisés pour le suivi RMN, qui a montré que le multiplet de l'acétal (H₃) disparaissait totalement au bout de 2 h avec la présence du singulet du proton de l'aldéhyde à 10 ppm. Ce protocole en deux étapes a donc été choisi (**Schéma 40**). De plus l'ordre inverse de déprotection n'a pas été concluant car le produit **113** est très peu soluble dans l'acétonitrile aqueux à 5% et le résidu obtenu après plusieurs heures de reflux était également très peu soluble dans le mélange chloroforme/acide formique pour la déprotection de l'acétal, ce qui rend très compliqué le suivi de la réaction et compromet l'efficacité des deux réactions.



Schema 40 : Double déprotection consécutive par irradiation en conditions acides et formation de l'oxime 63

Le composé **115** a donc été obtenu en suivant ce protocole avec des rendements modérés, notamment 113 mg obtenus avec 49% de rendement, après des purifications par chromatographies assez délicates (**Schéma 40**). L'oxime **63** désiré a ensuite été formé dans les conditions habituelles avec 77% de rendement. L'obtention du produit avec plus de 95% de pureté LC/MS a cependant nécessité des purifications par chromatographie supplémentaires.

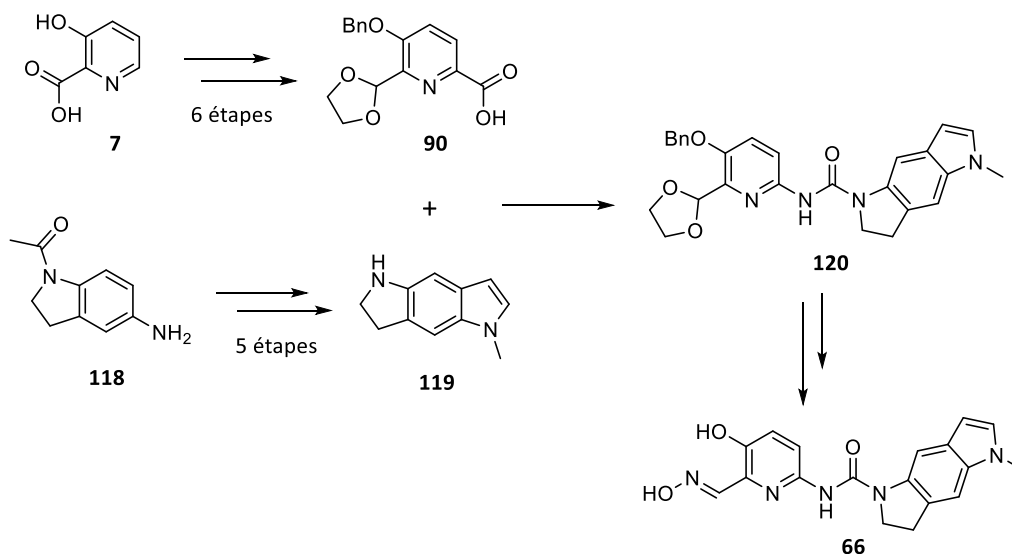
5.3.6. Conclusion

Le composé **63** a pu être obtenu en 10 étapes de synthèse avec un rendement global de 5%. Les étapes limitantes sont la réduction de l'amide de Weinreb **109** en aldéhyde (**Schéma 35**), la formation de l'acide carboxylique **112** (**Schéma 36**) et l'étape de déprotection du produit de couplage **113** (**Schéma 40**). Si les marges de manœuvre pour améliorer le rendement de la formation de l'acide carboxylique **112** semblent réduites, la réduction de l'amide de Weinreb **109** peut être optimisée en testant des températures de réaction plus basses, dans l'idéal inférieure à -70°C , si le composé reste suffisamment soluble dans le DCM à cette température. Pour l'étape de déprotection de **113**, un suivi UHPLC serait plus efficace que par RMN et CCM, permettant l'identification des différentes espèces chimiques formées par LC/MS, pour comprendre la nature des réactions secondaires limitant le rendement et pour optimiser la durée et les conditions réactionnelles de chaque étape.

5.4. Synthèse du **SB-206553** et du MTDA **66** correspondant

5.4.1. Voie de synthèse de **66**

La voie de synthèse choisie pour synthétiser le composé **66** s'appuyait sur la rétrosynthèse établie précédemment (**Schéma 23** parie 5.1.), en synthétisant parallèlement l'acide carboxylique **90** et l'aniline **119**, pour les coupler ensuite sous forme d'urée qui devait être déprotégé pour obtenir **66**.



Schema 41 : Voie de synthèse du composé 66

Pour cette synthèse, la protection du phénol du produit de départ **7** sous forme d'éther benzyle était envisageable car il ne semblait pas, à première vue, que les conditions d'hydrogénolyse pour

déprotéger le phénol soient incompatibles avec le produit **120**. Pour la même raison, l'aldéhyde a été protégé sous forme d'acétal. La synthèse du fragment **119** s'appuiera sur les travaux de Forbes *et al.*, qui ont développé la synthèse du SB-206553 et de nombreux autres dérivés pour leur évaluation comme antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C/2B}.^{501,502,504,563,564} Ce fragment **119** servira donc aussi à la synthèse du SB-206553.

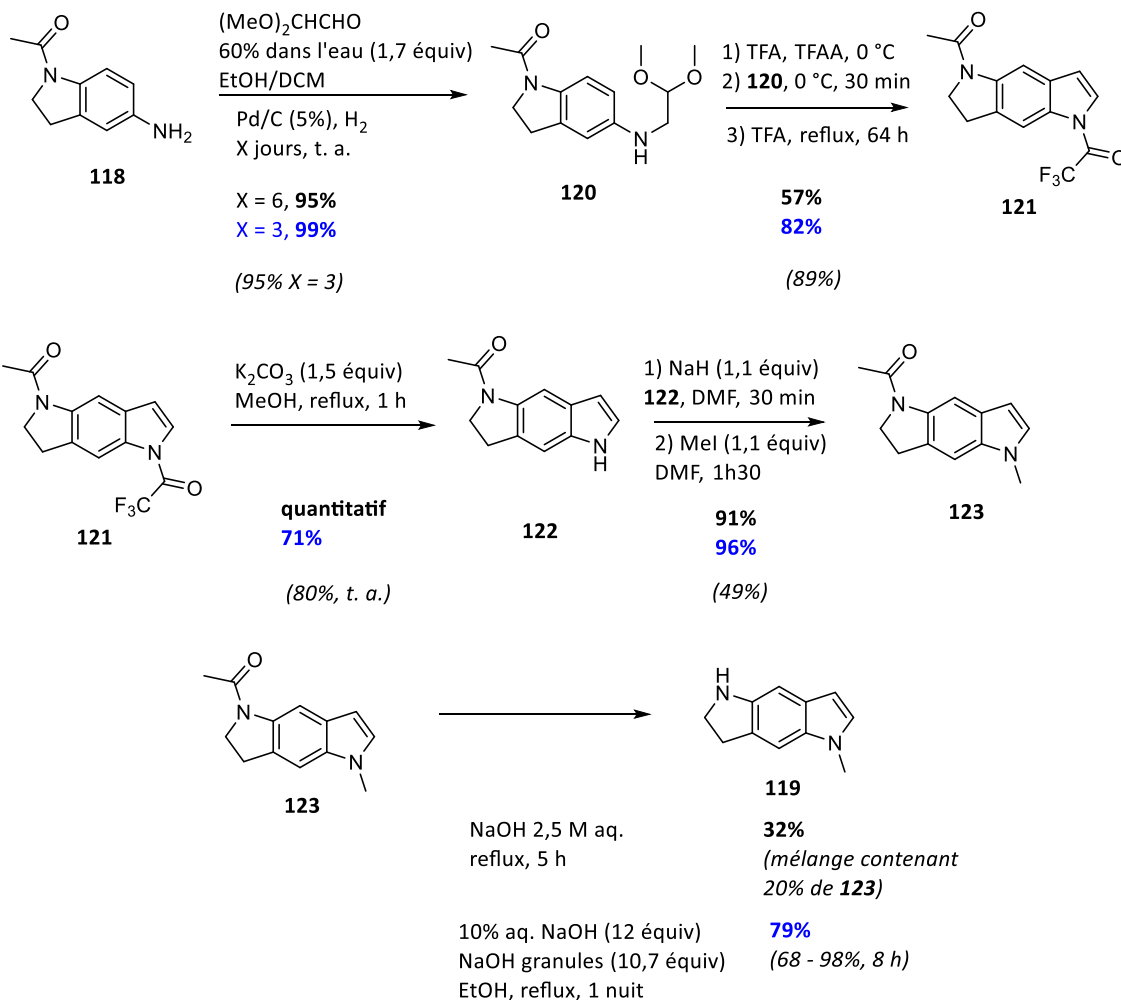
5.4.2. Synthèse du fragment 119

La synthèse a été répétée deux fois (rendements en bleu pour la 2^{ème} synthèse **Schéma 42**) car certaines étapes ont montré des rendements inférieurs à ceux attendus et des quantités supplémentaires ont donc été nécessaires. C'est notamment le cas de la dernière étape de déprotection de l'aniline **123** dont le protocole a d'abord été tiré de la publication de 1995 de Forbes *et al.* et qui n'est pas optimisé.⁵⁰¹ Or le protocole de cette étape a été optimisé dans la publication de Forbes *et al.* de 1996 et cette version a donc été utilisée pour la deuxième synthèse de **119**.⁵⁶³ Les rendements obtenus dans la littérature pour chaque étape sont indiqués à titre de comparaison entre parenthèses.

La synthèse débute par la formation de l'amine **120** par amination réductrice de l'aniline **118** (environ 194€ pour 10 g chez le fournisseur Fluorochem) avec le 2,2-diméthoxy acétaldéhyde. Par rapport au protocole original la concentration du composé **118** dans l'éthanol a été divisée par deux et une proportion de 6% de DCM a été ajoutée car ce composé s'est révélé peu soluble dans ce solvant. Dans ces conditions, et après sonication 30 min en présence de 2,2-diméthoxyacétaldéhyde, la solution devient limpide et est mise sous hydrogénation à pression atmosphérique pour au moins 3 jours. Selon la conversion du produit de départ suivie par CCM, le premier essai a duré 6 jours la première fois, mais 3 jours seulement ont bien été nécessaires la deuxième fois, comme dans la littérature, pour obtenir le composé **120** avec des rendements quasi-quantitatifs après filtration et un simple traitement aqueux.

Ce composé est transformé en dérivé indolique tricyclique **121** avec de bons rendements, en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) et d'anhydride trifluoroacétique (TFAA), à reflux pendant 64 h. L'éluant CHCl₃/AcOEt proposé dans la littérature pour réaliser la purification du produit par chromatographie a dans un premier temps été remplacé par cyclohexane/AcOEt (moins toxique et disponible en plus grande quantité au laboratoire) mais l'élution s'est révélée très difficile et l'éluant original a donc été utilisé la fois suivante, ce qui résout ce problème. Le mécanisme de cette réaction est probablement la conversion de l'acétal en aldéhyde sur lequel peut ensuite se faire une substitution électrophile

aromatique régiosélective menant à la cyclisation intra-moléculaire (grâce à l'encombrement stérique de l'autre position possible sur le cycle aromatique). S'en suit la réaromatisation du cycle phénylique et l'aromatisation du cycle indolique par déshydratation, catalysée par les conditions acides.



Schema 42 : Voie de synthèse du fragment 119.^{501,563}

Le trifluoro acétamide de **121** a ensuite été clivé en conditions basiques pour obtenir le composé **122** avec de très bons rendements. Le contrôle de la réaction n'est pas possible par CCM car les deux produits **121** et **122** ont exactement le même rapport frontal mais le chauffage 1 h à reflux a été suffisant pour obtenir une conversion totale. Cependant, une chute du rendement a été observée la deuxième fois (71%) qui est peut-être due à la montée en échelle, avec 8,25 g de **121**, contre une quantité trois fois inférieure la première fois (de même que dans la littérature). **122** est avantageusement obtenu avec une bonne pureté après un simple traitement aqueux, sans purification par chromatographie.

L'azote ainsi libéré du cycle indolique de **122** est ensuite méthylé par de l'iodure de méthyle après déprotonation par NaH, fournissant le composé **123** avec de très bons rendements. La différence observée avec le rendement de la littérature (49%) provient peut-être en partie du fait que Forbes *et al.* purifient le produit **123** par chromatographie sur gel de silice tandis qu'ici sa pureté était satisfaisante avec seulement des traitements aqueux.

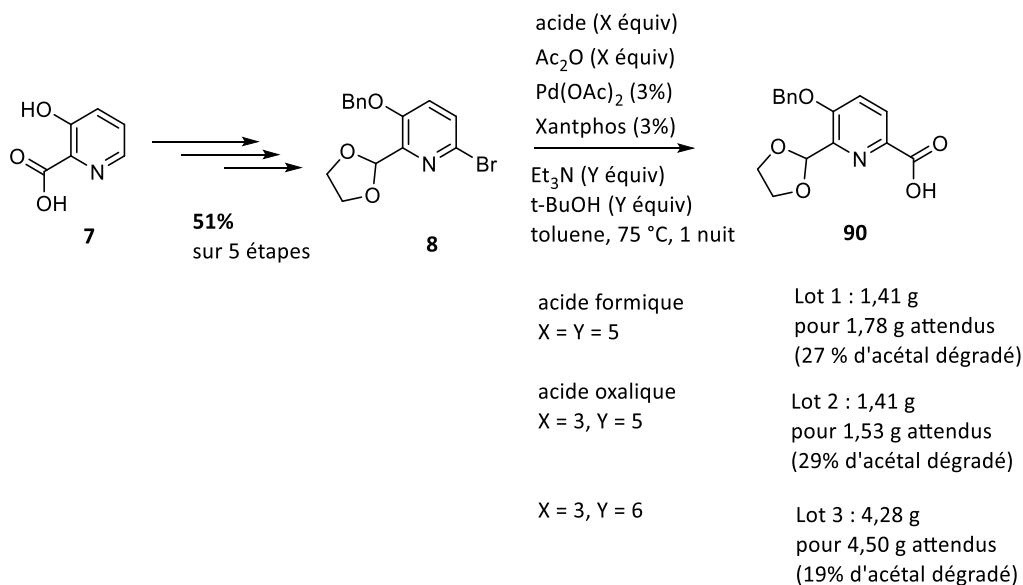
La dernière étape est la déprotection de l'amide de **123** pour obtenir l'aniline libre pour la réaction suivante de formation de l'urée. Le premier protocole publié par Forbes *et al.* (1995) proposait de l'effectuer simplement dans une solution aqueuse de soude à 2,5 M à reflux 4 h. Ils obtenaient alors un mélange contenant encore 20% de l'amide de départ. Malheureusement la conversion est faible car le composé **123** est très peu soluble dans cette solution et son précipité finit par s'agglomérer, empêchant la réaction de se poursuivre. Un faible rendement de 32% a donc été obtenu, occasionnant des pertes de produit. Une fraction du produit de départ **123** a cependant été récupérée après chromatographie sur gel de silice et a été engagée dans une déprotection de l'amide dans le méthanol, catalysée non plus par des conditions basiques, mais acides avec HCl (37%) (10 équiv). Après un reflux d'1h30 la conversion maximale estimée était malheureusement de 24% et la majorité du produit était dégradé. Le protocole précédent, dans sa forme optimisée par Forbes *et al.* (1996), a alors été retenté avec cette fois la présence d'éthanol qui améliore la solubilité et la dispersion du produit en solution. Le rendement obtenu de 79% a donc été largement amélioré et est similaire à ceux rapportés dans la littérature.

Lors de la deuxième synthèse, 2,57 g de **119** ont ainsi été obtenus en 5 étapes avec un rendement global de 44%.

5.4.3. Synthèse du fragment 90

L'autre fragment **90** (Schéma 43) correspondant à la fonction réactivatrice est obtenu à partir de l'intermédiaire **8** par réaction d'hydroxycarbonylation, obtenu en grandes quantités et en 5 étapes avec 51% de rendement global, comme présenté précédemment au chapitre I (Schéma 8). Cette réaction a été répétée plusieurs fois selon les besoins, sans faire cette fois de purification par chromatographie sur gel de silice, mais uniquement les différentes extractions et traitements aqueux. La RMN du brut ainsi obtenu montre que le produit obtenu est propre, mais l'intégration du pic correspondant aux quatre protons de l'acétal intègrent pour une valeur inférieure à 4, correspondant à une proportion de 20 à 30% d'acétal probablement dégradé. Malgré cela, la chromatographie n'a pas été réalisée car elle induit des pertes significatives, tandis que les quantités récupérées de cette

façon sont proches des conversions effectivement produites durant la réaction. De plus, excepté pour le lot 2, les réactions suivantes de formation de l'urée se sont faites malgré tout avec de bons rendements, en utilisant 2 équivalents d'acide **90**.

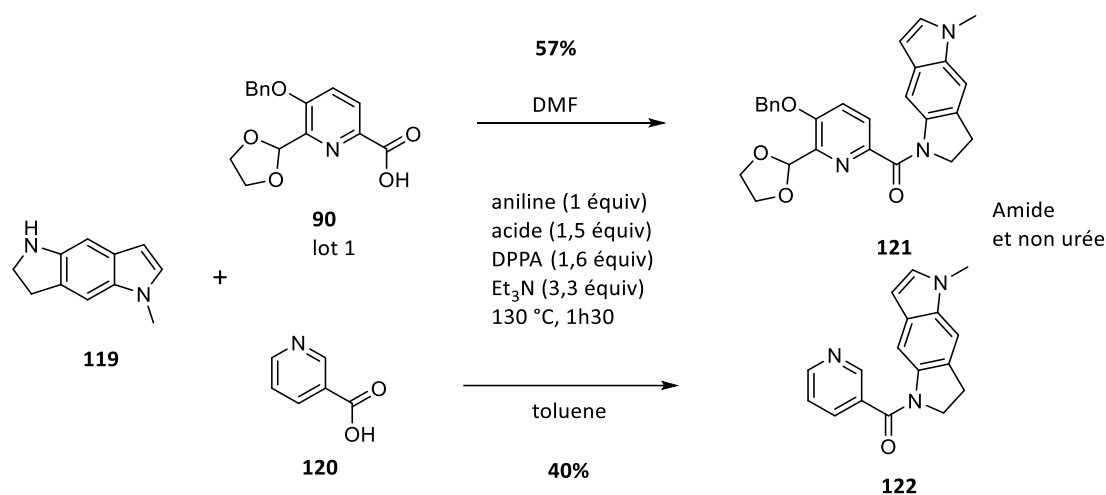


Schema 43 : Synthèse de l'intermédiaire 90 par hydroxycarbonylation

Devant ces dégradations de l'acétal, la proportion de triéthylamine et de tert-butanol ($2 * Y$ équivalents) par rapport au nombre d'équivalents d'acide généré lors de la réaction ($2 * X$ pour l'acide formique et $3 * X$ pour l'acide oxalique comportant deux fonctions acides intrinsèques, voir mécanisme **Schéma 25** partie 5.2.1.) a été augmentée pour la synthèse du lot 3, ce qui a effectivement réduit la proportion d'acétal dégradé. Le rendement pourrait potentiellement être encore amélioré en réduisant la quantité d'alcool à 1 équivalent, ce qui réduirait la quantité d'eau produite par estérification, tout en utilisant un excès de triéthylamine par rapport aux acides générés, ce qui serait plus efficace pour neutraliser ces acides que la réaction d'estérification, dont la cinétique n'est peut-être pas suffisamment rapide.

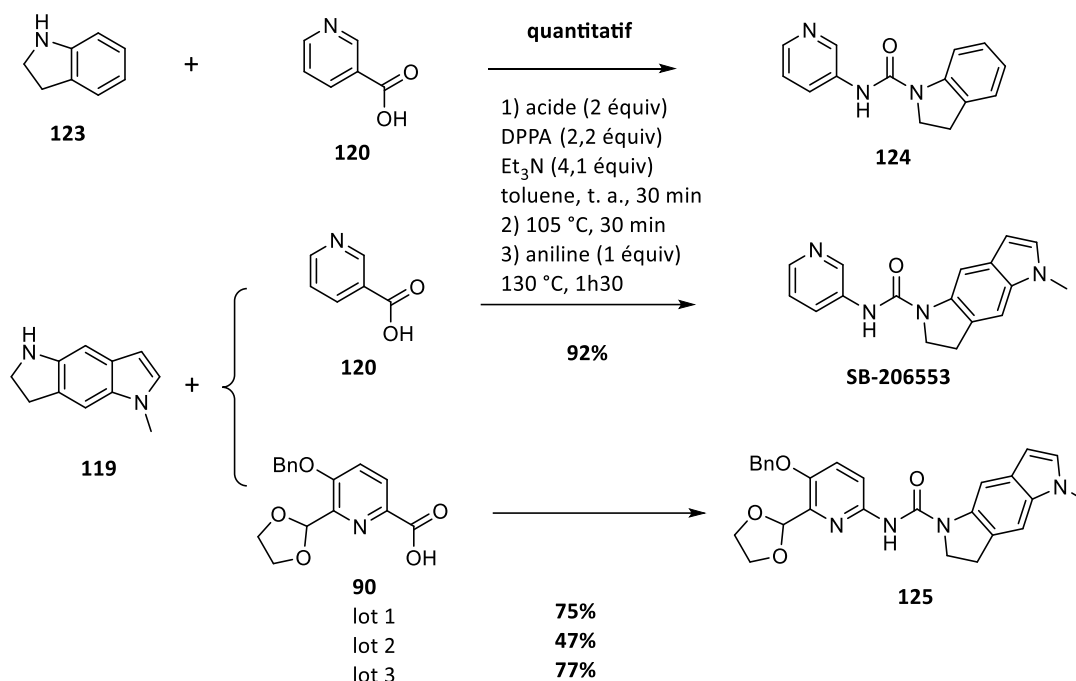
5.4.4. Synthèse du SB-206553 et du composé 66

Les synthèses du **SB-206553** et de l'urée précurseur du composé **66** visé ont ensuite été tentées en suivant le protocole one-pot utilisé pour la synthèse du **PNU-120596** et du MTDA **63**, qui fournissait les urées correspondantes avec de très bons rendements (**Schéma 44**). Malheureusement, cette fois, pour chacune des deux réactions, les amides **121** et **122** ont été obtenus au lieu des urées correspondantes attendues, ce qui a été confirmé par analyse HRMS. Nous pouvons supposer que l'aniline **119** a un pouvoir nucléophile plus important que l'aniline utilisée pour la synthèse du **PNU-120596**, ce qui peut lui permettre d'opérer une substitution nucléophile sur les azotures d'acyle dérivés de **90** et **120** avant que le réarrangement de Curtius puisse avoir lieu.



Schema 44 : Tentative de synthèse de l'urée SB-206553 et de l'urée précurseur du MTDA 66 par azidation, réarrangement de Curtius et addition nucléophile one pot.

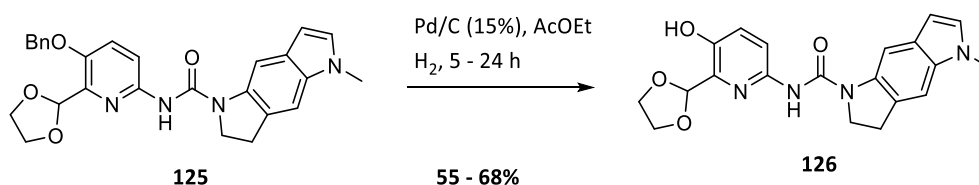
Pour éviter cette réaction non désirée, la formation de l'urée s'est ensuite faite de façon séquentielle, en produisant d'abord l'isocyanate à partir de l'acide carboxylique, puis en ajoutant seulement ensuite l'aniline, comme le font d'ailleurs Forbes *et al* (**Schéma 45**).⁵⁰¹ Cependant, pour la synthèse du **SB-206553**, nous utilisons l'acide nicotinique **120**, qui est plus pratique à manipuler que l'azoture de nicotynoyle correspondant utilisé par Forbes *et al.*, qui est un réactif qui peut exploser en étant chauffé sans solvant et qui nécessite donc des précautions particulières.



Schema 45 : Synthèse séquentielle de différentes urées

Le protocole séquentiel a d'abord été testé sur des composés commerciaux simples, l'indoline **123** et l'acide nicotinique **120**, permettant d'obtenir avec succès l'urée **124** de façon quantitative. Ce protocole a donc ensuite été appliqué à la synthèse du **SB-206553**, obtenu avec 92% de rendement, et à celle de l'urée **125**, précurseur du MTDA **66**, obtenu avec de bons rendements, excepté avec le lot 2 de **90** qui était sûrement moins pur que les autres. La purification par chromatographie sur gel de silice a cependant dû être optimisée car le composé **125** éluait difficilement sur la colonne avec un éluant DCM/AcOEt, tandis qu'un éluant ternaire DCM/(AcOEt/MeOH 1/1) avec un gradient 100/0->98/2 permettait d'obtenir une résolution satisfaisante.

Le composé **125** devait ensuite être déprotégé pour obtenir le composé **66** désiré, avec la débenzylation du phénol et la déprotection de l'acétal en aldéhyde.



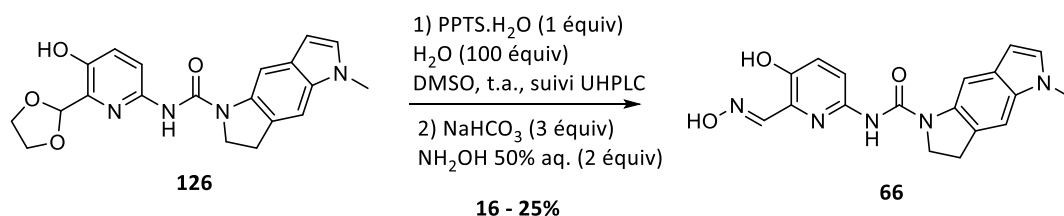
Schema 46 : débenzylation du composé 125

La débenzylation du composé **125** par hydrogénolyse s'est faite sans difficulté particulière, fournissant le phénol **126** avec des rendements modérés, limités essentiellement par une conversion incomplète (Schéma 46).

La déprotection de l'acétal a cependant posé des problèmes plus importants qui ont nécessité une optimisation importante du protocole. En effet, le protocole utilisé habituellement (60 °C une nuit dans une solution eau/acide formique 1/1), testé deux fois sur le composé **126**, n'a pas permis d'obtenir l'aldéhyde correspondant. Un suivi UHPLC sur un troisième essai a permis de vérifier la formation de nombreux produits de dégradation dans les 30 premières minutes de la réaction. Le produit **126** est donc sensible aux acides en milieu aqueux.

Un acide plus doux a alors été choisi : le paratoluenesulfonate de pyridinium (PPTS), en quantité substoéchiométrique (0,5 équivalent), qui est connu pour son utilisation comme catalyseur du clivage d'acétals lorsque le substrat comporte des fonctions sensibles aux acides plus forts. Le composé **126** a été solubilisé dans une solution DMSO/H₂O 10/3, le DMSO étant le solvant organique miscible à l'eau dans lequel le composé est le plus soluble. Après l'ajout du PPTS la solution a été suivie par UHPLC (avec identification des différents pics par LC/MS) pour étudier la réaction. Le pic d'aldéhyde se formait alors lentement sur les trois premières heures mais au bout de 20 heures, un pic significatif secondaire apparaissait. La dilution par deux du milieu réactionnel par du DMSO a ensuite permis de stopper dans les heures suivantes l'augmentation de ce pic secondaire qui devait être principalement lié à un mécanisme d'hydrolyse. Au vu de la cinétique lente de la réaction, 0,5 équivalents supplémentaires de PPTS ont aussi été ajoutés.

Dans les 14 heures suivantes, la conversion en aldéhyde a continué de progresser, mais des pics de produits secondaires ont aussi commencé à se former de manière simultanée, empêchant d'obtenir une conversion de 100%. La réaction a alors été stoppée à 34 h par une neutralisation avec 5 équivalents de NaHCO₃, alors que la conversion en aldéhyde était de 60%. Cependant, la formation de produits secondaires a augmenté assez rapidement suite à cet ajout de NaHCO₃. La formation d'une oxime a alors été essayée pour stopper ces dégradations en ajoutant 2 équivalents d'hydroxylamine (50% aq.) : l'oxime s'est alors très rapidement formée (quelques minutes) et a en effet permis de stopper la formation des produits secondaires.



Schema 47 : synthèse du composé **66** par déprotection de l'acétal et formation de l'oxime one pot.

En prenant en compte ces observations, le protocole a été adapté en utilisant 1 équivalent de PPTS et une concentration (0,05 M) cinq fois plus élevée que précédemment pour augmenter la cinétique, en limitant arbitrairement la quantité d'eau à 100 équivalents, et en formant l'oxime on pot immédiatement après l'ajout de NaHCO₃. Le contrôle par UHPLC s'est révélé cependant toujours nécessaire pour faire l'ajout d'hydroxylamine, dès que l'intégration du pic d'aldéhyde diminuait au profit des pics secondaires (aux alentours de 50 à 60% de conversion).

Cela a permis d'obtenir le composé **66** avec des rendements de 16% et de 25%. Mais la purification de **66** pour obtenir une pureté de 95% s'est avérée extrêmement délicate car les produits secondaires avaient des rapports frontaux très proches. Pour le lot le plus conséquent (300 mg) trois chromatographies successives avec un gradient DCM/MeOH 100/0 -> 99,95/0,05 n'ont pas permis d'obtenir la pureté voulue, et le DCM, trop polaire, a avantageusement été remplacé le chloroforme, moins polaire, pour obtenir une pureté supérieure à 95% après deux chromatographies successives, de gradient CHCl₃/MeOH 100/0->98/2.

5.4.5. Conclusion

Le composé **66** a donc été obtenu en trois étapes à partir de l'urée **125** avec un rendement global de 13%, lui-même obtenu de façon convergente à partir de l'aniline **119** synthétisée en 5 étapes avec un rendement global de 44%, et de l'acide **90** (**Schéma 45**).

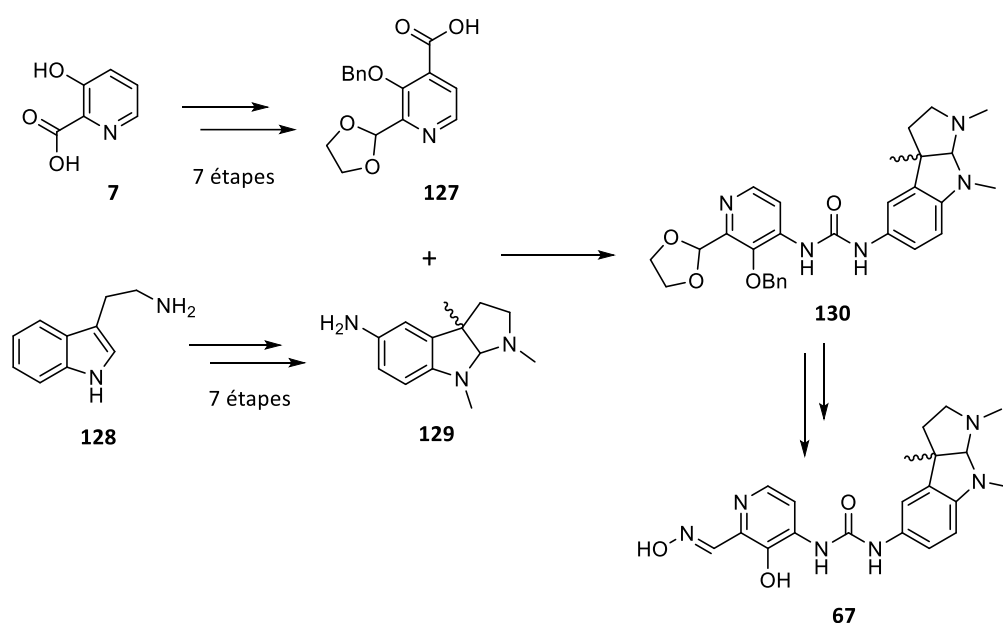
L'étape limitante est bien évidemment la dernière étape de déprotection (**Schéma 47**), dont le rendement ne peut pas excéder 50% avec le protocole actuel et dont le suivi UHPLC ne permet pas l'utilisation en routine. La quantité d'eau pourrait cependant être encore largement réduite pour observer d'éventuels bénéfices sur les dégradations observées. En revanche, ce protocole pourrait être adapté pour les synthèses des réactivateurs des chapitres précédents, qui ne sont pas sensibles aux conditions acides aqueuses, et pourrait permettre d'obtenir l'oxime en une seule étape à partir de l'acétal.

Pour la synthèse du MTDA **66**, un autre groupement que l'acétal pourrait être envisagé. Mais l'ester n'est pas forcément une option privilégiée car ce type de composé, comme le phénol **126**, a une solubilité assez faible dans les solvants organiques et la réduction ménagée de l'ester en aldéhyde en utilisant le DIBAL dans le DCM pourrait s'avérer délicate.

5.5. Efforts synthétiques déployés pour la synthèse du MTDA **67** dérivé de la physostigmine

5.5.1. Voie de synthèse de **67**

La voie de synthèse choisie pour le composé **67** s'appuie sur la rétrosynthèse établie précédemment (**Schéma 23** partie 5.1.), en synthétisant parallèlement l'acide carboxylique **127** et l'aniline **129** pour les coupler ensuite sous forme d'urée, qui devait ensuite être déprotégée pour obtenir **67**.



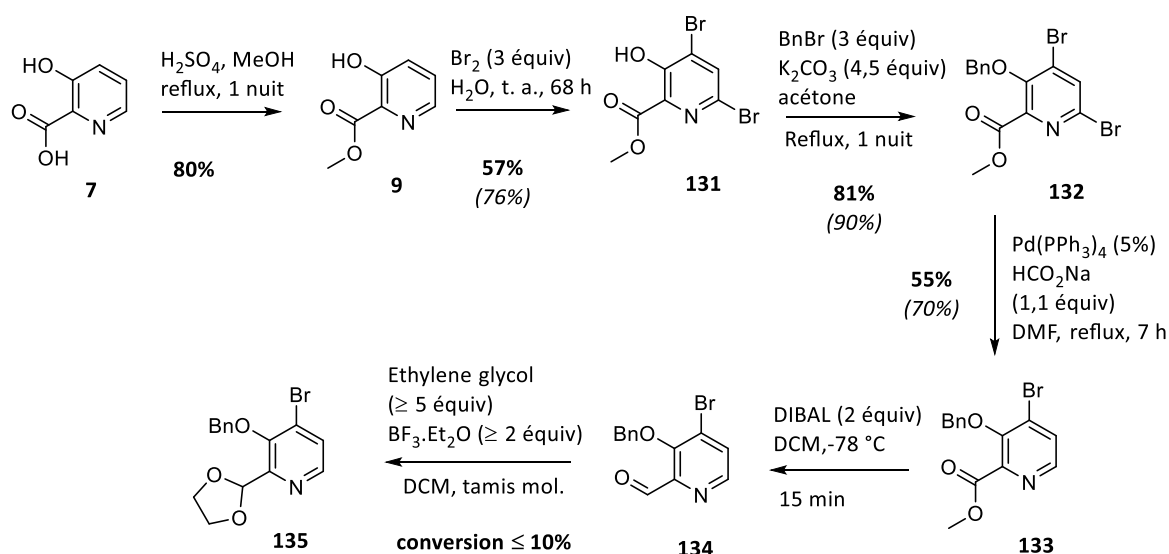
Schema 48 : Voie de synthèse envisagée pour le composé **67**

Pour cette synthèse, la protection du phénol du produit de départ **7** sous forme d'éther benzylique était envisageable car il ne semblait pas, à première vue, que les conditions d'hydrogénolyse pour déprotéger le phénol soient incompatibles avec le produit **120**. Pour la même raison, l'aldéhyde a été protégé sous forme d'acétal. La synthèse de l'acide **127** s'est appuyée en grande partie sur les travaux précédents de notre équipe, en particulier les travaux du Dr. Tristan Verdelet, sur la fonctionnalisation, notamment, de la position 4 de l'acide picolinique **7**.⁵⁶⁵ La synthèse du fragment **129** s'est appuyée, elle, notamment sur les travaux portant sur la synthèse de la physostigmine et de ses dérivés publiés par Kawahara *et al.* et par Wang *et al.*, à partir de la tryptamine **128** (127 € pour 50 g chez le fournisseur Sigma Aldrich).^{566,567} Cette synthèse a fait l'objet du sujet de stage de Master 2 de Maxime Henoc, qui a donc réalisé sous ma supervision des étapes de synthèse menant à **127** et **129**.

5.5.2. Synthèse du noyau pyridine fonctionnalisé

5.5.2.1. 1^{ère} voie de synthèse

La voie de synthèse développée pour synthétiser le fragment **127** est basée, pour les 4 premières étapes, sur la publication de Verdelet *et al.* dont les rendements sont indiqués entre parenthèses à titre de comparaison (**Schéma 49**).⁵⁶⁵ Après la réaction d'estérification du produit de départ **7**, l'utilisation d'un excès de dibrome lors de la réaction de bromation électrophile aromatique a permis d'obtenir le produit **131**, bromé aux positions 4 et 6. Le rendement est modéré car la réaction a été trop longuement prolongée (68 h contre 20 h dans la littérature), conduisant à une dégradation du produit, potentiellement en raison de la présence de HBr en solution. Le phénol a ensuite été protégé par benzylation dans les conditions habituelles, avec un bon rendement. Le produit **132** est ensuite obtenu avec un rendement modéré par une réaction de déhalogénéation sélective pallado-catalysée, grâce à la plus grande réactivité de la position 6.



Schema 49 : 1^{ère} voie de synthèse tentée pour obtenir le composé 127, s'appuyant, en partie, sur les travaux de Verdelet *et al.* (rendements entre parenthèses).⁵⁶⁵

Alors que les travaux reportés précédemment conservaient l'ester, nous voulions ensuite convertir l'ester méthylique en aldéhyde protégé sous forme d'acétal. L'ester **133** a donc été réduit dans les conditions habituelles avec du DIBAL. Le traitement aqueux a fourni un mélange du produit de départ **133**, de l'alcool dérivé et du produit attendu **134** à hauteur d'au moins 50% selon la RMN. Bien qu'il aurait été préférable que ce mélange soit purifié, il a été utilisé pour tester la réaction d'acétalisation sur le composé **134**. Deux réactions tests ont échoué, malgré l'ajout d'équivalents supplémentaires d'éthylène glycol ou de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ et l'allongement de la durée de la réaction, ou encore la mise à reflux

du mélange réactionnel. La seule conversion qui a pu être observée à partir d'une fraction obtenue après purification par chromatographie est estimée inférieure à 10%. Nous avons donc alors choisi de modifier l'ordre des trois dernières étapes, à savoir inverser les étapes de réduction/acétalisation et de déhalogénéation sélective, en espérant que la réaction d'acétalisation se déroule mieux.

5.5.2.2. 2^{ème} voie de synthèse

Les trois premières étapes de cette deuxième voie de synthèse étaient donc identiques à celles précédemment effectuées, les deux premières ne nécessitant pas de purification par chromatographie (**Schéma 50**). Pour l'étape de double bromation du composé **9**, la réduction du temps de réaction à 20 h, comme indiqué par Verdelet *et al.*, a fourni cette fois un rendement de 73% similaire à celui reporté.

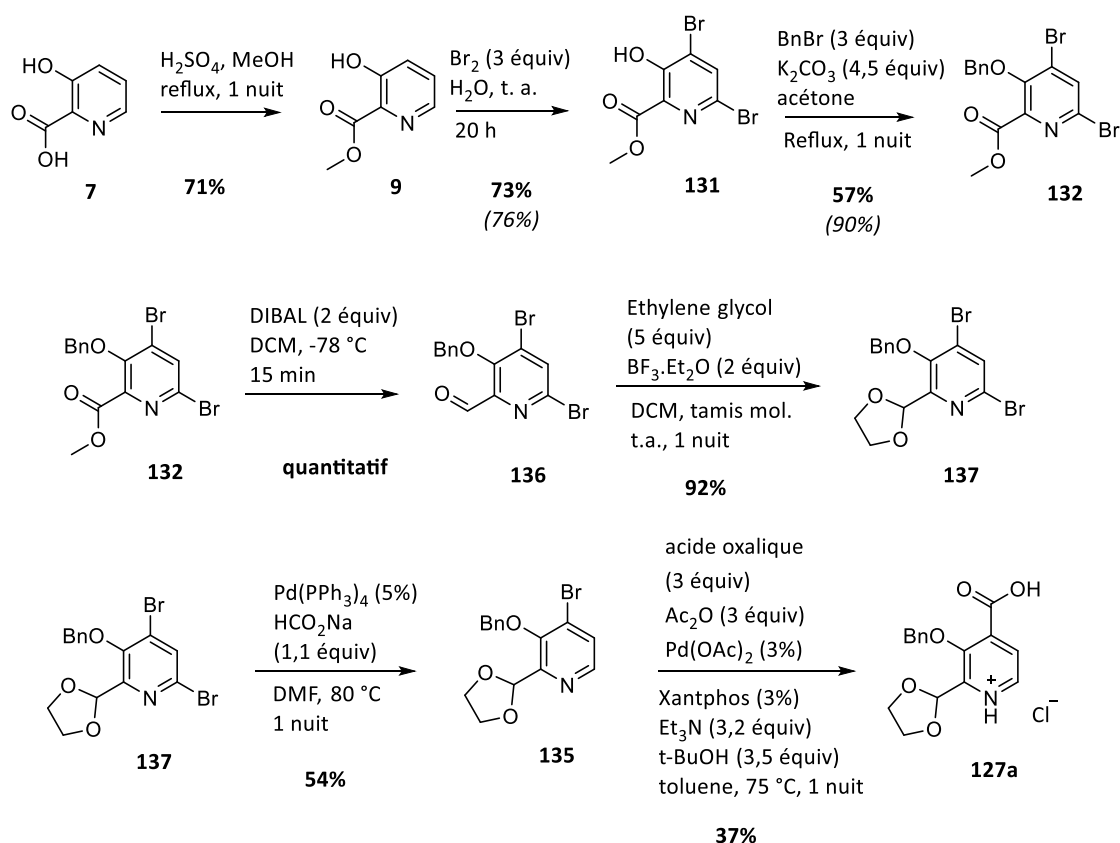


Schéma 50 : 2^{ème} voie de synthèse réalisée pour obtenir le composé 127

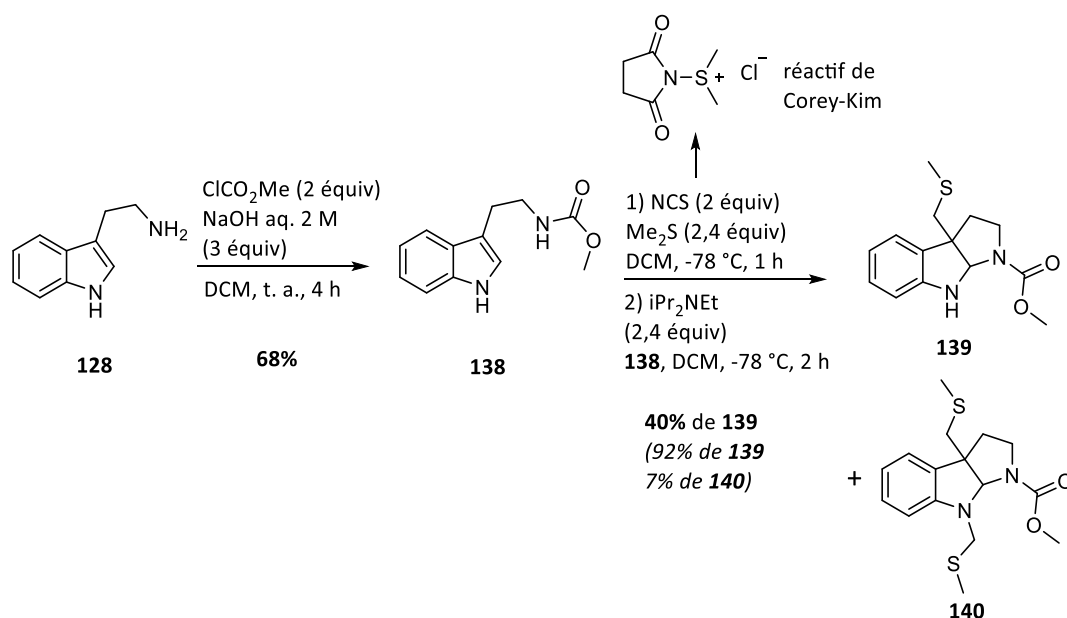
La réduction de l'ester **132** s'est faite ensuite de façon quantitative avec les conditions habituelles et un simple traitement aqueux. La réaction d'acétalisation a donc été réalisée cette fois sur le substrat **136** et non plus le composé **134**, ce qui a permis, à notre satisfaction, d'obtenir l'acétal **137** avec un excellent rendement, après un simple traitement aqueux pour purification. La débromation sélective de la position 6 a ensuite fourni le composé **135** avec un rendement similaire à celui obtenu

précédemment. La présence de l'acétal ne change donc pas la réactivité, ce qui est cohérent avec ce qu'on pouvait observer précédemment avec les couplages de Sonogashira sur la position 6, en utilisant le même catalyseur Pd(PPh₃)₄. Le composé **135** a ensuite été engagé dans la réaction d'hydroxycarbonylation avec les conditions habituelles, ce qui a permis d'obtenir 377 mg de l'acide carboxylique **127a**, soit un rendement de 37%, après purification par des traitements aqueux (le laissant sous forme protonée).

Ce composé a donc été obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 5%. L'avantage de cette voie de synthèse est par ailleurs de n'avoir que deux étapes nécessitant une purification par chromatographie sur gel de silice.

5.5.3. Synthèse du fragment **129**

Les premières étapes de synthèse du composé **129** se sont appuyées sur la synthèse développée par Kawahara *et al.* (rendements indiqués entre parenthèses à titre de comparaison), qui débutait à partir du composé **138** (Schéma 51).⁵⁶⁷ Celui-ci a donc été synthétisé à partir de la tryptamine **128** en se fondant sur le protocole rapporté par Wang *et al.* qui ont travaillé sur la fonctionnalisation des indoles.⁵⁶⁸ Le composé **138** est obtenu avec 68% de rendement à l'échelle de la dizaine de grammes (9.3 g), à la suite d'une purification par recristallisation dans le mélange isopropanol/pentane.



Schema 51 : Deux premières étapes de la synthèse de 129, tirées de Wang *et al.* et de Kawahara *et al.*^{567,568}

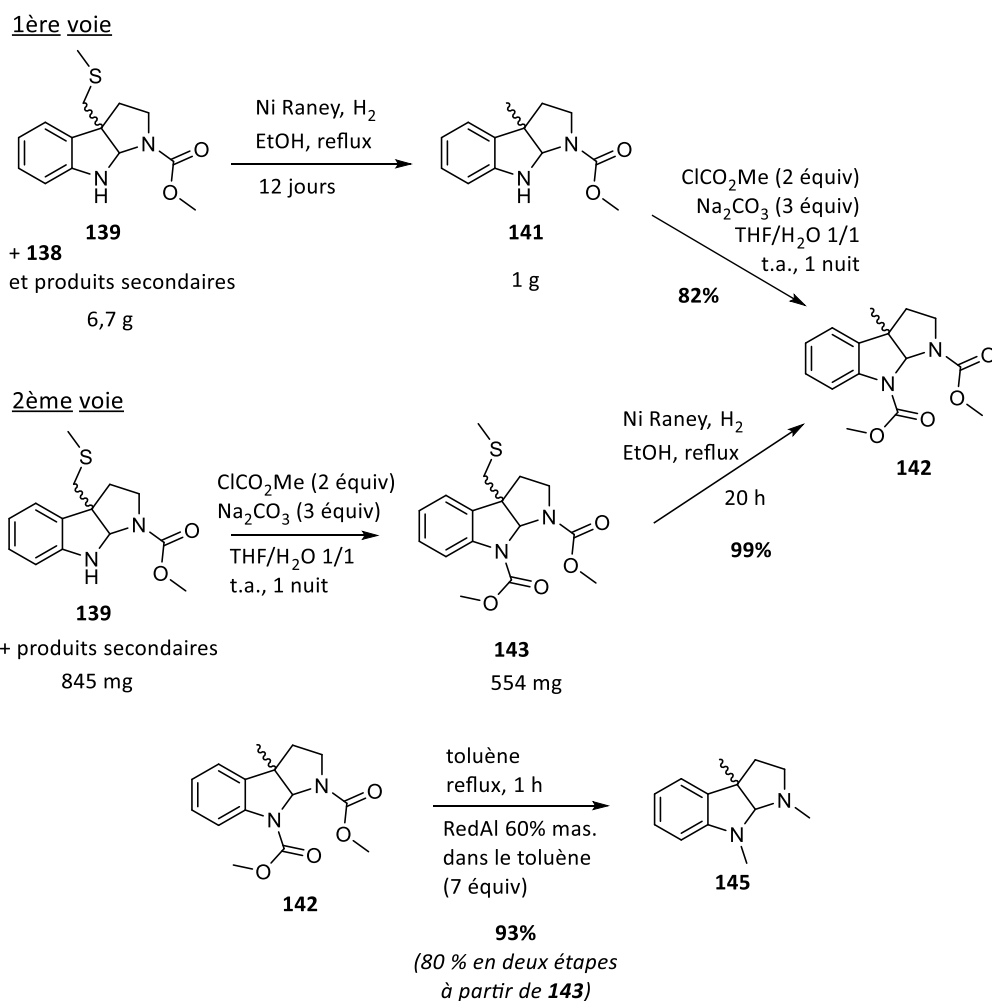
La cyclisation de **138** a ensuite été réalisée avec le réactif de Corey-Kim, produit *in situ* à -78 °C, en conditions basiques, dont le mécanisme d'action sur les indoles a été explicité par Katayama *et al.* en

1992.⁵⁶⁹ Le composé **139** a alors été obtenu avec 40% de rendement, avec une conversion incomplète. En effet, après une purification par chromatographie délicate (rapports frontaux proches), des fractions importantes ont été isolées correspondant à un mélange de **139** et du produit de départ **138**. La différence de rendement avec celui rapporté par Kawahara *et al.* peut s'expliquer par la différence d'échelle (quelques centaines de mg contre une dizaine de grammes ici) ainsi que potentiellement par la pureté du réactif N-chlorosuccinimide utilisé (NCS).

Dans leurs travaux, Kawahara *et al.* rapportent ensuite une triple réaction one pot à partir de **139**, avec la formation d'une imine sur l'aniline libre, hydrogénée ensuite par H₂ et du nickel de Raney et le clivage de la liaison C-S encore par hydrogénolyse, à reflux dans l'éthanol. Malheureusement leur protocole n'est pas détaillé et nous nous sommes donc appuyés sur les protocoles de Knefeli *et al.* rapportant une imination sur un composé indolinique et son hydrogénolyse *in situ* et celui de Bravo *et al.* rapportant le clivage d'une liaison C-S par hydrogénolyse avec du nickel de Raney.^{570,571} Avec le nickel de Raney disponible au laboratoire, toutes nos tentatives ont cependant été infructueuses, seule l'imine étant retrouvée avec le produit de départ. La réaction d'hydrogénolyse seule de la liaison C-S a aussi été tentée sans succès. Or Kawahara *et al.* rapportent l'utilisation de nickel de Raney de type W2. Soupçonnant que le réactif utilisé ne possédait pas la réactivité désirée, nous avons pu obtenir un lot de nickel de Raney de qualité industrielle (B 113 CW ; Degussa) qui a alors permis d'identifier le produit de clivage **141** sur une réaction test (**Schéma 52**). Il n'a en revanche pas été plus efficace pour réaliser l'hydrogénation de l'imine formée *in situ*. Les deux étapes ont donc été découplées.

Une première voie a donc été essayée, débutant par le clivage de la liaison C-S sur le composé **139** (**Schéma 52**). Cependant, réalisée à grande échelle, la cinétique de la réaction a été extrêmement lente, ne permettant d'obtenir qu'un gramme de **141** à partir de 6,7 g de **139** en mélange avec des produits secondaires (fraction de mélange issue de purification).

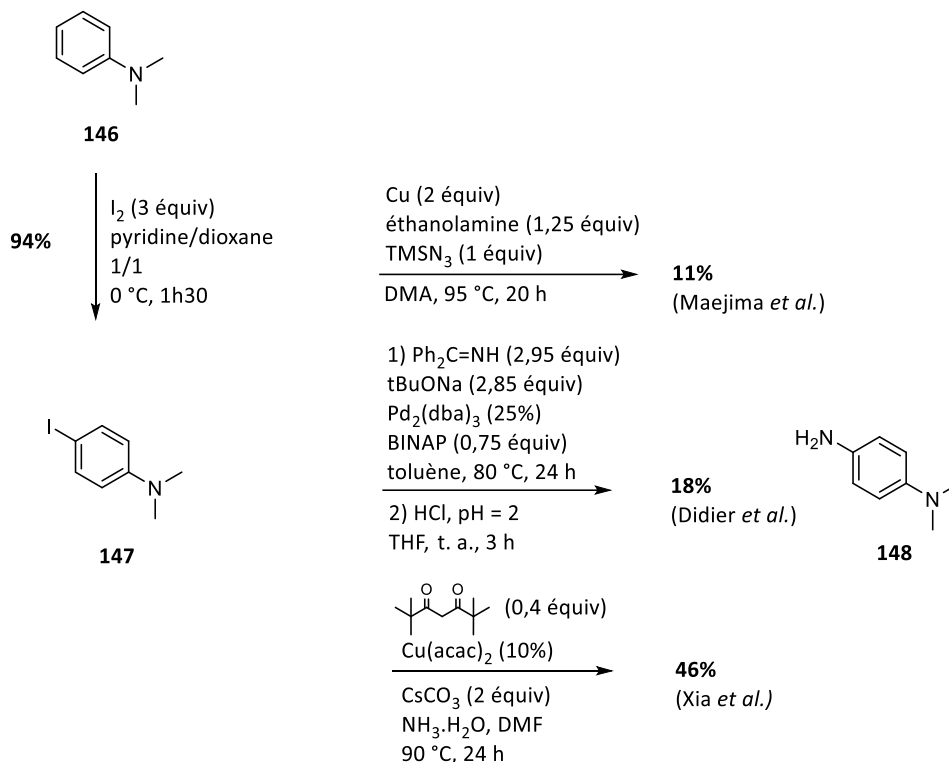
Le composé **141** a ensuite subi une réaction de carbamoylation qui a permis d'obtenir le double carbamate **142** avec un bon rendement. Ces deux fonctions carbamate ont ensuite été réduites par du RedAl dans le toluène à reflux, pour obtenir le composé **145** avec un très bon rendement.



Schema 52 : étapes de carbamoylation, hydrogénolyse et réduction pour obtenir le composé 145, basées sur Kawahara et al.⁵⁶⁷

Cependant, nous avons voulu trouver une solution à la faible conversion ainsi que la cinétique très lente observées à l'étape d'hydrogénation par le nickel de Raney. Nous avons supposé que la protection préalable de l'azote encore libre sur le composé **139** par un carbamate pouvait augmenter le rendement de l'hydrogénation car le nickel de Raney pouvait potentiellement être empoisonné. Une deuxième voie a donc été réalisée avec d'abord une bonne conversion par carbamoylation d'un mélange de **139** avec des produits secondaires (fraction issue de purification) en **143**. L'hydrogénation de **143** a alors vérifié notre hypothèse puisque le produit résultant du clivage de la liaison C-S **142** a alors été obtenu en seulement 20 h de façon quasi-quantitative. Cette 2^{ème} voie est donc plus adaptée pour les réactifs dont nous disposons au laboratoire.

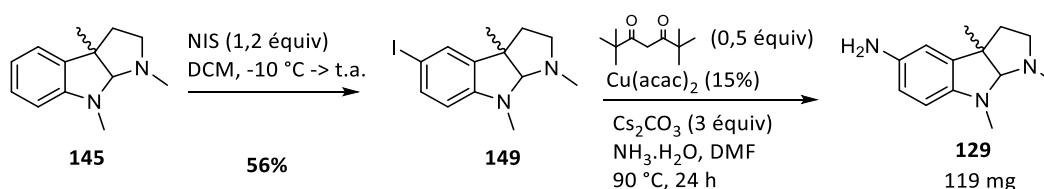
Les deux dernières étapes devaient consister en l'halogénéation et l'amination consécutive du produit **145** pour obtenir le composé **129** désiré. Pour cela, différentes conditions d'amination ont été testées sur des composés simples et similaires au produit **145** (Schéma 53).



Schema 53 : Sélection de la méthodologie d'amination de l'aniline iodée **147**.⁵⁷²⁻⁵⁷⁴

Trois méthodologies différentes d'amination aromatique ont été testées sur l'aniline iodée **147**, obtenue préalablement à partir de **146**, pour sélectionner la plus efficace sur ce type de composé. La méthodologie de Maejima *et al.* repose sur l'incorporation d'une fonction azoture par du cuivre sur la position halogénée et sa réduction consécutive en amine.⁵⁷⁴ Le rendement obtenu s'est cependant révélé très faible. Ensuite, la réaction utilisée par Didier *et al.* sur des anilines iodées bicycliques a été développée par Buchwald et fait intervenir l'introduction palado-catalysée de la benzophénone imine sur la position halogénée, qui peut ensuite être clivée en conditions acides pour donner l'amine libre voulue.^{573,575} Là encore le rendement obtenu s'est révélé décevant. La dernière méthodologie à avoir été testée est celle développée par Xia *et al.* qui permet l'introduction de l'amine sur un aryl iodé avec de l'ammoniaque et une catalyse au cuivre, ligandé par une dicétone comme la tetraméthyl-3,5-heptanedione.⁵⁷² Le rendement s'est cette fois-ci révélé modéré et nous n'avons pas cherché de méthode plus efficace pour une question de temps.

Le composé **145** a donc été régiosélectivement iodé dans un premier temps en se basant sur le protocole utilisant le N-iodosuccinimide (NIS) reporté par Wang *et al.*, qui ont réalisé cette même réaction pour leurs travaux sur la physostigmine.⁵⁶⁶ Le protocole a cependant été adapté à cause de la très faible solubilité du NIS dans le DCM, qui a donc été ajouté par portions et non en solution, à -10 °C par précaution, au lieu de 0 °C.



Schema 54 : derni\u00e8res \u00e9tapes d'iodation et d'amination pour obtenir le compos\u00e9 129

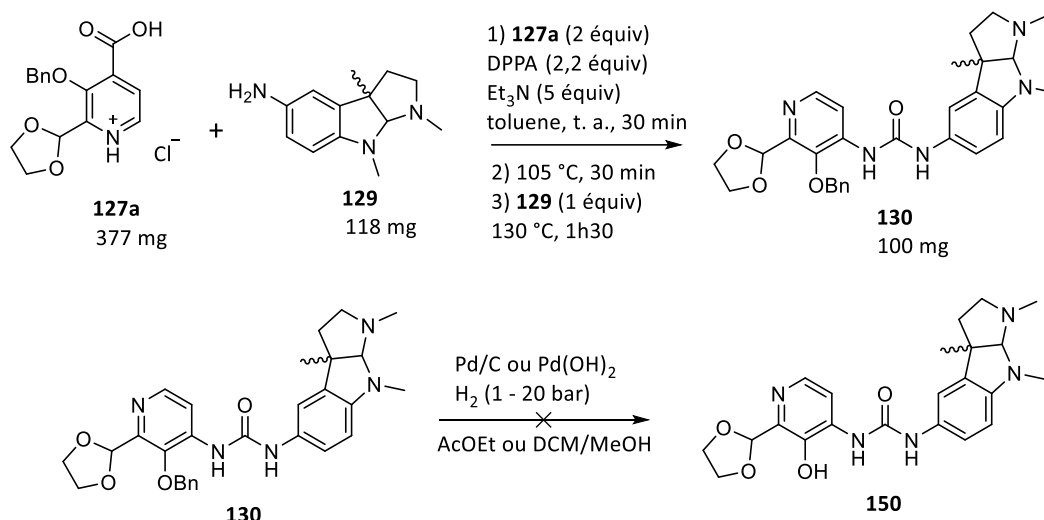
Le compos\u00e9 iod\u00e9 **149** a \u00e9t\u00e9 obtenu avec 56% de rendement et a \u00e9t\u00e9 engag\u00e9 dans les conditions d'amination aromatique s\u00e9lectionn\u00e9es, qui ont fourni 119 mg du compos\u00e9 **129** d\u00e9sir\u00e9 avec une conversion estim\u00e9e entre 40 et 50%. Apr\u00e8s purification par chromatographie sur gel de silice, la RMN du compos\u00e9 **129** n'a en effet pas \u00e9t\u00e9 concluante, le spectre \u00e9tant tr\u00e8s mal r\u00e9solu avec ce type de compos\u00e9. Surprenamment, l'analyse HRMS de la fraction obtenue n'a pas non plus \u00e9t\u00e9 concluante, donnant un rapport m/z de 233,1293, correspondant \u00e0 C₁₃H₁₇N₂O₂, formule dont le lien avec **129** n'a pas \u00e9t\u00e9 \u00e9clairci. Heureusement, l'analyse LC/MS a permis de confirmer la pr\u00e9sence \u00e0 hauteur de 68% de **129** dans cette fraction, avec un sous-produit majoritaire poss\u00e9dant deux protons en moins. Une seconde purification par chromatographie sur gel de silice n'a pas \u00e9t\u00e9 tent\u00e9e car la forte polarit\u00e9 du produit aurait pu induire des pertes importantes.

L'\u00e9tape limitante de cette voie de synth\u00e8se est la cyclisation de **138** en **139** par le r\u00e9actif de Corey-Kim (**Sch\u00e9ma 51**) qui devrait \u00eatre optimis\u00e9e pour des r\u00e9actions r\u00e9alis\u00e9es \u00e0 plus grande \u00e9chelle, car avec une conversion incompl\u00e8te la purification s'av\u00e8re difficile. Les \u00e9tapes suivantes ont \u00e9t\u00e9 r\u00e9alis\u00e9es avec de tr\u00e8s bons rendements. Les \u00e9tapes d'iodation et d'amination ont cependant fourni les produits correspondants avec des conversions mod\u00e9r\u00e9es et pourraient \u00eatre soit optimis\u00e9es soit remplac\u00e9es : une fonction nitro \u00e0 cette position, pr\u00e9sente d\u00e8s le d\u00e9but de la voie de synth\u00e8se pourrait potentiellement \u00eatre r\u00e9duite en amine de fa\u00e7on avantageuse \u00e0 la derni\u00e8re \u00e9tape.

5.5.4. Couplage des fragments 129 et 127 et derni\u00e8res \u00e9tapes

Les compos\u00e9s **129** et **127** ainsi obtenus ont \u00e9t\u00e9 engag\u00e9s dans la r\u00e9action s\u00e9quentielle de formation de l'ur\u00e9e, permettant d'obtenir avec succ\u00e8s l'ur\u00e9e **130**, dont la quantit\u00e9 semble correspondre \u00e0 une conversion mod\u00e9r\u00e9e (**Sch\u00e9ma 55**). La purification de **130** a cependant \u00e9t\u00e9 d\u00e9licate car trois colonnes

chromatographiques successives n'ont pas réussi à séparer **130** d'un produit secondaire à la polarité très proche. L'analyse LC/MS réalisée a permis de supposer que ce produit secondaire était le diphenyl phosphate dérivé du DPPA, ce qu'a confirmé une analyse RMN du phosphore. Plusieurs lavages aqueux basiques successifs ont alors permis de s'en débarrasser.



Schema 55 : Formation de l'urée **130** et tentatives de débenzoylation

Malheureusement, l'étape de débenzoylation n'a en revanche pas été fructueuse. Une hydrogénolyse avec Pd/C à 15% molaire dans l'acétate d'éthyle durant 4 jours n'a pas montré de conversion vers le produit **150**. La réaction a alors été retentée dans le DCM/MeOH pour une meilleure solubilité, sous 5 bar de H₂ pendant 2h30, sans amélioration, puis pendant 20 h sous 20 bar. Cette fois une nouvelle tâche est apparue sur CCM, bien que celle du produit de départ soit toujours présente. 24 heures supplémentaires sous 20 bar n'ont pas permis d'augmenter significativement cette première conversion. Le palladium hydroxyde Pd(OH)₂ a alors été essayé sous 20 bar de H₂ pendant 24 h, sans que la tâche du produit de départ ne disparaisse. A ce moment-là, une analyse LC/MS a montré que le brut réactionnel était composé de 35% de produit débenzylé comportant l'acétal partiellement ouvert, réaction secondaire déjà observée aux chapitre I et II, et 28% du produit de départ, le reste étant des produits secondaires non identifiés. Il se peut que le problème déjà identifié de complexation par l'azote de la pyridine et un oxygène de l'acétal soit aggravé ici par la participation d'un ou des deux azotes du ligand tricyclique, limitant ainsi drastiquement la cinétique, et conduisant à la formation de sous-produits.

Des recherches sur de nouvelles méthodes de débenzoylation ne faisant pas intervenir une hydrogénolyse n'ont malheureusement pas pu être menées, par manque de temps. Un autre

groupement protecteur du phénol devrait être envisagé si aucune autre méthode de débenzylation ne permettait d'obtenir le composé **150**.

5.6. Conclusion

Tout d'abord, en se basant sur les synthèses présentées dans la littérature, les PAM **SB-206553** et **PNU-120596** ont pu être synthétisés avec de très bons rendements en quantités suffisantes pour des tests *in vivo*.

Ensuite, la méthodologie de synthèse basée sur la fonctionnalisation du noyau pyridine par un acide carboxylique, permettant de coupler par un lien urée la fonction réactivatrice au fragment conservé des différents modulateurs allostériques, a été couronnée de succès pour les trois synthèses et a permis d'optimiser ces deux réactions essentielles.

Les réactions finales de déprotection ont cependant été délicates pour les trois synthèses, soit à cause de la nature du groupement protecteur comme pour la synthèse de **63**, avec le photoclivage du nitrobenzyle et la déprotection concomitante de l'acétal ; soit à cause des propriétés de la structure de ces composés dérivés des modulateurs allostériques, qui compliquent les réactions de déprotection, avec une sensibilité à l'acidité en milieu aqueux pour la synthèse de **66**, ou une faible réactivité vis-à-vis de l'hydrogénéolyse pour la synthèse de **67**.

Néanmoins, des quantités largement suffisantes pour les tests biologiques prévus ont été obtenues pour les composés **63** et **66**, grâce à une synthèse convergente présentant une majorité d'étapes avec de bons rendements.

6. FORMULATION DES COMPOSES TESTES

6.1. Composé dérivé de la **physostigmine**

Bien que la synthèse du composé **67** n'ait malheureusement pas pu être menée à terme, nous avons malgré tout voulu vérifier si l'intermédiaire réactionnel **130 (PDG-254) (Figure 101)** conservait les propriétés de modulation allostérique que possède la physostigmine sur les nAChRs. Un lot de 11,6 mg du composé **130** a donc été envoyé au CEA avec une pureté de 87,5% par LC/MS, qui n'a pas pu être améliorée par manque de temps. Le composé est suffisamment soluble dans le DMSO et devrait donc pouvoir être ensuite dilué dans les tampons à pH 7,4 utilisés pour les tests d'électrophysiologie.

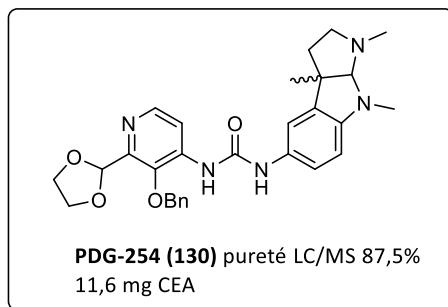


Figure 101 : composé basé sur la physostigmine envoyé pour des tests sur les nAChRs

6.2. Composés dérivés du PNU-120596

Un lot de 202 mg de **PNU-120596** de pureté LC/MS 99,8% a été envoyé à l'IRBA pour réaliser des tests *in vivo* (Figure 102). Le **PNU-120596** n'est pas soluble dans l'eau mais est solubilisé grâce à une solution à 10% de Cremophor®, selon la publication de Potasiewicz *et al.*⁵⁷⁶ Le Cremophor® est un mélange de tensioactifs basés sur une structure de triglycérides, utilisé pour solubiliser des molécules lipophiles pour des produits comme des parfums, ou des produits pharmaceutiques.

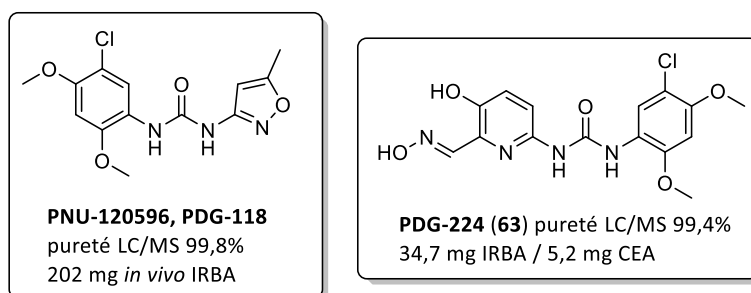


Figure 102 : PNU-120596 et MTDA associé envoyés pour des tests biologiques

Le composé **63** n'est malheureusement pas non plus soluble dans l'eau et à notre surprise, ses sels de mésylate ou de chlorhydrate non plus (à 20 mM après 2 h de sonication à 35 °C). Le composé **63** neutre est le plus soluble dans le THF, et un peu moins dans le DMSO. Ses sels ne sont pas solubles dans le méthanol à 10 mM mais sont solubles dans le DMSO, à 100 mM pour le mésylate et à 80 mM pour le chlorhydrate.

Le DMSO ayant des propriétés inhibitrices envers l'AChE, sa proportion ne doit pas dépasser 1% de la solution utilisée *in vitro* car à cette proportion, 33% de l'AChE est déjà inhibée. Ces observations nous ont donc fait renoncer à tester le composé pour des tests de réactivation *in vitro*. La quantité envoyée à l'IRBA devait donc être directement testée *in vivo*. Malheureusement, malgré l'utilisation de DMSO et de Cremophor®, la dilution du composé dans le sérum physiologique a provoqué un trouble persistant. Ce composé n'a donc pas non plus pu être testé *in vivo*.

Pour les tests sur les nAChRs, l'incidence du THF sur les expérimentations a été vérifiée et ce solvant a pu être utilisé pour solubiliser le composé **63** et le diluer en solution aqueuse pour effectuer les tests.

6.3. Composés dérivés du **SB-206553**

Le **SB-206553 (PDG-232)** a été envoyé à l'IRBA pour être testé *in vivo* et au CEA pour vérifier son effet sur les nAChRs (**Figure 103**). Comme ce composé n'est pas soluble dans l'eau et doit d'abord être solubilisé dans le DMSO pour être ensuite dilué (ou bien dans une solution de Cremophor®), son sel de mésylate a aussi été formé, au cas où sa solubilité serait meilleure en cas de problème. L'analogue plus simple de **SB-206553**, **124 (PDG-231)** a aussi été envoyé au CEA, pour observer si cette structure plus simple conservait un effet modulateur allostérique sur les nAChRs. Pour la même raison que précédemment, il a été envoyé sous forme neutre et de sel de mésylate.

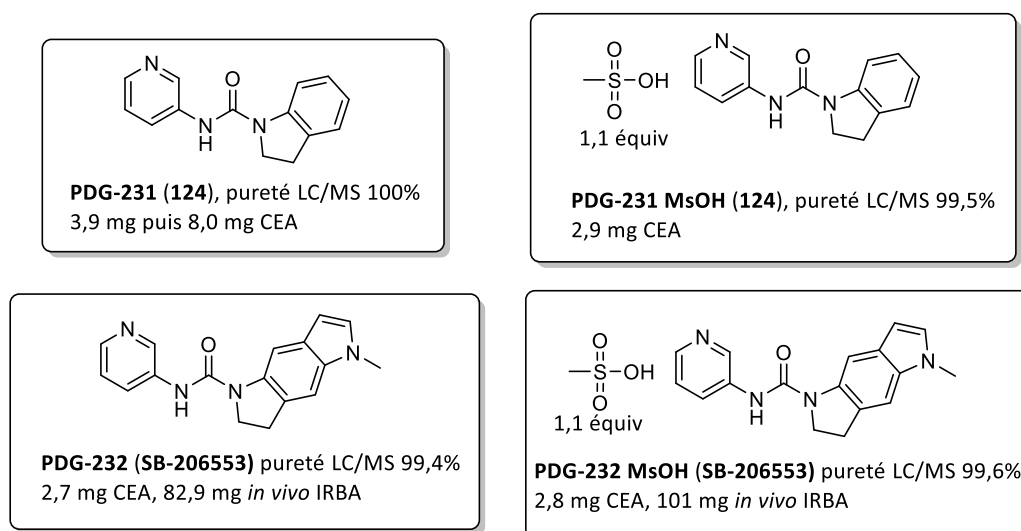


Figure 103 : SB-206553 et analogue 124 et leurs sels de mésylate envoyés pour des tests biologiques

Le composé **67 (PDG-275)** a été envoyé sous forme neutre et chargée au CEA pour des tests sur le nAChRs et à l'IRBA pour des tests *in vitro* dans un premier temps et peut-être *in vivo* dans un deuxième temps (si la solubilisation s'avère impossible *in vitro*, ou si les résultats *in vitro* sont prometteurs) (**Figure 104**). Malheureusement les propriétés de solubilité du composé **67** sont également problématiques. Que ce soit sous forme neutre ou chargée, ce produit n'est pas soluble à 10 mM dans l'eau, le THF, l'ACN et le méthanol.

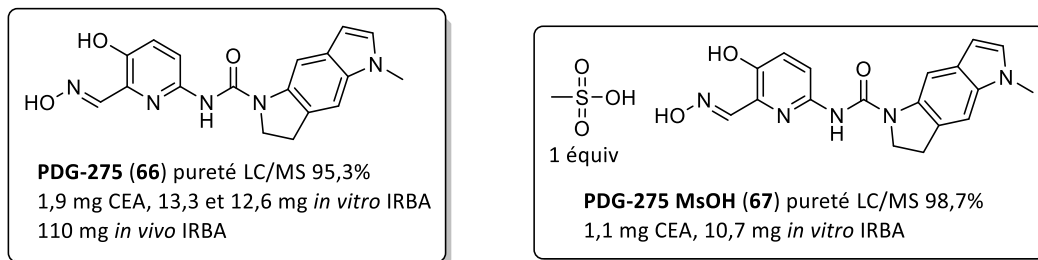


Figure 104 : MTDA dérivé du SB-206553 sous formes neutre et chargée envoyé pour des tests biologiques.

Sous forme neutre le composé **67** est soluble à 40 mM dans le DMSO et à 50 mM dans le DMAC (diméthylacétamide), qui est aussi miscible à l'eau, tandis que, sous la forme de sel de mésylate, il n'est soluble qu'à 10 mM dans le DMSO et 15 mM dans le DMAC. Pour les tests *in vitro*, le DMAC a donc été d'abord testé mais il s'est révélé encore plus inhibiteur que le DMSO sur l'AChE. Le DMSO va donc être testé dans un deuxième temps pour le solubiliser.

Encore une fois, l'utilisation de DMSO pose moins de problèmes au niveau des tests sur les nAChRs.

6.4. Hydrosolubilité des urées en chimie médicinale

Nous pouvons observer que les composés **67** et **63** ont une mauvaise hydrosolubilité, ce que nous avons pu vérifier grâce aux logiciels de simulation, qui prévoyaient des solubilités plus basses que celles des autres structures étudiées (**Tableau 28, partie 3.1.3.**). En particulier, la substitution de l'urée en position 4 améliorerait significativement l'hydrosolubilité selon ces simulations. Nous nous sommes demandés pourquoi ces composés étaient si peu solubles et la raison de ces différences. Des éléments de réponse peuvent être apportés par une revue assez récente et très complète de Ghosh *et al.* sur l'utilisation des produits comportant une fonction urée en chimie médicinale.

Les propriétés de solubilité des bi-aryles urées sont liées notamment à leur capacité à former des liaisons hydrogènes et à former des interactions de type π -stacking avec les groupes aromatiques présents sur ces structures. Plusieurs stratégies ont été développées pour augmenter la solubilité en jouant sur ces paramètres.

Les urées peuvent former des réseaux polymériques de liaisons hydrogènes lorsque les substituants des deux azotes sont petits, ce qui peut réduire leur solubilité (**Figure 105, gauche**). Il est possible de limiter la formation de ces liaisons hydrogène avec des substituants à plus fort encombrement stérique. L'urée peut alors par exemple ne plus former que des dimères (**Figure 105, droite**).

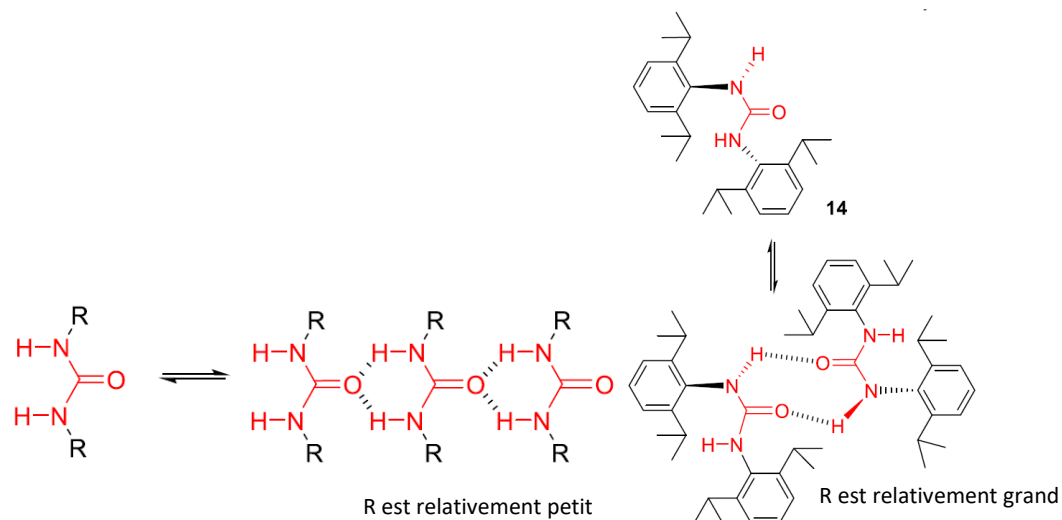


Figure 105 : Comparaison entre un réseau intermoléculaire de liaisons hydrogène avec des petits substituants (gauche) et la formation d'un dimère avec de plus gros substituants (droite) (adapté de Ghosh, 2020)⁵⁷⁷

La formation de liaisons hydrogène intramoléculaires pourrait aussi augmenter l'hydrosolubilité, ce qui peut également réduire la possibilité de former des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

Les bi-aryles urées ont aussi tendance à former des interactions de type π -stacking. Diminuer la symétrie du composé peut alors réduire ces interactions en réduisant le caractère plan du composé. Cela peut notamment être réalisé en plaçant un substituant sur un des atomes d'azote de l'urée.

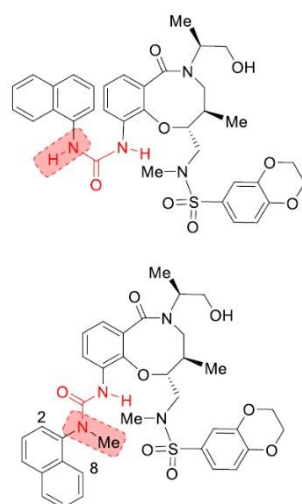


Figure 106 : modification de la conformation et de la planarité par ajout d'un méthyle sur l'un des azotes de l'urée.⁵⁷⁷

Par exemple, le composé du bas sur la **Figure 106** porte un méthyle sur un des azotes de l'urée, ce qui modifie sa conformation, le rendant alors 110 fois plus soluble dans l'eau que le composé du haut. Pour supprimer ce caractère plan, des substituants peuvent aussi être ajoutés sur les groupements aromatiques aux positions adjacentes à celles des azotes de l'urée.

Dans le cas de nos composés, c'est donc peut-être le phénol qui pourrait jouer un rôle important lorsque l'urée est en position 4 sur la pyridine, en limitant à la fois les liaisons hydrogène intermoléculaires et en modifiant l'équilibre conformationnel du composé, comme substituant adjacent à l'urée, ce qui peut jouer sur la planarité et *in fine* sur le π -stacking (**Figure 106**).

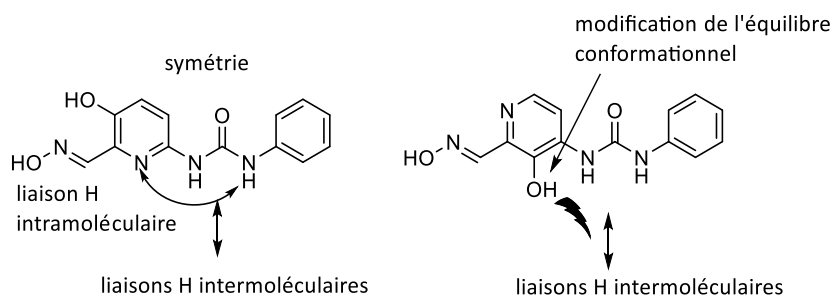


Figure 107 : Comparaison des substitutions de l'urée en position 6 ou 4 sur le noyau pyridine et potentiels effets sur l'hydrosolubilité.

7. EVALUATION BIOLOGIQUE

7.1. Evaluation *in vitro* sur l'hAChE inhibée

Seul le composé **66** doit être encore testé sur l'AChE inhibée par les collaborateurs à l'IRBA, en essayant de le solubiliser avec du DMSO pour ensuite le diluer dans l'eau ou tampons à pH 7,4. Ces tests sont prévus dans les mois à venir.

7.2. Electrophysiologie sur les récepteurs nicotiques

Ces tests d'électrophysiologie sont effectués par les Dr. Rómulo Aráoz et Nicolas Lamassiaude au CEA.

7.2.1. Modulateurs allostériques

L'action du **PNU-120596** sur le nAChR $\alpha 7$ avait précédemment été vérifiée par nos partenaires et l'effet PAM de type II décrit dans la littérature avait bien été confirmé.

L'action du **SB-206553 (PDG-232)** sur le nAChR $\alpha 7$ décrite dans la littérature se confirme avec les mesures réalisées par nos partenaires, avec un effet PAM de type I de 100 nM à 10 μ M (**Figure 108**) et un effet PAM de type II à 100 μ M, ainsi que la resensibilisation de récepteurs préalablement désensibilisés.

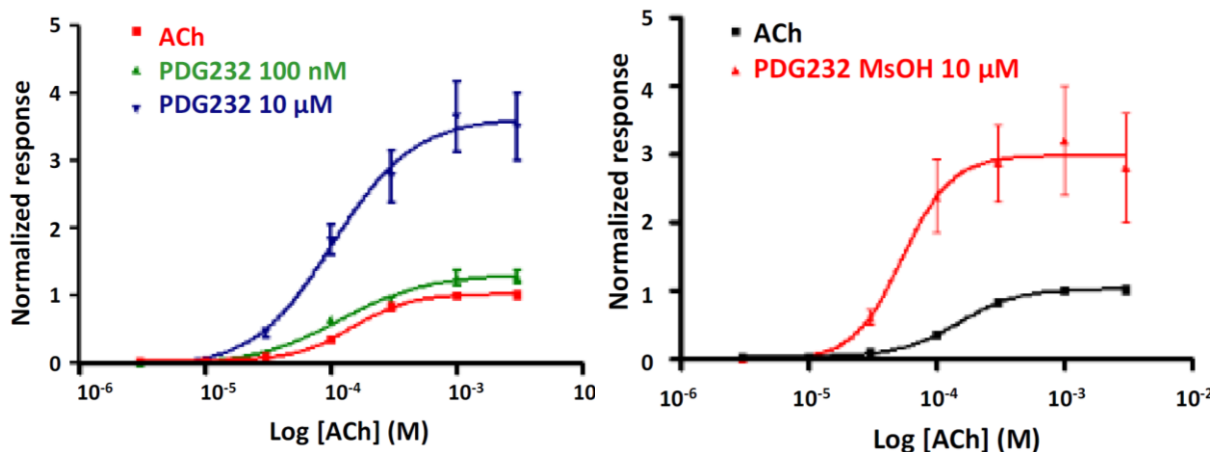


Figure 108 : Courbes du courant cholinergique produit par l'ACh, seule ou en combinaison avec le PDG-232 (SB-206553) à 100 nM ou 10 μM et le PDG-232 MsOH à 10 μM, normalisées par rapport à la moyenne d'applications d'ACh seule. Ce courant est mesuré au travers de la membrane d'ovocytes de *X. Laevis* exprimant le nAChR α7 sur leur membrane cellulaire.

Aucun effet particulier du **SB-206553** n'a par contre été relevée sur les récepteurs musculaires.

L'analogue **124 (PDG-231)** a aussi été testé sur les nAChRs α7. Dans un premier temps, un effet PAM a pu être observé, significatif mais beaucoup moins important que celui du **SB-206553**. Cependant des mesures supplémentaires ne montreraient finalement pas d'effet particulier, c'est pourquoi un deuxième lot a été envoyé pour résoudre la question avec une dernière série de mesures. Quoi qu'il en soit, la perte du troisième cycle indolique dans le motif du **SB-206553** au niveau du composé **124** réduit au minimum fortement l'activité PAM du composé. Ce motif indolique semble donc essentiel. Le composé **124** ne présente pas non plus d'effet sur les récepteurs musculaires.

7.2.2. MTDAs

Comme nous pouvions le craindre (partie 2.1.), le composé **63** basé sur le **PNU-120596** n'a, de manière décevante, aucune action visible et directe sur les nAChRs α7 et musculaires à 10 μM avec une co-application d'ACh à 50 μM. Le remplacement du noyau isoxazole du **PNU-120596** par la fonction réactivatrice a donc radicalement diminué l'action PAM de type II du composé.

Le composé **66** basé sur le **SB-206553** n'a également aucune action visible directe sur les nAChRs α7, α4β2 et musculaires, à 10 μM avec une co-application d'ACh à 50 μM. Le remplacement de la pyridine du **SB-206553** par la fonction réactivatrice a donc également radicalement diminué l'action PAM de ce composé.

Le composé **130** sera testé dans les mois à venir pour voir si l'ajout de la fonction réactivatrice (encore protégée par un benzyle et un acétal) et le changement du carbamate en urée opérés sur la structure de la **physostigmine** ne compromettent pas son action antagoniste sur les nAChRs.

7.3. Evaluation *in vivo*

Les tests *in vivo* sont effectués par le Dr. Guilhem Calas à l'IRBA.

7.3.1. Modulateurs allostériques

Les PAM **PNU-120596 (PDG-118)** et **SB-206553 (PDG-232)** ont été évalués dans le cadre de tests de protection vis-à-vis d'une intoxication au VX ou au sarin, ainsi que les antagonistes mécamylamine (décrite pour être active sur divers types de nAChRs) et la méthyllycaconitine (plus spécifique du nAChR $\alpha 7$), en combinaison avec le sulfate d'atropine et le réactivateur 2-PAM, pour observer un éventuel gain d'indice de protection (**Tableau 30**).

Antidote / Toxique	VX	Sarin
2-PAM + sulfate d'atropine	1,82 [1,67 ; 2,31]	1,49 [0 ; +∞[
2-PAM + Sulfate d'atropine +	PNU-120596 (PDG-118) 3 mg/kg	2,42 [2,22 ; 3,03] 1,4 [1,36 ; 1,5]
	SB-206553 (PDG-232) 2,8 mg/kg	2,71 [0 ; +∞[
	mécamylamine 2 mg/kg	2,66 [2,44 ; 3,37]
	méthyllycaconitine 1 mg/kg	3,22 [2,95 ; 4,23]

Tableau 30 : Indices de protection de la combinaison du sulfate d'atropine (SA) et du 2-PAM avec un ligand des nAChRs

Selon ces premiers résultats, les PAMs de type II comme le **PNU-120596** et le **SB-206553** semblent apporter un gain d'indice de protection significatif contre une intoxication au VX par rapport au traitement classique, de même que les antagonistes mécamylamine et méthyllycaconitine. En revanche le **PNU-120596** ne semble pas améliorer l'indice de protection contre une intoxication au

sarin. Ces valeurs semblent globalement supporter nos hypothèses portant sur un effet bénéfique de ces deux types de composés vis-à-vis de la surstimulation des récepteurs nicotiniques.

Cependant, Guilhem Calas a noté des éléments qui laisseraient penser que les indices de protection du 2-PAM et du sulfate d'atropine seuls pourraient avoir été sous-évalués, ces données sont donc temporaires dans l'attente de confirmation. De plus, dans le cas des PAM qui ont été solubilisés avec une solution de Cremophor®, il faut aussi mesurer la valeur contrôle d'indice de protection du 2-PAM et du sulfate d'atropine avec une solution de Cremophor®.

7.3.2. MTDAs

A cause de son insolubilité, le composé **63** basé sur le **PNU-120596** n'a pas pu être testé.

Le composé **66**, basé sur le **SB-206553**, sera testé si les résultats *in vitro* sont prometteurs ou si les conditions de solubilisation ne permettent pas de réaliser les tests *in vitro* et qu'il faille utiliser une solution de Cremophor®.

8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un état de l'art sur les différents types existants de modulateurs allostériques des nAChRs a permis de déterminer que les PAM et les NAM pourraient avoir un effet bénéfique dans le cas d'une intoxication par un OP, avec cependant certaines limites potentielles pour chaque type de composé. Parmi ces deux types de composé, j'ai opéré une sélection des composés les plus intéressants, qui satisfaisaient à certains critères permettant d'augmenter les chances d'observer des effets significatifs avec des structures basées sur ceux-ci. Nous avons donc choisi pour les PAM : le GAT107, le PNU-120596 et le SB-206553, et secondairement le NS-1738, et pour les NAM : la physostigmine et la mécamylamine.

J'ai choisi de travailler en priorité sur le **PNU-120596**, le **SB-206553** et la **physostigmine (Figure 109)** pour concevoir des MTDAs basés sur leurs structures qui puissent conserver leurs effets sur les nAChRs, tout en ayant une bonne efficacité de réactivation de l'AChE inhibée par différents OPs. Les composés multi-cibles utilisant un bras espaceur pour relier la fonction réactivatrice à la structure du **PNU-120596** ne passant pas la BHE, selon le logiciel Percepta, des structures plus intégrées ont été conçues en se basant sur un lien urée commun aux différentes structures, qui est encadrée de groupes aromatiques, provenant à la fois de la structure du modulateur allostérique et de la fonction réactivatrice.

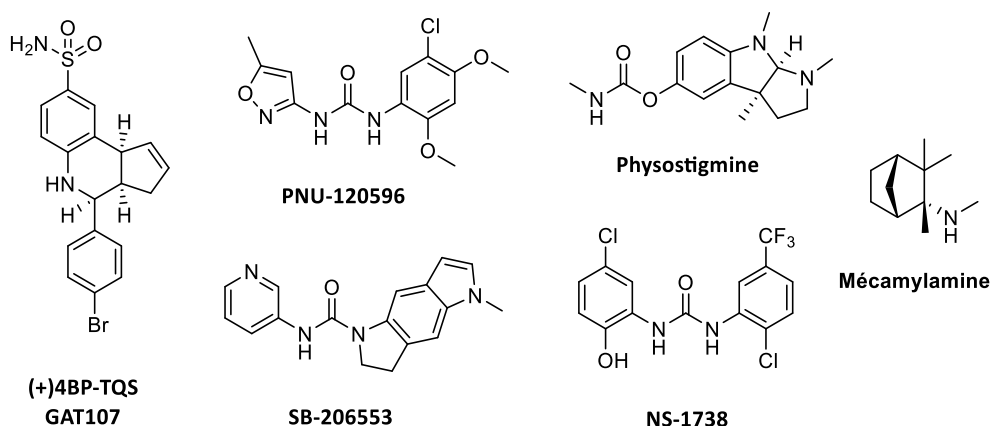


Figure 109 : Structures des modulateurs allostériques sélectionnés

Une sélection s'est ensuite opérée entre les différentes structures possibles grâce à une analyse de paramètres déterminé *in silico*, à savoir le passage de la BHE selon Percepta, leur score CNS MPO et leur validation des critères CNS+, ainsi que les pKa estimés de leurs oximes, et également grâce aux études d'amarrage moléculaire réalisées à l'IRBA par le Dr José Dias. Les estimations de solubilité ont été moins prises en compte au début du projet car elles étaient partielles. Les structures ainsi sélectionnées étaient **63**, **66** et **67**, Figure 110 ci-dessous.

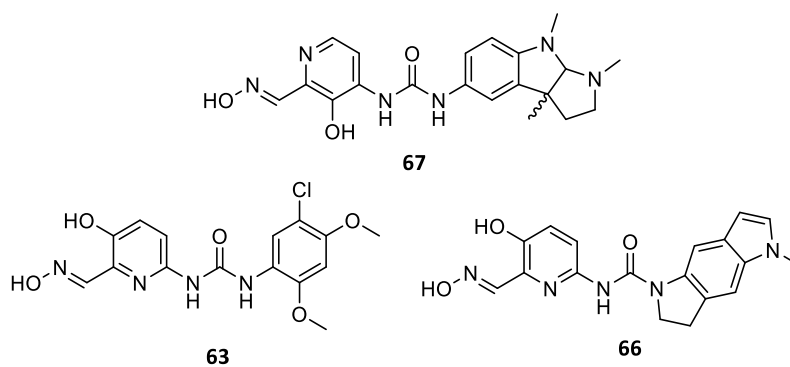
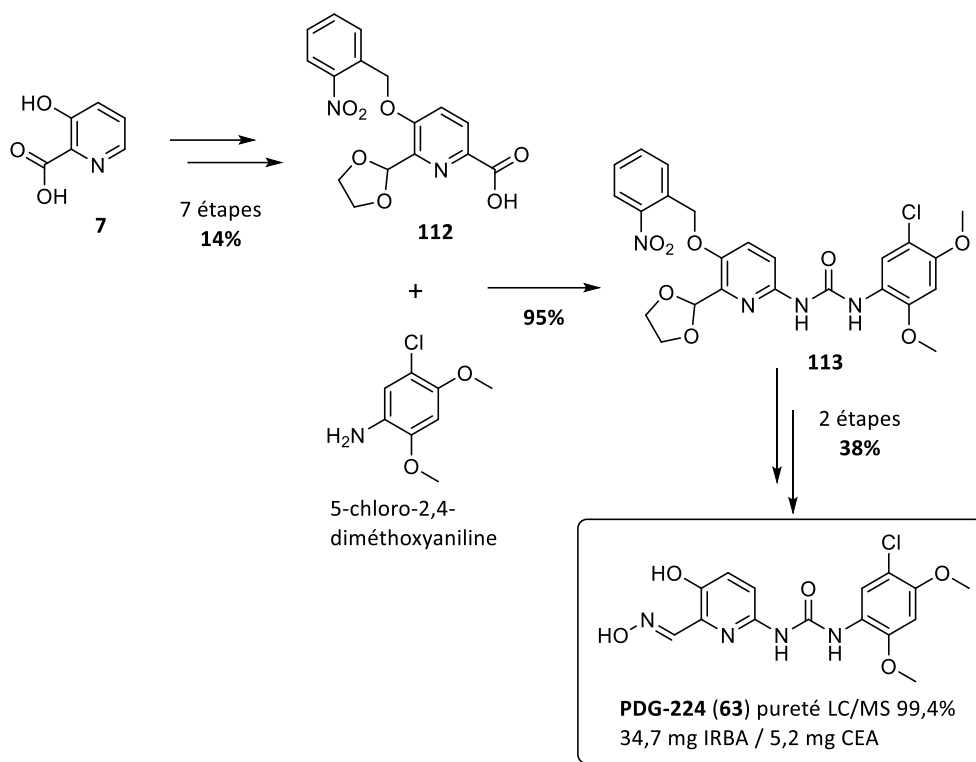


Figure 110 : Structures des MTDA sélectionnés après étude *in silico*, basés sur les modulateurs allostériques PNU-120596, SB-206553 et physostigmine

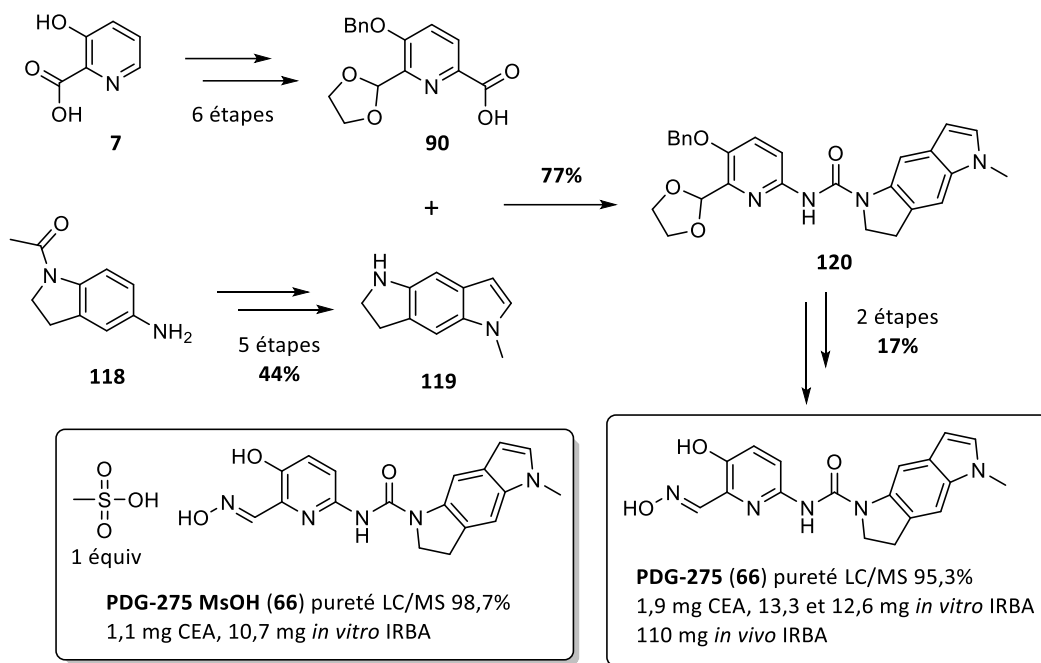
La synthèse de ces trois composés s'est appuyée sur une voie convergente, permettant de synthétiser en parallèle le noyau pyridine fonctionnalisé, notamment par un acide carboxylique obtenu par réaction d'hydroxycarbonylation, précurseur de la fonction réactivatrice, et de l'autre, l'aniline, faisant office de ligand pour le site actif de l'AChE et de motif préservé du modulateur allostérique de base, dont la synthèse s'est appuyée sur les travaux déjà publiés pour ces composés ou leurs dérivés.^{501,544,563,566,578} Les deux fragments, acide carboxylique et aniline, ont été liés par une fonction urée grâce à une azidation de l'acide carboxylique, lui-même transformé ensuite en isocyanate par

réarrangement de Curtius, et qui subit l'addition nucléophile consécutive de l'aniline pour former l'urée, de façon one pot ou séquentielle.



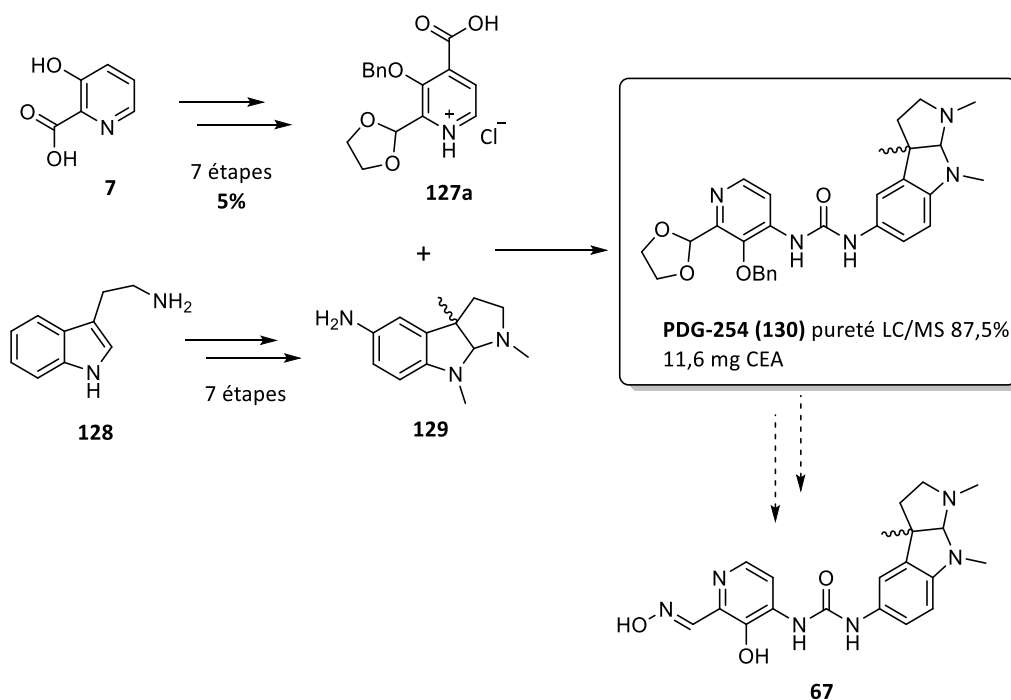
Schema 56 : Synthèse du MTDA 63 et lot envoyé pour tests biologiques

Face aux défis synthétiques rencontrés, des solutions originales ont été mises en place, avec une protection du phénol sous forme d'éther de 2-nitro benzyle photoclivable pour la synthèse de **63**, pour éviter des conditions d'hydrogénolyse nécessaires avec un simple benzyle, et incompatibles avec ce substrat ; l'adaptation des voies de synthèses reportées dans la littérature pour obtenir de meilleurs rendements ; ou encore le suivi par RMN ou UHPLC des réactions les plus délicates : la déprotection du 2-nitrobenzyle pour **63** et la déprotection de l'acétal pour **66**. Ces efforts ont permis d'obtenir des quantités largement suffisantes aux tests biologiques de **63** et **66** et d'obtenir un intermédiaire avancé de la synthèse de **67**.



Schema 57 : Synthèse du MTDA 66 et lots envoyés pour tests biologiques

Au travers de ces synthèses, le **PNU-120596** et le **SB-206553** (ainsi que son analogue simplifié **124**) ont aussi été synthétisés avec de bons rendements pour être testé *in vivo* contre une intoxication aux OPs et pour vérifier leur effet sur les nAChRs (**Figure 111**). L'expérience menée sur **124** devait permettre de vérifier si une structure plus simple à synthétiser permettrait de conserver l'effet PAM.



Schema 58 : Synthèse du MTDA 66 et lot envoyé pour tests biologiques

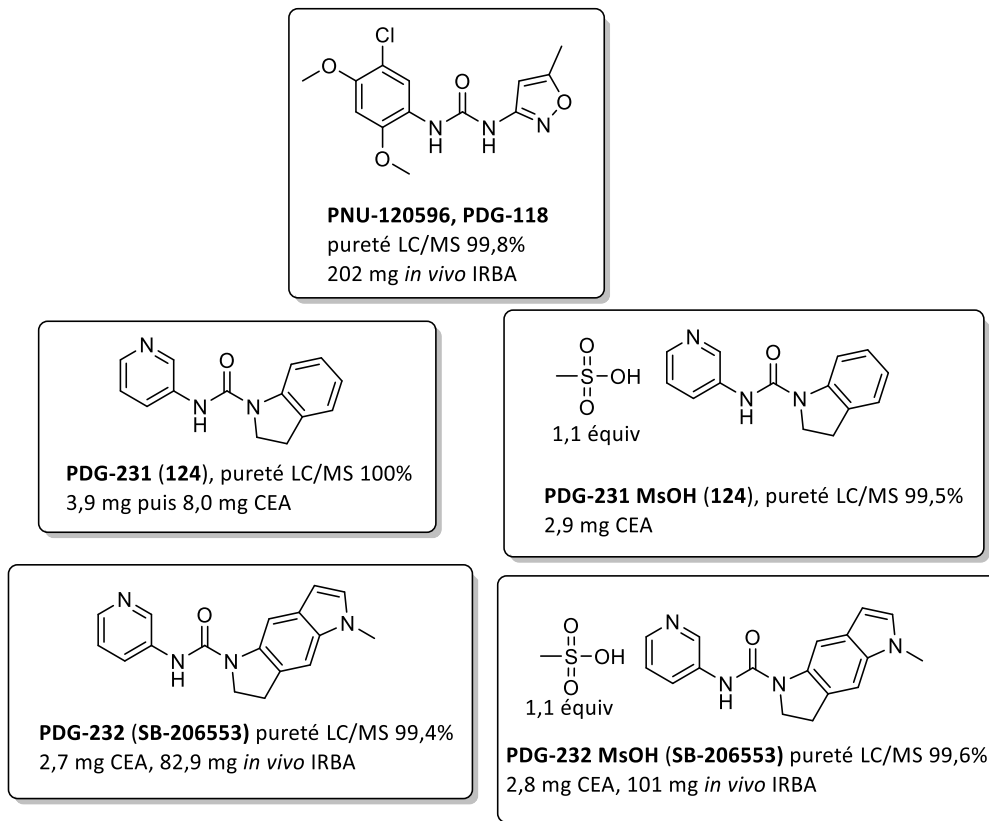


Figure 111 : Lots de PNU-120596, de SB-206553 et de son analogue 124 envoyés pour tests biologiques.

L'analogue du **SB-206553**, **124**, n'a pas démontré d'effet PAM très prononcé, ce qui indique la présence nécessaire du motif indolique pour avoir un effet PAM avec cette structure. En revanche le **PNU-120596** et le **SB-206553** ont bien confirmé les effets PAM reportés dans la littérature sur les nAChRs $\alpha 7$. Ces effets semblent avoir un impact positif contre l'intoxication par le VX car ces deux composés augmentent a priori légèrement les indices de protection quand ils sont combinés au traitement classique à base de sulfate d'atropine et du réactivateur 2-PAM. Les antagonistes mécamylamine et méthylycaconitine présentent en outre les mêmes effets bénéfiques mais ces observations sont néanmoins à confirmer.

En revanche, les MTDAs **63** et **66** n'ont pas conservé d'effet sur le récepteur $\alpha 7$ des PAM dont ils dérivent, respectivement sur le **PNU-120596** et le **SB-206553**, aux concentrations testées. Les modifications structurales ont donc trop fortement compromis l'affinité avec leur(s) site(s) de liaison qui reste(nt) toujours à déterminer précisément. La détermination très récente, par cryo-microscopie électronique, de la structure du complexe PNU-120596 avec le récepteur nicotinique alpha 7 humain représente un atout majeur pour ce projet. Ces données essentielles nous permettront, d'une part, de comprendre comment les modifications structurales opérées pour insérer la fonction réactivatrice ont compromis l'effet PAM du **PNU-120596**, et, d'autre part, de proposer de nouvelles modifications

structurales à envisager pour la suite de ce projet, en gardant à l'esprit les problèmes éventuels de solubilité et de passage de la BHE. Par exemple, la conception de nouveaux MTDA possédant un bras espaceur permettrait de mieux conserver la structure du modulateur allostérique.

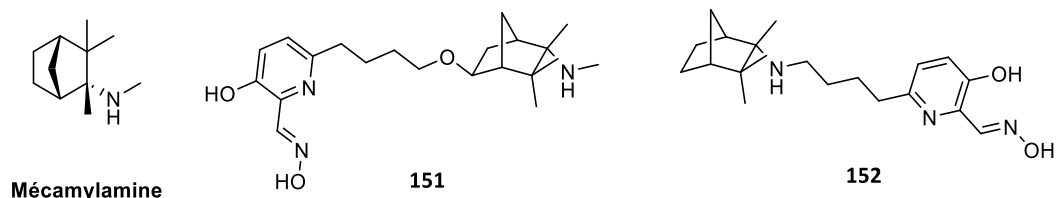


Figure 112 : Structures de MTDA potentiels basés sur la mécamylamine

Seul le NAM mécamylamine (agissant sur de nombreux sous-types de nAChRs) pourrait être à la base d'un MTDA selon ce mode de conception en évitant ces écueils (**Figure 112**). Sa petite structure permet de concevoir un MTDA avec le motif de la mécamylamine comme ligand du site périphérique de l'AChE, lié à la fonction réactivatrice par une chaîne alkyle, comme pour les composés synthétisés aux chapitres I et II. Ainsi sa structure serait mieux préservée. De plus, son amine secondaire permet de fournir un caractère hydrophile nécessaire à l'hydrosolubilité. Des structures ont déjà été imaginées et ont fait l'objet d'études d'amarrage moléculaire réalisée à l'IRBA, dont les plus prometteuses semblent être **151** et **152** (**Tableau 31**).

Composé	hAChE-VX			hAChE-sarin		
	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°	ΔG (kcal/mol)	Distance P-O (Å)	Pose n°
151	-9,8	5,5	1	-9,5	6,4	1
152	-10,1	5,6	1	-9,4	7,5	1

Tableau 31 : Résultats des études d'amarrage moléculaire des composés 151 et 152 sur l'AChE phosphorylée par le VX et le sarin, réalisées à l'IRBA

En ce qui concerne la réactivation de l'AChE par les MTDA **63** et **66**, leur faible hydrosolubilité compromet la réalisation des tests *in vitro* et *in vivo*, qui n'ont pas pu être réalisés pour **63**, malgré l'utilisation de DMSO et de Cremophor® pour aider à la solubilisation. Les tests *in vitro* vont être tentés dans les mois prochains pour le composé **66**.

Face à ces problèmes d'hydrosolubilité, il semble, selon les tendances observées avec les outils de simulation que la substitution de l'urée en position 4 augmenterait significativement la solubilité significativement. Mais il n'est pas possible de savoir si cela serait suffisant. De plus il est probable que ces composés analogues n'aient pas plus d'effet sur les nAChRs que les composés **63** et **66** substitués en position 6. L'approche avec un bras espaceur paraît donc à ce stade la plus raisonnable pour pouvoir

obtenir des preuves de concept de MTDA, en considérant l'hydrosolubilité comme un critère rédhibitoire, car les structures des modulateurs allostériques sont en en grande majorité lipophiles.

CONCLUSION GENERALE

1. RESULTATS

Devant la menace que représentent toujours les agents neurotoxiques organophosphorés chez les populations civiles et militaires, la recherche de remèdes plus efficaces perdure, car les réactivateurs de l'acétylcholinestérase historiques, dont les meilleurs sont le HI-6 et l'obidoxime, souffrent de défauts rédhibitoires. Notamment, dû à un faible passage de la BHE, ces molécules ne peuvent réactiver les cholinestérases centrales, conduisant ainsi à d'éventuelles séquelles neurologiques importantes selon le degré d'intoxication. En outre, les pyridiniums aldoximes ne présentent pas d'efficacité à large spectre, en protégeant notamment plus faiblement contre le sarin et surtout contre le tabun. Malgré plusieurs dizaines d'années de recherche, aucun autre réactivateur développé jusqu'à maintenant ne présente une efficacité thérapeutique à la fois supérieure et à plus large spectre que les bis-pyridiniums aldoximes de référence.

Il y a une dizaine d'années, notre équipe de chimie bio-organique a initié des projets portant sur le développement de nouvelles fonctions réactivatrices et de nouveaux réactivateurs non chargés capables de traverser efficacement le BHE afin de réactiver les cholinestérases du SNC. Ces travaux ont permis d'identifier la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime qui présente de très bonnes cinétiques de réactivation. En se basant sur ces résultats, et afin d'augmenter l'affinité de cette fonction avec l'enzyme inhibée, la stratégie mise en place consiste à associer cette fonction à un ligand connu des cholinestérases via un bras espaceur de 3, 4 ou 5 atomes.

Guidés par des études d'amarrage moléculaire, les structures envisagées de ces nouveaux réactivateurs permettraient, à la fois, la formation d'un complexe stable de Michaelis-Menten entre le réactivateur et l'enzyme, avant la réaction de réactivation (assurant une bonne affinité avec l'enzyme inhibée), ainsi qu'un positionnement optimal de l'oxime dans le site catalytique de l'enzyme (assurant ainsi une proximité et une bonne orientation vers la sérine phosphorylée). Cette stratégie a fait ses preuves, notamment avec des ligands cycliques aminés, qui permettent à ces réactivateurs de traverser efficacement la BHE tout en possédant, grâce à l'amine tertiaire, l'hydrophilie nécessaire à leur hydrosolubilité. Ils présentent ainsi des efficacités de réactivation à large spectre *in vitro* sur l'AChE, supérieures à celles des réactivateurs de référence pour une partie significative d'entre eux, en particulier pour le tabun. Ces travaux menés notamment par la Dr. Anissa Braïki nous ont amené à opérer une sélection parmi ces molécules pour tester les plus prometteuses *in vivo*.

Mon premier objectif était donc de synthétiser en quantité importante (au minimum quelques centaines de milligrammes) trois de ces réactivateurs parmi les 8 sélectionnés pour ces tests *in vivo*, avec une pureté LC/MS supérieure à 95% (**Figure 113**) : le **RM048**, l'**AB745** et l'**AB647**. Les 5 autres composés sélectionnés ont été préparés par les Dr. Nicolas Probst et Dr. Julien Gasnot, stagiaires post-doctorants au laboratoire.

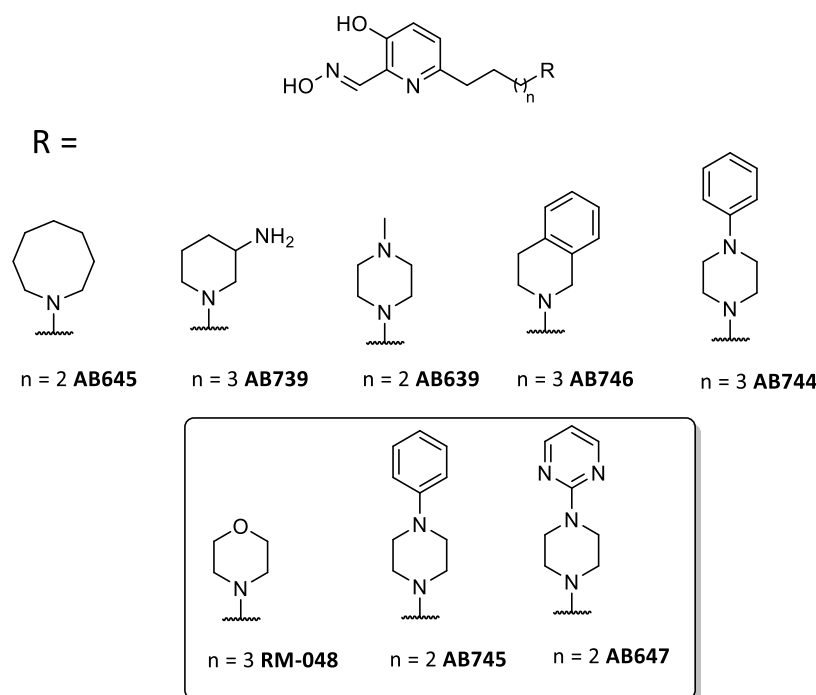
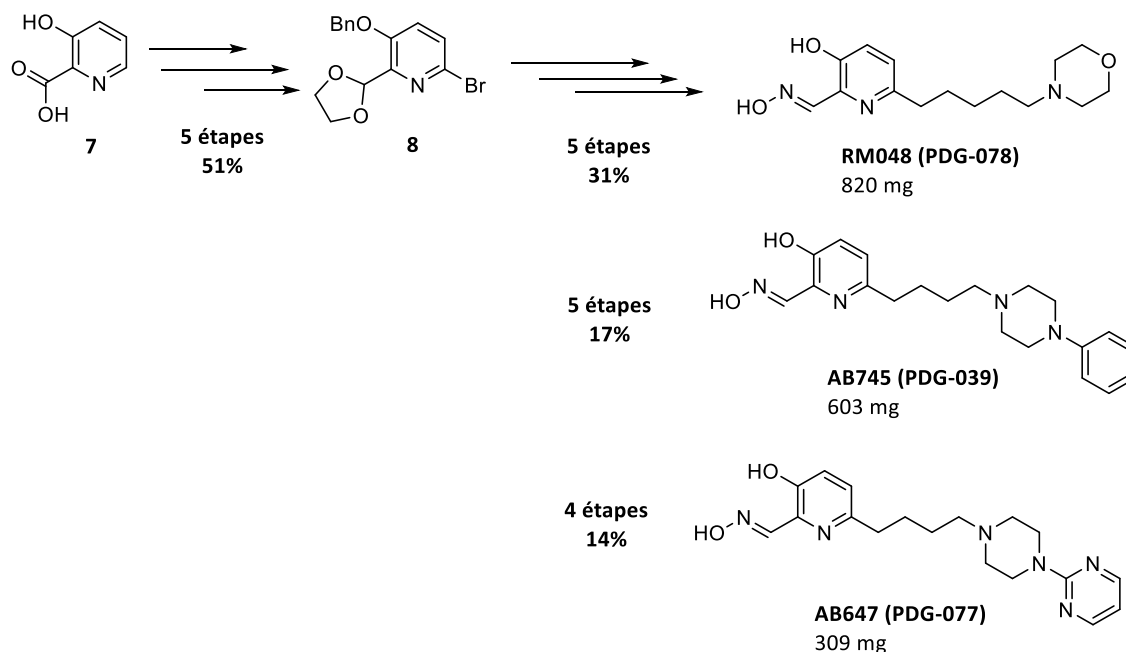


Figure 113 : Réactivateurs sélectionnés pour les tests *in vivo*

Ces synthèses ont été réalisées à partir de l'intermédiaire **8**, synthétisé à l'échelle de plusieurs dizaines de grammes en 5 étapes avec un rendement global de 51% (**Schéma 59**). Cet intermédiaire avancé présente l'avantage de servir d'intermédiaire commun à de nombreuses autres synthèses de réactivateurs, dont celles des composés MTDAs antagonistes des nAChRs (**26, 27, 28, 29**).

Les réactivateurs ont ensuite été synthétisés en 4 ou 5 étapes supplémentaires, permettant d'obtenir tout d'abord le **RM048** en grandes quantités (820 mg) avec un rendement global de 31% à partir du composé **8**. Le **AB745** a été obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 17% et le **AB647** en 4 étapes avec un rendement global de 14%. Le **RM048** a également été formulé sous forme de sel de chlorhydrate (HCl), de mésylate (MeSO₃H), d'hexafluorophosphate (PF₆⁻) et de bis(trifluorométhylsulfonyl)imide (NTf₂⁻), ce dernier n'étant pas suffisamment soluble dans l'eau malheureusement.



Schema 59 : Voies de synthèse des réactivateurs RM048, AB745 et AB647

L'équipe de l'IRBA a alors pu déterminer pour le **RM048 MeSO₃H** une DL₅₀ de 750 µmol/kg et une NOAEL (dose sans effet nocif observable) de 166,7 µmol/kg, sur des souris. Les indices de protection ont aussi été mesurés, d'abord avec une dose de 100 µmol/kg de réactivateur sans atropine, puis à la dose NOAEL avec 3mg/kg de sulfate d'atropine, ce qui permet d'être au plus proche des conditions cliniques réelles (**Tableau 32**).

Parmi les autres réactivateurs sélectionnés et testés (voir **Figure 113**) le **RM048** reste le composé phare de notre équipe en étant très efficace contre le VX et le paraoxon, de façon similaire à l'obidoxime. De plus, il protège mieux contre le sarin que ce dernier mais pas autant que le HI-6. Il offre également une légère protection contre le tabun. Il a également été prouvé qu'il passe efficacement la BHE.

Sulfate d'atropine (3 mg/kg) avec :		VX	Sarin	Tabun	Paraoxon
∅		0,97	1	0,91	1,62
100 μmol/kg	2-PAM	1,82	1,49	0,95	7,1
	Obidoxime	20,91	1,82	2,42	22,44
	HI-6	34,53	4,72	1,69	7,59
	AB639 TFA	4,04	1,36	1,36	7,26
	AB645 TFA	8,42	1,82	1,36	8,7
	AB746 TFA	4,14	1,82	1,24	6,77
NOAEL	HI-6	25,21	3,63	nd	7,59
	RM048 MeSO ₃ H	16,82	2,86	1,4	18,2

Tableau 32 : Indices de protection des réactivateurs en combinaison avec de l'atropine à 3 mg/kg à une dose de 100 μmol/kg ou à leur NOAEL pour le HI-6 et le RM048 MeSO₃H sur des souris intoxiquées par différents OPs. TFA : sel de trifluoroacétate

La formulation du réactivateur influence significativement la protection. En effet, le **RM048 MeSO₃H** protège deux fois plus que le **RM048** neutre contre le paraoxon et il s'agit de la formulation la plus protectrice parmi toutes celles testées. Cette observation est cohérente avec les analyses de pharmacocinétique qui montrent que le sel de mésylate possède les meilleures propriétés à ce niveau. C'est pourquoi le sel de mésylate a ensuite été choisi en première intention pour la formulation de nombreux autres antidotes, mais il sera intéressant de faire de telles études de formulation pour les composés phares, dans le but d'améliorer leur efficacité via leur pharmacocinétique. C'est notamment un facteur important pour les **AB745** et **AB647** dont la formulation sous forme de sel de trifluoroacétate n'a pas permis une bonne solubilisation dans les solutions salines utilisées *in vivo*. C'est pourquoi leur reformulation sera effectuée.

Certains réactivateurs de cette famille ont présenté un caractère antagoniste sur les récepteurs nicotiques (nAChR), qui, à l'instar des récepteurs muscariniques (mAChR), sont hyperstimulés par l'accumulation d'acétylcholine lors d'une intoxication aux OPs. Alors que ces derniers sont efficacement traités par de l'atropine, ce qui provoque un effet synergique très favorable en combinaison avec un réactivateur, les nAChRs demeurent une cible biologique non traitée. Pourtant, la régulation de leur activité pourrait permettre un meilleur taux de survie car ils sont impliqués dans

le processus de respiration aux niveaux somatique et central. Leur régulation permettrait également de limiter les séquelles neurologiques à long terme du SNC, car leur hyperactivité cholinergique est impliquée dans les processus menant à ces désordres neurologiques, et potentiellement aussi grâce à leur rôle dans la gestion de l'inflammation, présente au niveau du SNC après une intoxication.

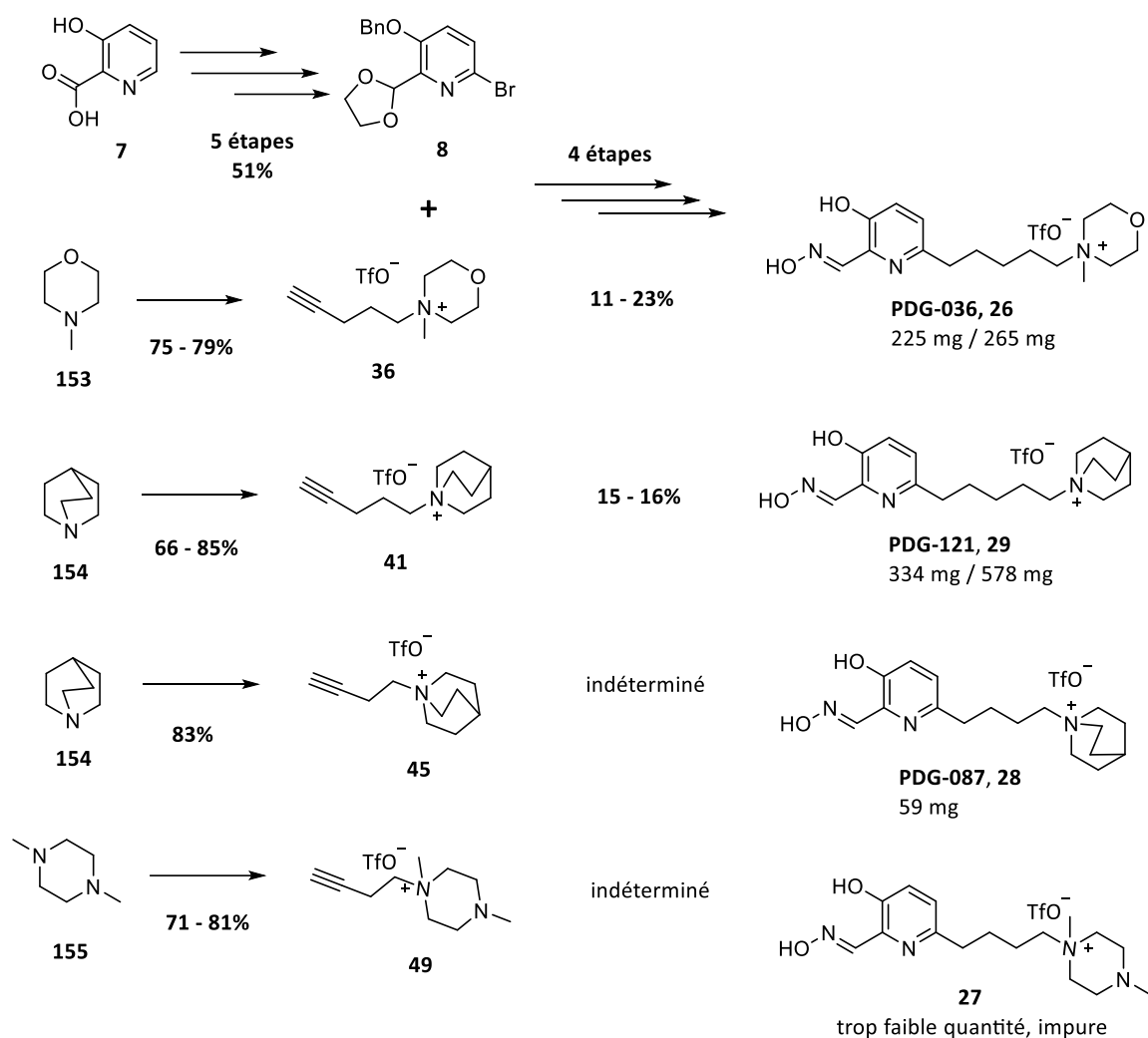
Mon deuxième objectif était donc de synthétiser des composés multi-cibles pouvant à la fois réactiver l'AChE et présenter un effet antagoniste sur les nAChRs. Pour cela, un ligand comportant un ammonium quaternaire devait être lié à la fonction réactivatrice, car ce motif, mimant la structure du ligand naturel ACh, peut interagir avec le site orthostérique des nAChRs et est connu pour être un motif récurrent des antagonistes compétitifs des nAChRs.

Cela a été réalisé en quaternarisant par méthylation l'amine tertiaire présente sur les ligands des réactivateurs non-chargés déjà développés dans l'équipe (**RM048** et **AB639**), pour espérer potentialiser leur caractère antagoniste précédemment observé (composés **26** et **27**, **Schéma 60**). Le motif quinuclidinium, connu également pour ses effets antagonistes sur les nAChRs, a aussi été choisi, donnant ainsi accès aux MTDA **28** et **29**.

Cette charge, bien qu'elle puisse compromettre le passage de la BHE, pouvait d'un autre côté améliorer l'hydrosolubilité de ces composés ainsi que leur pharmacocinétique. La simulation de leurs propriétés *in silico* : passage de la BHE, hydrosolubilité, pKa de l'oxime, affinité et positionnement dans le site actif de l'AChE par étude d'amarrage moléculaire (montrant des interactions favorables de type cation- π entre les ligands ammoniums et les résidus aromatiques du site actif de l'AChE) nous ont paru suffisamment favorables pour procéder à la synthèse de ces MTDA.

Leur synthèse a été réalisée suivant la voie convergente précédemment utilisée, pour obtenir des quantités très satisfaisantes (**Schéma 60**) des MTDA **26** et **29**, avec un rendement global sur 4 étapes à partir de **8** de respectivement 23 et 16%.

La synthèse des MTDA **27** et **28** s'est avérée plus délicate à cause d'une moins bonne stabilité des motifs **45** et **49** en conditions basiques lors des réactions de couplage de Sonogashira (plus prononcée sur **49**). Le MTDA **28** a malgré tout pu être obtenu en quantité suffisante (59 mg) pour les différents tests biologiques. En revanche, en raison de purifications plus difficiles dûes à une plus forte polarité et hydrophilie des intermédiaires de synthèse de **27**, celui-ci n'a pas pu être obtenu assez pur (pureté LC/MS > 95%) et en quantité suffisante.



Schema 60 : Voies de synthèse des MTDAs 26, 27, 28 et 29

Les tests *in vitro* de réactivation menés à l'IRBA sur l'AChE phosphylée par le VX, le sarin, le tabun et le paraoxon présentent de bons résultats pour les trois MTDAs **26**, **27** et **28**. Le composé **26** démontre une réactivation efficace à large spectre. D'autre part, le passage d'un bras espaceur de 5 à 4 carbones entre les composés **29** et **28**, améliore de manière spectaculaire les résultats pour **28**, avec une bonne efficacité de réactivation contre le VX et le sarin et une efficacité exceptionnelle contre le paraoxon et le tabun, ce dernier formant pourtant l'un des adduits les plus difficiles à réactiver en raison de son encombrement stérique.

En outre, le MTDA **26** réactive très efficacement la BChE phosphylée par le paraoxon tandis que le MTDA **29** réactive bien la BChE phosphylée par le VX. Mais surtout, le composé **28** réactive à nouveau très efficacement la BChE phosphylée par le VX, le sarin et le paraoxon. Ces bons résultats du composé **28** viennent en particulier d'une très bonne affinité envers le site actif phosphylé des deux cholinestérases. Dans le même temps, les IC_{50} du composé **28** mesurées sur les enzymes natives (12

μM pour l'hAChE, $136 \mu\text{M}$ pour l'hBChE) montrent des affinités a priori suffisamment faibles pour limiter les risques d'inhibition aux doses thérapeutiques. Un ligand à l'encombrement stérique important comme la quinuclidine paraît donc être un choix pertinent pour agir sur les deux cholinestérases, la BChE possédant un site actif plus volumineux que celui de l'AChE. Les structures des composés **26**, **27** et **28** ont d'ailleurs été intégrées à un brevet développé par notre équipe et nos collaborateurs, intitulé « BUTYRYLCHOLINESTERASE REACTIVATORS », dont je suis co-inventeur.

Les résultats de ces trois MTDA sont aussi satisfaisants sur les tests d'électrophysiologie menés au CEA, avec un effet antagoniste sur les nAChRs $\alpha 7$ légèrement accentué pour **26** par rapport au **RM048** avec une IC_{50} de $10,9 \mu\text{M}$ contre $15,5 \mu\text{M}$ pour le **RM048**, et avec une inhibition totale intervenant à une concentration inférieure à $100 \mu\text{M}$ pour **26** et largement supérieure à $100 \mu\text{M}$ pour le **RM048**. Là aussi le bras espaceur plus court du composé **28** lui permet d'avoir un effet plus important que son analogue **29** avec une bonne IC_{50} de $5,4 \mu\text{M}$, contre $16,1 \mu\text{M}$ pour **29**. En outre, le motif quinuclidinium montre à nouveau un caractère universel en permettant au MTDA **28** d'avoir un effet antagoniste encore plus important sur les nAChRs musculaires avec une IC_{50} de $0,56 \mu\text{M}$, tandis que **26**, comportant un motif morpholinium, n'a aucun effet sur ces nAChRs.

Les effets de tous ces composés sont de plus liés à l'association de la fonction réactivatrice avec ces ligands car la fonction réactivatrice seule n'a démontré que de faibles effets sur le nAChR $\alpha 7$ dans les concentrations testées. Enfin, les affinités pour les différentes cibles biologiques ne montrent pas d'écarts largement supérieur à un facteur 10, ce qui favorise leur action multi-cibles.

Les MTDA **26** et **28** ont été sélectionnés pour être testés *in vivo* à l'IRBA. Le composé **26** va ainsi être testé dans les mois prochains. L'utilisation de la dose NOAEL pourrait être encore plus intéressante pour ce type de composé, pour prendre en compte les potentiels effets secondaires apportés par les effets antagonistes sur les nAChRs, bien que ce soit moins problématique pour les nAChRs neuronaux que pour les nAChRs musculaires.

En effet le dosage délicat de tels antagonistes compétitifs est le facteur limitant ayant empêché de développer plus avant l'utilisation de tels composés dans le contexte d'une intoxication aux OPs. Pour réduire ces problèmes de dosage, et pour comparer l'efficacité de différentes voies de régulation de l'activité des nAChRs dans le cas d'une intoxication aux OPs, les modulateurs allostériques de ces récepteurs ont été considérés. Mon troisième et principal objectif était donc de sélectionner les types de modulateurs allostériques et les structures précises à partir desquelles concevoir et synthétiser des MTDA ayant la capacité de réactiver l'AChE phosphorylée et de moduler l'activité des nAChRs. L'étude bibliographique montre que les PAM, en particulier de type II, semblent intéressants car ils

augmentent l'intensité du signal cholinergique, dont la transmission est drastiquement réduite dans le cas d'une intoxication. Les PAM de type II peuvent de plus resensibiliser les nAChRs désensibilisés par la stimulation prolongée de l'acétylcholine. Cependant, l'ouverture prolongée des nAChRs pourrait empêcher la cellule post-synaptique de se repolariser ou pourrait provoquer un afflux trop important et néfaste de Ca^{2+} dans la cellule. Ces effets pourraient être contrebalancés par l'apparition au bout d'un certain temps d'un état désensibilisé insensible au PAM de type II, mais cela limiterait ainsi la durée d'action de ces PAM. Ces questions demeurent ouvertes dans le cas d'une intoxication par des OPs. Les NAM sont aussi des composés intéressants car ils limitent l'intensité du signal cholinergique sans que leur effet soit autant lié aux effets de concentration que les antagonistes compétitifs.

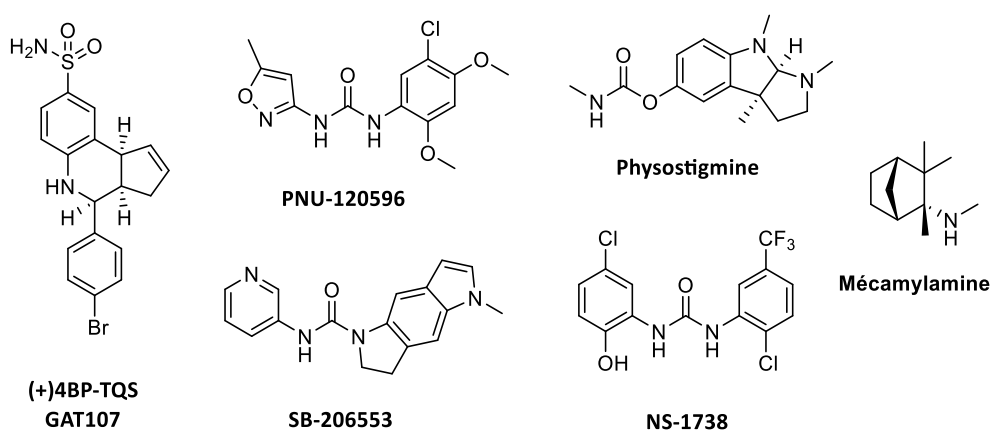
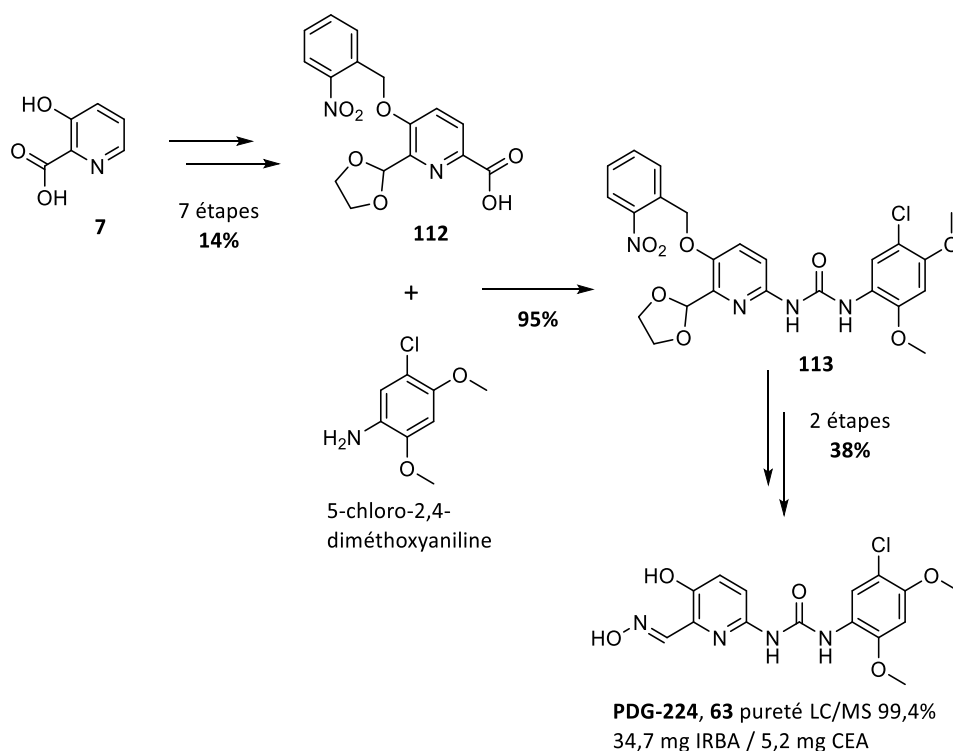


Figure 114 : modulateurs allostériques sélectionnés pour concevoir des composés multi-cibles à partir de leurs structures

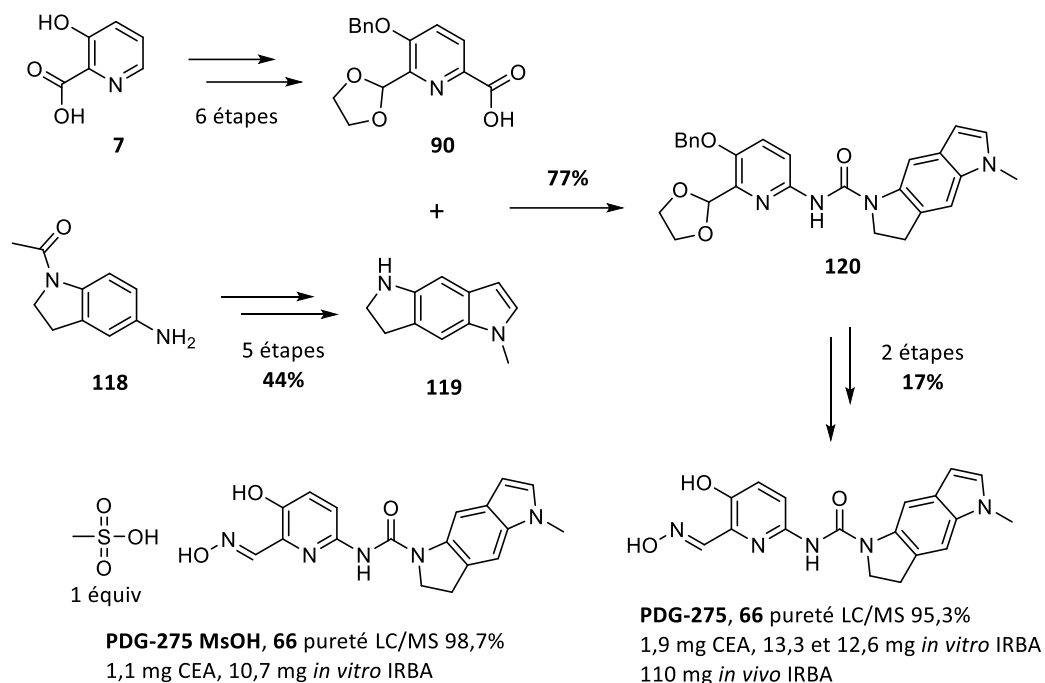
Parmi ces deux types de modulateurs allostériques, les PAM de type II GAT107, PNU120596 et SB-120596, le PAM de type I NS1738, et les NAM physostigmine et mécamylamine ont démontré des effets significatifs sur les nAChRs autant *in vitro* que *in vivo* et possèdent des structures pouvant former des interactions favorables avec le site actif de l'AChE (**Figure 114**). Ils ont donc été sélectionnés pour concevoir des composés multi-cibles à partir de leur structure, sans pour autant connaître la nature des interactions de ces ligands avec les nAChRs (pharmacophores associés), ce qui représentait le défi de ce projet. Les composés multi-cibles **63** et **66**, intégrant la structure de la fonction réactivatrice avec celles des PAM PNU-120596 et SB-120596, et le composé **67**, combinant la fonction réactivatrice avec la structure de la physostigmine, ont finalement été choisis car leurs structures permettaient un meilleur passage de la BHE selon les études *in silico*, et permettaient de concevoir des voies de synthèse semblables pour les trois composés multi-cibles. Ces voies de synthèse étaient en effet toutes basées sur l'étape clé de formation du bras espaceur urée entre la fonction réactivatrice et le motif provenant de la structure originelle du modulateur allostérique. Les composés **63** et **66** ont de plus

démontré par étude d'amarrage moléculaire de très bonnes énergies de stabilisation dans le site de l'AChE phosphorylée, avec la formation d'interactions favorables de type π -stacking.



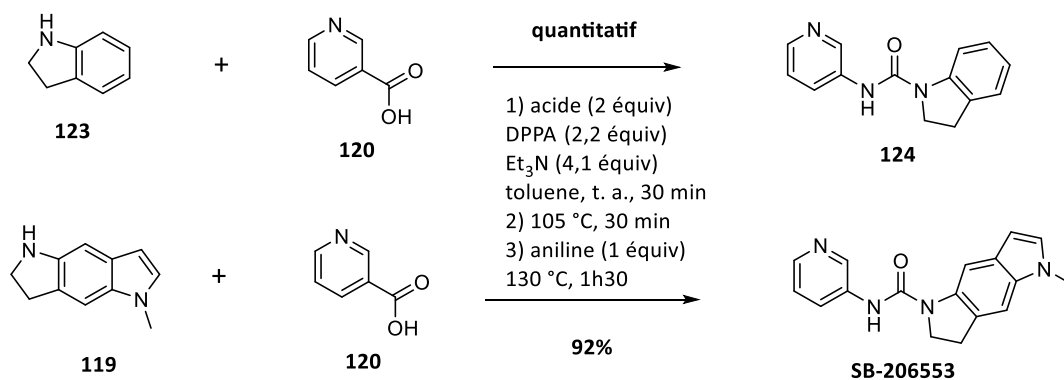
Schema 61 : Voie de synthèse du MTDA 63

Pour la synthèse du MTDA **63**, la protection du phénol de la fonction réactivatrice ne pouvant être réalisée avec une fonction éther benzylique simple, se déprotégeant par hydrogénolyse, une fonction éther benzylique avec un groupe 2-nitrobenzyle a été choisie car elle permet un photoclivage sous irradiation UV (**Schéma 61**). Celle-ci a cependant modifié la polarité et les propriétés de solubilité des intermédiaires de synthèse, ce qui a demandé des optimisations des purifications par chromatographie et une étape supplémentaire pour pouvoir réduire la fonction ester en aldéhyde. Après la réaction d'hydroxycarbonylation pallado-catalysée permettant d'ajouter la fonction acide carboxylique sur le noyau pyridine, par génération *in situ* de gaz CO, l'intermédiaire **112** a été obtenu en 7 étapes avec 14% de rendement global. Comme pour les synthèses des deux autres composés, l'azidation de l'acide carboxylique **112**, son réarrangement de Curtius *in situ* en isocyanate et la formation consécutive de l'urée **113** par addition nucléophile de l'aniline s'est faite avec un excellent rendement. Les déprotections du phénol et de l'aldéhyde ont demandé une optimisation mais ont été réalisées one pot et le composé **63** a pu être obtenu avec 38% de rendement en deux étapes à partir de **113**. Le PNU-120596 a également été synthétisé en une étape avec 82% de rendement.



Schema 62 : Voie de synthèse du MTDA 66

Pour la synthèse du MTDA **66** (Schéma 62), le composé **8**, obtenu en 5 étapes à partir de **7** avec 51% de rendement, a pu être utilisé pour obtenir l'acide carboxylique **90** à l'échelle du gramme grâce à la réaction d'hydroxycarbonylation. L'autre fragment **119** a également été obtenu à l'échelle du gramme après 5 étapes de synthèse avec 44% de rendement global. L'étape d'azidation et de réarrangement *in situ* de l'acide carboxylique **90** en isocyanate, suivi de la formation de l'urée par addition de l'aniline **119**, s'est faite avec un bon rendement. Le composé final **66** a ensuite été obtenu en deux étapes avec un rendement global de 17% à partir de **120**. Cependant, la déprotection de l'acétal a nécessité un suivi UHPLC qui a mené, au regard de la dégradation du produit au cours de la réaction, à faire la formation one pot de l'oxime une fois l'aldéhyde déprotégé.



Schema 63 : Synthèse du SB-206553 et de l'analogue 124

Le SB-206553 a aussi été synthétisé en une étape à partir du composé **119** avec 92% de rendement, ainsi qu'un analogue plus simple **124**, quantitativement (**Schéma 63**).

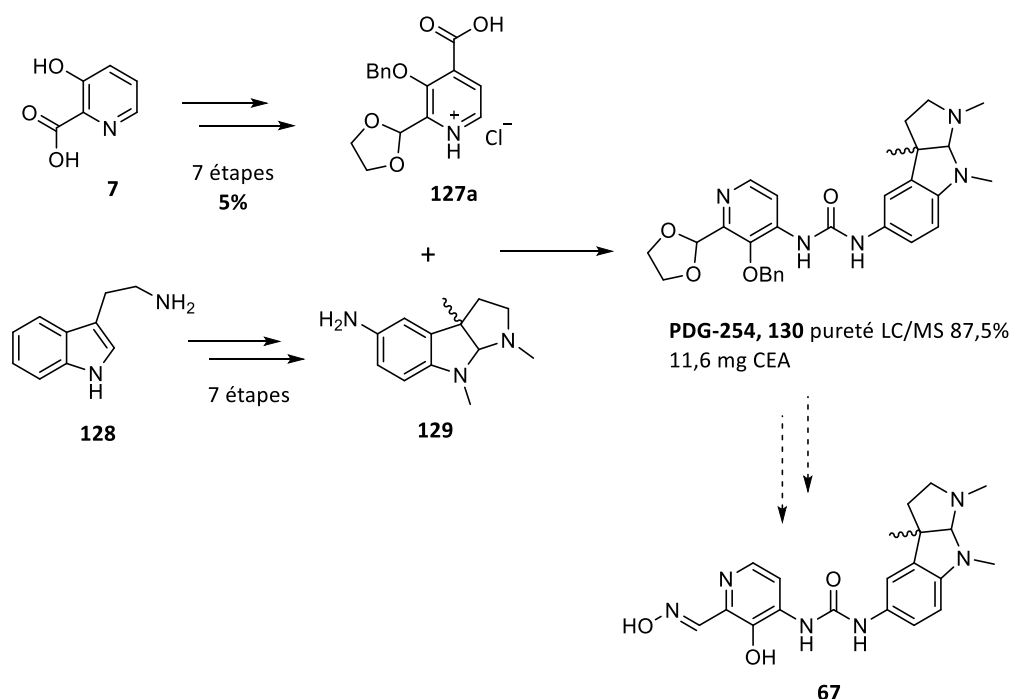


Schéma 64 : Voie de synthèse prévue pour le MTDA 67

Pour la synthèse du MTDA **67** (**Schéma 63**), les deux fragments **127a** et **129** ont été obtenus en 7 étapes, avec un rendement global de 5% pour **127a**, qui ont nécessité des ajustements dans l'ordre des différentes réactions par rapport aux synthèses rapportées initialement dans la littérature. La formation de l'urée **130** s'est là aussi faite sans difficulté, mais sa purification a été plus délicate. Malheureusement les différentes conditions d'hydrogénolyse testées sur le composé **130** n'ont pas permis de déprotéger le phénol efficacement et sans réaction secondaire, ce qui n'a pas permis d'obtenir *in fine* le MTDA désiré **67**. Le composé **130** a malgré tout été envoyé au CEA pour vérifier si les propriétés de type NAM de la physostigmine étaient conservées avec ce produit.

Selon des tests *in vivo* menés à l'IRBA, les modulateurs allostériques, dont les PAM PNU-120596 et SB-206553 synthétisés ici, ainsi que les NAM mécamylamine et méthyllycaconitine, semblent, en combinaison avec le réactivateur 2-PAM et du sulfate d'atropine, augmenter les indices de protection de la combinaison 2-PAM + sulfate d'atropine seule. Ces observations intéressantes sont cependant à confirmer.

Malheureusement, le composé **63** n'a pas pu être testé *in vitro* ou *in vivo* en raison d'une trop faible hydrosolubilité, et malgré l'utilisation d'un tensioactif. La solubilisation aqueuse du composé **66** s'annonce aussi délicate pour les tests prévus dans les prochains mois. La lipophilie de ces composés

s'avère trop élevée, d'autant que le DMSO ne peut être utilisé qu'en très petite quantité (0,1 % au final) pour les solubiliser pour les tests *in vitro*, car ce solvant inhibe fortement l'AChE.

Enfin, les tests d'électrophysiologie menés au CEA ont montré que ces deux composés n'ont pas montré d'effet sur les nAChRs $\alpha 7$ et musculaires à 10 μM avec une co-application d'ACh à 50 μM , ni avec l' $\alpha 4\beta 2$ pour le composé **66**. La modification de la structure opérée sur le SB-206553 et le PNU-120596 a donc modifié de façon trop importante une ou plusieurs interactions essentielles de ces composés avec les nAChRs, qui leur permettait d'avoir un effet PAM sur ceux-ci. De même l'effet PAM produit par le composé **124** sur le nAChR $\alpha 7$ est au minimum drastiquement réduit par rapport à l'effet produit par le SB-206553, le motif indolique du SB-206553 est donc aussi nécessaire. Une plus grande conservation de leur motif originel serait donc nécessaire pour ces modulateurs allostériques, mais peut sembler incompatible avec une bonne hydrosolubilité du composé multi-cible final, notamment si la liaison avec la fonction réactivatrice s'effectue avec un bras espaceur.

2. PERSPECTIVES

En l'état, le RM048 reste le meilleur réactivateur *in vivo* et une publication est en cours d'écriture pour présenter les propriétés de ce réactivateur. Nous attendons les résultats *in vivo* de tous les autres réactivateurs neutres sélectionnés pour réaliser une comparaison et déterminer plus précisément ce qui permet à nos réactivateurs d'être plus ou moins efficaces, ainsi que les meilleures structures.

En ce qui concerne la synthèse de ces réactivateurs neutres, tout comme celle des MTDA **26** à **29**, deux optimisations peuvent être apportées. Il est apparu que la purification par chromatographie après l'étape d'hydrogénolyse/réduction n'était généralement pas nécessaire. De plus, le protocole employé pour l'étape de déprotection de l'acétal dans la synthèse du MTDA **66**, qui permet cette déprotection avec du PPTS (pyridinium paratoluenesulfonate) et qui est suivie de la formation one pot de l'oxime, pourrait être avantageusement généralisée pour diminuer d'une étape la synthèse, en utilisant un solvant miscible à l'eau plus pratique que le DMSO. A partir de l'hydrogénolyse, on passerait ainsi de trois étapes avec trois purifications par chromatographie, à deux étapes avec une seule chromatographie. Enfin, pour éviter la formation du produit secondaire résultant de l'ouverture de l'acétal durant l'étape d'hydrogénolyse, celle-ci devrait systématiquement se faire sous pression.

Pour la synthèse des MTDA possédant un ligand ammonium et un bras espaceur de 4 carbones, les conditions du couplage de Sonogashira devraient être optimisées en étudiant notamment la nature de la base employée, pour réduire la dégradation observée pendant celle-ci.

Dans le cas du MTDA **27**, la forte hydrophilie nécessite des purifications en phase inverse lors des dernières étapes de synthèse et s'avèrent très délicates. La voie de synthèse développée par Gorecki *et al.*⁴⁶⁹ pourrait donc être tentée, car, bien qu'elle comporte un plus grand nombre d'étapes, le ligand chargé responsable de cette hydrophilie ne serait ajouté qu'à la dernière étape, ce qui pourrait limiter les pertes aux étapes intermédiaires.

Les résultats obtenus sur ces MTDA antagonistes des nAChRs ouvrent plusieurs perspectives. Dans un premier temps, les résultats *in vivo* du composé **26**, analogue chargé du RM048, permettront de voir si l'amélioration des résultats *in vitro* observée par rapport au RM048 se confirme *in vivo*, et si cela est dû à la seule réactivation des cholinestérases, ou bien aussi à une amélioration de sa pharmacocinétique et l'accentuation de son antagonisme pour le nAChR $\alpha 7$.

De plus, comme un bras espaceur de 4 carbones a montré une amélioration impressionnante des résultats *in vitro* de réactivation du MTDA **28** par rapport au composé **29** (bras de 5 carbones), l'analogue du composé **26** avec un bras espaceur de 4 carbones pourrait être synthétisé pour vérifier une telle amélioration.

L'observation la plus importante semble en revanche les propriétés apportées par le ligand quinuclidinium qui semblent idéales pour répondre à notre cahier des charges, et que les résultats obtenus semblent confirmer. Ce motif associe en effet l'hydrophilie apportée par la charge positive, la lipophilie apportée par le bicyclic saturé, et enfin un encombrement stérique important. Cela permet à ce motif d'être un bon ligand des deux cholinestérases avec des interactions hydrophobes et cation- π , et son encombrement stérique augmente l'affinité pour le site actif plus volumineux de la BChE. Cette association de la charge positive et de la forte lipophilie lui permet aussi de se lier aux sites orthostériques à la fois des nAChRs neuronaux et des nAChRs musculaires. Enfin, au niveau du composé dans sa globalité, il permet un très bon équilibre entre les pré-requis opposés permettant le passage de la BHE et la bonne solubilité aqueuse.

Nous pensons donc que d'autres ligands du même type devraient être testés pour concevoir de nouveaux MTDA antagonistes des nAChRs. Mais tout d'abord, le positionnement du quinuclidinium pourrait également être reconsidéré, ainsi que le bras espaceur, en se fondant sur deux agonistes reconnus du nAChR $\alpha 7$: le PHA-543613 et le PNU-282967, et de l'antagoniste (R)-8d de l' $\alpha 7$ et de l' $\alpha 4\beta 2$ (**Figure 115**).^{449,579,580} En effet, pour ce dernier, l'ammonium est plus libre car il est seulement

substitué par un méthyle et non une chaîne alkyle, ce qui semble plus favorable à la liaison dans le site orthostérique, au vu des études d'amarrage faite par Arias *et al.* sur ce composé.⁴⁵² Le composé **156** pourrait en découler, avec un espacement similaire au composé **28** entre la charge et le noyau pyridine.

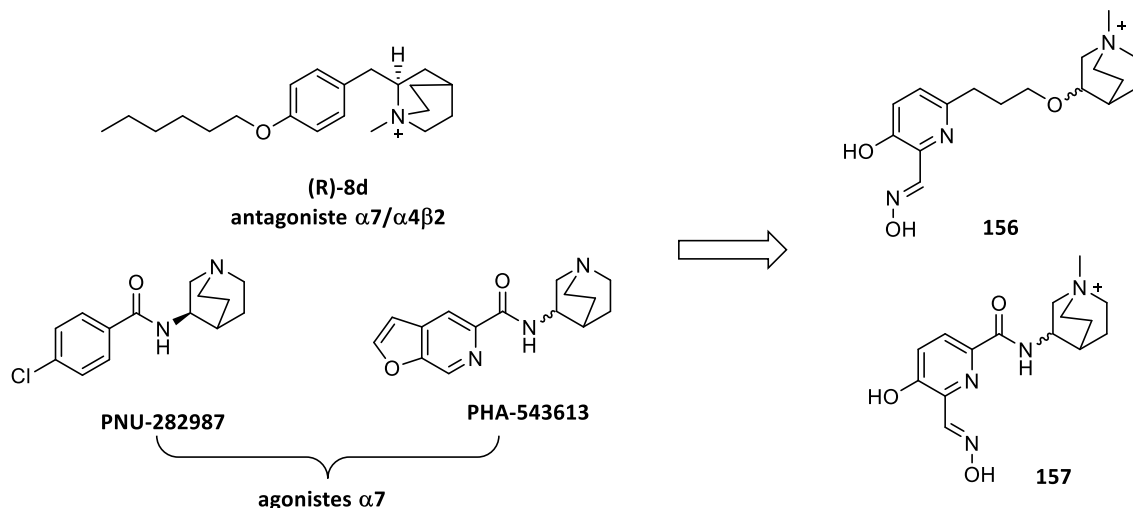


Figure 115 : antagoniste et agoniste des nAChR neuronaux et potentiels

Le lien amide pourrait aussi être utilisé pour lier le quinuclidinium à la fonction réactivatrice (composé **157**) comme dans la structure des deux agonistes, en particulier le PHA-543613.

Ensuite, d'autres bicycles azotés, tels que le pyrrolizidinium (**160** et **161**) ou celui des composé **158** et **159**, pourraient aussi être envisagés (Figure 116).

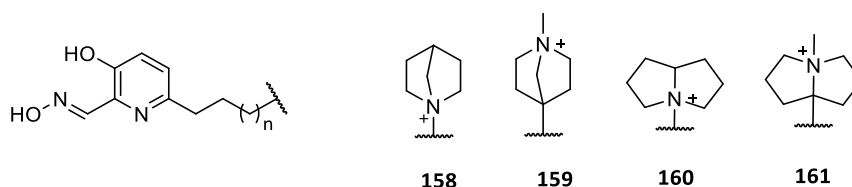


Figure 116 : Structures de potentiels MTDA ayant pour ligands un bicyclic azoté chargé

Cependant, de manière plus raisonnée, au moins deux autres ligands connus des nAChRs disposent dans leur structure d'un tel bicyclic azoté donc il serait possible de s'inspirer pour concevoir un MTDA : le médicament varénicline et l'épipatidine (Figure 117).^{581,582} De la varénicline pourrait être envisagés les ligands ammoniums de **162** et **163** et de l'épipatidine celui du composé **164**.

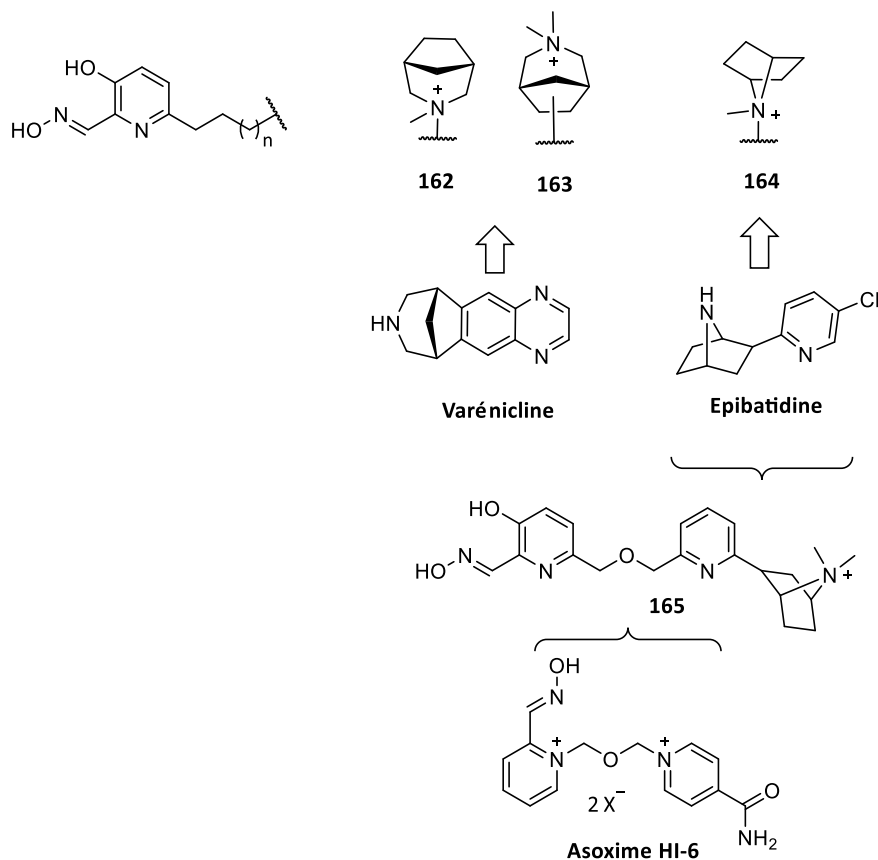


Figure 117 : Structures de potentiels MTDAs ayant pour ligands un bicyclic azoté, motif provenant de ligands des nAChR varenicline et épibatidine

La structure presque complète de l'épibatidine pourrait également faire office de ligand pour le composé **165** (avec quaternisation de l'azote pour l'effet antagoniste), avec un bras espaceur identique à celui des réactivateurs de référence, tel que le HI-6, entre les deux pyridines (pyridiniums pour les réactivateurs de référence).

Cependant, le mécanisme d'action de ces antagonistes compétitifs sur les nAChRs devraient être étudiés, en particulier si la liaison avec de tels motifs ammoniums quaternaires promeut un état désensibilisé du récepteur nicotinique ou un état de repos. Dans ce dernier cas le récepteur serait prêt à être activé par une molécule d'ACh lorsque l'antagoniste se retire du site orthostérique. Dans l'autre cas l'activation du récepteur deviendrait plus rare car la désensibilisation serait accentuée.

En l'état des connaissances il n'est pas évident de savoir quel mécanisme d'action serait le meilleur dans le cas d'une intoxication. Néanmoins il semble qu'une accentuation de l'état désensibilisé des récepteurs ne soit pas souhaitable puisque cet état provoque en partie la perte de transmission des influx cholinergiques après une trop longue activation par l'ACh qui s'accumule lors d'une intoxication aux OPs. C'est pourtant le mécanisme le plus probable de ces ammoniums quaternaires, car il a été

décrit que le quinuclidinium est un agoniste silencieux, c'est-à-dire un antagoniste promouvant l'état désensibilisé, celui-ci étant réceptif aux PAM de type II.⁴⁷⁸⁻⁴⁸⁰ Leur association avec un PAM de type II permet donc d'ouvrir le canal et transforme ces composés en agonistes. Cela pourrait donc avoir l'avantage de pouvoir potentiellement moduler l'activité de ces molécules : soit antagoniste, soit agoniste en présence d'un PAM de type II.

En ce qui concerne les modulateurs allostériques, les NAM ne présenteraient pas ces inconvénients potentiels et restent préférables pour agir de façon plus sûre sur les nAChRs, de même que les PAM. Cependant, comme nous l'avons vu, leurs structures sont très souvent lipophiles et posent des problèmes de solubilité. Une nouvelle revue de tous les NAM et PAM permettrait d'identifier d'autres modulateurs allostériques comportant des fonctions chimiques hydrophiles et pouvant avoir des interactions favorables avec les résidus du site actif de l'AChE. Malgré tout, les deux NAM sélectionnés dans cette thèse satisfont à ces critères : la physostigmine et la mécamylamine, grâce à leurs amines tertiaires.

La synthèse du MTDA **67** fondé sur la physostigmine devrait donc être finalisée, avec un potentiel protocole de débenzylation sans hydrogénolyse et compatible avec cette structure. D'autre part, des structures de MTDA fondées sur la mécamylamine ont déjà été imaginées et ont fait l'objet d'études d'amarrage moléculaire favorables : **151** et **152** (**Figure 118**). En plus de très nombreux sous-types de nAChRs, ces structures pourraient avoir le potentiel d'avoir une bonne affinité pour les deux cholinestérases car, comme la quinuclidine, le motif de la mécamylamine est un bicyclic azoté à l'encombrement stérique important.

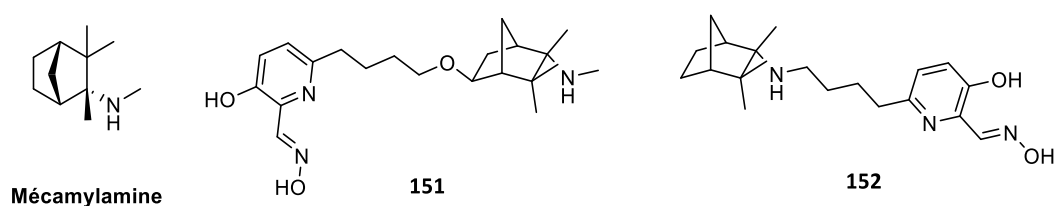


Figure 118 : Structures de MTDA potentiels basés sur la mécamylamine

PARTIE EXPERIMENTALE

1. BIOLOGY

1.1. *In vitro* evaluations

1.1.1. Blood-brain barrier permeability tests

1.1.1.1. Human Blood-brain barrier model setting up

The blood-brain barrier (BBB) permeability studies were performed using the *in vitro* human BBB model. After infant's parents signed informed consents, endothelial cells were isolated and differentiated from cord blood CD34⁺-hematopoietic stem cells according to the protocol described by Pedroso et al. and then freeze-dried. The preservation and preparation protocol of these cells issued from the human cord blood were approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH number DC2011-1321). After thawing within 100 mm petri dishes (Corning, VWR, Switzerland), the endothelial cells derived from human stem cells reached the confluency and were then subcultured onto matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, 354230) coated Transwell inserts in the presence of bovine pericytes seeded at bottom of the wells, on other side of Transwell inserts, to induce the properties of the BBB. Renewal of the medium [ECM basal medium (Sciencell, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% (v / v) fetal calf serum, 1% (v / v) EC growth supplement (Sciencell) and 50 µg / mL gentamycin (Biochrom AG, Berlin, Germany)] of the co-culture thus set up was carried out every other day. After six days under these culture conditions, the endothelial cells differentiated in human brain-like endothelial cells (hBLECs) reproduced characteristics of the *in vivo* BBB and are widely used to predict molecule toxicity and passage to the CNS.

1.1.1.2. Endothelial permeability coefficient evaluation

The permeability of the BBB to the different oximes and ¹⁴C D-glucose was evaluated by measuring the endothelial permeability coefficient (Pe) which represents the speed of diffusion through the BLECs monolayer. Human BLECs monolayers developed after 6 days of coculture were transferred into new plates containing 1.5 mL per well (abluminal compartment) of HEPES buffered-Ringer's solution (RH; 150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM NaCl₂, 0.2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 2.8 mM glucose, 5 mM HEPES). Medium in apical chambers (luminal compartment) was replaced by 0.5 mL of RH containing either RM048 or 2-PAM or HI-6 or obidoxime used as oximes control. All compounds were tested at 50µM (dose checked as non-toxic for the human BLECs) for a diffusion duration of an hour at 37°C.

Then the amount of each oxime in the luminal and abluminal compartments was measured by mass spectrometry with a TripleTOF 5600+ System (AB SCIEX, Concord, ON, Canada). Percentages of recovery were checked between 86 and 106%. The quantification of radiolabeled ^{14}C D-glucose (PerkinElmer, Boston, MA, USA) was performed using a scintillation counter TriCarb 2100TR (PerkinElmer, USA).

The clearance principle was used to calculate a concentration-independent permeability coefficient. The mean compound cleared volume was plotted against time, and the slope was estimated by linear regression. The permeability values of the inserts (PSf for inserts with a Matrigel™ coating only) and the inserts with hBLECs (PSt, Matrigel™-coated inserts + endothelial cells) were taken into consideration by applying the following equation: $1/P_{\text{Se}} = 1/P_{\text{St}} - 1/P_{\text{Sf}}$. To obtain the endothelial permeability coefficient (P_{e} expressed in cm/min), the permeability value (P_{Se}) was divided by the insert's membrane surface area (1.13 cm^2).

1.1.2. In vitro inhibition and reactivation

1.1.2.1. Chemicals.

VX, sarin and tabun have been supplied by DGA maîtrise NRBC (Vert le Petit, France). 2-PAM and HI-6 were from Pharmacie Centrale des Armées (Orléans, France) and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

1.1.2.2. Inhibition of hAChE

Stock solutions of OPNA at 5 mM in isopropanol were used to inhibit the purified hAChE. Briefly, a ten-fold excess of OPNA was used to perform the inhibition of hAChE in a sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4, 0.1% BSA) at 25°C. Complete inhibition of hAChE was monitored by measuring the residual activity with a modified Ellman assay and excess of OPNA were removed by using a desalting PD-10 column (GE Healthcare).

1.1.2.3. IC50 Measurements

Oximes were dissolved in water to make 40 mM stock solutions. Recombinant hAChE activity was measured spectrophotometrically at 25°C, monitoring the absorbance at 412 nm, in 1 mL of Ellman's buffer (0.5 mM DTNB, 0.1% BSA, 0.1 M phosphate, pH 7.4), in the presence of appropriate oxime concentrations. Measurements were performed at least in duplicate for each concentration tested.

Eq : 3

For the continuous method of recording OP-inhibited *hAChE* reactivation by oximes, the velocity of substrate hydrolysis (v) is proportional to the concentration of the reactivated *hAChE* and is expressed and derived as equation 4 and 5 respectively. v_t is the velocity at time t and v_0 represents the maximum velocity. Equation 5 was used to determine the k_{obs} by non-linear regression analysis for each individual oxime concentration with ProFit (Quantumsoft).

$$\text{Eq : 4} \quad v_t = v_0 (1 - e^{-k_{obs} t})$$

$$\text{Eq : 5} \quad -d[S] = \int_0^t v dt = v_0 t + \frac{v_0}{k_{obs}} (e^{-k_{obs} t} - 1)$$

1.1.3. Electrophysiology on nAChRs

1.1.3.1. Two-electrodes voltage clamp (TEVC) electrophysiology

TEVC electrophysiology was performed on *Xenopus laevis* oocytes. Laparotomy of *X. laevis* mature female frogs for oocyte extraction was performed according to the protocol APAFIS#5310–2016, 042,016,067,330 v3 approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation C2EA-59 of Paris Center-South. A female donor tagged with an electronic chip was anesthetized by immersion in a 1 g/l ethyl-3-amino benzoate methane sulfonate solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) for 20 min. Following a small incision below 5 mm of the termination of the sternum, the ovarian lobes were excised and immediately immersed in OR2 solution containing 88 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES 5; pH 7.6. The muscle and dermic planes were sutured and the amphibian was placed in a small aquarium for recovery and observation for 24 h. After three washes with OR2, the ovarian lobes were incubated in Barth's solution containing 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.5 mM NaHCO₃, 0.33 mM Ca(NO₃)₂; 7.5 mM Hepes (pH 7.6) at 18 °C.

TEVC electrophysiology was then performed on defollicularized oocytes having incorporated *T. marmorata* electrocyte membranes rich in embryonic muscular nAChR (α_1)₂ β 1 γ δ in their plasmatic membrane, after at least one day of incubation after the microinjection of the membranes, or expressing human α_7 nAChRs after a microinjection of mRNA and at least two days of incubation.

TEVC electrophysiology recordings were performed 1 to 4 days after microinjection using an OC-725B TEVC amplifier (Warner Instrument, Hamden, CT, USA). Voltage and current microelectrodes were filled with 3 M KCl (4–10 M Ω electrode resistance). ACh-evoked currents were acquired using a pCLAMP-9/ Digidata-1322A system (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The *Xenopus* oocyte was

constantly clamped at -60 mV and was perfused with Ringer-Barium containing 100 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.3 mM BaCl₂ and 5 mM HEPES (pH 7.4), at a flow rate of 8 ml/min.

1.1.3.2. Concentration – inhibition analysis of ACh Currents

Dose-response curves for agonist activation were fitted to Eq. (1):

$$I = I_{max} [L]^{nH} / (EC_{50} + [L])^{nH}$$

where I is the measured agonist-evoked current, [L] is the agonist concentration, EC₅₀ is the agonist concentration that evoked half the maximal current (I_{max}), and nH is the Hill coefficient.

For antagonist inhibition, current (I) values were normalized to the I_{max} ACh value recorded from the same oocyte to yield fractional (%) response data. IC₅₀ values were determined from dose-response curves by fitting to the Eq. (2):

$$F = 1 / [1 + ([X] / IC_{50})^{nH}]$$

where F is the fractional response obtained in the presence of the inhibitor at concentration [X] and IC₅₀ is the inhibitor concentration that reduced the ACh-evoked amplitude by half. Data was analyzed with Clampfit 10.2 (Molecular Devices) and GraphPad Prism 5.0.

1.2. *In vivo* evaluations

1.2.1. Ventilatory Effect Measurement Using Double-Chamber Plethysmography – NOAEL dose

Ventilatory parameters were recorded in a double-chamber plethysmograph (DCP, EMKA Technologies, Paris, France) according to the method described and validated by Nervo et al., [32]. Briefly, this system consists of two interconnected Plexiglas chambers, the head chamber, and the body chamber. The awake mouse is maintained in a conical tube with a small opening to allow the animal's muzzle to pass through. This restrainer is placed into the body chamber, the mouse's muzzle being in the head chamber so that there is no airflow between the two compartments. Each chamber is equipped with a pneumotachograph and a differential pressure transducer. The pneumotachograph ensures the air passages with the outside, while the differential pressure transducer measures the pressure differences between the atmosphere and the relevant compartment. There is a linear relationship between airflow and pressure difference. The mouse breathing leads to two distinct air flows which are simultaneously recorded: 1 - the nasal flow generated by the airflow in and out of the muzzle; and 2 - the thoracic flow generated by compression and expansion of air when the thorax rises

and falls. Both chambers are connected to a ventilation pump that removes carbon dioxide and moisture formed inside the chamber.

On the day of the experiment, DCP calibration was performed on two points, high value and a low value by injection of 20 mL and 0 mL of air (corresponding to no flow), respectively. The range of measures had to be included between ± 280 and ± 420 mL/s. The mouse was then placed in the device for a 5–10 min habituation session. Once its spontaneous breathing was calm and regular, the recording was started. The inspiratory time, the expiratory time, the tidal volume, the peak inspiratory flow, the peak expiratory flow, the duration of end-inspiratory pauses and end-expiratory pauses, and the specific airway resistance were continuously measured for 45–50 min using Iox[®] software (EMKA Technologies, Paris, France) and stored on a computer for subsequent analysis and calculation of additional parameters including the breathing frequency and the minute volume. The first 15 min of the recording corresponded to the physiological breathing of the mouse and were considered as an internal control. The mouse was then gently removed from the plethysmograph to receive an i.p. injection of RM048 MsOH and replaced thereafter in the device for the 30-min remaining measurements. Since two experiments were performed in parallel, the RM048 MsOH administration was delayed by 5 min between the first and the second mouse. We used the up-and-down method in beginning with a 0.5 LD₅₀ (375 μ mol/kg) and then in reducing this dose by a factor 1.5 twice and by a factor 1.1 several times to determine the RM048 MsOH dose considered as the “no observed adverse effect level” (NOAEL), when no more ventilatory effect was visually observed on the plethysmography traces by the experimenter. At the end of the experiment, the mouse was euthanized by an i.p. lethal injection of sodium pentobarbital (Doléthal[®], Vétoquinol SA, France).

1.2.2. LD₅₀ Estimation and Protective Index Using the Up-and-Down Method

LD₅₀ was estimated using the improved method of Dixon’s up-and-down procedure described by Rispin et al. This method uses an iterative dose-selection algorithm. It consists of a single ordered dose progression in which mice are dosed, one at a time, at 24 h intervals. The first animal receives a dose a step below the level of the best estimate of the LD₅₀. If the mouse survives, the dose for the next animal has increased by 1.1-fold the original dose; if it dies, the dose for the next animal is decreased by the same factor. In our particular conditions, the testing stops when one of the following criteria is met: (1) three consecutive animals survive at the highest dose (which is normally 2000 mg/kg); (2) five reversals occur in any six consecutive animals tested; (3) at least four animals have followed the first reversal and the specified likelihood-ratios which compare the maximum likelihood estimate for LD₅₀

with LD₅₀ values above and below exceed the critical value of 2.5. Profile likelihood methods are used to estimate confidence intervals. In practice, the stopping criteria, the resulting LD₅₀, and the corresponding confidence interval were determined using the AOT 425 Pgm software as recommended by OECD. The antidotal efficacy of the oximes is expressed as a protective index (PI) with 95% confidence interval. The PI corresponds to the ratio of LD₅₀ of the studied OP agent combined with oxime treatment (and with atropine sulfate and allosteric modulators where appropriate) on LD₅₀ of OP alone.

2. CHEMISTRY

2.1. Chemical and reagents

Unless otherwise need, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. When necessary, solvents were dried by standard procedures (THF: distillation over sodium benzophenone, triethylamine: distillation over KOH and storage over molecular sieve, tert-butanol : storage over 3 Å molecular sieve in powder). ACN, THF, toluene, dichloromethane and Et₂O were dried over alumina cartridges using a solvent purification system MBRAUN MB SPS-800®. HPLC gradient-grade THF, ACN and methanol were purchased from VWR. Mobile phases for preparative-HPLC were prepared with ultrapure water (18.2 MΩ.cm) provided by an osmosis unit Aquadem E500 from Veolia and a PURELAB® flex 1 system (Elga Veolia).

When necessary, reagents were dried in a desiccator containing the desiccant P₂O₅ under reduced pressure or warmed at a defined temperature under reduced pressure for some hours in using the desiccator Vacuo Temp from J.P Selecta.

TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp (254/365 nm) and by staining with vanillin, bromocresol green, KMnO₄, ninhydrin or 2,4-DNP.

2.2. Instruments

Microwave-assisted reactions were performed on a Monowave 300 from Anton Paar. Pressure hydrogenations were performed with a Tinyclave steel pressure reactor from Büchiglasuster.

Melting points were measured with a Stuart SMP30 melting-point apparatus.

2.2.1. Purification

Purification steps were performed using silica columns from Interchim (4, 12, 25, 40, 80 or 120 g), either SI-HP (high purification) columns with a particle size of 30 μm or SI-HC (high capacity) columns with a particle size of 15 μm . It was performed on automated flash purification devices : either Biotage (Simple UV detection) or Puriflash 430 from Interchim (diode array detector) or Combiflash nextgen 300 from Teledyne Isco (diode array detector).

Preparative purifications on inverse phase were performed on a Puriflash 4250 from Interchim (diode array detector). Aqueous fractions were freeze dried with an Alpha 2-4 LDplus device from Christ.

2.2.2. NMR

^1H , ^{13}C , ^{19}F , and ^{31}P NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 spectrometer machine operating at ambient probe temperature. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) and the residual solvent resonance peak was used as the internal standard respectively for ^1H NMR and ^{13}C NMR (CDCl_3 at 7.26 and 77.16 ppm ; $\text{DMSO}-d_6$ at 2.50 and 39.52 ppm ; MeOD at 3.31 and 49.0 ppm ; $\text{THF}-d_8$ at 1.72, 3.58 and 67.2, 25.3 ppm, CD_3CN at 1.94 and 118.26 ppm). In case of mixtures of deuterated solvents, the residual solvent peak of the major solvent was used as the internal standard. Coupling constant J values are expressed in Hertz (Hz). The following abbreviations are used to give the multiplicity of the NMR signals : s : singlet, d : doublet, t : triplet, q : quartet, quint : quintet, sext : sextuplet, hept : heptuplet, m : multiplet, br : broad signal, dd : doublet of doublet, dt : triplet of doublet ($J_t < J_d$), td : doublet of triplet ($J_d < J_t$) and so on. ^1H and ^{13}C NMR assignments were found with the help of COSY, HSQC and HMBC spectral analyses.

2.2.3. Chromatography analysis

TLC-MS (low resolution) was achieved using an Acquity QDa performance (ESI+, Waters) coupled with TLC interface Camay (Waters) with an ISM pump (isocratic, 180 $\mu\text{L}/\text{min}$ -1, ethanol/ formic acid as eluent, 100/0.1, v/v).

Analytical HPLC and UHPLC were performed on Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC systems including a diode array detector and using the Chromeleon CDS software.

Analytical UHPLC-MS was performed on a Thermo Scientific Vanquish UHPLC system (diode array detector) coupled to a Thermo scientific ISQ EC single quadrupole mass spectrometer with a heated electrospray ionization in positive or negative mode, and using the Chromeleon CDS software.

2.2.4. Mass spectra

High Resolution Mass spectrometry (HRMS) was performed using a Waters Micromass LCT Premier XE® equipped with an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) and an electrospray source or an atmospheric pressure ionization in positive or negative mode, with a product introduction by direct infusion or by a coupling to a UHPLC Waters Acquity system (diode array detector) equipped with a Waters Acquity BEH C18 column (1.7 μm , 2.1 x 50 mm) with H₂O/ACN as eluent, or to a Waters 2694 Alliance HPLC system (diode array detector) equipped with a Waters SunFire C18 column (5 μm , 2.1 x 50 mm) with H₂O/ACN as eluent.

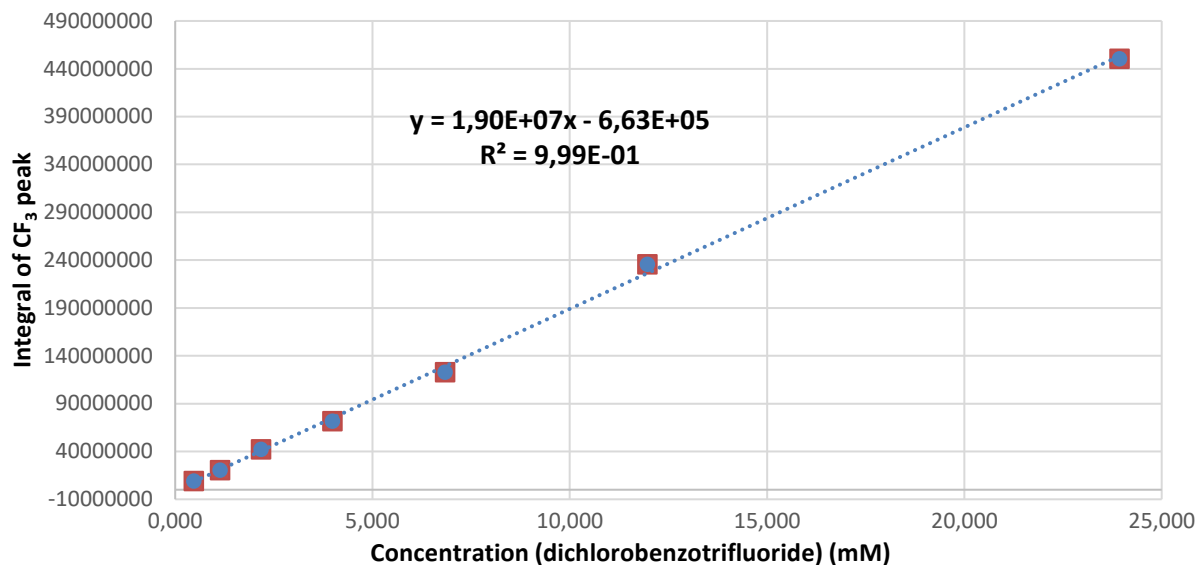
2.3. Analytical and purification methods

2.3.1. Quantitative NMR calibration curve of the CF₃ concentration

On the basis of the reference below, dichlorobenzotrifluoride (analytical grade) was dissolved in DMSO-*d*₆ to obtain the following concentrations (mM) in duplicates : 0.469, 1.140, 2.176, 3.989, 6.838, 11.966, 23.933. The ¹⁹F NMR (282.4 MHz) spectrum was carried out on each duplicate with the following parameters :

- Pulse program : zgig
- Acquisition mode : DQD
- Rotation frequency of sample : 20 Hz
- Number of dummy scans : 4
- Number of scans : 128
- Spectral width : 100 ppm
- Transmitter frequency offset : -77.0 ppm
- Size of fid : 64000 data points
- Acquisition time : 1.126 sec
- Relaxation delay : 10 sec

The absolute integral of the peak area of the CF₃ peak was measured and the average value of each duplicate was calculated. These measures were plotted as a function of the linked concentration in dichlorobenzotrifluoride to obtain the following curve :



Little, M. J.; Aubry, N.; Beaudoin, M.-E.; Goudreau, N.; LaPlante, S. R. Quantifying Trifluoroacetic Acid as a Counterion in Drug Discovery by ¹⁹F NMR and Capillary Electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *43* (4), 1324–1330

2.3.2. HPLC/UHPLC methods

Method A :

Thermo Scientific Hypersil GOLD column (5 μm, 250 × 4.6 mm) temperature-controlled at 20 °C with ACN and aq. 0.1% trifluoroacetic acid as eluents at a flow rate of 1.0 mL/min : 5% to 100% ACN in 25 min. UV-detection was achieved at 270 nm.

Method B :

Thermo Scientific Acclaim polar advantage II column (2.2 μm, 100 × 2.1 mm) temperature-controlled at 25 °C with ACN and aq. 20 mM ammonium acetate as eluents at a flow rate of 0.4 mL/min : 5% ACN for 3 min, then 5% to 100% ACN in 16 min. UV-detection was achieved at 307 nm.

Method C :

Thermo Scientific Accucore aQ column (2.6 μm, 150 × 2.1 mm) temperature-controlled at 25 °C with ACN and aq. 20 mM ammonium acetate as eluents at a flow rate of 0.4 mL/min : 0% ACN for 5 min, then 0% to 100% ACN in 20 min. UV-detection was achieved at 254 nm.

2.3.3. UHPLC-MS methods :

Method D :

Thermo Scientific Hypersil GOLD column (1.9 μm , 100 \times 2.1 mm) temperature-controlled at 30 °C with ACN and aq. 0.1% formic acid as eluents at a flow rate of 0.5 mL/min : 5% to 100% ACN in 10 min. UV-detection was achieved at 254 nm.

Method E :

Thermo Scientific Hypersil GOLD column (1.9 μm , 100 \times 2.1 mm) temperature-controlled at 30 °C with ACN and aq. 0.2% formic acid as eluents at a flow rate of 0.5 mL/min : 5% to 100% ACN in 10 min. UV-detection was achieved at 254 nm.

Method F :

Thermo Scientific Hypersil GOLD column (1.9 μm , 50 \times 2.1 mm) temperature-controlled at 25 °C with ACN and aq. 0.1% formic acid as eluents at a flow rate of 0.4 mL/min : 5% ACN for 0.5 min, then 0% to 70% ACN in 4.5 min. UV-detection was achieved at 254 nm.

Method G :

Waters acquity UPLC BEH shield column (1.7 μm , 100 \times 2.1 mm) temperature-controlled at 40 °C with ACN and aq. 0.1% formic acid as eluents at a flow rate of 0.4 mL/min : 0% ACN for 2 min, then 0% to 100% ACN in 8 min. UV-detection was achieved at 254 nm.

Method H :

Waters acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μm , 100 \times 2.1 mm) temperature-controlled at 40 °C with ACN and aq. 0.1% formic acid as eluents at a flow rate of 0.4 mL/min : 0% to 100% ACN in 10 min. UV-detection was achieved at 254 nm.

2.3.4. Preparative HPLC method

Method I :

Thermo Scientific Acclaim polar advantage II column (5 μm , 250 \times 20 mm) with ACN and aq. 20 mM ammonium acetate as eluents at a flow rate of 20 mL/min : 5% ACN for 3 min, then 5% to 38% in 12 min followed by 38% ACN for 4 min and 38% to 100% ACN in 8 min. UV-detection was achieved at 230 nm and 250 nm.

2.4. General synthetic procedures

General procedure A : benzylation

The phenol (1.0 equiv) was dissolved in acetone (0.25 M) and K_2CO_3 (3.0 equiv) and benzyl bromide (2.0 equiv) were added. The heterogeneous mixture was stirred at reflux overnight.

The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 10/0 \rightarrow 8/2, v/v) to yield the desired benzylated product.

General procedure B : DIBAL-H reduction

The ester (1.0 equiv) was dissolved in dry DCM (0.15 M) under argon and cooled to $-78\text{ }^\circ\text{C}$. DIBAL (1 M in DCM) (2.0 equiv) was added dropwise, and the solution was stirred for 15 min.

MeOH ($0.3 \cdot V_{\text{DCM}}$) was added slowly at $-78\text{ }^\circ\text{C}$, and the solution was warmed slowly to r.t. for 40 min. The solution was concentrated under reduced pressure, and the crude reaction mixture was dissolved in DCM (0.1 M). The organic phase was washed with an aq. NaOH (1 M) solution and this aqueous phase was extracted with DCM despite an emulsion. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to yield the desired aldehyde product without further purification.

General procedure C : acetalization

In a dried round-bottom flask under argon, a solution of the aldehyde in DCM (0.15 M for benzylated products and 0.1 M for nitro-benzylated products) with activated molecular sieve 4 \AA was cooled to $0\text{ }^\circ\text{C}$, and $BF_3 \cdot Et_2O$ was added dropwise. The solution was warmed slowly to r.t. and stirred overnight under argon.

The molecular sieve was removed by filtration, and the organic phase was washed with water (thrice). The aqueous phase was extracted with DCM once. The combined organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to remove traces of ethylene glycol. The desired acetal product was then used without further purification.

General procedure D : Sonogashira cross-coupling for neutral compounds

The brominated substrate (1.0 equiv) and the alkyne (1.0 equiv) were dissolved in dry DCM/Et₃N (2/1 v/v, 0.08 M) under argon, and the solution was degassed with argon for 15 min. Pd(PPh₃)₄ (0.05 to 0.15 equiv) and CuI (0.1 to 0.3 equiv) were added, and the solution was stirred overnight at r.t. under argon, protected from light.

The solution was concentrated and purified with flash chromatography on silica gel with cyclohexane/EtOAc or DCM/MeOH as eluent to yield the desired product.

General procedure E : methanesulfonate activation followed by a nucleophilic substitution

The alcohol was dissolved in dry DCM (0.1 to 0.2 M) with Et₃N (2 to 3 equiv) and cooled to 0 °C under argon. MsCl (1.5 equiv) was added, and the solution was stirred at r.t. for 2 to 3 hours with a TLC control.

The solution was diluted in DCM and washed with water and brine. This organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was immediately used and dissolved in dry ACN (0.1 to 0.2 M) under argon. The amine (1.5 equiv) and K₂CO₃ (2.0 equiv) were added at 0 °C and the solution was stirred at reflux overnight.

The solution was filtered, concentrated under reduced pressure, and purified by a flash chromatography on silica gel with cyclohexane/EtOAc or DCM/MeOH as eluent to yield the desired product.

General procedure F : deprotection step

The acetal was dissolved in H₂O/HCO₂H (1/1, v/v) (0.05 M) and stirred under argon at 60 °C overnight.

For neutral amino-compounds, NaHCO₃ was added to reach pH around 8. This aqueous phase was extracted either with EtOAc or DCM or CHCl₃ (thrice), depending of the product. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum.

For charged ammonium compounds, formic acid was neutralized by a stoichiometric quantity of NaHCO₃ to reach a pH around 8. The aqueous phase was lyophilized, and the freeze-dried product was washed with DCM/MeOH (8/2, v/v). This resulting organic phase was then concentrated under reduced pressure.

For both cases, the concentration was done under 30°C to avoid the degradation of the product (for most aldehydes, a darkening could be observed). The crude material was purified by flash chromatography on silica gel with DCM/MeOH as eluent to yield the desired aldehyde product.

General procedure G : oxime formation

Unless otherwise specified, the aldehyde was dissolved in MeOH (0.1 M) and aqueous hydroxylamine (50 wt.%) (1.2 to 2.0 equiv) was added. The solution was stirred at r.t. and followed by TLC to stop it when the aldehyde was consumed (from 4 h to 48 h).

The solution was concentrated under reduced pressure and was purified by flash chromatography on silica gel DCM/MeOH as eluent to yield the desired oxime product.

General procedure H : formation of methanesulfonate salt

The substrate (1.0 equiv) was dissolved in a vial in MeOH (HPLC grade) (0.2 to 0.1 M), with some DCM in case of difficult solubility. Methanesulfonic acid (0.2 M : 39 µL acid in 3.0 mL MeOH or 0.5 M : 0.16 mL in 5.0 mL MeOH, depending on the quantities of substrate) (1.0 equiv) was added, and the solution was concentrated under reduced pressure. The number of equivalents of acid was determined by NMR and the difference of mass measured. The purity was determined by HPLC or LC-MS.

General procedure I : triflate activation followed by a nucleophilic substitution

Trifluoromethanesulfonic anhydride (1.1 equiv) was dissolved in dry DCM (0.13 M) under argon and cooled to 0 °C. A solution of the alcohol (1.0 equiv) and dry pyridine (1.0 equiv) in dry DCM (0.53 M) under argon was added in the previous solution dropwise at 0 °C. The solution was stirred at 0 °C for 15 to 45 min with a TLC control. To complete the conversion, additional 0.5 equivalents of trifluoromethanesulfonic anhydride could be needed.

The organic phase was washed twice with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure (temperature of the bath not exceeding 30 °C). The crude reaction product was used immediately and dissolved in dry ACN (0.5 M if the amine is liquid, 0.67 M if the amine is solid) under argon. The amine (0.85 to 0.95 equiv) was added dropwise (either in liquid form or dissolved in dry ACN (1.8 M) under argon. The solution was stirred at r.t. overnight.

The solution was concentrated under reduced pressure and was purified by flash chromatography on silica gel with DCM/MeOH as eluent to yield the desired product.

General procedure J : Sonogashira cross-coupling reaction using ammonium compounds

The brominated compound (1.1 equiv), K_3PO_4 (2.0 equiv) and the alkyne (1.0 equiv) were dissolved in dry ACN (0.08 to 0.13 M) under argon, and the solution was degassed with argon for 15 min. CuI (0.2 equiv) and $Pd(PPh_3)_4$ (0.2 equiv) were added in this order and the solution was stirred overnight (unless otherwise specified) at r.t. under argon, protected from light.

The solution was filtered on cotton, concentrated under reduced pressure, and was purified by flash chromatography on silica gel with DCM/MeOH as eluent to yield the desired product.

General procedure K : Urea formation for PNU-120596 and its MTDA analogues

4-Chloro-2,5-dimethoxyaniline (1.0 equiv) and the carboxylic acid (1.4 equiv for **102**, 1.5 equiv for **91** and **113** and 1.9 equiv for **PNU-120596**) were suspended in dry toluene (0.1 M for **102**, 0.2 M for **91** and **PNU-120596** and 0.08 M for **113**) in a dry flask under argon. Et_3N (3.3 equiv, 4.3 equiv for **102**) and DPPA (1.6 equiv) were added in this order under argon. A refrigerant was adjusted on the flask and the solution was stirred at 130 °C from 1h to 3h.

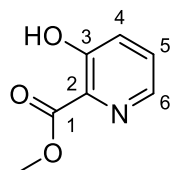
The solution was washed with water and the aqueous phase was extracted with DCM/EtOAc (9/1 v/v). The gathered organic phases were washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography with cyclohexane/EtOAc or DCM/EtOAc or DCM/MeOH as eluent to yield the desired urea product.

General procedure L : Urea formation for SB-206553 and its MTDA analogues

The carboxylic acid (2.0 equiv) was suspended in dry toluene (0.2 M) in a dry two-neck round-bottom flask under argon. Et_3N (4.1 equiv) and DPPA (2.2 equiv) were added in this order and the solution was stirred at r.t. 30 min and became limpid. The solution was then stirred at 105 °C and the heating was stopped 10 min after the end of the gaseous emission. The cyclic aniline (1.0 equiv) was added at r.t. and the solution was stirred at reflux (heating bath : 130 °C) 2h.

The solution was diluted in EtOAc and washed with water. The aqueous phase was extracted with EtOAc/ $CHCl_3$ 6/1 thrice and the gathered organic phases were washed with brine. It was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography with DCM/EtOAc/MeOH or DCM/MeOH as eluent to yield the desired urea product.

Methyl 3-hydroxypicolinate (**9**)



$C_7H_7NO_3$
Exact Mass: 153,0426
Molecular Weight: 153,1370

3-Hydroxypicolinic acid **7** (9.0 g, 64.7 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (130 mL) and was cooled to 0 °C. Concentrated sulfuric acid (10.8 mL, 194 mmol, 3.0 equiv) was added dropwise and the solution was stirred at reflux overnight.

Then the solution was concentrated under reduced pressure and the residue was adjusted to pH 8.5 with saturated aqueous NaHCO₃ solution and solid NaHCO₃. This aqueous phase was extracted with EtOAc (thrice). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the ester **9** (8.05 g, 81%) as a white solid used in the next step without further purification.

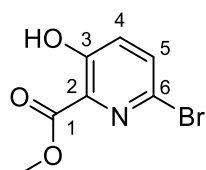
$R_f = 0.34$ (PE/EtOAc 1/1 v/v). $M_p = 73-75.5$ °C. **MS** (ESI+) m/z (%): 154 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₇H₈NO₃]⁺ 154.0499, found 154.0504.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.04 (s, 3H, OCH₃), 7.35 (dd, $J = 1.5$ Hz, 8.5 Hz, 1H, H₄), 7.41 (dd, $J = 4.1$ Hz, 8.5 Hz, 1H, H₅), 8.26 (dd, $J = 1.5$ Hz, 4.1 Hz, 1H, H₆), 10.61 (s, 1H, OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 53.2 (OCH₃), 126.3 (C₄), 129.7 (C₅), 130.1 (C₂), 141.6 (C₆), 158.9 (C₃), 170.0 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the reference : Louise-Leriché, L.; Păunescu, E.; Saint-André, G.; Baati, R.; Romieu, A.; Wagner, A.; Renard, P.-Y. A HTS Assay for the Detection of Organophosphorus Nerve Agent Scavengers. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (11), 3510–3523 (where 53.2 ppm for the ¹³C NMR was forgotten)

Methyl 6-bromo-3-hydroxypicolinate (**10**)



$C_7H_6BrNO_3$
Exact Mass: 230,9531
Molecular Weight: 232,0330

The ester **9** (10.4 g, 67.6 mmol, 1.0 equiv) was poured into water and ice (450 mL) at 0 °C. Bromine (4.18 mL, 80.0 mmol, 1.2 equiv) was added in 4 portions with some ice every half hour in the vigorously stirred solution. Then the stirring was continued for two additional hours.

The aqueous phase was extracted four times with DCM. The combined organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the brominated product **10** (13.0 g, 83%) as a clear yellow solid (due to yellow traces of bromine) used without further purification in the next step.

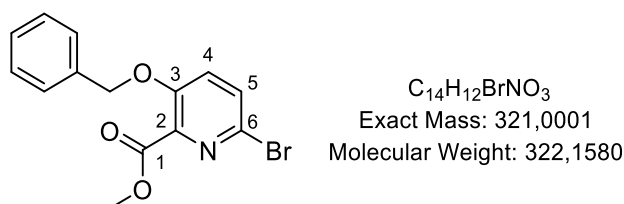
R_f = 0.9 (PE/EtOAc 1/1 v/v). M_p = 108.4-111.5 °C. **MS** (API+) m/z (%): 232 (100) [C₇H₆⁷⁹BrNO₃+H]⁺, 234 (97.5) [C₇H₆⁸¹BrNO₃+H]⁺. **HRMS** (API+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₇H₇⁷⁹BrNO₃]⁺ 231.9604, found 231.9609.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.04 (s, 3H, OCH₃), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H₄), 7.55 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H₅), 10.68 (s, 1H, OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 53.5 (OCH₃), 129.5 (C₄), 130.1 (C₂), 130.7 (C₆), 134.5 (C₅), 158.6 (C₃), 169.1 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Renou, J.; Liodice, M.; Arboléas, M.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. Tryptoline-3-Hydroxypyridinaldoxime Conjugates as Efficient Reactivators of Phosphylated Human Acetyl and Butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (30), 3947–3950

Methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopyridine-2-carboxylate (**11**)



The general procedure A was carried out on the phenol **10** (20.1 g, 86.4 mmol) to yield the benzylated product **11** (22.1 g, 79.5%) as a clear yellow solid.

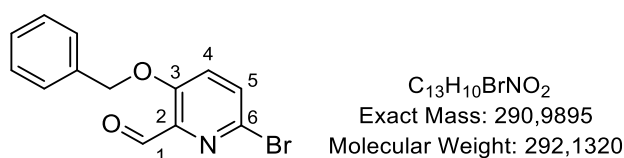
R_f = 0.31 (PE/EtOAc 8/2 v/v). M_p = 79.8-82.5 °C. **MS** (ESI+) m/z (%): 322 (98.6) [C₁₄H₁₂⁷⁹BrNO₃+H]⁺, 324 (100) [C₁₄H₁₂⁸¹BrNO₃+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₄H₁₃⁷⁹BrNO₃]⁺ 322.0079, found 322.0075.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.96 (s, 3H, OCH₃), 5.20 (s, 2H, CH₂-Ph), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₄), 7.29-7.45 (m, 5H, H_{Ph}), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₅) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 53.0 (OCH₃), 71.5 (CH₂-Ph), 125.1 (C₄), 127.1 (C_{Ph}), 128.5 (C_{Ph/para}), 128.9 (C_{Ph}), 131.3 (C₆), 131.4 (C₅), 135.4 (C_{Ph/quat.}), 140.1 (C₂), 154.1 (C₃), 164.1 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Renou, J.; Liodice, M.; Arboléas, M.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. Tryptoline-3-Hydroxypyridinaldoxime Conjugates as Efficient Reactivators of Phosphylated Human Acetyl and Butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (30), 3947–3950

3-(Benzyloxy)-6-bromopicolinaldehyde (**13**)



The general procedure B was carried out on the ester **11** (14.4 g, 44.5 mmol) to yield the aldehyde **13** (12.8 g, 98%) as a white solid.

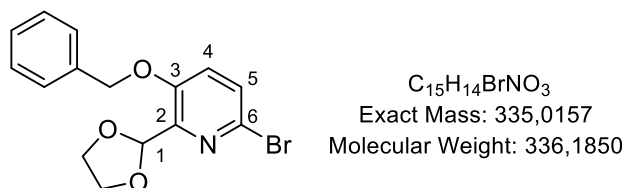
R_f = 0.33 (PE/EtOAc 1/1 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 292 (36) [C₁₃H₁₀⁷⁹BrNO₂+H]⁺, 294 (37) [C₁₃H₁₀⁸¹BrNO₂+H]⁺, 324 (99) [C₁₃H₁₀⁷⁹BrNO₂+MeOH+H]⁺, 326 (100) [C₁₃H₁₀⁸¹BrNO₂+MeOH+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₃H₁₁⁷⁹BrNO₂]⁺ 291.9968, found 291.9972.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.24 (s, 2H, CH₂Ph), 7.33 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₄), 7.31-7.45 (m, 5H, H_{Ph}), 7.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₅), 10.2 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 71.3 (CH₂Ph), 125.3 (C₄), 127.1 (C_{Ph/ortho}), 128.7 (C_{Ph/para}), 129.0 (C_{Ph/meta}), 132.4 (C₆), 133.3 (C₅), 134.9 (C_{Ph/quat.}), 141.7 (C₂), 156.4 (C₃), 188.7 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the reference : Zorbaz, T.; Mišetić, P.; Probst, N.; Žunec, S.; Zandona, A.; Mendaš, G.; Micek, V.; Maček Hrvat, N.; Katalinić, M.; Braiki, A.; Jean, L.; Renard, P.-Y.; Gabelica Marković, V.; Kovarik, Z. Pharmacokinetic Evaluation of Brain Penetrating Morpholine-3-Hydroxy-2-Pyridine Oxime as an Antidote for Nerve Agent Poisoning. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, 11 (7), 1072–1084

3-(Benzyloxy)-6-bromo-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridine (**8**)



The general procedure C was carried out on the aldehyde **13** (20.1 g, 68.8 mmol) to yield the acetal **8** (22.2 g, 96%) as a clear yellow solid.

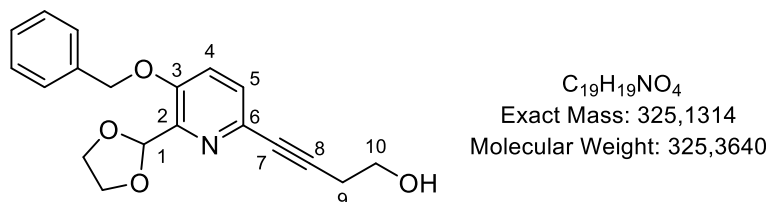
$R_f = 0.35$ (PE/EtOAc 1/1 v/v). $M_p = 80.5\text{--}82.5^\circ\text{C}$. **MS** (ESI+) m/z (%): 336 (99.9) [$C_{15}H_{14}^{79}BrNO_3 + H$]⁺, 338 (100) [$C_{15}H_{14}^{81}BrNO_3 + H$]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [$M+H$]⁺ calcd for [$C_{15}H_{15}^{79}BrNO_3$]⁺ 336.0230, found 336.0237.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.96–4.27 (m, 4H, $CH_2\text{-O}$), 5.10 (s, 2H, $CH_2\text{-Ph}$), 6.27 (s, 1H, H_1), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_4), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_5), 7.29–7.43 (m, 5H, H_{Ph}) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 65.9 ($CH_2\text{-O}$), 71.0 ($CH_2\text{-Ph}$), 99.9 (C_1), 123.3 (C_4), 127.5 (C_{Ph}), 128.5 ($C_{Ph/quat.}$), 128.8 (C_{Ph}), 128.9 (C_5), 131.4 (C_6), 135.6 (C_{Ph}), 147.6 (C_2), 153.0 (C_3) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the following reference where the melting point is slightly different ($83\text{--}85^\circ\text{C}$): Zorbaz, T.; Mišetić, P.; Probst, N.; Žunec, S.; Zandona, A.; Mendaš, G.; Micek, V.; Maček Hrvat, N.; Katalinić, M.; Braiki, A.; Jean, L.; Renard, P.-Y.; Gabelica Marković, V.; Kovarik, Z. Pharmacokinetic Evaluation of Brain Penetrating Morpholine-3-Hydroxy-2-Pyridine Oxime as an Antidote for Nerve Agent Poisoning. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (7), 1072–1084

4-(5-(Benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-ol (**4a**)



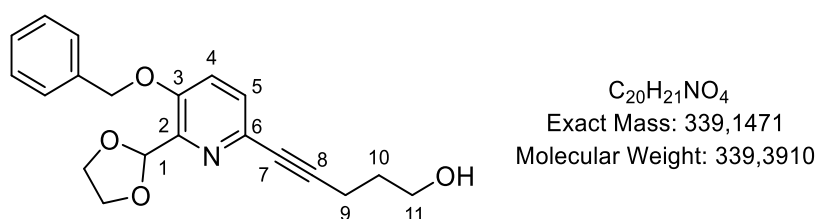
The general procedure D was carried out on the brominated substrate **8** (5.68 g, 16.9 mmol) and 3-butyn-1-ol (1.3 mL, 16.9 mmol) to yield after a flash chromatography (PE/EtOAc 1/1→0/10 v/v) the compound **4a** (5.03 g, 92%) as a very viscous orange oil.

$R_f = 0.33$ (EtOAc/PE 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 326 (100) $[M+H]^+$, 348 (4) $[M+Na]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{19}H_{20}NO_4]^+$ 326.1387, found 326.1385.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.66 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H_9), 3.81 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H_{10}), 3.95-4.20 (m, 4H, CH_2-O), 5.12 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.24 (s, 1H, H_1), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_4), 7.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_5), 7.31-7.42 (m, 5H, H_{Ph}) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 24.0 (C_9), 61.0 (C_{10}), 65.9 (CH_2-O), 70.7 (CH_2-Ph), 81.6 (C_7), 86.3 (C_8), 100.8 (C_1), 120.2 (C_4), 127.5 ($C_{Ph/ortho}$), 128.4 (C_5 or $C_{Ph/para}$), 128.5 (C_5 or $C_{Ph/para}$), 128.8 ($C_{Ph/meta}$), 134.7 (C_6), 135.8 ($C_{Ph/quat.}$), 146.6 (C_2), 152.8 (C_3) ppm

5-(5-(Benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)pent-4-yn-1-ol (**4b**)



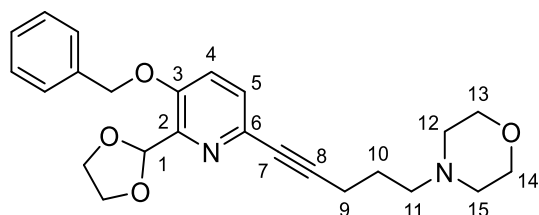
The general procedure D was carried out on the brominated substrate **8** (2.45 g, 7.29 mmol) and 4-pentyn-1-ol (0.68 mL, 7.29 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) the compound **4b** (2.14 g, 87%) as a very viscous orange oil.

$R_f = 0.39$ (EtOAc/PE 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 340 (100) $[M+H]^+$, 362 (5) $[M+Na]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{20}H_{22}NO_4]^+$ 340.1543, found 340.1549.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.86 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H, H_{10}), 2.53 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H_9), 3.80 (q, $J = 5.5$ Hz, 2H, H_{11}), 3.96-4.24 (m, 4H, CH_2-O), 5.12 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.25 (s, 1H, H_1), 7.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.30-7.44 (m, 5H, H_{Ph}) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 16.1 (C_9), 31.2 (C_{10}), 61.9 (C_{11}), 65.9 (CH_2-O), 70.7 (CH_2-Ph), 80.7 (C_7), 88.6 (C_8), 101.2 (C_1), 120.2 (C_4), 127.6 ($C_{Ph/ortho}$), 128.3 (C_5), 128.5 ($C_{Ph/para}$), 128.8 ($C_{Ph/meta}$), 135.1 (C_6), 135.9 ($C_{Ph/quat.}$), 146.7 (C_2), 152.7 (C_3) ppm

4-(5-(5-(Benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)pent-4-yn-1-yl)morpholine (**14**)



$C_{24}H_{28}N_2O_4$
Exact Mass: 408,2049
Molecular Weight: 408,4980

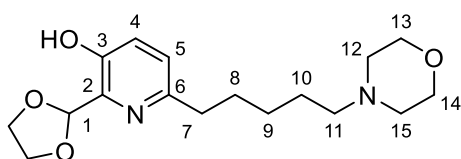
The general procedure E was carried out on the alcohol **4b** (2.28 g, 6.72 mmol) and morpholine (0.87 mL, 10.0 mmol) to yield after a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 1/1→0/1 v/v) the compound **14** (2.38 g, 89%) as a yellow oil.

$R_f = 0.14$ (EtOAc/PE 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 409 (100) $[M+H]^+$, 431 (5) $[M+Na]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{24}H_{29}N_2O_4]^+$ 409.2122, found 409.2118.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.79 (quint, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{10}), 2.40-2.50 (m, 8H, $H_9, H_{11}, H_{12}, H_{15}$), 3.71 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, H_{13}, H_{14}), 3.95-4.20 (m, 4H, CH_2-O), 5.12 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.24 (s, 1H, H_1), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_4), 7.29 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_5), 7.31-7.43 (m, 5H, H_{Ph}) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 17.5 (C_9), 25.5 (C_{10}), 53.8 (C_{12}, C_{15}), 58.0 (C_{11}), 65.9 (CH_2-O), 67.1 (C_{13}, C_{14}), 70.7 (CH_2-Ph), 80.4 (C_7), 88.9 (C_8), 101.3 (C_1), 120.2 (C_4), 127.6 ($C_{Ph/ortho}$), 128.3 ($C_{Ph/para}$), 128.4 (C_5), 128.8 ($C_{Ph/meta}$), 135.2 (C_6), 135.9 ($C_{Ph/quat.}$), 146.7 (C_2), 152.6 (C_3) ppm

2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-6-(5-morpholinopentyl)pyridin-3-ol (**15**)



$C_{17}H_{26}N_2O_4$
Exact Mass: 322,1893
Molecular Weight: 322,4050

The benzylated compound (**14**) (2.33 g, 5.72 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in ACN (57 mL) in a Teflon vessel of a hydrogenation reactor. $Pd(OH)_2$ (20%, 1.20 g, 1.71 mmol, 0.3 equiv) was added under argon and the reactor was closed. The reactor was subjected to three cycles vacuum-hydrogen and finally filled with hydrogen at 4 Bar. The solution was stirred 1h30 with a TLC control of the disappearance of the substrate and the appearance of the secondary product.

The solution was filtered on a celite pad with DCM/MeOH (3/1 v/v) and concentrated under reduced pressure to be purified with a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v). A fraction of 300

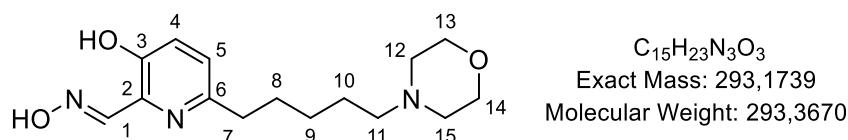
mg containing still the benzylated compound was subjected to the same procedure (1 hour) and purification to finally yield the phenol **15** (1.71 g, 75 %) as a white solid.

$R_f = 0.46$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 323 (62) $[M+H]^+$, 355 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{17}H_{27}N_2O_4]^+$ 323.1965, found 323.1986.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.25-1.37 (m, 2H, H_9), 1.40-1.52 (m, 2H, H_{10}), 1.64 (quint, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_8), 2.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_{11}), 2.33-2.40 (m, 4H, H_{12} , H_{15}), 2.67 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_7), 3.66 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, H_{12} , H_{14}), 3.99-4.23 (m, 4H, CH_2-O), 5.85 (s, 1H, H_1), 7.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.1 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 26.4 (C_{10}), 27.2 (C_9), 30.1 (C_8), 37.3 (C_7), 53.8 (C_{12} , C_{15}), 59.1 (C_{11}), 65.1 (CH_2-O), 67.0 (C_{13} , C_{14}), 105.7 (C_1), 124.3 (C_5), 125.5 (C_4), 137.9 (C_2), 150.6 (C_3), 153.4 (C_6) ppm

3-Hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinaldehyde oxime (**RM048**, **PDG-078**)



The general procedure F was carried out on the acetal **15** (1.68 g, 5.21 mmol) with a TLC control (DCM/MeOH 9/1 v/v). The extraction of the aqueous phase was repeated thrice with DCM/EtOAc (4/1 v/v). The flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) yielded the aldehyde **17** (932 mg, 65%) as a yellow oil which darkens. $R_f = 0.36$ (DCM/MeOH 9/1 v/v) from the reaction mixture H_2O/HCO_2H .

The general procedure G was carried out on this aldehyde **17** (932 mg, 3.4 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) the oxime **RM048** (820 mg, 82%) as a white solid.

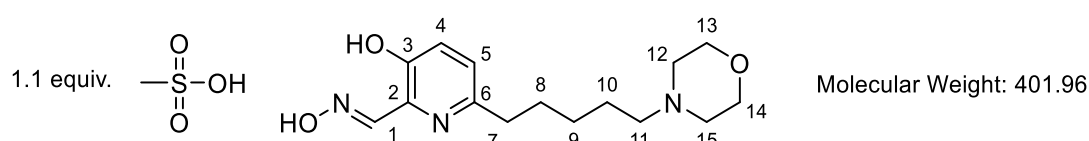
$R_f = 0.45$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 294 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{15}H_{24}N_3O_3]^+$ 294.1812, found 294.1815.

1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.28-1.40 (m, 2H, H_9), 1.47-1.60 (m, 2H, H_8), 1.70 (quint, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{10}), 2.29-2.36 (m, 2H, H_{11}), 2.40-2.47 (m, 4H, H_{12} , H_{15}), 2.71 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_7), 3.67 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, H_{13} , H_{14}), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 8.28 (br s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NH, HMR (75 MHz, MeOD) δ 26.9 (C_8), 28.1 (C_9), 31.1 (C_{10}), 37.8 (C_7), 54.7 (C_{12} , C_{15}), 60.0 (C_{11}), 67.5 (C_{13} , C_{14}), 125.3 (C_5), 126.0 (C_4), 136.2 (C_2), 152.9 (C_1), 153.8 (C_3), 154.6 (C_6) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the following reference : Zorbaz, T.; Braïki, A.; Maraković, N.; Renou, J.; de la Mora, E.; Maček Hrvat, N.; Katalinić, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Mercey, G.; Gomez, C.; Mougeot, R.; Pérez, B.; Baati, R.; Nachon, F.; Weik, M.; Jean, L.; Kovarik, Z.; Renard, P.-Y. Potent 3-Hydroxy-2-Pyridine Aldoxime Reactivators of Organophosphate-Inhibited Cholinesterases with Predicted Blood-Brain Barrier Penetration. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (38), 9675–9691.

4-(5-(5-Hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)pentyl)-4 λ^5 -morpholino methanesulfonate (**RM048 MeSO₃H**)



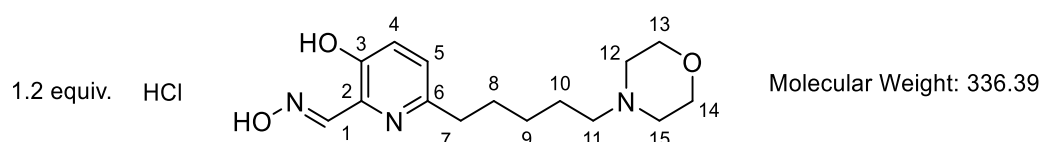
The general procedure H was carried out on the oxime **RM048** (360 mg, 1.23 mmol) to yield the methanesulfonate salt **RM048 MeSO₃H** (495 mg) as a clear yellow solid. 1.1 equivalents of MsOH were added according to the NMR integration of the CH₃-S peak area and to the difference of the mass measured.

HPLC (Method A) *t_r* (min), relative area (%) : 6.66, 97.66.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.39-1.50 (m, 2H, H₉), 1.70-1.85 (m, 4H, H₈, H₁₀), 2.70 (s, 3.4H, CH₃-S), 2.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₇), 3.07-3.20 (m, 4H, H₁₁, H₁₂, H₁₅), 3.40-3.55 (m, 2H, H₁₂, H₁₅), 3.65-3.84 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 3.95-4.15 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 7.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.32 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 24.4 (C₁₀), 26.9 (C₉), 30.4 (C₈), 37.0 (C₇), 39.6 (CH₃-S), 53.1 (C₁₂, C₁₅), 58.3 (C₁₁), 65.0 (C₁₃, C₁₄), 125.6 (C₅), 126.6 (C₄), 136.0 (C₂), 151.9 (C₁), 153.8 (C₆), 154.0 (C₃) ppm

6-(5-(4-Chloro-4 λ^5 -morpholino)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime (**RM048 HCl**)



The oxime **RM048** (18.7 mg, 64 μ mol, 1.0 equiv) was dissolved in a vial in MeOH (HPLC grade) (1.0 mL) and HCl (4 M in dioxane) (16 μ L, 64 μ mol, 1.0 equiv) was added. The solution was concentrated to yield

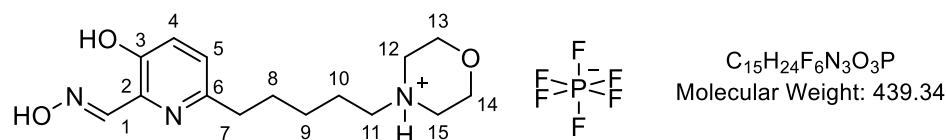
the chloride salt **RM048 HCl** (21.4 mg) as a pinkish beige solid. 1.2 equivalents of HCl were added according to the difference of the mass measured.

LC-MS (ESI+) (Method D) t_r (min), relative area (%), m/z : 1.407, 0.82, 294 $[M+H]^+$; 1.56, 96.45, 294 $[M+H]^+$. Purity : 97.2%

1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.42 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_9), 1.69-1.83 (m, 4H, H_8, H_{10}), 2.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_7), 2.96-3.07 (m, 2H, H_{11}), 3.12-3.23 (m, 4H, H_{12}, H_{15}), 3.82-3.93 (m, 4H, H_{13}, H_{14}), 7.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 8.28 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 24.8 (C_{10}), 27.1 (C_9), 30.6 (C_8), 37.4 (C_7), 53.4 (C_{12}, C_{15}), 58.6 (C_{11}), 65.4 (C_{13}, C_{14}), 125.4 (C_5), 126.1 (C_4), 136.3 (C_2), 152.8 (C_1), 153.8 (C_3), 154.3 (C_6) ppm

6-(5-(4 λ^4 -Morpholino)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime compound with hexafluoro- λ^6 -phosphane (1:1) (**RM048**)



The oxime **RM048** (110 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (HPLC grade) (2.2 mL) and DCM (0.4 mL) in a vial. HCl (4 M in dioxane) (94 μ L, 0.37 mmol, 1.0 equiv) was added and the solution was concentrated in the vial under reduced pressure and was kept drying under a high vacuum overnight. The crude product was dissolved in ultrapure water (1.5 mL) and a solution of $AgPF_6$ (93.5 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv) in ultrapure water (0.5 mL) was added. After one hour, the $AgCl$ precipitate was filtered through a PTFE filter of 0.2 μ m on the syringe. The solution was lyophilized, yielding the hexafluorophosphate salt **RM048 PF_6^-** (112 mg, 69%) as a white dusty solid. The procedure was repeated a second time on the oxime **RM048** (55 mg, 187 μ mol), yielding 43 mg (53%) of the salt **RM048 PF_6^-** .

The salt being moderately soluble in water, the residues in the vials of both procedures were solubilised in a minimum of MeOH (HPLC grade) to be filtered through a PTFE filter of 0.2 μ m on the syringe. The LC-MS purity of these solutions were higher than 95% and thus were mixed with the previous lyophilized batches of salt. Finally, after concentration under reduced pressure, two batches of the salt **RM048 PF_6^-** were obtained as a foamy orange solid : **RM048 PF_6^- 1** (149 mg) and **RM048 PF_6^- 2** (24 mg) for a global yield of 70%.

Batch **RM048 PF₆⁻ 1** :

LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 3.100, 4.08, 294 [M+H]⁺ ; 3.287, 95.14, 294 [M+H]⁺. Purity : 99.22%

Batch **RM048 PF₆⁻ 2** :

LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 3.220, 3.08, 294 [M+H]⁺ ; 3.387, 96.92, 294 [M+H]⁺. Purity : 100%

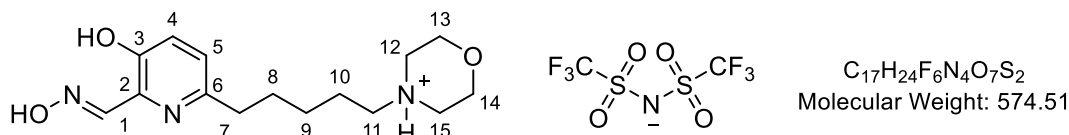
³¹P NMR (121.5 MHz, MeOD) δ -144.6 (sept, J = 709 Hz, PF₆⁻) ppm

¹⁹F NMR (282.4 MHz, MeOD) δ -74.3 (dd, J = 709 Hz, 4 Hz, PF₆⁻) ppm

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.40-1.52 (m, 2H, H₉), 1.72-1.88 (m, 4H, H₈, H₁₀), 2.86 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H₇), 3.05-3.20 (m, 4H, H₁₁, H₁₂, H₁₅), 3.40-3.55 (m, 2H, H₁₂, H₁₅), 3.67-3.84 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 3.96-4.13 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 7.41 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H₅), 7.55 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H₄), 8.35 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 24.4 (C₁₀), 26.9 (C₉), 30.2 (C₈), 35.6 (C₇), 53.2 (C₁₂, C₁₅), 58.3 (C₁₁), 65.1 (C₁₃, C₁₄), 126.8 (C₅), 129.5 (C₄), 134.9 (C₂), 148.0 (C₁), 152.8 (C₆), 154.2 (C₃) ppm

1,1,1-Trifluoro-N-(4-(5-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)pentyl)-4λ⁺-morpholino)-N-((trifluoromethyl)sulfonyl)methanesulfonamide (**RM048**)



The oxime **RM048** (110 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (HPLC grade) (2.2 mL) and DCM (0.4 mL) in a vial. HCl (4 M in dioxane) (94 μL, 0.37 mmol, 1.0 equiv) was added and the solution was concentrated in the vial under reduced pressure and was kept drying under a high vacuum overnight. The crude product was dissolved in ultrapure water (1.5 mL) and a solution of AgNTf₂ (143.5 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv) in ultrapure water (0.5 mL) was added. After one hour, the AgCl precipitate was filtered through a PTFE filter of 0.2 μm on the syringe. The solution was lyophilized, yielding the bis(trifluoromethanesulfonyl)imide salt **RM048 NTf₂⁻** (100 mg, 47%) as a gummy yellow solid.

The procedure was repeated a second time on the oxime **RM048** (110 mg, 0.37 μmol). Because of the poor solubility in water, few product was obtained after the lyophilization. The lyophilized product was thus combined with the residues from the vial in a minimum of MeOH (HPLC grade) ; the solution was filtered as previously and concentrated under reduced pressure to yield 153 mg (72%) of the salt

RM048 NTf₂⁻: The yield being improved, the same procedure in MeOH was carried out on the first batch.

Finally, two batches of the salt **RM048 NTf₂⁻** were obtained as a gummy yellow solid : **RM048 NTf₂⁻ 1** (195 mg) and **RM048 NTf₂⁻ 2** (58 mg) for a global yield of 60%.

Batch **RM048 NTf₂⁻ 1** :

LC-MS (ESI-) (Method H) *t_r* (min), relative area (%), *m/z* : 2.983, 3.07, 292 [M-H]⁻ ; 3.183, 96.11, 292 [M-H]⁻. Purity : 99.18%

Batch **RM048 NTf₂⁻ 2** :

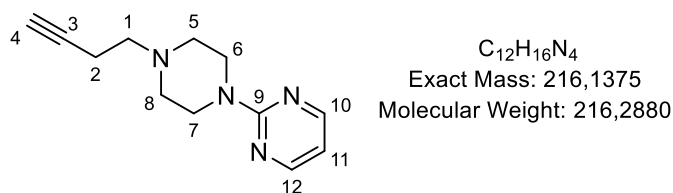
LC-MS (ESI+) (Method H) *t_r* (min), relative area (%), *m/z* : 2.713, 3.33, 294 [M+H]⁺ ; 2.907, 33.32, 294 [M+H]⁺ ; 2.980, 59.63, 294 [M+H]⁺. Purity : 96.28%

¹⁹F NMR (282.4 MHz, MeOD) δ -80.6 (s, CF₃) ppm

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.36-1.51 (m, 2H, H₉), 1.69-1.87 (m, 4H, H₈, H₁₀), 2.80 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₇), 3.04-3.20 (m, 4H, H₁₁, H₁₂, H₁₅), 3.37-3.58 (m, 2H, H₁₂, H₁₅), 3.65-3.89 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 3.93-4.16 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.31 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 24.4 (C₁₀), 26.9 (C₉), 30.3 (C₈), 36.5 (C₇), 53.1 (C₁₂, C₁₅), 58.3 (C₁₁), 65.0 (C₁₃, C₁₄), 121.1 (q, *J* = 323 Hz, CF₃), 126.0 (C₅), 127.7 (C₄), 135.6 (C₂), 150.5 (C₁), 153.6 (C₆), 154.0 (C₃) ppm

2-(4-(But-3-yn-1-yl)piperazin-1-yl)pyrimidine (**22**)



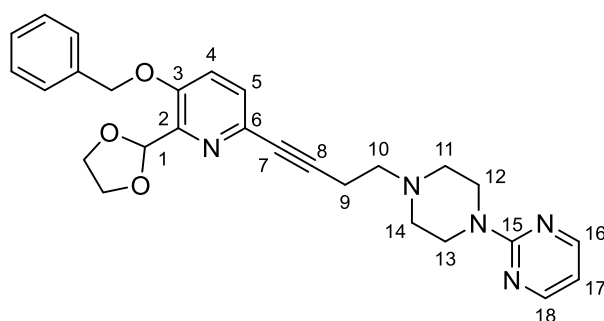
The general procedure E was carried out on 3-butyn-1-ol **5a** (1.06 mL, 13.9 mmol) and 2-(piperazin-1-yl)pyrimidine (2.95 mL, 20.8 mmol) to yield after a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 9/1→5/5 v/v) the compound **22** (2.03 g, 68%) as a yellow crystalline solid.

R_f = 0.37 (EtOAc/PE 8/2 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 217 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₂H₁₇N₄]⁺ 217.1448, found 217.1457.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.97 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H₄), 2.35-2.42 (m, 2H, H₂), 2.50 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, H₅, H₈), 2.57-2.64 (m, 2H, H₁), 3.80 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, H₆, H₇), 6.44 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H₁₁), 8.26 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H₁₀, H₁₂) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 16.9 (C₂), 43.7 (C₆, C₇), 52.8 (C₅, C₈), 57.2 (C₁), 69.3 (C₄), 82.7 (C₃), 109.9 (C₁₁), 157.8 (C₁₀, C₁₂), 161.7 (C₉) ppm

2-(4-(4-(5-(Benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-yl)piperazin-1-yl)pyrimidine (**23**)



C₂₇H₂₉N₅O₃
Exact Mass: 471,2270
Molecular Weight: 471,5610

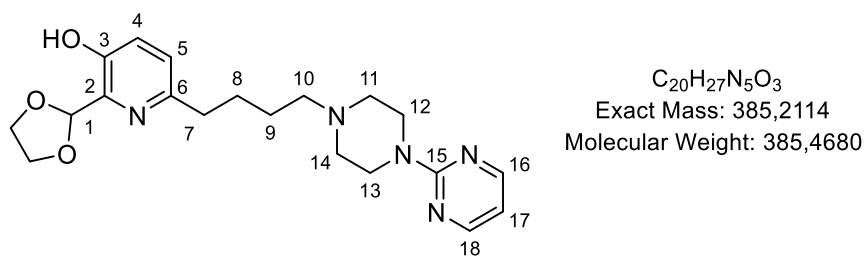
The general procedure D was carried out on the brominated substrate **8** (2.93 g, 8.72 mmol) and the alkyne **22** (1.89 g, 8.72 mmol) to yield after a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→0/10 v/v) the compound **23** (2.55 g, 62%) as a brown solid.

R_f = 0.25 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 472 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₂₇H₃₀N₅O₃]⁺ 472.2343, found 472.2349.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.55 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H₁₁, H₁₄), 2.58-2.75 (m, 4H, H₉, H₁₀), 3.83 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H₁₂, H₁₃), 3.93-4.21 (m, 4H, CH₂-O), 5.10 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.23 (s, 1H, H₁), 6.45 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H₁₇), 7.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₄), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₅), 7.30-7.43 (m, 5H, H_{Ph}), 8.28 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 17.8 (C₉), 43.7 (C₁₂, C₁₃), 52.8 (C₁₁, C₁₄), 57.0 (C₁₀), 65.9 (CH₂-O), 70.6 (CH₂-Ph), 80.9 (C₇), 87.3 (C₈), 101.2 (C₁), 109.9 (C₁₇), 120.1 (C₄), 127.5 (C_{Ph/ortho}), 128.3 (C_{Ph/para}), 128.4 (C₅), 128.8 (C_{Ph/meta}), 135.0 (C₆), 135.8 (C_{Ph/quat.}), 146.7 (C₂), 152.6 (C₃), 157.8 (C₁₆, C₁₈), 161.7 (C₁₅) ppm

2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)pyridin-3-ol (**24**)



The benzylated substrate **23** was subjected successively to four different hydrogenolyses. Two batches (100 mg, 0.21 mmol) were dissolved in EtOAc (2 mL) with AcOH (0.06 mL, 5.0 equiv) and were stirred under H_2 at atmospheric pressure either with Pd/C (10%) (0.2 equiv) for 4 hours for one or with $Pd(OH)_2$ (20%) (0.2 equiv) for 20 hours for the other. Two other batches were dissolved in ACN (0.1 M) and were stirred in a hydrogenation reactor with $Pd(OH)_2$ (20%) : either 0.4 equiv for (0.94 g, 2.0 mmol) of **23** at 15 Bar of H_2 during 43 h or 0.2 equiv for (0.76 g, 1.6 mmol) of **23** at 8 Bar of H_2 during 24 h. These different procedures yielded the product with the alkyne completely reduced but with the phenol still benzylated.

A batch of this reduced intermediate (0.90 g) was dissolved in ACN (20 mL) and stirred in a hydrogenation reactor with Pd/C (10%) (0.3 equiv) at 10 Bar of H_2 for 24 h without an improvement of the progress of the debenzylation.

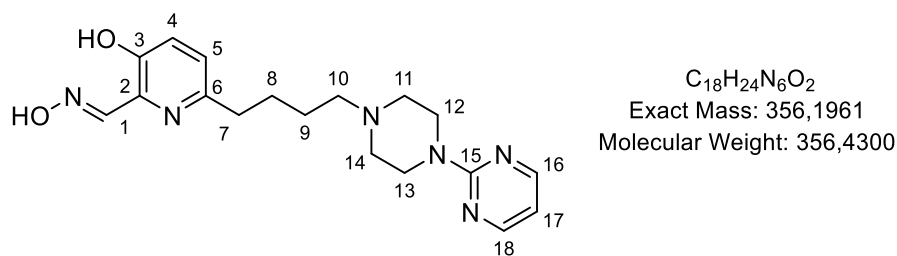
Finally, all the crude reaction products (2.25 g) were dissolved in ACN (46 mL) and stirred in a hydrogenation reactor at 3 Bar of H_2 overnight. The solution was filtered on a celite pad and purified by flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) to yield the desired phenol **24** (510 mg, 32%) as a brown solid.

R_f = 0.5 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 386 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{20}H_{28}N_5O_3]^+$ 386.2187, found 386.2200.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.52-1.77 (m, 4H, H_8, H_9), 2.45 (br t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{10}), 2.55 (br t, $J = 5.0$ Hz, 4H, H_{11}, H_{14}), 2.74 (br t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_7), 3.80-3.89 (m, 4H, H_{12}, H_{13}), 4.05-4.28 (m, 4H, CH_2-O), 5.88 (s, 1H, H_1), 6.48 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H_{17}), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_5), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_4), 8.30 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, H_{16}, H_{18}) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 26.0 (C_9), 28.1 (C_8), 37.2 (C_7), 43.4 (C_{12}, C_{13}), 52.9 (C_{11}, C_{14}), 58.4 (C_{10}), 65.3 (CH_2-O), 106.1 (C_1), 110.1 (C_{17}), 124.5 (C_5), 125.8 (C_4), 137.8 (C_2), 150.8 (C_3), 153.3 (C_6), 157.9 (C_{16}, C_{18}), 161.7 (C_{15}) ppm

3-Hydroxy-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde oxime (**AB647**, **PDG-077**)



The general procedure F was carried out on the acetal **24** (481 mg, 1.25 mmol). The extraction of the aqueous phase was repeated thrice with DCM/EtOAc (4/1 v/v). The flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) yielded the aldehyde **25** (324 mg, 76%) as a yellow oil which darkens. $R_f = 0.72$ (DCM/MeOH 85/15 v/v) from the reaction mixture in H_2O/HCO_2H .

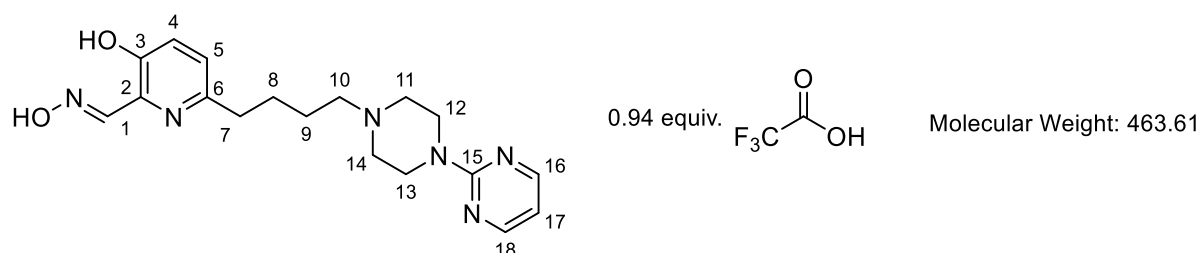
The general procedure G was carried out on this aldehyde **25** (324 mg, 0.95 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) the oxime **AB647** (309 mg, 91%) as a white solid.

$R_f = 0.51$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 357 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{18}H_{25}N_6O_2]^+$ 357.2034, found 357.2031.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ (+ MeOD)) δ 1.38-1.61 (m, 4H, H_9, H_8), 2.23-2.31 (m, 2H, H_{10}), 2.37 (br t, $J = 4.9$ Hz, 4H, H_{11}, H_{14}), 2.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_7), 3.60 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H, H_{12}, H_{13}), 6.37 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H_{17}), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 8.10 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, H_{16}, H_{18}) 8.17 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$ (+MeOD)) δ 25.8 (C_9), 27.8 (C_8), 36.6 (C_7), 43.2 (C_{12}, C_{13}), 52.8 (C_{11}, C_{14}), 58.4 (C_{10}), 109.9 (C_{17}), 123.8 (C_5), 124.6 (C_4), 134.9 (C_2), 152.3 (C_1), 152.9 (C_3), 157.6 (C_{16}, C_{18}), 161.2 (C_{15}) ppm

1-(4-(5-Hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)butyl)-4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate (**AB647 TFA**)



The oxime **AB647** (119 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in a vial in THF/MeOH (HPLC grade) (4.0/2.0 mL) and TFA (0.5 M in ACN (HPLC grade) : 0.1 mL TFA in 2.6 mL ACN) (0.66 mL, 0.33 mmol, 1.0 equiv) was added. After several hours, the solution was concentrated under reduced pressure to yield the trifluoroacetate salt **AB647 TFA** (143 mg) as a yellow solid. 0.94 equivalents of TFA were added according to two methods : the mass difference measured in the vial and the 2.89 mM TFA concentration calculated for 1.0 mg of product in 0.70 mL of DMSO-*d*₆ thanks to the quantitative NMR calibration curve. The calculation was based on the CF₃ peak area integral in the ¹⁹F NMR (282.4 MHz) spectrum of **AB647 TFA** in using the same parameters used for the NMR calibration curve.

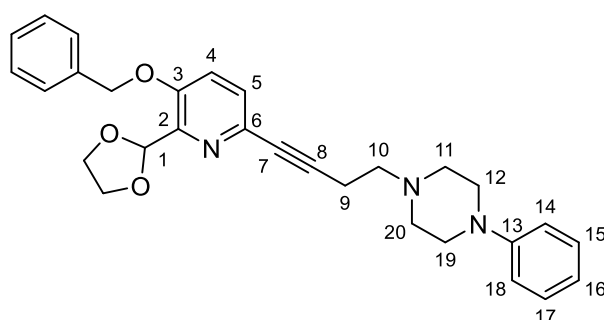
LC-MS (ESI+) (Method F) *t*_r (min), relative area (%), *m/z* : 0.530, 79.20, 357 [M+H]⁺ ; 1.797, 18.84, 357 [M+H]⁺. Purity : 98.04%.

¹⁹F NMR (282.4 MHz, MeOD) δ -76.9 (s, CF₃) ppm

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.70-1.90 (m, 4H, H₈, H₉), 2.72-2.86 (m, 2H, H₇), 3.05-3.64 (m, 8H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄), 3.16-3.26 (m, 2H, H₁₀), 6.72 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H₁₇), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.29 (s, 1H, H₁), 8.40 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H₁₆, H₁₈) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 24.4 (C₉), 27.8 (C₈), 36.8 (C₇), 42.0 (C₁₂, C₁₃), 52.7 (C₁₁, C₁₄), 57.9 (C₁₀), 112.8 (C₁₇), 118.1 (q, *J* = 294 Hz, CF₃), 125.5 (C₅), 126.2 (C₄), 136.5 (C₂), 152.5 (C₁), 153.5 (C₆), 153.9 (C₃), 159.3 (C₁₆, C₁₈), 162.3 (C₁₅), 163.0 (q, *J* = 34 Hz, CO₂H) ppm

1-(4-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-yl)-4-phenylpiperazine (**18**)



C₂₉H₃₁N₃O₃
Exact Mass: 469,2365
Molecular Weight: 469,5850

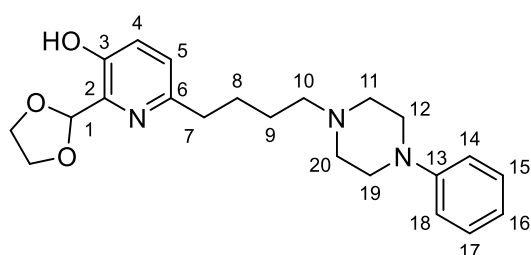
The general procedure E was carried out on the alcohol **4a** (4.00 g, 12.3 mmol) and N-phenylpiperazine (2.81 mL, 18.4 mmol) to yield after a flash chromatography (PE/EtOAc 100/0→65/35 v/v) a mixture of the compound **18** and a secondary product (4.26 g, 63%) as a brown solid.

*R*_f = 0.16 (EtOAc/PE 8/2 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 470 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₂₉H₃₂N₃O₃]⁺ 470.2438, found 470.2441.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.68-2.91 (m, 8H, H₉, H₁₁, H₂₀, H₁₀), 3.23-3.37 (m, 4H, H₁₂, H₁₉), 4.05-4.37 (m, 4H, CH₂-O), 5.23 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.37 (s, 1H, H₁), 6.97 (br t, *J* = 7.3Hz, 1H, H₁₆), 7.01-7.08 (m, 2H, H₁₄, H₁₈), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₄), 7.33-7.55 (m, 8H, H₅, H₁₅, H₁₇, H_{Ph}) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 17.7 (C₉), 49.1 (C₁₂, C₁₉), 52.9 (C₁₁, C₂₀), 56.9 (C₁₀), 65.9 (CH₂-O), 70.7 (CH₂-Ph), 81.0 (C₇), 87.2 (C₈), 101.2 (C₁), 116.2 (C₁₄, C₁₈), 119.9 (C₁₆), 120.1 (C₄), 127.5 (C_{Ph/ortho}), 128.3 (C₅), 128.4 (C_{Ph/para}), 128.8 (C_{Ph/meta}), 129.2 (C₁₅, C₁₇), 135.0 (C₆), 135.9 (C_{Ph/quat.}), 146.7 (C₂), 151.3 (C₁₃), 152.7 (C₃) ppm

2-(1,3-dioxolan-2-yl)-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)pyridin-3-ol (**19**)



C₂₂H₂₉N₃O₃
Exact Mass: 383,2209
Molecular Weight: 383,4920

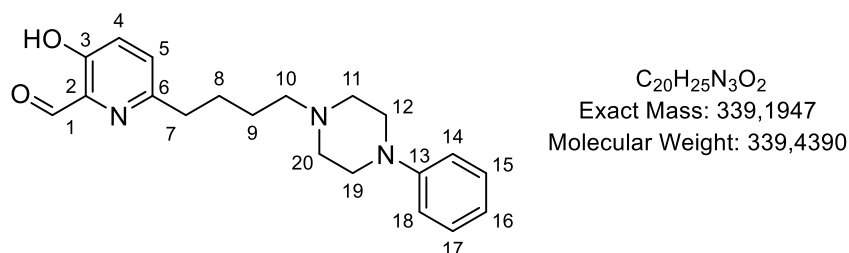
The mixture of the benzylated substrate **18** and a secondary product (3.98 g, 7.28 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (40 mL) under argon and Pd(OH)₂ was added. The solution was submitted to three cycles of reduced pressure followed by a H₂ filling and the solution was stirred under H₂ at r.t. and atmospheric pressure during 9 days with a TLC control. The solution was filtered on a celite pad and purified by flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) to yield the desired phenol **19** (1.65 g, 59%) as a clear orangeish brown solid.

R_f = 0.47 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 384 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₂₂H₃₀N₃O₃]⁺ 384.2282, found 384.2274.

¹H NMR (300 MHz, MeOD (+CDCl₃)) δ 1.64-1.78 (m, 4H, H₈, H₉), 2.70 (br t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₇), 2.80-2.87 (m, 2H, H₁₀), 2.99-3.06 (m, 4H, H₁₁, H₂₀), 3.28-3.33 (m, 4H, H₁₂, H₁₉), 3.96-4.08 (m, 2H, CH₂-O), 4.15-4.27 (m, 2H, CH₂-O), 6.03 (s, 1H, H₁), 6.84-6.90 (m, 1H, H₁₆), 6.91-6.97 (m, 2H, H₁₄, H₁₈), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 7.20-7.27 (m, 2H, H₁₅, H₁₇) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD (+CDCl₃)) δ 25.0 (C₉), 28.1 (C₈), 36.7 (C₇), 48.5 (C₁₂, C₁₉), 53.1 (C₁₁, C₂₀), 58.1 (C₁₀), 66.2 (CH₂-O), 102.4 (C₁), 117.5 (C₁₄, C₁₈), 121.7 (C₁₆), 125.4 (C₅), 125.9 (C₄), 129.9 (C₁₅, C₁₇), 141.6 (C₂), 151.2 (C₁₃), 151.9 (C₃), 152.6 (C₆) ppm

3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde (**21**)



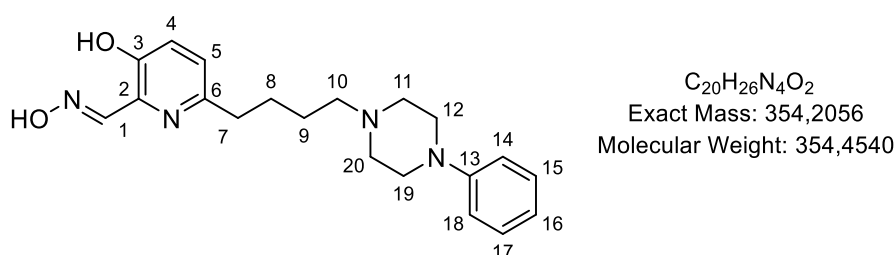
The general procedure F was carried out on the acetal **19** (1.45 g, 3.78 mmol). The extraction of the aqueous phase was repeated four times with DCM and $CHCl_3$. The flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) yielded the aldehyde **21** (790 mg, 62%) as a crystalline white solid.

R_f = 0.88 (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 340 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{20}H_{26}N_3O_2]^+$ 340.2020, found 340.2035.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.52-1.64 (m, 2H, H_9), 1.71-1.82 (m, 2H, H_8), 2.42 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H_{10}), 2.55-2.60 (m, 4H, H_{11} , H_{20}), 2.81 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H_7), 3.16-3.21 (m, 4H, H_{12} , H_{19}), 6.83 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_{16}), 6.88-6.94 (m, 2H, H_{14} , H_{18}), 7.20-7.35 (m, 4H, H_5 , H_4 , H_{15} , H_{17}), 10.02 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 26.5 (C_9), 27.6 (C_8), 37.2 (C_7), 49.1 (C_{12} , C_{19}), 53.3 (C_{11} , C_{20}), 58.5 (C_{10}), 116.0 (C_{14} , C_{18}), 119.7 (C_{16}), 126.4 (C_4), 129.1 (C_{15} , C_{17}), 129.8 (C_5), 135.7 (C_2), 151.3 (C_{13}), 154.8 (C_6), 157.0 (C_3), 198.8 (C_1) ppm

3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde oxime (**AB745**, **PDG-039**)



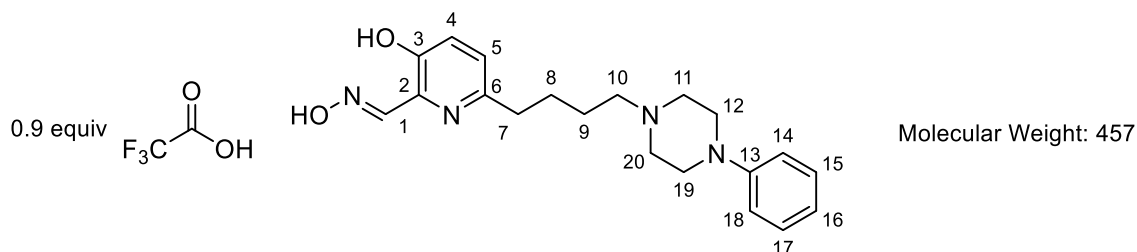
The general procedure G was carried out on the aldehyde **21** (715 mg, 2.10 mmol). The flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) yielded the oxime **AB745** (603 mg, 81%) as a white solid.

R_f = 0.77 (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 355 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{20}H_{27}N_4O_2]^+$ 355.2129, found 355.2127.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃ (+MeOD)) δ 1.45-1.58 (m, 2H, H₉), 1.58-1.70 (m, 2H, H₈), 2.40 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₁₀), 2.52-2.59 (m, 4H, H₁₁, H₂₀), 2.70 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₇), 3.08-3.15 (m, 4H, H₁₂, H₁₉), 6.78 (tt, *J* = 7.3 Hz, 0.9 Hz, 1H, H₁₆), 6.82-6.88 (m, 2H, H₁₄, H₁₈), 6.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 7.10-7.21 (m, 3H, H₄, H₁₅, H₁₇), 8.30 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃ (+MeOD)) δ 25.9 (C₉), 27.9 (C₈), 36.8 (C₇), 48.9 (C₁₂, C₁₉), 53.0 (C₁₁, C₂₀), 58.4 (C₁₀), 116.3 (C₁₄, C₁₈), 120.1 (C₁₆), 123.8 (C₅), 124.6 (C₄), 129.1 (C₁₅, C₁₇), 135.0 (C₂), 151.0 (C₁₃), 152.3 (C₃), 152.6 (C₁), 153.0 (C₆) ppm

3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde oxime 2,2,2-trifluoroacetate (**AB745 TFA**)



The oxime **AB745** (370 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in a vial in DCM/MeOH (HPLC grade) (2.0/2.0 mL) and TFA (2.0 M in MeOH (HPLC grade) : 0.15 mL TFA in 1.0 mL MeOH) (0.50 mL, 1.00 mmol, 1.0 equiv) was added. After one hour, the solution was concentrated under reduced pressure to yield the trifluoroacetate salt **AB745 TFA** (480 mg) as a clear yellow solid. 0.9 equivalents of TFA were added according to two methods : the mass difference measured in the vial and the 3.5 mM TFA concentration calculated for 1.35 mg of product in 0.75 mL of DMSO-*d*₆ thanks to the quantitative NMR calibration curve. The calculation was based on the CF₃ peak area integral in the ¹⁹F NMR (282.4 MHz) spectrum of **AB745 TFA** in using the same parameters used for the NMR calibration curve.

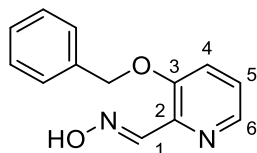
LC-MS (ESI+) (Method H) *t*_r (min), relative area (%), *m/z* : 3.667, 99.34, 355 [M+H]⁺.

¹⁹F NMR (282.4 MHz, MeOD) δ -73.4 (s, CF₃) ppm

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.80 (quint, *J* = 3.7 Hz, 4H, H₈, H₉), 2.80 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₇), 3.19-3.26 (m, 2H, H₁₀), 2.95-4.00 (m, 8H, H₁₁, H₁₂, H₁₉, H₂₀) 6.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₁₆), 7.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁₄, H₁₈), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 7.28 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₁₅, H₁₇), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.30 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 24.4 (C₉), 27.8 (C₈), 36.8 (C₇), 53.1 (C₁₁, C₁₂, C₁₉, C₂₀), 57.7 (C₁₀), 118.0 (C₁₄, C₁₈), 118.1 (q, *J* = 293 Hz, CF₃), 122.4 (C₁₆), 125.5 (C₅), 126.2 (C₄), 130.3 (C₁₅, C₁₇), 136.5 (C₂), 151.1 (C₁₃), 152.6 (C₁), 153.5 (C₆), 153.9 (C₃), 163.0 (q, *J* = 34 Hz, CO₂H) ppm

3-(Benzyloxy)picolinaldehyde oxime (**32**)



C₁₃H₁₂N₂O₂
Exact Mass: 228,0899
Molecular Weight: 228,2510

The general procedure A was carried out on the phenol **9** (0.77 g, 5.03 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/EtOAc 10/0→9/1 v/v) the desired benzylated compound **30** (0.99 g, 81%) as a yellow solid. *R_f* = 0.47 (DCM/EtOAc 9/1 v/v). **TLC-MS** (ESI+) *m/z* : 266 [M+Na]⁺.

The general procedure B was carried out on this ester **30** (0.99 g, 4.07 mmol) to yield the desired aldehyde **31** (0.87 g, 4.07 mmol) as a viscous yellow oil.

The general procedure G was carried out on this aldehyde **31** (0.87 g, 4.07 mmol) in DCM. The crude reaction product was dissolved in DCM and this organic phase was washed with water. This aqueous phase was extracted with DCM and the gathered organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by a flash chromatography (DCM/EtOH 10/0→9/1 v/v, then DCM/MeOH 95/5 v/v) to yield the oxime **32** (368 mg, 40% over two steps) as a white solid.

R_f = 0.47 (DCM/MeOH 95/5 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 229 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₃H₁₃N₂O₂]⁺ 229.0972, found 229.0981.

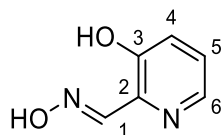
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.22 (s, 2H, CH₂-Ph), 7.29-7.51 (m, 6H, H_{Ph}, H₅), 7.60 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.1 Hz, 1H, H₄), 8.18 (dd, *J* = 4.5 Hz, 1.1 Hz, 1H, H₆), 8.35 (s, 1H, H₁), 11.58 (s, 1H, N-OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 69.6 (CH₂-Ph), 120.7 (C₄), 124.8 (C₅), 127.6 (C_{Ph/ortho}), 128.0 (C_{Ph/para}), 128.6 (C_{Ph/meta}), 136.4 (C_{Ph/quat.}), 140.5 (C₂), 141.5 (C₆), 144.9 (C₁), 152.9 (C₃) ppm

Compound a priori reported in the following reference but no spectroscopic data are available : Manna, F.; Bolasco, A.; Bizzarri, B.; Lena, R.; Chimenti, F.; Filippelli, A.; Palla, A.; Fontana, M. Synthesis and Beta-Adrenoreceptor Blocking Activity of [[3-(Alkylamine)-2-Hydroxypropyl]Oximino]Pyridines

and O[3-(Alkylamine)-2-Hydroxypropyl]Methylpyridine Ketone Oximes Derivatives. *Farmaco* **1996**, *51* (8–9), 579–587.

3-hydroxypicolinaldehyde oxime (**PDG-149**)



$C_6H_6N_2O_2$
Exact Mass: 138,0429
Molecular Weight: 138,1260

The benzylated compound **32** (348 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in THF (40 mL) with some millilitres of EtOAc and MeOH at 35°C. Pd/C (10%) (243 mg, 0.23 mmol, 0.15 equiv) was added under argon and the solution was submitted to three cycles of reduced pressure followed by a H₂ filling. The solution was stirred under H₂ for 3 hours. The progress of the reaction was controlled by TLC-MS (ESI+) m/z : 139 [M+H]⁺; R_f = 0.63 (DCM/MeOH 9/1 v/v).

The solution was filtered on a celite pad with DCM/MeOH (1/1 v/v) and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) to yield the phenol **PDG-149** (143 mg, 69%) as a white solid.

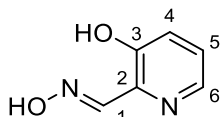
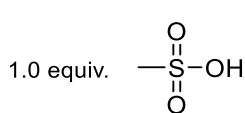
R_f = 0.63 (DCM/MeOH 9/1 v/v). M_p = 179.9 °C. **MS** (ESI+) m/z (%): 139 (20) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₆H₇N₂O₂]⁺ 139.0502, found 139.0497.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.27 (dd, J = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 1H, H₅), 7.36 (dd, J = 8.4 Hz, 1.4 Hz, 1H, H₄), 8.11 (dd, J = 4.5 Hz, 1.4 Hz, 1H, H₆), 8.29 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 125.6 (C₄), 126.1 (C₅), 137.4 (C₂), 141.8 (C₆), 152.4 (C₁), 155.7 (C₃) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the reference : Louise-Leriché, L.; Păunescu, E.; Saint-André, G.; Baati, R.; Romieu, A.; Wagner, A.; Renard, P.-Y. A HTS Assay for the Detection of Organophosphorus Nerve Agent Scavengers. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (11), 3510–3523

3-hydroxypicolinaldehyde oxime methanesulfonate (**PDG-149 MeSO₃H**)



$C_7H_{10}N_2O_5S$
Molecular Weight: 234,23

The general procedure H was carried out on the oxime **PDG-149** (20.0 mg, 0.14 mmol) to yield the methanesulfonate salt **PDG-149 MESO₃H** (31.7 mg) as a clear yellow solid. 1.0 equivalent of

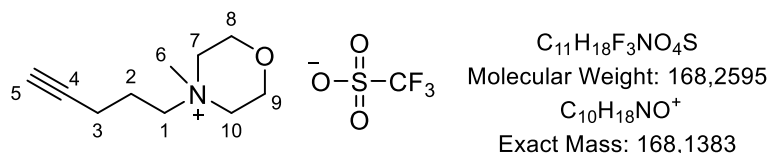
methanesulfonic acid was added according to the NMR integration and the difference of mass measured.

HPLC (Method C) t_r (min), relative area (%): 9.573, 99.38.

^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 2.71 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$), 7.86 (dd, $J = 8.7$ Hz, 5.5 Hz, 1H, H_5), 8.02 (dd, $J = 8.7$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H_4), 8.25 (dd, $J = 5.5$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H_6), 8.44 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 39.5 ($\text{CH}_3\text{-S}$), 128.6 (C_5), 133.7 (C_4), 134.4 (C_2), 134.6 (C_6), 139.3 (C_1), 156.2 (C_3) ppm

4-Methyl-4-(pent-4-yn-1-yl)-4 λ^5 -morpholino trifluoromethanesulfonate (**36**)



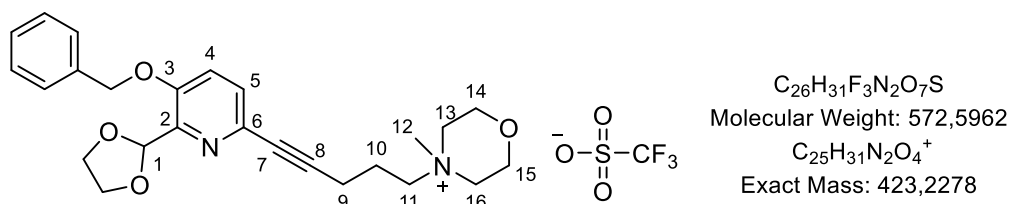
The general procedure I was carried out on 4-pentyn-1-ol **5b** (0.78 mL, 8.40 mmol) and N-methylmorpholine (0.83 mL, 7.56 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) the ammonium **36b** (1.79 g, 75%) as a very viscous clear yellow oil or a white solid (depending of the solvent traces and humidity).

$R_f = 0.39$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 168 (100) $[\text{M}]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}]^+$ 168.1383, found 168.1380.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 (+MeOD)) δ 1.90-2.02 (m, 2H, H_2), 2.08 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H_5), 2.34 (dt, $J = 6.5$ Hz, 2.6 Hz, 2H, H_3), 3.17 (s, 3H, H_6), 3.35-3.48 (m, 4H, H_7 , H_{10}), 3.49-3.57 (m, 2H, H_1), 3.95 (br s, 3H, H_8 , H_9) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 (+MeOD)) δ 15.4 (C_3), 20.7 (C_2), 47.1 (C_6), 60.2 (C_7 , C_{10}), 60.6 (C_8 , C_9), 64.7 (C_1), 71.0 (C_5), 81.4 (C_4), 120.6 (q, $J = 320$ Hz, CF_3) ppm

4-(5-(5-(Benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)pent-4-yn-1-yl)-4-methyl-4 λ^5 -morpholino trifluoromethanesulfonate (**37**)



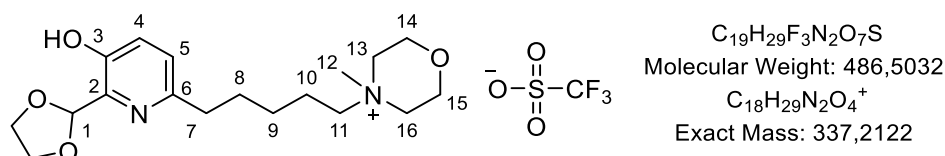
The general procedure J was carried out on the brominated compound **8** (713 mg, 2.12 mmol) and the alkyne **36** (674 mg, 2.12 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) the desired product **37** (953 mg, 78%) as a foamy and gummy orange solid.

R_f = 0.42 (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 423 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{25}H_{31}N_2O_4]^+$ 423.2278, found 423.2290.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.00-2.15 (m, 2H, H_{10}), 2.57 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H_9), 3.24 (s, 3H, H_{12}), 3.40-3.54 (m, 4H, H_{13} , H_{16}), 3.59-3.68 (m, 2H, H_{11}), 3.93-3.99 (m, 4H, H_{14} , H_{15}), 3.91-4.19 (m, 4H, CH_2-O), 5.11 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.17 (s, 1H, H_1), 7.22 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H_4), 7.29-7.43 (m, 6H, H_{Ph} , H_5) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 16.4 (C_9), 20.8 (C_{10}), 47.1 (C_{12}), 60.2 (C_{13} , C_{16}), 60.6 (C_{14} , C_{15}), 64.6 (C_{11}), 65.8 (CH_2-O), 70.7 (CH_2-Ph), 81.8 (C_7), 86.4 (C_8), 100.7 (C_1), 120.6 (q, J = 320 Hz, CF_3), 120.6 (C_4), 127.6 (C_{Ph}), 128.5 (C_{Ph}), 128.8 (C_{Ph}), 129.0 (C_5), 134.1 (C_6), 135.7 ($C_{Ph/quat.}$), 146.3 (C_2), 153.1 (C_3) ppm

4-(5-(6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-hydroxypyridin-2-yl)pentyl)-4-methylmorpholin-4-ium trifluoromethanesulfonate (**38**)



The benzylated compound **37** (1.55 g, 2.7 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (27 mL) and $Pd(OH)_2$ (20%) (379 mg, 0.54 mmol, 0.2 equiv) was added under argon. The solution was submitted to three cycles of reduced pressure followed by a H_2 filling. The solution was stirred under H_2 for 1h10 with a regular TLC control to avoid the formation of the secondary product.

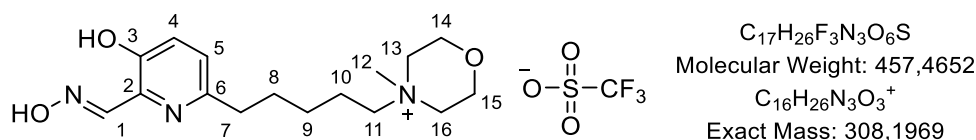
The solution was filtered on a celite pad with DCM/MeOH (1/1 v/v) and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) to yield the phenol **38** (985 mg, mixture) as a very viscous colourless oil.

$R_f = 0.38$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 337 (100) $[M]^+$, 369 (10) $[M+MeOH]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{18}H_{29}N_2O_4]^+$ 337.2122, found 337.2125.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ (+MeOD)) δ 1.30 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_9), 1.58-1.72 (m, 4H, H_8 , H_{10}), 2.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_7), 3.05 (s, 3H, H_{12}), 3.22-3.28 (m, 2H, H_{11}), 3.29-3.35 (m, 4H, H_{13} , H_{16}), 3.82-3.90 (m, 4H, H_{14} , H_{15}), 3.95-4.18 (m, 4H, CH_2-O) 5.85 (s, 1H, H_1), 7.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_5), 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$ (+MeOD)) δ 20.9 (C_{10}), 25.3 (C_9), 28.9 (C_8), 36.0 (C_7), 46.4 (C_{12}), 59.8 (C_{13} , C_{16}), 60.5 (C_{14} , C_{15}), 65.2 (CH_2-O), 65.8 (C_{11}), 103.5 (C_1), 120.3 (q, $J = 317$ Hz, CF_3), 124.7 (C_5), 125.7 (C_4), 138.9 (C_2), 150.8 (C_3), 152.2 (C_6) ppm

4-(5-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)pentyl)-4-methylmorpholin-4-ium trifluoromethanesulfonate (**26**, **PDG-036**)



The general procedure F was carried out on the acetal **38** (985 mg, mixture). The flash chromatography (DCM/MeOH 10/0 \rightarrow 9/1 v/v) yielded the aldehyde **40** (658 mg, mixture) as a colourless viscous oil which darkens to the concentration.

$R_f = 0.24$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 293 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{16}H_{25}N_2O_3]^+$ 293.1865, found 293.1864.

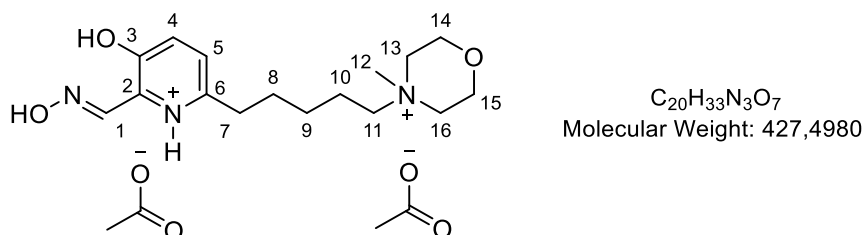
The general procedure G was carried out on this aldehyde **40** (658 mg, mixture) to yield after two purifications by flash chromatography (DCM/MeOH 10/0 \rightarrow 9/1 v/v) the oxime **26** (**PDG-036**) (265 mg, 22% over three steps, from **38**) as a clear yellow solid.

$R_f = 0.35$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 308 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{16}H_{26}N_3O_3]^+$ 308.1969, found 308.1980.

1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.42 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_9), 1.70-1.89 (m, 4H, H_8 , H_{10}), 2.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_7), 3.19 (s, 3H, H_{12}), 3.40-3.54 (m, 6H, H_{13} , H_{16} , H_{11}), 3.95-4.02 (m, 4H, H_{14} , H_{15}), 7.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 8.28 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 22.2 (C₁₀), 26.7 (C₉), 30.4 (C₈), 37.3 (C₇), 47.1 (C₁₂), 60.9 (C₁₃, C₁₆), 61.5 (C₁₄, C₁₅), 66.5 (C₁₁), 121.7 (q, J = 320 Hz, CF₃), 125.4 (C₅), 126.0 (C₄), 136.2 (C₂), 152.7 (C₁), 153.7 (C₃), 154.2 (C₆) ppm

4-(5-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-2-yl)pentyl)-4-methylmorpholin-4-ium acetate (**PDG-036A**)



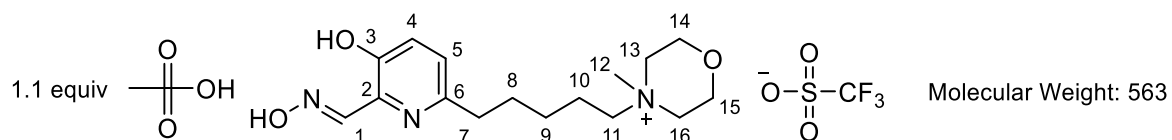
The triflate salt of **26** (30 mg, 66 μmol) was purified by inverse preparative chromatography (Method I), yielding the acetate salt **PDG-036A** (10 mg, 23 μmol) as a hygroscopic orange solid.

HPLC (Method B) t_r (min), relative area (%) : 9.563, 97.84.

^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.42 (quint, J = 7.5 Hz, 2H, H₉), 1.70-1.89 (m, 4H, H₈, H₁₀), 1.91 (s, 6H, CH₃CO₂⁻), 2.77 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H₇), 3.18 (s, 3H, H₁₂), 3.40-3.54 (m, 6H, H₁₃, H₁₆, H₁₁), 3.95-4.02 (m, 4H, H₁₄, H₁₅), 7.17 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H₅), 7.28 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.28 (s, 1H, H₁) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 22.2 (C₁₀), 23.7 (CH₃CO₂⁻), 26.7 (C₉), 30.4 (C₈), 37.3 (C₇), 47.1 (C₁₂), 60.9 (C₁₃, C₁₆), 61.5 (C₁₄, C₁₅), 66.5 (C₁₁), 125.4 (C₅), 126.0 (C₄), 136.4 (C₂), 152.7 (C₁), 153.9 (C₃), 154.2 (C₆) 179.4 (CO₂⁻) ppm

4-(5-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)pentyl)-4-methyl-4 λ^5 -morpholino trifluoromethanesulfonate methanesulfonate (**PDG-036 MsOH**)



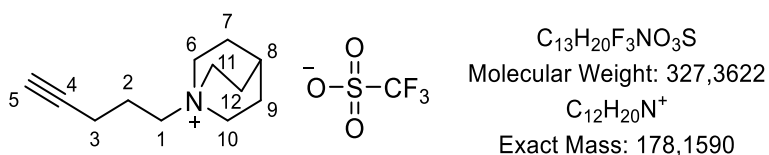
The general procedure H was carried out on the oxime **26** (176 mg, 0.39 mmol) to yield the methanesulfonate salt **PDG-036 MsOH** (217 mg) as a yellow solid. 1.1 equivalent of methanesulfonic acid were added according to the NMR integration and the difference of mass measured.

LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 1.957, 7.53, 308 [M]⁺ ; 2.130, 92.36, 308 [M]⁺.
Purity : 99.89%.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.50 (quint, J = 7.5 Hz, 2H, H₉), 1.77-1.96 (m, 4H, H₈, H₁₀), 2.73 (s, 3H, CH₃-S), 3.05 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H₇), 3.21 (s, 3H, H₁₂), 3.40-3.59 (m, 6H, H₁₃, H₁₆, H₁₁), 3.92-4.06 (m, 4H, H₁₄, H₁₅), 7.79 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H₅), 7.98 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H₄), 8.45 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 22.0 (C₁₀), 26.4 (C₉), 29.8 (C₈), 32.9 (C₇), 39.6 (CH₃-S), 47.2 (C₁₂), 60.9 (C₁₃, C₁₆), 61.5 (C₁₄, C₁₅), 66.2 (C₁₁), 121.7 (q, J = 319 Hz, CF₃), 128.8 (C₅), 132.4 (C₂), 134.7 (C₄), 140.9 (C₁), 150.6 (C₆), 154.6 (C₃) ppm

1-(pent-4-yn-1-yl)quinuclidin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**41**)



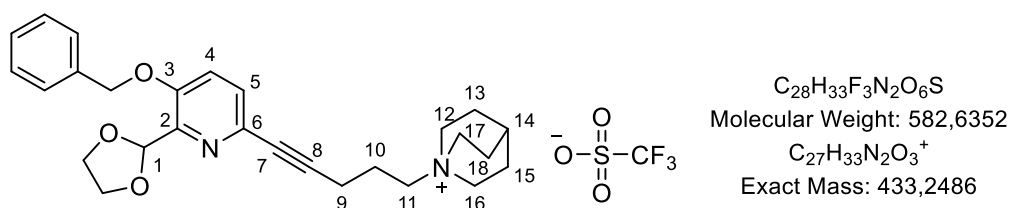
The general procedure I was carried out on 4-pentyn-1-ol **5b** (1.26 mL, 13.5 mmol) and quinuclidine (1.27 g, 11.5 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) the ammonium **41** (3.55 g, 85%) as a white crystalline solid.

R_f = 0.53 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 178 (100) [M]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₂H₂₀N]⁺ 178.1590, found 178.1595.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃ (+MeOD)) δ 1.75-1.86 (m, 2H, H₂), 1.86-1.96 (m, 6H, H₇, H₁₂, H₉), 2.00 (t, J = 2.5 Hz, 1H, H₅), 2.10 (sept, J = 3.1 Hz, H₈), 2.21 (td, J = 6.6 Hz, 2.5 Hz, 2H, H₃), 3.10-3.20 (m, 2H, H₁), 3.28-3.36 (m, 6H, H₆, H₁₁, H₁₀) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃ (+MeOD)) δ 15.4 (C₃), 19.2 (C₈), 20.9 (C₂), 23.6 (C₇, C₁₂, C₉), 54.9 (C₆, C₁₁, C₁₀), 63.3 (C₁), 70.6 (C₅), 81.2 (C₄), 120.3 (q, J = 320 Hz, CF₃) ppm

1-(5-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)pent-4-yn-1-yl)quinuclidin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**42**)



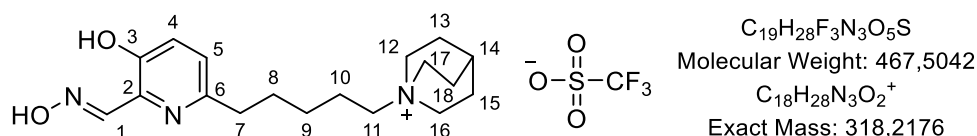
The general procedure J was carried out on the brominated compound **8** (2.66 g, 7.9 mmol) and the alkyne **41** (2.59 g, 7.9 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→8/2 v/v) the desired product **42** (3.10 g, 67%) as a foamy brown solid.

$R_f = 0.55$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 433 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{27}H_{33}N_2O_3]^+$ 423.2486, found 433.2478.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.79-1.97 (m, 8H, H_{10} , H_{13} , H_{15} , H_{18}), 2.01-2.09 (m, 1H, H_{14}), 2.44 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H_9), 3.18-3.27 (m, 2H, H_{11}), 3.30-3.41 (m, 6H, H_{12} , H_{16} , H_{17}), 3.86-3.96 (m, 2H, CH_2-O), 4.01-4.10 (m, 2H, CH_2-O), 5.03 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.11 (s, 1H, H_1), 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_4), 7.24-7.40 (m, 6H, H_5 , H_{Ph}) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 16.4 (C_9), 19.1 (C_{14}), 21.0 (C_{10}), 23.6 (C_{13} , C_{15} , C_{18}), 54.7 (C_{12} , C_{16} , C_{17}), 63.2 (C_{11}), 65.6 (CH_2-O), 70.4 (CH_2-Ph), 81.5 (C_7), 86.1 (C_8), 100.8 (C_1), 120.4 (C_4), 120.7 (q, $J = 322$ Hz, CF_3), 127.4 (C_{Ph}), 128.2 (C_{Ph}), 128.6 (C_{Ph}), 128.9 (C_5), 134.0 (C_6), 135.5 ($C_{Ph/quat.}$), 146.1 (C_2), 152.8 (C_3) ppm

1-(5-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)pentyl)quinuclidin-1-ium
trifluoromethanesulfonate (**29**, **PDG-121**)



The benzylated compound **42** (1.61 g, 2.76 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry ACN (28 mL) and $Pd(OH)_2$ (20%) (582 mg, 0.83 mmol, 0.3 equiv) was added under argon. The solution was submitted to three cycles of reduced pressure followed by a H_2 filling. The solution was stirred under H_2 for 24 h with a regular TLC control to avoid the formation of the secondary product.

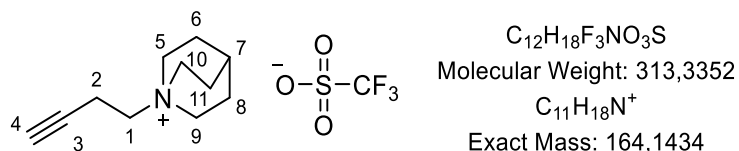
The solution was filtered on a celite pad with DCM/MeOH (1/1 v/v) and concentrated under reduced pressure to yield the phenol **43** (1.24 g, mixture) as a very viscous yellow oil.

$R_f = 0.50$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 347 (100) $[M]^+$, 379 (20) $[M+MeOH]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{20}H_{31}N_2O_3]^+$ 347.2329, found 347.2341.

The general procedure F was carried out on the acetal **43** (1.24 g, mixture). The flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→94/6 v/v) yielded the aldehyde **44** (837 mg, mixture) as a viscous yellow oil which darkens to the concentration.

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 20.8 (br t, *J* = 4 Hz, C₁₄), 22.7 (C₁₀), 24.8 (C₁₃, C₁₅, C₁₈), 26.8 (C₉), 30.0 (C₈), 33.0 (C₇), 39.6 (CH₃-S), 55.7 (br s, C₁₂, C₁₆, C₁₇), 65.2 (br s, C₁₁), 121.7 (q, *J* = 320 Hz, CF₃), 128.8 (C₅), 132.8 (C₂), 134.7 (C₄), 140.7 (C₁), 150.7 (C₆), 154.7 (C₃) ppm

1-(but-3-yn-1-yl)quinuclidin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**45**)



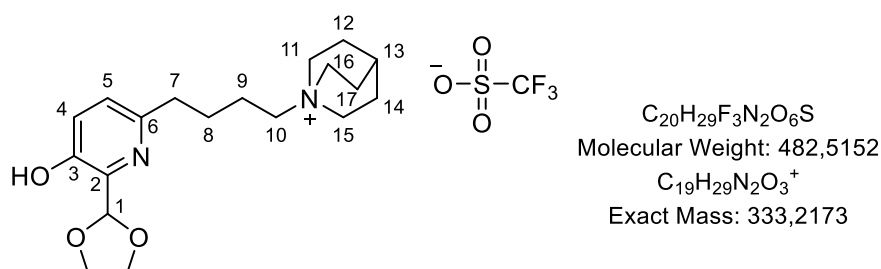
The general procedure I was carried out on 4-butyn-1-ol **5a** (1.02 mL, 13.5 mmol) and quinuclidine (1.43 g, 12.8 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→96/4 v/v) the ammonium **45** (3.50 g, 83%) as a white solid.

R_f = 0.36 (DCM/MeOH 95/5 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 164 (100) [M]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₁H₁₈N]⁺ 164.1434, found 164.1430.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.95-2.07 (m, 6H, H₆, H₁₁, H₈), 2.17 (sept, *J* = 3.3 Hz, 1H, H₇), 2.56 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₄), 2.76 (td, *J* = 7.4 Hz, 2.6 Hz, 2H, H₂), 3.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₁), 3.44-3.54 (m, 6H, H₅, H₁₀, H₉) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 13.7 (C₂), 20.7 (C₇), 24.7 (C₆, C₁₁, C₈), 55.9 (C₅, C₁₀, C₉), 63.3 (C₁), 73.0 (C₄), 79.7 (C₃), 121.7 (q, *J* = 318 Hz, CF₃) ppm

1-(4-(6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)quinuclidin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**47**)



The general procedure J was carried out on the brominated compound **8** (1.38 g, 4.1 mmol) and the alkyne **45** (1.16 g, 3.7 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) a mixture (412 mg) of the desired product **46** and a by-product of the quinuclidine (25% according to the NMR) as a foamy brown solid.

$R_f = 0.44$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 419 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{26}H_{31}N_2O_3]^+$ 419.2329, found 419.2332.

This mixture (505 mg) containing the benzylated compound **46** was dissolved in ACN (7 mL) in a Teflon vessel of a hydrogenation reactor. $Pd(OH)_2$ (20%) (92 mg, 0.13 mmol) was added under argon and the reactor was closed. The reactor was subjected to three cycles vacuum-hydrogen and finally filled with hydrogen at 10 Bar. The solution was stirred under H_2 for 7 h with a TLC control.

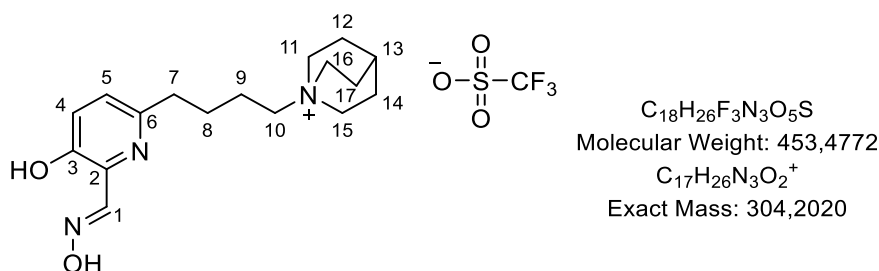
The solution was filtered on a celite pad with DCM/MeOH (1/1 v/v) and concentrated under reduced pressure to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) the phenol **47** (148 mg, mixture) as a clear yellow oil.

$R_f = 0.63$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 333 (45) $[M]^+$, 365 (15) $[M+MeOH]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{19}H_{29}N_2O_3]^+$ 333.2173, found 333.2177.

1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.60-1.79 (m, 4H, H_8, H_9), 1.88-2.02 (m, 6H, H_{12}, H_{17}, H_{14}), 2.12 (sept, $J = 3.2$ Hz, 1H, H_{13}), 2.70-2.82 (m, 2H, H_7), 3.07-3.17 (m, 2H, H_{10}), 3.32-3.41 (m, 6H, H_{11}, H_{16}, H_{15}), 3.95-4.29 (m, 4H, CH_2-O), 6.05 (s, 1H, H_1), 7.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 20.7 (br t, $J = 4$ Hz, C_{13}), 22.2 (C_9), 24.7 (C_{12}, C_{14}, C_{17}), 27.8 (C_8), 36.4 (C_7), 55.6 (br s, C_{11}, C_{16}, C_{15}), 65.1 (br s, C_{10}), 66.5 (CH_2-O), 102.0 (C_1), 121.8 (q, $J = 318$ Hz, CF_3), 125.9 (C_5), 126.3 (C_4), 142.3 (C_2), 152.3 (C_3), 152.7 (C_6) ppm

1-(4-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)butyl)quinuclidin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**28**, PDG-087)



The general procedure F was carried out on the acetal **47** (148 g, mixture). The flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→9/1 v/v) yielded a mixture (95 mg) of a secondary product (33% according to the NMR) and the aldehyde **48** as a very clear yellow solid.

$R_f = 0.49$ (DCM/MeOH 8/2 v/v) from the reaction mixture H_2O/HCO_2H . **MS** (ESI+) m/z (%): 289 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{17}H_{25}N_2O_2]^+$ 289.1911, found 289.1918.

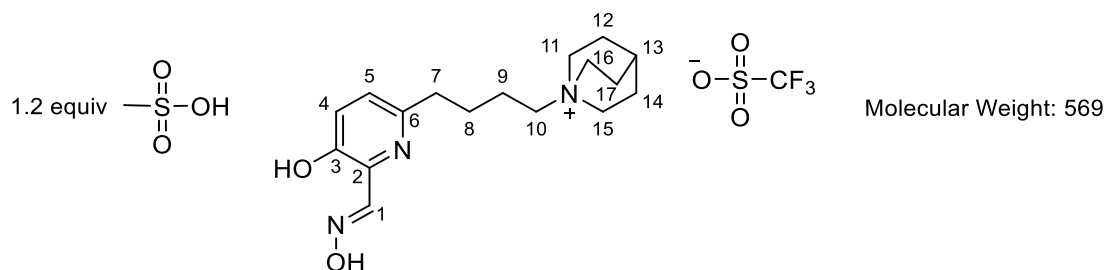
The general procedure G was carried out on this mixture (95 mg) containing the aldehyde **48** to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) the oxime **28 (PDG-087)** (59 mg) as a very clear yellow crystalline solid.

$R_f = 0.51$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 304 (100) $[M]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M]^+$ calcd for $[C_{17}H_{26}N_3O_2]^+$ 304.2020, found 304.2023.

1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.65-1.81 (m, 4H, H_8, H_9), 1.92-2.04 (m, 6H, H_{12}, H_{17}, H_{14}), 2.15 (sept, $J = 3.2$ Hz, 1H, H_{13}), 2.72-2.85 (m, 2H, H_7), 3.09-3.22 (m, 2H, H_{10}), 3.36-3.45 (m, 6H, H_{11}, H_{16}, H_{15}), 7.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_5), 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 8.28 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 20.8 (C_{13}), 22.5 (C_9), 24.8 (C_{12}, C_{14}, C_{17}), 27.8 (C_8), 36.8 (C_7), 55.7 (C_{11}, C_{15}, C_{16}), 65.2 (C_{10}), 121.8 (q, $J = 320$ Hz, CF_3), 125.5 (C_5), 126.1 (C_4), 136.4 (C_2), 152.8 (C_1), 153.6 (C_3), 153.9 (C_6) ppm

1-(4-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)butyl)-1 λ^5 -azabicyclo[2.2.2]octan-1-yl trifluoromethanesulfonate methanesulfonate (**PDG-087 MsOH**)



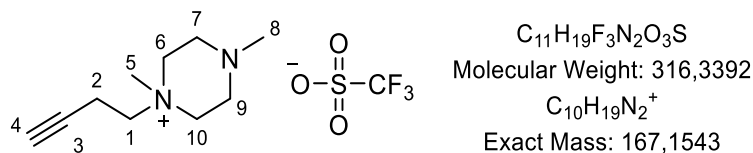
The general procedure H was carried out on the oxime **28** (23 mg, 0.05 mmol) to yield the methanesulfonate salt **PDG-087 MsOH** (28 mg) as a clear yellow solid. 1.2 equivalent of methanesulfonic acid were added according to the NMR integration and the difference of mass measured.

LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 2.290, 2.31, 304 $[M]^+$; 2.487, 97.69, 304 $[M]^+$. Purity : 100%.

1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 1.71-1.92 (m, 4H, H_8, H_9), 1.93-2.07 (m, 6H, H_{12}, H_{17}, H_{14}), 2.10-2.20 (m, 1H, H_{13}), 2.72 (s, 3H, $CH_3\text{-S}$), 3.08 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H_7), 3.15-3.25 (m, 2H, H_{10}), 3.39-3.49 (m, 6H, H_{11}, H_{16}, H_{15}), 7.79 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H_5), 7.98 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H_4), 8.46 (s, 1H, H_1) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 20.8 (C₁₃), 22.6 (C₉), 24.8 (C₁₂, C₁₄, C₁₇), 27.3 (C₈), 32.7 (C₇), 39.6 (CH₃-S), 55.8 (C₁₁, C₁₅, C₁₆), 64.8 (C₁₀), 121.7 (q, *J* = 320 Hz, CF₃), 128.8 (C₅), 133.0 (C₂), 134.7 (C₄), 140.7 (C₁), 149.9 (C₆), 154.8 (C₃) ppm

1-(but-3-yn-1-yl)-1,4-dimethyl-1λ⁵-piperazin-1-yl trifluoromethanesulfonate (**49**)



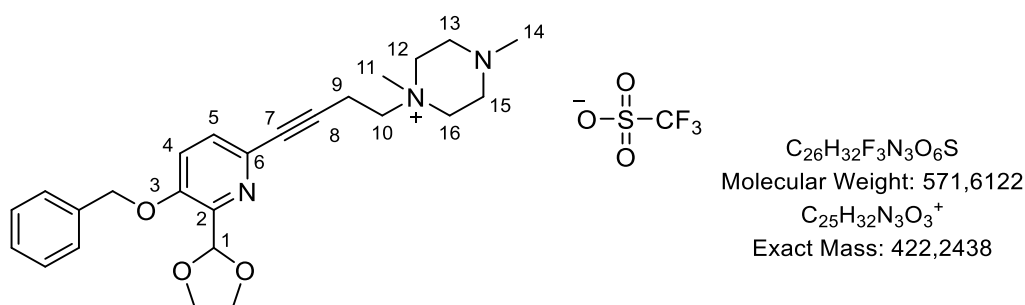
The general procedure I was carried out on 4-butyn-1-ol **5a** (0.70 mL, 7.6 mmol) and N,N-dimethylpiperazine (0.97 mL, 7.2 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) the ammonium **49** (1.84 g, 81%) as a white solid.

R_f = 0.41 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 167 (100) [M]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₀H₁₉N₂]⁺ 167.1543, found 167.1545.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 2.40 (s, 3H, H₈), 2.59 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H₄), 2.69-2.90 (m, 6H, H₂, H₇, H₉), 3.17 (s, 3H, H₅), 3.48-3.60 (m, 4H, H₆, H₁₀), 3.64 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 13.6 (C₂), 45.1 (C₈), 47.4 (C₅), 49.1 (C₇, C₉), 61.6 (C₆, C₁₀), 63.7 (C₁), 73.4 (C₄), 79.5 (C₃), 121.7 (q, *J* = 318 Hz, CF₃) ppm

1-(4-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-yl)-1,4-dimethyl-1λ⁵-piperazin-1-yl trifluoromethanesulfonate (**50**)



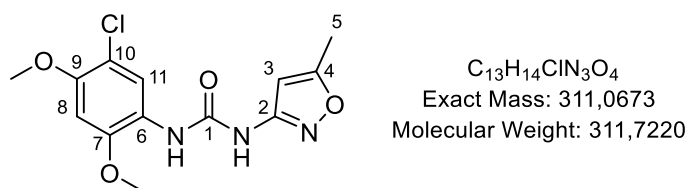
The general procedure J was carried out on the brominated compound **8** (425 mg, 1.26 mmol) and the alkyne **49** (400 mg, 1.26 mmol) during only 6 h, to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→75/25 v/v) the desired product **50** (352 mg, 86%) as a very viscous brown oil.

R_f = 0.57 (DCM/MeOH 7/3 v/v).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 2.41 (s, 3H, H₁₄), 2.70-2.93 (m, 4H, H₁₃, H₁₅), 3.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₉), 3.23 (s, 3H, H₁₁), 3.51-3.63 (m, 4H, H₁₂, H₁₆), 3.74 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₁₀), 3.92-4.15 (m, 4H, CH₂-O), 5.20 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.12 (s, 1H, H₁), 7.30-7.50 (m, 7H, H_{Ph}, H₄, H₅) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 14.4 (C₉), 45.1 (C₁₄), 48.0 (C₁₁), 49.2 (C₁₃, C₁₅), 61.8 (C₁₂, C₁₆), 63.7 (C₁₀), 66.8 (CH₂-O), 71.8 (CH₂-Ph), 83.1 (C₇), 84.3 (C₈), 101.6 (C₁), 121.8 (q, *J* = 318 Hz, CF₃), 122.3 (C₄ or C₅), 128.8 (C_{Ph}), 129.4 (C₄ or C₅), 129.7 (C_{Ph}), 130.1 (C_{Ph}), 134.5 (C₆), 137.3 (C_{Ph}), 147.7 (C₂), 155.2 (C₃) ppm

1-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)urea (**PNU-120596**)



The general procedure K was carried out on the carboxylic acid **89** (1.30 g, 10.2 mmol). The crude reaction product was purified with a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→2/3 v/v) and the product obtained, not yet pure, was then poured in Et₂O/ACN/THF (30 mL/8mL/4mL v/v/v) and heated at 65 °C. The mixture was then cooled to 0 °C and filtered with Et₂O/ACN/THF (10/1.5/0.5) to yield the urea product **PNU-120596** (997 mg, 61%) as a white solid.

R_f = 0.53 (PE/EtOAc 2/3 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 312 (100) [M+H]⁺, 357 (20) [M+EtNH₃]⁺, 375 (40) [M+Na+MeCN]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₃H₁₅³⁵ClN₃O₄]⁺ 312.0751, found 312.0753.

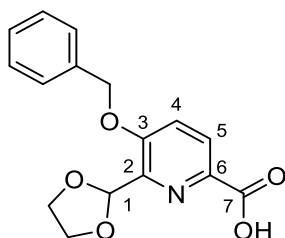
LC-MS (ESI+) (Method D) *t_r* (min), relative area (%), *m/z* : 5.673, 99.78, 312 [M+H]⁺.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.35 (br s, 3H, H₅), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.92 (s, 3H, OMe), 6.48 (s, 1H, H₃), 6.86 (s, 1H, H₈), 8.11 (s, 1H, H₁₁), 8.59 (s, 1H, NH-C₆), 9.90 (s, 1H, NH-C₂) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.1 (C₅), 56.5 (OMe), 95.4 (C₃), 98.1 (C₈), 111.4 (C₁₀), 119.7 (C₁₁), 121.6 (C₆), 147.9 (C₇), 150.1 (C₉), 151.2 (C₁), 158.6 (C₂), 169.2 (C₄) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Kulkarni, A. R.; Garai, S.; Thakur, G. A. Scalable, One-Pot, Microwave-Accelerated Tandem Synthesis of Unsymmetrical Urea Derivatives. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (2), 992–999.

5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)picolinic acid (**90**)



$C_{16}H_{15}NO_5$
Exact Mass: 301,0950
Molecular Weight: 301,2980

Method 1 : : Formic acid (0.035 mL, 1.19 mmol, 2.0 équiv) and acetic anhydride (0.11 mL, 1.19 mmol, 2.0 équiv) are stirred together at 30 °C 1h30. The brominated compound **8** (200 mg, 0.59 mmol, 1.0 equiv), Pd(OAc)₂ (2.7 mg, 0.01 mmol, 0.02 equiv) and xantphos (6.9 mg, 0.01 mmol, 0.02 equiv) were dissolved in dry toluene (1.2 mL) in a dry pressurized reaction flask (5 mL) under argon. Triethylamine (0.16 mL, 1.19 mmol, 2.0 equiv), tert-butanol (0.16 mL, 1.77 mmol, 3.0 equiv) were added. The flask was sealed with a septum the anhydride mixture was added through the septum. The solution was stirred at 75°C 2 h and at r.t. overnight.

The crude reaction product was purified with a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0→9/1 v/v) to yield the carboxylic acid **90** (96 mg, 54%) as an orange foamy solid.

Method 2 : The brominated compound **8** (1.70 g, 5.06 mmol, 1.0 equiv), oxalic acid dihydrate (1.92 g, 15.2 mmol, 3.0 equiv), Pd(OAc)₂ (57 mg, 0.25 mmol, 0.05 equiv) and xantphos (145 mg, 0.25 mmol, 0.05 equiv) were dissolved in dry toluene (25 mL) in a dry pressurized reaction flask (100 mL) under argon. Triethylamine (3.48 mL, 25.8 mmol, 5.1 equiv), tert-butanol (2.58 mL, 27.8 mmol, 5.5 equiv), and acetic anhydride (1.44 mL, 15.2 mmol, 3.0 equiv) were successively and rapidly added in this order without stirring, and the flask was then rapidly sealed. The solution was stirred at 75°C overnight.

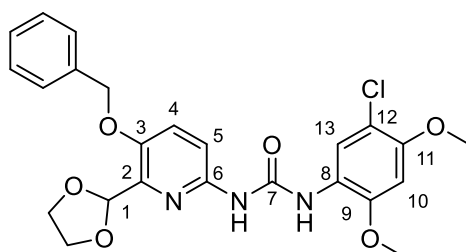
The solution was filtered over celite with DCM and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was dissolved in DCM (50 mL) and extracted with a 1M NaHCO₃ solution (51 mL, 10 equiv) thrice and water twice. The potential precipitate was added in the aqueous phase. The gathered aqueous phases were acidified firstly with concentrated HCl (37%, 12M) (12.7 mL, 30 equiv) under vigorous stirring and then with HCl 10% until the pH was moderately acidic. The aqueous phase was extracted with DCM 5 times and the gathered organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield a mixture (1.41 g) as an orange foamy solid, containing the carboxylic acid **90** and 29% of a by-product with the acetal function degraded, according to the ¹H NMR analyse.

$R_f = 0.59$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 302 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{16}H_{16}NO_5]^+$ 302.1023, found 302.1034.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.00-4.20 (m, 4H, CH_2-O), 5.22 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.29 (s, 1H, H_1), 7.30-7.46 (m, 6H, H_{Ph} , H_4), 8.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_5), 9.40 (br s, 1H, COOH) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 66.1 (CH_2-O), 71.1 (CH_2-Ph), 100.5 (C_1), 120.9 (C_4 or C_5), 126.1 (C_4 or C_5), 127.6 ($C_{Ph/ortho}$), 128.8 ($C_{Ph/para}$), 128.9 ($C_{Ph/meta}$), 135.0 ($C_{Ph/quat.}$), 137.4 (C_6), 145.7 (C_2), 157.0 (C_3), 16.2 (C_7) ppm

1-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)-3-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)urea (**91**)



$C_{24}H_{24}ClN_3O_6$
Exact Mass: 485,1354
Molecular Weight: 485,9210

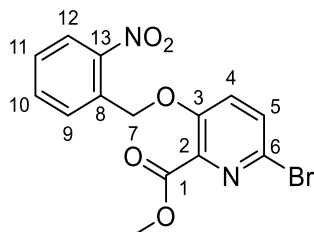
The general procedure K was carried out on the carboxylic acid **90** (85 mg, 0.28 mmol) with the cessation of heating only 10 min after the end of the gaseous emission. The crude reaction product was purified with a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→5/5 v/v) to yield the urea product **91** (27 mg, 29%) as a white solid.

$R_f = 0.51$ (cyclohexane/EtOAc 2/3 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 486 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{24}H_{25}^{35}ClN_3O_6]^+$ 486.1426, found 486.1430.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.90 (br s, 6H, CH_3-O), 3.92-4.15 (m, 4H, CH_2-O), 5.09 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.21 (s, 1H, H_1), 6.55 (s, 1H, H_{10}), 6.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H_5), 7.23-7.46 (m, 7H, H_4 , H_{Ph}), 8.27 (s, 1H, H_{13}), 8.96 (s, 1H, $NH-C_8$), 11.1 (s, 1H, $NH-C_6$) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 56.2 (CH_3-O), 56.9 (CH_3-O), 66.1 (CH_2-O), 71.8 (CH_2-Ph), 97.3 (C_{10}), 103.0 (C_1), 113.6 (C_5), 113.7 (C_8 or C_{12}), 122.2 (C_8 or C_{12}), 123.0 (C_{13}), 125.8 (C_4), 127.8 ($C_{Ph/ortho}$), 128.4 ($C_{Ph/para}$), 128.8 ($C_{Ph/meta}$), 136.4 ($C_{Ph/quat.}$), 142.6 (C_2), 146.0 (C_6), 148.9 (C_3), 149.1 (C_9 or C_{11}), 151.1 (C_9 or C_{11}), 153.7 (C_7) ppm

Methyl 6-bromo-3-((2-nitrobenzyl)oxy)picolinate (**100**)



$C_{14}H_{11}BrN_2O_5$
Exact Mass: 365,9851
Molecular Weight: 367,1550

Method 1 : The general procedure A was carried out on the phenol **10** (300 mg, 1.29 mmol) for 3h30 to yield after a flash chromatography (DCM/cyclohexane 15/85→90/10 v/v + 2% EtOAc) the benzylated product **100** (410 mg, 87%) as a white solid.

Method 2 : The phenol **10** (10.0 g, 43.1 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DMF (172 mL) under argon and K_2CO_3 (17.83 g, 129 mmol, 3.0 equiv) and 2-nitrobenzyl bromide (19.55 g, 91 mmol, 2.1 equiv) were added. The heterogeneous mixture was stirred at 60°C 4h30.

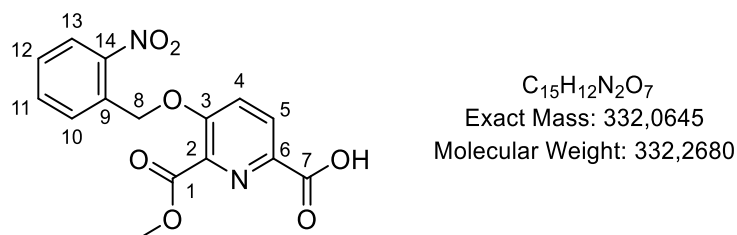
The mixture was filtered and crystallized overnight in the DMF. The solution was filtered and the filtrate was concentrated by half to carry out a second crystallization followed by a filtration. This second batch of product being not pure, it was purified with a flash chromatography (DCM/cyclohexane 15/85→90/10 v/v + 2% EtOAc) and gathered with the first batch to yield the benzylated product **100** (13.62 g, 86%) as a white solid.

$R_f = 0.19$ (DCM/cyclohexane 1/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 367 (100) [$C_{14}H_{11}^{79}BrN_2O_5+H$]⁺, 369 (99) [$C_{14}H_{11}^{81}BrN_2O_5+H$]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [$C_{14}H_{12}^{79}BrN_2O_5$]⁺ 366.9930, found 366.9926.

¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.99 (s, 3H, OCH_3), 5.57 (s, 2H, H_7), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H_4), 7.50-7.57 (m, 1H, H_{11}), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H_5), 7.77 (td, $J = 7.8$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H_{10}), 8.14 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H_9), 8.21 (dd, $J = 8.2$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H_{12}) ppm

¹³C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 53.0 (OCH_3), 68.2 (C_7), 124.7 (C_4), 125.2 (C_{12}), 128.7 (C_9), 128.9 (C_{11}), 131.7 (C_6), 132.0 (C_5), 132.3 (C_8), 134.8 (C_{10}), 139.0 (C_2), 146.5 (C_{13}), 154.0 (C_3), 163.8 (C_1) ppm

6-(methoxycarbonyl)-5-((2-nitrobenzyl)oxy)picolinic acid (**101**)



A solution of formic acid (1.62 mL) and acetic anhydride (5.19 mL) was stirred at 30°C for 2 hours. The brominated compound **100** (2.52 g, 6.86 mmol, 1.0 equiv), Pd(OAc)₂ (46 mg, 0.20 mmol, 0.03 equiv) and xantphos (118 mg, 0.20 mmol, 0.03 equiv) were equally divided in 12 dry pressurized reaction tubes and dissolved in dry DMF (4.6 mL) under argon. Triethylamine (0.31 mL, 2.3 mmol, 4.05 equiv) and tert-butanol (0.24 mL, 2.57 mmol, 4.5 equiv) were added in each tube under argon and the tubes were then sealed. The solution of mixed anhydride (0.28 mL : 2.28 mmol of formic acid, 4.0 equiv with 2.28 mmol of acetic anhydride, 4.0 equiv) was added in each tube through the sealed septum and the solution was stirred at 70°C overnight.

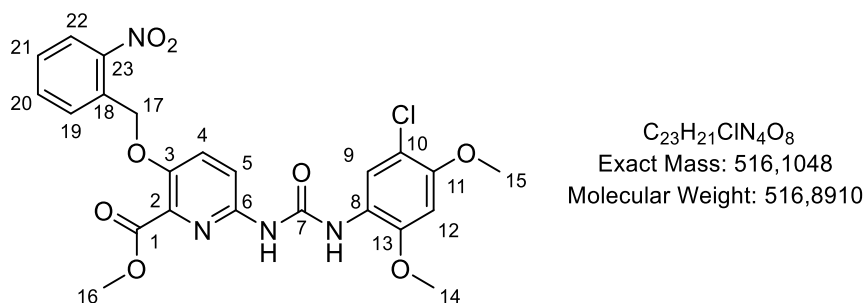
All the solutions were filtered over celite with DCM and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was dissolved in DCM and extracted with a 1M NaHCO₃ solution (69 mL, 10 equiv) twice and water. The potential precipitate was added in the aqueous phase. The gathered aqueous phases were acidified with HCl 10% until the pH was moderately acidic. The aqueous phase was extracted with DCM 5 times and the gathered organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the carboxylic acid **101** (880 mg, 39%) as a white solid.

$R_f = 0.15$ (DCM/EtOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 333 (100) [M+H]⁺, 350 (28) [M+NH₄]⁺, 355 (56) [M+Na]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₅H₁₃N₂O₇]⁺ 333.0717, found 333.0729.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.89 (s, 3H, OCH₃), 5.70 (s, 2H, H₈), 7.65 (ddd, $J = 8.3$ Hz, 4.2 Hz, 4.2 Hz, 1H, H₁₂), 7.80-7.90 (m, 3H, H₁₁, H₁₀, H₄), 8.14-8.22 (m, 2H, H₅, H₁₃) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.5 (OCH₃), 67.4 (C₈), 122.1 (C₄), 125.1 (C₁₃), 128.7 (C₅, C₁₀), 129.4 (C₁₂), 131.5 (C₉), 134.4 (C₁₁), 139.4 (C₆), 140.1 (C₂), 147.0 (C₁₄), 154.6 (C₃), 164.8 (C₁), 165.1 (C₇) ppm

Methyl 6-(3-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)ureido)-3-((2-nitrobenzyl)oxy)picolinate (**102**)



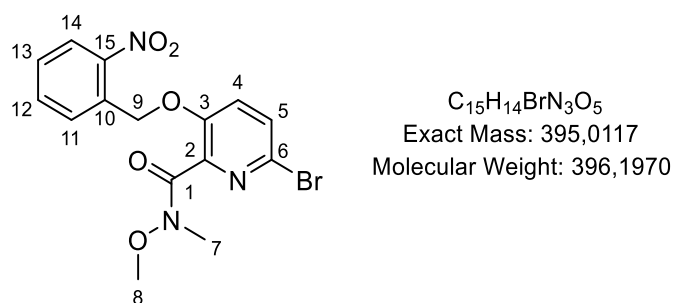
The general procedure K was carried out on the carboxylic acid **101** (800 mg, 2.47 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/EtOAc 10/0→9/1 v/v) the urea product **102** (995 mg, quantitative) as a clear brown solid.

R_f = 0.1 (DCM/EtOAc 8/2 v/v). M_p = 183.7 °C **MS** (ESI+) m/z (%): 517 (100) [$C_{23}H_{21}^{35}ClN_4O_8+H$]⁺, 519 (28) [$C_{23}H_{21}^{37}ClN_4O_8+H$]⁺, 539 (100) [$C_{23}H_{21}^{35}ClN_4O_8+Na$]⁺, 541 (39) [$C_{23}H_{21}^{37}ClN_4O_8+Na$]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [$C_{23}H_{22}^{35}ClN_4O_8$]⁺ 517.1126, found 517.1104.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.86 (s, 3H, H₁₅), 3.87 (s, 3H, H₁₆), 3.90 (s, 3H, H₁₄), 5.56 (s, 2H, H₁₇), 6.85 (s, 1H, H₁₂), 7.60-7.73 (m, 2H, H₁₉, H₅), 7.80-7.93 (m, 3H, H₂₀, H₂₁, H₂₂), 8.17 (s, 1H, H₉), 8.17 (dd, J = 8.2 Hz, 0.9 Hz, 1H, H₄), 9.94 (s, 1H, NH-C₆) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.3 (C₁₆), 56.4 (C₁₅), 56.5 (C₁₄), 67.8 (C₁₇), 98.0 (C₁₂), 111.3 (C₁₀), 115.9 (C₅), 119.9 (C₄), 121.8 (C₈), 124.9 (C₉), 126.6 (C₂₀), 128.9 (C₂₁), 129.2 (C₁₉), 132.2 (C₁₈), 134.2 (C₂₂), 135.3 (C₂), 146.2 (C₂₃), 147.1 (C₆), 148.1 (C₃), 148.3 (C₁₃), 150.0 (C₁₁), 151.9 (C₇), 164.7 (C₁) ppm

6-bromo-N-methoxy-N-methyl-3-((2-nitrobenzyl)oxy)picolinamide (**109**)



Methylamine hydrochloride (5.43 g, 55.7 mmol, 1.5 equiv) was suspended in dry THF (186 mL) under argon and strongly stirred. At 0°C, AlMe₃ (27.8 mL, 55.7 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise with a gaseous emission. The solution was stirred at r.t. 40 min. The ester **100** (13.6 g, 37.1 mmol, 1.0 equiv),

was dissolved in dry THF (310 mL) and dry DCM (62 mL) and cooled to 0°C. The solution of AlMe₃ was added dropwise and the solution was stirred at 0°C 15 min. The solution was then stirred at r.t. overnight.

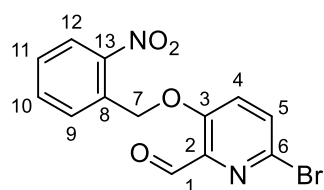
At 0°C, brine (620 mL) was added dropwise with a strong gaseous emission, and the solution was stirred 30 min. At r.t., water (460 mL) was added and the pH was adjusted to 11/12 with a 1M NaOH solution. The solution was stirred strongly 20 min and the aqueous phase was then extracted with EtOAc thrice and with DCM thrice. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the Weinreb amide **109** (14.03 g, 97%) as a clear yellow solid.

$R_f = 0.29$ (cyclohexane/DCM 1/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 396 (100) [C₁₅H₁₄⁷⁹BrN₃O₅+H]⁺, 398 (97) [C₁₅H₁₄⁸¹BrN₃O₅+H]⁺, 413 (63) [C₁₅H₁₄⁷⁹BrN₃O₅+NH₄]⁺, 415 (60) [C₁₅H₁₄⁸¹BrN₃O₅+NH₄]⁺, 441 (69) [C₁₅H₁₄⁷⁹BrN₃O₅+CH₃CN+H]⁺, 443 (60) [C₁₅H₁₄⁸¹BrN₃O₅+CH₃CN+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₅H₁₅⁷⁹BrN₃O₅]⁺ 396.0195, found 396.0183.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.38 (s, 3H, H₇), 3.62 (s, 3H, H₈), 5.54 (s, 2H, H₉), 7.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H₄), 7.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H₅), 7.50 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₃), 7.69 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H₁₂), 7.83 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H₁₁), 8.17 (dd, $J = 8.2$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H₁₄) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 32.1 (C₇), 61.8 (C₈), 67.9 (C₉), 123.3 (C₄), 125.2 (C₁₄), 128.4 (C₁₁), 128.9 (C₁₃), 129.1 (C₅), 131.8 (C₆), 132.4 (C₁₀), 134.6 (C₁₂), 145.3 (C₂), 146.7 (C₁₅), 150.8 (C₃), 166.0 (C₁) ppm

6-bromo-3-((2-nitrobenzyl)oxy)picolinaldehyde (**110**)



C₁₃H₉BrN₂O₄
Exact Mass: 335,9746
Molecular Weight: 337,1290

The Weinreb amide **109** (14.26 g, 36.0 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DCM (360 mL) under argon and cooled to -25 °C. DIBAL (1 M in DCM) (76 mL, 76 mmol, 2.1 equiv) was added dropwise over 1 h, and the solution was stirred for 45 min. According to the TLC control, DIBAL (14 mL, 14 mmol, 0.4 equiv) was added dropwise and the solution was stirred 15 min.

A saturated Rochelle salt solution (100 mL) was added at -25 °C and the solution was stirred 10 min. The solution was transferred in a 1 L flask containing 300 mL of saturated Rochelle salt solution at 0 °C. The solution was diluted with DCM and was allowed to warm up slowly overnight with stirring.

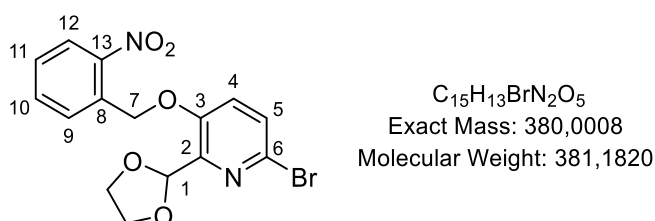
NaOH 1 M solution (90 mL) was added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted with DCM and EtOAc. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product contained the secondary product alcohol and was thus divided in two batches so that each was purified with a flash chromatography : (DCM/cyclohexane 10/90→20/80 v/v + 2% EtOAc) for the first and (DCM/cyclohexane 18/82 v/v + 2% EtOAc) for the second. In each case the majority fraction contained still the secondary product. The gathered fractions were dissolved in DMF and cyclohexane to cause a precipitation of the product at 0 °C. This was repeated a second time. The precipitate was purified with a flash chromatography (DCM/cyclohexane 10/90→20/80 v/v + 2% EtOAc). Finally, the pure fractions were gathered to yield the desired aldehyde **110** (6.87 g, 57%) as a yellow solid.

$R_f = 0.41$ (cyclohexane/DCM 1/1 v/v).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 5.61 (s, 2H, H₇), 7.48 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H₄), 7.56 (br t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₁₁), 7.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H₅), 7.83 (td, $J = 7.8$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H₁₀), 8.25 (dd, $J = 8.3$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H₁₂), 8.30 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H₉), 10.2 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 68.1 (C₇), 124.7 (C₄), 125.3 (C₁₂), 128.8 (C₉), 129.0 (C₁₁), 132.1 (C₈), 132.6 (C₆), 133.6 (C₅), 135.0 (C₁₀), 141.8 (C₂), 146.4 (C₁₃), 155.0 (C₃), 190.0 (C₁) ppm

6-bromo-2-(1,3-dioxolan-2-yl)-3-((2-nitrobenzyl)oxy)pyridine (**111**)



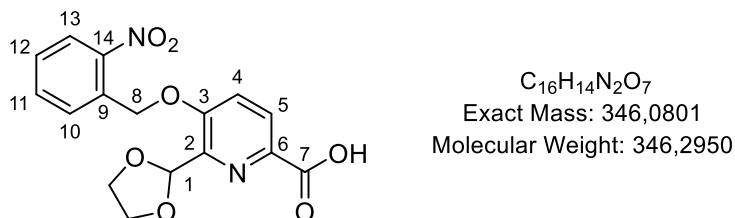
The general procedure C was carried out on the aldehyde **110** (750 mg, 2.22 mmol) to yield the acetal **111** (778 mg, 92%) as an orange solid.

$R_f = 0.28$ (cyclohexane/DCM 1/1 v/v + 2% EtOAc). **MS** (ESI+) m/z (%): 381 (99) [C₁₅H₁₃⁷⁹BrN₂O₅+H]⁺, 383 (100) [C₁₅H₁₃⁸¹BrN₂O₅+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₅H₁₄⁸¹BrN₂O₅]⁺ 383.0066, found 383.0061.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.00-4.35 (m, 4H, CH₂-O), 5.54 (s, 2H, H₇), 6.33 (s, 1H, H₁), 7.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H₄), 7.39 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H₅), 7.52 (br t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₁), 7.71 (br t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₀) 7.86 (br d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₉), 8.19 (dd, $J = 8.2$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H₁₂) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 65.8 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 67.8 (C_7), 99.6 (C_1), 123.2 (C_4), 125.3 (C_{12}), 128.4 (C_9), 129.0 (C_{11}), 129.1 (C_5), 132.1 (C_8), 132.5 (C_6), 134.5 (C_{10}), 146.9 (C_{13}), 147.6 (C_2), 152.4 (C_3) ppm

6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-((2-nitrobenzyl)oxy)picolinic acid (**112**)



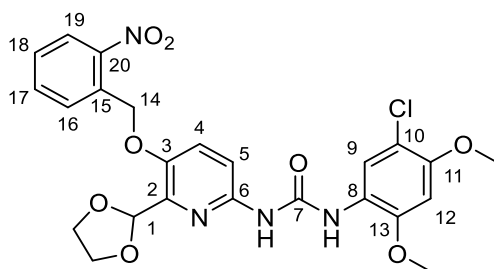
In three different dry pressurized reaction flasks (250 mL / 100 mL / 50 mL) were dissolved in dry DMF (62 mL / 25 mL / 13 mL) under argon the brominated compound **111** (4.69 g, 12.3 mmol / 1.88 g, 4.9 mmol / 938 mg, 2.46 mmol, 1.0 equiv), oxalic acid dihydrate (4.67 g, 37 mmol / 1.87 g, 14.8 mmol / 930 mg, 7.4 mmol, 3.0 equiv), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (135 mg, 0.60 mmol / 56 mg, 0.25 mmol / 28 mg, 0.12 mmol, 0.05 equiv) and xantphos (347 mg, 0.60 mmol / 144 mg, 0.25 mmol / 71 mg, 0.12 mmol, 0.05 equiv). Triethylamine (5.18 mL, 38 mmol / 2.12 mL, 15.7 mmol / 1.06 mL, 7.9 mmol, 3.2 equiv), tert-butanol (3.98 mL, 43 mmol / 1.60 mL, 17 mmol / 0.80 mL, 8.6 mmol, 3.5 equiv), and acetic anhydride (3.50 mL, 37 mmol / 1.4 mL, 15 mmol / 0.70 mL, 7.4 mmol, 3.0 equiv) were successively and rapidly added in this order without stirring, and the flasks were then rapidly sealed. The solutions were stirred at 75°C 6 h. The solutions were filtered over celite with DCM and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was dissolved in DCM (400 mL) and extracted with a 1M NaHCO_3 solution (197 mL, 10 equiv) once, then (99 mL, 5 equiv) thrice, with a 1 M NaOH solution (50 mL, 2.5 equiv) and with water. The potential precipitate was added in the aqueous phase. The gathered aqueous phases were acidified firstly with concentrated HCl (37%, 12M) (33mL, 20 equiv) under vigorous stirring and then with HCl 10% until the pH was moderately acidic. The aqueous phase was extracted with DCM 5 times and the gathered organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography (DCM/MeOH 10/0 \rightarrow 9/1 v/v) to yield the carboxylic acid **112** (2.68 g, 39%) as a yellow solid.

R_f = 0.37 (DCM/EtOH 9/1 v/v). M_p = 133.4 °C **MS** (ESI+) m/z (%): 347 (100) [$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7+\text{H}$] $^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for [$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7$] $^+$ 347.0874, found 333.0890.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 (+MeOD)) δ 4.00-4.30 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 5.63 (s, 2H, H_8), 6.30 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H_1), 7.41 (br d, J = 8.6 Hz, 1H, H_4), 7.53 (br t, J = 7.7 Hz, 1H, H_{12}), 7.70 (br t, J = 7.7 Hz, 1H, H_{11}), 7.82 (br d, J = 7.7 Hz, 1H, H_{10}), 8.15-8.24 (m, 2H, H_{13} , H_5) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃ (+MeOD)) δ 65.7 (CH₂-O), 67.7 (C₈), 99.9 (C₁), 120.5 (C₄), 125.4 (C₁₃), 127.1 (C₅), 128.5 (C₁₀), 129.2 (C₁₂), 131.8 (C₉), 134.5 (C₁₁), 139.0 (C₆), 144.9 (C₂), 147.0 (C₁₄), 155.9 (C₃), 165.2 (C₇) ppm

1-(6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-((2-nitrobenzyl)oxy)pyridin-2-yl)-3-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)urea
(113)



C₂₄H₂₃ClN₄O₈
Exact Mass: 530,1204
Molecular Weight: 530,9180

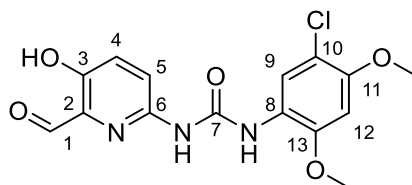
The general procedure K was carried out on the carboxylic acid **112** (300 mg, 0.87 mmol) with the 5-chloro-2,4-dimethoxyaniline (109 mg, 0.58 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) the urea product **113** (292 mg, 95%) as a white solid.

R_f = 0.8 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 531 (22) [C₂₄H₂₃³⁵ClN₄O₈+H]⁺, 533 (10) [C₂₄H₂₃³⁷ClN₄O₈+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₂₄H₂₄³⁵ClN₄O₈]⁺ 531.1283, found 531.1279.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.86 (s, 3H, CH₃-O), 3.91 (s, 3H, CH₃-O), 3.92-4.11 (m, 4H, CH₂-O), 5.51 (s, 2H, H₁₄), 6.03 (s, 1H, H₁), 6.86 (s, 1H, H₁₂), 7.48 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₅), 7.59-7.70 (m, 2H, H₄, H₁₈), 7.78-7.85 (m, 2H, H₁₆, H₁₇), 8.15 (s, 1H, H₉), 8.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₉), 9.73 (s, 1H, NH-C₆), 9.53-10.27 (br s, 1H, NH-C₈) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.3 (CH₃-O), 56.5 (CH₃-O), 65.2 (CH₂-O), 67.6 (C₁₄), 98.0 (C₁₂), 100.9 (C₁), 111.3 (C₁₀), 113.3 (C₅), 120.2 (C₉), 121.9 (C₈), 124.9 (C₁₉), 125.3 (C₄), 129.1 (C₁₇), 129.2 (C₁₈), 132.3 (C₁₅), 134.2 (C₁₆), 142.4 (C₂), 145.9 (C₆), 147.3 (C₂₀), 147.9 (C₃), 148.2 (C₁₁ or C₁₃), 149.9 (C₁₁ or C₁₃), 152.1 (C₇) ppm

1-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-3-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)urea (**115**)



C₁₅H₁₄ClN₃O₅
Exact Mass: 351,0622
Molecular Weight: 351,7430

The benzylated compound **113** (575 mg, 1.08 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in CHCl₃ (108 mL) in a quartz glass flask. Formic acid (0.17 mL, 4.55 mmol, 4.2 equiv) was added and the solution was stirred in a rayonet reactor under UV illumination (300 nm) from 12 light bulbs. The extent of the reaction was controlled by NMR every 15 min and the reaction was stopped at 1h50.

The solution was diluted with ACN and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was dissolved in 5% aqueous ACN (54 mL) and pTsoH (17 mg, 0.10 mmol, 0.1 equiv) was added. The solution was stirred at reflux 3h.

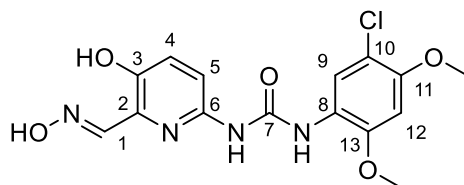
NaHCO₃ (0.92 g) was added, and the solution was then concentrated under reduced pressure. The residues were partitioned between an organic phase (CHCl₃, DCM and EtOAc) and an aqueous phase (water and saturated NaHCO₃ solution). The phases were separated and the aqueous phase was extracted with DCM and EtOAc. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. This crude reaction product was dissolved in DCM and MeOH to be purified with two successive flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) to yield the deprotected product **115** (113 mg, 30%) as a yellow solid.

$R_f = 0.7$ (DCM/MeOH 9/1 v/v).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.86 (s, 3H, CH₃-O), 3.95 (s, 3H, CH₃-O), 6.86 (s, 1H, H₁₂), 7.39-7.53 (m, 2H, H₄, H₅), 8.25 (br s, 1H, H₉), 9.85 (br s, 1H, NH-C₆), 10.09 (s, 1H, H₁), 10.30-11.07 (br s, 1H, NH or OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.3 (CH₃-O), 56.4 (CH₃-O), 97.8 (C₁₂), 111.2 (C₁₀), 119.9 (C₉), 120.3 (C₅), 122.0 (C₈), 130.3 (C₄), 133.1 (C₂), 145.4 (C₆), 148.1 (C₁₁ or C₁₃), 149.9 (C₁₁ or C₁₃), 152.1 (C₇), 153.9 (C₃), 191.3 (C₁) ppm

1-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-3-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)urea (**63**)



$C_{15}H_{15}ClN_4O_5$
Exact Mass: 366,0731
Molecular Weight: 366,7580

The general procedure G was carried out on the aldehyde product **115** (113 mg, 0.32 mmol) which was dissolved in MeOH (10 mL) and DCM (2 mL). The crude reaction product was purified by flash chromatography (DCM/(MeOH/EtOAc 1/1 v/v) 10/0→9/1 v/v) to yield the oxime product **63** (91 mg, 77%) as a clear yellow solid.

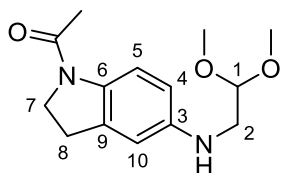
$R_f = 0.46$ (DCM/EtOAc 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 367 (100) [$C_{15}H_{15}^{35}ClN_4O_5+H$]⁺, 369 (42) [$C_{15}H_{15}^{37}ClN_4O_5+H$]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [$C_{15}H_{16}^{35}ClN_4O_5$]⁺ 367.0809, found 367.0815.

LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 5.190, 0.84, 367 [M+H]⁺, 5.930, 98.13, 367 [M+H]⁺. Purity : 99.42%

¹H NMR (300 MHz, THF-*d*₈) δ 3.84 (s, 3H, CH₃-O), 4.01 (s, 3H, CH₃-O), 6.75 (s, 1H, H₁₂), 6.94 (br d, $J = 8.2$ Hz, H₅), 7.30 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H₄), 8.35 (s, 1H, H₁), 8.55 (s, 1H, H₉), 8.87 (s, 1H, NH-C₆), 9.63 (s, 1H, Ar-OH), 11.08-11.63 (br s, 1H, NH-C₈), 11.24 (s, 1H, N-OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, THF-*d*₈) δ 56.5 (CH₃-O), 56.8 (CH₃-O), 98.2 (C₁₂), 114.2 (C₁₀), 114.4 (C₅), 121.1 (C₉), 124.3 (C₈), 128.3 (C₄), 131.7 (C₂), 147.4 (C₆), 148.7 (C₁₁ or C₁₃), 150.2 (C₃), 151.1 (C₁₁ or C₁₃), 152.8 (C₇), 153.1 (C₁) ppm

1-(5-((2,2-dimethoxyethyl)amino)indolin-1-yl)ethan-1-one (**120**)



$C_{14}H_{20}N_2O_3$
Exact Mass: 264,1474
Molecular Weight: 264,3250

1-Acetyl-5-aminoindoline **118** (6.00 g, 34.0 mmol, 1.0 equiv) and 2,2-dimethoxyacetaldehyde (60% weight in H₂O / 6.63 M) (8.7 mL, 58 mmol, 1.7 equiv) were suspended in absolute EtOH (340 mL) and DCM (17 mL) under argon. The solution was sonicated 20 min until it becomes limpid. Pd/C (10%) (1.81 g, 1.7 mmol, 0.05 equiv) was added under argon and the solution was subjected to three cycles of

reduced pressure followed by a filling with H₂. The solution was stirred under H₂ for 3 days with a TLC control.

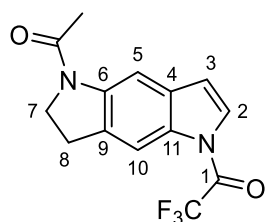
The solution was filtered over a celite pad and concentrated. The residue was dissolved in EtOAc (215 mL) and washed with water. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to yield the desired compound **120** (8.94 g, 99%) as a white solid.

$R_f = 0.54$ (DCM/MeOH 95/5 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 265 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₄H₂₁N₂O₃]⁺ 265.1547, found 265.1546.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.17 (major, s, 3H, CH₃-CO), 2.36 (minor, s, 3H, CH₃-CO), 2.98 (minor, t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H₈), 3.11 (major, t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H₈), 3.21 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, H₂), 3.40 (br s, 6H, s, 3H, CH₃-O), 3.74 (br s, 1H, NH), 3.99 (major, t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H₇), 4.09 (minor, t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H₇), 4.54 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H₁), 6.42-6.58 (m, 2H, H₁₀, H₄), 8.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H₅) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference where only the major form was reported and where the H₇ signal was forgotten : Forbes, I. T.; Ham, P.; Booth, D. H.; Martin, R. T.; Thompson, M.; Baxter, G. S.; Blackburn, T. P.; Glen, A.; Kennett, G. A.; Wood, M. D. 5-Methyl-1-(3-Pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-Tetrahydropyrrolo[2,3-f]Indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2524–2530.

1-(5-acetyl-6,7-dihydropyrrolo[2,3-f]indol-1(5H)-yl)-2,2,2-trifluoroethan-1-one (**121**)



C₁₄H₁₁F₃N₂O₂
Exact Mass: 296,0773
Molecular Weight: 296,2492

Trifluoroacetic acid (38.4 mL) and trifluoroacetic anhydride (38.4 mL) were mixed under argon at 0°C with an ice bath. This mixture was added very slowly on the compound **120** (8.94 g, 33.8 mmol, 1.0 equiv) at 0°C under argon : the solution becomes dark violet and a gassing occurred. The solution was stirred 30 min at 0°C with an ice bath and trifluoroacetic acid (61 mL) was added slowly. The solution was then stirred at reflux for 64 h.

The solution was concentrated, and the crude reaction product was purified with a flash chromatography (CHCl₃/EtOAc 10/0→7/3 v/v) to yield the indole product **121** (8.25 g, 82%) as a white solid.

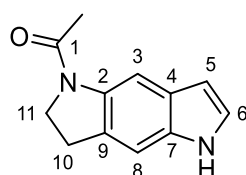
$R_f = 0.38$ (EtOAc/cyclo 4/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 201 (100) $[M-CF_3CO+2H]^+$, 242 (18) $[M-CF_3CO+CH_3CN+H]^+$, 264 (20) $[M-CF_3CO+CH_3CN+Na]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M-CF_3CO+2H]^+$ calcd for $[C_{12}H_{13}N_2O]^+$ 201.1022, found 201.1028.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.25 (s, 3H, CH_3-CO), 3.30 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_8), 4.13 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_7), 6.71 (dd, $J = 3.9$ Hz, 0.5 Hz, 1H, H_3), 7.37-7.44 (m, 1H, H_2), 8.13 (s, 1H, H_{10}), 8.41 (s, 1H, H_5) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 24.3 (CH_3-CO), 28.2 (C_8), 49.5 (C_7), 109.3 (C_5), 113.2 (C_{10}), 113.4 (C_3), 115.6 (q, $J = 287$ Hz, CF_3), 124.0 (q, $J = 5$ Hz, C_2), 130.3 (C_{11}), 130.7 (C_6), 132.3 (C_4), 141.0 (C_9), 154.0 (q, $J = 40$ Hz, C_1), 169.0 ($CO-CH_3$) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference : Forbes, I. T.; Ham, P.; Booth, D. H.; Martin, R. T.; Thompson, M.; Baxter, G. S.; Blackburn, T. P.; Glen, A.; Kennett, G. A.; Wood, M. D. 5-Methyl-1-(3-Pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-Tetrahydropyrrolo[2,3-f]Indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2524–2530.

1-(3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indol-1(2H)-yl)ethan-1-one (**122**)



$C_{12}H_{12}N_2O$
Exact Mass: 200,0950
Molecular Weight: 200,2410

The protected indole product **121** (2.69 g, 9.07 mmol, 1.0 equiv) was suspended in MeOH (90 mL) and K_2CO_3 was added. The solution was stirred at r.t. 1h30 and then at reflux 1h.

The solution was almost totally concentrated (under 30°C), and the crude reaction product was dissolved in EtOAc and washed with water. The aqueous phase was extracted with $CHCl_3$ /MeOH (95/5 v/v) thrice. The gathered organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to yield the deprotected indole product **122** (1.86 g, quantitative) as a clear brown solid.

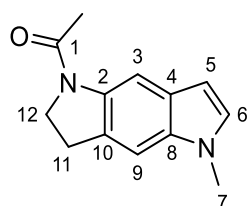
$R_f = 0.38$ (EtOAc/cyclo 4/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 201 (100) $[M+H]^+$, 242 (30) $[M+CH_3CN+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{12}H_{13}N_2O]^+$ 201.1022, found 201.1026.

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2.15 (s, 3H, CH_3-CO), 3.18 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{10}), 4.07 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{11}), 6.32-6.36 (m, 1H, H_5), 7.14-7.35 (m, 2H, H_8 , H_6), 8.25 (s, 1H, H_3), 10.87 (s, 1H, NH) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 24.0 (CH₃-CO), 27.2 (C₁₀), 48.6 (C₁₁), 101.4 (C₅), 106.7 (C₃), 107.3 (C₈), 124.9 (C₆), 126.4 (C₄), 126.7 (C₉), 132.8 (C₇), 136.1 (C₂), 167.5 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference : Forbes, I. T.; Ham, P.; Booth, D. H.; Martin, R. T.; Thompson, M.; Baxter, G. S.; Blackburn, T. P.; Glen, A.; Kennett, G. A.; Wood, M. D. 5-Methyl-1-(3-Pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-Tetrahydropyrrolo[2,3-f]Indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2524–2530.

1-(5-methyl-3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indol-1(2H)-yl)ethan-1-one (**123**)



C₁₃H₁₄N₂O
Exact Mass: 214,1106
Molecular Weight: 214,2680

NaH (60% in oil) (868 mg, 21.7 mmol, 1.1 equiv) was washed with dry toluene thrice in a dry flask under argon and finally dissolved in dry DMF (12.5 mL). At 0°C, a solution of the indole product **122** (3.95 g, 19.7 mmol, 1.0 equiv) in dry DMF (52 mL) was added slowly. The solution was stirred at r.t. 30 min. A solution of iodomethane (1.35 mL, 21.7 mmol, 1.1 equiv) in dry DMF (10 mL) was added and the solution was stirred at r.t. 1h30.

Water (3.5 mL) was added dropwise and once the excess of NaH was quenched, larger quantities of water were added, along with EtOAc. The phases were separated and the aqueous phase was extracted once with EtOAc. The gathered organic phases were washed with water and brine and dried over Na₂SO₄. This organic phase was filtered and concentrated under reduced pressure to yield the methylated indole product **123** (4.07 g, 96%) as a clear brown solid.

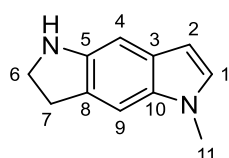
R_f = 0.38 (EtOAc/cyclo 4/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 215 (100) [M+H]⁺, 256 (23) [M+CH₃CN+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₃H₁₅N₂O]⁺ 215.1179, found 215.1183.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.24 (major, s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 2.50 (minor, s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 3.15 (minor 1, t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{11}), 3.25 (minor 2, t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{11}), 3.28 (major, t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{11}), 3.73 (major, s, 3H, H_7), 3.76 (minor, s, 3H, H_7), 4.06 (minor 2, t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{12}), 4.07 (major, t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{12}), 4.20 (minor 1, t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{12}), 6.44 (major + minor 2, d, $J = 3.1$ Hz, 1H, H_5), 6.50 (minor 1, m, 1H, H_5), 6.97 (major, d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H_6), 7.01 (minor 2, d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H_6), 7.08 (major, s, 1H, H_9), 7.11-7.14 (minor 1, m, 1H, H_6), 7.16 (minor 1, br s, 1H, H_9), 7.22-7.24 (m, 1H, minor 2, H_3), 7.31 (minor 2, br s, 1H, H_9), 8.48 (major, s, 1H, H_3), 8.50 (minor 1, s, 1H, H_3) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 24.4 (major, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 24.5 (minor, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 27.3 (minor 1, C_{11}), 28.0 (minor 2, C_{11}), 28.1 (major, C_{11}), 33.0 (major + minor, C_7), 48.8 (minor 1, C_{12}), 49.5 (major + minor 2, C_{12}), 101.2 (minor 2, C_5), 101.7 (major, C_5), 103.4 (minor 1, C_5), 105.1 (major, C_9), 106.0 (minor 2, C_9), 106.4 (minor 2, C_3), 106.9 (minor 1, C_9), 108.5 (minor 1, C_3), 108.7 (major, C_3), 124.4 (minor 1, C_6), 126.9 (major, C_{10}), 127.3 (minor 1 or minor 2, C_{10}), 127.4 (minor 1 or minor 2, C_{10}), 127.9 (major, C_4), 128.9 (major, C_6), 129.3 (minor 2, C_6), 129.5 (minor, C_4), 133.1 (minor, C_8), 134.1 (major, C_8), 135.6 (minor 2, C_2), 136.4 (major, C_2), 136.7 (minor 1, C_2), 168.1 (major, C_1), 168.4 (minor, C_1) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference where only two rotamers are reported, unlike three rotamers observed here : Forbes, I. T.; Ham, P.; Booth, D. H.; Martin, R. T.; Thompson, M.; Baxter, G. S.; Blackburn, T. P.; Glen, A.; Kennett, G. A.; Wood, M. D. 5-Methyl-1-(3-Pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-Tetrahydropyrrolo[2,3-f]Indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2524–2530.

5-methyl-1,2,3,5-tetrahydropyrrolo[2,3-f]indole (**119**)



$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2$
Exact Mass: 172,1000
Molecular Weight: 172,2310

The acetylated compound **123** (4.06 g, 18.9 mmol, 1.0 equiv) was suspended in EtOH (82 mL) under argon and sonicated to dissolve it. An aqueous NaOH solution (10 wt.%) (82 mL, 228 mmol, 12 equiv) was added, followed by the slow addition of NaOH pellets (8.1 g, 202 mmol, 11 equiv) under argon. The solution was then stirred at reflux overnight.

The solution was diluted in water and this aqueous phase was extracted four times with DCM. The organic phase was concentrated under reduced pressure and the crude reaction product was purified

with a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 9/1→7/3 v/v) to yield the deacetylated product **119** (2.57 g, 79%) as a brown solid.

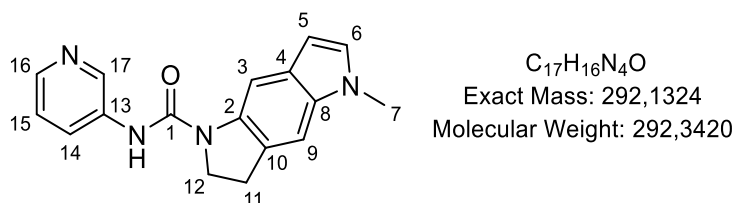
R_f = 0.54 (EtOAc/cyclo 9/1 v/v). M_p = 70.9 °C **MS** (ESI+) m/z (%): 173 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₁H₁₂N₂]⁺ 173.1073, found 173.1073.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.15 (br t, J = 7.8 Hz, 2H, H₇), 3.61 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H₆), 3.72 (s, 3H, H₁₁), 3.88 (br s, 1H, NH), 6.30 (dd, J = 3.0 Hz, 0.8 Hz, 1H, H₂), 6.92 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H₁), 6.95 (s, 1H, H₄), 7.10-7.11 (m, 1H, H₉) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 30.3 (C₇), 33.0 (C₁₁), 48.1 (C₆), 100.1 (C₂), 101.3 (C₄), 105.6 (C₉), 126.7 (C₈), 128.1 (C₃), 128.4 (C₁), 133.0 (C₁₀), 143.8 (C₅) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference : Forbes, I. T.; Ham, P.; Booth, D. H.; Martin, R. T.; Thompson, M.; Baxter, G. S.; Blackburn, T. P.; Glen, A.; Kennett, G. A.; Wood, M. D. 5-Methyl-1-(3-Pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-Tetrahydropyrrolo[2,3-f]Indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2524–2530.

5-methyl-N-(pyridin-3-yl)-3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indole-1(2H)-carboxamide (**SB-206553**, **PDG-232**)



The general procedure L was carried out on the tricyclic indole product **119** (103 mg, 0.60 mmol) and nicotinic acid **120** (148 mg, 1.20 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→97/3 v/v) the urea product **SB-206553** (161 mg, 92%) as a white solid.

R_f = 0.51 (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 293 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₇H₁₆N₄O]⁺ 293.1397, found 293.1402.

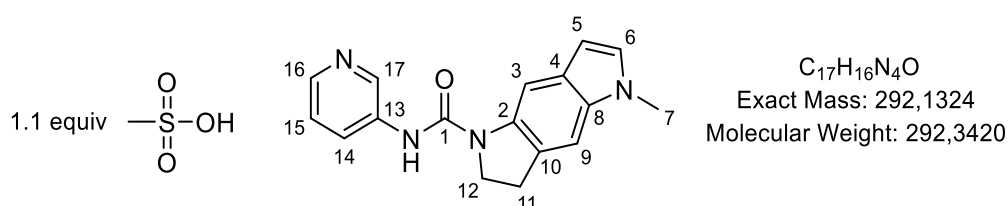
LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 4.040, 99.40, 293 [M+H]⁺.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 3.26 (t, J = 8.2 Hz, 2H, H₁₁), 3.72 (s, 3H, H₇), 4.17 (t, J = 8.2 Hz, 2H, H₁₂), 6.32 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H₅), 7.18 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H₆), 7.25 (s, 1H, H₉), 7.29-7.36 (m, 1H, H₁₅), 8.00 (br d, J = 8.5 Hz, 1H, H₁₄), 8.05 (s, 1H, H₃), 8.21 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H₁₆), 8.63 (s, 1H, NH), 8.77 (br s, 1H, H₁₇) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 27.4 (C₁₁), 32.5 (C₇), 47.8 (C₁₂), 100.5 (C₅), 105.7 (C₉), 105.8 (C₃), 123.2 (C₁₅), 126.4 (C₁₀), 127.0 (C₁₄), 127.1 (C₄), 129.1 (C₆), 133.0 (C₈), 136.6 (C₁₃, C₂), 141.9 (C₁₇), 143.1 (C₁₆), 152.4 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference : Forbes, I. T.; Ham, P.; Booth, D. H.; Martin, R. T.; Thompson, M.; Baxter, G. S.; Blackburn, T. P.; Glen, A.; Kennett, G. A.; Wood, M. D. 5-Methyl-1-(3-Pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-Tetrahydropyrrolo[2,3-f]Indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2524–2530.

5-methyl-N-(pyridin-3-yl)-3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indole-1(2H)-carboxamide methanesulfonate
(PDG-232 MsOH)



The general procedure H was carried out on the compound **SB-206553** (76 mg, 0.26 mmol) to yield the methanesulfonate salt **PDG-232 MsOH** (103 mg) as a beige solid which tends to turn purple.

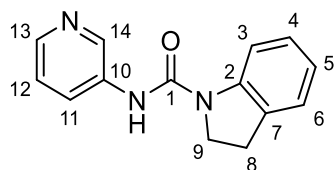
LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 4.140, 99.61, 293 [M+H]⁺.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD (+CDCl₃)) δ 2.71 (s, 3H, CH₃-S), 3.36 (t, J = 8.4 Hz, 2H, H₁₁), 3.75 (s, 3H, H₇), 4.22 (t, J = 8.4 Hz, 2H, H₁₂), 7.08 (s, 1H, H₆), 7.20 (s, 1H, H₉), 7.91-7.99 (m, 1H, H₁₅), 8.08 (s, 1H, H₃), 8.43 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H₁₆), 8.56 (br d, J = 8.6 Hz, 1H, H₁₄), 9.31 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H₁₇) ppm

The H₅ signal does not appear.

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, MeOD (+CDCl₃)) δ 28.9 (C₁₁), 32.9 (C₇), 39.5 (CH₃-S), 49.2 (C₁₂), 102.0 (C₅), 106.4 (C₉), 108.1 (C₃), 128.0 (C₁₀), 128.4 (C₁₅), 129.2 (C₄), 130.2 (C₆), 133.1 (C₁₇), 135.3 (C₁₆), 135.5 (C₈), 136.6 (C₁₄), 136.9 (C₂), 142.2 (C₁₃), 153.3 (C₁) ppm

N-(pyridin-3-yl)indoline-1-carboxamide (**124**, PDG-231)



C₁₄H₁₃N₃O
Exact Mass: 239,1059
Molecular Weight: 239,2780

The general procedure L was carried out on indoline **123** (119 mg, 1.00 mmol) and nicotinic acid **120** (246 mg, 2.00 mmol) to yield after a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→97/3 v/v) the urea product **124** (266 mg, quantitative) as a white solid.

R_f = 0.38 (DCM/MeOH 95/5 v/v). M_p = 208.9 °C. **MS** (ESI+) m/z (%): 240 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₄H₁₄N₃O]⁺ 240.1131, found 240.1136.

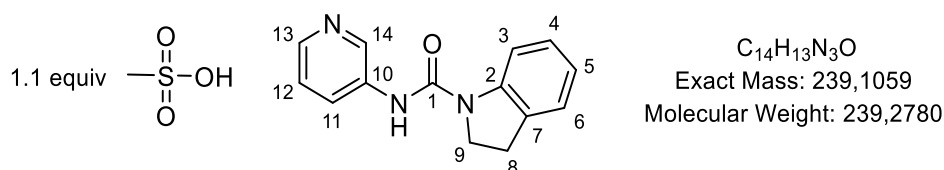
LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 3.653, 100.0, 240 [M+H]⁺.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.18 (t, J = 8.6 Hz, 2H, H₈), 4.14 (t, J = 8.6 Hz, 2H, H₉), 6.91 (td, J = 7.4 Hz, 0.5 Hz, 1H, H₅), 7.13 (br t, J = 7.7 Hz, 1H, H₄), 7.20 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H₆), 7.28-7.36 (m, 1H, H₁₂), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H₃), 7.98 (ddd, J = 8.3 Hz, 2.3 Hz, 1.4 Hz, 1H, H₁₁), 8.22 (dd, J = 4.6 Hz, 1.1 Hz, 1H, H₁₃), 8.72 (s, 1H, NH), 8.75 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H₁₄) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.3 (C₈), 47.3 (C₉), 114.9 (C₃), 121.9 (C₅), 123.3 (C₁₂), 124.7 (C₆), 127.0 (C₄), 127.3 (C₁₁), 131.0 (C₇), 136.4 (C₁₀), 142.1 (C₁₄), 143.4 (C₁₃), 143.5 (C₂), 152.5 (C₁) ppm

Spectroscopic data are in agreement with the following reference : Bromidge, S. M.; Dabbs, S.; Davies, D. T.; Duckworth, D. M.; Forbes, I. T.; Ham, P.; Jones, G. E.; King, F. D.; Saunders, D. V.; Starr, S.; Thewlis, K. M.; Wyman, P. A.; Blaney, F. E.; Naylor, C. B.; Bailey, F.; Blackburn, T. P.; Holland, V.; Kennett, G. A.; Riley, G. J.; Wood, M. D. Novel and Selective 5-HT_{2C/2B} Receptor Antagonists as Potential Anxiolytic Agents: Synthesis, Quantitative Structure–Activity Relationships, and Molecular Modeling of Substituted 1-(3-Pyridylcarbamoyl)Indolines. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (10), 1598–1612.

N-(pyridin-3-yl)indoline-1-carboxamide methanesulfonate (**PDG-231 MsOH**)



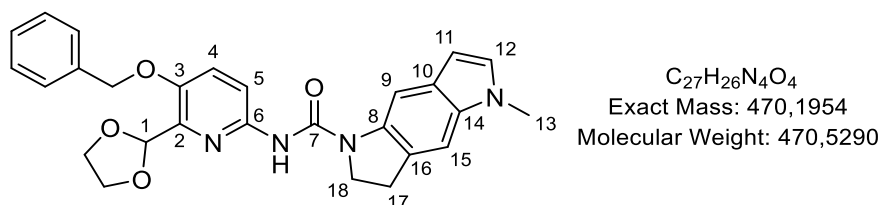
The general procedure H was carried out on the compound **124** (81 mg, 0.34 mmol) to yield the methanesulfonate salt **PDG-231 MsOH** (116 mg) as a yellow solid.

LC-MS (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 3.657, 99.45, 240 [M+H]⁺.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 2.74 (s, 3H, CH₃-S), 3.21 (t, J = 8.5 Hz, 2H, H₈), 4.16 (t, J = 8.4 Hz, 2H, H₉), 6.95 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H₅), 7.08-7.20 (m, 2H, H₆, H₄), 7.90 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H₃), 7.93-8.00 (m, 1H, H₁₂), 8.44 (br d, J = 5.5 Hz, 1H, H₁₃), 8.59-8.66 (m, 1H, H₁₁), 9.30 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H₁₄) ppm

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 28.8 (C₈), 39.5 (CH₃-S), 48.6 (C₉), 116.8 (C₃), 124.2 (C₅), 125.8 (C₄), 128.2 (C₆), 128.4 (C₁₂), 132.6 (C₇), 133.2 (C₁₄), 135.6 (C₁₃), 136.8 (C₁₁), 141.9 (C₁₀), 143.9 (C₂), 153.3 (C₁) ppm

N-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)-5-methyl-3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indole-1(2H)-carboxamide (**125**)



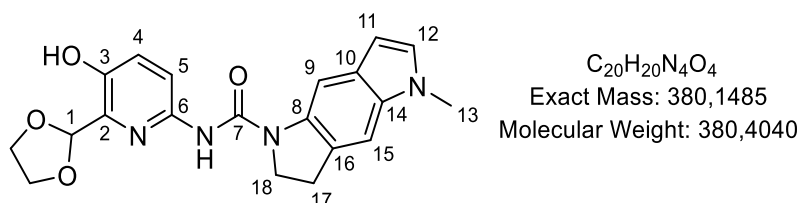
The general procedure L was carried out on the tricyclic indole product **119** (1.22 g, 7.1 mmol) and the carboxylic acid **90** (4.28 g, mixture) to yield after a flash chromatography (DCM/(MeOH/EtOAc 1/1 v/v) 100/0→99.5/0.5 v/v) the urea product **125** (2.59 g, 77%) as a foamy yellow solid.

R_f = 0.44 (DCM/EtOAc 7/3 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 471 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₂₇H₂₆N₄O₄]⁺ 471.2027, found 471.2029.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.30 (t, J = 8.2 Hz, 2H, H₁₇), 3.73 (s, 3H, H₁₃), 3.98-4.29 (m, 6H, CH₂-O, H₁₈), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.28 (s, 1H, H₁), 6.42 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H₁₁), 6.97 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H₁₂), 7.11 (s, 1H, H₉), 7.27-7.47 (m, 7H, H_{Ph}, H₄, NH), 8.11 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H₅), 8.13 (s, 1H, H₁₅) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28.1 (C₁₇), 33.0 (C₁₃), 48.2 (C₁₈), 65.7 (CH₂-O), 71.6 (CH₂-Ph), 99.4 (C₁), 101.4 (C₁₁), 105.5 (C₉), 106.7 (C₁₅), 115.2 (C₅), 123.9 (C₄), 126.8 (C₈), 127.6 (C_{Ph/ortho}), 128.0 (C₁₀), 128.2 (C_{Ph/para}), 128.7 (C_{Ph/meta}), 128.9 (C₁₂), 133.6 (C₁₄), 136.4 (C₁₆), 136.5 (C_{Ph/quat.}), 143.2 (C₂), 145.8 (C₆), 149.8 (C₃), 151.9 (C₇) ppm

N-(6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-hydroxypyridin-2-yl)-5-methyl-3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indole-1(2H)-carboxamide (**126**)



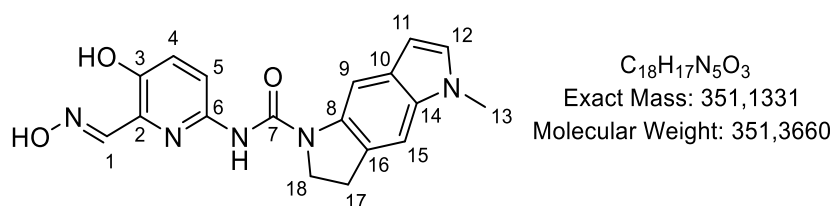
The benzylated compound **125** (534 mg, 1.14 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in EtOAc (23 mL) and Pd/C (10%) (182 mg, 0.17 mmol, 0.15 equiv) was added under argon. The solution was submitted to three cycles of reduced pressure followed by a H₂ filling. The solution was stirred under H₂ overnight. The solution was filtered on a celite pad with DCM/MeOH (9/1 v/v) and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by flash chromatography (DCM/(MeOH/EtOAc 1/1 v/v) 100/0→98/2 v/v) to yield the phenol **126** (296 mg, 68%) as a white solid.

R_f = 0.2 (DCM/EtOAc 7/3 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 381 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₂₀H₂₁N₄O₄]⁺ 381.1557, found 381.1563.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.22 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₁₇), 3.72 (s, 3H, H₁₃), 3.85-4.00 (m, 2H, CH₂-O), 4.08-4.26 (m, 4H, CH₂-O, H₁₈), 6.03 (s, 1H, H₁), 6.30 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H₁₁), 7.17 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H₁₂), 7.22-7.29 (m, 2H, H₄, H₁₅), 7.69 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H₅), 8.02 (s, 1H, H₉), 8.55 (s, 1H, NH), 9.58 (s, 1H, OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.5 (C₁₇), 32.5 (C₁₃), 47.7 (C₁₈), 64.9 (CH₂-O), 99.5 (C₁), 100.4 (C₁₁), 105.7 (C₁₅), 105.8 (C₉), 116.6 (C₅), 125.7 (C₄), 126.5 (C₁₆), 127.1 (C₁₀), 129.1 (C₁₂), 133.0 (C₁₄), 136.8 (C₈), 140.2 (C₂), 144.3 (C₆), 147.8 (C₃), 152.5 (C₇) ppm

N-(5-hydroxy-6-((hydroxyimino)methyl)pyridin-2-yl)-5-methyl-3,5-dihydropyrrolo[2,3-f]indole-1(2H)-carboxamide (**66**)



The acetal compound **126** (250 mg, 0.66 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in DMSO (13 mL) and PPTS (168 mg, 0.66 mmol, 1.0 equiv) was added, followed by water (1.19 mL, 66 mmol, 100 equiv). The solution was stirred at r.t. 20 h with a UHPLC monitoring (Method H). When the relative area of the secondary products peaks reached excessive levels compared to those of the acetal and the aldehyde, $NaHCO_3$ (168 mg, 2.0 mmol, 3.0 equiv) was added, followed by aqueous 5wt% NH_2OH (0.09 mL, 1.3 mmol, 2.0 equiv), and the solution was stirred 1 h.

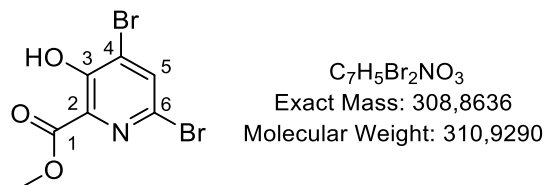
The solution was concentrated under reduced pressure to be purified by flash chromatography : (DCM/MeOH 100/0→99.95/0.05 v/v) twice, followed by (DCM/(EtOAc/MeOH 1/1) 100/0→99.9/0.1 v/v) to yield the oxime **66** (36 mg, 16%) as a yellow solid.

R_f = 0.59 (DCM/EtOAc/MeOH 7/2/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 352 (25) $[M+H]^+$, 374 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{18}H_{18}N_5O_3]^+$ 352.1410, found 352.1410.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 3.22 (t, J = 8.1 Hz, 2H, H_{17}), 3.72 (s, 3H, H_{13}), 4.19 (t, J = 8.1 Hz, 2H, H_{18}), 6.31 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H_{11}), 7.17 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H_{12}), 7.23 (s, 1H, H_{15}), 7.38 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_4), 7.80 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_5), 8.04 (s, 1H, H_9), 8.25 (s, 1H, H_1), 8.78 (s, 1H, NH), 9.98 (br s, 1H, OH), 11.85 (br s, 1H, OH) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 27.5 (C_{17}), 32.5 (C_{13}), 47.7 (C_{18}), 100.5 (C_{11}), 105.7 (C_{15}), 105.9 (C_9), 116.7 (C_5), 125.8 (C_4), 126.5 (C_{16}), 127.1 (C_{10}), 129.1 (C_{12}), 133.0 (C_{14}), 133.3 (C_2), 136.7 (C_8), 145.5 (C_6), 149.2 (C_3), 149.7 (C_1), 152.4 (C_7) ppm

Methyl 4,6-dibromo-3-hydroxypicolinate (**131**)



The ester **9** (4.10 g, 26.7 mmol, 1.0 equiv) was suspended into water (300 mL) and bromine (4.11 mL, 80.1 mmol, 3.0 equiv) was added dropwise. The solution was stirred 20 h at r.t.

The aqueous phase was extracted thrice with DCM and the combined organic phases were washed with a saturated $Na_2S_2O_3$ solution and brine. This organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the brominated product **131** (6.07 g, 73%) as a white solid.

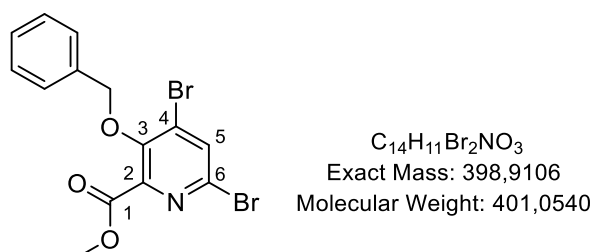
R_f = 0.77 (cyclohexane/EtOAc 1/1 v/v). **MS** (ESI-) m/z (%): 308 (40) [$C_7H_5^{79}Br_2NO_3-H$]⁻, 310 (100) [$C_7H_5^{79}Br^{81}BrNO_3-H$]⁻. **HRMS** (ESI-) m/z : [M-H]⁻ calcd for [$C_7H_4^{79}Br^{81}BrNO_3$]⁻ 309.8537, found 309.8539.

¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.06 (s, 3H, OCH_3), 7.86 (d, J = 0.5 Hz, 1H, H_5), 11.35 (s, 1H, OH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 54.0 (OCH_3), 124.8 (C_4), 130.0 (C_2 or C_6), 130.3 (C_2 or C_6), 137.0 (C_5), 156.2 (C_3), 168.9 (C_1) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Verdelet, T.; Mercey, G.; Correa, N.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Straightforward and Efficient Synthesis of 3-Benzyloxy-4-Bromopicolinate Ester and 3-Benzyloxy-5-Bromopicolinate Ester, Common Building Blocks for Pharmaceuticals and Agrochemicals. *Tetrahedron* **2011**, 67 (45), 8757–8762

Methyl 3-(benzyloxy)-4,6-dibromopicolinate (**132**)



The phenol **131** (3.00 g, 9.68 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in acetone (120 mL) and K_2CO_3 (6.00 g, 43.4 mmol, 4.5 equiv) and benzyl bromide (3.43 mL, 28.9 mmol, 3.0 equiv) were added. The heterogeneous mixture was stirred at reflux overnight.

The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 10/0→9/1 v/v) to yield the benzylated product **132** (3.14 g, 81%) as a clear yellow solid.

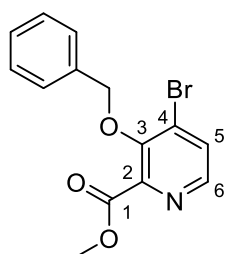
$R_f = 0.44$ (cyclohexane/EtOAc 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 400 (55) $[C_{14}H_{11}^{79}Br_2NO_3+H]^+$, 402 (100) $[C_{14}H_{11}^{79}Br^{81}BrNO_3+H]^+$, 404 (50) $[C_{14}H_{11}^{81}Br_2NO_3+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{14}H_{12}^{79}Br_2NO_3]^+$ 399.9184, found 399.9198.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.92 (s, 3H, OCH_3), 5.14 (s, 2H, CH_2 -Ph), 7.33-7.45 (m, 3H, H_{Ph}), 7.48-7.54 (m, 2H, H_{Ph}), 7.88 (s, 1H, H_5) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 53.4 (OCH_3), 77.1 (CH_2 -Ph), 128.7 (C_{Ph}), 128.8 (C_{Ph}), 128.9 (C_{Ph}), 132.0 (C_4), 135.0 (C_5), 135.5 (C_6), 135.6 ($C_{Ph/quat.}$), 145.4 (C_2), 152.0 (C_3), 163.4 (C_1) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Verdelet, T.; Mercey, G.; Correa, N.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Straightforward and Efficient Synthesis of 3-Benzyloxy-4-Bromopicolinate Ester and 3-Benzyloxy-5-Bromopicolinate Ester, Common Building Blocks for Pharmaceuticals and Agrochemicals. *Tetrahedron* **2011**, 67 (45), 8757–8762.

Methyl 3-(benzyloxy)-4-bromopicolinate (**133**)



$C_{14}H_{12}BrNO_3$
Exact Mass: 321,0001
Molecular Weight: 322,1580

The brominated compound **132** (2.00 g, 5.00 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DMF (40 mL) and sodium formate (380 mg, 5.50 mmol, 1.1 equiv) was added. The solution was degassed with argon 15 min. $Pd(PPh_3)_4$ (280 mg, 0.26 mmol, 0.05 equiv) was added and the solution was stirred at reflux for 7h under argon and protected from light.

The solution was concentrated under reduced pressure and the crude reaction product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→7/3 v/v) to yield the debrominated product **133** (891 mg, 55%) as a yellow solid.

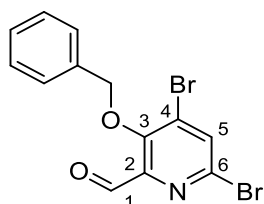
$R_f = 0.51$ (cyclohexane/EtOAc 6/4 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 322 (100) $[C_{14}H_{12}^{79}Br_2NO_3+H]^+$, 324 (95) $[C_{14}H_{12}^{81}BrNO_3+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{14}H_{13}^{79}BrNO_3]^+$ 322.0079, found 322.0092.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.88 (s, 3H, OCH_3), 5.10 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.26-7.40 (m, 3H, H_{Ph}), 7.46-7.52 (m, 2H, H_{Ph}), 7.63 (br d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H_5), 8.19 (br d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H_6) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 52.8 (OCH_3), 76.5 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 128.4 (C_{Ph}), 128.4 (C_{Ph}), 128.5 (C_{Ph}), 129.8 (C_4), 131.1 (C_5), 135.7 ($\text{C}_{\text{Ph/quat.}}$), 145.1 (C_6), 145.3 (C_2), 152.2 (C_3), 164.3 (C_1) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Verdelet, T.; Mercey, G.; Correa, N.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Straightforward and Efficient Synthesis of 3-Benzyloxy-4-Bromopicolinate Ester and 3-Benzyloxy-5-Bromopicolinate Ester, Common Building Blocks for Pharmaceuticals and Agrochemicals. *Tetrahedron* **2011**, 67 (45), 8757–8762.

3-(benzyloxy)-4,6-dibromopicolinaldehyde (**136**)



$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Br}_2\text{NO}_2$
Exact Mass: 368,9000
Molecular Weight: 371,0280

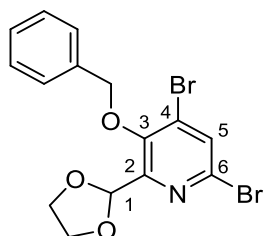
The general procedure B was carried out on the ester **132** (4.30 g, 10.7 mmol) to yield the aldehyde **136** (4.29 g, quantitative) as a yellow oil.

$R_f = 0.28$ (cyclohexane/EtOAc 9/1 v/v).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 5.13 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.33-7.46 (m, 3H, H_{Ph}), 7.46-7.58 (m, 2H, H_{Ph}), 7.93 (s, 1H, H_5), 9.96 (s, 1H, H_1) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 77.8 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 128.7 (C_4 or C_6), 128.9 (C_{Ph}), 129.2 (C_{Ph}), 129.3 (C_{Ph}), 132.6 (C_4 or C_6), 135.0 ($\text{C}_{\text{Ph/quat.}}$), 136.4 (C_5), 146.8 (C_2), 153.6 (C_3), 188.6 (C_1) ppm

3-(benzyloxy)-4,6-dibromo-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridine (**137**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{NO}_3$
Exact Mass: 412,9262
Molecular Weight: 415,0810

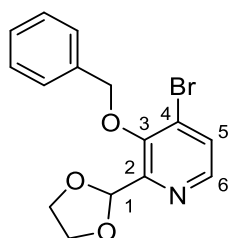
The general procedure C was carried out on the aldehyde **136** (4.30 g, 11.5 mmol) to yield the acetal **137** (4.38 g, 92%) as a yellow oil.

$R_f = 0.52$ (cyclohexane/EtOAc 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 414 (54) $[C_{15}H_{13}^{79}Br_2NO_3+H]^+$, 416 (100) $[C_{15}H_{13}^{79}Br^{81}BrNO_3+H]^+$, 418 (52) $[C_{15}H_{13}^{81}Br_2NO_3+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{15}H_{14}^{79}Br_2NO_3]^+$ 413.9340, found 399.413.9340.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.98-4.30 (m, 4H, CH_2-O), 5.07 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.19 (s, 1H, H_1), 7.32-7.45 (m, 3H, H_{Ph}), 7.47-7.56 (m, 2H, H_{Ph}), 7.72 (s, 1H, H_5) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 65.9 (CH_2-O), 77.1 (CH_2-Ph), 99.6 (C_1), 128.3 ($C_{Ph/ortho}$), 128.8 ($C_{Ph/para} + C_{Ph/meta}$), 130.4 (C_4), 132.7 (C_5), 135.9 (C_6), 136.0 ($C_{Ph/quat.}$), 151.2 (C_3), 153.6 (C_2) ppm

3-(benzyloxy)-4-bromo-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridine (**135**)



$C_{15}H_{14}BrNO_3$
Exact Mass: 335,0157
Molecular Weight: 336,1850

The brominated compound **137** (4.38 g, 10.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DMF (90 mL) and sodium formate (788 mg, 11.6 mmol, 1.1 equiv) was added. The solution was degassed with argon 15 min. $Pd(PPh_3)_4$ (633 mg, 0.50 mmol, 0.05 equiv) was added and the solution was stirred at 80°C overnight under argon and protected from light.

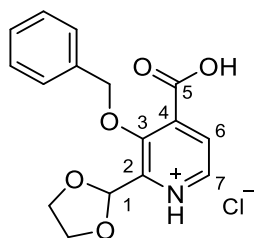
The solution was concentrated under reduced pressure and the crude reaction product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→7/3 v/v) to yield the debrominated product **135** (1.90 g, 53%) as a yellow oil.

$R_f = 0.11$ (cyclohexane/EtOAc 8/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 336 (100) $[C_{15}H_{14}^{79}BrNO_3+H]^+$, 338 (99) $[C_{15}H_{14}^{81}BrNO_3+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{15}H_{15}^{79}BrNO_3]^+$ 336.0230, found 336.0242.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.99-4.31 (m, 4H, CH_2-O), 5.10 (s, 2H, CH_2-Ph), 6.25 (s, 1H, H_1), 7.34-7.46 (m, 3H, H_{Ph}), 7.51-7.57 (m, 2H, H_{Ph}), 7.56 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H_5), 8.25 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H_6) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 65.9 (CH_2-O), 76.8 (CH_2-Ph), 99.9 (C_1), 128.3 ($C_{Ph/ortho}$), 128.5 ($C_{Ph/para}$), 128.6 (C_4), 128.7 ($C_{Ph/meta}$), 129.3 (C_5), 136.4 ($C_{Ph/quat.}$), 145.7 (C_6), 151.8 (C_3), 152.8 (C_2) ppm

3-(benzyloxy)-4-carboxy-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-1-ium chloride (**127a**)



$C_{16}H_{16}ClNO_5$
Molecular Weight: 337,7560
 $C_{16}H_{16}NO_5^+$
Exact Mass: 302,1023

The brominated compound **135** (1.01 g, 3.00 mmol, 1.0 equiv) previously dried in a desiccator overnight, together with oxalic acid dihydrate (1.14 g, 9.00 mmol, 3.0 equiv), Pd(OAc)₂ (34 mg, 0.15 mmol, 0.05 equiv) and xantphos (87 mg, 0.15 mmol, 0.05 equiv) were dissolved in dry toluene (15 mL) in a dry pressurized reaction flask (50 mL) under argon. Triethylamine (1.30 mL, 9.60 mmol, 3.2 equiv), tert-butanol (0.97 mL, 10.5 mmol, 3.5 equiv), and acetic anhydride (0.85 mL, 9.00 mmol, 3.0 equiv) were successively and rapidly added in this order without stirring, and the flask was then rapidly sealed. The solution was stirred at 75°C for 8 hours.

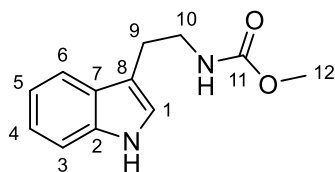
The solution was filtered over celite with DCM and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was dissolved in EtOAc (40 mL) and extracted with a 1M NaHCO₃ solution (30 mL, 10 equiv) thrice. The potential precipitate was added in the aqueous phase. The gathered aqueous phases were acidified firstly with concentrated HCl (37%, 12M) (7.5 mL, 30 equiv) under vigorous stirring and then with HCl 10% until the pH was moderately acidic. Here too much acid was added and the pH was around 2, according to the pH paper. The aqueous phase was extracted with DCM 5 times and the gathered organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the carboxylic acid **127a** (377 mg, 37%) as a white solid.

$R_f = 0.29$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 302 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₆H₁₆NO₅]⁺ 302.1023, found 302.1028.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.88-4.17 (m, 4H, CH₂-O), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.17 (s, 1H, H₁), 7.21-7.32 (m, 3H, H_{Ph}), 7.36-7.43 (m, 2H, H_{Ph}), 7.64 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H₆), 8.38 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H₇) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 65.5 (CH₂-O), 78.3 (CH₂-Ph), 98.8 (C₁), 125.4 (C₆), 128.2 (C_{Ph/para}), 128.3 (C_{Ph}), 128.3 (C_{Ph}), 134.0 (C₂), 136.2 (C_{Ph/quat.}), 144.5 (C₇), 152.2 (C₄), 152.4 (C₃), 166.1 (C₅) ppm

Methyl (2-(1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (**138**)



$C_{12}H_{14}N_2O_2$
Exact Mass: 218,1055
Molecular Weight: 218,2560

Tryptamine **128** (10.0 g, 62.4 mmol, 1.0 equiv) was suspended in DCM (94 mL) and a 2 M NaOH solution (94 mL, 188 mmol, 3.0 equiv). At 0 °C, methyl chloroformate (9.6 mL, 124 mmol, 2.0 equiv) was added dropwise with a strong stirring. The solution was then stirred at r.t. for 4 hours.

The phases were separated and the aqueous phase was extracted with DCM thrice. The gathered organic phases were washed with brine thrice, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was dissolved in a minimum of isopropyl alcohol and stirred at reflux. Pentane was added until the product begins to precipitate and the solution was allowed to cool slowly to r.t. for the crystallization. The solution was let at 0 °C overnight and was then filtered to get the desired carbamate product **138** (13.62 g, 68%) as a brown solid.

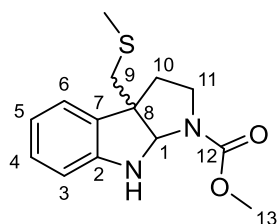
$R_f = 0.55$ (cyclohexane/EtOAc 1/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 219 (98) [M+H]⁺, 236 (100) [M+NH₄]⁺, 257 (35) [M+K]⁺, 282 (17) [M+Na+ACN]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₁₂H₁₅N₂O₂]⁺ 219.1128, found 219.1127.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.98 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H₉), 3.41-3.58 (m, 2H, H₁₀), 3.67 (s, 3H, H₁₂), 4.50-4.92 (m, 1H, NH-CO), 7.02 (s, 1H, H₁), 7.14 (td, $J = 7.6$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.22 (td, $J = 7.6$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H₄), 7.37 (br d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₃), 7.61 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H₆), 8.20 (br s, 1H, NH) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 25.9 (C₉), 41.4 (C₁₀), 52.2 (C₁₂), 111.4 (C₃), 112.9 (C₈), 118.8 (C₆), 119.6 (C₅), 122.2 (C₁), 122.3 (C₄), 127.4 (C₇), 136.5 (C₂), 157.2 (C₁₁) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the reference : Ito, Y.; Ushitora, H. Trapping of Carbamic Acid Species with (Trimethylsilyl)Diazomethane. *Tetrahedron* **2006**, 62 (1), 226–235.

Methyl 3a-((methylthio)methyl)-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indole-1(2H)-carboxylate (**139**)



C₁₄H₁₈N₂O₂S
Exact Mass: 278,1089
Molecular Weight: 278,3700

N-chloro succinimide (11.1 g, 83.1 mmol, 2.4 equiv) was dissolved in dry DCM (200 mL) and cooled to -78 °C. Dimethyl sulfide (7.4 mL, 99.7 mmol, 2.4 equiv) was added dropwise and the solution was stirred at -78 °C for 1 h. The compound **138** (9.07 g, 41.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DCM (190 mL) and diisopropylethylamine (17.4 mL, 99.7 mmol, 2.4 equiv) was added. The solution was cooled at -78 °C and the solution of Corey Kim reagent was added dropwise. The solution was stirred at -78 °C for 2 h.

The organic phase was washed with cold brine and this aqueous phase was extracted with DCM twice. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→7/3 v/v) to yield the product **139** (4.63 g, 40%) as an orange oil.

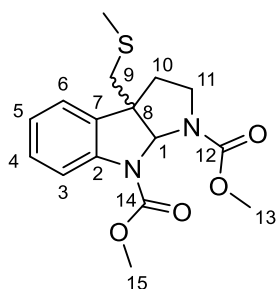
*R*_f = 0.63 (cyclohexane/EtOAc 1/1 v/v). **MS** (ESI+) *m/z* (%): 279 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for [C₁₄H₁₉N₂O₂S]⁺ 279.1162, found 279.1168.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.07 (minor, s, 3H, CH₃-S), 2.08 (major, s, 3H, CH₃-S), 2.14-2.37 (major + minor, m, 2H, H₁₀), 2.84 (minor, s, 2H, H₉), 2.87 (major, s, 2H, H₉), 3.00-3.13 (major + minor, m, 1H, H₁₁), 3.59-3.80 (major + minor, m, 1H, H₁₁), 3.68 (major, s, 3H, H₁₃), 3.77 (minor, s, 3H, H₁₃), 4.73 (minor, s, 1H, NH), 5.16 (major, s, 1H, NH), 5.25 (minor, s, 1H, H₁), 5.27 (major, s, 1H, H₁), 6.61 (major + minor, br d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₃), 6.72-6.81 (major + minor, 1H, H₅), 7.10 (major + minor, t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₄), 7.15 (br d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₆) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 17.9 (minor, CH₃-S), 18.0 (major, CH₃-S), 34.3 (major, C₁₀), 34.4 (minor, C₁₀), 42.4 (major, C₉), 42.6 (minor, C₉), 45.8 (major, C₁₁), 46.1 (minor, C₁₁), 52.4 (major, C₁₃), 52.7 (minor, C₁₃), 57.7 (major, C₈), 58.8 (minor, C₈), 79.4 (minor, C₁), 80.0 (major, C₁), 109.6 (minor, C₃), 109.8 (major, C₃), 119.1 (major, C₅), 119.3 (minor, C₅), 123.4 (major + minor, C₆), 129.0 (major, C₄), 129.1 (minor, C₄), 130.8 (minor, C₇), 130.9 (major, C₇), 149.0 (minor, C₂), 149.3 (major, C₂), 154.7 (minor, C₁₂), 155.6 (major, C₁₂) ppm

Spectroscopic data are coherent with those of the following reference where the NMR analysis was made in DMSO-*d*₆ at 130 °C to avoid the rotamer effect : Kawahara, M.; Nishida, A.; Nakagawa, M. An Efficient Synthesis of Optically Active Physostigmine from Tryptophan via Alkylative Cyclization. *Org. Lett.* **2000**, 2 (5), 675–678.

Dimethyl 3a-((methylthio)methyl)-2,3,3a,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indole-1,8-dicarboxylate (**143**)



C₁₆H₂₀N₂O₄S
Exact Mass: 336,1144
Molecular Weight: 336,4060

The mixture of the compound **139** with other secondary products (845 mg) was dissolved in THF (6.0 mL) and Na₂CO₃ (1.15 g, 11.0 mmol) was added. Water (6.0 mL) was added and the solution was cooled to 0 °C to add methylchloroformate (0.56 mL, 7.3 mmol) slowly. The solution was allowed to warm to r.t. and was stirred overnight.

The solution was diluted with water (12 mL) and the aqueous phase was extracted with EtOAc thrice. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→8/2 v/v) to yield the carbamate product **143** (554 mg) as a colourless oil.

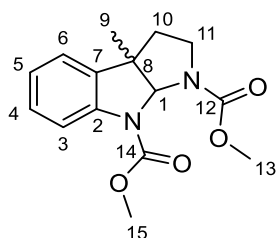
*R*_f = 0.34 (cyclohexane/EtOAc 3/2 v/v).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.00 (s, 3H, CH₃-S), 2.11-2.26 (m, 2H, H₁₀), 2.87 (s, 2H, H₉), 2.89-3.00 (m, 1H, H₁₁), 3.73 (s, 3H, H₁₃), 3.79-3.88 (m, 1H, H₁₁), 3.87 (s, 3H, H₁₅), 6.15 (s, 1H, H₁), 7.07 (td, *J* = 7.5 Hz, 0.9 Hz, 1H, H₅), 7.22 (dd, *J* = 7.5 Hz, 0.9 Hz, 1H, H₆), 7.28 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1H, H₄), 7.71 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₃) ppm

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 17.9 (CH₃-S), 35.5 (C₁₀), 42.7 (C₉), 46.1 (C₁₁), 52.8 (C₁₃), 53.0 (C₁₅), 57.7 (C₈), 80.3 (C₁), 116.7 (C₃), 123.2 (C₆), 123.8 (C₅), 129.2 (C₄), 133.7 (C₇), 142.5 (C₂), 154.2 (C₁₄), 155.2 (C₁₂) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the following reference, where a misprint changed the right “2.86” ppm in “3.86” ppm in the ¹H NMR : Kawahara, M.; Nishida, A.; Nakagawa, M. An Efficient Synthesis of Optically Active Physostigmine from Tryptophan via Alkylative Cyclization. *Org. Lett.* **2000**, 2 (5), 675–678.

Dimethyl 3a-methyl-2,3,3a,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indole-1,8-dicarboxylate (**142**)



$C_{15}H_{18}N_2O_4$
Exact Mass: 290,1267
Molecular Weight: 290,3190

An aqueous suspension of Raney nickel (3.0 mL) was washed thrice with absolute ethanol and a solution of the sulphur-containing compound **143** (550 mg, 1.63 mmol, 1.0 equiv) in ethanol (6.0 mL) was added. Bubbling of H_2 in the solution was carried out 15 min, then the solution was stirred under H_2 at reflux for 20 h.

EtOH was added, the solution was stirred and the nickel was decanted to collect the supernatant liquid which was filtered over a celite pad under argon. This operation was repeated thrice and the gathered filtrates were concentrated under reduced pressure and purified with a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 10/0→8/2 v/v) to yield the desulphurized product **142** (470 mg, 99%) as a colourless oil.

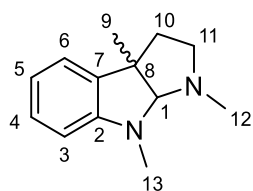
$R_f = 0.37$ (cyclohexane/EtOAc 3/2 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 291 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{15}H_{19}N_2O_4]^+$ 191.1339, found 191.1351.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.43 (s, 3H, H_9), 1.92-2.06 (m, 1H, H_{10}), 2.13-2.23 (m, 1H, H_{10}), 2.92 (td, $J = 11.5$ Hz, 5.5 Hz, 1H, H_{11}), 3.72 (s, 3H, H_{13}), 3.75-3.85 (m, 1H, H_{11}), 3.87 (s, 3H, H_{15}), 5.93 (s, 1H, H_1), 7.06 (td, $J = 7.4$ Hz, 0.8 Hz, 1H, H_5), 7.14 (dd, $J = 7.4$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H_6), 7.22 (td, $J = 8.0$ Hz, 1.4 Hz, 1H, H_4), 7.70 (br d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 25.1 (C_9), 38.0 (C_{10}), 46.3 (C_{11}), 52.7 (C_{13}), 53.0 (C_8 , C_{15}), 82.2 (C_1), 116.4 (C_3), 122.5 (C_6), 123.9 (C_5), 128.5 (C_4), 136.3 (C_7), 141.7 (C_2), 154.3 (C_{14}), 155.3 (C_{12}) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the following reference : Chiou, W.-H.; Kao, C.-L.; Tsai, J.-C.; Chang, Y.-M. Domino Rh-Catalyzed Hydroformylation–Double Cyclization of o-Amino Cinnamyl Derivatives: Applications to the Formal Total Syntheses of Physostigmine and Physovenine. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (74), 8232.

1,3a,8-trimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indole (**145**)



$C_{13}H_{18}N_2$
Exact Mass: 202,1470
Molecular Weight: 202,3010

The carbamate product **142** (637 mg, 2.19 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry toluene (15 mL) under argon. RedAl (65wt%) (3.0 mL, 15.3 mmol, 7.0 equiv) was added dropwise and the solution was stirred at reflux 1h.

The solution was diluted with EtOAc (15 mL) and a saturated Rochelle salt solution (60 mL) was added. The solution was stirred 30 min and the aqueous phase was extracted with EtOAc four times. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography (cyclohexane/EtOAc + 0.5% Et_3N 5/5→1/9 v/v) to yield the reduction product **145** (411 mg, 93%) as a yellow oil.

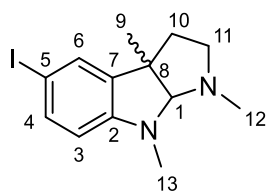
R_f = 0.28 (EtOAc + 0.5% Et_3N). **MS** (ESI+) m/z (%): 203 (100) $[M+H]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[M+H]^+$ calcd for $[C_{13}H_{19}N_2]^+$ 203.1543, found 203.1544.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.44 (s, 3H, H_9), 1.91-2.03 (m, 2H, H_{10}), 2.55 (s, 3H, H_{12}), 2.58-2.78 (m, 2H, H_{11}), 2.94 (s, 3H, H_{13}), 4.10 (s, 1H, H_1), 6.41 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_3), 6.67 (td, J = 7.3 Hz, 0.6 Hz, 1H, H_5), 7.0 (dd, J = 7.3 Hz, 0.8 Hz, 1H, H_6), 7.08 (td, J = 7.8 Hz, 0.8 Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 27.5 (C_9), 36.7 (C_{13}), 38.7 (C_{12}), 41.0 (C_{10}), 52.8 (C_8), 53.4 (C_{11}), 97.7 (C_1), 106.7 (C_3), 117.6 (C_5), 122.4 (C_6), 127.8 (C_4), 136.9 (C_7), 152.1 (C_2) ppm

Spectroscopic data are in good agreement with the following reference : Kawahara, M.; Nishida, A.; Nakagawa, M. An Efficient Synthesis of Optically Active Physostigmine from Tryptophan via Alkylative Cyclization. *Org. Lett.* **2000**, 2 (5), 675–678.

5-iodo-1,3a,8-trimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indole (**149**)



$C_{13}H_{17}IN_2$
Exact Mass: 328,0436
Molecular Weight: 328,1975

The compound **145** (410 mg, 2.03 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DCM (67 mL) under argon and the solution was cooled to $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. *N*-iodo succinimide (549 mg, 2.44 mmol, 1.2 equiv) was added in 6 portions every two minutes, then the solution was allowed to warm to r.t. and was stirred overnight. Saturated sulphite solution was added and the aqueous phase was extracted with DCM thrice. The gathered organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0 \rightarrow 98.5/1.5 v/v) to yield the iodinated product **149** (376 mg, 56%) as a clear yellow solid.

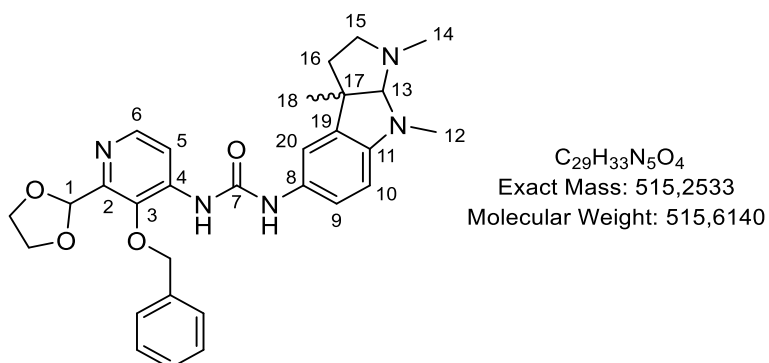
$R_f = 0.54$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 329 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 370 (24) $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{H}]^+$. **HRMS** (ESI+) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{IN}_2]^+$ 329.0509, found 329.0523.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (s, 3H, H_9), 1.91-2.05 (m, 2H, H_{10}), 2.54 (s, 3H, H_{12}), 2.57-2.81 (m, 2H, H_{11}), 2.92 (s, 3H, H_{13}), 4.15 (s, 1H, H_1), 6.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_3), 7.21 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H_6), 7.33 (dd, $J = 8.3$ Hz, 1.8 Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 27.1 (C_9), 36.2 (C_{13}), 38.5 (C_{12}), 40.5 (C_{10}), 52.8 (C_8), 53.3 (C_{11}), 78.2 (C_5), 97.3 (C_1), 108.9 (C_3), 131.1 (C_6), 136.5 (C_4), 139.5 (C_7), 151.4 (C_2) ppm

Spectroscopic data are coherent with the following reference but some differences are observed. The 2H multiplet signal around 2.0 ppm is reported as a triplet around 1.68 ppm in the reference. Moreover, the C_5 signal at 78.2 ppm is missing and a signal at 178.5 ppm is reported, maybe a misprint. Wang, H.; Zhang, D.; Wang, F.; Wu, Y.; Song, H. Synthesis and Anticholinesterase Activity of (–)-Physostigmine Analogues with Modifications at C_3a and C_5 . *Chem. Res. Chin. Univ.* **2013**, 29 (5), 888–893.

1-(3-(benzyloxy)-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-4-yl)-3-(1,3a,8-trimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl)urea (**130**)



The iodinated compound **149** (375 mg, 1.14 mmol, 1.0 equiv), $Cu(acac)_2$ (44 mg, 0.17 mmol, 0.15 equiv), Cs_2CO_3 (1.11 g, 3.42 mmol, 3.0 equiv) and 2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione (0.12 mL, 0.57 mmol, 0.5 equiv) were added in this order in a dry pressurized reaction flask under argon and dissolved in dry DMF previously degassed 20 min with argon. Ammoniac (35%) (0.33 mL) was added and the flask was sealed. The biphasic solution (blue and dark green) was stirred at 90 °C for 36 h and became brown with a brick-red precipitate.

The solution was diluted with DCM and filtered over celite with DCM/MeOH (8/2 v/v). The filtrate was concentrated under reduced pressure and dissolved in EtOAc. This organic phase was washed with water twice and the gathered aqueous phases were extracted with EtOAc thrice and with DCM thrice. The gathered organic phases were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction product was purified with a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→85/15 v/v) to yield the amino product **129** (119 mg) as a dark red solid.

$R_f = 0.22$ (DCM/MeOH 8/2 v/v). **LC-MS** (ESI+) (Method H) t_r (min), relative area (%), m/z : 0.597, 68.3, 218 $[M+H]^+$

The carboxylic acid **127a** (377 mg, 1.11 mmol) was suspended in dry toluene (3.0 mL) in a dry two-neck round-bottom flask under argon. Et_3N (0.36 mL, 2.7 mmol) and DPPA (0.26 mL, 1.19 mmol) were added in this order and the solution was stirred at r.t. 30 min and became limpid. The solution was then stirred at 105 °C and the heating was stopped 10 min after the end of the gaseous emission. The solution was cannulated at r.t. in a dry two-neck round-bottom flask under argon containing the amino compound **129** (118 mg) and the solution was stirred at reflux (heating bath : 130 °C) 2 h.

The solution was diluted with EtOAc and washed with water twice. The aqueous phase was extracted with EtOAc/ $CHCl_3$ (6/1 v/v) five times. The gathered organic phases were washed with brine and

saturated NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The reaction crude product was purified with a flash chromatography (DCM/MeOH 100/0→95/5 v/v) twice to get the supposed diphenyl phosphate salt of the desired product. The product was diluted in EtOAc and washed with a saturated NaHCO₃ solution twice. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the urea product **130** (100 mg) as a dark red solid.

$R_f = 0.59$ (DCM/MeOH 9/1 v/v). **MS** (ESI+) m/z (%): 516 (100) [M+H]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z : [M+H]⁺ calcd for [C₂₉H₃₃N₅O₄]⁺ 516.2605, found 516.2617.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.35 (s, 3H, H₁₈), 1.73-1.95 (m, 2H, H₁₆), 2.43 (s, 3H, H₁₄), 2.39-2.51 (m, 1H, H₁₅), 2.59-2.69 (m, 1H, H₁₅), 2.83 (s, 3H, H₁₂), 3.89-3.98 (m, 2H, CH₂-O), 4.05 (s, 1H, H₁₃), 4.08-4.17 (m, 2H, CH₂-O), 4.99 (s, 2H, CH₂-Ph), 6.15 (s, 1H, H₁), 6.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₁₀), 7.02 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2.0 Hz, 1H, H₉), 7.15 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H₂₀), 7.31-7.58 (m, 5H, H_{Ph}), 8.18 (s, 2H, H₅, H₆), 8.47 (s, 1H, NH-C₄), 9.17 (s, 1H, NH-C₈) ppm

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.2 (C₁₈), 36.5 (C₁₂), 37.9 (C₁₄), 40.5 (C₁₆), 52.1 (C₁₇), 52.6 (C₁₅), 65.0 (CH₂-O), 76.2 (CH₂-Ph), 97.1 (C₁₃), 99.1 (C₁), 106.5 (C₁₀), 112.8 (C₅), 114.8 (C₂₀), 119.1 (C₉), 128.0 (C_{Ph}), 128.2 (C_{Ph}), 128.3 (C_{Ph}), 129.3 (C₈), 136.3 (C_{Ph/quat.}), 137.0 (C₁₉), 140.9 (C₄), 141.5 (C₃), 145.4 (C₆), 148.2 (C₁₁), 150.1 (C₂), 151.9 (C₇) ppm

BIBLIOGRAPHIE

1. Bagdad : prise d'un ancien site chimique par des "terroristes" <https://www.cnews.fr/monde/2014-07-09/bagdad-prise-dun-ancien-site-chimique-par-des-terroristes-684930> (accessed Sep 2, 2021).
2. Annual Reports <https://www.opcw.org/resources/documents/annual-reports> (accessed Sep 1, 2021).
3. M. Eddleston. Poisoning by pesticides. *Medicine* **2020**, 48 (3), 214–217.
4. East Africa deploys huge volumes of 'highly hazardous' pesticides against locust plague <https://news.mongabay.com/2021/04/east-africa-deploys-huge-volumes-of-highly-hazardous-pesticides-against-locust-plague/> (accessed Sep 2, 2021).
5. V. Aroniadou-Anderjaska, J.P. Aplan, T.H. Figueiredo, M. De Araujo Furtado, M.F. Braga. Acetylcholinesterase inhibitors (nerve agents) as weapons of mass destruction: History, mechanisms of action, and medical countermeasures. *Neuropharmacology* **2020**, 181, 108298.
6. T. Zorbaz, P. Mišetić, N. Probst, et al. Pharmacokinetic Evaluation of Brain Penetrating Morpholine-3-hydroxy-2-pyridine Oxime as an Antidote for Nerve Agent Poisoning. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, 11 (7), 1072–1084.
7. T. Zorbaz, A. Braïki, N. Maraković, et al. Potent 3-Hydroxy-2-Pyridine Aldoxime Reactivators of Organophosphate-Inhibited Cholinesterases with Predicted Blood-Brain Barrier Penetration. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24 (38), 9675–9691.
8. K. Oukoloff, N. Coquelle, M. Bartolini, et al. Design, biological evaluation and X-ray crystallography of nanomolar multifunctional ligands targeting simultaneously acetylcholinesterase and glycogen synthase kinase-3. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, 168, 58–77.
9. R.C. Gupta. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds; Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, **2006**.
10. G.A. Petroianu. History of organophosphate synthesis: the very early days. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, 65 (4), 306–311.
11. G.A. Petroianu. Synthesis of tetraethyl pyrophosphate (TEPP): from physician Abbot and pharmacist Riegel to chemist Nylen. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 70 (6), 427–434.
12. L.G. Costa. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicological Sciences* **2018**, 162 (1), 24–35.
13. P. Varsha¹, P.B.P. Swapnil³, G. Raju⁴. Profile of Organophosphorus Poisoning Cases in a Tertiary Care Hospital in Central India. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology* **2020**, 14 (4), 369–372.
14. A.E.R. Diatta, A.L. Diatta, M.C. Gaye Fall, M. Ndiaye. Exposition aux pesticides organophosphorés des travailleurs du domaine agricole communautaire de Sefa Sedhiou. *Toxicologie Analytique et Clinique* **2021**, 33 (2), 116–122.
15. A. Karunarathne, A. Bhalla, A. Sethi, U. Perera, M. Eddleston. Importance of pesticides for lethal poisoning in India during 1999 to 2018: a systematic review. *BMC Public Health* **2021**, 21 (1), 1441.
16. R. Ghimire, L. Utyasheva, M. Pokhrel, et al. Intentional pesticide poisoning and pesticide suicides in Nepal. *Clinical Toxicology* **2021**, 1–7.
17. F. Kamel, J.A. Hoppin. Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environmental Health Perspectives* **2004**, 112 (9), 950–958.
18. S.Y. Foong, N.L. Ma, S.S. Lam, et al. A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, 400, 123006.
19. N.H. Johnson, J.C. Larsen, E. Meek. Chapter 2 - Historical Perspective of Chemical Warfare Agents. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press, Boston, **2015**; pp 7–15.

20. T.C.C. Franca, D.A.S. Kitagawa, S.F. de A. Cavalcante, et al. Novichoks: The Dangerous Fourth Generation of Chemical Weapons. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, 20 (5), 1222.
21. Annexe sur les Produits Chimiques <https://www.opcw.org/fr/convention-sur-linterdiction-des-armes-chimiques/annexes/annex-chemicals/annexe-sur-les-produits> (accessed Sep 4, 2021).
22. D.H. Ellison. Handbook of chemical and biological warfare agents, 2nd ed.; CRC Press, Boca Raton, **2008**.
23. J. Patočka. NOVICHOK AGENTS - MYSTERIOUS POISONOUS SUBSTANCES FROM THE COLD WAR PERIOD. *MMSL* **2018**, 87 (2), 92–94.
24. R.A. Young, A. Watson. Chapter 8 - Organophosphate nerve agents. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition)*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press, Boston, **2020**; pp 97–126.
25. C.P. Holstege, M. Kirk, F.R. Sidell. CHEMICAL WARFARE. *Critical Care Clinics* **1997**, 13 (4), 923–942.
26. E. Nepovimova, K. Kuca. Chapter 10 - Novichoks. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition)*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press, Boston, **2020**; pp 143–148.
27. Handbook of toxicology of chemical warfare agents, Second edition.; Gupta, R. C., Ed.; Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston, **2015**.
28. C.M. Mahan, W.F. Page, T.A. Bullman, H.K. Kang. Health Effects in Army Gulf War Veterans Possibly Exposed to Chemical Munitions Destruction at Khamisiyah, Iraq: Part I. Morbidity Associated with Potential Exposure. *Military Medicine* **2005**, 170 (11), 935–944.
29. K. Sakurada, H. Ohta. No promising antidote 25 years after the Tokyo subway sarin attack: A review. *Legal Medicine* **2020**, 47, 101761.
30. Report on the Alleged Use of Chemical Weapons in the Ghouta Area of Damascus on 21 August 2013 - Note by the Secretary-General - Syrian Arab Republic <https://reliefweb.int/report/syrian-arab-republic/report-alleged-use-chemical-weapons-ghouta-area-damascus-21-august-2013> (accessed Sep 5, 2021).
31. Report of the Independent International Commission of Inquiry on the Syrian Arab Republic (Advance Edited Version) (A/HRC/36/55) [EN/AR] - Syrian Arab Republic <https://reliefweb.int/report/syrian-arab-republic/report-independent-international-commission-inquiry-syrian-arab-3> (accessed Sep 5, 2021).
32. T. Nakagawa, A.T. Tu. Murders with VX: Aum Shinrikyo in Japan and the assassination of Kim Jong-Nam in Malaysia. *Forensic Toxicol* **2018**, 36 (2), 542–544.
33. J.A. Vale, T.C. Marrs, R.L. Maynard. Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. *Clinical Toxicology* **2018**, 56 (11), 1093–1097.
34. Empoisonnement d'Alexeï Navalny : une enquête journalistique accuse les services russes de sécurité. *Le Monde.fr*. December 15, 2020.
35. O. Lockridge. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* **2015**, 148, 34–46.
36. W.C. Bowman. Neuromuscular transmission: prejunctional events. In *Pharmacology of Neuromuscular Function*; Elsevier, **1990**; pp 36–64.
37. D.G. Waller, A.P. Sampson. Neurotransmission and the peripheral autonomic nervous system. In *Medical Pharmacology and Therapeutics*; Elsevier, **2018**; pp 73–90.
38. N.P. Hirsch. Neuromuscular junction in health and disease. *British Journal of Anaesthesia* **2007**, 99 (1), 132–138.
39. T.C. Westfall. Cholinergic Neurotransmission in the Autonomic and Somatic Motor Nervous System. In *Encyclopedia of Neuroscience*; Elsevier, **2009**; pp 827–834.
40. T.L. Rosenberry. Acetylcholinesterase. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; John Wiley & Sons, Ltd, **1975**; pp 103–218.

41. M. Pohanka. Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, 15 (6), 9809–9825.
42. Y. Hasin, N. Avidan, D. Bercovich, et al. A paradigm for single nucleotide polymorphism analysis: The case of the acetylcholinesterase gene. *Human Mutation* **2004**, 24 (5), 408–416.
43. X. Luo, M. Lauwers, P.G. Layer, C. Wen. Non-neuronal Role of Acetylcholinesterase in Bone Development and Degeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, 8, 1886.
44. G. Johnson, S.W. Moore. The Adhesion Function on Acetylcholinesterase Is Located at the Peripheral Anionic Site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 258 (3), 758–762.
45. H. Soreq, S. Seidman. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* **2001**, 2 (4), 294–302.
46. B. Li, J.A. Stribley, A. Ticu, et al. Abundant Tissue Butyrylcholinesterase and Its Possible Function in the Acetylcholinesterase Knockout Mouse. *Journal of Neurochemistry* **2000**, 75 (3), 1320–1331.
47. E.G. Duysen, B. Li, S. Darvesh, O. Lockridge. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology* **2007**, 233 (1), 60–69.
48. Y.H. Zhe, M. Shintu, Y.Y. Keng. Butyrylcholinesterase: A Multifaceted Pharmacological Target and Tool. *Current Protein & Peptide Science* **2019**, 21 (1), 99–109.
49. E. Giacobini. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* **2004**, 50 (4), 433–440.
50. P. Masson, M.-T. Froment, P.-L. Fortier, et al. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, 1387 (1), 41–52.
51. E.G. Duysen, B. Li, O. Lockridge. The butyrylcholinesterase knockout mouse a research tool in the study of drug sensitivity, bio-distribution, obesity and Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2009**, 5 (5), 523–528.
52. S. Xing, Q. Li, B. Xiong, et al. Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: Application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism. *Medicinal Research Reviews* **2021**, 41 (2), 858–901.
53. O. David L., C. Paul D. α/β Hydrolase Fold: An Update. *Protein & Peptide Letters* **2009**, 16 (10), 1137–1148.
54. P. Taylor, Z. Radic. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 34 (1), 281–320.
55. M. Wandhammer. Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation. phdthesis, Université de Strasbourg, **2012**.
56. J.-P. Colletier. Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acetylcholinesterase. phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I, **2006**.
57. J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, et al. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* **1991**.
58. P. Marchot, R.B.G. Ravelli, M.L. Raves, et al. Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: Expression, purification, and crystallization in complex with fasciculin. *Protein Science* **1996**, 5 (4), 672–679.
59. M. Harel, G. Kryger, T.L. Rosenberry, et al. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* **2000**, 9 (6), 1063–1072.
60. Y. Bourne, J. Grassi, P.E. Bougis, P. Marchot. Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography *. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274 (43), 30370–30376.

61. Y. Bourne, L. Renault, P. Marchot. Crystal Structure of Snake Venom Acetylcholinesterase in Complex with Inhibitory Antibody Fragment Fab410 Bound at the Peripheral Site: EVIDENCE FOR OPEN AND CLOSED STATES OF A BACK DOOR CHANNEL *. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290 (3), 1522–1535.
62. G. Kryger, M. Harel, K. Giles, et al. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Cryst D* **2000**, 56 (11), 1385–1394.
63. P.H. Axelsen, M. Harel, I. Silman, J.L. Sussman. Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: Synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography. *Protein Science* **1994**, 3 (2), 188–197.
64. P. Taylor, S. Lappi. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. Site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* **1975**, 14 (9), 1989–1997.
65. J. G., W.M. S. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design* **2005**, 12 (2), 217–225.
66. D. Barak, C. Kronman, A. Ordentlich, et al. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269 (9), 6296–6305.
67. J.L. Johnson, B. Cusack, M.P. Davies, A. Fauq, T.L. Rosenberry. Unmasking Tandem Site Interaction in Human Acetylcholinesterase. Substrate Activation with a Cationic Acetanilide Substrate. *Biochemistry* **2003**, 42 (18), 5438–5452.
68. S. Cheng, W. Song, X. Yuan, Y. Xu. Gorge Motions of Acetylcholinesterase Revealed by Microsecond Molecular Dynamics Simulations. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 3219.
69. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal* **2006**, 25 (12), 2746–2756.
70. W.D. Mallender, T. Szegletes, T.L. Rosenberry. Acetylthiocholine Binds to Asp74 at the Peripheral Site of Human Acetylcholinesterase as the First Step in the Catalytic Pathway. *Biochemistry* **2000**, 39 (26), 7753–7763.
71. H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 187 (1), 10–22.
72. D. Van Belle, L. De Maria, G. Iurcu, S.J. Wodak. Pathways of ligand clearance in acetylcholinesterase by multiple copy sampling¹¹Edited by I. B. Honig. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 298 (4), 705–726.
73. T. Rosenberry, X. Brazzolotto, I. Macdonald, et al. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. *Molecules* **2017**, 22 (12), 2098.
74. J.C. Ma, D.A. Dougherty. The Cation- π Interaction. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (5), 1303–1324.
75. M. Harel, D.M. Quinn, H.K. Nair, I. Silman, J.L. Sussman. The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (10), 2340–2346.
76. H.L. Gerald, G. Jian-Xin, M.H. Margaret. Acetylcholinesterase: Molecular Modeling with the Whole Toolkit. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2005**, 6 (1), 57–73.
77. Y. Bourne, Z. Radić, G. Sulzenbacher, et al. Substrate and Product Trafficking through the Active Center Gorge of Acetylcholinesterase Analyzed by Crystallography and Equilibrium Binding *. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (39), 29256–29267.
78. H.C. Froede, I.B. Wilson. Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, 259 (17), 11010–11013.

79. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, F. Nachon. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products *. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (42), 41141–41147.
80. T. Čadež, Z. Kovarik. Advancements in recombinant technology for production of butyrylcholinesterase, a bioscavenger of nerve agents: Production of recombinant BChE. *Periodicum Biologorum* **2020**, No. 1–2, 55–63.
81. K.M. Boyko, T.N. Baymukhametov, Y.M. Chesnokov, et al. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. *Biochimie* **2019**, 156, 196–205.
82. A. Saxena, A.M.G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B.P. Doctor. Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions* **1999**, 119–120, 61–69.
83. L. Pezzementi, F. Nachon, A. Chatonnet. Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: An Atypical Butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*. *PLOS ONE* **2011**, 6 (2), e17396.
84. P. Masson, S. Lushchekina, L.M. Schopfer, O. Lockridge. Effects of viscosity and osmotic stress on the reaction of human butyrylcholinesterase with cresyl saligenin phosphate, a toxicant related to aerotoxic syndrome: kinetic and molecular dynamics studies. *Biochemical Journal* **2013**, 454 (3), 387–399.
85. D. De Boer, N. Nguyen, J. Mao, J. Moore, E.J. Sorin. A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules* **2021**, 11 (4), 580.
86. F. Nachon, L. Ehret-Sabatier, D. Loew, et al. Trp82 and Tyr332 Are Involved in Two Quaternary Ammonium Binding Domains of Human Butyrylcholinesterase as Revealed by Photoaffinity Labeling with [3H]DDF. *Biochemistry* **1998**, 37 (29), 10507–10513.
87. J.R. Tormos, K.L. Wiley, J. Seravalli, et al. The Reactant State for Substrate-Activated Turnover of Acetylthiocholine by Butyrylcholinesterase is a Tetrahedral Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (42), 14538–14539.
88. Z. KOVARIK, Z. RADIĆ, H.A. BERMAN, et al. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochemical Journal* **2003**, 373 (1), 33–40.
89. J. Milan, P. Milica. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, 16 (17), 2177–2188.
90. F. Worek, H. Thiermann. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology & Therapeutics* **2013**, 139 (2), 249–259.
91. D. Coult, D. Marsh, G. Read. Dealkylation studies on inhibited acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* **1966**, 98 (3), 869–873.
92. B. Sanson, F. Nachon, J.-P. Colletier, et al. Crystallographic Snapshots of Nonaged and Aged Conjugates of Soman with Acetylcholinesterase, and of a Ternary Complex of the Aged Conjugate with Pralidoxime. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (23), 7593–7603.
93. C.B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, et al. Reaction Products of Acetylcholinesterase and VX Reveal a Mobile Histidine in the Catalytic Triad. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (42), 9883–9884.
94. E. Carletti, J.-P. Colletier, F. Dupeux, et al. Structural Evidence That Human Acetylcholinesterase Inhibited by Tabun Ages through O-Dealkylation. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (10), 4002–4008.
95. H.J. Mason, E. Waive, A. Stevenson, H.K. Wilson. Aging and Spontaneous Reactivation of Human Plasma Cholinesterase Activity After Inhibition by Organophosphorus Pesticides. *Hum Exp Toxicol* **1993**, 12 (6), 497–503.

96. H.J. Mason, C. Sams, A.J. Stevenson, R. Rawbone. Rates of spontaneous reactivation and aging of acetylcholinesterase in human erythrocytes after inhibition by organophosphorus pesticides. *Hum Exp Toxicol* **2000**, 19 (9), 511–516.
97. M. Trovaslet-Leroy, L. Musilova, F. Renault, et al. Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents. *Toxicology Letters* **2011**, 206 (1), 14–23.
98. F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology* **2004**, 68 (11), 2237–2248.
99. F. Nachon, O.A. Asojo, G.E.O. Borgstahl, P. Masson, O. Lockridge. Role of Water in Aging of Human Butyrylcholinesterase Inhibited by Echothiophate: The Crystal Structure Suggests Two Alternative Mechanisms of Aging. *Biochemistry* **2005**, 44 (4), 1154–1162.
100. H. Li, L.M. Schopfer, F. Nachon, et al. Aging Pathways for Organophosphate-Inhibited Human Butyrylcholinesterase, Including Novel Pathways for Isomalathion, Resolved by Mass Spectrometry. *Toxicological Sciences* **2007**, 100 (1), 136–145.
101. G.S. Sirin, Y. Zhou, L. Lior-Hoffmann, S. Wang, Y. Zhang. Aging Mechanism of Soman Inhibited Acetylcholinesterase. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116 (40), 12199–12207.
102. C. Viragh, I.M. Kovach, L. Pannell. Small Molecular Products of Dealkylation in Soman-Inhibited Electric Eel Acetylcholinesterase. *Biochemistry* **1999**, 38 (30), 9557–9561.
103. F. Nachon, E. Carletti, F. Worek, P. Masson. Aging mechanism of butyrylcholinesterase inhibited by an N-methyl analogue of tabun: Implications of the trigonal–bipyramidal transition state rearrangement for the phosphorylation or reactivation of cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 187 (1–3), 44–48.
104. T.J. Kropp, R.J. Richardson. Mechanism of Aging of Mipaflox-Inhibited Butyrylcholinesterase. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20 (3), 504–510.
105. Y. An, Y. Zhu, Y. Yao, J. Liu. Is it possible to reverse aged acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds? Insight from the theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18 (14), 9838–9846.
106. Daniel Quinn, Joseph Topczewski, Nilanthi Yasapala, Alexander Lodge. Why is Aged Acetylcholinesterase So Difficult to Reactivate? *Molecules* **2017**, 22 (9), 1464.
107. A.J. Franjesevic, S.B. Sillart, J.M. Beck, et al. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Chem. Eur. J.* **2019**, 25 (21), 5337–5371.
108. M. Lotti, A. Moretto. Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy. *Toxicol Rev* **2005**, 24 (1), 37–49.
109. N.M.S. Bakry, A.H. El-Rashidy, A.T. Eldefrawi, M.E. Eldefrawi. Direct actions of organophosphate anticholinesterases on nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *J. Biochem. Toxicol.* **1988**, 3 (4), 235–259.
110. C.J.G.M. Smulders. Block of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Organophosphate Insecticides. *Toxicological Sciences* **2004**, 82 (2), 545–554.
111. C.M. Morris, C. Savy, S.J. Judge, P.G. Blain. Acute Toxicity of Organophosphorus Compounds. In *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*; Balali-Mood, M., Abdollahi, M., Eds.; Springer, London, **2014**; pp 45–78.
112. T. Zorbaz, Z. Kovarik. Neuropharmacology: Oxime antidotes for organophosphate pesticide and nerve agent poisoning. *Periodicum biologorum* **2020**, 121–122 (1–2), 35–54.
113. F. Worek, J. Jenner, H. Thiermann. Chemical Warfare Toxicology, Volume 2: Management of Poisoning. **2016**, 1–346.
114. P. Jayawardane, N. Senanayake, N.A. Buckley, A.H. Dawson. Electrophysiological correlates of respiratory failure in acute organophosphate poisoning: Evidence for differential roles of muscarinic and nicotinic stimulation. *Clinical Toxicology* **2012**, 50 (4), 250–253.

115. A. Ivosevic, N. Miletic, M. Vulovic, et al. Mechanism and Clinical Importance of Respiratory Failure Induced by Anticholinesterases. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* **2017**, 18 (4), 349–355.
116. K. Nomura, E. Narimatsu, H. Inoue, et al. Mechanism of central hypopnoea induced by organic phosphorus poisoning. *Sci Rep* **2020**, 10 (1), 15834.
117. L. Karalliedde, D. Baker, T.C. Marrs. Organophosphate-Induced Intermediate Syndrome: Aetiology and Relationships with Myopathy. *Toxicological Reviews* **2006**, 25 (1), 1–14.
118. T. Farkhondeh, O. Mehrpour, F. Forouzanfar, B. Roshanravan, S. Samarghandian. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in organophosphate pesticide-induced neurotoxicity and its amelioration: a review. *Environ Sci Pollut Res* **2020**, 27 (20), 24799–24814.
119. L.S. Deshpande, D.S. Carter, K.F. Phillips, R.E. Blair, R.J. DeLorenzo. Development of status epilepticus, sustained calcium elevations and neuronal injury in a rat survival model of lethal paraoxon intoxication. *NeuroToxicology* **2014**, 44, 17–26.
120. J.H. McDONOUGH, T.-M. Shih. Neuropharmacological Mechanisms of Nerve Agent-induced Seizure and Neuropathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **1997**, 21 (5), 559–579.
121. Y. Gu, G. Li, C. Huang, et al. Dichlorvos poisoning caused chicken cerebrum tissue damage and related apoptosis-related gene changes. *Science of The Total Environment* **2021**, 783, 147051.
122. K.A. Ibrahim, H.A. Abdelgaid, M. Eleyan, S.A. Khwanes, M.M. Abdel-Daim. Ethoprophos induces rats' brain injury and neurobehavioral impairment via transcriptional activation of glial fibrillary acidic protein and tubulin-associated unit even at the threshold inhibition of acetylcholinesterase: A 90-days study. *Science of The Total Environment* **2021**, 777, 146216.
123. D.A. Jett, S.M. Spriggs. Translational research on chemical nerve agents. *Neurobiology of Disease* **2020**, 133, 104335.
124. K.D. Spradling, L.A. Lumley, C.L. Robison, J.L. Meyerhoff, J.F. Dillman. Transcriptional analysis of rat piriform cortex following exposure to the organophosphonate anticholinesterase sarin and induction of seizures. *J Neuroinflammation* **2011**, 8 (1), 83.
125. P.F. Zabrodskii, V.V. Maslyakov, M.S. Gromov. Role of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors of B Cells in the Immunotoxic Effect of Organophosphorus Compounds. *Bull Exp Biol Med* **2016**, 161 (6), 779–781.
126. N. Halder, G. Lal. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* **2021**, 12, 1236.
127. F. Testud, J.-P. Grillet. Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. *EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement* **2007**, 2, 1–24.
128. F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet, P. Masson. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, 206 (3), 536–544.
129. J.R. Keeler, C.G. Hurst, M.A. Dunn. Pyridostigmine Used as a Nerve Agent Pretreatment Under Wartime Conditions. *JAMA* **1991**, 266 (5), 693–695.
130. C. Amourette, I. Lamproglou, L. Barbier, et al. Gulf War illness: Effects of repeated stress and pyridostigmine treatment on blood–brain barrier permeability and cholinesterase activity in rat brain. *Behavioural Brain Research* **2009**, 203 (2), 207–214.
131. B.A. Golomb. Acetylcholinesterase inhibitors and Gulf War illnesses. *PNAS* **2008**, 105 (11), 4295–4300.
132. P. Masson. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicology Letters* **2011**, 206 (1), 5–13.
133. S. Eckert, P. Eyer, F. Worek. Reversible inhibition of acetylcholinesterase by carbamates or huperzine A increases residual activity of the enzyme upon soman challenge. *Toxicology* **2007**, 233 (1), 180–186.

134. Y. Aracava, E.F.R. Pereira, M. Akkerman, M. Adler, E.X. Albuquerque. Effectiveness of Donepezil, Rivastigmine, and (\pm)Huperzine A in Counteracting the Acute Toxicity of Organophosphorus Nerve Agents: Comparison with Galantamine. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, 331 (3), 1014–1024.
135. H.P.M. van Helden, M.J.A. Joosen, I.H.C. Philippens. Non-enzymatic pretreatment of nerve agent (soman) poisoning: A brief state-of-the-art review. *Toxicology Letters* **2011**, 206 (1), 35–40.
136. J. Chen, H. Pan, C. Chen, et al. (-)-Phenserine Attenuates Soman-Induced Neuropathology. *PLOS ONE* **2014**, 9 (6), e99818.
137. E.F.R. Pereira, Y. Aracava, M. Alkondon, et al. Molecular and Cellular Actions of Galantamine: Clinical Implications for Treatment of Organophosphorus Poisoning. *J Mol Neurosci* **2010**, 40 (1–2), 196–203.
138. R. Golime, M. Palit, J. Acharya, D.K. Dubey. Neuroprotective Effects of Galantamine on Nerve Agent-Induced Neuroglial and Biochemical Changes. *Neurotox Res* **2018**, 33 (4), 738–748.
139. M. Lane, D. Carter, J.D. Pescrille, et al. Oral Pretreatment with Galantamine Effectively Mitigates the Acute Toxicity of a Supra-Lethal Dose of Soman in Cynomolgus Monkeys Post-treated with Conventional Antidotes. *J Pharmacol Exp Ther* **2020**.
140. T.M. Myers, W. Sun, A. Saxena, et al. Systemic administration of the potential countermeasure huperzine reversibly inhibits central and peripheral acetylcholinesterase activity without adverse cognitive–behavioral effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2010**, 94 (3), 477–481.
141. G. Lallement, J.-P. Demoncheaux, A. Foquin, et al. Subchronic Administration of Pyridostigmine or Huperzine to Primates: Compared Efficacy Against Soman Toxicity. *Drug and Chemical Toxicology* **2002**, 25 (3), 309–320.
142. L.R. Hamilton, S.C. Schachter, T.M. Myers. Time Course, Behavioral Safety, and Protective Efficacy of Centrally Active Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors in Cynomolgus Macaques. *Neurochem Res* **2017**, 42 (7), 1962–1971.
143. E.X. Albuquerque, E.F.R. Pereira, Y. Aracava, et al. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103 (35), 13220–13225.
144. D.E. Lorke, G.A. Petroianu. Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. *Journal of Applied Toxicology* **2019**, 39 (1), 101–116.
145. O.A. Lenina, I.V. Zueva, V.V. Zobov, et al. Slow-binding reversible inhibitor of acetylcholinesterase with long-lasting action for prophylaxis of organophosphate poisoning. *Sci Rep* **2020**, 10 (1), 16611.
146. P. Masson, F. Nachon. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *Journal of Neurochemistry* **2017**, 142 (S2), 26–40.
147. F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet, P. Masson. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, 206 (3), 536–544.
148. C. van Hooionk, C.C. Groos. Model studies for enzyme inhibition. Part II: The stereospecific reaction of isopropyl p-nitrophenyl methylphosphonate with α -cyclodextrin in aqueous alkaline media. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1970**, 89 (8), 845–856.
149. M. Zengerle, F. Brandhuber, C. Schneider, et al. Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, 7 (1), 1543–1554.
150. A. Bierwisch, M. Zengerle, H. Thiermann, S. Kubik, F. Worek. Detoxification of alkyl methylphosphonofluoridates by an oxime-substituted β -cyclodextrin – An in vitro structure–activity study. *Toxicology Letters* **2014**, 224 (2), 209–214.
151. S. Letort, S. Balieu, W. Erb, G. Gouhier, F. Estour. Interactions of cyclodextrins and their derivatives with toxic organophosphorus compounds. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, 12 (1), 204–228.
152. P.W. Elsinghorst, F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2013**, 8 (12), 1467–1477.

153. F. Worek, T. Seeger, M. Zengerle, et al. Effectiveness of a substituted β -cyclodextrin to prevent cyclosarin toxicity in vivo. *Toxicology Letters* **2014**, 226 (2), 222–227.
154. T.J. Finnegan, V.W.L. Gunawardana, J.D. Badjić. Molecular Recognition of Nerve Agents and Their Organophosphorus Surrogates: Toward Supramolecular Scavengers and Catalysts. *Chemistry – A European Journal* **2021**, 27 (53), 13280–13305.
155. C. Schneider, A. Bierwisch, M. Koller, F. Worek, S. Kubik. Entgiftung von VX und anderen V-Stoffen in Wasser bei 37 °C und pH 7.4 durch substituierte Sulfonatocalix[4]arene. *Angewandte Chemie* **2016**, 128 (41), 12859–12863.
156. B. Li, M. Sedlacek, I. Manoharan, et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology* **2005**, 70 (11), 1673–1684.
157. D.T. Yeung, D.E. Lenz, D.M. Cerasoli. Human Paraoxonase I: A Potential Bioscavenger of Organophosphorus Nerve Agents. In *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*; Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., Paragh, G., Eds.; Proteins And Cell Regulation; Springer Netherlands, Dordrecht, **2008**; pp 151–170.
158. M.A. Sogorb, E. Vilanova. Serum albumins and detoxication of anti-cholinesterase agents. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 187 (1), 325–329.
159. M.J. Hatfield, R.A. Umans, J.L. Hyatt, et al. Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, 259, 327–331.
160. A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, et al. Exploring the Active Center of Human Acetylcholinesterase with Stereomers of an Organophosphorus Inhibitor with Two Chiral Centers. *Biochemistry* **1999**, 38 (10), 3055–3066.
161. M. Wandhammer, E. Carletti, M. Van der Schans, et al. Structural Study of the Complex Stereoselectivity of Human Butyrylcholinesterase for the Neurotoxic V-agents. *J Biol Chem* **2011**, 286 (19), 16783–16789.
162. J. Atsmon, E. Brill-Almon, C. Nadri-Shay, et al. Preclinical and first-in-human evaluation of PRX-105, a PEGylated, plant-derived, recombinant human acetylcholinesterase-R. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2015**, 287 (3), 202–209.
163. C. Kronman, O. Cohen, O. Mazor, et al. Next generation OP-bioscavengers: A circulatory long-lived 4-PEG hypolysine mutant of F338A-HuAChE with optimal pharmacokinetics and pseudo-catalytic characteristics. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 187 (1), 253–258.
164. Z. Pang, C.-M.J. Hu, R.H. Fang, et al. Detoxification of Organophosphate Poisoning Using Nanoparticle Bioscavengers. *ACS Nano* **2015**, 9 (6), 6450–6458.
165. L. Pascual, S.E. Sayed, R. Martínez-Máñez, et al. Acetylcholinesterase-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles That Open in the Presence of Diisopropylfluorophosphate (a Sarin or Soman Simulant). *Org. Lett.* **2016**, 18 (21), 5548–5551.
166. L. Raveh, E. Grauer, J. Grunwald, E. Cohen, Y. Ashani. The Stoichiometry of Protection against Soman and VX Toxicity in Monkeys Pretreated with Human Butyrylcholinesterase. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**, 145 (1), 43–53.
167. A. Weber, H. Butterweck, U. Mais-Paul, et al. Biochemical, molecular and preclinical characterization of a double-virus-reduced human butyrylcholinesterase preparation designed for clinical use. *Vox Sanguinis* **2011**, 100 (3), 285–297.
168. D.E. Lenz, D.M. Maxwell, I. Koplovitz, et al. Protection against soman or VX poisoning by human butyrylcholinesterase in guinea pigs and cynomolgus monkeys. *Chemico-Biological Interactions* **2005**, 157–158, 205–210.
169. A. Saxena, W. Sun, J.M. Fedorko, I. Koplovitz, B.P. Doctor. Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX. *Biochemical Pharmacology* **2011**, 81 (1), 164–169.

170. B.A. Reed, C.L. Sabourin, D.E. Lenz. Human butyrylcholinesterase efficacy against nerve agent exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2017**, 31 (5), e21886.
171. Baxalta now part of Shire. A Phase 1, Randomized, Observer-Blinded, Single Dose, Placebo Controlled Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Plasma-Derived Human Butyrylcholinesterase (HuBChE) Administered Intramuscularly (IM); Clinical trial registration NCT00333528; clinicaltrials.gov, **2021**.
172. J. Grunwald, D. Marcus, Y. Papier, et al. Large-scale purification and long-term stability of human butyrylcholinesterase: a potential bioscavenger drug. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1997**, 34 (2), 123–135.
173. A. Saxena, P. Tipparaju, C. Luo, B.P. Doctor. Pilot-scale production of human serum butyrylcholinesterase suitable for use as a bioscavenger against nerve agent toxicity. *Process Biochemistry* **2010**, 45 (8), 1313–1318.
174. Y.-J. Huang, Y. Huang, H. Baldassarre, et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *PNAS* **2007**, 104 (34), 13603–13608.
175. H. Baldassarre, J. Deslauriers, N. Neveu, V. Bordignon. Detection of endoplasmic reticulum stress markers and production enhancement treatments in transgenic goats expressing recombinant human butyrylcholinesterase. *Transgenic Res* **2011**, 20 (6), 1265–1272.
176. E. Egelkrout, C. Hayden, M. Wales, et al. Production of the bioscavenger butyrylcholinesterase in maize. *Mol Breeding* **2017**, 37 (11), 136.
177. C. Ronco, P.Y. Renard, L. Jean, F. Nachon, A. Romieu. 7,11-Methanocycloocta [b] Quinoline Derivative as Highly Functionalizable Acetylcholinesterase Inhibitors. WO/2011/124712, October 13, 2011.
178. P.-Y. Renard, O. Lockridge, M. Larson, et al. Compositions and Methods for the Purification and Production of Butyrylcholinesterase. WO/2015/077317, May 28, 2015.
179. Y.-J. Huang, P.M. Lundy, A. Lazaris, et al. Substantially improved pharmacokinetics of recombinant human butyrylcholinesterase by fusion to human serum albumin. *BMC Biotechnology* **2008**, 8 (1), 50.
180. Y.J. Rosenberg, A. Saxena, W. Sun, et al. Demonstration of in vivo stability and lack of immunogenicity of a polyethyleneglycol-conjugated recombinant CHO-derived butyrylcholinesterase bioscavenger using a homologous macaque model. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 187 (1), 279–286.
181. S.S. Terekhov, T.C. C, I.V. Smirnov, et al. Chemical Polysialylation and In Vivo Tetramerization Improve Pharmacokinetic Characteristics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers. *Acta Naturae* **2015**, 7 (4), 136–141.
182. M.A. Larson, O. Lockridge, S.H. Hinrichs. Polyproline promotes tetramerization of recombinant human butyrylcholinesterase. *Biochemical Journal* **2014**, 462 (2), 329–335.
183. C. Yu, M. Zhao, Z. Pan, et al. Butyrylcholinesterase nanodepots with enhanced prophylactic and therapeutic performance for acute organophosphorus poisoning management. *J. Mater. Chem. B* **2021**, 9 (7), 1877–1887.
184. M. Goldsmith, Y. Ashani. Catalytic bioscavengers as countermeasures against organophosphate nerve agents. *Chemico-Biological Interactions* **2018**, 292, 50–64.
185. N. Aurbek, H. Thiermann, F. Eyer, P. Eyer, F. Worek. Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: A kinetic analysis. *Toxicology* **2009**, 259 (3), 133–139.
186. L. Musilova, K. Kuca, Y.-S. Jung, D. Jun. In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Clinical Toxicology* **2009**, 47 (6), 545–550.

187. J. Renou, M. Loiodice, M. Arboléas, et al. Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphylated human acetyl and butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (30), 3947–3950.
188. Z. Radić, T. Dale, Z. Kovarik, et al. Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. *Biochemical Journal* **2013**, 450 (1), 231–242.
189. M. Katalinić, N. Maček Hrvat, K. Baumann, et al. A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2016**, 310, 195–204.
190. R.K. Sit, V.V. Fokin, G. Amitai, et al. Imidazole Aldoximes Effective in Assisting Butyrylcholinesterase Catalysis of Organophosphate Detoxification. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (4), 1378–1389.
191. R.H. Nichols, J.E. Chambers. Reactivation of organophosphate-inhibited serum butyrylcholinesterase by novel substituted phenoxyalkyl pyridinium oximes and traditional oximes. *Toxicology* **2021**, 452, 152719.
192. L. Zhang, H. Murata, G. Amitai, et al. Catalytic Detoxification of Organophosphorus Nerve Agents by Butyrylcholinesterase-Polymer-Oxime Bioscavengers. *Biomacromolecules* **2020**, 21 (9), 3867–3877.
193. Z. Kovarik, N. Maček Hrvat. Efficient detoxification of nerve agents by oxime-assisted reactivation of acetylcholinesterase mutants. *Neuropharmacology* **2020**, 171, 108111.
194. N. Amend, K.V. Niessen, T. Seeger, et al. Diagnostics and treatment of nerve agent poisoning—current status and future developments. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2020**, 1479 (1), 13–28.
195. C.B. Millard, O. Lockridge, C.A. Broomfield. Organophosphorus Acid Anhydride Hydrolase Activity in Human Butyrylcholinesterase: Synergy Results in a Somanase. *Biochemistry* **1998**, 37 (1), 237–247.
196. K.G. McGarry, R.F. Lalissee, R.A. Moyer, et al. A Novel, Modified Human Butyrylcholinesterase Catalytically Degrades the Chemical Warfare Nerve Agent, Sarin. *Toxicological Sciences* **2020**, 174 (1), 133–146.
197. T. Wille, K. Neumaier, M. Koller, et al. Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: Intraosseous versus intravenous injection. *Toxicology Letters* **2016**, 258, 198–206.
198. F. Worek, T. Seeger, G. Reiter, et al. Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: A proof-of-concept study. *Toxicology Letters* **2014**, 231 (1), 45–54.
199. T.C. Otto, S.A. Kasten, E. Kovaleva, et al. Purification and characterization of functional human paraoxonase-1 expressed in *Trichoplusia ni* larvae. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 187 (1), 388–392.
200. F. Renault, T. Carus, C. Cléry-Barraud, et al. Integrative analytical approach by capillary electrophoresis and kinetics under high pressure optimized for deciphering intrinsic and extrinsic cofactors that modulate activity and stability of human paraoxonase (PON1). *Journal of Chromatography B* **2010**, 878 (17), 1346–1355.
201. J.-M. Rousseau, I. Besse Bardot, L. Franck, et al. Intérêt de la seringue Ineurope® devant une intoxication par neurotoxique de guerre. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **2009**, 28 (5), 482–488.
202. C.M. Timperley, J.E. Forman, M. Abdollahi, et al. Advice on assistance and protection provided by the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons: Part 1. On medical care and treatment of injuries from nerve agents. *Toxicology* **2019**, 415, 56–69.

203. F. Worek, T. Wille, M. Koller, H. Thiermann. Structural requirements for effective oximes – Evaluation of kinetic in vitro data with phosphorylated human AChE and structurally different oximes. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, 203 (1), 125–128.
204. G.A. Petroianu. The history of cholinesterase reactivation: hydroxylamine and pyridinium aldoximes. *Pharmazie* **2012**, No. 10, 874–879.
205. I.B. Wilson, S. Ginsburg. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1955**, 18, 168–170.
206. F. Hobbiger. Protection Against the Lethal Effects of Organo-Phosphates by Pyridine-2-Aldoxime Methiodide. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1957**, 12 (4), 438–446.
207. F. Hobbiger, D.G. O'sullivan, P.W. Sadler. New Potent Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Tetraethyl Pyrophosphate. *Nature* **1958**, 182 (4648), 1498–1499.
208. A. Luettringhaus, I. Hagedorn. [QUATERNARY HYDROXYIMINOMETHYLPYRIDINIUM SALTS. THE DISCHLORIDE OF BIS-(4-HYDROXYIMINOMETHYL-1-PYRIDINIUM-METHYL)-ETHER (LUEH6), A NEW REACTIVATOR OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITED BY ORGANIC PHOSPHORIC ACID ESTERS]. *Arzneimittelforschung* **1964**, 14, 1–5.
209. H. Oldiges, K. Schoene. Pyridinium- und Imidazoliumsalsze als Antidote gegenüber Soman- und Paraoxonvergiftungen bei Mäusen. *Arch. Toxikol.* **1970**, 26 (4), 293–305.
210. P. Eyer, I. Hagedorn, R. Klimmek, et al. HLö 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases. *Arch Toxicol* **1992**, 66 (9), 603–621.
211. F. Worek, P. Eyer, N. Aurbek, L. Szinicz, H. Thiermann. Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, 219 (2–3), 226–234.
212. F. Worek, T. Wille, M. Koller, H. Thiermann. Reactivation kinetics of a series of related bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase—Structure–activity relationships. *Biochemical Pharmacology* **2012**, 83 (12), 1700–1706.
213. F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. The oximes HI-6 and MMB-4 fail to reactivate soman-inhibited human and guinea pig AChE: A kinetic in vitro study. *Toxicology Letters* **2018**, 293, 216–221.
214. M. Jokanović, M. Maksimović. A comparison of trimedoxime, obidoxime, pralidoxime and HI-6 in the treatment of oral organophosphorus insecticide poisoning in the rat. *Arch Toxicol* **1995**, 70 (2), 119–123.
215. D. Jun, L. Musilova, K. Musilek, K. Kuca. In Vitro Ability of Currently Available Oximes to Reactivate Organophosphate Pesticide-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, 12 (3), 2077–2087.
216. G.M. Steinberg, J. Cramer, A.B. Ash. New reactivators of phosphonylated acetylcholinesterase. *Biochemical Pharmacology* **1977**, 26 (5), 439–441.
217. F. Terrier, P. Rodriguez-Dafonte, E. Le Guével, G. Moutiers. Revisiting the reactivity of oximate α -nucleophiles with electrophilic phosphorus centers. Relevance to detoxification of sarin, soman and DFP under mild conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4 (23), 4352–4363.
218. A.A. de Castro, D.A. Polisel, B.T.L. Pereira, et al. Understanding the Interaction Modes and Reactivity of Trimedoxime toward MmAChE Inhibited by Nerve Agents: Theoretical and Experimental Aspects. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21 (18), 6510.
219. J. Jończyk, J. Kukułowicz, K. Łątka, et al. Molecular Modeling Studies on the Multistep Reactivation Process of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **2021**, 11 (2), 169.
220. F. Ekström, A. Hörnberg, E. Artursson, et al. Structure of HI-6•Sarin-Acetylcholinesterase Determined by X-Ray Crystallography and Molecular Dynamics Simulation: Reactivator Mechanism and Design. *PLOS ONE* **2009**, 4 (6), e5957.

221. A. Allgardsson, L. Berg, C. Akfur, et al. Structure of a prereaction complex between the nerve agent sarin, its biological target acetylcholinesterase, and the antidote HI-6. *PNAS* **2016**, 113 (20), 5514–5519.
222. A. Hörnberg, E. Artursson, R. Wärme, Y.-P. Pang, F. Ekström. Crystal structures of oxime-bound fenamiphos-acetylcholinesterases: Reactivation involving flipping of the His447 ring to form a reactive Glu334–His447–oxime triad. *Biochemical Pharmacology* **2010**, 79 (3), 507–515.
223. T. Driant, F. Nachon, C. Ollivier, P.-Y. Renard, E. Derat. On the Influence of the Protonation States of Active Site Residues on AChE Reactivation: A QM/MM Approach. *ChemBioChem* **2017**, 18 (7), 666–675.
224. E. Artursson, P.O. Andersson, C. Akfur, et al. Catalytic-site conformational equilibrium in nerve-agent adducts of acetylcholinesterase: Possible implications for the HI-6 antidote substrate specificity. *Biochemical Pharmacology* **2013**, 85 (9), 1389–1397.
225. G. Becker, A. Kawan, D. Gutzeit, F. Worek, L. Szinicz. Direct reaction of oximes with crotylsarin, cyclosarin, or VX in vitro. *Archives of Toxicology* **2007**, 6 (81), 415–420.
226. H.P.M. van Helden, R.W. Busker, B.P.C. Melchers, P.L.B. Bruijnzeel. Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? *Arch Toxicol* **1996**, 70 (12), 779–786.
227. B.P.C. Melchers, A.L. Van der Laaken, H.P.M. Van Helden. On the mechanism whereby HI-6 improves neuromuscular function after oxime-resistant acetylcholinesterase inhibition and subsequent impairment of neuromuscular transmission. *European Journal of Pharmacology* **1991**, 200 (2), 331–337.
228. J.G. Clement. Pharmacological actions of HS-6, an oxime, on the neuromuscular junction. *European Journal of Pharmacology* **1979**, 53 (2), 135–141.
229. D. Kuhnen-Clausen, I. Hagedorn, G. Gross, H. Bayer, F. Hucho. Interactions of bisquaternary pyridine salts (H-Oximes) with cholinergic receptors. *Arch Toxicol* **1983**, 54 (3), 171–179.
230. O.K. Øydvin, R. Tansø, P. Aas. Pre-junctional effects of oximes on [3H]-acetylcholine release in rat hippocampal slices during soman intoxication. *European Journal of Pharmacology* **2005**, 516 (3), 227–234.
231. Y. Kloog, R. Galron, M. Sokolovsky. Bisquaternary Pyridinium Oximes as Presynaptic Agonists and Postsynaptic Antagonists of Muscarinic Receptors. *Journal of Neurochemistry* **1986**, 46 (3), 767–772.
232. V. Hepnarova, L. Muckova, A. Ring, et al. Pharmacological and toxicological in vitro and in vivo effect of higher doses of oxime reactivators. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2019**, 383, 114776.
233. D. Kirsch, W. Hauser, N. Weger. Effect of the bispyridinium oximes HGG12 and HGG42 and ganglion blocking agents on synaptic transmission and NAD(P) HFluorescence in the superior cervical ganglion of the rat after Soman poisoning in vitro. *Fundamental and Applied Toxicology* **1981**, 1 (2), 169–176.
234. J. Ellis, M. Seidenberg. Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **1992**, 42 (4), 638–641.
235. J.B. Machamer, J.P. Apland, B.M. Winner, et al. Functional basis for dose-dependent antagonism of rat and rabbit neuromuscular transmission by the bis-pyridinium oxime MMB4. *Arch Toxicol* **2020**, 94 (11), 3877–3891.
236. J.E.H. Tattersall. Ion channel blockade by oximes and recovery of diaphragm muscle from soman poisoning in vitro. *British Journal of Pharmacology* **1993**, 108 (4), 1006–1015.
237. M. Alkondon, E.X. Albuquerque. The nonoxime bispyridinium compound SAD-128 alters the kinetic properties of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel: a possible mechanism for antidotal effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, 250 (3), 842–852.
238. A. Ring, B.O. Strom, S.R. Turner, et al. Bispyridinium Compounds Inhibit Both Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Human Cell Lines. *PLoS ONE* **2015**, 10 (8), e0135811.

239. D. Jovanović. Pharmacokinetics of pralidoxime chloride. *Arch Toxicol* **1989**, 63 (5), 416–418.
240. R. Kusic, D. Jovanovic, S. Randjelovic, et al. HI-6 in Man: Efficacy of the Oxime in Poisoning by Organophosphorus Insecticides. *Hum Exp Toxicol* **1991**, 10 (2), 113–118.
241. F.R. Sidell, W.A. Groff. Toxogonin: Blood Levels and Side Effects After Intramuscular Administration In Man. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1970**, 59 (6), 793–797.
242. J.G. Clement, D.G. Bailey, H.D. Madill, L.T. Tran, J.D. Spence. The acetylcholinesterase oxime reactivator HI-6 in man: Pharmacokinetics and tolerability in combination with atropine. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **1995**, 16 (5), 415–425.
243. P. Eyer. The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning. *Toxicol Rev* **2003**, 22 (3), 165–190.
244. A.-G. Calas, J. Dias, C. Rousseau, et al. An easy method for the determination of active concentrations of cholinesterase reactivators in blood samples: Application to the efficacy assessment of non quaternary reactivators compared to HI-6 and pralidoxime in VX-poisoned mice. *Chemico-Biological Interactions* **2017**, 267, 11–16.
245. K.S. Pawar, R.R. Bhoite, C.P. Pillay, et al. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *The Lancet* **2006**, 368 (9553), 2136–2141.
246. H. Garrigue, J.C. Maurizis, C. Nicolas, et al. Disposition and metabolism of two acetylcholinesterase reactivators, pyrimidoxime and HI6, in rats submitted to organophosphate poisoning. *Xenobiotica* **1990**, 20 (7), 699–709.
247. P. Eyer, B. Ladstetter, W. Schäfer, J. Sonnenbichler. Studies on the stability and decomposition of the Hagedorn-oxime HLö 7 in aqueous solution. *Arch Toxicol* **1989**, 63 (1), 59–67.
248. A.P.-Z. Clark, L.A. Cabell, J.A. McDonough. MMSL: MMSL, 2014 (vol. 83), issue 1. *MMSL* **2014**, 83 (1), 18–27.
249. A.C. Schroeder, J.H. Digiovanni, J.V. Bredow, M.H. Heiffer. Pralidoxime Chloride Stability-Indicating Assay and Analysis of Solution Samples Stored at Room Temperature for Ten Years. *JPharmSci* **1989**, 78 (2), 132–136.
250. S. Rubnov, S. Amisar, D. Levy, S. Muchtar, H. Schneider. Stability of Trimedoxime in Concentrated Acidic Injectable Solutions. *Military Medicine* **1999**, 164 (1), 55–58.
251. S. Rubnov, I. Shats, D. Levy, S. Amisar, H. Schneider. Autocatalytic Degradation and Stability of Obidoxime. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1999**, 51 (1), 9–14.
252. P. Eyer, I. Hagedorn, B. Ladstetter. Study on the stability of the oxime HI 6 in aqueous solution. *Arch Toxicol* **1988**, 62 (2), 224–226.
253. C.M. Wilhelm, T.H. Snider, M.C. Babin, et al. A comprehensive evaluation of the efficacy of leading oxime therapies in guinea pigs exposed to organophosphorus chemical warfare agents or pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2014**, 281 (3), 254–265.
254. A. Braïki. Conceptions, synthèses et évaluations biologiques de nouveaux réactivateurs de l'Acétylcholinestérase inhibée par des neurotoxiques organophosphorés. These de doctorat, Normandie, **2018**.
255. A. Blumenberg, R. Benabbas, I.S. deSouza, et al. Utility of 2-Pyridine Aldoxime Methyl Chloride (2-PAM) for Acute Organophosphate Poisoning: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Med. Toxicol.* **2018**, 14 (1), 91–98.
256. N.A. Buckley, M. Eddleston, Y. Li, M. Bevan, J. Robertson. Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2011**, No. 2.
257. J. Kassa. Review of Oximes in the Antidotal Treatment of Poisoning by Organophosphorus Nerve Agents. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* **2002**, 40 (6), 803–816.
258. C. Becker, F. Worek, H. John. Chromatographic analysis of toxic phosphorylated oximes (POX): a brief overview. *Drug Testing and Analysis* **2010**, 2 (10), 460–468.

259. F. Worek, P. Eyer, D. Kiderlen, H. Thiermann, L. Szinicz. Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase. *Arch Toxicol* **2000**, 74 (1), 21–26.
260. H. Leader, A. Vincze, B. Manisterski, et al. Characterization of O,O-diethylphosphoryl oximes as inhibitors of cholinesterases and substrates of phosphotriesterases. *Biochem Pharmacol* **1999**, 58 (3), 503–515.
261. Y. Ashani, A.K. Bhattacharjee, H. Leader, A. Saxena, B.P. Doctor. Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators. *Biochemical Pharmacology* **2003**, 66 (2), 191–202.
262. D. Kiderlen, P. Eyer, F. Worek. Formation and disposition of diethylphosphoryl-obidoxime, a potent anticholinesterase that is hydrolyzed by human paraoxonase (PON1). *Biochemical Pharmacology* **2005**, 69 (12), 1853–1867.
263. J. Stenzel, F. Worek, P. Eyer. Preparation and characterization of dialkylphosphoryl-obidoxime conjugates, potent anticholinesterase derivatives that are quickly hydrolyzed by human paraoxonase (PON1192Q). *Biochemical Pharmacology* **2007**, 74 (9), 1390–1400.
264. S. Herkenhoff, L. Szinicz, V.K. Rastogi, et al. Effect of organophosphorus hydrolysing enzymes on obidoxime-induced reactivation of organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. *Arch Toxicol* **2004**, 78 (6), 338–343.
265. F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, 259, 93–98.
266. Y. Ashani, M.K. Gentry, B.P. Doctor. Differences in conformational stability between native and phosphorylated acetylcholinesterase as evidenced by a monoclonal antibody. *Biochemistry* **1990**, 29 (10), 2456–2463.
267. L. Bartosova, K. Kuca, G. Kunesova, D. Jun. The Acute Toxicity of Acetylcholinesterase Reactivators in Mice in Relation to Their Structure. *neurotox res* **2006**, 9 (4), 291.
268. J. Kassa, J. Karasova, K. Musilek, K. Kuca. An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology* **2008**, 243 (3), 311–316.
269. J. Kassa, D. Jun, K. Kuca. The Reactivating and Therapeutic Efficacy of Oximes to Counteract Russian VX Poisonings. *Int J Toxicol* **2006**, 25 (5), 397–401.
270. V.A. Voicu, H. Thiermann, F.Ş. Rădulescu, C. Mircioiu, D.S. Miron. The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphonates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2010**, 106 (2), 73–85.
271. V. Voicu, F.Ş. Rădulescu, A. Medvedovici. Toxicological considerations of acetylcholinesterase reactivators. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2013**, 9 (1), 31–50.
272. V. Jačević, E. Nepovimova, K. Kuča. Acute Toxic Injuries of Rat's Visceral Tissues Induced by Different Oximes. *Sci Rep* **2019**, 9 (1), 16425.
273. V. Jačević, E. Nepovimova, K. Kuča. Toxic Injury to Muscle Tissue of Rats Following Acute Oximes Exposure. *Sci Rep* **2019**, 9 (1), 1457.
274. M. Balali-Mood, M. Shariat. Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. *J Physiology (Paris)* **1998**, 92, 375–378.
275. I.N. Pessah, M.A. Rogawski, D.J. Tancredi, et al. Models to identify treatments for the acute and persistent effects of seizure-inducing chemical threat agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2016**, 1378 (1), 124–136.
276. J.L. Burchfiel, F.H. Duffy. Organophosphate neurotoxicity: chronic effects of sarin on the electroencephalogram of monkey and man. *Neurobehav Toxicol Teratol* **1982**, 4 (6), 767–778.
277. M.B. Abou-Donia, B. Siracuse, N. Gupta, A. Sobel Sokol. Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review. *Crit Rev Toxicol* **2016**, 46 (10), 845–875.

278. L. Angrand, S. Takillah, I. Malissin, et al. Persistent brainwave disruption and cognitive impairment induced by acute sarin surrogate sub-lethal dose exposure. *Toxicology* **2021**, 456, 152787.
279. Y. Nishiwaki, K. Maekawa, Y. Ogawa, et al. Effects of sarin on the nervous system in rescue team staff members and police officers 3 years after the Tokyo subway sarin attack. *Environmental Health Perspectives* **2001**, 109 (11), 1169–1173.
280. K. Murata, S. Araki, K. Yokoyama, et al. Asymptomatic sequelae to acute sarin poisoning in the central and autonomic nervous system 6 months after the Tokyo subway attack. *J Neurol* **1997**, 244 (10), 601–606.
281. K. Yokoyama, S. Araki, K. Murata, et al. Chronic neurobehavioral and central and autonomic nervous system effects of Tokyo subway sarin poisoning. *Journal of Physiology-Paris* **1998**, 92 (3), 317–323.
282. N. Yanagisawa, H. Morita, T. Nakajima. Sarin experiences in Japan: Acute toxicity and long-term effects. *Journal of the Neurological Sciences* **2006**, 249 (1), 76–85.
283. K. Miyaki, Y. Nishiwaki, K. Maekawa, et al. Effects of Sarin on the Nervous System of Subway Workers Seven Years after the Tokyo Subway Sarin Attack. *Journal of Occupational Health* **2005**, 47 (4), 299–304.
284. J. Bajgar. Organophosphates / Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment. In *Advances in Clinical Chemistry*; Elsevier, **2004**; Vol. 38, pp 151–216.
285. E.L. D., K. H., A.P. G., T. K. Entry of Oximes into the Brain: A Review. *Current Medicinal Chemistry* **2008**, 15 (8), 743–753.
286. G. Cassel, L. Karlsson, L. Waara, K.W. Ang, A. Göransson-Nyberg. Pharmacokinetics and effects of HI 6 in blood and brain of soman-intoxicated rats: A microdialysis study. *European Journal of Pharmacology* **1997**, 332 (1), 43–52.
287. F. Worek, T. Kirchner, L. Szinicz. Effect of atropine and bispyridinium oximes on respiratory and circulatory function in guinea-pigs poisoned by sarin. *Toxicology* **1995**, 95 (1), 123–133.
288. V. Voicu, F.Ş. Rădulescu, A. Medvedovici. Relationships between the antidotal efficacy and structure, PK/PD parameters and bio-relevant molecular descriptors of AChE reactivating oximes: inclusion and integration to biopharmaceutical classification systems. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2015**, 11 (1), 95–109.
289. G.A. Petroianu, D.E. Lorke, M.Y. Hasan, et al. Paraoxon has only a minimal effect on pralidoxime brain concentration in rats. *Journal of Applied Toxicology* **2007**, 27 (4), 350–357.
290. K. Sakurada, K. Matsubara, K. Shimizu, et al. Pralidoxime Iodide (2-PAM) Penetrates Across the Blood-Brain Barrier. *Neurochem Res* **2003**, 28 (9), 1401–1407.
291. A. Falb, W.D. Erdmann. [Penetration of ¹⁴C-obidoxime through the so-called blood-brain barrier of mice and rats]. *Arch Toxikol* **1969**, 24 (2), 123–132.
292. J. Yang, L. Fan, F. Wang, et al. Rapid-releasing of HI-6 via brain-targeted mesoporous silica nanoparticles for nerve agent detoxification. *Nanoscale* **2016**, 8 (18), 9537–9547.
293. T.N. Pashirova, I.V. Zueva, K.A. Petrov, et al. Nanoparticle-Delivered 2-PAM for Rat Brain Protection against Paraoxon Central Toxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9 (20), 16922–16932.
294. D.N. Buzyurova, T.N. Pashirova, I.V. Zueva, et al. Surface modification of pralidoxime chloride-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced brain reactivation of organophosphorus-inhibited AChE: Pharmacokinetics in rat. *Toxicology* **2020**, 444, 152578.
295. G. Mercey, T. Verdelet, J. Renou, et al. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (5), 756–766.
296. M. Hoskovcová, E. Halánek, Z. Kobliha, I. Tušarová. Reactivation of immobilized acetylcholinesterasetabun complex by pralidoxime, its isomers, and homologs. *Toxicology Mechanisms and Methods* **2010**, 20 (5), 223–226.

297. J. Picha, K. Kuca, M. Kivala, et al. A new group of monoquaternary reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2005**, 20 (3), 233–237.
298. K. Kuča, J. Pícha, J. Cabal, F. Liška. Synthesis of the three monopyridinium oximes and evaluation of their potency to reactivate acetylcholinesterase inhibited by nerve agents. *J Appl Biomed* **2004**, 2 (1), 51–56.
299. P. Pooja, S. Aggarwal, A.K. Tiwari, et al. Novel pyridinium oximes: synthesis, molecular docking and in vitro reactivation studies. *RSC Adv.* **2015**, 5 (30), 23471–23480.
300. H. Ohta, T. Ohmori, S. Suzuki, et al. New Safe Method for Preparation of Sarin-Exposed Human Erythrocytes Acetylcholinesterase Using Non-Toxic and Stable Sarin Analogue Isopropyl p-Nitrophenyl Methylphosphonate and its Application to Evaluation of Nerve Agent Antidotes. *Pharm Res* **2006**, 23 (12), 2827–2833.
301. D.A.S. Kitagawa, R.B. Rodrigues, T.N. Silva, et al. Design, synthesis, in silico studies and in vitro evaluation of isatin-pyridine oximes hybrids as novel acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2021**, 36 (1), 1370–1377.
302. G. Amitai, R. Gez, L. Raveh, et al. Novel bifunctional hybrid small molecule scavengers for mitigating nerve agents toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, 259, 187–204.
303. V. Bušić, M. Katalinić, G. Šinko, Z. Kovarik, D. Gašo-Sokač. Pyridoxal oxime derivative potency to reactivate cholinesterases inhibited by organophosphorus compounds. *Toxicology Letters* **2016**, 262, 114–122.
304. N. Maček Hrvat, J. Kalisiak, G. Šinko, et al. Evaluation of high-affinity phenyltetrahydroisoquinoline aldoximes, linked through anti-triazoles, as reactivators of phosphorylated cholinesterases. *Toxicology Letters* **2020**, 321, 83–89.
305. M.C. de Koning, M.J.A. Joosen, D. Noort, A. van Zuylen, M.C. Tromp. Peripheral site ligand–oxime conjugates: A novel concept towards reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19 (1), 588–594.
306. J.E. Chambers, H.W. Chambers, K.E. Funck, et al. Efficacy of novel phenoxyalkyl pyridinium oximes as brain-penetrating reactivators of cholinesterase inhibited by surrogates of sarin and VX. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, 259, 154–159.
307. J.E. Chambers, H.W. Chambers, E.C. Meek, R.B. Pringle. Testing of novel brain-penetrating oxime reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agent surrogates. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, 203 (1), 135–138.
308. J.E. Chambers, E.C. Meek. Novel centrally active oxime reactivators of acetylcholinesterase inhibited by surrogates of sarin and VX. *Neurobiology of Disease* **2020**, 133, 104487.
309. J.E. Chambers, M.B. Dail, E.C. Meek. Oxime-mediated reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase with emphasis on centrally-active oximes. *Neuropharmacology* **2020**, 175, 108201.
310. M.B. Dail, C.A. Leach, E.C. Meek, et al. Novel Brain-Penetrating Oxime Acetylcholinesterase Reactivators Attenuate Organophosphate-Induced Neuropathology in the Rat Hippocampus. *Toxicological Sciences* **2019**, 169 (2), 465–474.
311. M.B. Dail, E.C. Meek, H.W. Chambers, J.E. Chambers. In vitro P-glycoprotein activity does not completely explain in vivo efficacy of novel centrally effective oxime acetylcholinesterase reactivators. *Drug and Chemical Toxicology* **2019**, 42 (4), 403–408.
312. E. Reiner, V. Simeon-Rudolf. PYRIDINIUM, IMIDAZOLIUM AND QUINUCLIDIUM COMPOUNDS: TOXICITY AND ANTIDOTAL EFFECTS AGAINST THE NERVE AGENTS TABUN AND SOMAN. *Arh Hig Rada Toksikol* **2006**, No. 57, 171–179.
313. M.C. de Koning, M.J.A. Joosen, F. Worek, et al. Application of the Ugi Multicomponent Reaction in the Synthesis of Reactivators of Nerve Agent Inhibited Acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (22), 9376–9392.

314. A. Zandona. Targeting organophosphorus compounds poisoning by novel quinuclidine-3 oximes: development of butyrylcholinesterase-based bioscavengers. *Archives of Toxicology* **2020**, 94, 3157–3171.
315. M. Katalinić, A. Zandona, A. Ramić, et al. New Cinchona Oximes Evaluated as Reactivators of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds. *Molecules* **2017**, 22 (7), 1234.
316. Y.-P. Pang, T.M. Kollmeyer, F. Hong, et al. Rational Design of Alkylene-Linked Bis-Pyridiniumaldoximes as Improved Acetylcholinesterase Reactivators. *Chemistry & Biology* **2003**, 10 (6), 491–502.
317. J. Acharya, A.K. Gupta, A. Mazumder, D.K. Dubey. In vitro reactivation of sarin inhibited electric eel acetylcholinesterase by bis-pyridinium oximes bearing methoxy ether linkages. *Toxicology in Vitro* **2008**, 22 (2), 525–530.
318. K. Musilek, M. Komloova, O. Holas, et al. Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage—Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19 (2), 754–762.
319. D.A. Polisel, A.A. de Castro, D.T. Mancini, et al. Slight difference in the isomeric oximes K206 and K203 makes huge difference for the reactivation of organophosphorus-inhibited AChE: Theoretical and experimental aspects. *Chemico-Biological Interactions* **2019**, 309, 108671.
320. K. Tekes, G. Karvaly, S. Nurulain, et al. Pharmacokinetics of K117 and K127, two novel antidote candidates to treat Tabun poisoning. *Chemico-Biological Interactions* **2019**, 310, 108737.
321. D.E. Lorke, G.A. Petroianu. The Experimental Oxime K027—A Promising Protector From Organophosphate Pesticide Poisoning. A Review Comparing K027, K048, Pralidoxime, and Obidoxime. *Frontiers in Neuroscience* **2019**, 13, 427.
322. K. Kuca, K. Musilek, D. Jun, et al. A newly developed oxime K203 is the most effective reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *BMC Pharmacol Toxicol* **2018**, 19 (1), 8.
323. J. Kassa, K. Kuca, J. Cabal, M. Paar. A Comparison of the Efficacy of New Asymmetric Bispyridinium Oximes (K027, K048) with Currently Available Oximes Against Tabun by In Vivo Methods. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2006**, 69 (20), 1875–1882.
324. T. Zorbaz, D. Malinak, N. Maraković, et al. Pyridinium Oximes with *Ortho* -Positioned Chlorine Moiety Exhibit Improved Physicochemical Properties and Efficient Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Several Nerve Agents. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (23), 10753–10766.
325. D.E. Lorke, S.M. Nurulain, M.Y. Hasan, K. Kuča, G.A. Petroianu. Experimental and Established Oximes as Pretreatment before Acute Exposure to Azinphos-Methyl. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22 (6), 3072.
326. M.C. de Koning, G. Horn, F. Worek, M. van Grol. Discovery of a potent non-oxime reactivator of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 157, 151–160.
327. M.C. de Koning, G. Horn, F. Worek, M. van Grol. Synthesis and in vitro evaluation of novel non-oximes for the reactivation of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions* **2020**, 326, 109139.
328. Z. Radić, R.K. Sit, Z. Kovarik, et al. Refinement of Structural Leads for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases *. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287 (15), 11798–11809.
329. T.-M. Shih, B.L. Oyler, B.R. Capacio, I. Koplovitz. The tertiary oxime monoisonitrosoacetone penetrates the brain, reactivates inhibited acetylcholinesterase, and reduces mortality and morbidity following lethal sarin intoxication in guinea pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2021**, 415, 115443.

330. K.J. Okolotowicz, M. Dwyer, E. Smith, J.R. Cashman. Preclinical Studies of Noncharged Oxime Reactivators for Organophosphate Exposure: NONCHARGED OXIME REACTIVATORS. *J Biochem Mol Toxicol* **2014**, 28 (1), 23–31.
331. Z. Radić, R.K. Sit, E. Garcia, et al. Mechanism of interaction of novel uncharged, centrally active reactivators with OP-hAChE conjugates. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, 203 (1), 67–71.
332. M.A. Malfatti, H.A. Enright, N.A. Be, et al. The biodistribution and pharmacokinetics of the oxime acetylcholinesterase reactivator RS194B in guinea pigs. *Chemico-Biological Interactions* **2017**, 277, 159–167.
333. B.J. Bennion, M.A. Malfatti, N.A. Be, et al. Development of a CNS-permeable reactivator for nerve agent exposure: an iterative, multi-disciplinary approach. *Sci Rep* **2021**, 11 (1), 15567.
334. L. Gorecki, O. Gerlits, X. Kong, et al. Rational design, synthesis, and evaluation of uncharged, “smart” bis-oxime antidotes of organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, 295 (13), 4079–4092.
335. H.P. Benschop, G.R. Van den Berg, C. Van Hooijdonk, et al. Antidotes to organophosphate poisoning. 2. Thiadiazole-5-carboxaloximes. *J. Med. Chem.* **1979**, 22 (11), 1306–1313.
336. T.S. Ribeiro, A. Prates, S.R. Alves, et al. The effect of neutral oximes on the reactivation of human acetylcholinesterase inhibited with paraoxon. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23 (7), 1216–1225.
337. Z. Wei, Y. Liu, X. Zhou, et al. New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24 (24), 5743–5748.
338. Z. Wei, J. Yang, Y. Liu, et al. Molecular modeling-guided optimization of acetylcholinesterase reactivators: A proof for reactivation of covalently inhibited targets. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 215, 113286.
339. Z. Wei, Y. Liu, S. Wang, et al. Conjugates of salicylaloximes and peripheral site ligands: Novel efficient nonquaternary reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, 25 (16), 4497–4505.
340. D. Kitagawa, S. Cavalcante, R. de Paula, et al. In Vitro Evaluation of Neutral Aryloximes as Reactivators for Electrophorus eel Acetylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Biomolecules* **2019**, 9 (10), 583.
341. Z. Wei, J. Yang, Y. Liu, et al. Molecular modeling-guided optimization of acetylcholinesterase reactivators: A proof for reactivation of covalently inhibited targets. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 215, 113286.
342. X. Lu, Z. Zhang, R. Gao, H. Wang, J. Xiao. Recent progress in the chemical attribution of chemical warfare agents and highly toxic organophosphorus pesticides. *Forensic Toxicol* **2021**, 39 (2), 334–349.
343. N. Amend, J. Langgartner, M. Siegert, et al. A case report of cholinesterase inhibitor poisoning: cholinesterase activities and analytical methods for diagnosis and clinical decision making. *Arch Toxicol* **2020**, 94 (6), 2239–2247.
344. G. Saint-André, M. Kliachyna, S. Kodepelly, et al. Design, synthesis and evaluation of new α -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. *Tetrahedron* **2011**, 67 (34), 6352–6361.
345. L. Louise-Leriche, E. Păunescu, G. Saint-André, et al. A HTS Assay for the Detection of Organophosphorus Nerve Agent Scavengers. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16 (11), 3510–3523.
346. J. Renou, J. Dias, G. Mercey, et al. Synthesis and in vitro evaluation of donepezil-based reactivators and analogues for nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *RSC Adv.* **2016**, 6 (22), 17929–17940.
347. M. Kliachyna, G. Santoni, V. Nussbaum, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine- aldoxime and -amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators

- of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 78, 455–467.
348. J. Renou, M. Liodice, M. Arboléas, et al. Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphylated human acetyl and butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (30), 3947–3950.
349. G. Santoni, J. de Sousa, E. de la Mora, et al. Structure-Based Optimization of Nonquaternary Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (17), 7630–7639.
350. G. Mercey, J. Renou, T. Verdelet, et al. Phenyltetrahydroisoquinoline–Pyridinaldoxime Conjugates as Efficient Uncharged Reactivators for the Dephosphylation of Inhibited Human Acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (23), 10791–10795.
351. A.-G. Calas, J. Dias, C. Rousseau, et al. An easy method for the determination of active concentrations of cholinesterase reactivators in blood samples: Application to the efficacy assessment of non quaternary reactivators compared to HI-6 and pralidoxime in VX-poisoned mice. *Chemico-Biological Interactions* **2017**, 267, 11–16.
352. A.-G. Calas, A.-S. Hanak, N. Jaffré, et al. Efficacy Assessment of an Uncharged Reactivator of NOP-Inhibited Acetylcholinesterase Based on Tetrahydroacridine Pyridine-Aldoxime Hybrid in Mouse Compared to Pralidoxime. *Biomolecules* **2020**, 10 (6), 858.
353. L. Lumley, J. Niquet, B. Marrero-Rosado, et al. Treatment of acetylcholinesterase inhibitor-induced seizures with polytherapy targeting GABA and glutamate receptors. *Neuropharmacology* **2021**, 185, 108444.
354. X.M. Shao, J.L. Feldman. Central cholinergic regulation of respiration: nicotinic receptors. *Acta Pharmacol Sin* **2009**, 30 (6), 761–770.
355. D. Bertrand, T.L. Wallace. A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders. In *Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System*; Shoaib, M., Wallace, T. L., Eds.; Current Topics in Behavioral Neurosciences; Springer International Publishing, Cham, **2020**; pp 1–28.
356. D.G. Waller, A.P. Sampson. 27 - The neuromuscular junction and neuromuscular blockade. In *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)*; Waller, D. G., Sampson, A. P., Eds.; Elsevier, **2018**; pp 351–357.
357. R. Piovesana, M.S. Salazar Intriago, L. Dini, A.M. Tata. Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22 (9), 4912.
358. M. Faria, L. Oliveira, M.A. Timóteo, M.G. Lobo, P. Correia-de-sá. Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing $\alpha 3\beta 2$ subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm: $\alpha 3\beta 2$ Nicotinic Receptors on Motoneurons. *Synapse* **2003**, 49 (2), 77–88.
359. C. Prior, L. Tian, J. Dempster, I.G. Marshall. Prejunctional actions of muscle relaxants: Synaptic vesicles and transmitter mobilization as sites of action. *General Pharmacology: The Vascular System* **1995**, 26 (4), 659–666.
360. K.J. Tracey. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117 (2), 289–296.
361. J. Corradi, C. Bouzat. Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol* **2016**, 90 (3), 288–299.
362. C.L. Morales-Perez, C.M. Noviello, R.E. Hibbs. X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature* **2016**, 538 (7625), 411–415.
363. A. Mourot. Structure et dynamique du récepteur nicotinique. These de doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008), **2004**.
364. J.-P. Changeux, Y. Paas. Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Encyclopedia of neuroscience* **2009**, 1129–1133.

365. C.M. Noviello, A. Gharpure, N. Mukhtasimova, et al. Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cell* **2021**, 184 (8), 2121–2134.
366. L.W. Role, D.K. Berg. Nicotinic Receptors in the Development and Modulation of CNS Synapses. *Neuron* **1996**, 16 (6), 1077–1085.
367. A. Taly, P.-J. Corringer, D. Guedin, P. Lestage, J.-P. Changeux. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, 8 (9), 733–750.
368. R. Aráoz, P. Barnes, V. Séchet, et al. Cyclic imine toxins survey in coastal european shellfish samples: Bioaccumulation and mode of action of 28-O-palmitoyl ester of pinnatoxin-G. first report of portimine-A bioaccumulation. *Harmful Algae* **2020**, 98, 101887.
369. M.W. Quick, R.A.J. Lester. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* **2002**, 53 (4), 457–478.
370. R. Giniatullin, A. Nistri, J. Yakel. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends in Neurosciences* **2005**, 28 (7), 371–378.
371. M. Alkondon, Y. Aracava, E.F.R. Pereira, E.X. Albuquerque. A Single in Vivo Application of Cholinesterase Inhibitors Has Neuron Type-Specific Effects on Nicotinic Receptor Activity in Guinea Pig Hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, 328 (1), 69–82.
372. R.A. Maselli, C. Leung. Analysis of Neuromuscular Transmission Failure Induced by Anticholinesterases. *Ann NY Acad Sci* **1993**, 681 (1 Myasthenia Gr), 402–404.
373. L.M. Broad, R. Zwart, K.H. Pearson, et al. Identification and Pharmacological Profile of a New Class of Selective Nicotinic Acetylcholine Receptor Potentiators. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, 318 (3), 1108–1117.
374. T. Collins, G.T. Young, N.S. Millar. Competitive binding at a nicotinic receptor transmembrane site of two $\alpha 7$ -selective positive allosteric modulators with differing effects on agonist-evoked desensitization. *Neuropharmacology* **2011**, 61 (8), 1306–1313.
375. J. Halvard Grønlien, M. Håkerud, H. Ween, et al. Distinct Profiles of $\alpha 7$ nAChR Positive Allosteric Modulation Revealed by Structurally Diverse Chemotypes. *Mol Pharmacol* **2007**, 72 (3), 715–724.
376. R.S. Hurst. A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization. *Journal of Neuroscience* **2005**, 25 (17), 4396–4405.
377. R. Faghiih, S.M. Gopalakrishnan, J.H. Gronlien, et al. Discovery of 4-(5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744) as a Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (10), 3377–3384.
378. N.A. Horenstein, R.L. Papke, A.R. Kulkarni, et al. Critical Molecular Determinants of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Allosteric Activation: SEPARATION OF DIRECT ALLOSTERIC ACTIVATION AND POSITIVE ALLOSTERIC MODULATION *. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, 291 (10), 5049–5067.
379. R.L. Papke, S. Garai, C. Stokes, et al. Differing Activity Profiles of the Stereoisomers of 2,3,5,6TMP-TQS, a Putative Silent Allosteric Modulator of $\alpha 7$ nAChR. *Mol Pharmacol* **2020**, 98 (4), 292–302.
380. W.A. Varanda, Y. Aracava, S.M. Sherby, et al. The acetylcholine receptor of the neuromuscular junction recognizes mecamylamine as a noncompetitive antagonist. *Mol. Pharmacol.* **1985**, 28 (2), 128–137.
381. N.B. Fedorov, L.C. Benson, J. Graef, P.M. Lippiello, M. Bencherif. Differential Pharmacologies of Mecamylamine Enantiomers: Positive Allosteric Modulation and Noncompetitive Inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, 328 (2), 525–532.
382. B. Yi, S. Long, T.F. González-Cestari, et al. Discovery of benzamide analogs as negative allosteric modulators of human neuronal nicotinic receptors: Pharmacophore modeling and structure–activity relationship studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21 (15), 4730–4743.

383. R.F. Yoshimura, D.J. Hogenkamp, W.Y. Li, et al. Negative Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors Blocks Nicotine Self-Administration in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, 323 (3), 907–915.
384. J.K. Gill, M. Savolainen, G.T. Young, et al. Agonist activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108 (14), 5867–5872.
385. M. Quadri, R.L. Papke, N.A. Horenstein. Dissection of N,N-diethyl-N'-phenylpiperazines as $\alpha 7$ nicotinic receptor silent agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, 24 (2), 286–293.
386. D.K. Williams, J. Wang, R.L. Papke. Investigation of the Molecular Mechanism of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulator PNU-120596 Provides Evidence for Two Distinct Desensitized States. *Mol Pharmacol* **2011**, 80 (6), 1013–1032.
387. I. Ledneczki, A. Horváth, P. Tapolcsányi, et al. HTS-based discovery and optimization of novel positive allosteric modulators of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 222, 113560.
388. F. Delbart, M. Brams, F. Gruss, et al. An allosteric binding site of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor revealed in a humanized acetylcholine-binding protein. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293 (7), 2534–2545.
389. R. Spurny, S. Debaveye, A. Farinha, et al. Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**, 112 (19), E2543–E2552.
390. K.M. Targowska-Duda, A.A. Kaczor, K. Jozwiak, H.R. Arias. Molecular interactions of type I and type II positive allosteric modulators with the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor: an *in silico* study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2019**, 37 (2), 411–439.
391. P. Möller-Acuña, J.S. Contreras-Riquelme, C. Rojas-Fuentes, et al. Similarities between the Binding Sites of SB-206553 at Serotonin Type 2 and Alpha7 Acetylcholine Nicotinic Receptors: Rationale for Its Polypharmacological Profile. *PLoS ONE* **2015**, 10 (8), e0134444.
392. A. Zandona, M. Katalinić. Nicotinic acetylcholine receptors: Diversity and physiological importance for neurodegenerative disorders and development of organophosphate antidotes. *Periodicum Biologorum* **2020**, No. 3–4, 115–128.
393. A.A. Pandya, J.L. Yakel. Effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulators in animal behavior studies. *Biochemical Pharmacology* **2013**, 86 (8), 1054–1062.
394. K.M. Targowska-Duda, B. Budzynska, A. Michalak, et al. Type I and type II positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors induce antidepressant-like activity in mice by a mechanism involving receptor potentiation but not neurotransmitter reuptake inhibition. Correlation with mTOR intracellular pathway activation. *European Neuropsychopharmacology* **2021**, 52, 31–47.
395. N. Sinha, N.P. Karche, M.K. Verma, et al. Discovery of Novel, Potent, Brain-Permeable, and Orally Efficacious Positive Allosteric Modulator of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor [4-(5-(4-Chlorophenyl)-4-methyl-2-propionylthiophen-3-yl)benzenesulfonamide]: Structure–Activity Relationship and Preclinical Characterization. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (3), 944–960.
396. R. Besser, T. Vogt, L. Gutmann, I. Wessler. High pancuronium sensitivity of axonal nicotinic-acetylcholine receptors in humans during organophosphate intoxication. *Muscle Nerve* **1991**, 14 (12), 1197–1201.
397. R. Besser, L. Gutmann. A quantitative study of the pancuronium antagonism at the motor endplate in human organophosphorus intoxication. *Muscle Nerve* **1995**, 18 (9), 956–960.
398. A.L. Clark, F. Hobbiger, D.A. Terrar. Effects of pancuronium and hexamethonium on paraoxon-induced twitch potentiation and antidromic firing in rat phrenic nerve diaphragm preparations. *British Journal of Pharmacology* **1983**, 80 (3), 489–496.

399. R.A. Maselli, B.C. Soliven. Analysis of the organophosphate-induced electromyographic response to repetitive nerve stimulation: Paradoxical response to edrophonium and D-Tubocurarine. *Muscle Nerve* **1991**, 14 (12), 1182–1188.
400. M.W. Parkes, P. Sacra. PROTECTION AGAINST THE TOXICITY OF CHOLINESTERASE INHIBITORS BY ACETYLCHOLINE ANTAGONISTS. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1954**, 9 (3), 299–305.
401. M. Eddleston. Applied clinical pharmacology and public health in rural Asia - preventing deaths from organophosphorus pesticide and yellow oleander poisoning: Poisoning in rural Asia. *Br J Clin Pharmacol* **2013**, 75 (5), 1175–1188.
402. J. Dhanarisi, F. Shihana, K. Harju, et al. A pilot clinical study of the neuromuscular blocker rocuronium to reduce the duration of ventilation after organophosphorus insecticide poisoning. *Clinical Toxicology* **2020**, 58 (4), 254–261.
403. S.M. White. Nicotinic antagonists and nerve gas poisoning. *Journal of the Royal Society of Medicine* **2005**, 98 (7), 336–336.
404. H. Mehrani, L. Golmanesh. Evaluation of nicotinic receptors agonists and antagonists against paraoxon exposed PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2008**, 26 (1), 22–29.
405. T. Wein, G. Höfner, S. Rappenglück, et al. Searching for putative binding sites of the bispyridinium compound MB327 in the nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicology Letters* **2018**, 293, 184–189.
406. F.V. Nazardinov, M.N. Spitsin. [Experience with the use of chlorpromazine in the treatment of acute poisoning with organophosphorus compounds]. *Sov Med* **1974**, 0 (7), 147.
407. P. Benoit. Voltage dependencies of the effects of chlorpromazine on the nicotinic receptor channel from mouse muscle cell line So18. *Neuroscience Letters* **1993**, 160, 81–84.
408. R.L. Papke, P.R. Sanberg, R.D. Shytle. Analysis of Mecamylamine Stereoisomers on Human Nicotinic Receptor Subtypes. *JPET* **2001**, 297, 646–656.
409. R.A. Giniatullin, E.M. Sokolova, S. Di Angelantonio, et al. Rapid Relief of Block by Mecamylamine of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors of Rat Chromaffin Cells In Vitro: An Electrophysiological and Modeling Study. *Mol Pharmacol* **2000**, 58 (4), 778–787.
410. L.W. Harris, D.L. Sticher, W.C. Heyl. The effects of pretreatments with carbamates, atropine and mecamylamine on survival and on Soman-induced alterations in rat and rabbit brain acetylcholine. *Life Sciences* **1980**, 26 (22), 1885–1891.
411. K.V. Niessen, T. Seeger, S. Rappenglück, et al. In vitro pharmacological characterization of the bispyridinium non-oxime compound MB327 and its 2- and 3-regioisomers. *Toxicology Letters* **2018**, 293, 190–197.
412. C. Scheffel, K.V. Niessen, S. Rappenglück, et al. Electrophysiological investigation of the effect of structurally different bispyridinium non-oxime compounds on human $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor activity—An in vitro structure-activity analysis. *Toxicology Letters* **2018**, 293, 157–166.
413. C. Scheffel, K.V. Niessen, S. Rappenglück, et al. Counteracting desensitization of human $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors with bispyridinium compounds as an approach against organophosphorus poisoning. *Toxicology Letters* **2018**, 293, 149–156.
414. S.R. Turner, J.E. Chad, M. Price, et al. Protection against nerve agent poisoning by a noncompetitive nicotinic antagonist. *Toxicology Letters* **2011**, 206 (1), 105–111.
415. T. Seeger, M. Eichhorn, M. Lindner, et al. Restoration of soman-blocked neuromuscular transmission in human and rat muscle by the bispyridinium non-oxime MB327 in vitro. *Toxicology* **2012**, 294 (2–3), 80–84.
416. W. Thomas, T.W. Klaus, R. Sebastian, et al. New Resensitizers for the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Ligand-Based Pharmacophore Modeling. *Current Computer-Aided Drug Design* **2019**, 15 (1), 104–109.

417. C.M. Timperley, M. Bird, S.J. Gore, et al. 3-Quinuclidinyl- α -methoxydiphenylacetate: A multi-targeted ligand with antimuscarinic and antinicotinic effects designed for the treatment of anticholinesterase poisoning. *Toxicology Letters* **2020**, 325, 67–76.
418. W. Luo, X. Ge, W. Cui, H. Wang. Targeting Cholinesterase Inhibitor Poisoning with a Novel Blocker Against Both Nicotinic and Muscarinic Receptors. *Neurotox Res* **2010**, 18 (2), 173–186.
419. Design of hybrid molecules for drug development; Decker, M., Ed.; Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2017**.
420. B.A. Weissman, L. Raveh. Multifunctional drugs as novel antidotes for organophosphates' poisoning. *Toxicology* **2011**, 290 (2), 149–155.
421. J. Zhou, X. Jiang, S. He, et al. Rational Design of Multitarget-Directed Ligands: Strategies and Emerging Paradigms. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (20), 8881–8914.
422. R. Morphy, Z. Rankovic. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (21), 6523–6543.
423. M. Chioua, E. Buzzi, I. Moraleda, et al. Tacripyrimidines, the first tacrine-dihydropyrimidine hybrids, as multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 155, 839–846.
424. H. Fu, W. Li, J. Luo, et al. Promising anti-Alzheimer's dimer bis(7)-tacrine reduces β -amyloid generation by directly inhibiting BACE-1 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 366 (3), 631–636.
425. O.M. Bautista-Aguilera, G. Esteban, M. Chioua, et al. Multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biochemical evaluation, ADMET, molecular modeling, and QSAR analysis of novel donepezil-pyridyl hybrids. *DDDT* **2014**, 8, 1893–1910.
426. T.J. Eckroat, D.L. Manross, S.C. Cowan. Merged Tacrine-Based, Multitarget-Directed Acetylcholinesterase Inhibitors 2015–Present: Synthesis and Biological Activity. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21 (17), 5965.
427. B. Irene, G. Alejandro, M. Leticia, et al. Multipotent, Permeable Drug ASS234 Inhibits A β Aggregation, Possesses Antioxidant Properties and Protects from A β -induced Apoptosis In Vitro. *Current Alzheimer Research* **2013**, 10 (8), 797–808.
428. M. Cieslikiewicz-Bouet, M. Naldi, M. Bartolini, et al. Functional characterization of multifunctional ligands targeting acetylcholinesterase and alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemical Pharmacology* **2020**, 177, 114010.
429. PhysChem, ADME/Tox Calculations | ACD/Labs Percepta Software <https://www.acdlabs.com/products/percepta/index.php> (accessed Oct 23, 2021).
430. R.J. Bastin, M.J. Bowker, B.J. Slater. Salt Selection and Optimisation Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, 4 (5), 427–435.
431. P.C. Acharya, S. Marwein, B. Mishra, et al. Role of Salt Selection in Drug Discovery and Development. In *Dosage Form Design Considerations*; Elsevier, **2018**; pp 435–472.
432. A.-G. Calas, A.-S. Hanak, N. Jaffré, et al. Efficacy Assessment of an Uncharged Reactivator of NOP-Inhibited Acetylcholinesterase Based on Tetrahydroacridine Pyridine-Aldoxime Hybrid in Mouse Compared to Pralidoxime. *Biomolecules* **2020**, 10 (6), 858.
433. Z. Kovarik, J. Kalisiak, N.M. Hrvat, et al. Reversal of Tabun Toxicity Enabled by a Triazole-Annulated Oxime Library—Reactivators of Acetylcholinesterase. *Chem. Eur. J.* **2019**, 25 (16), 4100–4114.
434. A. Rispin, D. Farrar, E. Margosches, et al. Alternative Methods for the Median Lethal Dose (LD 50) Test: The Up-and-Down Procedure for Acute Oral Toxicity. *ILAR Journal* **2002**, 43 (4), 233–243.
435. D.A. Ligtenstein, G.W. Moes. The synergism of atropine and the cholinesterase reactivator HI-6 in counteracting lethality by organophosphate intoxication in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **1991**, 107 (1), 47–53.

436. Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *The EMBO Journal* **2009**, 28 (19), 3040–3051.
437. F.R. de Souza, D. Rodrigues Garcia, T. Cuya, et al. Molecular Modeling Study of Uncharged Oximes Compared to HI-6 and 2-PAM Inside Human AChE Sarin and VX Conjugates. *ACS Omega* **2020**, 5 (9), 4490–4500.
438. J.A. Berberich, T.R. Stouch, S. Manepalli, E.X. Esposito, J.D. Madura. Biological Testing of Organophosphorus-Inactivated Acetylcholinesterase Oxime Reactivators Identified via Virtual Screening. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, 29 (9), 1534–1540.
439. A. Carter, R. Oswald. Channel blocking properties of a series of nicotinic cholinergic agonists. *Biophysical journal* **1993**, 65, 840–851.
440. M. Quadri, D. Bagdas, W. Toma, et al. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties of the $\alpha 7$ nAChR Weak Partial Agonist p-CF₃ N,N-diethyl-N'-phenylpiperazine. *J Pharmacol Exp Ther* **2018**, 367 (2), 203–214.
441. A. Bosak, A. Ramić, T. Šmidlehner, et al. Design and evaluation of selective butyrylcholinesterase inhibitors based on Cinchona alkaloid scaffold. *PLOS ONE* **2018**, 13 (10), e0205193.
442. A. Matošević, A. Radman Kastelic, A. Mikelić, et al. Quinuclidine-Based Carbamates as Potential CNS Active Compounds. *Pharmaceutics* **2021**, 13 (3), 420.
443. R. Odžak, S. Tomić. 3-Amidoquinuclidine derivatives: Synthesis of compounds and inhibition of butyrylcholinesterase. *Bioorganic Chemistry* **2006**, 34 (2), 90–98.
444. I. Primožič, T. Hrenar, S. Tomić. Binding Modes of Quinuclidinium Esters to Butyrylcholinesterase. *Croatica Chemica Acta* **2012**, 85 (1), 77–83.
445. E. Reiner, M. Škrinjarić-Špoljar, S. Dunaj, et al. 3-Hydroxyquinuclidinium derivatives: synthesis of compounds and inhibition of acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions* **1999**, 119–120, 173–181.
446. B. Radić, A. Lucić, M. Peraica, A. Domijan, V. Bradamante. Efficiency of imidazolium and quinuclidinium derivatives combined with HI-6 or diazepam in soman and tabun poisoning. *Acta Pharmaceutica* **2001**, 51, 1–9.
447. A. Conejo-García, L. Pisani, M. del Carmen Núñez, et al. Homodimeric Bis-Quaternary Heterocyclic Ammonium Salts as Potent Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors: A Systematic Investigation of the Influence of Linker and Cationic Heads over Affinity and Selectivity. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (8), 2627–2645.
448. T. Yang, T. Xiao, Q. Sun, K. Wang. The current agonists and positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2017**, 7 (6), 611–622.
449. A.L. Bodnar, L.A. Cortes-Burgos, K.K. Cook, et al. Discovery and Structure–Activity Relationship of Quinuclidine Benzamides as Agonists of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (4), 905–908.
450. N.A. Horenstein, F.M. Leonik, R.L. Papke. Multiple Pharmacophores for the Selective Activation of Nicotinic $\alpha 7$ -Type Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* **2008**, 74 (6), 1496–1511.
451. M.D. Mashkovsky, L.N. Yakhontov, V.V. Churyukanov. Quinuclidinium Compounds. In *New Neuromuscular Blocking Agents: Basic and Applied Aspects*; Kharkevich, D. A., Ed.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer, Berlin, Heidelberg, **1986**; pp 371–382.
452. H.R. Arias, J.J. López, D. Feuerbach, et al. Novel 2-(substituted benzyl)quinuclidines inhibit human $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors by different mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2013**, 45 (11), 2420–2430.
453. O. Fischer, J. Hofmann, H. Rampp, et al. Regiospecific Introduction of Halogens on the 2-Aminobiphenyl Subunit Leading to Highly Potent and Selective M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Antagonists and Weak Inverse Agonists. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (8), 4349–4369.
454. M. Pons. Toward an innovative treatment of Alzheimer's disease : Design of novel multi-target directed ligands. thèse, Normandie Université, **2019**.

455. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46 (1–3), 3–26.
456. H. Pajouhesh, G.R. Lenz. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *Neurotherapeutics* **2005**, 2 (4), 541–553.
457. T.T. Wager, X. Hou, P.R. Verhoest, A. Villalobos. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1 (6), 435–449.
458. T.T. Wager, X. Hou, P.R. Verhoest, A. Villalobos. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, 7 (6), 767–775.
459. M.D. Shultz. Two Decades under the Influence of the Rule of Five and the Changing Properties of Approved Oral Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (4), 1701–1714.
460. K. Lanevskij, P. Japertas, R. Didziapetris. Classification of drugs by CNS Access: an insight from quantitative blood-brain transport characteristics https://www.acdlabs.com/download/publ/2012/acss12_cns.pdf (accessed Oct 10, 2021).
461. K. Lanevskij, J. Dapkunas, L. Juska, P. Japertas, R. Didziapetris. QSAR Analysis of Blood–Brain Distribution: The Influence of Plasma and Brain Tissue Binding. *JPharmSci* **2011**, 100 (6), 2147–2160.
462. X. Liu, B.J. Smith, C. Chen, et al. Use of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Study the Time to Reach Brain Equilibrium: An Experimental Analysis of the Role of Blood-Brain Barrier Permeability, Plasma Protein Binding, and Brain Tissue Binding. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 313 (3), 1254–1262.
463. K. Lanevskij, P. Japertas, R. Didziapetris, A. Petrauskas. Ionization-Specific Prediction of Blood–Brain Permeability. *JPharmSci* **2009**, 98 (1), 122–134.
464. A. Daina, O. Michielin, V. Zoete. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 42717.
465. J.Ph. Colletier, B. Sanson, F. Nachon, et al. Conformational Flexibility in the Peripheral Site of Torpedo californica Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (14), 4526–4527.
466. F. Nachon, E. Carletti, C. Ronco, et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer’s drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal* **2013**, 453 (3), 393–399.
467. T.A. Halgren. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, 17 (5–6), 490–519.
468. P. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, et al. Gemini Pyridinium Surfactants: Synthesis and Conductometric Study of a Novel Class of Amphiphiles¹. *J. Org. Chem.* **2003**, 68 (20), 7651–7660.
469. L. Gorecki, V. Hepnarova, J.Z. Karasova, et al. Development of versatile and potent monoquaternary reactivators of acetylcholinesterase. *Arch Toxicol* **2021**, 95 (3), 985–1001.
470. S. Ondrej, K. Jan, M. David, et al. In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley? *Medicinal Chemistry* **2018**, 14 (3), 281–292.
471. G. Mercey, T. Verdelet, G. Saint-André, et al. First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (18), 5295.
472. C. Chiappe, C.S. Pomelli, S. Rajamani. Influence of Structural Variations in Cationic and Anionic Moieties on the Polarity of Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115 (31), 9653–9661.
473. J.-Y. Kazock, M. Taggougui, B. Carré, P. Willmann, D. Lemordant. Simple and Efficient Synthesis of N-Quaternary Salts of Quinuclidinium Derivatives. *Synthesis* **2007**, 2007 (24), 3776–3778.

474. G. Ding, W. Zhang, Z. Zhang, et al. A mechanistic study of geminal dicationic ionic liquids as mobile phase additives for improving the separation performance of high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* **2017**, 409 (19), 4581–4592.
475. O. Fekonja, M. Zorec-Karlovšek, M.E. Kharbili, D. Fournier, J. Stojan. Inhibition and protection of cholinesterases by methanol and ethanol. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2007**, 22 (4), 407–415.
476. H. Hu, Z. Rao, J. Xu, et al. 16-Morpholino quaternary ammonium steroidal derivatives as neuromuscular blocking agents: Synthesis, biological evaluation and in silico probe of ligand–receptor interaction. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 56, 332–347.
477. H. Hu, Z. Rao, M. Feng, et al. 3,16-Bisquaternary ammonium steroid derivatives as neuromuscular blocking agents: Synthesis and biological evaluation. *Steroids* **2015**, 96, 103–114.
478. R.L. Papke, K. Chojnacka, N.A. Horenstein. The Minimal Pharmacophore for Silent Agonism of the α_7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **2014**, 350 (3), 665–680.
479. M. Quadri, A. Silnović, C. Matera, et al. Novel 5-(quinuclidin-3-ylmethyl)-1,2,4-oxadiazoles to investigate the activation of the α_7 nicotinic acetylcholine receptor subtype: Synthesis and electrophysiological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 160, 207–228.
480. M. Quadri, C. Matera, A. Silnović, et al. Identification of α_7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Silent Agonists Based on the Spirocyclic Quinuclidine- Δ^2 -Isoxazoline Scaffold: Synthesis and Electrophysiological Evaluation. *ChemMedChem* **2017**, 12 (16), 1335–1348.
481. D.K. Williams, J. Wang, R.L. Papke. Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations. *Biochemical Pharmacology* **2011**, 82 (8), 915–930.
482. K. Jozwiak, S. Ravichandran, J.R. Collins, I.W. Wainer. Interaction of Noncompetitive Inhibitors with an Immobilized $\alpha_3\beta_4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Investigated by Affinity Chromatography, Quantitative–Structure Activity Relationship Analysis, and Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (16), 4008–4021.
483. A.K. Szabo, K. Pesti, A. Mike, E.S. Vizi. Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on α_7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **2014**, 81, 42–54.
484. A. Pandya, Jerrel.L. Yakel. Allosteric modulators of the $\alpha_4\beta_2$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **2011**, 82 (8), 952–958.
485. A. Maelicke, E.X. Albuquerque. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer’s disease. *European Journal of Pharmacology* **2000**, 393 (1–3), 165–170.
486. C.K. Jones, N. Byun, M. Bubser. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* **2012**, 37 (1), 16–42.
487. J. Newcombe, A. Chatzidaki, T.D. Sheppard, M. Topf, N.S. Millar. Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulators Revealed by Mutagenesis and a Revised Structural Model. *Mol Pharmacol* **2018**, 93 (2), 128–140.
488. R.L. Papke, J.M. Lindstrom. Nicotinic acetylcholine receptors: Conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology* **2020**, 168, 108021.
489. R.L. Papke, C. Stokes, M.I. Damaj, et al. Persistent activation of α_7 nicotinic ACh receptors associated with stable induction of different desensitized states. *British Journal of Pharmacology* **2018**, 175 (11), 1838–1854.
490. R.L. Papke, N.A. Horenstein, A.R. Kulkarni, et al. The Activity of GAT107, an Allosteric Activator and Positive Modulator of α_7 Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChR), Is Regulated by Aromatic Amino Acids That Span the Subunit Interface*. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, 289 (7), 4515–4531.

491. G.A. Thakur, A.R. Kulkarni, J.R. Deschamps, R.L. Papke. Expedient Synthesis, Enantiomeric Resolution, and Enantiomer Functional Characterization of (4-(4-Bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]quinoline-8-sulfonamide (4BP-TQS): An Allosteric Agonist-Positive Allosteric Modulator of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (21), 8943–8947.
492. R.L. Papke, W.R. Kem, F. Soti, G.Y. López-Hernández, N.A. Horenstein. Activation and Desensitization of Nicotinic $\alpha 7$ -type Acetylcholine Receptors by Benzylidene Anabaseines and Nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, 329 (2), 791–807.
493. R.L. Papke, C. Stokes, M.I. Damaj, et al. Persistent activation of $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors associated with stable induction of different desensitized states: Synergistic effects of GAT107 and NS6740 on $\alpha 7$ nAChR. *British Journal of Pharmacology* **2018**, 175 (11), 1838–1854.
494. H.J. Ng, E.R. Whittemore, M.B. Tran, et al. Nootropic $\alpha 7$ nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *PNAS* **2007**, 104 (19), 8059–8064.
495. C.M. Noviello, A. Gharpure, N. Mukhtasimova, et al. Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cell* **2021**, 184 (8), 2121–2134.
496. G.A. Neves, A.A. Grace. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-modulating agents reverse the hyperdopaminergic tone in the MAM model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* **2018**, 43 (8), 1712–1720.
497. P.M. Callahan, E.J. Hutchings, N.J. Kille, J.M. Chapman, A.V. Terry. Positive allosteric modulator of alpha 7 nicotinic-acetylcholine receptors, PNU-120596 augments the effects of donepezil on learning and memory in aged rodents and non-human primates. *Neuropharmacology* **2013**, 67, 201–212.
498. K. Freitas, S. Ghosh, F. Ivy Carroll, A.H. Lichtman, M. Imad Damaj. Effects of alpha 7 positive allosteric modulators in murine inflammatory and chronic neuropathic pain models. *Neuropharmacology* **2013**, 65, 156–164.
499. D.B. Timmermann, J.H. Grønlien, K.L. Kohlhaas, et al. An Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Possessing Cognition-Enhancing Properties in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, 323 (1), 294–307.
500. Z.K. Bali, L.V. Nagy, D. Budai, I. Hernádi. Facilitation and inhibition of firing activity and N-methyl-D-aspartate-evoked responses of CA1 hippocampal pyramidal cells by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor selective compounds in vivo. *Sci Rep* **2019**, 9 (1), 9324.
501. I.T. Forbes, P. Ham, D.H. Booth, et al. 5-Methyl-1-(3-pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrrolo[2,3-*f*]indole: A Novel 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} Receptor Antagonist with Improved Affinity, Selectivity, and Oral Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, 38 (14), 2524–2530.
502. S.M. Bromidge, S. Dabbs, D.T. Davies, et al. Novel and Selective 5-HT_{2C/2B} Receptor Antagonists as Potential Anxiolytic Agents: Synthesis, Quantitative Structure–Activity Relationships, and Molecular Modeling of Substituted 1-(3-Pyridylcarbamoyl)indolines. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (10), 1598–1612.
503. J. Dunlop, T. Lock, B. Jow, et al. Old and New Pharmacology: Positive Allosteric Modulation of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor by the 5-Hydroxytryptamine_{2B/C} Receptor Antagonist SB-206553 (3,5-Dihydro-5-methyl-*N*-3-pyridinylbenzo[1,2-*b*:4,5-*b'*]dipyrrole-1(2*H*)-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, 328 (3), 766–776.
504. G.A. Kennett, M.D. Wood, F. Bright, et al. In vitro and in vivo profile of SB 206553, a potent 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} receptor antagonist with anxiolytic-like properties. *British Journal of Pharmacology* **1996**, 117 (3), 427–434.
505. A. McCreary. Effects of the 5-HT_{2C/2B} Antagonist SB 206553 on Hyperactivity Induced by Cocaine. *Neuropsychopharmacology* **1999**, 20 (6), 556–564.
506. F. Mizobe, B.G. Livett. Biphasic Effect of Eserine and Other Acetylcholinesterase Inhibitors on the Nicotinic Response to Acetylcholine in Cultured Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry* **1982**, 39 (2), 379–385.

507. N. Mo, N.J. Dun, A.G. Karczmar. Facilitation and inhibition of nicotinic transmission by eserine in the sympathetic ganglia of the rabbit. *Neuropharmacology* **1985**, 24 (11), 1093–1101.
508. J. Kuhlmann, K.O. Okonjo, A. Maelicke. Desensitization is a property of the cholinergic binding region of the nicotinic acetylcholine receptor, not of the receptor-integral ion channel. *FEBS Letters* **1991**, 279 (2), 216–218.
509. K.O. Okonjo, J. Kuhlmann, A. Maelicke. A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel. *Eur J Biochem* **1991**, 200 (3), 671–677.
510. A. Maelicke, T. Coban, A. Storch, et al. Introductory Lecture: Allosteric Modulation of Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor Ion Channel Activity by Noncompetitive Agonists. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **1997**, 17 (1–3), 11–28.
511. E.F. Pereira, M. Alkondon, S. Reinhardt, et al. Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the alpha 4 beta 2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 270 (2), 768–778.
512. A. Storch, A. Schratzenholz, J.C. Cooper, et al. Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* **1995**, 290 (3), 207–219.
513. C. Cantí, E. Bodas, J. Marsal, C. Solsona. Tacrine and physostigmine block nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *European Journal of Pharmacology* **1998**, 363 (2–3), 197–202.
514. L. Svobodová, J. Krušek, T. Hendrych, F. Vyskocil. Allosteric Modulation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Physostigmine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2005**, 1048 (1), 355–358.
515. L. Svobodová, J. Krůšek, T. Hendrych, F. Vyskočil. Physostigmine modulation of acetylcholine currents in COS cells transfected with mouse muscle nicotinic receptor. *Neuroscience Letters* **2006**, 401 (1–2), 20–24.
516. J. Bufler, C. Franke, H. Parnas, J. Dudel. Open Channel Block by Physostigmine and Procaine in Embryonic-like Nicotinic Receptors of Mouse Muscle. *European Journal of Neuroscience* **1996**, 8 (4), 677–687.
517. J. Militante, B.-W. Ma, G. Akk, J.H. Steinbach. Activation and Block of the Adult Muscle-Type Nicotinic Receptor by Physostigmine: Single-Channel Studies. *Mol Pharmacol* **2008**, 74 (3), 764–776.
518. C.J.G.M. Smulders, R. Zwart, I. Bermudez, et al. Cholinergic drugs potentiate human nicotinic $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptors by a competitive mechanism. *European Journal of Pharmacology* **2005**, 509 (2–3), 97–108.
519. R. Zwart, R.G.D.M. van Kleef, C. Gotti, C.J.G.M. Smulders, H.P.M. Vijverberg. Competitive Potentiation of Acetylcholine Effects on Neuronal Nicotinic Receptors by Acetylcholinesterase-Inhibiting Drugs. *Journal of Neurochemistry* **2000**, 75 (6), 2492–2500.
520. K. Sabey, K. Paradiso, J. Zhang, J.H. Steinbach. Ligand Binding and Activation of Rat Nicotinic $\alpha 4\beta 2$ Receptors Stably Expressed in HEK293 Cells. *Mol Pharmacol* **1999**, 55 (1), 58–66.
521. X. Jin, I. Bermudez, J.H. Steinbach. The Nicotinic $\alpha 5$ Subunit Can Replace Either an Acetylcholine-Binding or Nonbinding Subunit in the $\alpha 4\beta 2^*$ Neuronal Nicotinic Receptor. *Mol Pharmacol* **2014**, 85 (1), 11–17.
522. M. Mozayan, M.-F. Chen, M. Si, et al. Cholinesterase Inhibitor Blockade and its Prevention by Statins of Sympathetic $\alpha 7$ -nAChR-Mediated Cerebral Nitroergic Neurogenic Vasodilation. *J Cereb Blood Flow Metab* **2006**, 26 (12), 1562–1576.
523. X. Jin, A.L. Germann, D.J. Shin, G. Akk, J.H. Steinbach. Determination of the Residues in the Extracellular Domain of the Nicotinic α Subunit Required for the Actions of Physostigmine on Neuronal Nicotinic Receptors. *Mol Pharmacol* **2017**, 92 (3), 318–326.

524. X. Jin, M.M. McCollum, A.L. Germann, G. Akk, J.H. Steinbach. The E Loop of the Transmitter Binding Site Is a Key Determinant of the Modulatory Effects of Physostigmine on Neuronal Nicotinic $\alpha 4\beta 2$ Receptors. *Mol Pharmacol* **2017**, 91 (2), 100–109.
525. A.K. Hamouda, T. Kimm, J.B. Cohen. Physostigmine and Galanthamine Bind in the Presence of Agonist at the Canonical and Noncanonical Subunit Interfaces of a Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Journal of Neuroscience* **2013**, 33 (2), 485–494.
526. B. Iorga, D. Herlem, E. Barré, C. Guillou. Acetylcholine nicotinic receptors: finding the putative binding site of allosteric modulators using the “blind docking” approach. *J Mol Model* **2006**, 12 (3), 366–372.
527. V. Costa, A. Nistri, A. Cavalli, P. Carloni. A structural model of agonist binding to the $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptor. *Br J Pharmacol* **2003**, 140 (5), 921–931.
528. D. Barak, A. Ordentlich, D. Stein, et al. Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochemical Journal* **2008**, 417 (1), 213–222.
529. T. Bilousova, B.J. Simmons, R.R. Knapp, et al. Dual Neutral Sphingomyelinase-2/Acetylcholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15 (6), 1671–1684.
530. C. Klivinyi, G. Rumpold-Seitlinger, C. Dorn, et al. Perioperative use of physostigmine to reduce opioid consumption and peri-incisional hyperalgesia: a randomised controlled trial. *British Journal of Anaesthesia* **2021**, 126 (3), 700–705.
531. F. Majolo, A. Martins, S. Rehfeldt, et al. Chapter 1 - Approaches for the treatment of neurodegenerative diseases related to natural products. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Bioactive Natural Products; Elsevier, **2021**; Vol. 69, pp 1–63.
532. R.L. Papke, C. Stokes, P. Muldoon, M. Imad Damaj. Similar activity of mecamlamine stereoisomers in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology* **2013**, 720 (1), 264–275.
533. I. Bacher, B. Wu, D.R. Shytle, T.P. George. Mecamlamine – a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2009**, 10 (16), 2709–2721.
534. N.D. Edge, S.J. Corne, G.E. Lee, W.R. Wragg. The Ganglion-Blocking Activity of Aminobicyclo-[2,2, 1]heptanes (congeners of Mecamlamine) and Bicyclo[3,2, 1]azaoctanes (bridged Congeners of Pempidine). *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1960**, 15 (2), 207–214.
535. C.A. Stone, M.L. Torchiana, K.L. Meckelnberg, et al. Chemistry and Structure-Activity Relationships of Mecamlamine and Derivatives. *J. Med. Chem.* **1962**, 5 (4), 665–690.
536. E. Lunt, W.R. Wragg. Hypotensive amines: unbridged cyclohexane analogues of mecamlamine. *J. Chem. Soc., C* **1970**, No. 13, 1845–1847.
537. M.E. Herr, H.C. Murray, G.S. Fonken. Microbiological and chemical modification of N-benzoyl-N,2,3,3-tetramethyl-exo-2-norbornanamine (N-benzoylmecamlamine). *J. Med. Chem.* **1971**, 14 (9), 842–845.
538. J.A. Suchocki, E.L. May, T.J. Martin, C. George, B.R. Martin. Synthesis of 2-exo- and 2-endo-mecamlamine analogs. Structure-activity relationships for nicotinic antagonism in the central nervous system. *J. Med. Chem.* **1991**, 34 (3), 1003–1010.
539. D. Mangan, N. McNabola, E.H. Clark, et al. A new synthesis and preliminary evaluation of some analogues of mecamlamine – a compound with anti-addiction properties. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (46), 10787–10798.
540. J.K. Gill-Thind, P. Dhankher, J.M. D’Oyley, T.D. Sheppard, N.S. Millar. Structurally Similar Allosteric Modulators of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Exhibit Five Distinct Pharmacological Effects. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290 (6), 3552–3562.

541. A.V. Gadakh, D. Chikanna, S.S. Rindhe, B.K. Karale. Heteroaryl Hydroxycarbonylation: An Efficient, Robust, Practically Scalable Approach Using Formyl Acetate as the CO Source. *Synthetic Communications* **2012**, 42 (5), 658–666.
542. C.-L. Li, X. Qi, X.-F. Wu. Palladium-Catalyzed Hydroxycarbonylation of Aryl Halides with the *in-situ* Generation of CO and H₂O. *ChemistrySelect* **2016**, 1 (8), 1702–1704.
543. C. Shao, A. Lu, X. Wang, et al. Oxalic acid as the in situ carbon monoxide generator in palladium-catalyzed hydroxycarbonylation of arylhalides. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (23), 5033–5040.
544. A.R. Kulkarni, S. Garai, G.A. Thakur. Scalable, One-Pot, Microwave-Accelerated Tandem Synthesis of Unsymmetrical Urea Derivatives. *J. Org. Chem.* **2017**, 82 (2), 992–999.
545. P. Klán, T. Šolomek, C.G. Bochet, et al. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (1), 119–191.
546. I.R. Dunkin, J. Gębicki, M. Kiszka, D. Sanín-Leira. The matrix-isolation IR spectrum of the o-quinonoid intermediate in the photolysis of 2-nitrobenzyl methyl ether. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1997**, 53 (14), 2553–2557.
547. I.R. Dunkin, J. Gębicki, M. Kiszka, D. Sanín-Leira. Phototautomerism of o-nitrobenzyl compounds: o-quinonoid aci-nitro species studied by matrix isolation and DFT calculations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, No. 8, 1414–1425.
548. J.W. Walker, G.P. Reid, J.A. McCray, D.R. Trentham. Photolabile 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphate esters of adenine nucleotide analogs. Synthesis and mechanism of photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110 (21), 7170–7177.
549. Y.V. Il'ichev, M.A. Schwörer, J. Wirz. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (14), 4581–4595.
550. E.W. Miller, N. Taulet, C.S. Onak, et al. Light-Activated Regulation of Cofilin Dynamics Using a Photocaged Hydrogen Peroxide Generator. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (48), 17071–17073.
551. T. Schneider, V. Kubyskin, N. Budisa. Synthesis of a Photo-Caged DOPA Derivative by Selective Alkylation of 3,4-Dihydroxybenzaldehyde: Synthesis of a Photo-Caged DOPA Derivative by Selective Alkylation of 3,4-Dihydroxybenzaldehyde. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2018 (18), 2053–2063.
552. J. Kim, J. Lee, B. Moon, et al. Pyridyl-urea Derivatives as Blockers of Aβ-induced mPTP Opening for Alzheimer's Disease. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2012**, 33 (11), 3887–3888.
553. A.R. Jeon, M.E. Kim, J.K. Park, W.K. Shin, D.K. An. Mild and direct conversion of esters to morpholine amides using diisobutyl(morpholino)aluminum: application to efficient one-pot synthesis of ketones and aldehydes from esters. *Tetrahedron* **2014**, 70 (29), 4420–4424.
554. M. Badioli, R. Ballini, M. Bartolacci, et al. Addition of Organocerium Reagents to Morpholine Amides: Synthesis of Important Pheromone Components of *Achaea janata*. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (25), 8938–8942.
555. S. Nahm, S.M. Weinreb. N-methoxy-n-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters* **1981**, 22 (39), 3815–3818.
556. S. Balasubramaniam, I. Aidhen. The Growing Synthetic Utility of the Weinreb Amide. *Synthesis* **2008**, 2008 (23), 3707–3738.
557. G. Guanti, R. Riva. Homochiral isoquinolines by lipase-catalysed resolution and their diastereoselective functionalisation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12 (8), 1185–1200.
558. N. Catozzi, M.G. Edwards, S.A. Raw, P. Wasnaire, R.J.K. Taylor. Synthesis of the Louisianin Alkaloid Family via a 1,2,4-Triazine Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Approach. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (21), 8343–8354.
559. D.B. Horne, K. Biswas, J. Brown, et al. Discovery of TRPM8 Antagonist (S)-6-(((3-Fluoro-4-(trifluoromethoxy)phenyl)(3-fluoropyridin-2-yl)methyl)carbonyl)nicotinic Acid (AMG 333), a Clinical Candidate for the Treatment of Migraine. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (18), 8186–8201.
560. V. Stockmann, A. Fiksdahl. Synthesis of novel 1,7-naphthyridines by Friedländer condensation of pyridine substrates. *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, 48 (6), 1383–1387.

561. I.W. Davies, J.-F. Marcoux, E.G. Corley, et al. A Practical Synthesis of a COX-2-Specific Inhibitor. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (25), 8415–8420.
562. R.H. Dodd, C. Ouannes, M. Robert-Gero, P. Potier. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy- β -carbolines. *J. Med. Chem.* **1989**, 32 (6), 1272–1276.
563. I.T. Forbes, S. Dabbs, D.M. Duckworth, et al. Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Studies of Selective 5-HT_{2C/2B} Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, 39 (25), 4966–4977.
564. S.M. Bromidge, S. Dabbs, D.T. Davies, et al. Model Studies on a Synthetically Facile Series of N-Substituted Phenyl-NH-pyridin-3-yl Ureas Leading to 1-(3-Pyridylcarbonyl) indolines that are Potent and Selective 5-HT_{2C/2B} Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2767–2773.
565. T. Verdelet, G. Mercey, N. Correa, L. Jean, P.-Y. Renard. Straightforward and efficient synthesis of 3-benzyloxy-4-bromopicolinate ester and 3-benzyloxy-5-bromopicolinate ester, common building blocks for pharmaceuticals and agrochemicals. *Tetrahedron* **2011**, 67 (45), 8757–8762.
566. H. Wang, D. Zhang, F. Wang, Y. Wu, H. Song. Synthesis and anticholinesterase activity of (–)-physostigmine analogues with modifications at C3a and C5. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2013**, 29 (5), 888–893.
567. M. Kawahara, A. Nishida, M. Nakagawa. An Efficient Synthesis of Optically Active Physostigmine from Tryptophan via Alkylative Cyclization. *Org. Lett.* **2000**, 2 (5), 675–678.
568. H. Wang, D. Liu, H. Chen, J. Li, D.Z. Wang. CuCl₂/TBHP-mediated direct chlorooxidation of indoles. *Tetrahedron* **2015**, 71 (38), 7073–7076.
569. S. Katayama, T. Watanabe, M. Yamauchi. Convenient Synthesis of 3H-Indoles(Indolenines) by Reaction of 1H-Indoles with Corey-Kim Reagent. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40 (10), 2836–2838.
570. P. Bravo, L. Bruché, W. Panzeri, F. Viani, L. Vichi. Synthesis of selectively fluorinated molecules from dimethylsulfoxide, fluoroacetic acid esters and diazomethane. *Journal of Fluorine Chemistry* **1998**, 91 (1), 27–36.
571. F. Knefeli, K.K. Mayer, W. Wiegrebe, U.P. Schlunegger, R. Lauber. Electron Impact Induced Loss of C-5/C-8 Substituents of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines, VI1): Synthesis and Mass Spectrometric Fragmentation of Dihydroindole Derivatives. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1990**, 323 (3), 145–155.
572. N. Xia, M. Taillefer. A Very Simple Copper-Catalyzed Synthesis of Anilines by Employing Aqueous Ammonia. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (2), 337–339.
573. D. Didier, S. Sergeev. Synthesis of symmetrical amino and aminomethyl derivatives of Tröger's base via Pd-catalyzed C–C and C–N bond formation. *Tetrahedron* **2007**, 63 (18), 3864–3869.
574. T. Maejima, Y. Shimoda, K. Nozaki, et al. One-pot aromatic amination based on carbon–nitrogen coupling reaction between aryl halides and azido compounds. *Tetrahedron* **2012**, 68 (6), 1712–1722.
575. J.P. Wolfe, J. Åhman, J.P. Sadighi, R.A. Singer, S.L. Buchwald. An Ammonia Equivalent for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Triflates. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38 (36), 6367–6370.
576. A. Potasiewicz, A. Nikiforuk, M. Hołuj, P. Popik. Stimulation of nicotinic acetylcholine $\alpha 7$ receptors rescue schizophrenia-like cognitive impairments in rats. *J Psychopharmacol* **2017**, 31 (2), 260–271.
577. A.K. Ghosh, M. Brindisi. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (6), 2751–2788.
578. M. Kawahara, A. Nishida, M. Nakagawa. An Efficient Synthesis of Optically Active Physostigmine from Tryptophan via Alkylative Cyclization. *Org. Lett.* **2000**, 2 (5), 675–678.
579. D.G. Wishka, D.P. Walker, K.M. Yates, et al. Discovery of N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an Agonist of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor, for

- the Potential Treatment of Cognitive Deficits in Schizophrenia: Synthesis and Structure–Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (14), 4425–4436.
580. Z.K. Bali, J. Inkeller, R. Csurgyók, et al. Differential effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behavioural Brain Research* **2015**, 278, 404–410.
581. J.W. Coe, P.R. Brooks, M.G. Vetelino, et al. Varenicline: An $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptor Partial Agonist for Smoking Cessation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48 (10), 3474–3477.
582. L.W. Corrie, C. Stokes, J.L. Wilkerson, et al. Nicotinic Acetylcholine Receptor Accessory Subunits Determine the Activity Profile of Epibatidine Derivatives. *Mol Pharmacol* **2020**, 98 (4), 328–342.

Résumé

Les neurotoxiques organophosphorés (OP) sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme clé permettant la terminaison de l'influx nerveux par hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh). Une intoxication par ces OPs provoque l'accumulation de l'ACh et l'hyperstimulation des récepteurs muscariniques (mAChR) et nicotiques (nAChR), provoquant de nombreux symptômes pouvant aller jusqu'à la mort par arrêt respiratoire. Malgré la ratification par quasiment tous les pays du globe de la convention d'interdiction des armes chimiques, les attaques perpétrées avec ces composés durant la dernière décennie ravivent la crainte de nouvelles menaces chimiques futures. En outre, les produits phytosanitaires à base d'OP sont responsables de centaines de milliers d'intoxications chaque année dans le monde rural. Le traitement actuel repose sur le diazepam (anticonvulsant), l'atropine, un antagoniste des mAChRs limitant leur stimulation, et un réactivateur de l'AChE, permettant de rendre l'enzyme de nouveau fonctionnelle. Les réactivateurs utilisés actuellement, mono- et bis-pyridiniums aldoxime, possèdent deux défauts majeurs : l'incapacité à traverser efficacement la barrière hémato-encéphalique (BHE) et une efficacité très inégale sur les différents OPs. De nouvelles molécules réactivatrices universelles et aptes à traverser la BHE sont donc au cœur des recherches sur le sujet. Mais le traitement des récepteurs nicotiques, encore non traités, commence aussi à être un sujet d'intérêt, avec comme objectif une synergie bénéfique des effets thérapeutiques produits avec les autres molécules du cocktail médicamenteux.

Au cours de cette thèse, trois réactivateurs non chargés prometteurs basés sur la fonction réactivatrice 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime ont été synthétisés pour poursuivre leur évaluation *in vivo*. Un de ces réactivateurs a démontré un passage efficace de la BHE et des indices de protection proches de ceux de l'obidoxime. Il présentait aussi un caractère antagoniste compétitif envers les nAChR. Dans cette continuité, trois antidotes multi-cibles (MTDA), à la fois réactivateurs de l'AChE et antagonistes des nAChRs, ont été synthétisés, avec un ammonium quaternaire comme ligand des deux cibles. Un de ces composés inédits a démontré une réactivation *in vitro* quasi-universelle de l'AChE et de la butyrylcholinestérase inhibées par le VX, le sarin, le tabun et le paraoxon, avec des efficacités largement supérieures aux oximes de référence, ainsi qu'un antagonisme accentué vis-à-vis des nAChR musculaires et $\alpha 7$. L'étude de la littérature a également identifié les modulateurs allostériques positifs (PAM) et négatifs (NAM) comme des molécules prometteuses pour réguler l'activité des nAChRs en cas d'intoxication. Trois autres MTDA ont donc été conçus en liant la fonction réactivatrice à des structures sélectionnées de PAM et de NAM. Deux de ces composés ont été synthétisés avec succès et un intermédiaire avancé a été obtenu pour le troisième.

Mots clés : oxime, réactivateur, cholinestérase, récepteur nicotinique, neurotoxique organophosphoré, antidote multi-cibles, modulateur allostérique.

Abstract

Organophosphorus nerve agents (OP) are irreversible inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), a key enzyme enabling the ending of the nervous impulse thanks to the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). OP poisoning leads to the accumulation of ACh and the overstimulation of the muscarinic (mAChR) and nicotinic (nAChR) receptors, causing numerous symptoms that can lead to death by respiratory failure. Despite the ratification by almost all countries worldwide of the convention banning chemical weapons, the attacks using these compounds committed during the last decade is reviving the fear of future chemical threats. Moreover, the plant protection products containing OP compounds are responsible for hundreds of thousands of poisonings each year in rural areas. Nowadays, medical countermeasure against OP poisoning are based on diazepam (anticonvulsant), atropine, which is a mAChR antagonist reducing its stimulation, and a reactivator of AChE, for restoring its proper functioning. The actual reactivators, mono- and bis-pyridinium aldoxime, have two major limitations : they do not readily cross the blood brain barrier (BBB) and have not a broad spectrum efficacy against OPs. New broad spectrum molecules able to cross the BBB are thus the focus of this research area. But the development of nicotinic receptors treatment is gaining interest to reduce its stimulation by ACh and to provide a beneficial therapeutic synergistic effect with the other molecules of the drug cocktail.

In this PhD, three promising uncharged reactivators based on the reactivating function 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime have been synthesized for further *in vivo* evaluation. One of these reactivators showed an effective crossing of the BBB and a protection against OP poisoning close to those of obidoxime. It had also a competitive nAChR antagonist effect. Following up on this, three multi-target directed antidotes (MTDA), reactivators of the AChE and competitive antagonists of nAChRs at the same time, have been synthesized, including a quaternary ammonium as ligand of both targets. One of these original compounds has showed *in vitro* an almost broad spectrum reactivation of both AChE and butyrylcholinesterase inhibited by VX, sarin, tabun and paraoxon, with far superior efficiencies to those of the reference oximes, along with an increased antagonism against muscular and $\alpha 7$ nAChRs. The literature review has also identified positive (PAM) and negative (NAM) allosteric modulators as promising molecules to regulate the nAChR activity during an intoxication. Thus, three other MTDA have been designed in binding the reactivating function to selected PAM and NAM structures. Two have been synthesized and an advanced intermediate has been obtained for the third.

Key words : oxime, reactivator, cholinesterase, nicotinic receptor, organophosphorus nerve agent, multi-target directed antidote, allosteric modulator.