



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique de prodrogues pléiotropes d'intérêt dans la maladie d'Alzheimer

Francois-Xavier Toublet

► **To cite this version:**

Francois-Xavier Toublet. Conception, synthèse et évaluation biologique de prodrogues pléiotropes d'intérêt dans la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC429 . tel-04828297

HAL Id: tel-04828297

<https://theses.hal.science/tel-04828297v1>

Submitted on 10 Dec 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Conception, synthèse et évaluation biologique de prodrogues pléiotropes d'intérêt dans la maladie d'Alzheimer.

**Présentée et soutenue par
Francois Xavier TOUBLET**

**Thèse soutenue publiquement le 09/12/2019
devant le jury composé de**

M. CHRISTIAN CAVE	Professeur des universités, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
M. PATRICIA MELNYK	Professeur des universités, Université de Lille	Rapporteur du jury
M. PATRICK DALLEMAGNE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. VINCENT LEVACHER	Directeur de recherche au CNRS, Université Rouen Normandie	Membre du jury
Mme MARIE-CLAUDE VIAUD-MASSUARD	Professeur des universités, Université de Tours François Rabelais	Président du jury

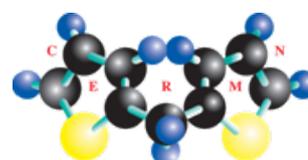
Thèse dirigée par CHRISTOPHE ROCHAIS, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



A Monsieur Christian Cavé

Professeur des universités, Université Paris-Saclay

A Madame Patricia Melnyk

Professeur des universités, Université Lille 2

A Madame Marie-Claude Viaud-Massuard

Professeur des universités, Université Tours François Rabelais

A Monsieur Vincent Levacher

Directeur de recherche au CNRS, Université de Rouen Normandie

A Monsieur Patrick Dallemagne

Professeur des universités, Université de Caen Normandie et Directeur du Centre d'Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie

A Monsieur Christophe Rochais

Professeur des universités, Université de Caen Normandie

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,

Et de juger mon travail,

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

“L’espoir c’est ce qui meurt en dernier.”

Proverbe Irlandais

“Some men see things as they are and say, why; I dream things that never were and say, why not.”

Robert Kennedy paraphrasant George Bernard Shaw

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu, le Professeur Christophe Rochais qui m'a encadré pendant mes 4 ans au laboratoire, pour m'avoir guidé dans mon projet et mes travaux de recherche, pour sa disponibilité, ou encore ses conseils toujours précieux et pertinents. Je sais que vous me jugez pour mes goûts musicaux vu la musique qui passait dans le laboratoire ("La Reine des Neiges"), mais je tiens à rectifier la vérité, le rock, le rock rien que le rock.

Je remercie le Professeur Patrick Dallemagne, directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli au sein du CERMN, de m'avoir initié aux cigares et au calvados. Je vous connais (ainsi que Christophe) depuis ma seconde année de pharmacie et c'est grâce à vous, Christophe, Fred et Thomas que la chimie s'est ouverte à moi, pour ça je vous remercie tous.

Je remercie le Docteur Cédric Lecoutey, dit "Cécé", pour sa bonne humeur habituelle et quotidienne. Tu as toujours été présent quand j'avais besoin de toi, à tout point de vue et c'est une qualité très importante. Avoir passé quatre années dans le CM034 avec toi est un honneur et une chance que beaucoup de doctorants aimeraient avoir. Je m'excuse encore d'avoir diminué ton stock de ballons, ampoules ou autres objets fragiles. Je m'excuse aussi de ne pas faire honneur à la tradition et ne boire que des demis dans ton temple. Merci en tout cas de m'avoir emmené plusieurs fois à l'hôpital, il fallait bien que quelqu'un te fasse pratiquer tes connaissances de secouristes. Mon seul regret, ne pas avoir calculer le nombre de kilomètres que nous avons faits ensemble le midi.

Je remercie Bérénice, ma co-doctorante de première année pour son calme et sa patience (désolé Reynald je sais que tu vas être jaloux). Par où commencer, il y aurait trop de choses à dire. Toujours de bonne humeur (sauf le matin, le midi et le soir), j'ai passé un an et demi formidable et inoubliable qui pourrait se résumer par des fous rires, films d'horreur, Mc Do et raclette (mais pas que). Grâce à toi j'ai pu découvrir de nouvelles musiques insoupçonnables. Je ne pourrais citer tous ces bons moments et souvenirs que nous avons passés ensemble. Tu as su me faire sortir de ma carapace même si je garde de temps en temps un bout de coquille de Calimero. Comme tu disais : "Cécé est un pruneau, toi un ananas et moi une noix de coco."

Je remercie bien évidemment Reynald, ami, colocataire et collègue, pour les 2 ans que nous avons passés ensemble. Grâce à toi, je ne suis pas mort de faim et tu m'as fait découvrir de nouvelles saveurs saines (ou pas), telles que le gratin de chou-fleur. Bien que nous nous voyons du petit déjeuner au diner, nous ne nous sommes jamais vraiment engueulés, juste quelques petites réflexions vis-à-vis de la salle de sport et de la nourriture. Nos soirées à l'appart, tes précieux conseils (entre autre de relooking), ton second degré et tes geekeries vont me manquer (ainsi que la méduse).

Je remercie mon collègue et ami (même si cela n'est pas réciproque) Victor. Du premier jour au dernier tu as toujours été là pour me prodiguer des conseils de chimie ou autre. Comment ne pas citer nos nombreuses sorties au Delirium, 23, Trappiste, bonnes en toutes occasions. J'espère que notre prochaine soirée à l'O'donnels ne sera pas entrecoupé d'alarme à incendie.

Je remercie Benjamin et Caroline, mes copains du CM034. Ma chère Caro, toi qui a failli m'éborgner ou me taper, je te pardonne, c'était sans doute mérité. Ta sensibilité peut être un défaut mais je la vois comme une qualité. Comment oublier nos danses dans le laboratoire ou à l'appart, sur Vengaboys ou Disney, nos soirées Koh Lanta ou L'Amour est dans le Pré. Ben, comment dire, tu es parfait. Tu es arrivé tardivement au laboratoire et nous nous sommes très vite entendu. Je peux dire que tu es le seul (je mettrais Cécé juste après) ayant un niveau musical digne de ce nom, et je ne te remercierai jamais assez de m'avoir fait découvrir "Le Bougalou du Loup Garou", "Allez la France" ou encore "Quatre-vingt-quinze pour cent" qui fait tant râler Caro (il faut dire que ce n'est pas difficile). Si l'envi te reprend, et que Manu te donne l'autorisation, je suis toujours chaud pour ouvrir notre bar / jeu de société. Je n'aurai qu'une seule déception : tu vas passer ta thèse pharma avant moi.

Je remercie les membres du CM036. Julien, ou Juju, l'homme qui m'a tout appris. Tu as su m'enseigner la pratique et me remettre au niveau. Ce fut une joie de te retrouver après le Canada, et je te retrouve à Toulouse en fin d'année. Pauline, la grande bouffe du labo, toujours "un truc dans le bouche" comme dirait Cécé, à venir me prendre pitch, bonbon ou autre friandise dans mon bureau. Bien sûr il n'y a pas que ça, il y a aussi ton accent alsacien mais surtout ta gentillesse et ta bienveillance. Encore merci pour les lunettes, sans toi j'aurais été perdu. Et bien sûr JP, tes conseils avisés m'auront beaucoup servi même si je ne les ai pas toujours écoutés (dixit la thèse pharma), et tes punchlines inattendus marqueront ma mémoire. Merci à Mirka de m'aider à développer mon Anglais, même si je pense que tu devrais développer ton Français.

Je remercie tout particulièrement Silvia. Malheureusement j'aurais aimé partager plus longtemps ton bureau. Toujours le sourire, tu es le rayon de soleil du laboratoire. Même si je doute qu'elles me servent dans le sud, j'emmène avec moi les chaussettes tricotées. Merci aussi à Valérie de m'avoir couvert pour une histoire de garage à vélo et de m'avoir accepté en TP de pharmacognose. Merci à Audrey pour avoir effectué les analyses biologiques sur les magnifiques huiles collantes de 10mg ainsi que pour les Lineweaver. On aura bien ri lors de l'accrobranche. Merci à Sophie pour les tests de dernières minutes. Merci à Rémi pour tes rappels sur l'analyse RMN, tes sous-entendus souvent mal placés et te servir de moi comme d'un punchingball, tu m'auras fait beaucoup rire.

Je remercie aussi les ex et actuels membres du CM042 : Camille (pour nos soirées boites), Marie, Martina, Anne-Sophie et bien sûr Chacha qui m'a bien aidé en TP et à la mise en page de posters.

Je remercie bien évidemment tous les autres membres du laboratoire pour leur soutien et aide, tels que Amanda, Clément, Anne-Claire, Camille, Martina, Willy, Marie, Marc, Jana, Ronan, Line, Alexandra, Johanna, et tous ceux que j'ai oubliés.

Merci à mes amis (les fratés) pour leur soutien depuis mon arrivé à Caen : Jo, Aurélien, Ben Victor, Rahma, Vincent et Arnaud (j'espère que l'ordre ne vexera personne). Mais aussi mes amis de pharma Pierre et Philippe, ainsi que Anne-Sophie.

Enfin je remercie ma famille et plus particulièrement ma mère. Je pense que sans toi rien n'aurait été possible ou alors beaucoup plus compliqué. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est bien grâce à toi.

Je dédie cette thèse à mon père décédé il y a tout juste 10 ans, j'aurais aimé que tu sois là pour ma soutenance et j'espère que tu es fier de moi.

Table des Matières

Abréviations	7
Avant-propos	11
Chapitre 1. Maladie d'Alzheimer : Physiopathologie	15
1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer : les enjeux économiques et médicaux	17
2. Physiopathologie et causes de la maladie d'Alzheimer	18
2.1. Généralités	18
2.2. Hypothèses	20
2.2.1. Hypothèse de la cascade amyloïde	20
2.2.2. Hypothèse de l'hyperphosphorylation de la protéine tau	22
2.2.3. Hypothèse des ions métalliques	24
2.2.4. Hypothèse du stress oxydant	25
2.2.5. Hypothèse cholinergique	26
Chapitre 2. Cibles et stratégies thérapeutiques : de l'état de l'art à la conception du projet	27
1. Cholinestérases : description et implication dans la maladie d'Alzheimer	29
1.1. Description et fonctionnement du système cholinergique	29
1.2. Description et fonctionnement des cholinestérases	30
1.3. Hypothèse cholinergique	33
1.4. Inhibiteurs des cholinestérases	34
1.4.1. Inhibition réversible/pseudo-irréversible	35
1.4.2. Inhibition irréversible ou Inhibition suicide	40
1.4.3. Inhibition par excès de substrat	40
2. Stratégies médicamenteuses – approche classique	41
2.1. Traitements actuels	41
2.1.1. Inhibiteurs réversibles	41
2.1.2. Inhibiteur pseudo-irréversible de l'AChE : la rivastigmine	42
2.1.3. Antagonistes des récepteurs NMDA	47
2.2. Recherche de nouveaux traitements	48
3. Récepteurs sérotoninergiques : description et implication dans la maladie d'Alzheimer	50
3.1. La sérotonine	50
3.2. 5-HT ₄ R	52
3.3. 5-HT ₆ R	54

4. Nouvelles stratégies médicamenteuses	57
4.1. Multiple-Medication Therapy MMT	57
4.2. Multiple-Compound Medication MMC	57
4.3. Multi-Target Directed Ligands MTDL	57
4.4. Développement des MTDL au CERMN	60
4.5. Prodrogues / Promédicaments	62
4.5.1. Définition et généralités	62
4.5.2. Prodrogues dans la MA	64
5. Projet : prodrogues pléiotropes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer	67
5.1. Concept	67
5.2. Ladostigil	67
5.3. Autres exemples	68
Chapitre 3. Développement de prodrogues pléiotropes : cholinestérases et récepteurs sérotoninergiques	71
1. Objectifs et description du concept	73
2. Développement de prodrogues multi-cibles : inhibitrices de l'ACHé et agoniste des récepteurs 5-HT₆	75
2.1. Accès synthétique	75
2.1.1. Analyse rétrosynthétique	75
2.1.2. Noyau indole : généralité et fonctionnalisation en position 3	76
2.1.3. Voie A	76
2.1.4. Voie B	78
2.1.5. Voie C	79
2.2. Résultats <i>in vitro</i>	83
2.2.1. Evaluation biologique <i>in vitro</i> AChE/5-HT ₆	83
2.2.2. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay PAMPA	91
2.2.3. Evaluation de la décarbamoylation du composé MR35215 en présence d'enzyme	92
2.3. Résultats <i>in silico</i>	94
2.4. Résultats <i>in vivo</i>	96
2.4.1. Description des différents tests	96
2.4.2. Résultats <i>in vivo</i>	98
2.5. Imagerie TEP et TEMP	100
2.5.1. Principe	100
2.5.2. Projet	101
2.5.3. Accès synthétique	101

2.5.4. Evaluation in vitro	102
3. Développement de prodrogues multi-cibles : inhibiteurs de l'AChE et agonistes des récepteurs 5-HT₄	103
3.1. Accès synthétiques des dérivés carbamates et phénoliques	103
3.1.1. Analyse rétrosynthétique	103
3.1.2. Voie de synthèse des précurseurs RS-pipéridine-Boc	104
3.1.3. Synthèse des précurseurs carbamoylés et phénoliques	106
3.1.4. Synthèse des précurseurs phénoliques	107
3.1.5. Voie de synthèse des produits phénoliques et carbamoylés	108
3.2. Résultats <i>in vitro</i>	109
3.2.1. Evaluation biologique in vitro AChE/5-HT ₄	109
3.2.2. Profils pharmacologiques	112
3.2.3. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay PAMPA	114
3.2.4. Evaluation de la décarbamoylation du composé MR35213 en présence d'AChE	114
3.3. Résultats <i>in silico</i>	118
3.3.1. MR35213	118
3.3.2. MR35212	119
3.4. Résultats <i>in vivo</i>	120
3.4.1. Screening pharmacologique et analyse de la toxicité	121
3.4.2. Activité locomotrice spontanée	121
3.4.3. Conclusion	122
3.5. Projet TRIAD	123
3.5.1. Principe général	123
3.5.2. Accès synthétique	123
3.5.3. Evaluation biologique in vitro	124
4. Conclusion	125
Chapitre 4. Ligands autoimmolables : les nouvelles prodrogues pléiotropes	127
1. Ligands autoimmolables : concept, définition et exemples	129
1.1. Généralités	129
1.1.1. Réaction d'élimination	130
1.1.2. Réactions de cyclisation	130
1.1.3. Réactions d'élimination/cyclisation ou cyclisation/élimination	131
1.1.4. Réactivité des méthide quinones	132
1.2. Applications	134
1.3. Explication du projet	135
2. Preuve de concept	136

1.1. Décarbamylation en milieu basique	137
2.1.1. Méta	138
2.1.2. Para	139
2.1.3. Ortho	140
2.2. Evaluation <i>in vitro</i>	141
2.3. Conclusion	142
3. Synthèses des composés présentant un groupement naphtalène	143
4. Synthèses de ligands dont le groupement partant se situe en position para du carbamate	144
4.1. Analyse rétrosynthétique et travaux antérieurs	144
4.2. Voie de synthèse D	147
4.2.1. Voie de synthèse commune	147
4.2.2. Série Ether	153
4.2.3. Série Amine	155
4.3. Autre voie de synthèse des dérivés éthers en position para du carbamate	157
4.3.1. Nitrile	157
4.3.2. Amide	161
4.3.3. Carbamate	169
4.4. Perspectives de synthèse de composés possédant un second groupement carbamate.	170
5. Synthèses des composés dont le groupement partant se situe en position ortho du carbamate	170
5.1. Analyse rétrosynthétique	170
5.2. Synthèse des ligands en position ortho du carbamate	171
5.2.1. Voie de synthèse commune	171
5.2.2. Série Ether	172
5.2.3. Série Amine	173
5.3. Résultats <i>in vitro</i>	174
5.4. Décarbamylation <i>in vitro</i>	174
5.4.1. Evaluation de la décarbamylation du composé 104 en milieu basique	174
5.4.2. Evaluation de la décarbamylation du composé 104 en présence de BuChE	175
6. Résultats <i>in silico</i> de RIV-<i>p</i>-MEM et RIV-<i>o</i>-MEM	175
6.1. RIV- <i>p</i> -MEM	175
6.2. RIV- <i>o</i> -MEM	176
7. Conclusion	177
Conclusion – Perspectives	179
Partie Expérimentale	185

1. General experimental conditions	187
2. Chemistry	188
2.1. General procedures	188
2.2. Synthesis of compounds	192
3. <i>In silico</i> studies	308
4. <i>In vitro</i> biological studies	308
4.1. <i>In vitro</i> tests of AChE and BuChE biological activity	308
4.2. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT ₄ R	309
4.3. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT ₆ R.	310
4.4. Kinetic Study for ChE Inhibition	310
4.5. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay	310
4.6. Determination of cAMP production	311
4.7. AChE and BuChE dependent Decarbamylation	311
5. <i>In vivo</i> biological studies	312
5.1. Animals	312
5.2. CNS-activity and acute toxicity test	312
5.3. Locomotor activity	312
5.4. Spatial working memory	313
5.5. Pharmacological treatments	313
5.6. Statistical analysis	313
<i>Bibliographie</i>	315

Abréviations

5-HT	Sérotonine
5-HTR	Récepteurs Sérotoninergique
5-HT _x R	Récepteurs Sérotoninergique X
Aβ	Béta-amyloïde
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide Acétique
ADDP	1,1'-(Azodicarbonyl)dipipéridine
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobisisobutyronitrile
AICD	APP intracellulaire
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine Précurseur de l'Amyloïde
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
AR	Site Aromatique Hydrophobe
ATC	Acétylthiocholine
ATP	Adénosine Triphosphate
BACE1	<i>Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1</i>
BAIB	<i>[bis(acétoxy)-iodo]benzene</i>
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i>
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
BuChE	Butyrylcholinestérase
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium
CAS	Site catalytique anionique
CCDC	Centre de Données Cristallographiques de Cambridge
ChAT	Choline acétyltransférase
ChE	Cholinestérase
CHX	Cyclohexane
CNS	<i>Central Nervous System</i>
CTF α	<i>C-Terminal Fragment α</i>
CTZ	<i>Chimoreceptive Trigger Zone</i>
Cu(OAc) ₂	<i>Copper(II) acetate</i>
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle
DL ₅₀	Dose létale médiane
DCE	Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane

dFCS	<i>dialyzed Fetal Calf Serum</i>
DIAD	Azodicarboxylate de diisopropyle
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DG	Groupe Directeur
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	Diméthylformamide
DMG	<i>Directed Metalation Group</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DoM	Ortho-métallation dirigée
dppp	<i>1,3-Bis(diphenylphosphino)propane</i>
DPZ	Donépézil
DTNB	5,5'-dithiobisnitrobenzoate
E	Enzyme
EDCI	1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
<i>(eel)</i>	<i>Electrophorus electricus</i>
EHPAD	Établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes
<i>(eq)</i>	Equine
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ERN	Espèces Réactives de l'Azote
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
Et ₃ N	Triéthylamine
Et ₂ O	Diéthylether
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
GDP	Guanosine Diphosphate
Glu	Glutamate
GMPC	Guanosine Monophosphate Cyclique
GSH	Forme réduite du glutathion
GTP	Guanosine Triphosphate
<i>(h)</i>	Humaine
HAD	Accepteur de liaison hydrogène
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HOBT	Hydroxybenzotriazole
HYD	Site Hydrophobe
I	Inhibiteur
IAChe	Inhibiteur de l'Acétylcholinestérase
IBuChE	Inhibiteur de la Butyrylcholinestérase
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
IGF	Institut de Génomique Fonctionnelle
IMAO	Inhibiteur de la Monoamine Oxydase
IP	Intrapéritonéale

iPrMgCl	Chlorure d'isopropylmagnésium
iPrMgCl.LiCl	Complexe de chlore d'isopropylmagnésium / chlorure de lithium
iPrOH	Isopropanol
IR	Infrarouge
K _D	Constante de Dissociation
K _i	Constante d'Affinité
K _m	Constante de Michaelis
LAH	Lithium aluminium hydride
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LCMS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LD ₅₀	Dose Létale Médiane
LiTMP	<i>Lithium tetramethylpiperidide</i>
LSD	Diéthyllysergamide
MA	Maladie d'Alzheimer
mAChR	Récepteurs muscarinique de l'AChE
MAO	Monoamine Oxydase
MeOD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
MIBK	Méthyl isobutyl cétone
MK801	Dizocilpine
MMC	<i>Multiple-Compound Medication</i>
MMT	<i>Multiple-Medication Therapy</i>
M.p.	<i>Melting point</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MTBE	Méthyl tert-butyl éther
MTDL	<i>Multi Target Directed Ligand</i>
n-BuLi	n-Butyllithium
NaBH(OAc) ₃	Triacétoxyborohydrure de sodium
nAChR	Récepteurs nicotiques de l'ACh
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAPQI	N-acétyl-p-benzoquinone imine
NBS	N-Bromosuccinimide
NFTs	<i>Neurofibrillary Tangles</i>
NIS	N-Iodosuccinimide
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
P	Produit
PAMPA	<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>
PAS	Site Anionique Périphérique
PdC	Palladacycle
PdCl ₂	<i>Palladium(II) chloride</i>
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	<i>Bis(triphenylphosphine)palladium chloride</i>
Pd(dppf)Cl ₂	<i>[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II) dichloride</i>
Pd(OAc) ₂	<i>Palladium (II) acetate</i>
Pd(PPh ₃) ₄	<i>Tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0)</i>
Pd(TFA) ₂	<i>Palladium(II) trifluoroacetate</i>

PDE-5	Phosphodiesterase de type 5
Phe	Phénylalanine
Ph ₂ S ₂	Disulfure de diphenyle
PhSH	Thiophenol
PPh ₃	Triphenylphosphine
PI	Ionisable Positif
pK _A	Constante d'acidite
PSEN	Présénilines
ptau	Hyperphosphorylation de tau
QSAR	Relation Quantitative Structure Activite
Réf	Référence
RCPG	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RIV	Rivastigmine
RSA	Telation Structure Activite
rt	Room temperature.
RuCl ₂ (PPh ₃) ₃	<i>Tris(triphenylphosphine)ruthenium(II) dichloride</i>
S	Substrat
<i>s</i> -BuLi	<i>sec</i> -Butyllithium
sAPP α	soluble Amyloid Precursor Proteine α
SEAR	Substitution Electrophile Aromatique
Ser	Sérine
SCOP	Scopolamine
TA	Température ambiante
TAC	Tacrine
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphénylsilyl
TBHP	Hydroperoxyde de <i>tert</i> -butyle
<i>t</i> -BuLi	<i>tert</i> -Butyllithium
(<i>Tc</i>)	<i>Torpedo californica</i>
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy
TFA	Acide Trifluoroacétique
TFEol	2,2,2-Trifluoroethanol
TFMU	4-(Trifluorométhyl)umbelliférol, 7-Hydroxy-4-(trifluorométhyl)coumarin
THF	Tétrahydrofurane
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyléthylènediamine
TMP	2,2,6,6-Tétraméthylpipéridine
TIPS	Triisopropylsilyl
t _R	Temps de rétention
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>

Avant-propos

Mes travaux de thèses ont été réalisés au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), sous la direction du Professeur Christophe Rochais.

Pharmacien de formation, je suis actuellement interne en innovation pharmaceutique et recherche. J'ai réalisé mes études à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Caen Normandie. Mon premier stage (stage d'initiation) de recherche s'est déroulé au laboratoire de biologie moléculaire BioTICLA, où, encadré par le Docteur Laurent Poulain, j'ai travaillé sur l'influence d'une protéine pro-apoptotique dans le cas de cancers ovariens résistants. J'ai ensuite effectué un stage de Master 1, au laboratoire d'analyse microbiologique du Centre Hospitalo-Universitaire de Caen sous la direction du Professeur Vincent Cattoir. Le sujet portait sur l'étude d'une souche de *Listeria monocytogenes* ayant développé une résistance très rare à la rifampicine. Ces travaux ont permis la publication d'un article en 2016.¹ Mon arrivée au CERMN a coïncidé avec le début de mon Master 2 et de mon 3^{ème} semestre d'internat.

Le CERMN, rattaché à l'Université de Caen Normandie et dirigé par le Pr Patrick Dallemagne, est une unité de recherche orientée vers le *drug design*. Elle est constituée de quatre plateformes : Chimie Organique et Médicinale, Chémoinformatique, Chimiothèque et Screening et Druggabilité. Les axes de recherche actuellement développés sont la cancérologie et les neurosciences, avec comme programmes scientifiques prioritaires la polypharmacologie, les interactions protéine-protéine et les outils chimiques pour le diagnostic et l'imagerie.

Mon projet de recherche s'insère principalement dans le domaine de la chimie organique et médicinale et dans la thématique polypharmacologie.

Mes travaux de thèse ont consisté à synthétiser des prodrogues pléiotropes inhibitrices des cholinestérases et actives sur une seconde cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Le nombre de nouvelles molécules pléiotropes croît de façon exponentielle depuis de nombreuses années, mais très peu arrivent en phase d'essais cliniques. Dans le but d'obtenir des molécules actives en clinique, nous nous sommes intéressés aux principes des prodrogues afin de former des molécules polyactives ayant de bonnes propriétés ADME (administration, distribution, métabolisation et élimination), permettant d'augmenter l'efficacité de ces molécules. Cette efficacité est couplée à la

¹ Isnard, C.; Fines-Guyon, M.; Toublet, F.-X.; Guerin, F.; Rogowski, C.; Vergnaud, M.; Cattoir, V. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48* (5), 572–574.

synergie d'actions des effets induits par la pléiotropie de ces molécules. Pour l'instant une seule molécule ayant atteint les essais cliniques a été décrite selon ce principe pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, le ladostigil.

Ce manuscrit sera ainsi divisé en 4 parties : la première résumera la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, la seconde décrira les différentes cibles et stratégies thérapeutiques. La troisième partie concernera la synthèse de prodrogues pléiotropes ainsi que l'analyse *in silico*, *in vitro* et *in vivo* des meilleures prodrogues. La quatrième et dernière partie sera consacrée à la synthèse de ligands autoimmolables pléiotropes.

Outre la synthèse chimique, cette thèse m'a permis de développer des connaissances et des compétences en biologie, par la participation et la réalisation de tests *in vitro*, tels que l'étude cinétique de Lineweaver-Burk, ou les tests de stabilité des prodrogues en présence de base, de tampon ou d'enzyme.

J'ai également eu la possibilité d'effectuer 192 heures d'enseignements au sein de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'UFR Santé de l'Université de Caen Normandie dans le cadre de vacances. J'ai pu encadrer les travaux pratiques de chimie organique de 2^{ème} année (30 h), de chimie thérapeutique de 3^{ème} et 4^{ème} années (36 h), de pharmacognosie de 2^{ème} et 3^{ème} année (90 h), de préparation et d'identification de matières premières de 6^{ème} année (36 h).

J'ai encadré une étudiante en stage de Master 1 (Dyhia Amrane, étudiante en M1 Drug Design à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'UFR Santé de l'Université de Caen Normandie) et une stagiaire Erasmus (Deanna Mohamed de l'Université de Portsmouth).

J'ai également suivi de nombreuses formations (102 h).

Les travaux réalisés au cours de ces trois années de recherches ont été valorisés à ce jour par une publication, trois communications orales ainsi que neuf communications par affiche. Deux autres publications sont en préparation.

Publication

Toulet, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Hatat, B.; Davis, A.; Since, M.; Corvaisier, S.; Freret, T.; Sopkova de Oliveira Santos, J.; Claeysen, S.; *et al.* Inhibiting Acetylcholinesterase to Activate Pleiotropic Prodrugs with Therapeutic Interest in Alzheimer's Disease. *Molecules* **2019**, *24* (15), 2786. <https://doi.org/10.3390/molecules24152786>.

Communications orales

Toulet, F.-X.; Lecoutey, C.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Conception de prodrugs multicibles pour vaincre la maladie d'Alzheimer*. Société des Docteurs et Amis du CERMN, Caen (France), 6 Octobre **2018**.

Toulet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey C.; Davis, A.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Synthesis and biological evaluation of novel concept: prodrugs with multi-target activities in Alzheimer's disease*. 25th Young Research Fellow Meeting, Orléans (France), 5 – 7 Mars **2018**.

Toulet, F.-X.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Synthesis and biological evaluation of prodrugs with acetylcholinesterase inhibition and 5-HT₄ Receptor agonist activities targeting Alzheimer's disease*. 31^{èmes} Journées Franco-Belge de Pharmacochimie, Spa (Belgique), 14 – 15 Septembre **2017**.

Communications par affiches

Toulet, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Davis, A.; Since, M.; Hatat, B.; Claeysen, S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. *Pleiotropic prodrugs: new method to treat Alzheimer's disease*. Normandy Chemistry Doctoral School, Caen (France), 5 Juillet **2019**.

Toulet, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Davis, A.; Since, M.; Hatat, B.; Claeysen, S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. *Pleiotropic prodrugs: covalent inhibition of AChE and activation of 5-HT₄ receptor to treat Alzheimer's disease*. EFMC-ASCMEDI MedChem Frontiers, Cracovie (Pologne), 10 – 13 Juin **2019**.

Toulet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Since, M.; Hatat, B.; Dallemagne D.; Rochais C. *Prodrug MTDLs a potential strategy to treat Alzheimer's disease*. 3rd WG meeting of the MuTaLig COST Action CA15135, Paris (France), 23 – 24 Février **2019**.

Toulet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Since, M.; Hatat, B.; Dallemagne, P.; Rochais, C. *Prodrug MTDLs a new way to treat Alzheimer's disease*. 26th Young Research Fellows Meeting, Paris (France), 20 – 22 Février **2019**.

Toulet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey, C.; Hatat, B.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Development of prodrugs to treat Alzheimer's disease*. Normandy Chemistry Doctoral School, Le Havre (France), 21 Juin **2018**.

Toulet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey, C.; Hatat, B.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Conception of multi-target directed ligands prodrugs to treat Alzheimer's disease*. 26th Annual GP2A Medicinal Chemistry

Conference / 31^{ème} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Asnelles sur Mer (France), 13 – 15 Juin **2018**.

Toubllet, F.-X.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Conception, synthesis and biological evaluation of prodrugs with multi-target activities in Alzheimer's disease*. Journée Normande de Recherche Biomédicale, Caen (France), 14 Novembre **2017**.

Toubllet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Synthesis and biological evaluation of novel 5-HT₆ receptor antagonist*. 25th Annual GP2A Medicinal Chemistry Conference, Liverpool (Angleterre), 31 Août – 1 Septembre **2017**.

Toubllet, F.-X.; Lalut, J.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Synthesis and biological evaluation of idalopirdine analogues as 5-HT₆ receptor antagonist*. 24th Young Research Fellows Meeting, Châtenay-Malabry (France), 8 – 10 Février **2017**.

Participation à des travaux ayant conduit à communications

Guieu, B.; Lecoutey, C.; **Toubllet, F.-X.**; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Development of pleiotropic (pro)drugs MAO-B Inhibitor / AChE Inhibitor for Alzheimer's disease*. 26th Young Research Fellows Meeting, Paris (France), 20 – 22 Février **2019**. *Poster*

Lanthier, C.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; **Toubllet, F.-X.**; Dallemagne, P.; Rochais, C. *Conception and synthesis of new pleiotropic compounds that both display 5-HT₄R agonist activity and antioxidant property in Alzheimer's disease*. 26th Annual GP2A Medicinal Chemistry Conference / 31^{ème} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Asnelles sur Mer (France), 13 – 15 Juin **2018**. *Communication orale*

Guieu, B.; Lecoutey, C.; **Toubllet, F.-X.**; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Conception of Pleiotropic (pro)drugs MAO- B Inhibitor / AChE Inhibitor for Alzheimer ' s Disease*. 26th Annual GP2A Medicinal Chemistry Conference / 31^{ème} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Asnelles sur Mer (France), 13 – 15 Juin **2018**. *Poster*

Chapitre 1. Maladie d'Alzheimer : Physiopathologie

1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer : les enjeux économiques et médicaux

Le cerveau est l'un des organes les plus intéressants mais aussi le plus complexe du corps humain. De nombreuses maladies le concernant ont été décrites, parmi lesquelles nous pouvons citer la maladie de Parkinson, la schizophrénie, et bien d'autres. Mais depuis quelques années, la maladie attirant l'attention de nombreux chercheurs est la maladie d'Alzheimer. En 1906, Alois Alzheimer, neurologue allemand décrivit le cas d'une patiente, Auguste Deter, et diagnostiqua pour la première fois cette maladie qui portera son nom : maladie d'Alzheimer (MA).²

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative d'évolution progressive qui se décompose en 3 phases : une phase préclinique asymptomatique durant plusieurs années avec l'apparition des lésions cérébrales, une phase pré-démentielle avec apparition des troubles mnésiques et comportementaux, et enfin la phase démentielle avec l'augmentation des troubles mnésiques, une dégradation des facultés mentales aboutissant à une perte d'autonomie du patient.

C'est une maladie complexe dont les causes restent encore mal connues. Son diagnostic anatomopathologique repose sur la détection de 2 types de lésions : les plaques séniles constituées de l'accumulation de peptides amyloïdes β ($A\beta$) d'une part, et les dégénérescences neurofibrillaires caractérisées par l'enchevêtrement de protéines tau anormalement hyperphosphorylées d'autre part. La compréhension des mécanismes aboutissant à l'apparition de ces lésions et à la survenue de la maladie d'Alzheimer est loin d'être complètement élucidée.

Elle représente actuellement entre 60 à 80% des cas de démences,³ et constitue la première cause de démence, les principales autres étant la démence à corps de Lewy, la démence associée à la maladie de Parkinson et enfin la dégénérescence lobaire fronto-temporale. Les maladies neurodégénératives et principalement la MA sont la cinquième cause de décès en Europe et la sixième aux Etats-Unis.^{4,5} Pour rappel, la démence est un « *État consécutif à une dégénérescence primaire du tissu nerveux ou secondaire à une atteinte vasculaire, plus rarement en relation avec des atteintes infectieuses dont les contaminations dues aux prions, ou encore avec des perturbations métaboliques.* ».⁶ Pour l'année 2015

² Stelzmann, R. A.; Norman Schnitzlein, H.; Reed Murtagh, F. *Clin. Anat.* **1995**, *8* (6), 429–431.

³ Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P. *Alzheimer's Dement.* **2013**, *9* (1), 63–75.

⁴ Global Health Observatory (GHO) data https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/ (accessed Sep 23, 2019).

⁵ Gaugler, J.; James, B.; Johnson, T.; Scholz, K.; Weuve, J. *Alzheimer's Dement.* **2019**, *15* (3), 321–387.

⁶ Démence - Acadpharm <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Démence> (accessed Aug 29, 2019)

le nombre de malades dans le monde est estimé à 47 millions, et sera sans doute de 75 millions en 2030 et 132 millions en 2050.⁷ La prévalence est de 3 à 5% après 65 ans et de 32% après 80%.⁸

Economiquement, les coûts globaux engendrés par les démences séniles sont estimés à 1000 milliards de dollars en 2011, et ces chiffres devraient doubler pour l'année 2030. Si le coût du traitement de la démence dans le monde était un pays, il serait la 18^{ème} économie mondiale dépassant les valeurs marchandes de sociétés telles que Apple et Google. La répartition géographique montre une forte présence des démences sur le continent asiatique avec 22,9 millions de malades, ce qui représente 49% des malades dans le monde. L'Europe compte 10,5 millions (22%), l'Amérique 9,4 millions (20%) et l'Afrique 4 millions de patients souffrant de démences (9%).⁷

En France, un plan « Solidarité grand âge » a permis aux établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) de pouvoir accueillir plus de patients Alzheimer dans des secteurs spécifiques dit « protégés ». La maladie d'Alzheimer a été déclarée « grande cause nationale » en 2007 et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) s'est vue dotée d'un milliard et demi d'euros pour lancer le « Plan Alzheimer 2007-2011 », d'une envergure égale à celle du « Plan Cancer ». Un deuxième plan Alzheimer a été annoncé en 2014 et intitulé « Plan Maladies Neurodégénératives 2014-2019 ». Il comprend cette fois-ci des axes de recherche portant sur d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et en outre son enveloppe est considérablement réduite. Son montant s'élève à 470 millions d'euros.⁹

Comprendre la maladie, le diagnostic, les traitements et l'accompagnement des malades et des familles deviennent actuellement des enjeux majeurs de notre société.

2. Physiopathologie et causes de la maladie d'Alzheimer

2.1. Généralités

La MA est une maladie neurodégénérative lente, provoquant un déficit cognitif irréversible. Ceci commence généralement par une amnésie, altération de la mémoire (compréhension des nouvelles informations, dysfonctionnement de la mémoire à court terme et autres). S'en suit une aphasie (perturbation du langage), une apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes), une agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets

⁷ Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G. C.; Wu, Y.-T.; Prina, M. *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*; 2015.

⁸ Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; et al. *Lancet* **2005**, *366*, 2112–2117.

⁹ Jourdan, J. Conception, Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Analogues de La Curcumine, Potentiels Agents Pléiotropes d'Intérêt Thérapeutique Dans La Maladie d'Alzheimer, 2015.

malgré des fonctions sensorielles intactes) et enfin une perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans le temps, avoir une pensée abstraite).¹⁰

Il existe deux formes de MA, une familiale et une sporadique. La forme familiale est héréditaire et génétique, elle se manifeste assez tôt (< 60 ans) et c'est la moins fréquente (5 à 8 %). Sa transmission s'effectue selon un mode autosomique dominant. Les mutations génétiques transmises portent sur les gènes codant pour la Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP) et les Présénilines 1 et 2 (PSEN1, PSEN2). La MA sporadique est majoritaire, non héréditaire. Elle se manifeste plus tardivement (> 60 ans) et représente 90% des formes de MA.¹¹ De plus les personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21), ont un risque accru de développer la MA. En effet, avoir une copie supplémentaire du chromosome 21 peut augmenter la production de fragments de A β produits dans le cerveau. À 40 ans, la plupart des personnes atteintes du syndrome de Down présentent des taux importants de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires dans le cerveau.¹² Selon la National Down Syndrome Society, environ 30% des personnes atteintes du syndrome de Down âgées de 50 ans sont atteintes de démence d'Alzheimer, ce nombre monte à 50 % à partir de 60 ans.¹³

À l'exception des cas d'Alzheimer liés à des mutations génétiques et à la trisomie 21, les scientifiques estiment que la MA, comme d'autres maladies chroniques courantes, se développe à la suite de multiples facteurs plutôt que d'une cause unique.

Les principaux facteurs de risque sont l'âge,¹⁴ une altération allélique sur les gènes codant pour l'apolipoprotéine E (APOE) principalement e4,¹⁵ et la présence d'antécédents familiaux.¹⁶ D'autres facteurs de risques existent et qui peuvent être eux légèrement modifiés. Il s'agit tout d'abord des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Le cerveau, bien que représentant 2% de la masse corporelle, consomme à lui seul 20% de l'oxygène du corps. Par exemple, de nombreuses publications montrent une corrélation entre une hypertension,¹⁷ une hypercholestérolémie et le développement d'une démence.¹⁸ Le niveau d'éducation et la stimulation au travail sont aussi dans les faits des facteurs protecteurs. Ces deux éléments ne permettent pas de ralentir la maladie et la formation de plaques, mais permettent à un malade de continuer à effectuer des tâches cognitives.¹⁹ Enfin bien

¹⁰ HAS. *Maladie d'Alzheimer et Maladies Apparentées : Diagnostic et Prise En Charge*; 2011.

¹¹ Bekris, L. M.; Yu, C.-E.; Bird, T. D.; Tsuang, D. W. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **2010**, *23* (4), 213–227.

¹² Lott, I. T.; Dierssen, M. *Lancet Neurol.* **2010**, *9* (6), 623–633.

¹³ Moran, J. *Aging and Down Syndrome*; 2017.

¹⁴ Hebert, L. E.; Weuve, J.; Scherr, P. A.; Evans, D. *Neurology* **2013**, *80* (19), 1778–1783.

¹⁵ Farrer, L. A.; Cupples, L. A.; Haines, J. L.; Hyman, B.; Kukull, W. A.; Myers, R. H.; Pericak-Vance, M. A.; Risch, N.; van Duijn, C. M. *JAMA* **1997**, *278* (16), 1349.

¹⁶ Mayeux, R.; Sano, M.; Chen, J.; Tatemichi, T.; Stern, Y. *Arch. Neurol.* **1991**, *48* (3), 269–273.

¹⁷ Rönnekaa, E.; Zethelius, B.; Lannfelt, L.; Kilander, L. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2011**, *31* (6), 460–466.

¹⁸ Meng, X.-F.; Yu, J.-T.; Wang, H.-F.; Tan, M.-S.; Wang, C.; Tan, C.-C.; Tan, L. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *42* (4), 1295–1310.

¹⁹ Stern, Y. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **2002**, *8* (3), 448–460.

évidemment les autres lésions traumatiques cérébrales augmentent fortement le risque de démences.²⁰

2.2. Hypothèses

Au fil des avancées sur les connaissances des causes moléculaires et des dysfonctionnements qui en découlent, plusieurs hypothèses ont été émises afin de tenter d'expliquer le déroulement et l'imbrication des causes moléculaires de la maladie. Il en existe essentiellement cinq : la cascade amyloïde, la protéine tau, les ions métalliques, le stress oxydatif, et enfin l'hypothèse cholinergique.

2.2.1. Hypothèse de la cascade amyloïde

Lors de l'autopsie de sa patiente, le Dr Alzheimer a découvert dans le cerveau de celle-ci de nombreuses plaques, appelées plaques amyloïdes.

La formation de ces plaques séniles extracellulaires est effectuée à partir de la protéine précurseur de l'amyloïde. Cet APP peut être clivé suivant 2 voies différentes : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique.

La première est la voie non pathogène (non-amyloïdogénique). Elle dépend d'une enzyme, l' α -sécrétase, qui va cliver cette APP en sAPP α , protéine soluble essentielle pour la plasticité neuronale, neuroprotectrice et neurotrophique, et en CTF α (C-terminal fragment α). sAPP α est un peptide thérapeutique potentiel dans la MA.²¹ La promotion de sa production peut notamment être induite par l'intervention d'agonistes des récepteurs à la sérotonine de type 4 (5-HT₄R). Chez le sujet jeune, les α -sécrétases sont les enzymes prédominantes.

A l'inverse, lors du vieillissement et en présence de certains facteurs favorisant, les β -sécrétases tendent à remplacer les α -sécrétases, c'est alors la voie amyloïdogénique. Elle conduit à la formation de sAPP β et d'APP-CTF β . Par la suite une γ -sécrétase vient cliver ce peptide en deux : un fragment A β et CTF β (Figure 1). Cette β -sécrétase ou BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1), est codée par le gène *BACE1*. Par la suite, le CTF β est clivé par la γ -sécrétase en plusieurs sites, entraînant la libération d'un fragment intracellulaire (AICD) et les peptides monomères A β de 38 à 43 acides aminés. A β ₄₀ et A β ₄₂ sont les monomères les plus couramment fournis.²²

²⁰ Fann, J. R.; Ribe, A. R.; Pedersen, H. S.; Fenger-Grøn, M.; Christensen, J.; Benros, M. E.; Vestergaard, M. *The Lancet Psychiatry* **2018**, 5 (5), 424–431.

²¹ Turner, P. R.; O'connor, K.; Tate, W. P.; Abraham, W. C. *Prog. Neurobiol.* **2003**, 70, 1–32.

²² Masters, C. L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C. C.; Sperling, R. A.; Cummings, J. L. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, 1, 15056.

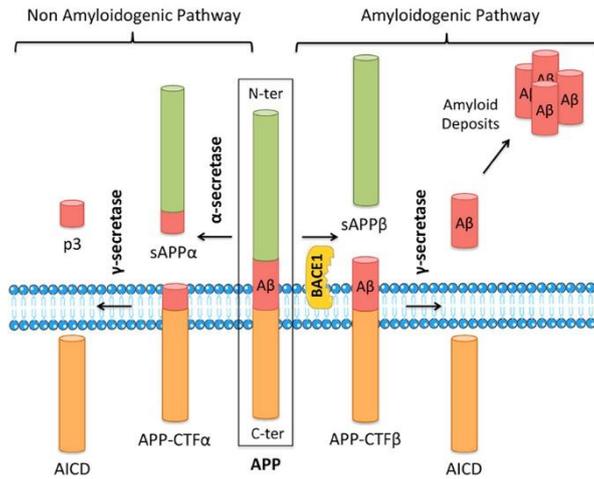


Figure 1. Hypothèse amyloïde.²³

Grâce à des facteurs environnementaux ou génétiques, ces monomères A β peuvent avoir une conformation partiellement repliée. Par la suite, dans la phase d'oligomérisation, A β va former des oligomères de transition potentiellement toxiques. Différents types d'oligomères sont également observés et stabilisés sans croissance supplémentaire des fibrilles. Par la suite, ces espèces oligomériques sont transformées en protofibrilles ou en fibrilles, formant ainsi les plaques amyloïdes. Même après la transition structurelle en fibrilles, certaines fibrilles peuvent se fragmenter et se réassembler en espèces oligomériques structurées (Figure 2).²⁴

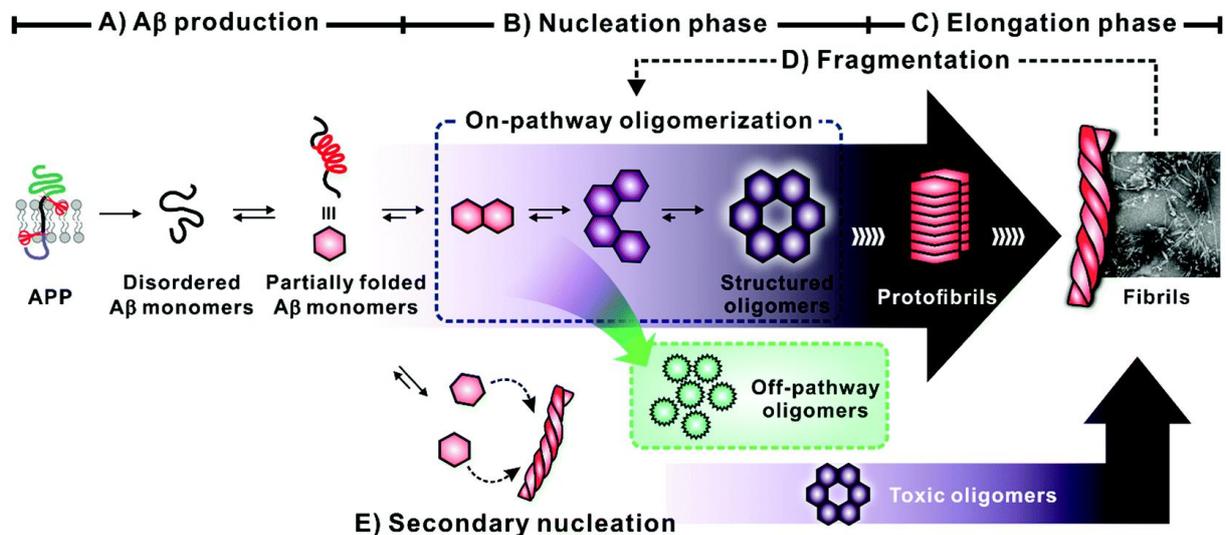


Figure 2. Description schématique de la production et de l'agrégation de l'A β .²⁴

Lee *et al.* décrivent dans un article récent les différents mécanismes suivant lesquels les oligomères d'A β peuvent provoquer des effets toxiques sur les systèmes cellulaires, bien que ces mécanismes

²³ Gay, M.; Evrard, C.; Descamps, F.; Carato, P.; Renault, N.; Coevoet, M.; Eddarkaoui, S.; Baud, C.; Larchanché, P.-E.; Buée, L.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 104–125.

²⁴ Lee, S. J. C.; Nam, E.; Lee, H. J.; Savelieff, M. G.; Lim, M. H. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (2), 310–323.

soient complexes et difficiles à interpréter.²⁴ Pour résumer, trois grands mécanismes seraient à l'origine de la toxicité de ces oligomères.

Premièrement, les microenvironnements membranaires seraient perturbés par une interaction des oligomères A β et des lipides des récepteurs synaptiques membranaires (Figure 3A). Deuxièmement, les oligomères A β peuvent être incorporés dans les compartiments subcellulaires *via* une interaction avec les récepteurs synaptiques, provoquant des lésions aux organites et aux voies de signalisation (Figure 3B). Enfin les oligomères peuvent se transmettre de neurone en neurone, provoquant une accélération du processus (Figure 3C).

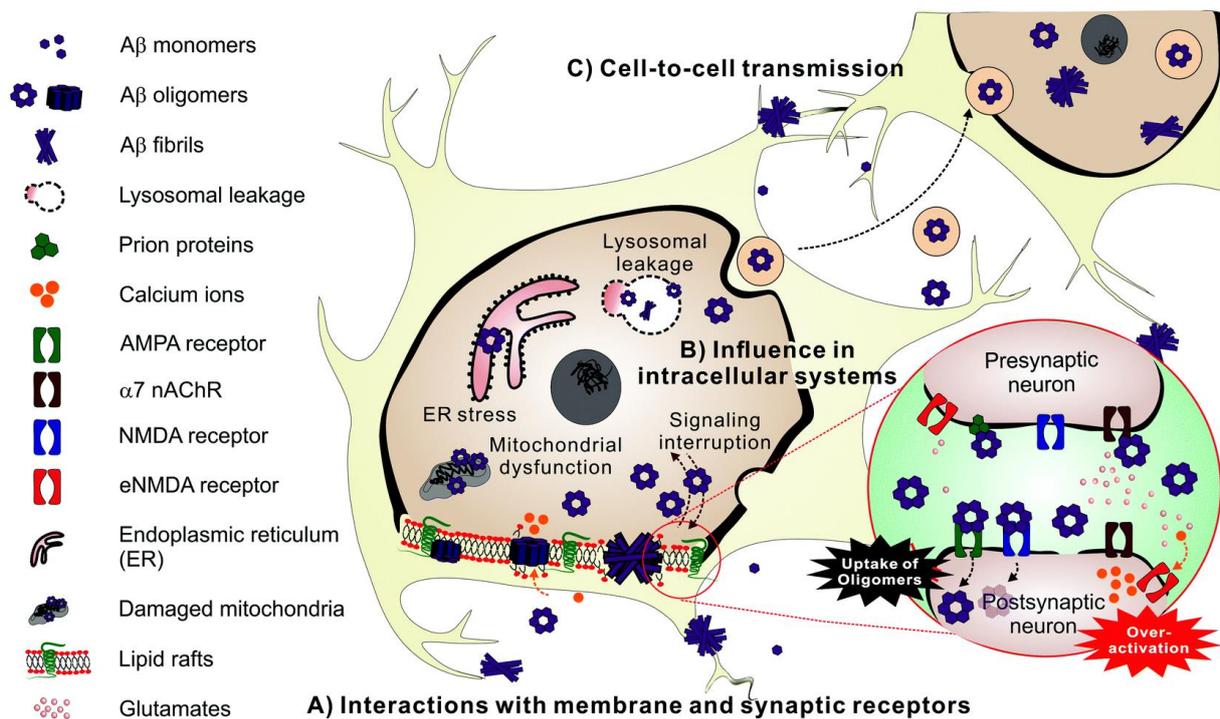


Figure 3. A : Interaction entre les oligomères A β et les lipides membranaires ; B : Internalisation des oligomères A β ; C : Transmission de cellules en cellules.²⁴

Les progrès récents dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis d'identifier une nouvelle enzyme appelée η -sécrétase qui serait responsable d'un clivage de l'APP dont Willem *et al.* ont démontré qu'elle serait responsable d'une inhibition de l'activité neuronale hippocampique.²⁵

2.2.2. Hypothèse de l'hyperphosphorylation de la protéine tau

La seconde hypothèse importante dans la MA est l'hyperphosphorylation de la protéine tau, provoquant la formation d'agrégats tau dans les neurones et un enchevêtrement neurofibrillaire caractéristique (appelé *neurofibrillary tangles* NFTs en anglais).²⁶

²⁵ Willem, M.; Tahirovic, S.; Busche, M. A.; Ovsepian, S. V.; Chafai, M.; Kootar, S.; Hornburg, D.; Evans, L. D. B.; Moore, S.; Daria, A.; *et al.* *Nature* **2015**, 526 (7573), 443–447.

²⁶ Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R. A. *Neuron* **1989**, 3 (4), 519–526.

Tau est une protéine appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP), qui stabilisent les microtubules, favorisant le transport axonal et le soutien de la structure de dendrite.²⁷ Tau est codé par un seul gène sur le chromosome 17 qui donne naissance à six isoformes dont la longueur varie de 352 à 441 acides aminés. Ces six isoformes se trouvent être agrégés et hyperphosphorylés dans le cadre de NFTs.

L'hyperphosphorylation de tau (ptau) provoque une perte de fonction qui entrave sa capacité à se lier aux microtubules, induisant la détérioration de la structure de la dendrite et la dépolymérisation des microtubules.²⁸ L'agrégation de tau se produit par étapes, d'abord par la formation d'oligomères d'enchevêtrements amorphes qui se transforment en paires de filaments hélicoïdaux et en filaments droits.²⁹

Dans une publication, Noble *et al.* ont lié l'initiation de l'agrégation de la protéine tau à la kinase-5 dépendante de la cycline (cdk5) dans un modèle murin.³⁰ Des recherches supplémentaires sur la phosphorylation et l'agrégation de tau dans la MA sont nécessaires pour déterminer leur relation de cause à effet conduisant à la dégradation neuronale afin de suggérer des approches thérapeutiques prospectives.

La communauté scientifique suggère que la fonction toxique de tau provient des oligomères de ptau plutôt que des NFT. De plus en plus, de récentes études sur les oligomères tau confirment leur rôle dans la pathologie précoce de la MA, car ils pourraient perturber le transport axonal antérograde et altérer la potentialisation à long terme.³¹

Outre la MA, les maladies appelées tauopathies (dégénérescence corticobasale sporadique, paralysie supranucléaire progressive et démence fronto-temporale), ont été liées à tau, suggérant un lien mutuel entre plusieurs maladies neurodégénératives.³²

Un lien entre l'hypothèse amyloïde et l'hypothèse tau dans la MA semble également avéré. Il a été rapporté que tau et ptau interagissaient directement et indirectement avec A β . Dans un article de Hardy et Selkoe, les auteurs pensent que A β serait responsable de la formation des NFT.³³ Le parallèle entre A β et tau, en ce qui concerne la toxicité des formes oligomères, a conduit à penser que les espèces oligomères de A β et de tau pourraient agir de manière synergique pour induire une

²⁷ Ballatore, C.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8* (9), 663–672.

²⁸ Baudier, J.; Cole, R. D. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (36), 17577–17583.

²⁹ Daebel, V.; Chinnathambi, S.; Biernat, J.; Schwalbe, M.; Habenstein, B.; Loquet, A.; Akoury, E.; Tepper, K.; Müller, H.; Baldus, M.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (34), 13982–13989.

³⁰ Noble, W.; Olm, V.; Takata, K.; Casey, E.; Mary, O.; Meyerson, J.; Gaynor, K.; LaFrancois, J.; Wang, L.; Kondo, T.; *et al.* *Neuron* **2003**, *38* (4), 555–565.

³¹ Ward, S. M.; Himmelstein, D. S.; Lancia, J. K.; Binder, L. I. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (4), 667–671.

³² Lee, V. M.-Y.; Goedert, M.; Trojanowski, J. Q. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24* (1), 1121–1159.

³³ Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297* (5580), 353–356.

neurotoxicité et un dysfonctionnement synaptique. De plus, la perturbation de l'homéostasie du calcium, de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), de la cdk5 et des acides gras libres a été mise en cause en tant que facteur de transition entre A β et tau (Figure 4).^{34,35}

Les interrelations de A β et de tau apparaissent complexes et des agents capables d'interagir avec eux deux pourraient tirer parti d'une clarification supplémentaire.

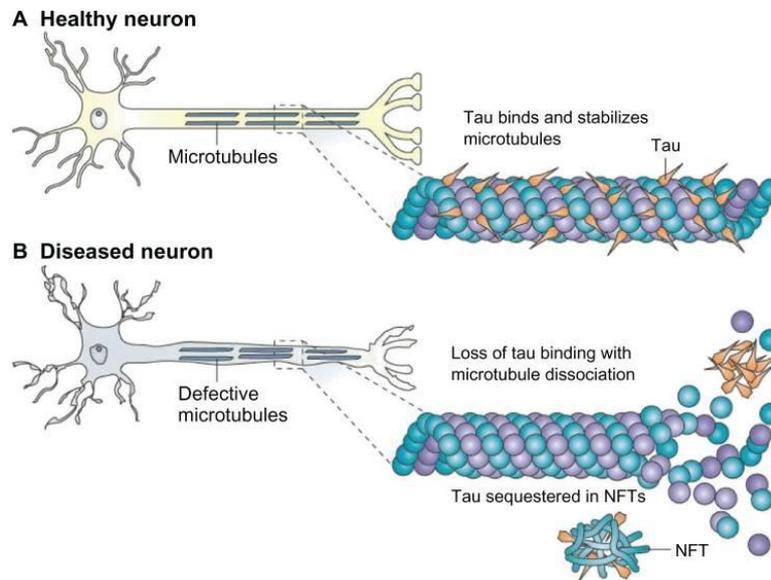


Figure 4. (A) Tau facilite la stabilisation des microtubules dans les cellules et est particulièrement abondant dans les neurones ; (B) Effet de l'hyperphosphorylation de tau.³⁶

2.2.3. Hypothèse des ions métalliques

Comme d'autres tissus, le cerveau contient plusieurs ions métalliques essentiels tels que Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Cr, Co et des métaux non essentiels. Le cerveau appartient aux organes dont la teneur en métaux de transition est la plus élevée. Les teneurs en métaux de transition les plus abondants, Fe, Zn et Cu, sont respectivement de 0,3 g, 0,1 g et 0,004 g par kg de cerveau.³⁷ Ces trois ions métalliques semblent directement impliqués dans le stress A β et / ou oxydant. Ces ions sont généralement liés aux protéines afin de contrôler la réactivité de celles-ci et ont le plus souvent un rôle dans le centre catalytique des métalloprotéines ou dans le site de transfert d'électrons. Seul le Zn apparaît à une concentration supérieure dans des formes non liées aux protéines, où il semble jouer le rôle de messager. Le métabolisme de ces ions est étroitement contrôlé par un système capable de détecter leur concentration, d'effectuer leur transport dans le sang ou à travers les membranes, de fournir l'ion métallique lors du repliement et de la maturation des protéines. Une teneur trop élevée ou trop faible en ions métalliques se trouve être toxique. C'est le cas des maladies de Wilson et de Menkes par

³⁴ Ittner, L. M.; Götz, J. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12* (2), 67–72.

³⁵ Phiel, C. J.; Wilson, C. A.; Lee, V. M.-Y.; Klein, P. S. *Nature* **2003**, *423* (6938), 435–439.

³⁶ Chen, S.; Ge, X.; Chen, Y.; Lv, N.; Liu, Z.; Yuan, W. *Drug Des. Devel. Ther.* **2013**, *7*, 117–125.

³⁷ Faller, P.; Hureau, C. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (50), 15910–15920.

exemple. La première est une surcharge en Cu, la seconde une maladie génétique due à une carence en Cu. Dans l'une ou l'autre de ces maladies, le cerveau est fortement touché, en raison de sa forte teneur en métaux.³⁸

Il existe de nombreuses preuves d'une mauvaise régulation des ions métalliques dans la MA, en particulier pour Cu, Zn et Fe (Figure 5).³⁹ En effet, il a été prouvé la présence d'une accumulation de Cu, Zn et Fe dans les plaques amyloïdes.⁴⁰

L'APP est par ailleurs également impliquée dans le métabolisme des métaux, car elle peut favoriser l'efflux de fer dans les neurones.⁴¹ De plus, la transcription de l'APP est régulée par Cu. Il a été décrit par James *et al.* une augmentation de la quantité de Cu faiblement liée dans le cerveau d'un malade comparativement à un sujet sain.⁴² Il est d'ailleurs maintenant bien établi que de telles liaisons faibles de Cu et Fe peuvent favoriser le stress oxydant.⁴³

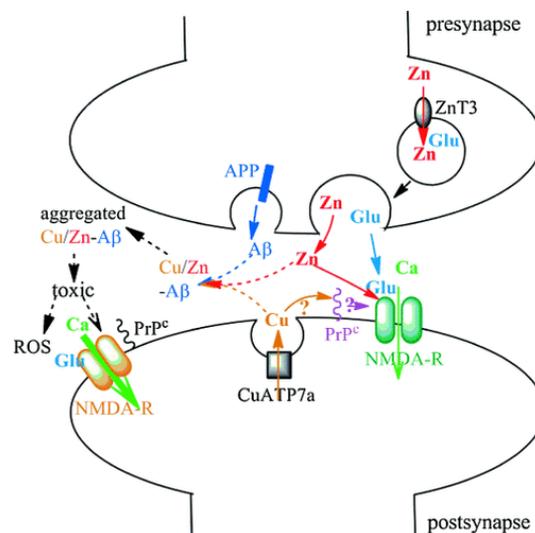


Figure 5. Effet des ions métalliques dans les synapses malades.³⁷

2.2.4. Hypothèse du stress oxydant

Une autre hypothèse est le stress oxydant, qui semble être un facteur déterminant de la pathogénèse et de la progression de la MA. Des études ont montré qu'une dérégulation de l'état oxydant, est présent à un stade précoce de la maladie, induisant de multiples voies de signalisation cellulaires qui contribuent à la progression du processus neurodégénératif.⁴⁴

³⁸ Biot, C.; Castro, W.; Botté, C. Y.; Navarro, M. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (21), 6335–6349.

³⁹ Bonda, D. J.; Lee, H. G.; Blair, J. A.; Zhu, X.; Perry, G.; Smith, M. A. *Metallomics* **2011**, *3* (3), 267–270.

⁴⁰ Miller, L. M.; Wang, Q.; Telivala, T. P.; Smith, R. J.; Lanzirrotti, A.; Miklossy, J. *J. Struct. Biol.* **2006**, *155* (1), 30–37.

⁴¹ Duce, J. A.; Tsatsanis, A.; Cater, M. A.; James, S. A.; Robb, E.; Wikhe, K.; Leong, S. L.; Perez, K.; Johanssen, T.; Greenough, M. A.; *et al.* *Cell* **2010**, *142* (6), 857–867.

⁴² James, S. A.; Volitakis, I.; Adlard, P. A.; Duce, J. A.; Masters, C. L.; Cherny, R. A.; Bush, A. I. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52* (2), 298–302.

⁴³ Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 450–464.

⁴⁴ Behl, C.; Moosmann, B. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (2), 182–191.

En effet, la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) et d'espèces réactives de l'azote (ERN ou RNS en anglais) ont été détectées dans les cerveaux de malades. De plus, les personnes malades présentent un taux d'enzymes antioxydantes cérébrales plus faible que pour les personnes saines. Toutes ces données confirment l'hypothèse du stress oxydant de la MA.

Les ERO comprennent : le radical anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroperoxyl, l'oxygène singulet, le peroxyde et l'ion hydroxyde. La principale source de production de ces ERO est la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase), présente dans les membranes cellulaires, les mitochondries et le réticulum endoplasmique.⁴⁵

Le stress oxydant est caractérisé par la dérégulation des ERO et des dommages cellulaires résultant de l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

Dans la MA, il existe des interconnexions établies entre le stress oxydant et d'autres événements clés, qui en amplifient la complexité. Le stress oxydant est donc un élément commun capable d'articuler les différents mécanismes de la MA.⁴⁶

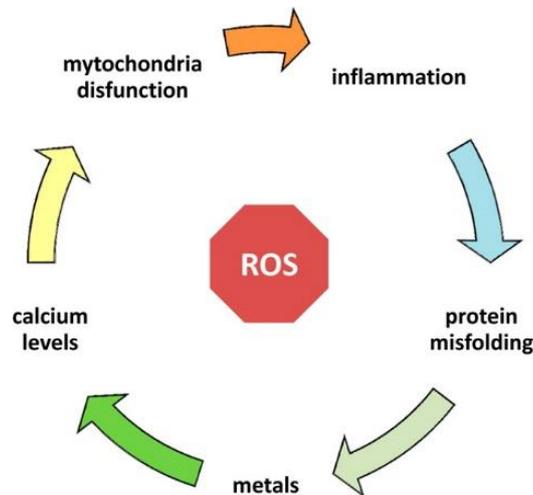


Figure 6. Implication des ERO (ROS) dans la complexité de la MA.⁴⁶

2.2.5. Hypothèse cholinergique

L'hypothèse cholinergique suppose que la dégénérescence dans les neurones cholinergiques et la perte associée de la neurotransmission dans le cortex cérébral contribuent à la détérioration des fonctions cognitives.⁴⁷ Cette hypothèse sera développée dans le chapitre 2.1.3.

⁴⁵ Markesbery, W. R.; Carney, J. M. *Brain Pathol.* **2006**, 9 (1), 133–146.

⁴⁶ Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (7), 2821–2831.

⁴⁷ Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, 66 (2), 137–147.

*Chapitre 2. Cibles et stratégies thérapeutiques : de l'état
de l'art à la conception du projet*

1. Cholinestérases : description et implication dans la maladie d'Alzheimer

1.1. Description et fonctionnement du système cholinergique

Le système cholinergique possède comme neurotransmetteur l'acétylcholine (ACh). L'ACh, agoniste cationique des récepteurs nicotiques et muscariniques, est impliquée dans de nombreux processus physiologiques au niveau central et périphérique (activité musculaire). Elle est responsable de l'apprentissage et de la mémoire.⁴⁸

Ce neurotransmetteur est synthétisé dans le neurone pré-synaptique à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A, grâce à une enzyme, la choline acétyltransférase (ChAT). L'ACh est ensuite libérée dans l'espace intersynaptique qui permet la transmission d'un influx nerveux d'un neurone à l'autre en diffusant et se liant aux récepteurs postsynaptiques. L'influx nerveux est régulé par les cholinestérases (ChE) : acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BuChE). Ces enzymes ont pour rôle de mettre fin à la transmission du signal par hydrolyse de l'ACh en acétate et en choline. La choline est par la suite recapturée par le neurone présynaptique permettant ainsi une nouvelle production d'ACh (Figure 7 et Schéma 1).

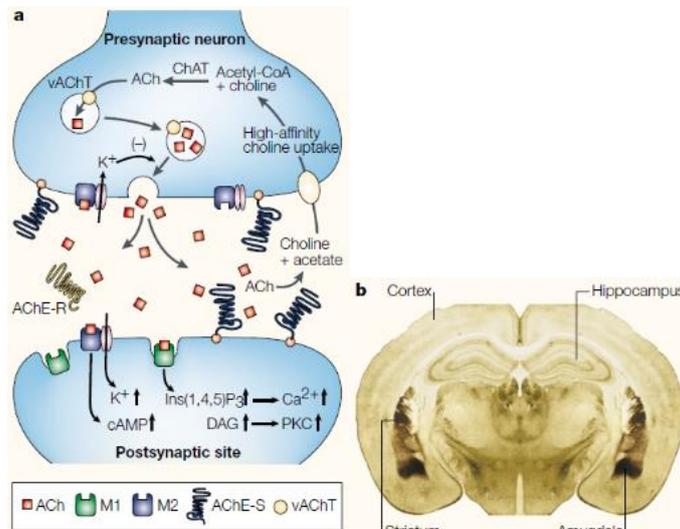


Figure 7. a : Cycle de transmission cholinergique et d'hydrolyse du neurotransmetteur AC ; b : Localisation cérébrale de l'AChE.⁴⁸

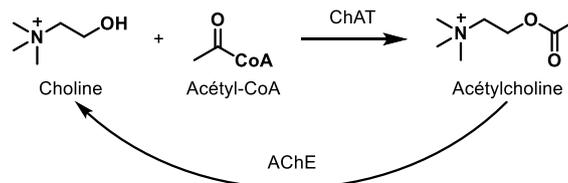


Schéma 1. Formation et dégradation de l'AChE.

⁴⁸ Soreq, H.; Seidman, S. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2 (4), 294–302.

1.2. Description et fonctionnement des cholinestérases

Comme nous venons de l'évoquer, il existe deux types de cholinestérases : l'acétyl et la butyrylcholinestérase. L'AChE est une cholinestérase que l'on trouve principalement au niveau des jonctions synaptiques nerveuses et dans le cortex cérébral humain adulte, alors que la BuChE est principalement située dans les cellules gliales.

L'AChE est une enzyme présente sous forme de tétramère. C'est une sérine hydrolase dont la spécificité est relativement élevée pour l'ACh, avec une dégradation de 25 000 molécules par seconde pour une molécule d'AChE.⁴⁹ Elle a une forme ellipsoïdale, d'une dimension de 45 Å sur 60 Å sur 65 Å. Un monomère est composé de 12 feuillets β entourés de 14 hélices α. L'enzyme possède une gorge profonde et étroite de 20 Å. Ainsi, le site actif catalytique de l'AChE est situé à 4 Å du fond de cette gorge et comprend 2 sous-sites : le site anionique et le site estérasique correspondant respectivement au site catalytique et à la poche de liaison de la choline. Le sous-site anionique, non chargé et lipophile, lie l'ammonium quaternaire chargé positivement de la partie choline de l'ACh. Les substrats cationiques ne sont pas liés par un acide aminé chargé négativement dans le site anionique, mais par interaction avec 14 résidus aromatiques qui bordent la gorge menant au site actif. Parmi les acides aminés aromatiques, le tryptophane 84 est essentiel et sa mutation en une alanine entraîne une diminution de 3000 fois de l'activité enzymatique. Le sous-site estérasique, où l'ACh est hydrolysée en acétate et choline, contient, comme les sous-sites catalytiques d'autres sérine hydrolases, la triade catalytique de trois acides aminés: la sérine 200, l'histidine 440 et le glutamate 327 (Figure 8).

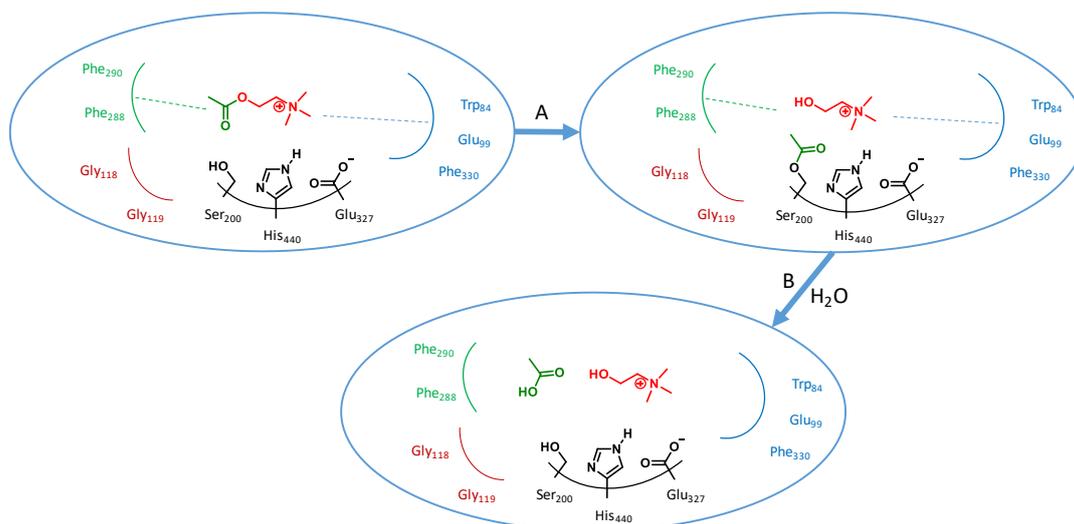


Figure 8. Mécanisme de l'hydrolyse de l'ACh, catalysé par la AChE(Tc) ; A. Décarboxylation de l'ACh et carboxylation réversible de la Ser200 ; B. Hydrolyse de la Ser200 et libération de choline et d'acide acétique.^{50,51}

⁴⁹ Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (3), 315–335.

⁵⁰ Dallemagne, P. *Les Médicaments Du Système Nerveux Central, Cours de 4^{ème} Année de Pharmacie*; 2014.

⁵¹ Darvesh, S.; Darvesh, K. V.; McDonald, R. S.; Mataija, D.; Walsh, R.; Mothana, S.; Lockridge, O.; Martin, E. J. *Med. Chem.* **2008**, *51* (14), 4200–4212.

En plus de son site actif, l'AChE contient un site périphérique (PAS) situé à l'entrée de la gorge. Il permet la liaison de l'ACh ou d'autres ligands agissant comme ligands non compétitifs. Il est impliqué dans les mécanismes d'action des inhibiteurs de l'AChE. Le PAS pourrait agir comme un régulateur allostérique de l'activité de l'AChE et réguler l'activité catalytique en adaptant l'efficacité de l'AChE à la concentration d'ACh, permettant notamment l'accélération de la réaction catalytique à de basses concentrations de substrat (fixation de l'ACh au PAS d'une enzyme contenant déjà un substrat d'ACh en son site actif). Inestrosa *et al.* ont prouvé qu'il existait une complexation entre l'A β et le PAS de l'AChE qui accélère l'agrégation de A β .⁵² Le donépézil, inhibiteur de l'AChE actuellement commercialisé, est un inhibiteur de ce PAS.

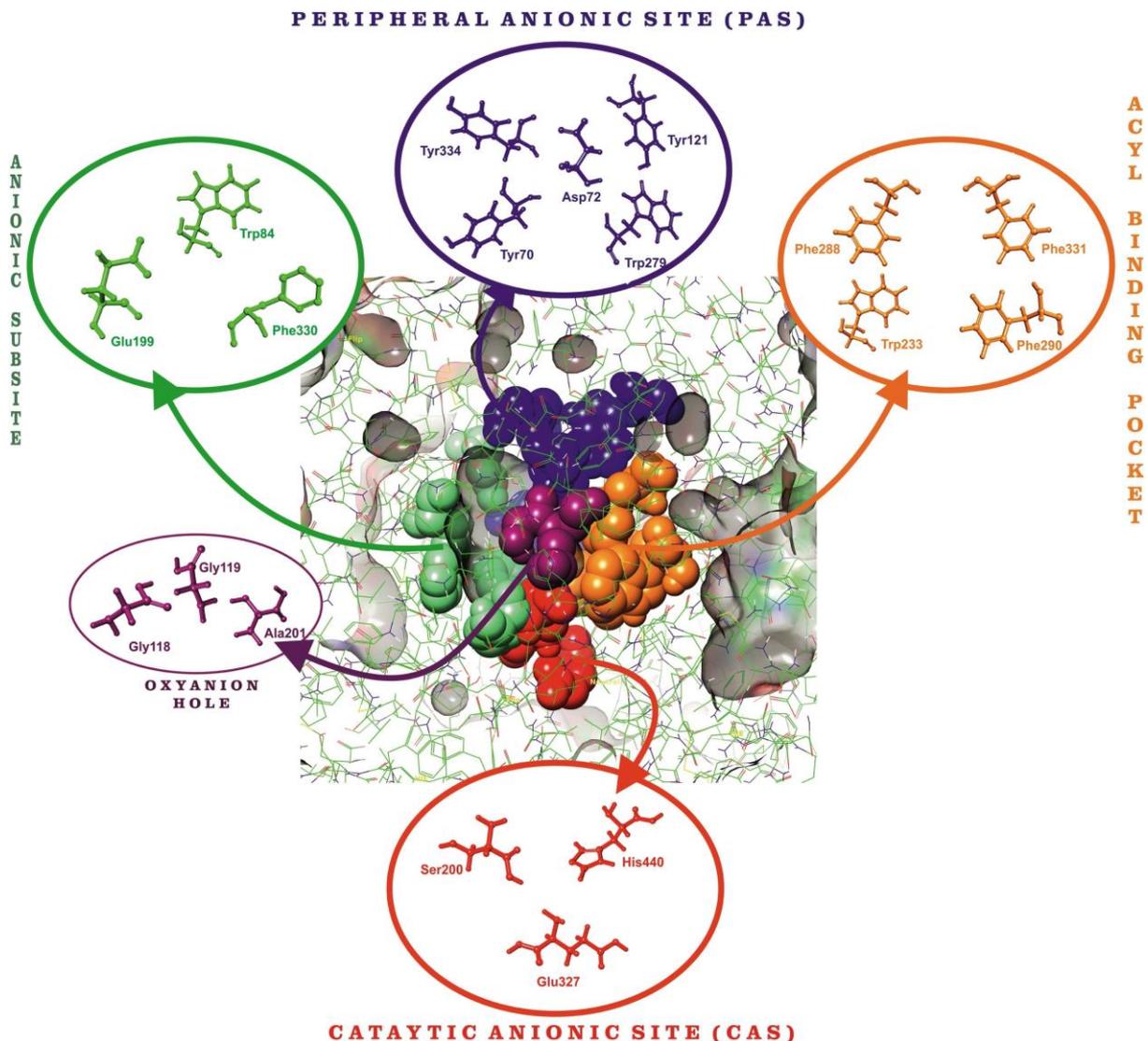


Figure 9. Représentation schématique de l'AChE(Tc) (code PDB : 1EVE) décrivant divers sites de liaison actifs et leurs résidus d'acides aminés. Plusieurs sites actifs d'AChE sont colorés avec des bulles : CAS en rouge ; PAS en bleu ; Sous-site anionique en vert ; Trou oxydant en violet ; Poche de fixation Acyl en orange.⁵³

⁵² Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. *Neuron* **1996**, *16* (4), 881–891.

⁵³ Sharma, P.; Srivastava, P.; Seth, A.; Tripathi, P. N.; Banerjee, A. G.; Shrivastava, S. K. *Prog. Neurobiol.* **2019**, *174*, 53–89.

La BuChE est une pseudocholinestérase ou une cholinestérase non spécifique. C'est une sérine hydrolase qui catalyse les hydrolyses d'esters de cholines, comme la butyrylcholine, la succinylcholine et l'acétylcholine. Comme l'AChE, la BuChE est composée d'un feuillet β central entouré d'hélices α .⁵⁴ Elle catalyse aussi l'hydrolyse d'esters variés comme la cocaïne, l'acide acétylsalicylique et l'héroïne.

Le site catalytique comprend une sérine 226, une histidine 466 et un acide glutamique 353. Les structures cristallographiques de l'AChE et de la BuChE montrent quelques différences entre ces 2 enzymes comme la triade catalytique de la BuChE qui se situe à une distance de 20 Å de la gorge. Celle-ci est composée de 6 acides aminés aromatiques (contre 14 pour l'AChE). La poche étant plus large, la BuChE peut accueillir de plus grands substrats.

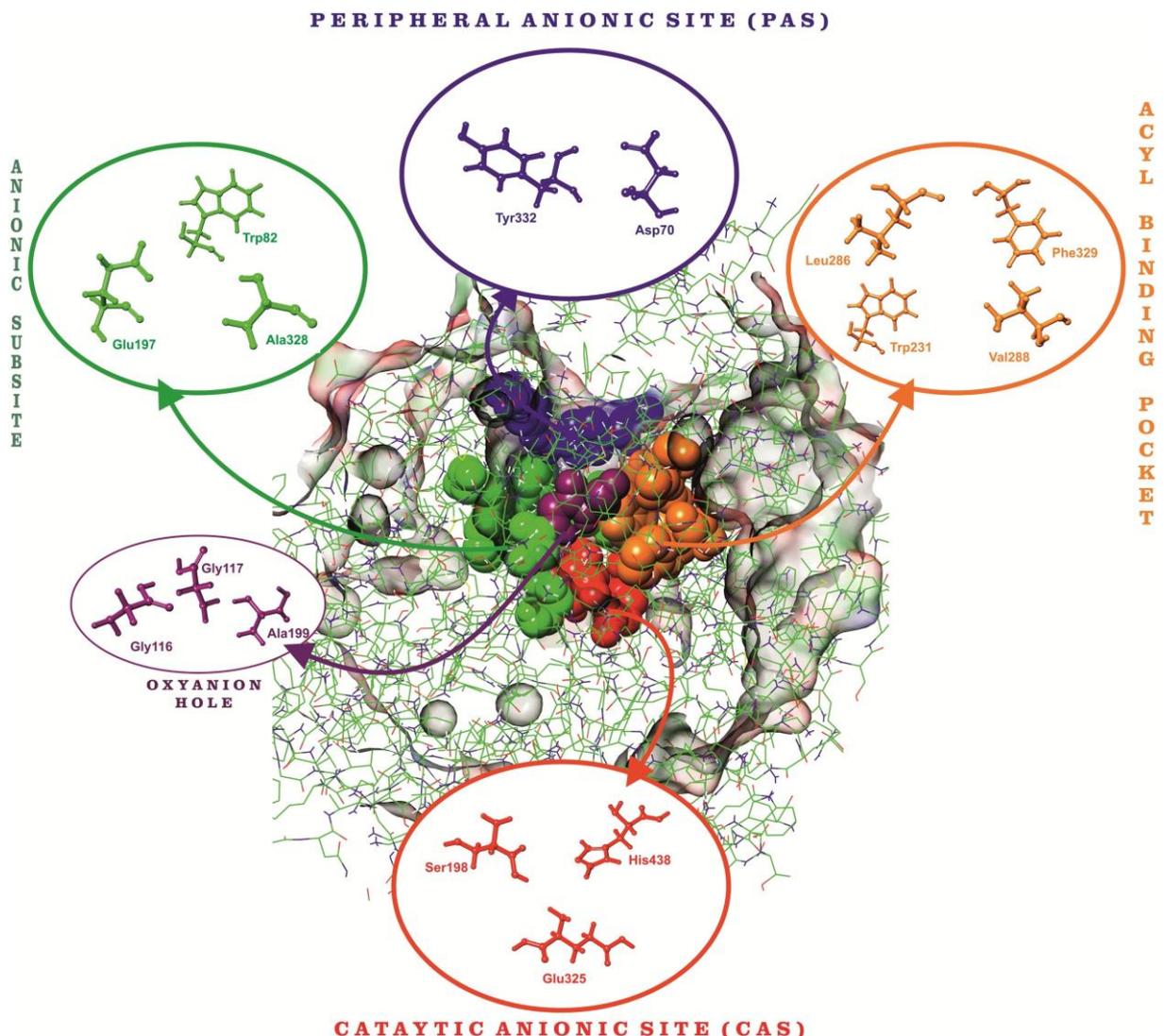


Figure 10. Représentation schématique de la structure de l'enzyme BuChE (h) (code PDB : 6EP4) décrivant divers sites actifs et leurs résidus d'acides aminés. Plusieurs sites actifs d'AChE sont colorés avec des bulles : CAS en rouge ; PAS en bleu ; Sous-site anionique en vert ; Trou oxydant en violet ; Poche de fixation Acyl en orange.⁵³

⁵⁴ Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, 4 (2), 131–138.

Les deux enzymes sont aussi des glycoprotéines. Des complexes glucidiques sont liés de manière covalente aux cholinestérases au niveau de 3 (AChE) ou 9 acides aminés (BuChE). Cette glycation permet de réguler les cholinestérases : modification du repliement, sécrétion, stabilité et clairance.

La BuChE a aussi une activité d'arylcyclamidase : elle catalyse l'hydrolyse d'acylamides aromatiques en aniline. Cette activité enzymatique supplémentaire, distincte de l'estérase, semble se réaliser sur un site différent, ou très proche et le substrat naturel est encore inconnu.

Les enzymes sont présentes dans le système nerveux central, principalement dans l'amygdale et la formation hippocampique. Dans le thalamus, compte tenu de la distribution globale des cholinestérases, il existe une complémentarité d'action entre la BuChE et l'AChE. Ainsi, dans de nombreuses régions du cerveau, des neurones exprimant BuChE et AChE sont mélangés et il est possible que certains neurones contiennent les deux enzymes.

La BuChE est aussi présente dans le système nerveux périphérique. Des neurones exprimant BuChE et AChE, ont été trouvés dans le système cardiaque intrinsèque. L'utilisation d'inhibiteur peut donc engendrer un risque d'effets indésirables.

Silver A. a montré que l'efficacité de la BuChE est moindre par rapport à l'AChE.⁵⁵ Mais une inhibition de la BuChE va entraîner une augmentation d'acétylcholine, et la BuChE peut aussi compenser une diminution ou l'absence d'AChE. En effet il a été montré dans la MA une diminution de l'AChE, alors que le taux de BuChE reste stable, compensant ainsi l'AChE pour l'hydrolyse de l'ACh. Toutefois une inhibition totale des deux enzymes est létale.⁵⁶

1.3. Hypothèse cholinergique

Dans cette hypothèse, la MA provoque une dégénérescence des neurones cholinergiques, provoquant une diminution de la neurotransmission cholinergique principalement dans le cortex cérébral et à d'autres régions entraînant la détérioration de la fonction cognitive observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Celle-ci est en relation avec un effondrement du taux de neurotransmetteur.⁵⁷ La Figure 11 tirée du travail de Francis *et al.* résume cette hypothèse.⁴⁷

⁵⁵ Silver, A. Elsevier: Amsterdam, 1974.

⁵⁶ Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q.-S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (47), 17213–17218.

⁵⁷ Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Pontecorvo, M. J.; Flicker, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, 332–358.

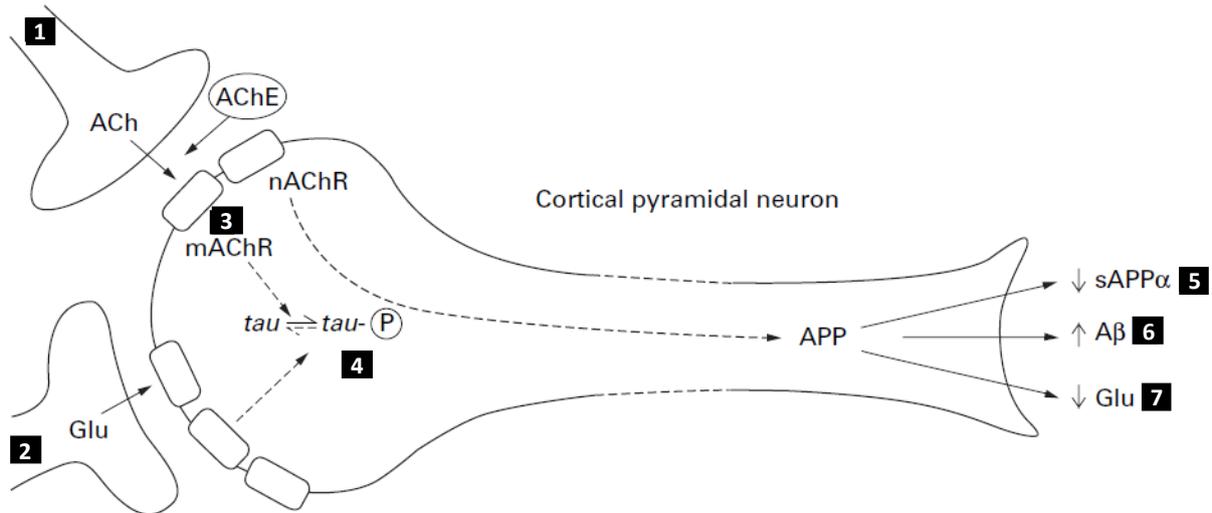


Figure 11. Représentation d'un neurone ayant des altérations dans la maladie d'Alzheimer. (1) réduction de l'innervation cholinergique corticale ; (2) neurotransmission glutamatergique corticocorticale réduite due à une perte de neurone ou de synapse ; (3) couplage réduit des récepteurs muscariniques M1 ; (4) passage de tau à l'état hyperphosphorylé ; (5) réduction de la sécrétion de sAPPα ; (6) augmentation de la production de Aβ ; (7) diminution de la production de glutamate. mAChR = récepteurs muscariniques de l'ACh ; nAChR = récepteurs nicotiniques de l'ACh. Glu = glutamate.^{47,58,59,60}

1.4. Inhibiteurs des cholinestérases

Vu ces caractéristiques, les cholinestérases et plus particulièrement l'AChE sont apparues comme des cibles de choix pour le traitement symptomatique de la MA. Ces cibles sont modulées par des inhibiteurs enzymatiques, ceux-ci ayant pour but de diminuer l'activité des ChE, permettant de limiter la diminution du taux d'ACh (Figure 12) et ainsi de permettre la transmission cholinergique. Ces composés n'empêchant pas la mort neuronale perdent rapidement en efficacité. De manière générale, il existe plusieurs types d'inhibiteurs : non-compétitif, compétitif, mixte ou in-compétitif.^{47,61} Parallèlement à cette classification, il existe les inhibiteurs réversibles, pseudo-irréversibles et irréversibles. Nous allons dans cette partie essayer de faire un résumé de la plupart de ces inhibitions, dont les principales informations sont tirées de la revue de Ramsay et Tipton.⁶²

⁵⁸ Palmer, A. M.; Gershon, S. *FASEB J.* **1990**, *4* (10), 2745–2752.

⁵⁹ Francis, P. T.; Sims, N. R.; Procter, A. W.; Bowen, D. M. *J. Neurochem.* **1993**, *60* (5), 1589–1604.

⁶⁰ Nitsch, R. M. *Neurodegeneration* **1996**, *5* (4), 477–482.

⁶¹ Enz, A.; Floersheim, P. In *Alzheimer Disease*; Birkhäuser Boston: Boston, MA, 1997; pp 211–215.

⁶² Ramsay, R.; Tipton, K. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1192.

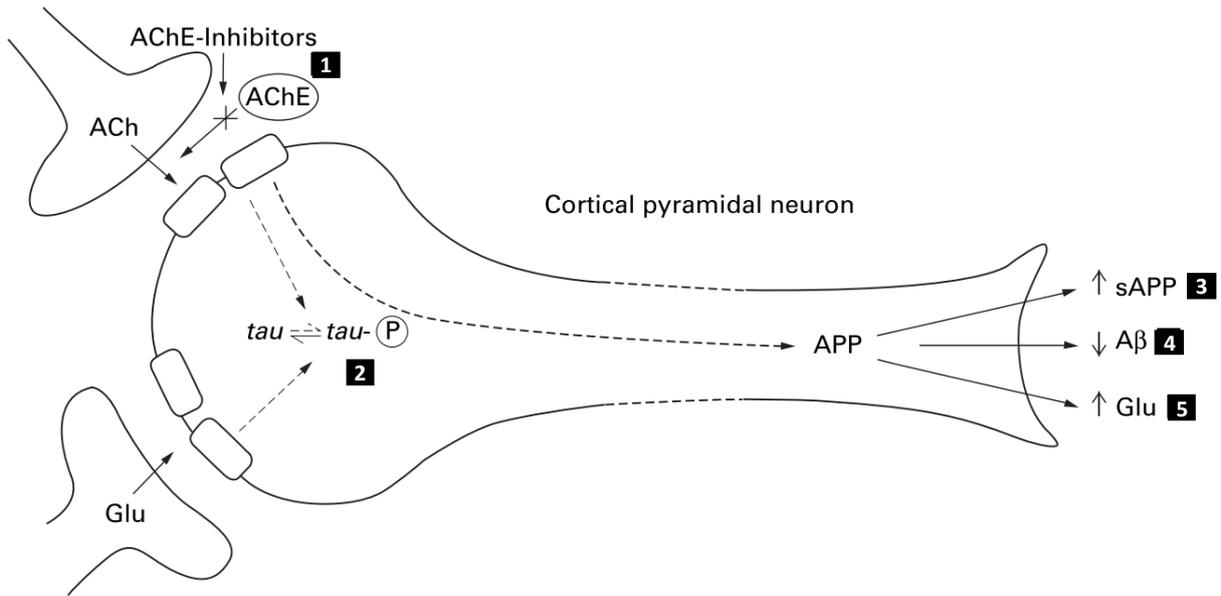


Figure 12. Représentation d'un neurone ayant des altérations dans la maladie d'Alzheimer. (1) Les inhibiteurs d'AChE réduisent la dégradation de l'ACh libérée, ce qui entraîne une plus grande activation des récepteurs ACh post-synaptiques ayant pour conséquences supposées : (2) réduction de la phosphorylation de tau ; (3) la sécrétion de sAPPα revenue à la normale ; (4) production réduite de Aβ ; (5) la neurotransmission glutamatergique retourne à la normale, probablement en raison de l'activation des récepteurs muscariniques et nicotiniques.⁴⁷

1.4.1. Inhibition réversible/pseudo-irréversible

Les inhibiteurs réversibles vont inhiber l'enzyme de façon rapide, en interagissant sans former de liaisons covalentes. De manière simple une réaction enzymatique se schématise par l'équation suivante, avec l'enzyme E, le substrat S et le produit P, k représentant les constantes de vitesses à chaque étape. (Schéma 2) :



Schéma 2. Equation d'Inhibition réversible

Après une démonstration mathématique non développée ici, nous obtenons l'équation de Michaelis-Menten représentant la vitesse de la réaction enzymatique (Figure 13) :

$$v_0 = v_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Avec v_0 la vitesse initiale de la réaction, v_{max} la vitesse maximale, $[S]$ la concentration en substrat et K_m la constante de Michaelis correspondant à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale V_{max} avec

$$v_{max} = k_2 [ES] \quad (2)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3)$$

Pour pousser plus loin le calcul mathématique, les biologistes utilisent la représentation de Lineweaver-Burk. Cette représentation dite aussi représentation en double inverse, permet de caractériser de façon mathématique le type d'inhibition : compétitif, incompétitif, non compétitif et mixte, que nous allons maintenant détailler :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (4)$$

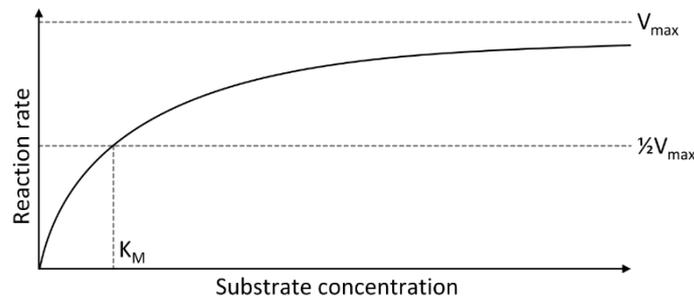


Figure 13. Représentation de la loi de Michaelis-Menten, montrant la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale en substrat [S].

1.4.1.1. Inhibition non-compétitive

Un inhibiteur non compétitif est un inhibiteur se fixant sur un autre site que le site actif de l'enzyme. Il n'est pas en compétition avec le substrat et est donc non-compétitif. Il peut se lier à l'enzyme aussi bien quand son site actif est libre que lorsqu'il est occupé. Il n'empêche pas la formation du complexe enzyme-substrat, mais empêche ce dernier de conduire à la formation des produits de réaction. Classiquement les inhibiteurs non-compétitifs de l'AChE se fixent dans le PAS, comme l'iodure de propidium (Schéma 3).⁶³

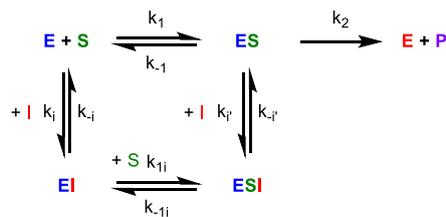


Schéma 3. Inhibition non-compétitive.

La vitesse de réaction se caractérise par une modification de v_{max} sans modifier K_m (Figure 14).

⁶³ Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guénard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (47), 15405–15411.

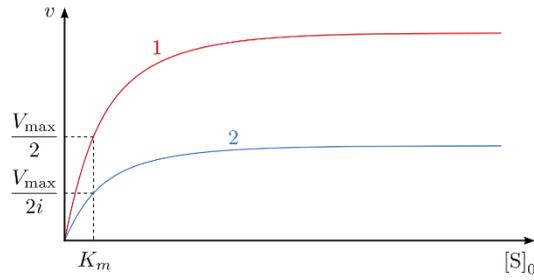


Figure 14. Représentation de Michaelis-Menten d'un inhibiteur non-compétitif. Courbe 1 : pas d'inhibiteur ; courbe 2 : inhibiteur.

L'étude cinétique à différentes concentrations en inhibiteur permet de tracer des droites suivant la représentation de Lineweaver-Burk. Ces inhibiteurs se caractérisent par l'intersection des différentes courbes qui se trouve sur l'axe des abscisses (Figure 15).

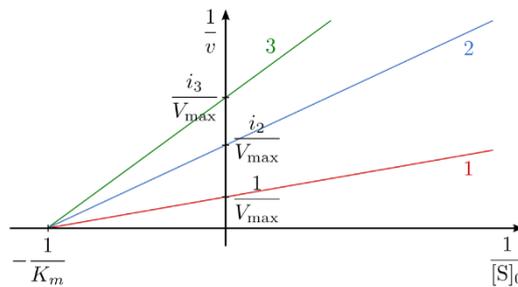


Figure 15. Représentation de Lineweaver-Burk d'un inhibiteur non-compétitif. Courbe 1 : pas d'inhibiteur ; courbe 2 et 3 : inhibiteur à 2 concentrations différentes.

1.4.1.2. Inhibition compétitive

Un inhibiteur compétitif est un inhibiteur se fixant sur le site actif de l'enzyme à la place du substrat. Il peut agir de manière irréversible (comme les organosphates pour l'acétylcholinestérase) ou pseudo-irréversible (carbamates) (Schéma 4) ou réversible (galantamine).^{49,64}

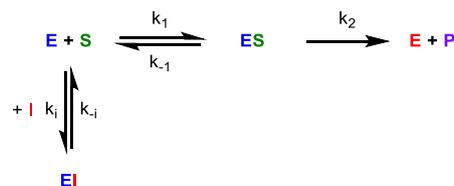


Schéma 4. Inhibition compétitive.

La vitesse de réaction se caractérise par une modification de K_m sans modifier v_{max} (Figure 16).

⁶⁴ Fukuto, T. R. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245–254.

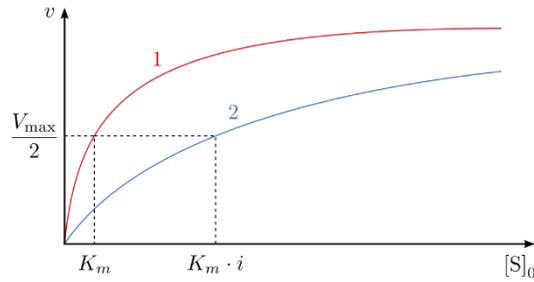


Figure 16. Représentation de Michaelis-Menten d'un inhibiteur compétitif. Courbe 1 : pas d'inhibiteur ; courbe 2 : inhibiteur.

Par la représentation de Lineweaver-Burk, le point d'intersection des différentes droites se trouve être l'axe des ordonnées (Figure 17).

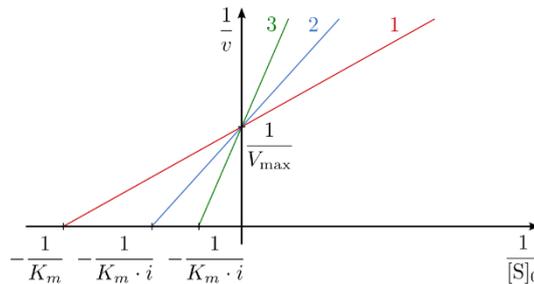


Figure 17. Représentation de Lineweaver-Burk d'un inhibiteur compétitif. Courbe 1 : pas d'inhibiteur ; courbe 2 et 3 : inhibiteur à 2 concentrations différentes.

1.4.1.3. Inhibition mixte

Dans le cas où l'inhibiteur peut se lier à la fois à l'enzyme libre et au complexe enzyme-substrat, et se comportant à la fois comme un inhibiteur compétitif et non-compétitif, le composé est dit inhibiteur mixte. Dans ce cas de figure, lors de la représentation en double inverse, les droites de régression se rejoindront avant ou après l'axe des ordonnées (Figure 18). Ceci est le cas de du donépézil et de la tacrine.^{65,66}

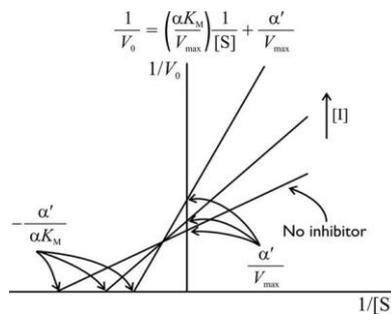


Figure 18. Représentation de Lineweaver-Burk d'un inhibiteur mixte.

1.4.1.4. Inhibition incompétitive

Cette inhibition est caractérisée par une inhibition du complexe enzyme/substrat. Dans ce cas de figure les deux paramètres sont modifiés par le même facteur. En effet, ce type d'inhibiteur favorise la

⁶⁵ Nochi, S.; Asakawa, N.; Sato, T. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18* (8), 1145–1147.

⁶⁶ Catalán, R. E.; Martínez, A. M.; Aragonés, M. D.; Miguel, B. G.; Hernández, F.; Cruz, E. *Life Sci.* **1993**, *53* (14), 1165–1172.

2. Stratégies médicamenteuses – approche classique

2.1. Traitements actuels

Actuellement 4 traitements sont commercialisés contre la MA : 3 inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et 1 antagoniste des récepteurs NMDA.

2.1.1. Inhibiteurs réversibles

Deux inhibiteurs réversibles possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM). Il s'agit du donépézil et de la galantamine. La tacrine,⁷⁰ (Cognex[®]) anciennement commercialisée, a été retirée du marché en 2013 pour causes d'effets secondaires hépatiques graves,⁷¹ couplés à une faible efficacité clinique.⁷² Le donépézil (Aricept[®]) est l'inhibiteur de référence pour le traitement symptomatique de la MA.⁷³ La galantamine (Reminyl[®]) est l'inhibiteur le plus récemment mis sur le marché (Figure 21).⁷⁴

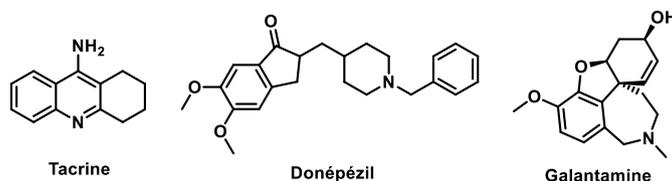


Figure 21. Structure des inhibiteurs compétitifs de l'AChE.

Ces molécules sont utilisées dans le traitement des formes légères à modérément sévères, avec une faible efficacité. Le traitement est uniquement symptomatique. L'AChE étant une enzyme aussi périphérique, de nombreux effets secondaires peuvent apparaître régulièrement comme des diarrhées, nausées, vomissements, mais aussi des problèmes cardiaques avec un effet vagotonique, bradycardie ou autre.^{75,76}

Le donépézil est un ligand de l'AChE, inhibiteur non-covalent, compétitif mixte ayant deux sites d'interactions différentes :^{65,77}

- Site périphérique anionique PAS : interaction par π -stacking entre l'indane et Trp279.

⁷⁰ <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=13597&info=CLASS> (accessed Jul 15, 2019).

⁷¹ Hammel, P.; Larrey, D.; Bernuau, J.; Kalafat, M.; Fréneaux, E.; Babany, G.; Degott, C.; Feldmann, G.; Pessayre, D.; Benhamou, J. P. *J. Clin. Gastroenterol.* **1990**, *12* (3), 329–331.

⁷² Qizilbash, N.; Birks, J.; López Arrieta, J.; Lewington, S.; Szeto, S. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1999**, *272* (24), 1897. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000202>.

⁷³ <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=10996&info=CLASS> (accessed Jul 15, 2019).

⁷⁴ Tsopeles, N. D.; Marin, D. B. Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease. In *Functional Neurobiology of Aging*; Elsevier, 2001; pp 475–486. <https://doi.org/10.1016/B978-012351830-9/50034-2>.

⁷⁵ Hansen, R. A.; Gartlehner, G.; Webb, A. P.; Morgan, L. C.; Moore, C. G.; Jonas, D. E. *Clin. Interv. Aging* **2008**, *3* (2), 211–225.

⁷⁶ Khoury, R.; Rajamanickam, J.; Grossberg, G. T. *Ther. Adv. Drug Saf.* **2018**, *9* (3), 171–178.

⁷⁷ Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 10282–10286.

- Site anionique catalytique : interaction π -cationique entre N de la pipéridine et Phe300, ainsi que l'interaction π -stacking entre le benzyle et Trp84.

Cette substance active est 1000 fois plus sélective vis-à-vis de l'AChE que de la BuChE.⁷⁸

La galantamine est elle un inhibiteur compétitif, non-covalent, actif dans le site actif catalytique par des interactions avec His400 et une interaction de π -stacking entre la liaison double du cyclohexène et Trp84. De plus la galantamine présente l'avantage de potentialiser l'action de l'ACh sur les récepteurs nicotiques nAChR. Il s'agit d'un modulateur allostérique positif de ce récepteur.⁷⁹

Leurs activités sont mesurées par la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) qui est de l'ordre du nanomolaire. Le donépézil est la molécule de référence et de comparaison pour la plupart des tests biologiques *in vitro* et *in vivo*.

2.1.2. Inhibiteur pseudo-irréversible de l'AChE : la rivastigmine

La rivastigmine est un inhibiteur mixte et pseudo-irréversible de l'AChE et de la BuChE. Il se lie de manière covalente au site actif, grâce à sa fonction carbamate, mimant l'ester de l'ACh (Figure 22).⁸⁰

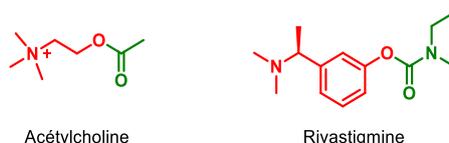


Figure 22. Analogie entre l'acétylcholine et la rivastigmine.

La rivastigmine est ionisée au pH physiologique et nous pouvons voir que la distance entre la fonction ester et l'ammonium de l'ACh est quasi-identique avec la distance entre le carbamate et l'amine de la rivastigmine.⁸¹ La distance entre N et O est de 3,73 Å pour l'ACh et de 5,27 Å pour la rivastigmine. La distance N et O=C est de 5,09 Å (ACh) et de 5,19 Å (rivastigmine).

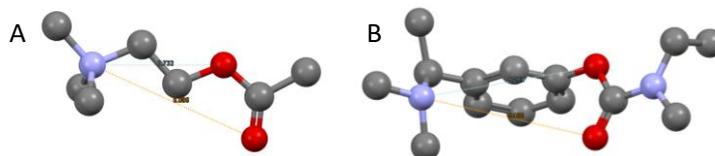


Figure 23. Cristaux de l'ACh (A) et de la rivastigmine (B), tirés de la bibliothèque PubChem.^{82,83}

Le mécanisme d'action de la rivastigmine est identique à celui de l'ACh sauf l'étape de réactivation de l'enzyme. En effet, l'inhibition est dite pseudo-irréversible car le groupement carbamate de la sérine

⁷⁸ Wilkinson, D. G. *Expert Opin. Pharmacother.* **1999**, *1* (1), 121–135.

⁷⁹ Lee, N.-Y.; Kang, Y.-S. *Biomol. Ther.* **2010**, *18* (1), 65–70.

⁸⁰ <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=11413&info=CLASS> (accessed Jul 15, 2019).

⁸¹ Birks, J.; Grimley Evans, J.; Iakovidou, V.; Tsolaki, M.; Holt, F. E. *Cochrane database Syst. Rev.* **2009**, *15* (2), CD001191.

⁸² Chemical Components in the PDB : ACh <https://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/ACH> (accessed Sep 23, 2019).

⁸³ PubChem : Rivastigmine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77991> (accessed Sep 23, 2019).

est relativement stable et donc très lente à hydrolyser : 30 à 40 min sont ainsi nécessaires (Figure 24).⁸⁴ Par la suite l'enzyme sera réactivé par une hydrolyse de cette sérine-carbamoylée. A l'inverse du donépézil, la rivastigmine inhibe aussi la butyrylcholinestérase avec une IC_{50} comparable à l'AChE ($IC_{50,AChE(h)} = 4.15 \mu M$ ⁸⁵ et $IC_{50,BuChE(eq)} = 1.60 \mu M$ ⁸⁶).^{87,88}

Lors de cette inhibition, comme nous pouvons le voir sur la Figure 24, nous avons à la suite de l'action de la rivastigmine, la libération d'un dérivé phénolique, qui sera le scaffold de base de nos molécules décrites par la suite.



Figure 24. Mécanisme d'action de la rivastigmine sur AChE(Tc).⁵⁰

2.1.2.1. Groupement carbamate

Un carbamate est un composé organique dérivé de l'acide carbamique. Il s'agit d'un ester substitué de cet acide. Il est porteur d'une fonction $R-NH-COO-R'$. La fonction carbamate est liée aux caractéristiques hybrides d'un amide et d'un ester, et présente une très bonne stabilité chimique et protéolytique, principalement pour les métabolisations dûes aux amino-peptidases, enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments similaires à des peptides. Le rôle émergent du carbamate dans la chimie médicinale est dû à sa stabilité chimique et à sa capacité à imprégner les membranes cellulaires. Ces attributs ont été exploités dans la conception de médicaments. En conséquence, le motif carbamate devient le choix pour les substituts de liaison peptidique. Ils sont aussi employés dans d'autres domaines tels que l'industrie agrochimique (pesticide, insecticide, herbicide et fongicide)⁶⁴ et l'industrie des polymères.

Un point important de cette fonction est représenté par la résonance de l'amide. En effet il y a trois structures de résonance possibles contribuant à la stabilisation du carbamate (Figure 25).⁸⁹

⁸⁴ Bar-On, P. *et al. Biochemistry* **2002**, *41* (11), 3555–3564.

⁸⁵ Yu, Q.-S.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Whittaker, N. F.; Brossi, A.; Greig, N. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (17), 3684–3691.

⁸⁶ Luo, W.; Li, Y.-P.; Tan, J.-H.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (5), 706–711.

⁸⁷ Furukawa-Hibi, Y. *et al. Behav. Brain Res.* **2011**, *225* (1), 222–229.

⁸⁸ Kandiah, N.; Pai, M. C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K. W.; Karanam, A. K.; Christopher, S. *Clin. Interv. Aging* **2017**, *12*, 697–707.

⁸⁹ Kaur, D.; Sharma, P.; Bharatam, P. V. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *757* (1–3), 149–153.

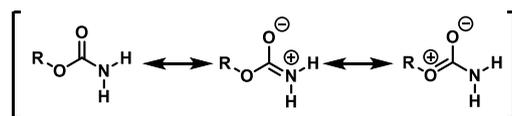


Figure 25. Structures de résonance de la fonction carbamate.

De plus les carbamates se caractérisent par une pseudo double liaison, une déconjugaison potentielle du système hétéroatome (σ -bond) -carbonyl (π -bond) -hétéroatome qui restreint la rotation libre sur la seule liaison σ formelle. Par conséquent, deux isomères, *syn* et *anti*, peuvent coexister (Figure 26).⁹⁰

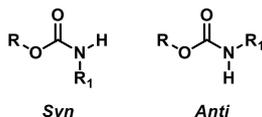


Figure 26. Conformations *syn* et *anti* des carbamates.

D'après certaines études, la conformation *anti* est favorisée par rapport à la conformation *syn* pour des raisons stériques et électrostatiques, avec une énergie de 1,0-1,5 kcal.mol⁻¹.⁹¹ Mais dans la plupart des cas, le ratio d'isomères *syn/anti* est de 50/50. L'équilibre entre ces rotamères est important pour la conformation des molécules.

Plusieurs paramètres peuvent modifier cet équilibre : il s'agit de l'électronégativité de R₁, le solvant, la concentration de produit, la présence ou non de sels et le pH. De plus il peut être perturbé par la présence ou non de liaisons hydrogène intra ou intermoléculaires.⁹²

Des études sur des spectres RMN ¹H ont ainsi montré que l'augmentation de la concentration en carbamate favorisait la conformation *syn*, expliquée par un processus d'agrégation. La diminution de la température est une autre circonstance permettant de stabiliser cette oligomérisation. A l'inverse une augmentation de la température permet de passer de la conformation *syn* à *anti*.⁹³

Ces composés sont utilisés dans le traitement de nombreuses maladies tels que le glaucome, la maladie de Parkinson et la myasthénie grave, et surtout comme inhibiteur de l'AChE dans les pesticides, et en traitement prophylactique de l'empoisonnement aux composés OP. A l'inverse des OP, les carbamates sont considérés comme des inhibiteurs pseudo-irréversibles, car le temps d'inactivation de l'enzyme est de 30 à 40 min.^{49,51} Friedman *et al.* ont montré que dans des conditions de stress, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE ou *Blood Brain Barrier BBB* en anglais) vis-à-vis des carbamates était augmentée.⁹⁴

⁹⁰ Dugave, C.; Demange, L. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (7), 2475–2532.

⁹¹ Moraczewski, A. L.; Banaszynski, L. A.; From, A. M.; White, C. E.; Smith, B. D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (21), 7258–7262.

⁹² Deetz, M. J.; Forbes, C. C.; Jonas, M.; Malerich, J. P.; Smith, B. D.; Wiest, O. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (11), 3949–3952.

⁹³ Marcovici-Mizrahi, D.; Gottlieb, H. E.; Marks, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (24), 8402–8406.

Un dérivé naturel carbamate, la physostigmine (issue de *Physostigma venenosum*) est utilisé comme inhibiteur d'AChE dans le traitement de la myasthénie grave. Cette physostigmine est capable d'empêcher la liaison irréversible des OP à l'AChE, et par conséquent peut être utilisée comme agent de prévention. La particularité de cette fonction la rend donc particulièrement intéressante dans le traitement de cette maladie.⁴⁹

Autre avantage, le groupement carbamate peut être utilisé dans la conception de prodrogues, par sa résistance au premier passage hépatique et sa stabilité à l'hydrolyse (vis-à-vis des estérases) dans le système systémique. Citons par exemple le robixifiban, ou bien évidemment le bambutérol, antiasthmatique, prodrogue de la terbutaline.⁹⁵

2.1.2.2. Inhibiteur covalent et cinétique

Le cinétique des inhibiteurs covalents tels que la rivastigmine est régie selon le Schéma 7 :⁹⁶

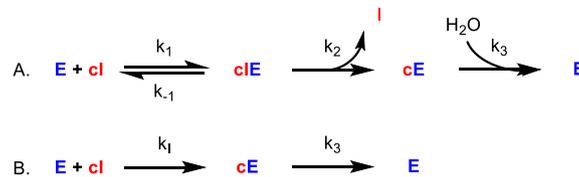


Schéma 7. Inhibition covalente de l'AChE ; A : forme complexe ; B : forme simplifiée.⁹⁶

Pour schématiser, l'inhibiteur (cl) forme avec l'enzyme (E) un complexe réversible clE. Ensuite, le groupement carbamate se fixe sur l'enzyme induisant son inactivation (cE), le groupement partant du carbamate (I) étant libéré dans le milieu. Enfin l'activité est lentement rétablie par de l'eau qui vient hydrolyser la liaison carbamate-enzyme (Schéma 7A). La constante de dissociation est la constante K_D (avec $K_D = k_{-1} / k_1$), la constante k_2 représente la cinétique de carbamoylation de l'enzyme, et la constante k_3 représente la constante de décarbamoylation de l'enzyme. Le Schéma 7B représente la forme simplifiée, la concentration en inhibiteur étant bien souvent inférieure à la constante de dissociation, où la constante d'inhibition k_i est régie par l'équation $k_i = k_2 / K_D$.⁹⁷ Ces différentes constantes sont calculées par différentes formules statistiques suites à une étude de type Lineweaver-Burck.⁸⁴

Ce type de liaison est effectué par des inhibiteurs à groupement carbamate. Une méthode qualitative peu décrire permet de mettre en évidence l'action des inhibiteurs carbamoylé par décarbamoylation en présence d'enzyme. Elle consiste à mettre un inhibiteur en présence d'un excès de cholinestérase,

⁹⁴ Friedman, A.; Kaufer, D.; Shemer, J.; Hendler, I.; Soreq, H.; Tur-Kaspa, I. *Nat. Med.* **1996**, 2 (12), 1382–1385.

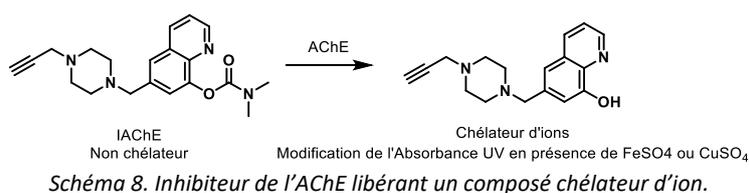
⁹⁵ Ghosh, A. K.; Brindisi, M. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (7), 2895–2940.

⁹⁶ Xiao, Q.; Zhou, H.; Wei, H.; Du, H.; Tan, W.; Zhan, Y.; Pistolozzi, M. *A J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 144, 175–182

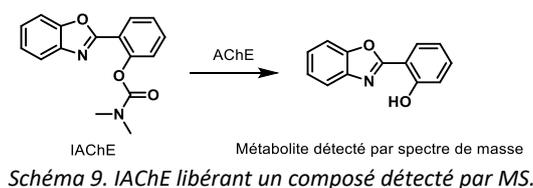
⁹⁷ Wilson, I. B.; Harrison, M. A.; Ginsburg, S. *J. Biol. Chem.* **1961**, 236 (5), 1498–1500

puis de détecter par HPLC et LCMS les différents composés présents en solution. Deux exemples peuvent être cités.

Prenons l'exemple de Zhang *et al.*⁹⁸ Cette équipe a étudié la synthèse de composés inhibiteurs de l'AChE, libérant un métabolite chélateur d'ions. Après mise en incubation de l'inhibiteur en présence d'enzyme, à pH 7,4, le métabolite est extrait par de l'AcOEt, puis son spectre d'absorption UV est mesuré en présence ou non de FeSO₄ et CuSO₄. La variation des spectres a permis de confirmer que le composé présent était bien chélateur d'ions et donc que l'enzyme avait bien décarbamoylé l'inhibiteur (Schéma 8).



Dans un second exemple, Telpoukhovskaia *et al.* mettent en mélange un inhibiteur en présence d'un excès d'enzyme.⁹⁹ Les composés sont ensuite extraits par de l'AcOEt et directement analysés par MS (Schéma 9).



Malheureusement peu de publications décrivent ces deux méthodes et ces dernières possèdent des protocoles expérimentaux très succincts.

Enfin une publication de 1996 de Harel *et al.*, décrit une autre méthode de détermination du mécanisme : la cristallographie par rayon X. Il décrit de manière très précise les interactions vues par rayons X des complexe ACh-AChE(Tc) (*Torpedo californica*) ou d'autres inhibiteurs avec l'AChE.¹⁰⁰ Deux autres publications présentent des cristaux montrant d'une part les interactions entre la rivastigmine et la TcAChE⁸⁴ et d'autre part les interactions entre la rivastigmine et la BuChE(h).¹⁰¹

Des études menées par le Dr Manuela Bartolini se concentrent sur l'utilisation de ChE humaines immobilisées sur des supports solides, augmentant ainsi leur stabilité et permet l'utilisation de réacteurs en flux continu. Ainsi des réacteurs enzymatiques micro-immobilisés peuvent être utilisés en

⁹⁸ Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. J. *Med. Chem.* **2009**, 52 (14), 4095–4098.

⁹⁹ Telpoukhovskaia, M. A.; Patrick, B. O.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Orvig, C. *Mol. Biosyst.* **2013**, 9 (4), 792.

¹⁰⁰ Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (10), 2340–2346.

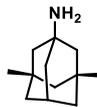
¹⁰¹ Dighe, S. N.; De la Mora, E.; Chan, S.; Kantham, S.; McColl, G.; Miles, J. A.; Veliyath, S. K.; Sreenivas, B. Y.; Nassar, Z. D.; Silman, I.; *et al. Commun. Chem.* **2019**, 2 (1), 35.

combinaison avec les systèmes HPLC, permettant de détecter de nombreuses cinétiques (temps de rétention par exemple).

2.1.3. Antagonistes des récepteurs NMDA

Les patients atteints de la MA présentent un dysfonctionnement de la transmission glutamatergique. Ces récepteurs permettent de réguler la transmission synaptique excitatrice dans le cerveau. Il existe 3 types de récepteurs activés par le glutamate : récepteurs kaïnate, récepteurs AMPA, et les récepteurs *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur du SNC, et permet la transmission rapide de l'information sensorielle et des commandes motrices d'une partie du corps à l'autre et est impliqué dans les processus cognitifs. En raison de dysfonctionnements du métabolisme et des systèmes de transport, les malades montrent une augmentation excessive du glutamate dans les synapses, provoquant une saturation des récepteurs NMDA, conduisant à une augmentation d'ions calcium, de radicaux libres et l'activation de facteurs pro-apoptotiques, conduisant à la mort neuronale.

Ainsi la mémantine a été développée pour réguler cette activité. Elle fonctionne comme un antagoniste voltage-dépendant non compétitif des récepteurs NMDA, et est utilisée dans le traitement symptomatique de la MA des formes modérées à sévères (Figure 27).¹⁰²



Mémantine

Figure 27. Structure de la mémantine.

Cependant, en 2017, la Haute Autorité de la Santé (HAS), a émis un avis défavorable concernant l'utilisation de ces 4 médicaments. Du fait de l'absence de la pertinence clinique des effets symptomatiques de ces médicaments, de l'absence de démonstration d'efficacité sur les troubles du comportement, la qualité de vie, la mortalité, l'évolution de la maladie, la charge de la maladie sur les aidants, de leur profil de tolérance et du risque élevé d'interactions médicamenteuses chez les sujets âgés, il a été considéré que ces médicaments n'avaient plus leur place dans la stratégie thérapeutique, ce qui a conduit à leur déremboursement en 2018.¹⁰³

Du fait de l'absence de traitement curatif, l'inefficacité des traitements symptomatiques et les conséquences humaine et sociale de la MA, la recherche de ligands sur de nouvelles cibles est devenue indispensable.

¹⁰² <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=15101&info=CLASS> (accessed Jul 15, 2019).

¹⁰³ HAS. *Synthèse d'avis de La Commission de La Transparence*; 2017

2.2. Recherche de nouveaux traitements

Au vu du nombre de facteurs impliqués dans la maladie, le nombre de cibles thérapeutiques se révèle important. Actuellement, la majorité des agents thérapeutiques développés ciblent l'activation et l'élimination de la protéine tau et des agrégats β -amyloïdes.

Nous pouvons classer différents mécanismes d'action (qui représentent une partie des cibles possibles) :^{104,105}

- Élimination des agrégats β -amyloïdes : immunothérapie, immunisation active et/ou passive mais aussi attaque de l'efflux des β -amyloïdes
- Diminution de la formation de plaques amyloïdes par des inhibiteurs de sécrétases : inhibiteurs et modulateurs de la γ -sécrétase, β -sécrétase
- Blocage de l'agrégation de la protéine tau, dégradation de la protéine, blocage de l'hyperphosphorylation.

Une tendance actuelle fort intéressante est le repositionnement thérapeutique. Il correspond à un médicament ayant une autorisation pour une maladie A, dont les effets peuvent être utiles pour traiter une maladie B. Nous pouvons citer comme ayant fait l'objet d'un repositionnement :¹⁰⁶

- Aciclovir : utilisé comme antivirus, il permet aussi de réduire la phosphorylation de la protéine tau et la formation de $A\beta$.¹⁰⁷
- Acide valproïque : célèbre antiépileptique, il serait aussi un neuroprotecteur en réduisant la formation des plaques $A\beta$ et diminuerait la production de cytokine pro-inflammatoire.¹⁰⁸
- Valsartan : utilisé comme antihypertenseur, c'est un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine, et plusieurs effets seraient à mettre à son actif. Il est capable de bloquer le récepteur AT1 qui semble être utile pour le déclin cognitif, il inhibe l'inflammation, la vasoconstriction et le dysfonctionnement mitochondrial. En outre il permettrait la libération d'ACh.¹⁰⁹
- Sildénafil : prescrit pour les troubles érectiles ou l'hypertension artérielle pulmonaire, c'est un inhibiteur hautement sélectif de la phosphodiesterase de type 5 (PDE-5) spécifique de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui améliore la vasodilatation médiée par l'oxyde

¹⁰⁴ Godyń, J.; Jończyk, J.; Panek, D.; Malawska, B. *Pharmacol. Reports* **2016**, *68* (1), 127–138.

¹⁰⁵ Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali. *Pharmacol. Reports* **2015**, *67* (2), 195–203.

¹⁰⁶ Durães, F.; Pinto, M.; Sousa, E. *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (2), 44.

¹⁰⁷ Wozniak, M. A.; Itzhaki, R. F. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2010**, *3* (3), 141–152.

¹⁰⁸ Mark, R. J.; Wesson Ashford, J.; Goodman, Y.; Mattson, M. P. *Neurobiol. Aging* **1995**, *16* (2), 187–198.

¹⁰⁹ Wang, J.; Ho, L.; Chen, L.; Zhao, Z.; Zhao, W.; Qian, X.; Humala, N.; Seror, I.; Bartholomew, S.; Rosendorff, C.; et al. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (11), 3393–3402.

nitrique (NO).¹¹⁰ Il a été montré que l'hypoxie et l'ischémie augmentent également l'expression et l'activation de la γ -sécrétase par le biais de multiples mécanismes.¹¹¹ L'utilisation de ce traitement permettrait de diminuer entre autre l'hypoxie et d'inhiber la neuroinflammation.¹¹²

Cummings *et al.* publient régulièrement une revue résumant les essais cliniques concernant la MA.^{113,114} Voici un résumé des essais cliniques du début de l'année 2019 (Figure 28) :¹¹⁵

Actuellement, 132 molécules sont présentes dans 156 études. 73 % des molécules revendiquent des effets curatifs dont 40 % ayant pour cible le système amyloïde et 18 % le système tau. 28 molécules sont en phase 3 d'essais thérapeutiques. Sur ces 28 molécules 61 % ont des effets curatifs, 28 % des effets symptomatiques neuropsychiatriques et 11 % des effets symptomatiques cognitifs. Comme toujours, la cible la plus représentée est le système amyloïde avec 9 molécules. Ces traitements sont composés de petites molécules chimiques ainsi que de biothérapies à base d'anticorps. En 2016, le record de molécules étant approuvées par la FDA pour devenir des médicaments, a été battu. Malheureusement aucune molécule dans le traitement de la maladie d'Alzheimer n'a passé la phase 3 depuis de nombreuses années. Dernier exemple en date, le LTMX, une molécule ciblant la protéine tau, mais dont l'efficacité vis-à-vis du placebo n'a pas été démontrée. Nous pouvons aussi citer le crenezumab, un anticorps fixant les oligomères A β , et bien d'autres encore. Au vu de ces résultats décourageants, le CERMN s'est intéressé depuis de nombreuses années à plusieurs cibles et notamment, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄ et 5-HT₆, que nous allons détailler ci-dessous.

¹¹⁰ Zhang, J.; Guo, J.; Zhao, X.; Chen, Z.; Wang, G.; Liu, A.; Wang, Q.; Zhou, W.; Xu, Y.; Wang, C. *Behav. Brain Res.* **2013**, *250*, 230–237.

¹¹¹ Salminen, A.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. *J. Neurochem.* **2017**, *140* (4), 536–549.

¹¹² Sheng, M.; Lu, H.; Liu, P.; Li, Y.; Ravi, H.; Peng, S. L.; Diaz-Arrastia, R.; Devous, M. D.; Womack, K. B. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *60* (4), 1351–1364.

¹¹³ Cummings, J.; Lee, G.; Mortsdorf, T.; Ritter, A.; Zhong, K. *Alzheimer's Dement. (New York, N. Y.)* **2017**, *3* (3), 367–384.

¹¹⁴ Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Zhong, K. *Alzheimer's Dement. (New York, N. Y.)* **2018**, *4*, 195–214.

¹¹⁵ Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2019**, *5* (1), 272–293.

2019 Alzheimer's Drug Development Pipeline

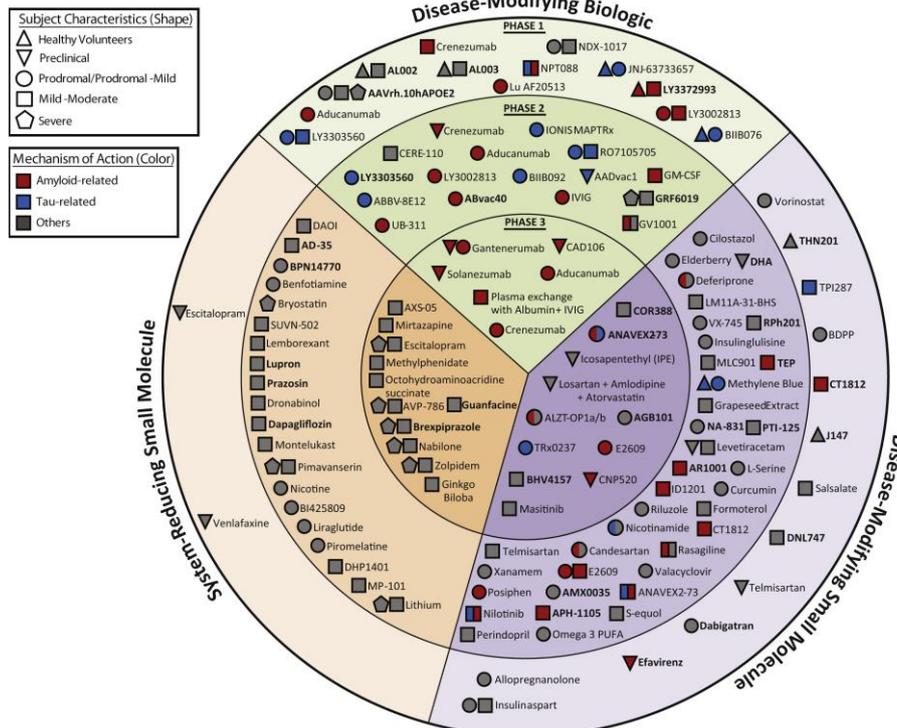


Figure 28. Schéma de J. Cummings illustrant les composés en essais thérapeutique à la date du 12 février 2019.¹¹⁵

3. Récepteurs sérotoninergiques : description et implication dans la maladie d'Alzheimer

3.1. La sérotonine

La sérotonine (5-HT) est une monoamine ayant un rôle de neurotransmetteur et d'autocoïde. Elle a été découverte dans le système périphérique comme ayant des propriétés vasoconstrictrices. Cette monomamine est présente dans tout le système nerveux central, et joue un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques par le biais de 7 types de récepteurs et de 14 sous-types de récepteurs sérotoninergiques, comprenant des récepteurs canaux (ou ionotropes) et des récepteurs couplés à des protéines G (ou métabotropes).¹¹⁶

Cette molécule a un rôle dans le contrôle du cycle sommeil/éveil, de la locomotion, de la thermorégulation, de l'alimentation, de la douleur, de la migraine, de la dépression, de l'homéostasie et de la cognition. La sérotonine est également profondément impliquée dans le contrôle de l'humeur et des émotions, et la plupart des maladies psychiatriques, notamment la dépression et l'anxiété généralisée, sont liées, du moins en partie, à un dysfonctionnement du système sérotoninergique. D'un point de vue périphérique, la 5-HT participe à de nombreux processus physiologiques et

¹¹⁶ Unsworth, C. D.; Molinoff, P. B. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 269 (1), 246–255.

homéostatiques, tels que le péristaltisme gastro-intestinal, la pression artérielle. Elle joue un rôle dans les maladies gastro-intestinales et l'arythmie cardiaque.

La biosynthèse de la sérotonine est effectuée à partir du tryptophane synthétisée dans le cytoplasme (Schéma 10). Elle est ensuite stockée dans les granules par l'intermédiaire de transporteurs vésiculaires VAMT1 et 2. Par la suite, un potentiel d'action va provoquer la libération de la sérotonine par exocytose dans la fente synaptique. Comme n'importe quel autre neurotransmetteur, plusieurs actions peuvent intervenir : elle peut être captée par des récepteurs sérotoninergiques (5-HTR) postsynaptiques et assurer la transduction du signal, être recapturée par des 5-HTR présynaptiques ou par un transporteur SERT (rôle dans le rétrocontrôle négatif) ou être dégradée par la monoamine oxydase MAO et l'aldéhyde déshydrogénase en acide 5-hydroxyindole acétique.

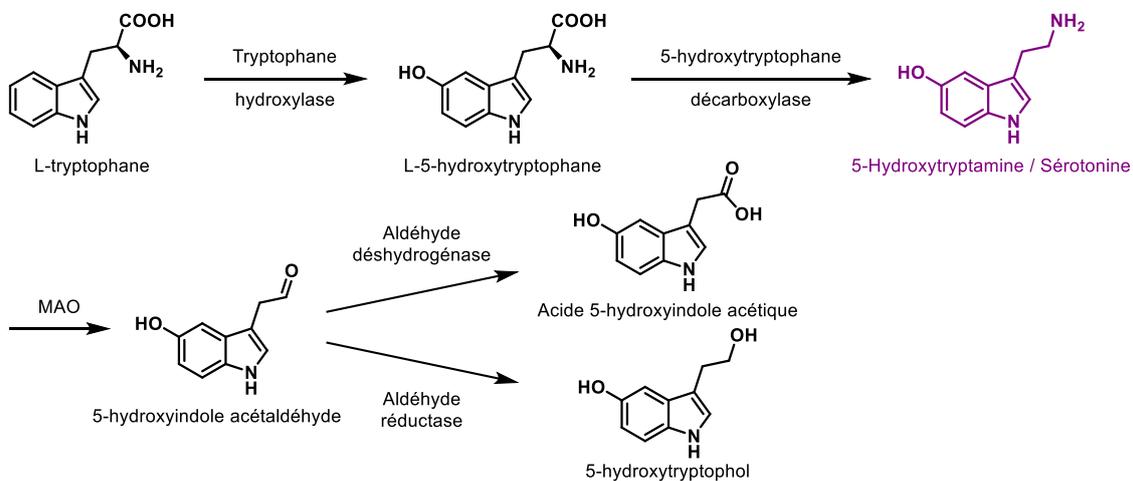


Schéma 10. Biosynthèse et métabolisation de la sérotonine.

Les 7 types de récepteurs sont divisés en 2 familles : les récepteurs inotropes et les récepteurs couplés aux protéines G.

Récepteurs ionotropes, famille des 5-HT₃R

Ce sont des récepteurs protéiques liés à un canal ionique. Sous l'action de la 5-HT, il déclenche une dépolarisation de la cellule après ouverture du canal cationique. L'entrée rapide de Na⁺ et Ca²⁺ dans le neurone permet de provoquer un potentiel d'action postsynaptique excitateur (PPSE) conduisant à la libération d'un autre neurotransmetteur.¹¹⁷

Ces récepteurs sont retrouvés dans le chimoreceptive trigger zone (CTZ), qui déclenche le réflexe nauséux. Ainsi, l'ondansétron, un antagoniste de ces récepteurs est indiqué dans les nausées associées aux chimiothérapies.

¹¹⁷ Lummis, S. C. R. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (48), 40239–40245.

Récepteurs couplés aux protéines G

Tous les récepteurs sérotoninergiques mis à part 5-HT₃ appartiennent à cette famille.

Ce sont des récepteurs heptahélicoïdaux couplés aux protéines G (RCPGs). L'activation de ces récepteurs provoque un changement de conformation du récepteur qui lui permet d'entrer en contact avec une protéine G. Au repos une protéine G comprend 3 sous-unités G α , G β et G γ , avec une molécule de GDP fixée à G α . Lorsque le récepteur est activé, la protéine G est activée par un échange GTP-GDP, déclenchant la dissociation de G α , G β et G γ , et permettant la régulation de différents effecteurs intracellulaires membranaires ou cytosoliques. Puis la GTPase permet le retour au repos par formation de GDP à partir du GTP et l'association de G α à G β et G γ .¹¹⁸

Parmi ces récepteurs, deux ont attiré notre attention : les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆. Ces récepteurs sont des RCPGs, plus particulièrement de la famille des Gs. Cette famille permet l'activation du premier messenger, l'AMPc, à l'inverse des autres récepteurs dont l'action est d'inhiber l'AMPc. Cela va donc permettre d'activer le second messenger, la Protéine Kinase A (PKA), et induire un blocage des canaux potassiques, provoquant une dépolarisation permettant la propagation de l'influx nerveux.¹¹⁹

3.2. 5-HT₄R

Les 5-HT₄R ont été découverts en 1988 par Dumuis *et al.* Ces récepteurs couplés aux protéines G permettent de stimuler les neurotransmissions GABAergique, glutaminergique et cholinergique. Ils sont localisés dans le système périphérique, dans les tractus urinaire et gastro-intestinal ainsi que dans le système cardiovasculaire.¹²⁰

Dans le système nerveux central, les récepteurs 5-HT₄ sont localisés dans le putamen, les noyaux caudés, le globus pallidus et la substance grise. Ces récepteurs ont un rôle dans l'apprentissage cognitif et dans les processus de mémorisation. Il a par ailleurs été démontré une diminution de la densité de ces récepteurs dans des maladies neurodégénératives, comme Alzheimer, principalement au niveau de l'hypothalamus et du cortex frontal.¹²⁰

Par ailleurs, l'activation de ces récepteurs par des agonistes va avoir des effets positifs dans l'évolution de la maladie (Figure 29). Dans un premier temps, ceux-ci vont permettre l'augmentation de la quantité d'ACh présente dans le SNC et ainsi faciliter la transmission de l'information. Ces agonistes peuvent donc avoir un effet synergique s'ils sont associés avec un IChE. Parallèlement à cela cette activation va avoir des conséquences sur la pathologie amyloïde : en effet ce récepteur est impliqué

¹¹⁸ Masson, J.; Emerit, M. B.; Hamon, M.; Darmon, M. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2012**, *1* (6), 685–713.

¹¹⁹ Leung, C.; Wong, Y. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1239.

¹²⁰ Lalut, J.; Karila, D.; Dallemagne, P.; Rochais, C. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (8), 781–795.

dans la modulation du métabolisme de l'APP en favorisant la voie non-amyloïdogénique, en stimulant l' α -sécrétase. Ce mécanisme va engendrer deux effets : la production de sAPP α , peptide ayant des propriétés neuroprotectrices, et diminuer la formation de A β et des plaques amyloïdes.¹²¹ Enfin il permet de diminuer l'astocytose et la microglie cérébrale, et exerce un effet anti-inflammatoire.¹²²

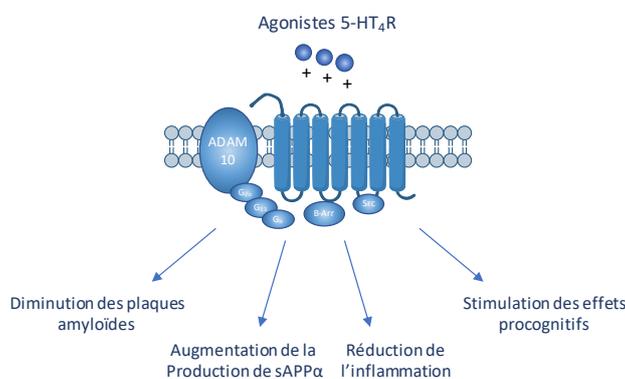


Figure 29. Effets de l'activation des 5-HT₄R.¹²³

En 2008, des membres du CERMN, Bureau *et al.*, ont proposé un pharmacophore des ligands agonistes des 5-HT₄R à partir d'une approche 3D-QSAR.¹²⁴ Ce pharmacophore comprend un motif aromatique, un accepteur de liaison hydrogène et un groupement basique. Plusieurs familles ont été développées comme les benzamides et les dérivés indole carbazimidamide (tegaserod).¹²⁵

Le ligand le plus connu est le composé RS67333, dérivé arylcétone, ayant une grande affinité pour ces récepteurs.¹²⁶ Le problème de ces dérivés est souvent un manque de sélectivité vis-à-vis de ces récepteurs, provoquant des effets secondaires. Ainsi le Tegaserod, prescrit dans le cadre de l'intestin irritable et de la constipation, a dû être retiré du marché.¹²⁷

Le nombre de ligands synthétiques de cette famille ne cesse d'augmenter d'année en année, et nous parlerons plus particulièrement du donécopride et du MR33327 décrits au laboratoire (Figure 30).^{128,129}

¹²¹ Giannoni, P.; Gaven, F.; de Bundel, D.; Baranger, K.; Marchetti-Gauthier, E.; Roman, F. S.; Valjent, E.; Marin, P.; Bockaert, J.; Rivera, S.; *et al. Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5* (DEC), 96.

¹²² Lezoualc'h, F. *Exp. Neurol.* **2007**, *205* (2), 325–329.

¹²³ Claeysen, S.; Bockaert, J.; Giannoni, P. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (7), 940–943.

¹²⁴ Bureau, R.; Varin, T.; Lepailleur, A.; Daveu, C.; Lemaitre, S.; Lancelot, J.-C.; Lesnard, A.; Butt-Gueulle, S.; Dauphin, F.; Rault, S. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **2008**, *4* (3), 199–208.

¹²⁵ Irving, H. R.; Tochon-Danguy, N.; Chinkwo, K. A.; Li, J. G.; Grabbe, C.; Shapiro, M.; Pouton, C. W.; Coupar, I. M. *Pharmacology* **2010**, *85* (4), 224–233.

¹²⁶ Eglen, R. M.; Bonhaus, D. W.; Johnson, L. G.; Leung, E.; Clark, R. D. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *115* (8), 1387–1392.

¹²⁷ Tack, J.; Camilleri, M.; Chang, L.; Chey, W. D.; Galligan, J. J.; Lacy, B. E.; Müller-Lissner, S.; Quigley, E. M. M.; Schuurkes, J.; De Maeyer, J. H.; *et al. Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35* (7), 745–767.

¹²⁸ Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert Freon, A.; *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), E3825–E3830.

¹²⁹ Rochais, C.; Lecoutey, C.; Gaven, F.; Giannoni, P.; Hamidouche, K.; Hedou, D.; Dubost, E.; Genest, D.; Yahiaoui, S.; Freret, T.; *et al. J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 3172–3187.

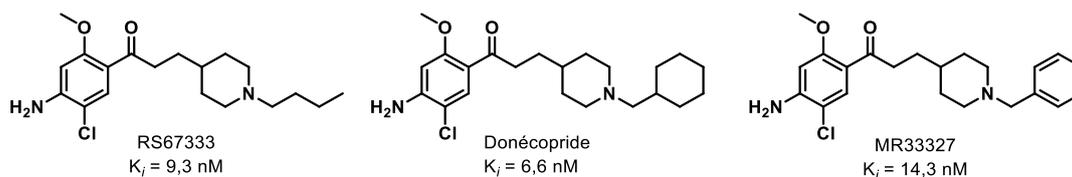


Figure 30. Structure et K_i sur les récepteurs 5-HT₄ de RS67333, donécopride et de MR33327.

3.3. 5-HT₆R

Les récepteurs 5-hydroxytryptamine 6 (5-HT₆) sont impliqués dans l'apprentissage, les processus de mémorisation, les troubles affectifs, l'anxiété, la dépression, l'épilepsie et l'obésité. Ils sont localisés presque exclusivement au niveau cérébral : cortex entorhinal et frontal, hippocampe, striatum, amygdale et noyaux accumbens.¹³⁰

Les 5-HT₆R partagent un mécanisme de signalisation avec les 5-HT₄R et 5-HT₇R, étant tous les trois couplés positivement aux protéines Gs. Ils induisent une production d'AMPC par la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase. L'un des effets principaux de l'activation des 5-HT₆R est la diminution de la transmission cholinergique. A l'inverse, le blocage des récepteurs induit une augmentation de la production d'ACh, stimulant ainsi la transmission cholinergique.

Lors de la MA, il a été démontré que les patients présentent une diminution de la densité de ces récepteurs au niveau du cortex. Ceci serait un mécanisme d'adaptation qui permettrait d'empêcher une chute importante de l'ACh (Figure 31).^{104,131}

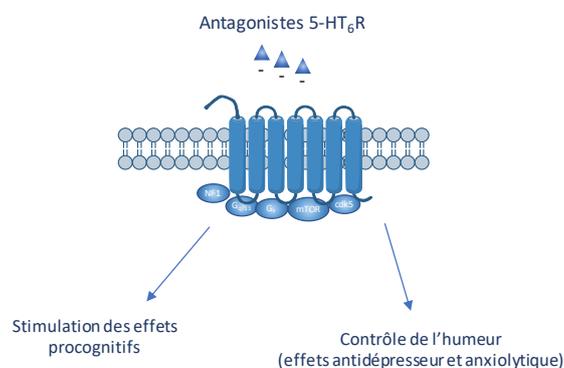


Figure 31. Effets des antagonistes de 5-HT₆R¹²³

Un des pharmacophores des antagonistes des 5-HT₆R comprend un atome ionisable positif (PI), un accepteur de liaison hydrogène (HBA), un site hydrophobe (HYD) et un site aromatique hydrophobe (AR) (Figure 32).¹³²

¹³⁰ Ramírez, M. J. *Alzheimers. Res. Ther.* **2013**, 5 (15), 1–8.

¹³¹ Quiedeville, A.; Boulouard, M.; Hamidouche, K.; Da Silva Costa-Aze, V.; Nee, G.; Rochais, C.; Dallemagne, P.; Fabis, F.; Freret, T.; Bouet, V. *Behav. Brain Res.* **2015**, 293, 10–17.

¹³² Benhamu, B.; Mart, M.; Va, H.; Pardo, L.; Lo, L. Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists for the Treatment of Cognitive De Fi Ciency in Alzheimer's Disease. *J Med Chem* **2014**, 57, 7160–7181



Figure 32. Pharmacophore commun aux antagonistes des 5-HT₆R : PI en bleu, HBA en vert, HYD en Bleu et AR en jaune.¹³²

Des études ont ainsi montré que les agonistes et les antagonistes agissaient sur des localisations neuronales distinctes.^{133,134} L'utilisation d'un agoniste a notamment permis l'activation de la phosphorylation de Fyn, une protéine responsable de la phosphorylation de la protéine tau.¹³⁵ Les ligands antagonistes peuvent représenter de nouvelles options thérapeutiques pour plusieurs types de maladies comme la schizophrénie ou l'obésité.¹³⁶

Comme le récepteur 5-HT₆ est une cible potentielle, de nombreux antagonistes ont été synthétisés et ont en général en commun : une sulfone, un indole, et une amine.

Le RVT-101 (SB-742457) et l'idalopirdine (LU-AE-58054), ont atteint la phase II d'essai clinique (Figure 33). La structure de l'idalopirdine est intéressante car la molécule ne possède pas de sulfone, ce qui est peu commun pour un antagoniste des récepteurs 5-HT₆.¹³⁷

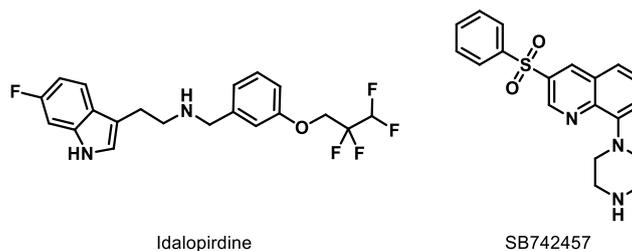


Figure 33. Structures chimiques de l'idalopirdine et SB742457.

L'idalopirdine ayant une constante d'inhibition plus faible que le SB7424757 (K_i de 0.8 nM contre 3.2), et ayant des caractéristiques physico-chimiques adéquates, lui permet d'être un bon candidat médicament.

¹³³ Haass, C.; Mandelkow, E. *Cell* **2010**, *142* (3), 356–358.

¹³⁴ Karila, D.; Freret, T.; Bouet, V.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (20), 7901–7912.

¹³⁵ Fone, K. C. F. *Neuropharmacology* **2008**, *55* (6), 1015–1022.

¹³⁶ Yun, H.; Rhim, H. *Exp. Neurobiol.* **2011**, *20* (4), 159–168.

¹³⁷ Arnt, J.; Bang-Andersen, B.; Grayson, B.; Bymaster, F. P.; Cohen, M. P.; DeLapp, N. W.; Giethlen, B.; Kreilgaard, M.; McKinzie, D. L.; Neill, J. C.; et al. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2010**, *13* (8), 1021–1033.

L'idalopirdine est un antagoniste des 5-HT₆R. Lors de son étude de phase II, l'idalopirdine, mis en association avec le donépézil a montré une diminution de l'anxiété et d'autres symptômes psychiatriques, sans doute dû à une stimulation de la transmission glutaminergique et à une diminution de la signalisation GABAergique.¹³⁸ A l'époque elle présentait aussi un intérêt dans le traitement de la schizophrénie, mais cette indication a été abandonnée. Après 24 semaines de traitement, une amélioration significative de la MA a été observée, entre les deux groupes de patients (échelle ADAS-cog).¹³⁹

L'étude a aussi montré une augmentation de la biodisponibilité du donépézil (10%), car l'idalopirdine est un inhibiteur enzymatique du CYP2D6. Or le donépézil est éliminé en partie sous forme de métabolites issus de l'action des cytochromes de la famille P450, dont le CYP2D6 fait partie.¹⁴⁰ Ceci pourrait surestimer les résultats obtenus. Une étude a aussi montré que l'idalopirdine pouvait être utilisée contre l'obésité et la schizophrénie. Dans le cas de la schizophrénie, une étude de phase II a été menée et terminée en Février 2010, mais les résultats n'ont jamais été publiés. Nous pouvons supposer que cette indication a été abandonnée.^{141,142}

Malheureusement la phase 3 a été abandonnée, le bras patient utilisant l'idalopirdine n'ayant montré aucune amélioration des cognitions après 24 semaines de traitement en comparaison au bras placebo.¹⁴³

L'histoire de l'idalopirdine ne devrait pas finir ici, des études sont actuellement menées en co-administration avec de la rivastigmine dans le traitement de la maladie de Parkinson.¹⁴⁴ D'ailleurs, cette structure a retenu notre attention et servira de scaffold pour la conception de prodrogues libérant un métabolite ligand des récepteurs 5-HT₆R (Chapitre 3.3).

Devant l'inefficacité des traitements actuels, le laboratoire a ainsi développé des molécules possédant une double activité : à la fois agoniste des 5-HT₄R et antagoniste des 5-HT₆R. ce type de médicament est appelé Multi-Target Directed Ligands (MTDL).¹⁴⁵

¹³⁸ Schneider, L. S. *Lancet Neurol.* **2014**, *13* (11), 1063–1065.

¹³⁹ Galimberti, D.; Scarpini, E. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2015**, *24* (7), 981–987.

¹⁴⁰ ARICEPT 5MG CPR - Monographie spécialité
http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=10995&info=CLASS#CLASS_bk2 (accessed Sep 2, 2019).

¹⁴¹ Efficacy Study Exploring the Effect of Lu AE58054 as Augmentation Therapy in Patients With Schizophrenia <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00810667?term=Lu+AE58054&rank=7> (accessed Sep 2, 2019).

¹⁴² Garay, R. P.; Bourin, M.; de Paillette, E.; Samalin, L.; Hameg, A.; Llorca, P.-M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2016**, *25* (2), 159–170.

¹⁴³ Atri, A.; Frölich, L.; Ballard, C.; Tariot, P. N.; Molinuevo, J. L.; Boneva, N.; Windfeld, K.; Raket, L. L.; Cummings, J. L. *JAMA* **2018**, *319* (2), 130.

¹⁴⁴ Koshy Cherian, A.; Kucinski, A.; Wu, R.; de Jong, I. E. M.; Sarter, M. *Psychopharmacology (Berl)*. **2019**, *236* (6), 1701–1715.

¹⁴⁵ Yahiaoui, S.; Hamidouche, K.; Ballandonne, C.; Davis, A.; de Oliveira Santos, J. S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 283–293.

4. Nouvelles stratégies médicamenteuses

Les molécules actuelles n'arrivant pas pour l'instant à avoir un effet suffisant sur la MA et ainsi obtenir une AMM, le développement d'un composé sélectif d'une seule cible spécifique de la MA ne semble pas à ce jour être l'approche la mieux adaptée à la nature complexe de la maladie d'Alzheimer, ayant une origine multifactorielle. Trois approches pharmacologiques semblent offrir des solutions pour prendre en compte cette dernière.

4.1. Multiple-Medication Therapy MMT

Une MMT consiste en un cocktail de deux ou trois médicaments combinant différents mécanismes thérapeutiques. Cependant, cette approche peut être désavantageuse pour les patients présentant des problèmes d'observance. Nous avons pour exemple le traitement de la tuberculose qui consiste en l'administration de 4 médicaments différentes pendant 2 mois puis 2 médicaments pendant 4 mois : isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol, puis isoniazide et rifampicine. En plus des difficultés de compliance, plus le nombre de médicaments augmente plus le risque d'effets indésirables augmente, ainsi que le risque d'interactions médicamenteuses.¹⁴⁶

4.2. Multiple-Compound Medication MMC

Dans cette approche, le médicament est composé de plusieurs substances actives, sous une seule forme pharmaceutique, afin de simplifier les schémas posologiques, améliorant ainsi la compliance du patient. Toujours dans l'exemple de la tuberculose, le Rifater[®] est composé d'isoniazide, de rifampicine et de pyrazinamide. Un médicament de cette sorte existe aux Etats-Unis pour la MA : le Namzarc[®], combinaison de mémantine à libération prolongée et de donépézil.¹⁴⁶

4.3. Multi-Target Directed Ligands MTDL

Depuis les années 90, le concept de base de la recherche de nouveaux médicaments était : « Quelle est la meilleure cible pour le traitement ou la prévention de la maladie ? », se traduisant par : un médicament est dirigé vers une seule cible thérapeutique.¹⁴⁷ Depuis quelques années, une nouvelle approche a été mise en avant : « une molécule peut agir sur plusieurs cibles thérapeutiques ».¹⁴⁸

¹⁴⁶ Morphy, R.; Rankovic, Z. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (21), 6523–6543.

¹⁴⁷ Simone, K.; Dias, T.; Viegas, C. Multi-Target Directed Drugs : A Modern Approach for Design of New Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, *12*, 239–255.

¹⁴⁸ Carreiras, M.; Mendes, E.; Perry, M.; Francisco, A.; Marco-Contelles, J. The Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease for Developing Potential Therapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13* (15), 1745–1770.

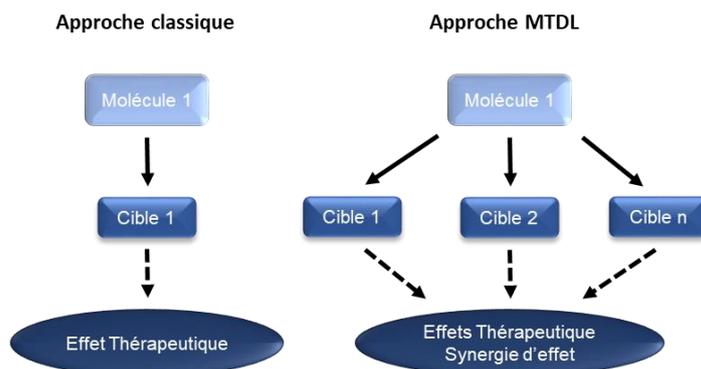


Figure 34. Approche classique et MTDL.¹⁴⁹

L'administration d'une substance active pléiotrope présente de nombreux avantages : bénéfice de la compliance, limitation des effets secondaires, optimisation des propriétés ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination) et baisse du risque d'interactions médicamenteuses. Par ailleurs, pour avoir une efficacité optimale, les activités sur les différentes cibles visées doivent être équivalentes.

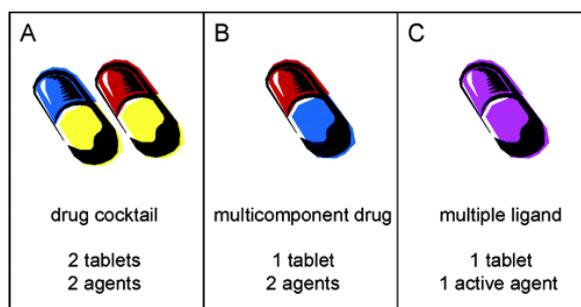


Figure 35. Trois principaux types de médicaments pour une thérapie à plusieurs cibles. A : MMT ; B : MMC ; C : MTDL.¹⁴⁶

Plusieurs stratégies existent pour concevoir des MTDL à partir de deux substances actives :¹⁵⁰

Deux substances actives reliées par un linker : Deux molécules, n'ayant pas spécialement une analogie structurale et respectant chacune le pharmacophore des cibles visées, sont reliées par un linker. Le linker peut être stable, ou peut être clivé par une enzyme (appelé aussi co-drug).¹⁵¹

Fusion de substances actives : Les MTDL sont dit fusionnés lorsque les deux substances actives, sont accolées. Bien que cela confère moins de liberté à chaque fragment de se déplacer dans sa poche de liaison cible, cela limite la taille de la molécule. En comparaison à l'approche par couplage, et cela favorise notamment le passage de la BHE.

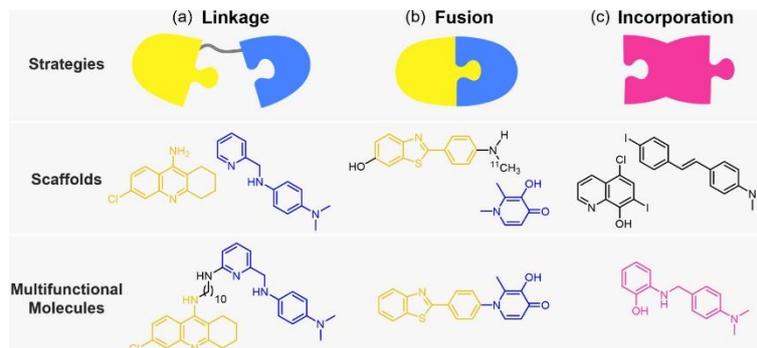
Compromis structural entre substances actives : Lorsque les cibles présentent des points communs, le plus efficace est de créer un compromis structural. Ceci permet d'obtenir des molécules plus petites et plus simples avec un poids moléculaire plus faible. Cette nouvelle entité moléculaire combine les

¹⁴⁹ Bolognesi, M. L.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (3), 303–308.

¹⁵⁰ Savelieff, M. G.; Nam, G.; Kang, J.; Lee, H. J.; Lee, M.; Lim, M. H. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 1221–1322.

¹⁵¹ Das, N.; Dhanawat, M.; Dash, B.; Nagarwal, R. C.; Shrivastava, S. K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41* (5), 571–588.

capacités de ciblage des molécules originales dans une structure chimique plus petite en maintenant les éléments essentiels.



La taille optimale des structures chimiques est censée obéir aux règles de Lipinski, qui prédisent que l'absorption sera probablement plus faible quand :¹⁵²

- Le poids moléculaire MW est supérieur à 500 daltons
- Le nombre de liaisons hydrogène donneur est supérieur à 5
- Le nombre de liaisons hydrogène accepteur est supérieur à 10
- Le coefficient de partage (logP) est supérieur à 5

Les composés qui sont des substrats des transporteurs biologiques sont des exceptions à la règle.

Ce nouveau concept est en plein développement et le nombre de parution d'articles « multitarget » croît de façon exponentielle. En Janvier 2019 dans *Journal of Medicinal Chemistry*, le nombre d'articles contenant le mot clé multitarget était de 265, dont 233 ont été publiés dans les 10 dernières années. Cette tendance est aussi présente dans *ACS Medicinal Chemistry Letters*.¹⁵³

Il est intéressant de noter que les principales stratégies des MTDL dans le cadre de la MA visent l'ACHé, mais d'autres sont actifs sans cette inhibition.¹⁵⁴ Par exemple Prati *et al.* ont développé un MTDL neuroprotecteur, avec de bonnes propriétés pharmacocinétiques, et inhibant à la fois BACE-1 et GSK-3 β , 2 protéines responsables de la cascade physiologique permettant la formation des plaques séniles et de NFTs.¹⁵⁵ De nombreux chélateurs d'ions sont aussi utilisés comme MTDL. Nous en trouvons avec des inhibiteurs de la phosphodiesterase, comme le composé, décrit par Wang *et al.*, qui est dérivé de la fusion du clioquinol (chélateur) et la moracine M (inhibiteur de PDE4D).¹⁵⁶

¹⁵² Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 4–17.

¹⁵³ Bolognesi, M. L. *Harnessing ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (3), 273–275.

¹⁵⁴ Zhang, P.; Xu, S.; Zhu, Z.; Xu, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *176*, 228–247.

¹⁵⁵ Prati, F.; De Simone, A.; Bisignano, P.; Armirotti, A.; Summa, M.; Pizzirani, D.; Scarpelli, R.; Perez, D. I.; Andrisano, V.; Perez-Castillo, A.; *et al.* *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (5), 1578–1582.

¹⁵⁶ Wang, Z.; Wang, Y.; Wang, B.; Li, W.; Huang, L.; Li, X. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8616–8637.

A l'inverse, la majorité des MTDL sont inhibiteurs de l'AChE associés à une grande variabilité de cibles thérapeutiques comme BACE-1,¹⁵⁷ GSK-3 β ,¹⁵⁸ MAOs,¹⁵⁹ chélateurs d'ions métalliques,¹⁶⁰ les récepteurs NMDA,¹⁶¹ ou H₃,¹⁶¹ ainsi que les PDEs.¹⁶²

4.4. Développement des MTDL au CERMN

Le CERMN s'intéresse depuis longtemps aux MTDL dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Les dernières publications concernent principalement différentes cibles. Nous pouvons citer des exemples de MTDL développés au laboratoire :

- IChE agonistes des 5-HT₄R^{128,129,163}
- Agonistes des 5-HT₄R et antagonistes 5-HT₆R¹⁴⁵
- IChE et ligands des récepteur σ_1 ¹⁶⁴
- Agonistes des 5-HT₄R et antioxydants¹⁶⁵
- MTDL ayant la particularité d'avoir une triple activité, IChE, agonistes des 5-HT₄R et antagonistes 5-HT₆R¹⁶⁶

Des travaux préliminaires effectués par le Dr. Thomas Freret, du Laboratoire COMETE, ont permis de montrer qu'une co-administration à des doses sous-actives de RS67333 et de donépézil améliore la mémoire de type épisodique chez la souris (Figure 37 et Figure 38).¹⁶⁷

¹⁵⁷ Viayna, E.; Sola, I.; Bartolini, M.; De Simone, A.; Tapia-Rojas, C.; Serrano, F. G.; Sabaté, R.; Juárez-Jiménez, J.; Pérez, B.; Luque, F. J.; *et al. J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2549–2567.

¹⁵⁸ Sivaprakasam, P.; Han, X.; Civiello, R. L.; Jacutin-Porte, S.; Kish, K.; Pokross, M.; Lewis, H. A.; Ahmed, N.; Szapiel, N.; Newitt, J. A.; *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (9), 1856–1863.

¹⁵⁹ Reis, J.; Cagide, F.; Valencia, M. E.; Teixeira, J.; Bagetta, D.; Pérez, C.; Uriarte, E.; Oliveira, P. J.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 781–800.

¹⁶⁰ Xie, S.-S.; Wang, X.-B.; Li, J.-Y.; Yang, L.; Kong, L.-Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 540–553.

¹⁶¹ Simoni, E.; Daniele, S.; Bottegoni, G.; Pizzirani, D.; Trincavelli, M. L.; Goldoni, L.; Tarozzo, G.; Reggiani, A.; Martini, C.; Piomelli, D.; *et al. J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9708–9721.

¹⁶² Huang, W.; Tang, L.; Shi, Y.; Huang, S.; Xu, L.; Sheng, R.; Wu, P.; Li, J.; Zhou, N.; Hu, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (23), 7158–7167.

¹⁶³ Lecoutey, C.; Rochais, C.; Genest, D.; Butt-Gueulle, S.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Dulin, F.; Lepailleur, A.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Dallemagne, P. *MedChemComm* **2012**, *3* (5), 627.

¹⁶⁴ Lalut, J.; Santoni, G.; Karila, D.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Nachon, F.; Silman, I.; Sussman, J.; Weik, M.; Maurice, T.; *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *162*, 234–248.

¹⁶⁵ Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; Rochais, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**.

¹⁶⁶ Hatat, B.; Yahiaoui, S.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Freret, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 148.

¹⁶⁷ Freret, T.; Bouet, V.; Quiedeville, A.; Nee, G.; Dallemagne, P.; Rochais, C.; Boulouard, M. *Behav. Brain Res.* **2012**, *230* (1), 304–308.

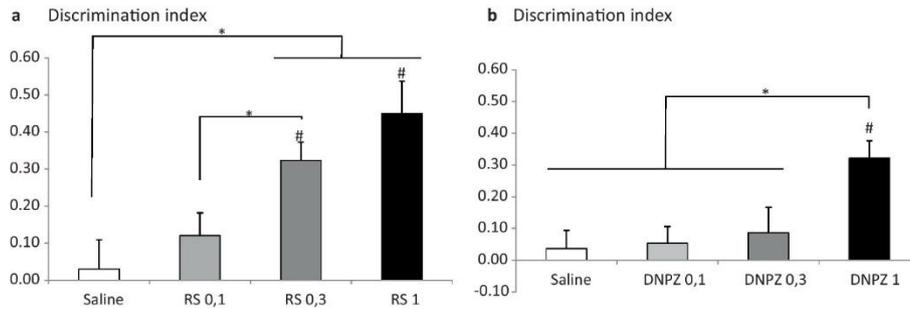


Figure 37. La co-administration de doses sous-actives de RS67333 et de donépézil améliore la mémoire de type épisodique chez la souris, un effet totalement annulé par le GR125487. a. Indice de discrimination dans la tâche de reconnaissance d'objet après la co-administration de RS67333 (0,1 mg / kg; i.p.) et de DNPZ (0,3 mg / kg; s.c.). b. Effet du blocage de la 5-HT4R par le GR125487 (10 mg / kg; i.p.) sur l'effet pro-mésique de la co-administration de RS67333 (0,1 mg / kg; iP) et de DNPZ (0,3 mg / kg; s.c.). (* $p < 0,05$; étudiant – Newman – Keuls, nombre différent de 0; $p < 0,05$; test t univarié.).¹⁶⁷

L'efficacité de cette association sur les souris et l'analogie structurale entre les deux molécules ont conduit les chercheurs du CERMN à préparer de nombreuses molécules sur la base du RS67333, où l'amine de la pipéridine est substituée par divers motifs.

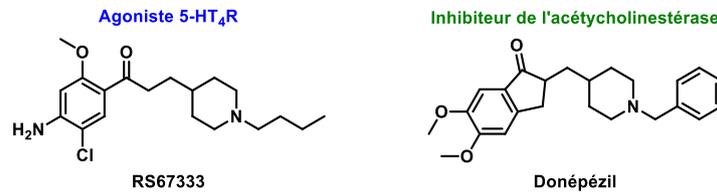


Figure 38. Structures du RS67333 et du donépézil.

La Figure 39 représente le positionnement des molécules en fonction de leur K_i (5-HT₄) et IC_{50} (AChE). Les molécules en haut à droite du schéma possédant la dualité d'effet. Dans cette zone, une molécule a retenu toute l'attention, le donécopride (Figure 30, page 54).

Cette molécule présente toutes les caractéristiques d'un candidat médicament et d'un bon MTDL. Nous pouvons citer entre autre une efficacité équivalente entre le K_i 5-HT₄R (7,1 nM) et l' IC_{50} AChE (16 nM). Toutes les études ont montré qu'il était bien agoniste des 5-HT₄R, inhibiteur non compétitif de l'AChE (prédit par docking et confirmé par Lineweaver-Burk et le test à l'iodure de propidium). Les tests *in vivo* se sont montrés de plus très concluants, avec un rétablissement de la mémoire de travail à des doses de 0,3 à 3 mg. Cette molécule très prometteuse, ayant une double activité induisant une synergie est actuellement en phase pré-clinique (Figure 40).^{128,129}

fonction chimique par exemple) de modifier les caractéristiques physico-chimiques de la substance active. Les prodrogues, par différents mécanismes, libèrent la molécule ayant une activité thérapeutique. La libération peut être induite soit par une réaction enzymatique par hydrolase, estérase, peptidase, phosphatase ou autre, soit par une transformation chimique, par oxydation ou réduction métabolique, par exemple.

Les objectifs des prodrogues peuvent être d'améliorer l'hydrosolubilité, d'améliorer le passage des barrières telle que la BHE, d'améliorer la stabilité métabolique, de prolonger l'activité, de diminuer la toxicité des substances actives ou d'améliorer le ciblage.

Comme le fait remarquer Rautio J., plusieurs facteurs sont à considérer dans le développement structural des prodrogues :¹⁶⁹

- Quels groupes fonctionnels du médicament parent sont susceptibles d'être modifiés ?
- Les modifications chimiques apportées au médicament doivent être réversibles et permettre au promédicament de se transformer en médicament actif par une réaction chimique et / ou enzymatique *in vivo*.
- Le profragment ne devra pas être toxique et doit rapidement être excrété du corps.
- Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME) du médicament parent et du promédicament doivent être connues.
- Les possibles dégradations des sous-produits peuvent affecter à la fois la stabilité chimique et physique qui conduit à la formation de nouveaux produits de dégradation.

Les prodrogues peuvent être classifiées de plusieurs façons : une classification basée sur les catégories thérapeutiques (par exemple les prodrogues anticancéreuses, les prodrogues antibiotiques...), une autre basée sur les catégories fonctionnelles en utilisant des approches stratégiques pour contourner les déficits du médicament actif (amélioration de l'absorption, réduction des effets indésirables...). Une autre les classes suivant les fonctions chimiques qui les attachent à la substance active (esters, acides aminés, antigènes...). Enfin une dernière classification beaucoup plus récente les classes suivant leur site de conversion (intracellulaire ou extracellulaire).¹⁷⁰

Il existe aussi 3 types de prodrogues particulières : les bioprécurseurs, les co-drogues et les soft-drogues. Un bioprécurseur est une prodrogue qui est activée, non pas par clivage mais par une modification chimique comme une oxydation ou une réduction. Cela génère un nouveau composé susceptible d'être transformé métaboliquement ou chimiquement, le composé obtenu étant l'agent

¹⁶⁹ Rautio, J. *Prodrugs and Targeted Delivery*, Wiley 2010.

¹⁷⁰ Wu, K.-M. *Pharmaceuticals* **2009**, 2 (3), 77–81.

actif.¹⁶⁸ Une co-drogue représente 2 molécules pharmacologiquement actives couplées pour ne former qu'une molécule,¹⁷¹ de sorte que chaque molécule joue le rôle de profragment pour l'autre.¹⁵¹ Celle-ci n'est pas à confondre avec les soft-drogues : médicament actif en tant que tel, conçu pour se transformer en une forme inactive *in vivo* après avoir atteint son effet thérapeutique.¹⁷²

Nous pouvons citer comme prodrogue très connu, le bambutérol. Ce médicament inactif par voie orale, est activé progressivement par des cholinestésaires, pChE et par le CYP450, permettant la libération progressive de terbutaline, un agoniste β_2 , médicament indiqué dans le traitement de l'asthme (Figure 41).^{173,174}

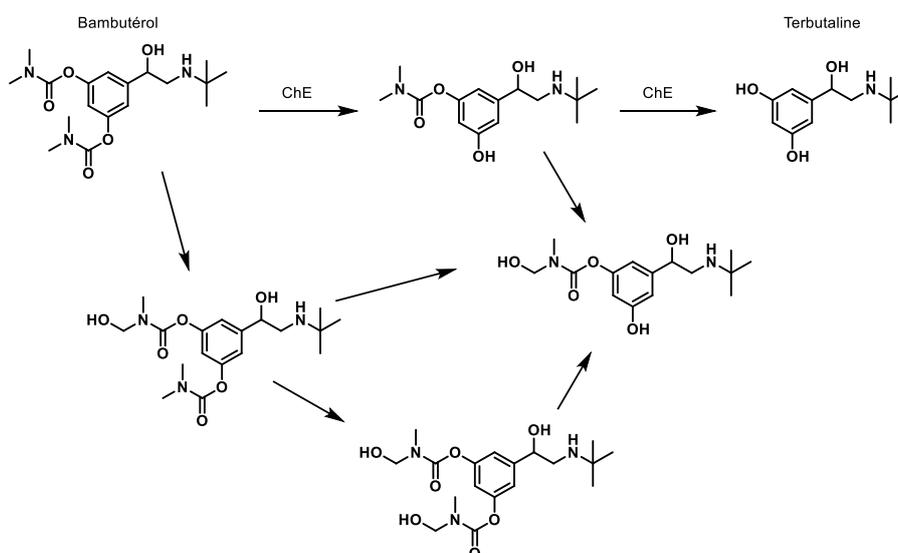


Figure 41. Mécanismes de transformation du bambutérol en terbutaline.^{174,175}

4.5.2. Prodrogues dans la MA

Plusieurs équipes ont ainsi développé des prodrogues dans le traitement de la MA, telles que celles du Dr. Simona Rapposelli et du Dr. Vincent Levacher.

4.5.2.1. Memit

Memit est une molécule synthétisée par l'équipe du Dr. Simona Rapposelli.¹⁷⁶ L'histoire de cette molécule commence par le constat suivant : la MA est caractérisée par une réduction de la production de sulfure d'hydrogène (environ 50%). H₂S est un neuromodulateur et un myorelaxant des muscles lisses. Il est produit de manière endogène à partir des acides aminés, L-cystéine et homocystéine par plusieurs enzymes, telle que la cystathionine β -synthase (CBS).¹⁷⁷ La CBS active la production de H₂S,

¹⁷¹ Leppänen, J.; Huuskonen, J.; Nevalainen, T.; Gynther, J.; Taipale, H.; Järvinen, T. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (6), 1379–1382.

¹⁷² Bodor, N.; Buchwald, P. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20* (1), 58–101.

¹⁷³ Tunek, A.; Svensson, L. A. *Drug Metab. Dispos.* **1988**, *16* (5), 759–764.

¹⁷⁴ Svensson, L. Å.; Tunek, A. *Drug Metab. Rev.* **1988**, *19* (2), 165–194.

¹⁷⁵ Pistolozzi, M.; Du, H.; Wei, H.; Tan, W. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, *43* (3), 344–352.

¹⁷⁶ Sestito, S.; Daniele, S.; Pietrobono, D.; Citi, V.; Bellusci, L.; Chiellini, G.; Calderone, V.; Martini, C.; Rapposelli, S. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 4612.

¹⁷⁷ Zhang, X.; Bian, J.-S. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (10), 876–883.

ayant pour effet de favoriser les réponses régulées par les récepteurs NMDA affectant ainsi la mémoire. Le H₂S aurait aussi un rôle contre le stress oxydant et aurait des effets protecteurs contre les lésions cellulaires induites par l'Aβ en inhibant l'inflammation, en favorisant la croissance cellulaire et en préservant la fonction mitochondriale.¹⁷⁸

Memit est donc constitué à partir de la mémantine, où l'amine a été remplacé par un thiocyanate. Grâce à un mécanisme médié par la L-cystéine (L-Cys), le H₂S est libéré ainsi que la mémantine (Schéma 11).

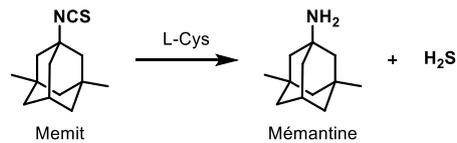


Schéma 11. Mécanisme d'action du memit.¹⁷⁶

Les analyses biologiques ont montré que cette molécule avait les avantages des 2 produits : neuroprotection, réduction de la production de ERO, inhibition de l'aggrégation de Aβ, et d'autres effets.

La concentration de H₂S ainsi que l'interaction avec les récepteurs NMDA de memit ont été mesurés en l'absence ou en présence de L-Cys :

- L-Cys – : le taux de H₂S est quasi indétectable et memit n'a aucune interaction avec le récepteur NMDA
- L-Cys + : le taux de H₂S augmente drastiquement et la memit possède un K_i du même ordre de grandeur que la mémantine sur les récepteurs NMDA (K_i (memit) = 458 nM ; K_i (mémantine) = 329 nM)

Ceci prouve que memit est une molécule inactive, qui à la suite de l'action de L-Cys, libère du sulfure d'hydrogène et de la mémantine. C'est donc une prodrogue libérant 2 molécules actives. Le terme de co-droque ne peut être utilisé ici car memit n'est pas activé par une enzyme. Des études *in vivo* sont en cours pour étudier de manière approfondie les effets synergiques ou cumulatifs.

4.5.2.2. Prodrogue IAChE

L'équipe du Dr. Levacher s'intéresse à la synthèse de composés inhibiteurs de l'AChE dérivés soit de la rivastigmine avec une inhibition covalente, soit du donépézil avec une inhibition non-compétitive. Les principaux effets secondaires de l'inhibition des cholinestérases sont dûs à des interactions dans le système nerveux périphérique. Pour diminuer ces derniers, l'équipe a synthétisé des composés possédant un groupe 1,4-dihydropyridine. Ces composés complètement inactifs ont une très forte

¹⁷⁸ Liu, Y.-Y.; Bian, J.-S. *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *22* (4), 1189–1200.

perméabilité à la BHE. A la suite d'une oxydation dont le mécanisme est actuellement inconnu, la molécule s'oxyde en sel de pyridinium, possédant toutes les caractéristiques des pharmacophores des inhibiteurs covalents¹⁷⁹ ou réversibles¹⁸⁰ suivant la série chimique considérée (Schéma 12). Ces prodrogues ont le terme de prodrogues « bio-oxydables ».¹⁸¹

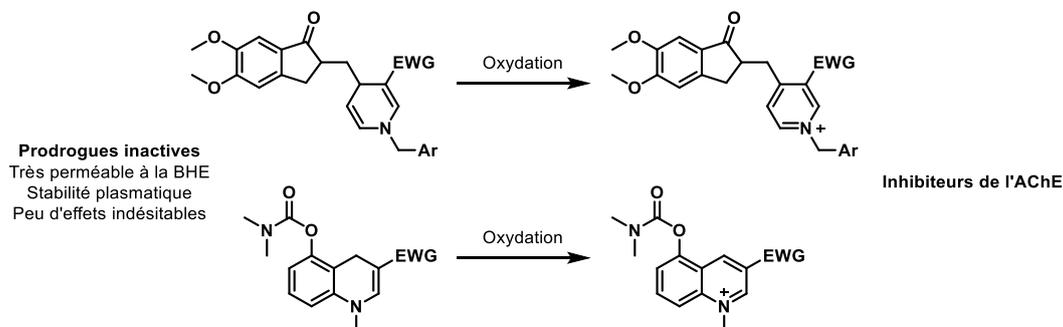


Schéma 12. Prodrogues « bio-oxydable » libérant des inhibiteurs de l'AChE.^{179,181}

A partir des deux premières séries publiées, une troisième série a été développée et basée sur le même principe d'activation de la prodrogue par oxydation (suite au passage de la BHE), la prodrogue activée étant ici un MTDL inhibiteur de l'AChE et inhibiteur de la kinase DYRK1a (Schéma 13).¹⁸²

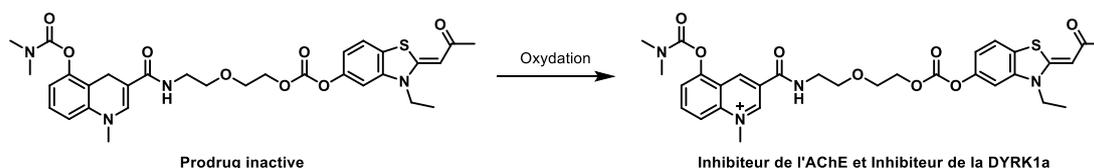


Schéma 13. Prodrogue « bio-oxydable » libérant un double inhibiteur de l'AChE et de la DYRK1a.¹⁸²

Une autre molécule a été synthétisée par cette équipe, et qui s'avère être un inhibiteur covalent de l'AChE comme la rivastigmine (Schéma 14). L'équipe a donc étudié différentes méthodes pour montrer la décarbamoxylation de l'inhibiteur par la sérine, ceci par UV-visible et par RMN. En outre la réactivation de l'enzyme a été mise en évidence par RMN. Une partie de ces études nous sera utile dans la suite de cette thèse.¹⁸³

¹⁷⁹ Bohn, P.; Gourand, F.; Papamicaël, C.; Ibazizène, M.; Dhilly, M.; Gembus, V.; Alix, F.; Tîntas, M.-L.; Marsais, F.; Barré, L.; et al. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (5), 737–744.

¹⁸⁰ Azzouz, R.; Peauger, L.; Gembus, V.; Tîntaş, M.-L.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Papamicaël, C.; Levacher, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 165–190.

¹⁸¹ Peauger, L.; Azzouz, R.; Gembus, V.; Tîntaş, M.-L.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Bohn, P.; Papamicaël, C.; Levacher, V. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5909–5926.

¹⁸² Barré, A.; Azzouz, R.; Gembus, V.; Papamicaël, C.; Levacher, V. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1264.

¹⁸³ Alix, F.; Gembus, V.; Coquet, L.; Hubert-Roux, M.; Chan, P.; Truong, L.; Sebban, M.; Coadou, G.; Oulyadi, H.; Papamicaël, C.; Levacher, V. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 18387–18397.

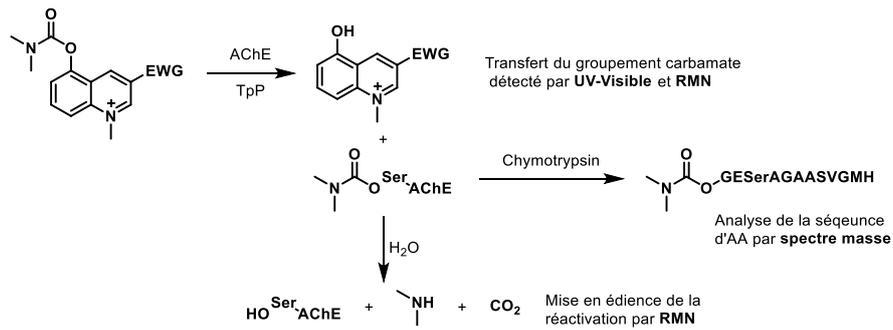


Schéma 14. Différentes analyses effectuées dans la publication de Alix et al.¹⁸³

5. Projet : prodrogues pléiotropes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

5.1. Concept

Une prodrogue pléiotrope, aussi appelée prodrogue multicible est une molécule déjà active sur une cible thérapeutique. Celle-ci, suite à l'action sur une première cible, va subir un clivage, une métabolisation, ou une hydrolyse, permettant de libérer un composé actif sur une seconde cible thérapeutique (Figure 42). Ce mécanisme particulier permet d'avoir les avantages d'une prodrogue (amélioration du passage membranaire, par exemple) et des MTDL (synergie d'effet, diminution des effets secondaires...). D'un point de vu littéraire nous pourrions considérer que ce sont des co-drogues.

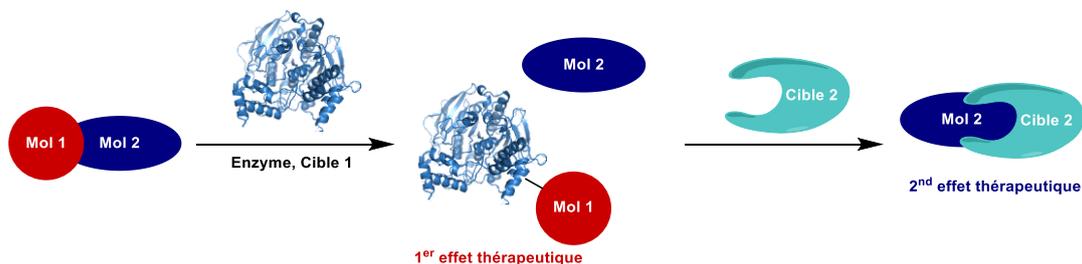


Figure 42. Mécanisme des prodrogues pléiotropes.

5.2. Ladostigil

Le ladostigil (TV3326) a été décrit par Weinstock *et al.* en 2000 et est la première prodrogue pléiotrope décrite ayant des résultats biologiques très prometteurs.¹⁸⁴ Cette molécule est un compromis structural entre la rivastigmine et la rasagiline. La rasagiline est un inhibiteur sélectif irréversible de la monoamine oxydase B (MAO-B), enzyme dégradant spécifiquement la dopamine.¹⁸⁵ Le ladostigil possède donc un indane, un groupement propargylamine (rasagiline) et un groupement carbamate en position 6 (rivastigmine) (Figure 43).

¹⁸⁴ Weinstock, M.; Bejar, C.; Wang, R.-H.; Poltyrev, T.; Gross, A.; Finberg, J. P. M.; Youdim, M. B. H. *Adv. Res. Neurodegener.* **2000**, *13* (60), 157–169.

¹⁸⁵ Kalir, A.; Sabbagh, A.; Youdim, M. B. *J. Pharmacol.* **1981**, *73* (1), 55–64.

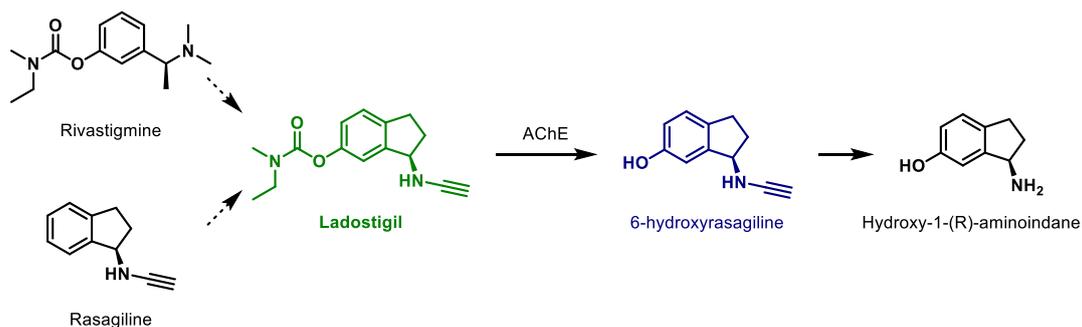


Figure 43. Conception et métabolisation du Ladostigil.¹⁸⁶

Le ladostigil est donc un inhibiteur compétitif covalent de l'AChE, comme la rivastigmine et n'a qu'une faible affinité pour MAO A et B (Tableau 2). A la suite de la métabolisation du ladostigil par l'AChE, le composé libéré, la 6-hydroxyrasagiline, est lui IMAO-A et IMAO-B.¹⁸⁷

Tableau 2. IC_{50} AChE, MAO-A et MAO-B de la rivastigmine, rasagiline, ladostigil et de la 6-hydroxyrasagiline.¹⁸⁸

	IC_{50} (μM)		
	AChE(h)	MAO-A	MAO-B
Rivastigmine	0,92	-	-
Rasagiline	-	0,7	0,014
Ladostigil	52,4	85	120
6-hydroxyrasagiline	-	0,3	0,2

Ce candidat médicament appartenant à Avraham Pharma a été en phase II d'essai clinique pour évaluer son innocuité et son efficacité dans le traitement de la déficience cognitive légère. Les résultats de cette étude ont été publiés en 2016 : l'objectif principal était de déterminer si le ladostigil pouvait retarder ou empêcher la progression de la déficience cognitive légère (de l'anglais *Mild Cognitive Impairment* MCI) pour bloquer la progression vers la maladie d'Alzheimer.

Les premiers résultats des études de phase II avec l'utilisation de ladostigil à faible dose, ne montre pas de différence significative avec le groupe placebo en ce qui concerne le nombre de patients n'ayant pas progressé de la MCI vers la MA.^{189,190}

5.3. Autres exemples

Le ladostigil n'est pas la seule prodrogue pléiotrope décrite dans la littérature. Même si le nom de prodrogue pléiotrope n'est pas directement utilisé, nous pouvons considérer que les molécules

¹⁸⁶ Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. H. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13* (4), 483–494.

¹⁸⁷ Hubálek, F.; Binda, C.; Li, M.; Herzig, Y.; Sterling, J.; Youdim, M. B. H.; Mattevi, A.; Edmondson, D. E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1760–1766.

¹⁸⁸ Sterling, J.; Herzig, Y.; Goren, T.; Finkelstein, N.; Lerner, D.; Goldenberg, W.; Miskolczi, I.; Molnar, S.; Rantal, F.; Tamas, T.; et al. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (24), 5260–5279.

¹⁸⁹ Avraham Pharma - Clinical Data <http://www.avphar.com/ladostigil/clinical-data/> (accessed Jul 23, 2019).

¹⁹⁰ Schneider, L. S.; Geffen, Y.; Rabinowitz, J.; Thomas, R. G.; Schmidt, R.; Ropele, S.; Weinstock, M. Low-Dose Ladostigil for Mild Cognitive Impairment. *Neurology* **2019**.

utilisent le même principe. Par ordre chronologique, nous pouvons nous arrêter sur 4 publications que nous allons brièvement évoquer.

Figure 44A : Zheng *et al.* (2010) décrivent un MTDL basé sur les structures de la rasagiline, de VK28 (un chélateur)¹⁹¹ et de la rivastigmine, permettant d'obtenir le composé HLA20A IChE et prochélateur. L'inhibition de l'AChE permet de libérer le composé HLA20 chélateur de métaux (Fe, Cu et Zn).¹⁹²

Figure 44B : Telpoukhovskaia *et al.* (2013) ont développé une molécule BXc composée d'éléments du thioflavin-T (ThT, ligand permettant de dissocier les agrégats A β),¹⁹³ de clioquinol (CQ, chélateur de métaux),¹⁹⁴ et de rivastigmine. Cette molécule est un IChE libérant HBx qui possède les activités de ThT et de CQ. Autre fait intéressant, le composé HBx est toxique à haute dose, alors que sa prodrogue BXc ne présente pas d'effets secondaires.⁹⁹

Figure 44C : Li *et al.* (2014) ont synthétisé des molécules hybrides de la rivastigmine et de la curcumine,¹⁹⁵ ayant une activité inhibitrice de l'AChE libérant une molécule entre autre inhibitrice de A β et chélateur du cuivre.¹⁹⁶

Figure 44D : Chen *et al.* (2017) ont produit des molécules hybrides entre la rivastigmine et l'acide hydroxycinnamique (ou acide coumarique), ayant les propriétés des prodrogues pléiotropes IChE se métabolisant en molécules MTDL actives sur différentes cibles.¹⁹⁷

A la suite de tous ces exemples, nous allons maintenant dans un nouveau chapitre, expliquer concrètement les objectifs de cette thèse, accompagné de synthèses, d'analyses *in silico*, *in vitro* et *in vivo* de nouvelles prodrogues pléiotropes.

¹⁹¹ Shachar, D. Ben; Kahana, N.; Kampel, V.; Warshawsky, A.; Youdim, M. B. H. *Neuropharmacology* **2004**, *46* (2), 254–263.

¹⁹² Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1* (11), 737–746.

¹⁹³ Biancalana, M.; Koide, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804* (7), 1405–1412.

¹⁹⁴ Rodríguez-Rodríguez, C.; Sánchez de Groot, N.; Rimola, A.; Alvarez-Larena, A.; Lloveras, V.; Vidal-Gancedo, J.; Ventura, S.; Vendrell, J.; Sodupe, M.; González-Duarte, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (4), 1436–1451.

¹⁹⁵ Jourdan, J.-P.; Since, M.; El Kihel, L.; Lecoutey, C.; Corvaisier, S.; Legay, R.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Cresteil, T.; Malzert-Fréon, A.; Rochais, C.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *114*, 365–379.

¹⁹⁶ Li, Y.; Peng, P.; Tang, L.; Hu, Y.; Hu, Y.; Sheng, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (17), 4717–4725.

¹⁹⁷ Chen, Z.; Digiacomo, M.; Tu, Y.; Gu, Q.; Wang, S.; Yang, X.; Chu, J.; Chen, Q.; Han, Y.; Chen, J.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 784–792.

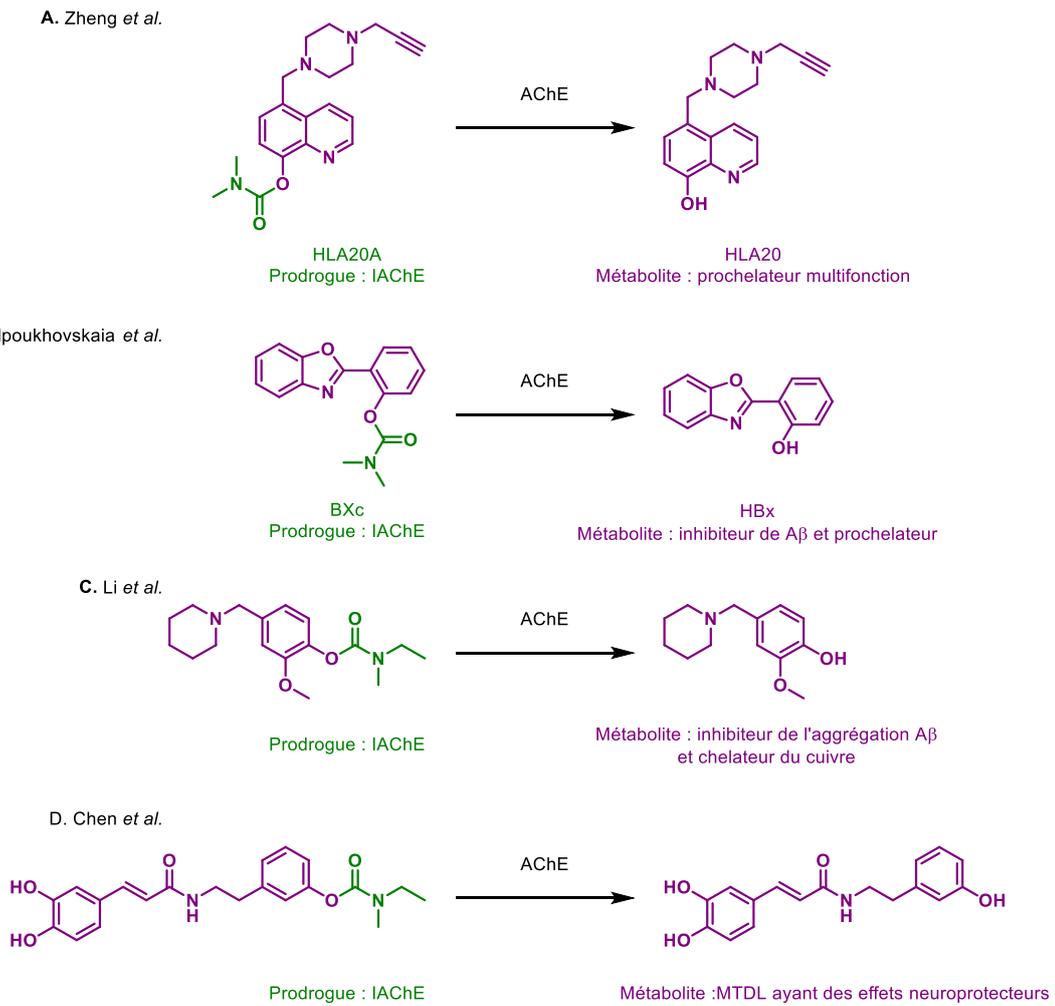


Figure 44. Exemple d'autres prodrogues pléiotropes IChE ; A. Réf. [192] ; B. Réf. [99] ; C. Réf. [196] ; D. Réf. [197].

*Chapitre 3. Développement de prodrogues pléiotropes :
cholinestérases et récepteurs sérotoninergiques*

1. Objectifs et description du concept

Au vu du contexte présenté dans les chapitres précédents, mon projet de thèse vise à concevoir, synthétiser et évaluer biologiquement des prodrogues ayant une double activité d'intérêt thérapeutique dans la MA.

Dans cette thèse, nous allons nous intéresser à des prodrogues qui devront obligatoirement être des inhibiteurs covalents réversibles de l'acétylcholinestérase et/ou de la butyrylcholinestérase, et qui suite à l'action de celle-ci, seront capables de libérer un métabolite actif sur une autre cible thérapeutique (Figure 45B).

Comme nous l'avons décrit précédemment le clivage de la rivastigmine libère un composé phénolique inactif (Figure 45A). Notre projet s'intéressera à la libération, par un mécanisme similaire, d'un métabolite actif sur une autre cible d'intérêt pour une prise en charge thérapeutique de la Maladie d'Alzheimer.

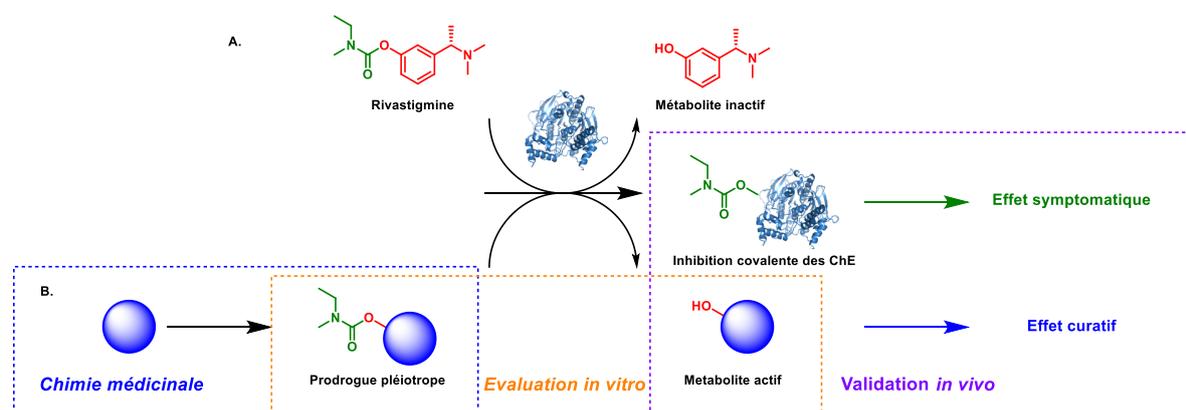


Figure 45. (A) : Mécanisme d'action de la rivastigmine ; (B) : Mécanisme général des prodrogues pléiotropes inhibitrices des cholinestérases.

Afin de conserver l'analogie avec la Rivastigmine, la prodrogue devra contenir un groupement carbamate. Sa reconnaissance par une cholinestérase imposera en outre la présence d'une amine protonable, à distance adéquate du groupement carbamate.

Dans le contexte de l'étude des récepteurs sérotoninergiques, deux molécules ont attiré notre attention : le composé MR33327 (dérivé benzylé du composé RS67333)¹²⁹ et l'idalopirdine,¹³⁹ respectivement agoniste des récepteurs 5-HT₄ et antagoniste des récepteurs 5-HT₆ (Figure 46).

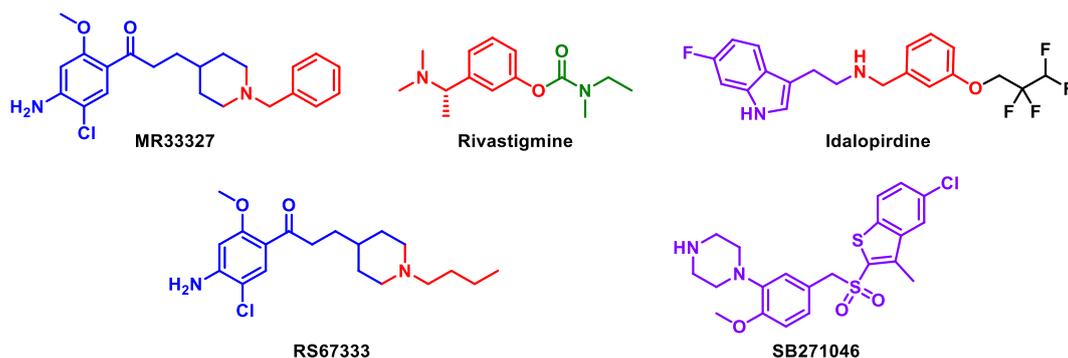


Figure 46. Structure du composé MR33327, de la Rivastigmine et de l'Idalopirdine, des références RS67333 et SB271046.

Ces composés en comparaison avec les références ont de très bonnes constantes d'inhibition (K_i) pour leurs cibles respectives. Pour les 5-HT₄R, le K_i de **MR33327** est de 14,3 nM et celui du **RS67333** est de 5,2 nM.¹²⁹ Pour les 5-HT₆R, l'idalopirdine a un K_i de 0,83 nM et le composé **SB271046** a un K_i de 3,0 nM.¹³⁷

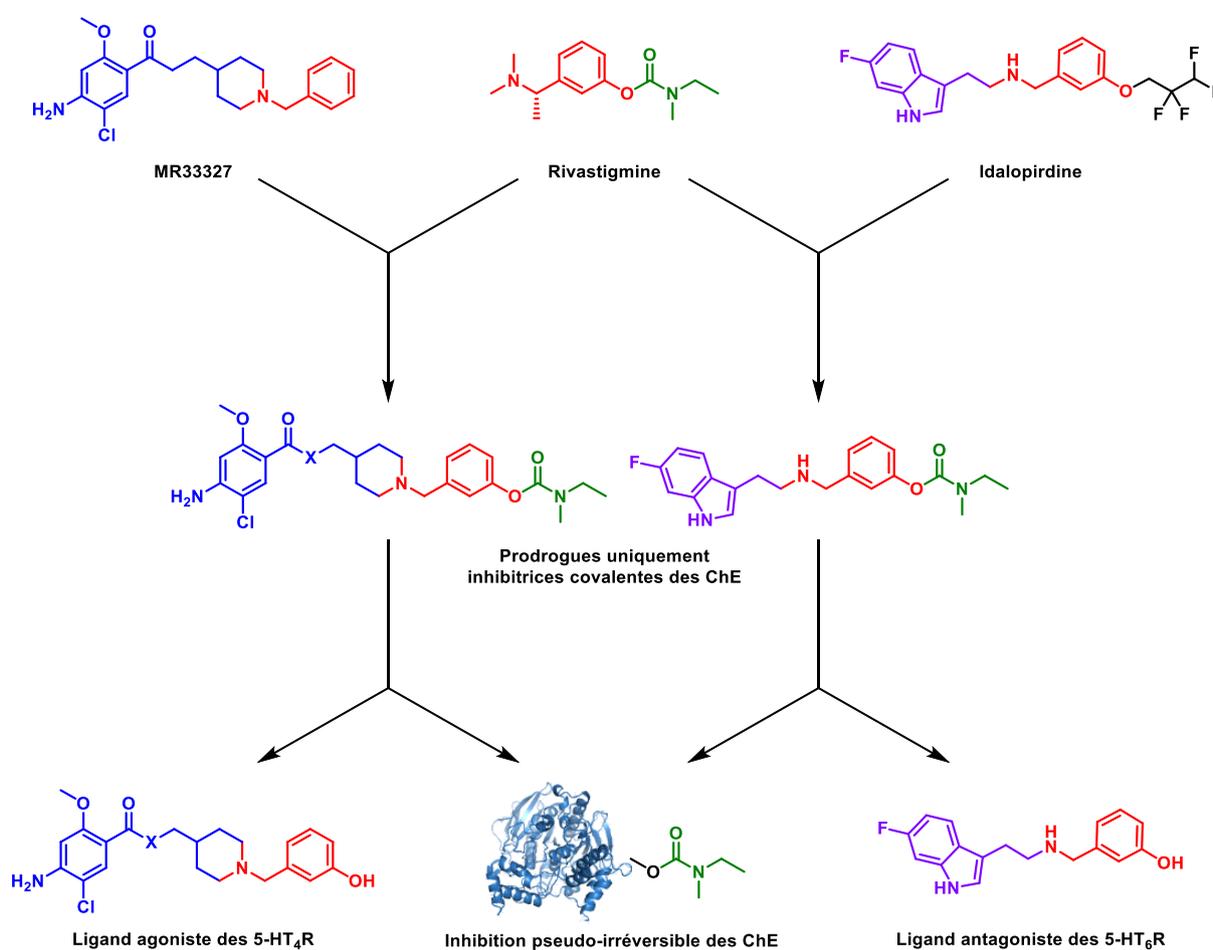


Figure 47. Schéma général explicatif de la première partie de thèse.

Ces composés, forts de leurs excellentes constantes d'inhibition, possèdent une analogie structurale avec la rivastigmine, notamment la présence d'une méthylamine secondaire ou tertiaire fixée sur un cycle phénolique (en rouge).

Nous nous sommes ainsi fixés pour objectif de développer un compromis structural d'une part entre la rivastigmine et le MR33327, et d'autre part entre la rivastigmine et l'idalopirdine.

Ainsi tous ces dérivés carbamoylés ainsi que leurs dérivés phénoliques seront synthétisés (Figure 47).

Mais au-delà de la synthèse de ces composés, il conviendra de vérifier plusieurs choses :

- Pour les composés carbamoylés : tester l'inhibition sur l'AChE et/ou sur la BuChE, la mise au point d'une méthode analytique pour prouver le mécanisme d'action de ces molécules et des études *in silico*.
- Pour les phénols libérés : évaluer l'affinité des composés vis-à-vis des 5-HT₆ des phénols ainsi que leurs profils pharmacologiques.
- Pour les meilleurs composés : des évaluations *in vivo* de toxicité, d'activité locomotrice et de réversion de l'alternance spontanées seront effectués.

2. Développement de prodrogues multi-cibles : inhibitrices de l'AChE et agoniste des récepteurs 5-HT₆

Dans cette partie, nous nous sommes basés sur la structure de l'idalopirdine, un antagoniste des 5-HT₆R, ayant une structure originale et différente du pharmacophore des antagonistes classiques de ces récepteurs. Cette molécule possède par ailleurs un K_i très faible de 0,83 nM.¹³⁷

La pharmacomodulation de ce produit se fera en 1 seul endroit : modification du groupement R. Ainsi seront synthétisés le dérivé carbamoylé et le dérivé phénolique de l'idalopirdine, ainsi que cette dernière qui nous servira de référence pour les différents tests biologiques.

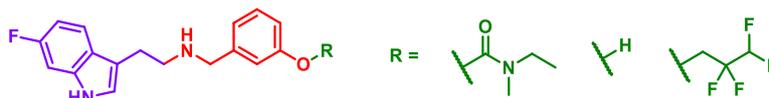


Figure 48. Pharmacomodulations de l'idalopirdine.

Une partie de ma thèse a également consisté à synthétiser le dérivé bromé de l'idalopirdine pour servir de précurseur à la préparation de radioligands utilisés dans l'imagerie TEP et TEMP.

2.1. Accès synthétique

2.1.1. Analyse rétrosynthétique

3 voies ont été testées pour synthétiser ces composés (Schéma 15) :

- Voie A : N-alkylation ; la synthèse consiste à opposer un éthylindole (violet) possédant un groupement partant X, et un dérivé aminé en rouge.
- Voie B : Amination réductrice one-pot entre un alcool primaire (violet) et une amine (rouge)

- Voie C : cette voie consiste à synthétiser un dérivé aminé violet et un aldéhyde en rouge, puis à effectuer une amination réductrice

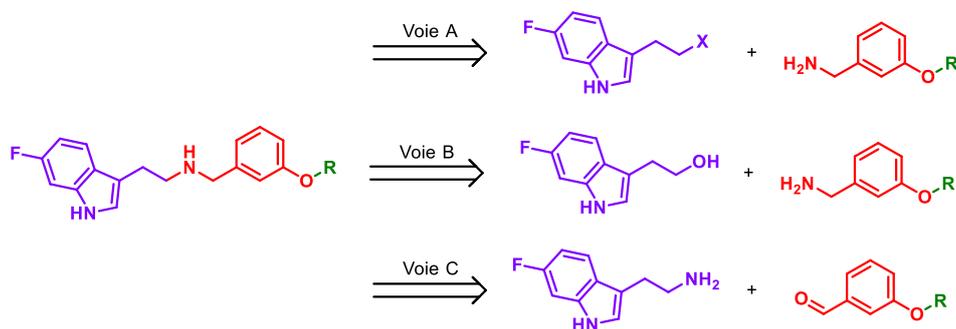


Schéma 15. Analyse rétrosynthétique des dérivés de l'idaloipirdine.

2.1.2. Noyau indole : généralité et fonctionnalisation en position 3

La structure de l'indole, ou benzopyrrole, fut élucidée en 1869 par Adolf von Baeyer, grâce à l'étude de l'indigo, un pigment bleu initialement extrait des feuilles de l'indigotier, un arbuste des régions tropicales d'Asie, d'Afrique et d'Amérique.

Avec la participation du doublet électronique de l'azote endocyclique à l'aromaticité du système, l'indole est un composé à dix électrons π avec plusieurs formes limites, même si les formes mésomères affectant l'aromaticité avec une charge négative sur le phényle restent quasi inexistantes (Figure 49). Une conséquence de la délocalisation du doublet libre est que ce dernier n'est pas disponible pour une protonation dans des conditions modérément acides.

Enfin, le caractère nucléophile marqué de ce noyau rend la position 3 fortement réactive vis-à-vis des électrophiles en raison de la forte densité électronique présente sur cette dernière.

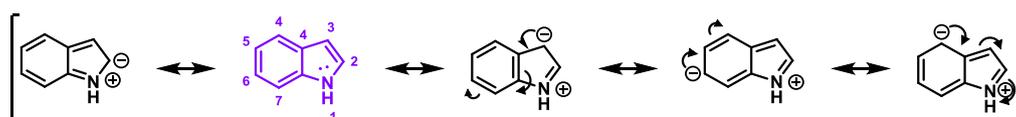


Figure 49. Formes limites du noyau indole.

2.1.3. Voie A

Nous partons d'un composé commercial le 6-fluoroindole. Pour obtenir le 3-(2-bromoéthyl)-6-fluoro-1H-indole **3**, nous devons commencer par former l' α -cétoster **1** (Schéma 16).¹⁹⁸ Cette réaction de SE_{Ar} conduit classiquement à l'attaque électrophile par la position 3, favorisée par rapport à la position 2. Après l'obtention d'un chlorure d'acide, l'ajout d'éthanol permet de former l' α -cétoster **1**.

¹⁹⁸ Demerson, C. A.; Humber, L. G.; Philipp, A. H.; Martel, R. R. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (3), 391–395.

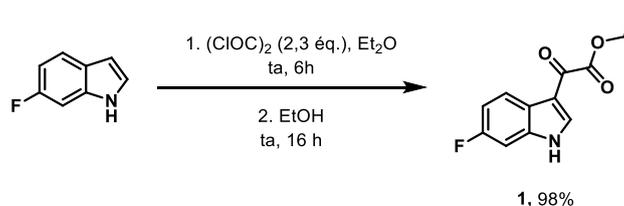


Schéma 16. Formation de l'α-cétoester **1**.

L'α-cétoester **1** est ensuite réduit en alcool primaire **2** par le LiAlH₄. Le produit étant suffisamment propre, il est directement mis en solution dans l'éther en présence de tribromure de phosphore. Après une première étape d'activation de l'alcool, un bromure effectue une substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2), formant ainsi le composé bromé **3**.¹⁹⁹ Le groupe partant PBr₂OH possédant 2 bromes permet de recommencer la réaction, c'est pour cela que nous n'utilisons que 0,33 équivalents de PBr₃ (Schéma 17).

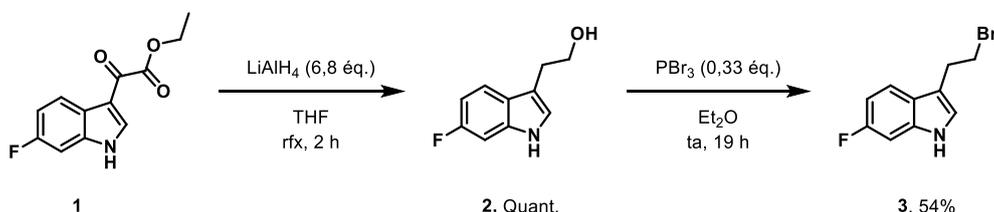


Schéma 17. Formation des composés **2** et **3**.

La dernière étape consiste en une N-alkylation du composé **3**. En présence de carbonate de potassium (K₂CO₃), l'amine du 3-(aminométhyl)phénol (pKa = 9,9) vient attaquer par un mécanisme de S_N2 le composé **3** (Schéma 18). Après purification, nous obtenons le composé **4**, avec un très faible rendement. En effet, la réaction est peu sélective avec compétition entre l'alcool et l'amine car leur pKa sont de même ordre de grandeur. Les autres composés formés n'ont pas été isolés.

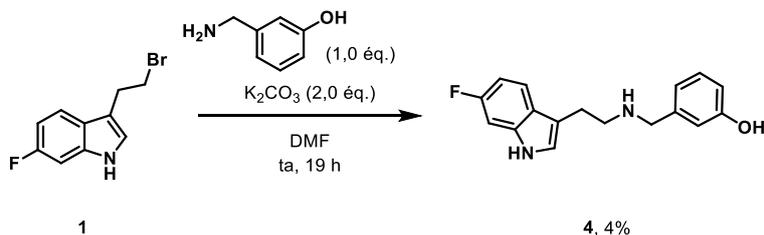


Schéma 18. Formation du produit final **4** par N-alkylation.

¹⁹⁹ Elderfield, R. C.; Fischer, B. A. *J. Org. Chem.* **1958**, *23* (7), 949–953.

2.1.4. Voie B

1.1.1.1. N-alkylation du 3-(aminométhyl)phénol

Pour éviter cette compétition, nous avons testé une autre méthode décrite par Guérin *et al.*²⁰⁰ (Schéma 19). Ils s'appuient sur une réaction d'amination réductrice en 3 étapes :

1. une oxydation de l'alcool **2** par du 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy et du [bis(acétoxy)-iodo]benzène (TEMPO-BAIB),
2. la formation de l'imine
3. une réduction de celle-ci avec du NaBH(OAc)₃.

Nous n'ajoutons pas d'acide acétique car il est formé au cours de la réaction.

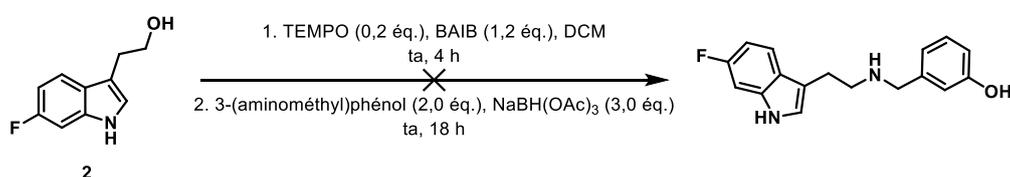


Schéma 19. *N-alkylation one-pot du 3-(aminométhyl)phénol par 2.*

Malheureusement après une nuit, cette réaction s'est montrée inopérante.

1.1.1.2. N-alkylation de la 1-[3-(benzyloxy)phényl]méthanamine

Une protection du dérivé aminé devrait permettre d'effectuer cette réaction particulière de *N*-alkylation. Pour éviter les réactions secondaires, le 3-hydroxybenzonitrile est protégé par un groupement benzyle. Le nitrile est ensuite réduit en amine par du LiAlH₄, pour former le composé **6**. (Schéma 20).

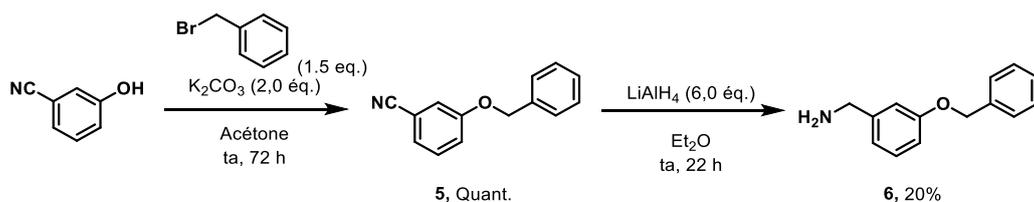


Schéma 20. *N-alkylation one-pot du 3-(aminométhyl)phénol.*

Toujours dans les conditions décrites par Guérin *et al.*, la *N*-alkylation du composé **6** n'a pas fonctionné (Schéma 21).

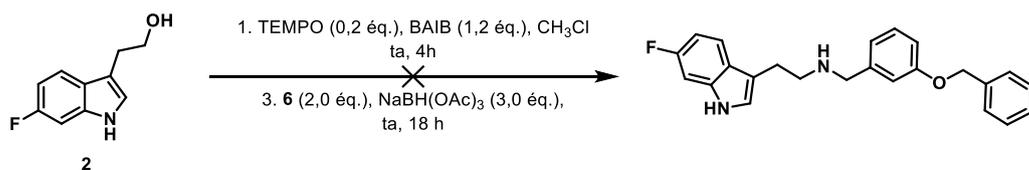


Schéma 21. *N-alkylation one-pot de la 1-[3-(benzyloxy)phényl]méthanamine.*

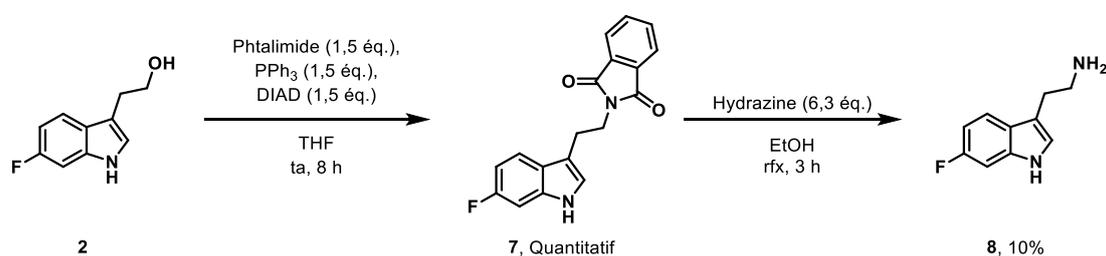
²⁰⁰ Guérin, C.; Bellosta, V.; Guillamot, G.; Cossy, J. *Org. Lett.* **2011**, *13* (13), 3534–3537.

2.1.5. Voie C

Après ces échecs nous avons tenté une autre méthode de synthèse : former le 2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)éthanamine **8** puis effectuer une amination réductrice. Deux méthodes ont été utilisées pour former ce précurseur.

1.1.1.3. 1^{ère} méthode pour synthétiser la 2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)éthanamine

La première consiste à convertir l'alcool **2** en amine primaire, par une réaction de Mitsunobu couplée à la synthèse de Gabriel, décrite par Ślusarska et Zwierzak.²⁰¹ Cette réaction consiste à mélanger **2**, du phthalimide, du DIAD et de la triphénylphosphine (PPh₃) pour former le composé **7**. Le produit est ensuite clivé par une réaction avec de l'hydrazine (Schéma 22).²⁰²



Malheureusement, la dégradation du produit sur la colonne de chromatographie lors de la purification a impacté le rendement, qui est seulement de 10%.

1.1.1.4. 2nd méthode pour synthétiser le 2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)éthanamine

La seconde méthode pour former le composé **8** a été décrite par Muratore et *al.*²⁰³ Elle comprend 3 étapes : une réaction de Vilsmeier-Haack, une réaction de Henry couplée à une déshydratation et une réduction.

La première réaction est une formylation, consistant à installer un aldéhyde en position 3 du fluoroindole, grâce à la réaction de Vilsmeier-Haack. C'est une réaction entre un amide substitué (DMF), le trichlorure de phosphoryle (POCl₃) et un dérivé aromatique. Le DMF et le POCl₃ réagissent pour former le réactif de Vilsmeier (chlorure d'imine), un composé réactif qui va être attaqué par la position 3 de l'indole. La réaction est finalisée par l'ajout d'hydroxyde de potassium (KOH), formant ainsi le composé **9** (Schéma 23).

²⁰¹ Ślusarska, E.; Zwierzak, A. *Liebigs Ann. der Chemie* **1986**, 1986 (2), 402–405.

²⁰² Xu, Y.-C.; Schaus, J. M.; Walker, C.; Krushinski, J.; Adham, N.; Zgombick, J. M.; Liang, S. X.; Kohlman, D. T.; Audia, J. E. *J. Med. Chem.* **1999**, *MR35215* (3), 526–531.

²⁰³ Muratore, M. E.; Holloway, C. A.; Pilling, A. W.; Storer, R. I.; Trevitt, G.; Dixon, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (31), 10796–10797.

La seconde réaction est la transformation du carbaldéhyde **9** en nitroalcène. Elle s'effectue en plusieurs étapes : la formation d'un β -nitroalcool (réaction de Henry ou nitro-aldolisation), puis en chauffant nous provoquons une déshydratation permettant de former le composé **10**.

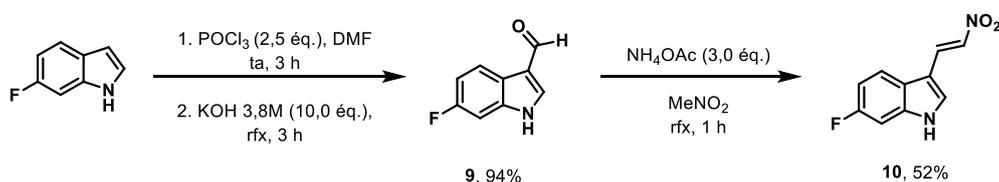


Schéma 23. Réaction de Vilsmeier-Haack et réaction de Henry.

Un produit secondaire non-isolé est apparu lors de cette réaction. En effet, du fait d'un excès de nitrométhane, une double C-alkylation en α de l'indole permet d'obtenir un produit possédant deux groupements nitro (Schéma 24). Celui-ci n'a pas été isolé.

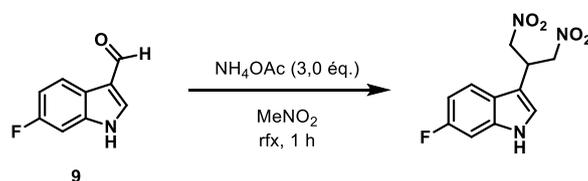


Schéma 24. Produit secondaire de la réaction de Henry.

Enfin le produit est réduit par LiAlH_4 pour obtenir l'amine **8** (Schéma 25).

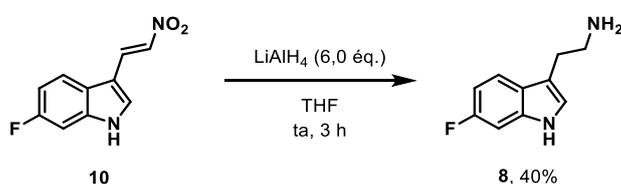


Schéma 25. Réduction du nitro-alcène.

1.1.1.5. Dernière étape : amination réductrice

La dernière réaction est une amination réductrice classique en deux étapes one-pot : en premier la mise en mélange d'un aldéhyde avec une amine, avec quelques gouttes d'acide acétique permettant de former l'imine. Par la suite du NaBH_4 est utilisé pour réduire l'imine en amine.

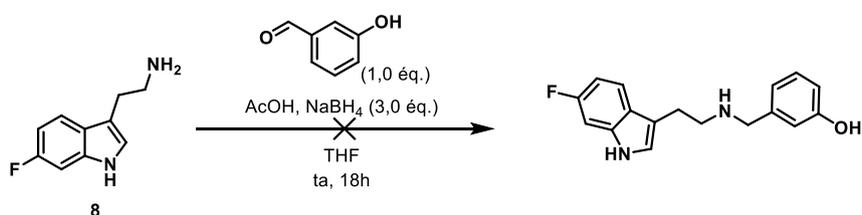


Schéma 26. Amination réductrice entre **8** et le 3-hydroxybenzaldéhyde.

Au bout de 18 h, le produit de départ était toujours présent et la RMN se révéla être inexploitable (Schéma 26). D'après notre hypothèse, nous pensons que le phénol empêcherait la formation de l'hémiaminal. Une protection du phénol par un groupement benzyle est donc nécessaire.

Pour protéger le phénol nous décidons d'utiliser un groupement benzyle, car les réactions de protection/déprotection sont connues et faciles. Nous protégeons donc le 3-hydroxybenzaldéhyde grâce au bromure de benzyle, en présence de base (Schéma 27). Cette réaction est appelée synthèse de Williamson, permet, elle de former un éther à partir d'un alcool et d'un composé halogéné.

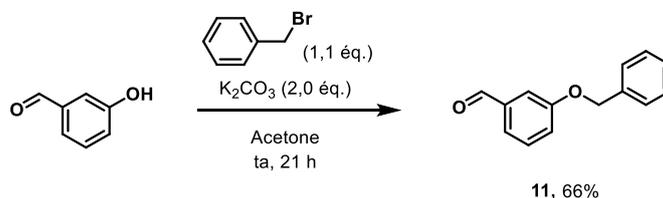


Schéma 27. Protection du 3-hydroxybenzaldéhyde.

Après isolement du composé **11**, nous effectuons une amination réductrice²⁰⁴ avec le composé **8**, dans les mêmes conditions que précédemment, pour obtenir le composé **12** (Schéma 28).

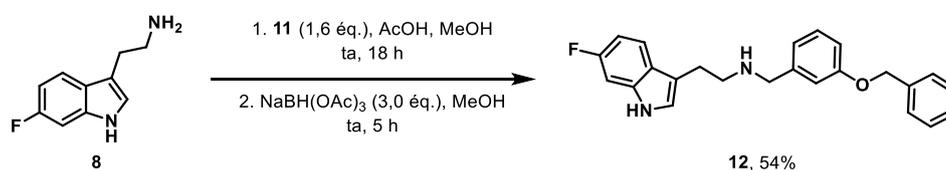


Schéma 28. Amination réductrice entre **8** et **11**.

Enfin, le composé phénolique **4** est obtenu par déprotection de **12** par une hydrogénation catalysée avec du palladium sur charbon, avec un rendement de 37% (Schéma 29).

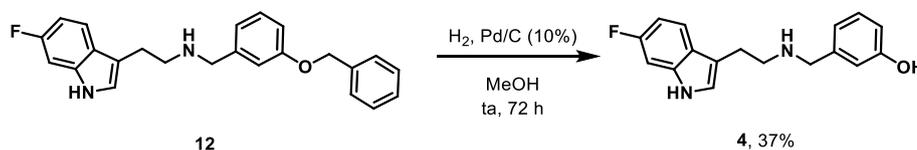


Schéma 29. Déprotection de **12** par hydrogénation.

Par la suite, l'*O*-alkylation du composé **4** par le chlorure d'éthylméthylcarbamoyle provoque au bout de 16 h une *N*-alkylation sur l'amine secondaire **13** ou une double alkylation sur l'amine secondaire et le phénol **14** (Schéma 30, confirmé par analyse 2D des spectres RMN).

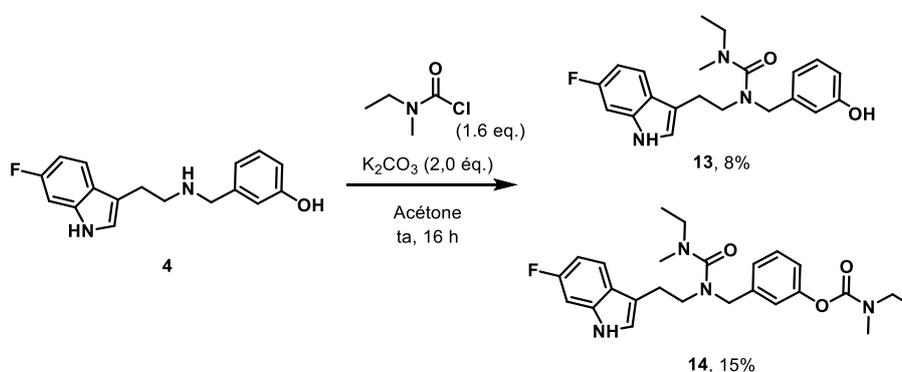


Schéma 30. Alkylation du composé **4**.

²⁰⁴ Martin, D. B. C.; Vanderwal, C. D. J. *Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (10), 3472–3473.

Pour éviter ces réactions parasites, il faut substituer le phénol avant l'amination réductrice. A partir du 3-hydroxybenzaldéhyde nous formons le dérivé carbamoylé **15** avec le chlorure d'éthyl(méthyl)carbamate, dans le DMF à 80 °C (Schéma 31).

Les spectres RMN du proton et du carbone de ces deux composés sont très intéressants. En effet, dans le DMSO deutéré à 295 K, les pics des protons et des carbones des groupements méthyle et éthyle sont doublés (un triplet devient un triplet dédoublé...). En effet, la présence du doublet non liant de l'azote impliqué dans une mésomérie avec le groupe carbonyle adjacent, provoque la présence de 2 isomères en équilibre (Figure 50).⁹⁵ Pour confirmer cette isomérie, nous réalisons différents spectres RMN à des températures croissantes (22, 50, 70 et 90 °C). Au fur et à mesure de l'accroissement de la température, les pics se rapprochent pour finir par fusionner à 363 K.

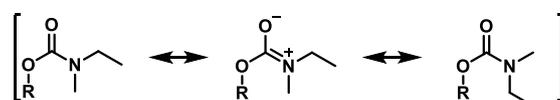


Figure 50. Formes de résonance d'un groupement carbamate.

De la même façon le dérivé fluoré **16** permettra de synthétiser l'idalopirdine qui servira de référence et de témoin lors des différents tests biologiques (Schéma 31).

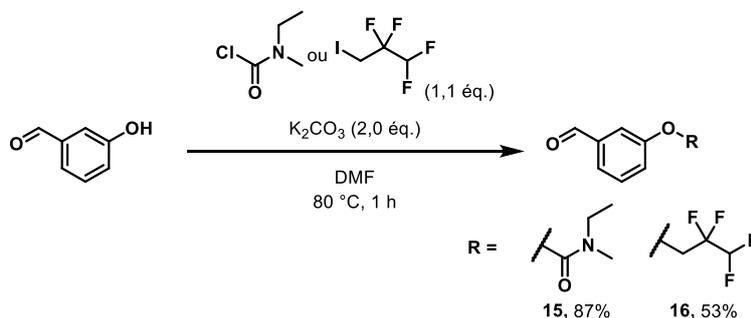


Schéma 31. Synthèse des précurseurs **15** et **16**.

Ainsi le composé carbamoylé **17** et l'idalopirdine **18** sont obtenus par amination réductrice, avec des rendements respectivement de 21 et 5% (Schéma 32). Ces rendements faibles sont assez surprenants, mais peuvent être imputables à une rétention du produit sur la colonne de chromatographie, en raison de la polarité des produits. Une silice désactivée par de l'ammoniaque ou une chromatographie en phase inverse aurait sans doute permis d'améliorer ces rendements.

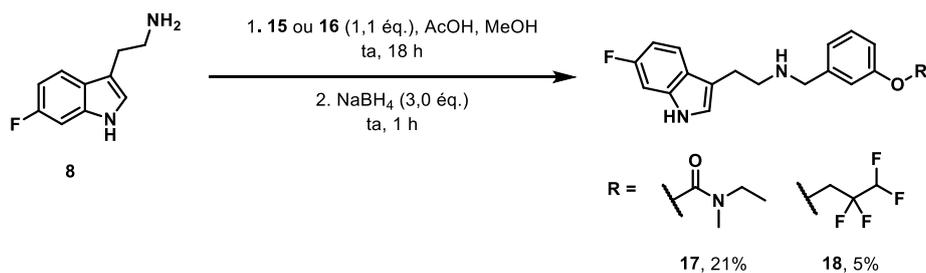


Schéma 32. Synthèse du dérivé carbamoylé **17** et l'idalopirdine **18**.

2.2. Résultats *in vitro*

2.2.1. *Evaluation biologique in vitro* AChE/5-HT₆

Le but de ces deux analyses est double : prouver que la prodrogue est uniquement inhibitrice de l'AChE et que le dérivé phénolique est ligand des récepteurs 5-HT₆.

1.1.1.6. Méthode d'Ellman

La méthode d'Ellman est la méthode standard utilisée pour détecter et surtout quantifier une inhibition de l'AChE et de la BuChE.²⁰⁵ Ce test présente de nombreux avantages, il nécessite de faibles quantités d'enzymes et de composés à tester, un spectrophotomètre UV-visible comme seul matériel et il offre une rapidité et un coût relativement faible par analyse.

Il est basé sur le clivage de l'acétylthiocholine, analogue soufré de l'acétylcholine par l'AChE ; cette réaction produit de la thiocholine qui réagit alors à son tour avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune, mesurable en spectrophotométrie à 412 nm (Schéma 33). La présence d'un inhibiteur d'AChE dans le milieu réactionnel, diminuera ainsi l'activité de l'enzyme, et conduira à une baisse de la concentration en 5-thio-2-nitrobenzoate dans le milieu réactionnel.

La mesure est tout d'abord réalisée à une concentration de 10⁻⁶ M. Les concentrations inhibitrices médianes sont ensuite déterminées uniquement pour les composés présentant un pourcentage d'inhibition d'au moins 50% à 10⁻⁶ M. Pour chaque composé satisfaisant ce critère, et tous les composés possédant un groupement carbamate, il est donc nécessaire de réaliser la même expérimentation plusieurs fois et à six concentrations différentes pour obtenir une courbe sigmoïde à partir de laquelle est déterminée graphiquement la concentration en composé diminuant de moitié l'activité de l'enzyme.

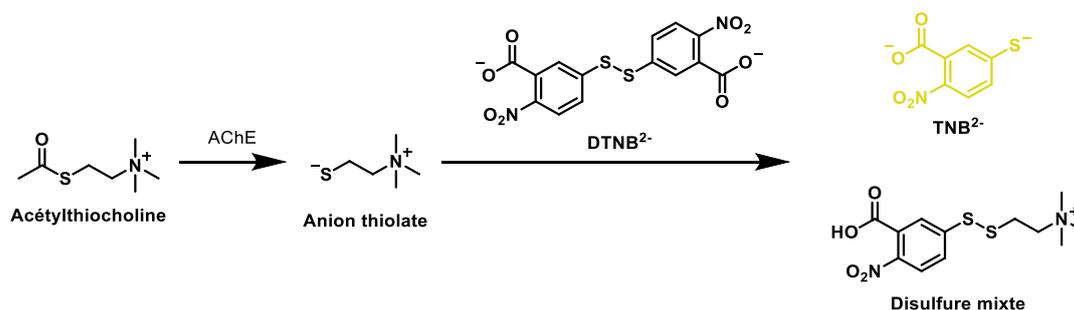


Schéma 33. Réaction mise en jeu lors du test d'Ellman.

Dans ces expérimentations, les témoins seront :

- La rivastigmine (RIV) : pour les dérivés carbamoylés, avec des IC₅₀ de 4,15 μM, 1,6 μM et 35 nM pour respectivement l'AChE(h), la BuChE(eq) et la BuChE(h).^{85,86}

²⁰⁵ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7 (2), 88–95.

- Le donépézil (DPZ) : pour les autres composés, avec une IC_{50} pour l'AChE(h) de 7,0 nM.
- La tacrine (TAC) : référence de la BuChE(eq), ici avec une IC_{50} de 2,7 nM, et de 85 nM pour la BuChE(h).

1.1.1.7. Affinité vis-à-vis des récepteurs 5-HT₄

L'affinité des composés synthétisés vis-à-vis des récepteurs 5-HT₄ est évaluée selon le protocole décrit par Grossman *et al.* *via* un test de compétition avec le [³H]-GR-113808, la forme tritié de l'antagoniste très affin et sélectif des 5-HT₄R, GR-113808.²⁰⁶ Les expérimentations ont été réalisées à partir de préparations membranaires de striatum de cobaye ou à partir de récepteurs humains clonés 5-HT_{4b}. L'évaluation de plusieurs composés sur les deux sources de récepteurs 5-HT₄ a démontré une très bonne corrélation des résultats pour les différentes séries chimiques développées lors de cette thèse, ce qui n'est pas toujours le cas suivant les structures.

Une première étape, préalable aux études de compétition, consiste à quantifier la radioactivité du ligand tritié lors d'une liaison totale, non-spécifique (en présence d'une concentration importante de 5-HT) ou spécifique (différence entre liaison totale et liaison non spécifique). Cette expérience de saturation permet de déterminer la constante de dissociation K_d (concentration de ligand nécessaire à l'occupation de 50% des récepteurs) et le nombre maximal de sites B_{max} . Afin de réaliser cette mesure de radioactivité par comptage, les récepteurs 5-HT₄ sont incubés avec le radioligand dans une gamme de concentrations connues avant une filtration et un rinçage.

Les études de compétition sont ensuite réalisées selon le même procédé en incubant avec les 5-HT₄R le radioligand à une concentration fixée et le composé évalué (aux concentrations de 10⁻⁶ et 10⁻⁸ M). La mesure du déplacement du radioligand par le composé permet de déterminer, à la concentration utilisée, le pourcentage d'inhibition de la liaison du composé aux 5-HT₄R. Plus le pourcentage est élevé, plus le composé est affin vis-à-vis des récepteurs.

Lorsque le pourcentage d'inhibition est supérieur à 90% à 10⁻⁶ M, l'expérimentation est reconduite dans une gamme de concentrations pertinentes pour déterminer la concentration inhibitrice médiane (concentration de ligand non radioactif nécessaire pour déplacer 50% de la liaison spécifique du radioligand).

L' IC_{50} étant dépendante des conditions expérimentales, une valeur indépendante de l'expérimentation permet généralement dans la littérature de comparer les affinités de différents ligands. Il s'agit de la

²⁰⁶ Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109* (3), 618–624.

constante d'inhibition K_i . Les travaux de Cheng et Prusoff ont permis d'établir une équation reliant IC_{50} et K_i .²⁰⁷ Plus le K_i est faible, plus l'affinité du composé vis-à-vis du récepteur 5-HT₄ est élevée.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_d}}$$

IC_{50} : concentration inhibitrice médiane du ligand non radioactif
 K_i : constante d'inhibition du ligand non radioactif
 K_d : constante de dissociation du radioligand
[L*] : concentration de radioligand

Le témoin utilisé sera le composé RS67333, avec un K_i de 5,1 nM.¹²⁸

1.1.1.1 Affinité vis-à-vis des récepteurs 5-HT₆

Le principe du test est strictement identique à celui des 5-HT₄R, à la différence du radioligand utilisé qui est ici le [³H]-LSD.²⁰⁸

Le témoin utilisé sera le composé SB271046 possédant un K_i de 3,0 nM.¹³⁷

1.1.1.2. Résultats

D'après les résultats présentés dans le Tableau 3, aucun des composés n'est ligand des 5-HT₄R. Comme nous nous y attendions **17** est inhibiteur de l'AChE mais avec une IC_{50} assez élevée et possède une très bonne affinité pour la BuChE. A l'inverse, le composé **4** est lui très bon ligand des 5-HT₆R avec un K_i de 11,4 nM.

Le composé **12** a été testé pour étudier l'influence de la substitution du phénol. La présence d'un groupement benzyle rend le composé complètement inactif sur toutes les cibles testées.

Pour étudier ces molécules et effectuer d'autres évaluations biologiques, les fumarates de ces deux composés ont été synthétisés. Ceux-ci vont faciliter les éventuels problèmes de solubilité (Schéma 34).

Pour des facilités de lecture le composé **19** sera renommé **MR35214** et le composé **20**, **MR35215**.

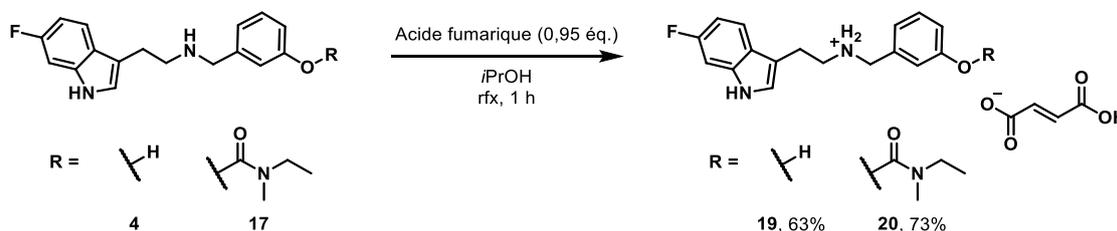
²⁰⁷ Chen, D.; Soh, C. K.; Goh, W. H.; Wang, H. J. *Med. Chem.* **2018**, *61* (4), 1552–1575.

²⁰⁸ Sleight, A. J.; Boess, F. G.; Bös, M.; Levet-Trafit, B.; Riemer, C.; Bourson, A. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *124* (3), 556–562.

Tableau 3. Activité inhibitrice sur l'AChE(h) (% inhibition ou IC₅₀), affinité sur les 5-HT₄R et les 5-HT₆R (% inhibition ou K_i) des composés **4**, **12**, **17** et **18**.

Composé	R	AChE(h)	BuChE(h)	5-HT ₄ R(h)	5-HT ₆ R(h)
		IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M	IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁵ M	K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M	K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M
		RIV	-	4.150 ± 160 ¹	37 ± 5 ¹
DPZ	-	7,0 ± 1,5	-	-	-
TAC	-	-	85 ± 6	-	-
RS67333	-	403 ± 86 ²	-	5,1 ± 0.5 ²	-
SB271046	-	-	-	-	3,0 ± 0,7 ³
4	H	n.d. 8%	n.d. 11%	n.d. 16% / 0%	11,4 ± 4,4 104% / 33%
12	Bn	n.d. 4%	-	-	n.d. 103% / 14%
17	CON(Me)Et	16.500 ± 3.900 9%	927 ± 81 93%	n.d. 10% / 0%	n.d. 37% / 24%
18	CH ₂ CF ₂ CHF ₂	-	-	-	6,9 ± 1,2 106% / 88%

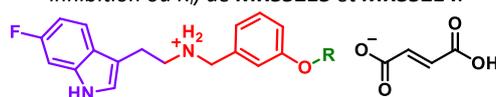
Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; Les valeurs de K_i sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences ; ¹Données de la réf. [85] ; ²Données de la réf. [128] ; ³Données de la réf. [137].


 Schéma 34. Synthèse des fumarates **MR35214** et **MR35215**.

Les résultats présents dans le Tableau 4 correspondent aux tests *in vitro* d'inhibition de l'AChE et de la BuChE, d'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R et d'affinité vis-à-vis des 5-HT₆R des fumarates **MR35214** et **MR35215**. Les différences d'IC₅₀ et de K_i entre les bases et les sels sont minimales. Il est intéressant de noter que le composé **MR35215**, en plus d'être inhibiteur de l'AChE, est un excellent inhibiteur de la BuChE avec une IC₅₀ de l'ordre de la centaine de nM.

Au vu de ces premiers résultats nous allons effectuer les mêmes tests présentés dans la partie précédente.

Tableau 4. Activité inhibitrice sur l'AChE(h) et la BuChE(eq) (% inhibition ou IC₅₀), affinité sur les 5-HT₄R et les 5-HT₆R (% inhibition ou K_i) de **MR35215** et **MR35214**.



Composé	R	AChE(h)	BuChE(h)	BuChE(eq)	5-HT ₄ R(h)	5-HT ₆ R(h)
		IC ₅₀ (nM) (n=2)	IC ₅₀ (nM) (n=2)	IC ₅₀ (nM) (n=2)	K _i (nM) (n=3)	K _i (nM) (n=3)
		% inh. 10 ⁻⁶ M	% inh. 10 ⁻⁵ M	% inh. 10 ⁻⁵ M	% inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M	% inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M
RIV	-	4.150 ± 160 ¹	37 ± 5 ¹	1.600 ± 30 ²	-	-
DPZ	-	7,0 ± 1,5	-	-	-	-
TAC	-	-	85 ± 6	2,7 ± 0,2	-	-
RS67333	-	403 ± 86 ³	-	-	5,1 ± 0,5 ³	-
SB271046	-	-	-	-	-	3,0 ± 0,7 ⁴
MR35214	H	n.d. 2%	n.d. 8%	n.d. 50%	n.d. 23%/ 12%	4,3 ± 0,8 85% / 48%
MR35215	CON(Me)Et	17.555 ± 1.916 5%	835 ± 44 95%	203 ± 58 97%	n.d. 32% / 19%	n.d. 53% / 32%

Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; Les valeurs de K_i sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences ; ¹Données de la réf. [85] ; ²Données de la réf. [86] ; ³Données de la réf. [128] ; ⁴Données de la réf. [137].

1.1.2 Profils pharmacologiques

1.1.2.1. Représentation de Lineweaver-Burk vis-à-vis d'AChE

Comme nous l'avons vu, la représentation double inverse de Lineweaver-Burk, permet de définir le type d'inhibition d'un ligand vis-à-vis d'une enzyme. Pour rappel, la quantité de substrat est modifiée, ainsi que la concentration en ligand. Plusieurs études sur le composé **17**, forme base de **MR35215**, vis-à-vis de l'AChE nous ont donné des résultats différents. Lors d'une première série de tests le composé se trouvait être un inhibiteur mixte comme nous nous y attendions. Mais suite à une seconde série de tests, le composé avait un profil non-compétitif. Malheureusement une troisième étude n'a pas permis de conclure.

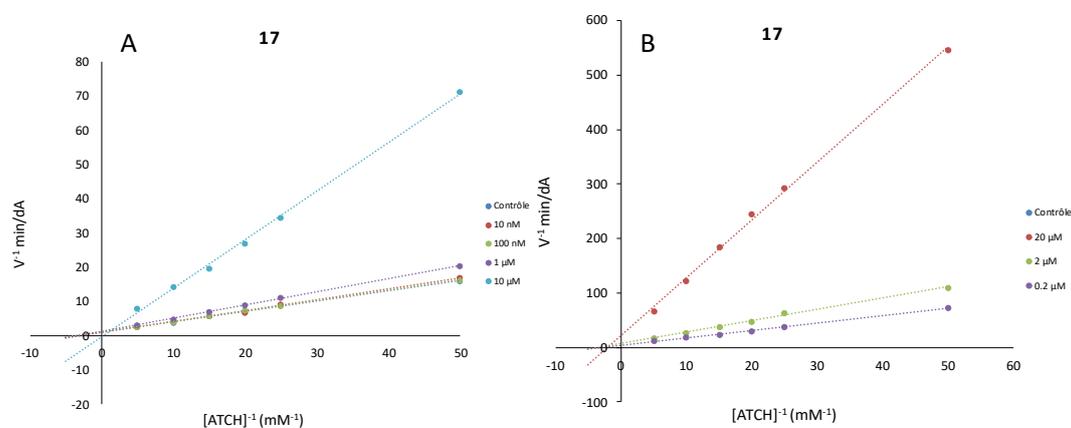


Figure 51. Représentation Lineweaver-Burk de la cinétique d'inhibition montrant que **17** agit comme un inhibiteur mixte de l'AChE (A) ou non-compétitif de l'AChE (B).

1.1.2.2. Modification du temps d'incubation

Stein et Kamal nous ont permis de mieux comprendre ces résultats.^{209,210} En effet, cette équipe a mis en évidence que le comportement compétitif/non-compétitif ainsi que le K_i pouvait changer suivant le temps d'incubation. Ainsi pour la physostigmine, pour un temps d'incubation de 0 min, le K_i est de 3,1 μM et l'inhibition est de type compétitive. A l'inverse pour des temps d'incubation de 6,8 et 18,9 min, les K_i sont de 0,19 et 0,10 μM respectivement, et l'inhibition est non-compétitive.

Lors d'un test d'Ellmann nous avons donc mesuré les absorbances et calculé les pourcentages d'inhibitions du composé **17**. Les tests ont été effectués en $n=3$ à 0, 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60 et 90 min, mais aucune différence significative n'a été observée.

1.1.2.3. Représentation de Lineweaver-Burk vis-à-vis de la BuChE

Le composé **MR35215** étant actif sur la BuChE(eq), nous avons décidé d'étudier son mode d'inhibition par la représentation double inverse de Lineweaver-Burk. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 52, **MR35215** est un inhibiteur mixte de la BuChE(eq).

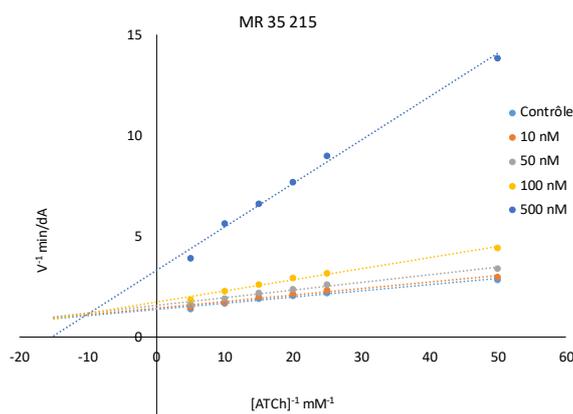


Figure 52. Représentation Lineweaver-Burk de la cinétique d'inhibition montrant que **MR35215** agit comme un inhibiteur mixte de la BuChE(eq).

1.1.2.4. Profils 5-HT₄ et 5-HT₆

Le profil pharmacologique du ligand **MR35214** a été évalué vis-à-vis des 5-HT₄R et de 5-HT₆R (ainsi que **MR35215** comme témoin négatif).

Cette technique se base sur la libération d'AMPC, l'activation de ces récepteurs entraînant une production d'AMPC qui sera quantifiée. Dans un premier temps, les cellules sont transfectées avec des plasmides encodant les récepteurs 5-HT₄ ou 5-HT₆. La molécule est ensuite injectée, et les cellules sont mises en incubation pendant 10 min à 37 °C. Les cellules sont ensuite lysées et l'AMPC dosé. Pour finir le pourcentage d'AMPC libéré est calculé en fonction de la référence utilisée pour le test.

²⁰⁹ Stein, H. H.; Lewis, G. J. *Biochem. Pharmacol.* **1969**, *18* (7), 1679–1684.

²¹⁰ Kamal, M. A.; Greig, N. H.; Alhomida, A. S.; Al-Jafari, A. A. Kinetics of Human Acetylcholinesterase Inhibition by the Novel Experimental Alzheimer Therapeutic Agent, Tolserine. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60* (4), 561–570.

Agoniste : pour la recherche d'agoniste, seul le produit est injecté dans le milieu cellulaire, avec une augmentation progressive de la concentration dans différents puits. Le pourcentage d'AMPc libéré est calculé en fonction du témoin : la sérotonine qui est injectée dans un puits sans molécule. Si le pourcentage augmente, le pEC_{50} est calculé. Si le pourcentage est supérieur ou égale à 100% la molécule est un agoniste total ; si le pourcentage est inférieur à 100%, c'est un agoniste partiel.

Antagoniste / Agoniste inverse : ici la molécule est mise en incubation pendant 5 min à 37 °C. La sérotonine est ensuite injectée dans tous les puits. La compétition entre les deux va permettre ou non la libération d'AMPc, qui sera dosé.

Normalement un dernier test permet de différencier un agoniste inverse d'un antagoniste. Celui-ci se base sur la libération intrinsèque d'AMPc par les récepteurs. Un puits sans produit sera le témoin. Si le produit est antagoniste, le taux d'AMPc sera linéaire quelque soit la concentration en produit. A l'inverse, dans le cas d'un agoniste inverse, ce taux diminuera avec l'augmentation de la concentration du produit.

Paramètres du test :

IC_{50} : concentration inhibitrice médiane. Représente la quantité d'une substance nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donnée.

$$pIC_{50} = \log IC_{50}$$

EC_{50} : concentration efficace médiane. Représente la quantité d'une substance nécessaire pour atteindre l'effet maximal de cette substance sur une cible.

$$pEC_{50} = \log EC_{50}$$

Taux d'AMPc :

$$\text{Taux d'AMPc} = \frac{\text{Quantité d'AMPc libérée à une concentration } x \text{ de molécule à tester}}{\text{Quantité d'AMPc libérée à une concentration donnée de sérotonine}}$$

Pour la différenciation entre agoniste inverse / antagoniste :

$$\text{Taux d'AMPc} = \frac{\text{Quantité d'AMPc libérée à une concentration } x \text{ de molécule à tester}}{\text{Quantité d'AMPc libérée de façon intrinsèque}}$$

Les profils pharmacologiques de **MR35214** ont été effectués, à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier, par le Dr Bérénice Hatat et le Dr Sylvie Claeysen. Le composé **MR35214** est un agoniste inverse des 5-HT₆R, et n'a aucun effet sur les 5-HT₄R (Figure 53 et Tableau 5).

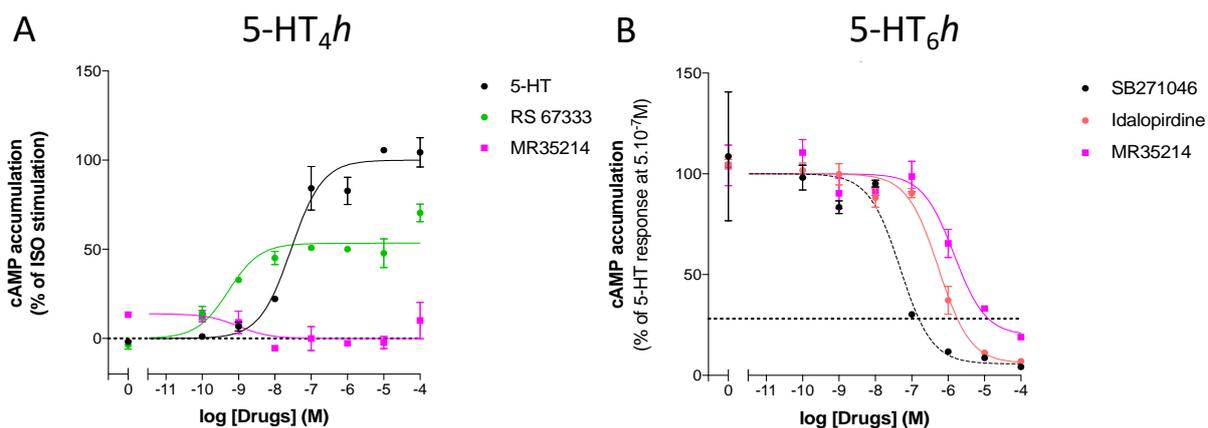


Figure 53. Profils pharmacologiques de **MR35214**, **RS67333** et **Idalopirdine**. (A) : activité agoniste vis-à-vis des 5-HT₄R_(a)(h) ; (B) : activité antagoniste vis-à-vis des 5-HT₆R(h).

Tableau 5. Profils pharmacologiques sur 5-HT₄R et/ou 5-HT₆R de **RS67333**, **Idalopirdine**, **MR35214** et **MR35215**. 5-HT et **SB271046** sont respectivement utilisés comme témoins agoniste des 5-HT₄R et antagoniste des 5-HT₆R.

	5-HT ₄ R _(a) (h)			5-HT ₆ R(h)		
	pEC ₅₀	% réponse agoniste par rapport au témoin	Profil	pIC ₅₀	% réponse antagoniste par rapport au témoin	Profil
RS67333	-8,8 ± 0,2 n = 2	48,7 ± 5,2 n = 3	Agoniste partiel	-	-	-
Idalopirdine	-	-	-	-6,2 ± 0,2 n = 2	101,2 ± 3,2 n = 2	Agoniste inverse
MR35214	n.d.	0	Non agoniste	-5,7 ± 0,2 n = 3	18,7 ± 3,4 n = 3	Agoniste inverse
MR35215	-5,5 n = 1	37 n = 1	Faible agoniste	-5,4 ± 0,4 n = 2	59,3 ± 6,4 n = 2	Antagoniste partiel

Les valeurs de pEC₅₀ et pIC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux ou quatre expériences ; Les valeurs des % réponse agoniste ou antagoniste par rapport au témoin sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux ou quatre expériences.

Pour aller plus loin dans l'étude de ces molécules, les profils pharmacologiques du carbamate **MR35215** ont aussi été testés. De manière surprenante, **MR35215** est un agoniste partiel des 5-HT₄R et antagoniste partiel des 5-HT₆R, alors que celui-ci ne devrait avoir aucune affinité vis-à-vis de ces récepteurs (Figure 54 et Tableau 5).

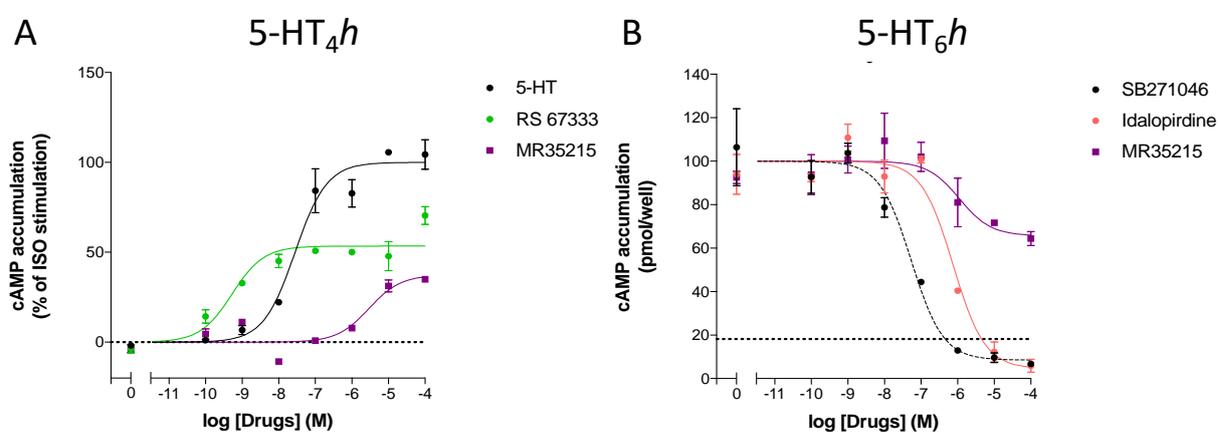


Figure 54. Profils pharmacologiques de **MR35215**, **RS67333** et **Idalopirdine**. (A) : activité agoniste vis-à-vis des 5-HT₄R_(a)(h) ; (B) : activité antagoniste vis-à-vis des 5-HT₆R(h).

Nous avons testé la stabilité de **MR35215** dans le tampons HBS à 25 °C. Au bout de 24 h le produit est resté stable. Au cours de ces études *in cellulo* le carbamate a sans doute été dégradé par les cholinestérases présentes dans le milieu, ou n'est pas stable dans le DMSO à long terme. Ceci est l'hypothèse la plus probable, car la molécule diluée dans le DMSO et stockée à 4 °C pendant plusieurs mois a montré la présence d'impuretés inconnues.

2.2.2. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay PAMPA

Le test d'essai de perméabilité parallèle à une membrane artificielle (de l'anglais Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, appelé couramment PAMPA), est une méthode qui permet de déterminer la diffusion passive d'une substance à travers une membrane artificielle contenant des phospholipides, d'un compartiment donneur vers un compartiment accepteur. La membrane utilisée ici doit simuler la BHE.

Une solution de produit dans du DMSO et un tampon à pH 7,4 sont placés dans le compartiment donneur. Un compartiment accepteur contenant la membrane de phospholipide est alors mise en contact pendant 4 h. Par la suite la concentration dans les deux compartiments est déterminée par analyse des spectres UV.

La perméabilité P_e ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) est calculée suivant l'équation suivante :

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \frac{V_A \cdot V_D}{V_A + V_D} \log \left[1 - \frac{V_A + V_D}{V_D \cdot (1 - MR)} \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right]$$

$$MR = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A}{V_D} \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)}$$

- A : surface du filtre (cm^2)
- V_D et V_A : volumes des compartiments donneur et accepteur (cm^3)
- t : temps d'incubation (s)
- τ_{ss} : temps pour atteindre l'état d'équilibre (s)
- $C_D(t)$ et $C_A(t)$: Concentration du composé dans la phase donneuse et la phase receveuse à l'instant t ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$)
- $C_D(0)$: Concentration du composé dans la phase donneuse à l'instant 0 ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$)
- MR : facteur de rétention membranaire estimé (fraction molaire estimée du soluté perdu dans la membrane)

Pour faciliter les interprétations, le $\log P_e$ est calculé. Suivant sa valeur, trois interprétations peuvent se faire :

- $\log P_e > -5$: le composé diffuse bien

- $-5 > \log P_e > -6$: diffusion modérée
- $\log P_e < -6$: le composé ne diffuse pas

Le dérivé carbamoylé, **MR35215**, comme nous le souhaitons, diffuse par diffusion passive à travers la BHE. Il en est de même pour le dérivé phénolique **MR35214** (Tableau 6).

Tableau 6. LogPe représentent les résultats du coefficient de perméabilité effective PAMPA de **MR35214** et **MR35215**.

	Perméabilité à pH 7,4		
	logPe	Pe 10^{-6} cm.s ⁻¹	Conclusion
Corticostérone	-4,84 ± 0,02	15,77 ± 0,73	Diffuse
Théophylline	-6,35 ± 0,02	0,45 ± 0,02	Ne diffuse pas
MR35214	-4,53 ± 0,07	29,59 ± 5,24	Diffuse
MR35215	-4,44 ± 0,07	36,55 ± 6,19	Diffuse

2.2.3. Evaluation de la décarbamoylation du composé **MR35215** en présence d'enzyme

2.2.3.1. En présence d'AChE(eel)

Cette méthode, très peu décrite dans la littérature, sert à prouver que l'enzyme permet la dégradation du carbamate et la libération du métabolite phénolique.

Mon travail avec le Dr Marc Since a consisté à développer cette méthode. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les publications de Zheng, H. *et al.* qui mettent en évidence, par analyse de spectres UV, l'apparition de dérivés secondaires après action de l'AChE sur leurs molécules.^{211,212}

Mais ils ne décrivent que très succinctement leur méthode expérimentale, ne précisant pour seule information que la mise en incubation du produit à pH 7,4 avec un excès d'AChE. Nous avons donc dû tout réétudier et essayer de développer un protocole détaillé ci-dessous. Pour des soucis d'économie, les tests ont été réalisés avec de l'AChE de *Electrophorus electricus* AChE(eel), moins chère.

Le principe général de cette méthode est de mettre en contact, pendant un temps t et à une certaine température, notre composé en présence ou non d'enzyme, et de contrôler par HPLC et LCMS, les composés présents au bout du temps imparti.

La mise en place du protocole expérimental sera expliqué page 114 du chapitre 3.0. En reprenant ce protocole, les composés à 5 μ M sont mis en solution à 25 °C, en présence ou non de 250 U/mL d'enzyme pendant 18 h (Tableau 7 et Tableau 19).

Une gamme d'étalonnage avec les deux composés a été effectué a 7 concentrations différente (de 50 à 1 μ M) dans un mélange ACN/H₂O (50/50) avec $r^2 > 0,99$.

²¹¹ Zheng, H.; Fridkin, M.; Youdim, M. B. H. *Neurochem. Res.* **2010**, 35 (12), 2117–2123.

²¹² Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. *ACS Chem. Biol.* **2010**, 5 (6), 603–610.

Tableau 7. Conditions expérimentales de décarbamoylation de la rivastigmine et de **MR35215** avec de l'AChE(*ee*)

[AChE(<i>ee</i>)] (U/mL)	Rivastigmine		MR35215	
	0	250	0	250
[Carbamate] (μ M)	5	5	5	5
Nombre d'équivalent d'AChE	0	3.0	0	3.0
Volume final (μ L)	250	250	250	250
Solvant	TpP	TpP	TpP	TpP
Temps (h)	18 h	18 h	18 h	18 h
Température ($^{\circ}$ C)	25	25	25	25

Nous ne pouvons donc pas conclure avec ces résultats. Le test devra être refait à partir de produit propre, dosé et dilué dans le DMSO avant la réaction. En effet l'échantillon testé a été préparé quelques mois avant la réaction, ce qui a sans doute provoqué une dégradation du produit.

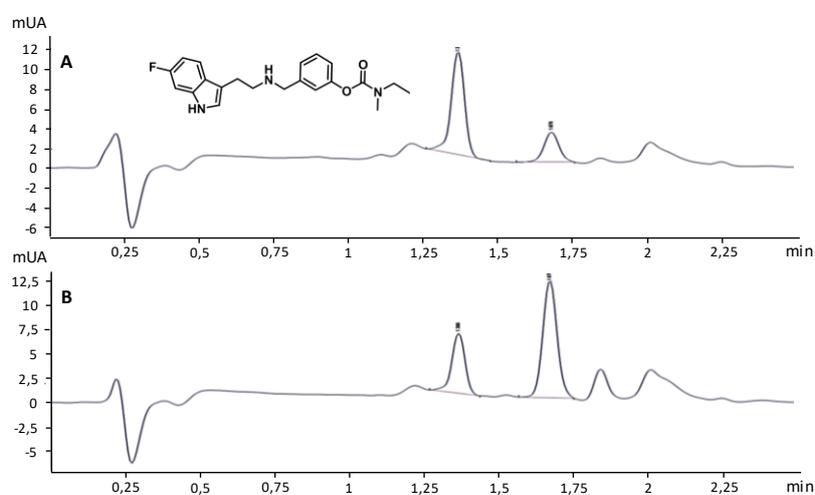


Figure 55 : Décarbamoylation de **MR35215** par l'AChE(*ee*) ; (A) : **MR35215** sans AChE(*ee*) (contrôle négatif) ; (B) : **MR35215** (5 μ M) en présence de 250 U/mL d'AChE (*ee*) ; λ = 280 nm, incubation à 25 $^{\circ}$ C, 18 h.

2.2.3.2. En présence de BuChE(*eq*)

Au vu de l'activité de **MR35215** sur la BuChE(*eq*) (IC_{50} = 203 μ M), l'essai de décarbamoylation a été effectué avec la BuChE(*eq*) dans des conditions identiques à celle de la AChE(*ee*) (Tableau 8). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 56B et C, les molécules **MR35214** et **MR35215** sont stables dans du tampon phosphate, et **MR35215** se dégrade en présence de BuChE(*eq*), entraînant la libération de **MR35214** (Figure 56.D), comme nous le souhaitons.

 Tableau 8. Conditions expérimentales de décarbamoylation de la rivastigmine et de **MR35215** avec de la BuChE(*eq*).

[BuChE(<i>eq</i>)] (U/mL)	Rivastigmine		MR35215	
	0	250	0	250
[Carbamate] (μ M)	5	5	5	5
Nombre d'équivalent BuChE	0	22.7	0	22.7
Volume final (μ L)	250	250	250	250
Solvant	TpP	TpP	TpP	TpP
Temps (h)	18 h	18 h	18 h	18 h
Température ($^{\circ}$ C)	25	25	25	25

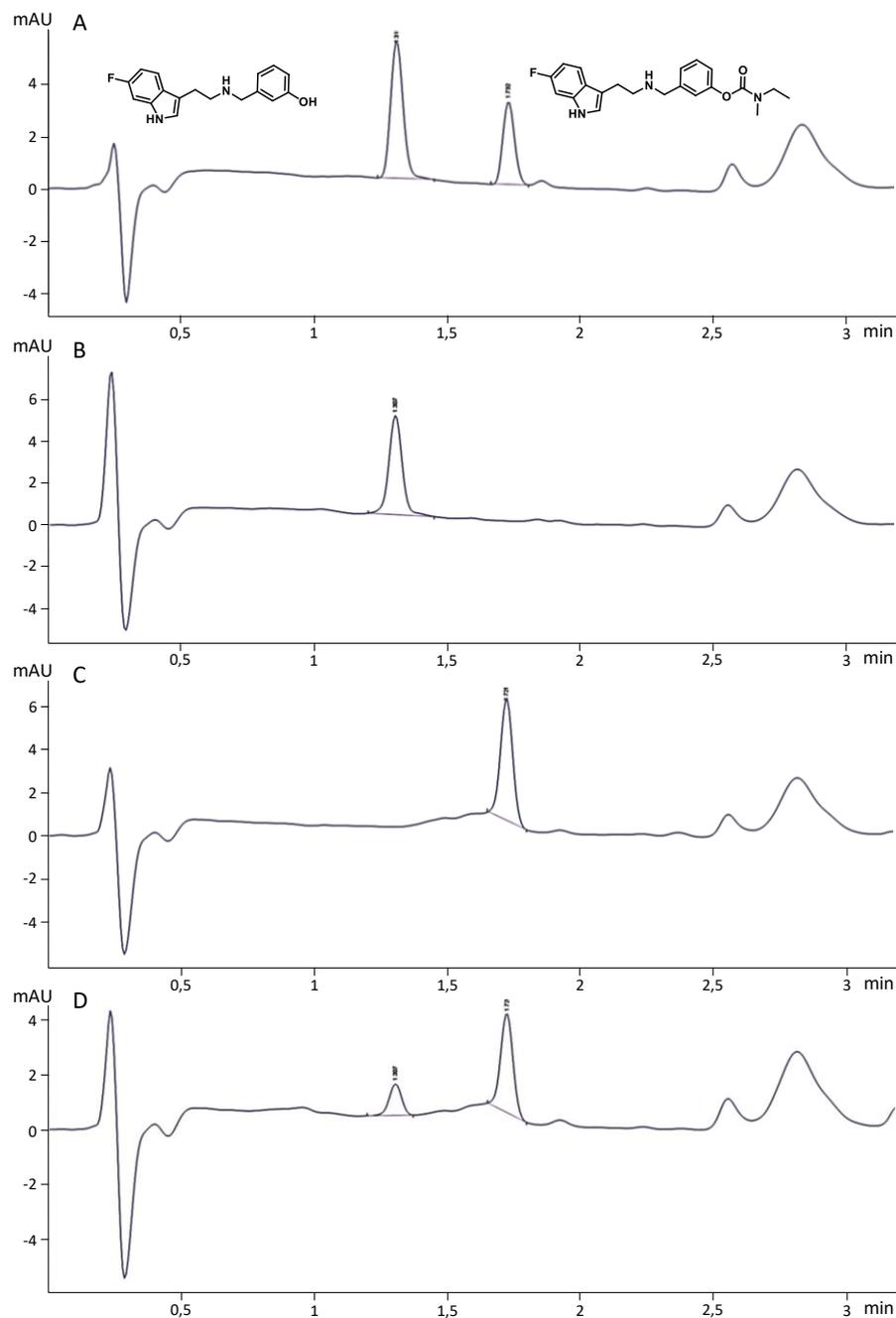
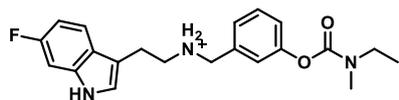


Figure 56. Décarbamoylation de **MR35215** par la BuChE(eq) ; (A) : Point de gamme de **MR3514** et **MR35215** ; (B) **MR35214** (5 μ M) sans BuChE(eq) ; (C) **MR35215** (5 μ M) sans BuChE(eq) ; (D) : **MR35215** (5 μ M) en présence de 250 U/mL BuChE(eq) ; λ = 280 nm, incubation 25 °C, 18 h.

2.3. Résultats *in silico*



La capacité de ce ligand à se lier à la BuChE(h) a été étudiée *in silico*.

Pour cette étude, nous avons utilisé la structure cristallographique de la BuChE- co-cristallisée avec un ligand indolique (PDB code : 6QAB).²¹³ La prédiction de protonation des résidus dans la BuChE indique que Glu197, le résidu voisin de Ser198 de la triade catalytique,

²¹³ Meden, A.; Knez, D.; Jukič, M.; Brazzolotto, X.; Gršič, M.; Pišlar, A.; Zahirović, A.; Kos, J.; Nachon, F.; Svete, J.; *et al. Chem. Commun.* **2019**, 55 (26), 3765–3768.

devrait être protoné à pH = 7,4. Nous l'avons donc protoné pour notre étude de docking. La protonation de MR35215 a été aussi vérifiée et **MR35215**, protoné sur son azote, a été docké dans le site actif de la BuChE, avec le logiciel Gold. La chaîne latérale de la Ser198 a été rendue flexible.

Au cours de ce docking, dix poses ont été proposées, séparées en deux clusters, se différenciant par la position de l'indole et l'interaction du carbamate au site actif. Dans cinq cas, le C=O du carbamate s'est trouvé en face du OH de la Ser198, alors que dans les cinq autres cas c'est le O du carbamate qui se trouve face au OH.

Nous avons ensuite appliqué la contrainte de la liaison H entre le C=O du carbamate et OH de Ser198. Pour simuler la première étape de rapprochement du groupement carbamate vers Ser198 de la triade catalytique, la chaîne latérale de la Ser198 a été maintenue flexible pendant le docking. Le docking a généré dix solutions qui se différencient principalement par la position du groupement indole (Figure 57) et qui ont pu être séparées en deux clusters. Dans le cluster 1 le ligand est replié sur lui-même et le groupement indole interagit par π -stacking, avec la Tyr332. Dans le cluster 2, le ligand a présenté une conformation allongée et une liaison H est établie entre NH_2^+ et C=O de Pro282.

Une simulation de dynamique moléculaire de 50 ns a été réalisée sur des complexes représentatifs de chaque cluster avec pour but de vérifier la stabilité des complexes et d'optimiser la position du ligand en incluant la flexibilité de la protéine. Ces études semblent confirmer la possibilité pour le carbamate MR35215 de se lier dans le site actif de la BuChE en plaçant le carbone électrophile à proximité de la sérine de la triade catalytique. Cette étude encourageante devra être confirmée en étudiant la stabilité de ce composé en présence de BuChE comme évoqué précédemment.

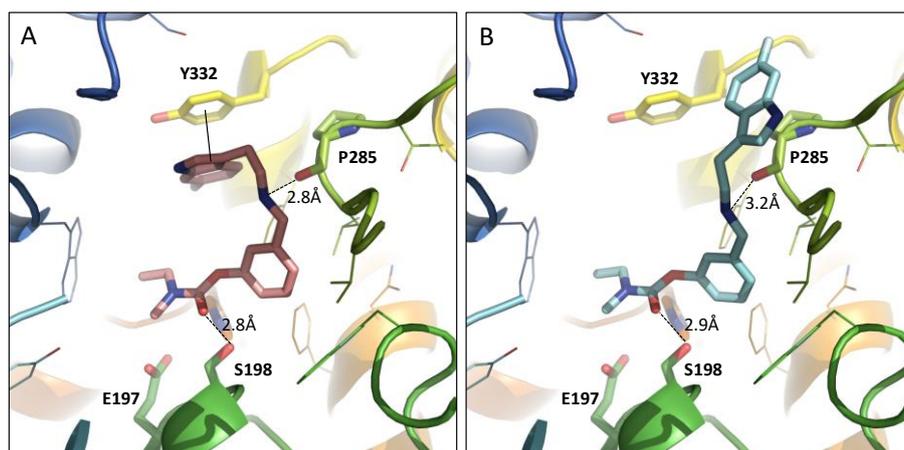


Figure 57. A. Cluster 1 avec liaison hydrogène entre C=O du carbamate et OH de la Ser198, et π -stacking entre l'indole et Tyr332 ; B. Cluster 2 ne présentant que la liaison hydrogène entre C=O du carbamate et OH de la Ser198. Le composé et les chaînes latérales des résidus sélectionnés du site de liaison sont représentés en bâtonnet et la protéine en ruban. Cette figure a été réalisée avec PyMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, États-Unis).

2.4. Résultats *in vivo*

Au vu de ces premiers résultats, les molécules **MR35214** et **MR35215** ont été testées sur des souris NMRI au laboratoire COMETE sous la direction du Pr. Thomas Fréret et du Pr. Michel Boulouard. Trois évaluations ont été faites durant cette campagne :

- Screening pharmacologique / toxicité aiguë
- Activité locomotrice spontanée
- Alternation spontanée de la mémoire de travail en présence de scopolamine ou de dizocilpine

2.4.1. Description des différents tests

1.1.2.5. Screening pharmacologique et analyse de la toxicité

Par groupe de quatre souris, les modifications comportementales et neurologiques induites par des doses graduées des dérivés testés ont été évaluées par une technique d'observation standardisée à différents temps après injection péritonéale (IP).²¹⁴ Les modifications majeures des données comportementales par rapport au groupe témoin (hypo ou hyperactivité, ataxie, tremblements, convulsions, etc.) sont notées à t 30 min, 3 h, 6 h et 24 h. Les doses létales médiane (LD₅₀) approximatives des composés ont également été calculées par la quantification de la mortalité après 24 h. L'amphétamine (2 mg/kg) est la référence excitative et la chlorpromazine (10 mg/kg) a été utilisée comme référence dépressive (Figure 58).

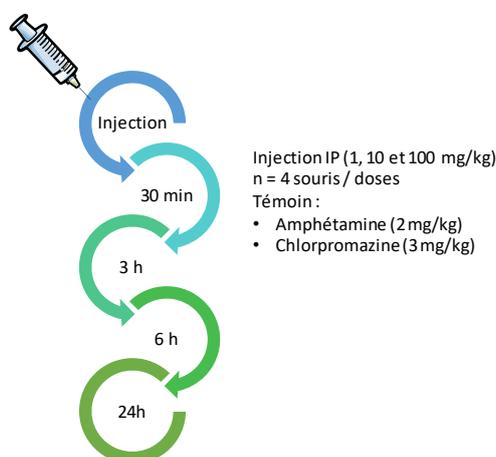


Figure 58. Protocole de screening pharmacologique et d'évaluation de la toxicité.

1.1.2.6. Activité locomotrice spontanée

L'activité locomotrice des souris est mesurée à l'aide d'un actimètre par détection infrarouge. Huit cages individuelles amovibles dans lesquelles chaque souris a été placée, sont disposées dans l'actimètre. L'activité locomotrice a été mesurée en enregistrant le nombre d'interruptions des faisceaux sur une période de 30 minutes *via* un système d'enregistrement relié à l'actimètre. Les

²¹⁴ Morpugo, C. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* **1971**, *11*, 1727–1734.

composés ont été testés à 1, 3 et 10 mg/kg. La chlorpromazine (3 mg/kg) a été utilisée comme référence dépressive (Figure 59).¹⁶⁷

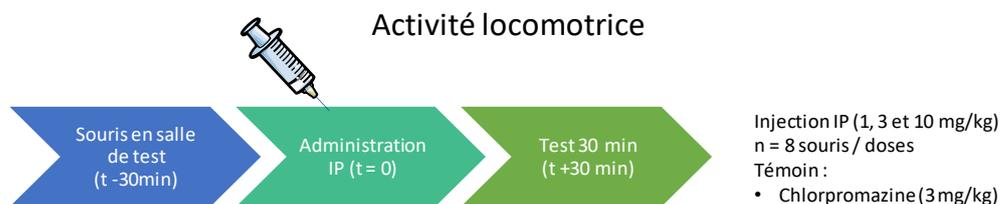


Figure 59. Protocole de l'évaluation de l'activité locomotrice.

1.1.2.7. Mémoire de travail : réversion de l'alternance spontanée

L'activité anti-amnésique des composés testés est évaluée par inversion du déficit induit, par la scopolamine SCOP (0,5 mg/kg) ou la dizocilpine, appelé aussi MK801 (0,1 mg/kg), sur le comportement d'alternance spontanée dans le test du labyrinthe en Y (ou Y maze).²¹⁵

La scopolamine est un parasympatholytique de type atropinique qui agit comme antagoniste compétitif de l'acétylcholine et des autres agonistes muscariniques (Figure 60). La scopolamine diminue la motilité intestinale et exerce un effet tachycardisant moins marqué que l'atropine. Au niveau du système nerveux central, elle exerce un effet sédatif prédominant contrairement à l'atropine. Elle est couramment utilisée pour induire un déficit mnésique chez les souris, lors des tests d'alternance spontanée de la mémoire de travail par inhibition du système cholinergique.

Le MK801 est antagoniste non-compétitif des récepteurs *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA) empêchant ainsi la transmission de l'influx nerveux.

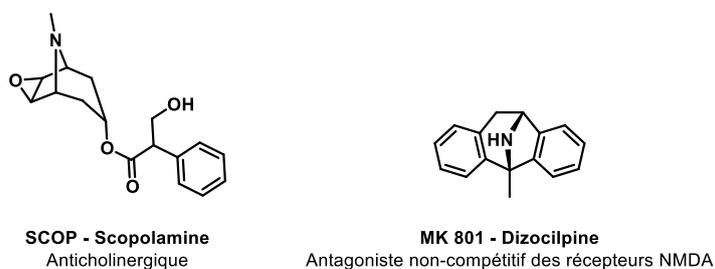


Figure 60. Structure de la scopolamine et de MK801.

Les composés testés sont injectés en IP 30 min avant le début du test. 20 min avant le test, la scopolamine, le MK801 ou la solution saline sont injectés en SC. La souris est placée au bout d'un des bras et est autorisée à se déplacer librement dans le labyrinthe au cours d'une session de 5 et 8 minutes, tandis que la séquence des entrées des bras est enregistrée par un observateur. Une entrée de bras est marquée lorsque les quatre pattes de la souris sont dans le bras. Une alternance a été définie comme une entrée dans les trois bras consécutifs. Le nombre d'alternances possibles est donc

²¹⁵ Hooper, N.; Fraser, C.; Stone, T. W. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996, 123 (3), 250–257.

le nombre total d'entrées de bras moins deux ; le pourcentage d'alternance a été calculé comme suit : (alternance réelle / alternance possible)x100. Les composés ont été testés à 1, 3 et 10 mg/kg.

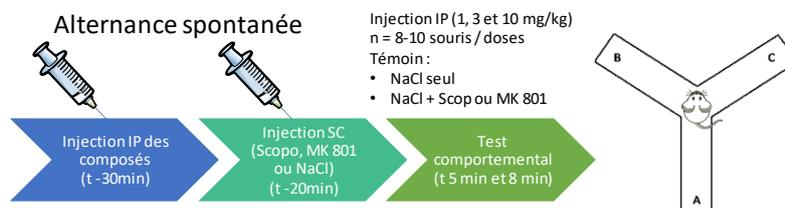


Figure 61. Protocole d'analyse de la mémoire de travail avec un déficit induit par scopolamine ou MK801.

2.4.2. Résultats in vivo

1.1.2.8. Screening pharmacologique et analyse de la toxicité

Quelle que soit la dose testée (1, 10 et 100 mg/kg), le dépistage toxicologique et pharmacologique préliminaire de **MR35214** et **MR35215** n'a révélé aucun signe délétère, suggérant ainsi une LD₅₀ très supérieure à 100 mg/kg (Tableau 9).

Tableau 9. Propriétés pharmacologique et toxicologique de **MR35214** et **MR35215**.

Composé	Doses (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	Symptômes (=oses toxiques)
MR35214	1-10-100	> 100	Pas de symptômes
MR35215	1-10-100	> 100	Pas de symptômes
Amphétamine ¹	2		Hyperactivité, exophtalmie, irritabilité
Chlorpromazine ¹	10		Hypoactivité, ataxie, sommeil

¹Amphétamine (2 mg/kg) et chlorpromazine (10 mg/kg) sont utilisées respectivement comme références stimulantes et dépressives.

1.1.2.9. Activité locomotrice spontanée

A aucunes des doses testées de **MR35214** et **MR35215** (1, 3 et 10 mg/kg) l'activité locomotrice spontanée n'a été modifiée (Figure 62).

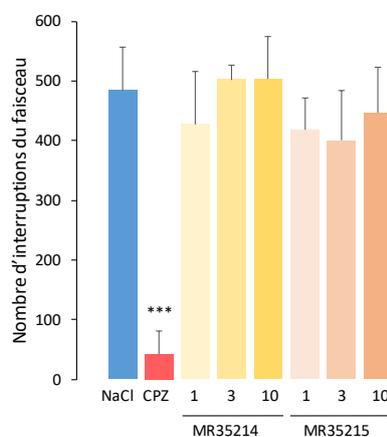


Figure 62. Effet de **MR35214** et **MR35215** sur l'activité locomotrice spontanée. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n = 8). Les médicaments ont été administrés par voie IP 30 minutes avant le test comportemental. Composés **MR35214** et **MR35215** : 1–3–10 mg/kg ; Chlorpromazine CPZ : 3 mg/kg (***) p < 0,05 NaCl, test SNK).

1.1.2.10. Mémoire de travail : inversion de l'alternance spontanée

Comme décrit précédemment, 2 molécules inductrices du déficit seront utilisées : la scopolamine et le MK801.

Scopolamine

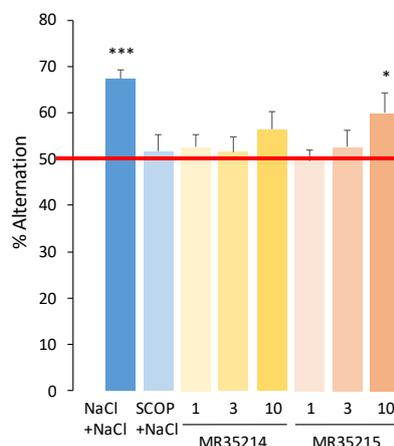


Figure 63. Effet de **MR35214** et **MR35215** sur la déficience induite par la scopolamine au cours du test de l'inversion de l'alternance spontanée. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($n = 8$). Les médicaments ont été administrés en IP 30 minutes avant le test et la scopolamine a été administrée en SC 20 minutes avant le test. Composé **MR35214** et **MR35215** : 1–3–10 mg/kg ; Scopolamine : 0,5 mg/kg. (* $p < 0,5$ *** $p < 0,001$, test t univarié).

Pour ce test, **MR35214** ne présente aucune différence avec l'injection d'eau salée, et ce quelle que soit la dose. Nous observons une diminution des effets de la scopolamine à une dose de 10 mg/kg pour **MR35215** (Figure 63).

MK801 : Pour ne pas porter atteinte au système cholinergique, nous avons ensuite utilisé MK801 qui va bloquer les récepteurs NMDA par antagonisme. Après l'injection de MK801, le composé **MR35214** induit une inversion partielle à 1 et 10 mg/kg. Malheureusement, à l'inverse, quelle que soit la dose, **MR35215** ne provoque aucune réversion (Figure 64).

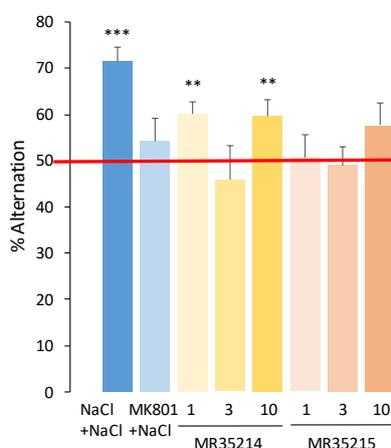


Figure 64. Effet de **MR35214** et **MR35215** sur la déficience induite par la scopolamine au cours du test de la réversion de l'alternance spontanée. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($n = 8$). Les médicaments ont été administrés en IP 30 minutes avant le test et la scopolamine a été administrée en SC 20 minutes avant le test. Composé **MR35214** et **MR35215** : 1–3–10 mg/kg ; MK801 : 0,1 mg/kg. (* $p < 0,5$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, test t univarié).

1.1.2.11. Conclusion

Le Tableau 10 permet de résumer ces résultats *in vivo* :

Tableau 10. Résumé des évaluations *in vivo* de **MR35214** et **MR35215**.

Composés	Screening (1, 10 et 100 mg/kg)	Activité locomotrice (1, 10 et 100 mg/kg)	Réversion de l'altération (1, 3 et 10 mg/kg)	
			SCOP	MK801
MR35214	✓	✓	Pas d'effets	Partielle à 1 et 10 mg/kg
MR35215	✓	✓	Partielle à 10 mg/kg ES à 3 et 10 mg/kg	Pas d'effets

Le dérivé **MR35214** (profil 5-HT₆) est, dans la gamme de doses testées, inactif, dans le modèle SCOP. Elle provoque à la dose la plus faible et la plus forte, mais pas à la dose intermédiaire une inversion partielle dans le modèle MK801. Le dérivé **MR35215** est quant à lui actif uniquement à 10 mg/kg en présence de scopolamine. Afin d'expliquer ces résultats contrastés, il serait intéressant de vérifier la possible libération du phénol **MR35214** *in vivo* après injection de **MR35215**.

L'analyse des dérivés de l'idalopirdine nous a amené à nous intéresser à un autre type de projet, l'imagerie TEP et TEMP.

2.5. Imagerie TEP et TEMP

2.5.1. Principe

L'imagerie TEP (Tomographie à émission de Positrons) et l'imagerie TEMP (Tomographie d'Emission Mono-Photonique) sont des méthodes d'imagerie moléculaire fonctionnelle qui permettent de visualiser et quantifier un processus biologique.

L'imagerie TEMP est une technique d'imagerie nucléaire fondée sur le principe de la scintigraphie caractéristique des isotopes radioactifs émetteurs γ . Alors que la TEP est une technique moléculaire fondée sur le phénomène d'annihilation des isotopes radioactifs β^+ .²¹⁶

Plusieurs antagonistes 5-HT₆R ayant des propriétés d'imagerie TEP ont déjà été synthétisés.²¹⁷ Ils possèdent toutes les caractéristiques du pharmacophore des antagonistes 5-HT₆R. Le composé le plus intéressant est le [¹⁸F]2FNQ1P est qui est en phase de passer en essais cliniques.²¹⁸

²¹⁶ Babin, V. Conception de Nouveaux Agents Iodés Pour l'imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT₄, 2018.

²¹⁷ Hazari, P. P.; Pandey, A.; Chaturvedi, S.; Mishra, A. K. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (11), 2647–2672.

²¹⁸ Sgambato-Faure, V.; Billard, T.; Météreau, E.; Duperrier, S.; Fieux, S.; Costes, N.; Tremblay, L.; Zimmer, L. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 1–11.

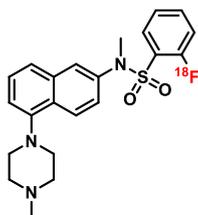


Figure 65. Structure de $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$.²¹⁹

2.5.2. Projet

Au vu de l'affinité de l'idalopirdine pour les 5-HT₆R, et le peu de radioigand pour ce récepteur, nous sommes intéressés à la synthèse du dérivé ester 6-boronique de l'idalopirdine. En effet à partir de ce même précurseur nous imaginons pouvoir accéder à la fois aux analogues fluorés et iodés utilisables en imagerie TEP ou TEMP. Si cette synthèse permettait d'accéder à la ¹⁸F-idalopirdine il conviendrait au cours de cette étude de vérifier l'affinité de son analogue iodé pour les 5-HT₆R.

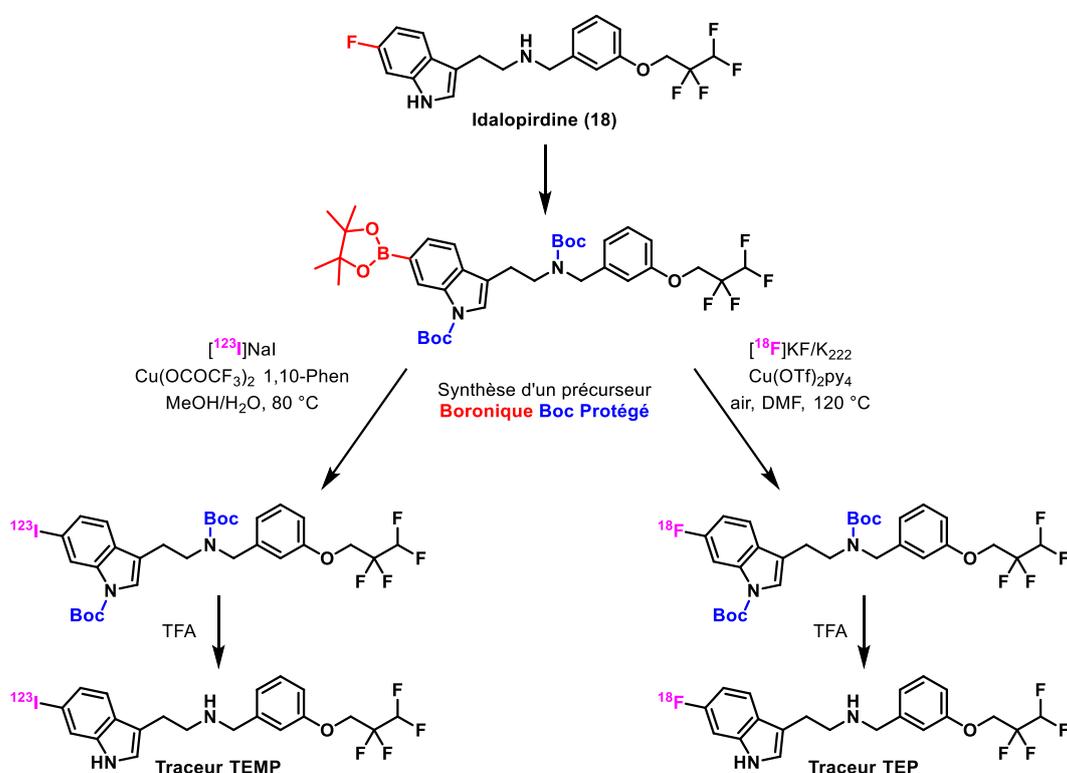
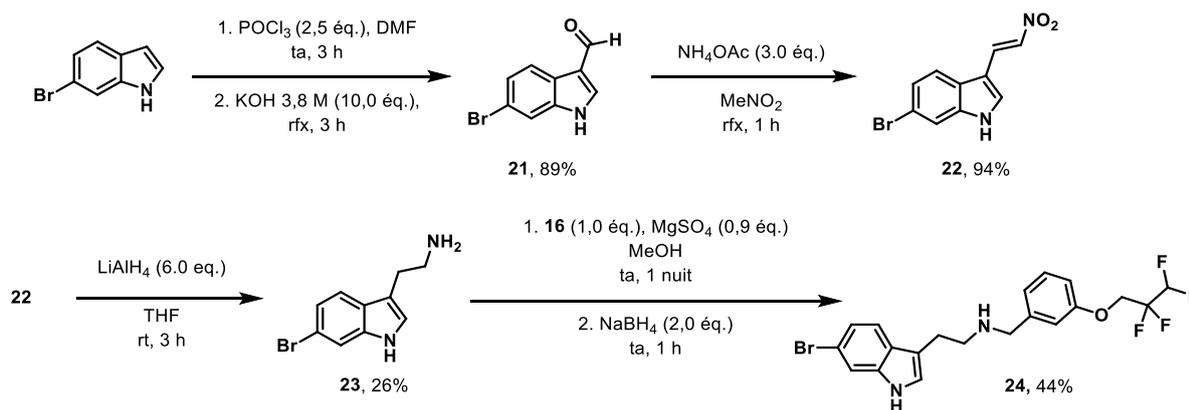


Figure 66. Molécules dérivées de l'idalopirdine potentiellement utiles en imagerie TEMP et TEP.

2.5.3. Accès synthétique

La voie de synthèse sera la même que celle du composé **18** (Schéma 35) : amination réductrice à partir du composé **24** et du composé **16** (Schéma 31). Nous avons substitué le fluor par un brome qui sera plus réactif pour former l'ester boronique par la borylation de Miyaura. S'en suivra une protection de l'amine de l'indole et de l'amine aliphatique.

²¹⁹ Colomb, J.; Becker, G.; Fieux, S.; Zimmer, L.; Billard, T. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (9), 3884–3890.


 Schéma 35. Synthèse de la 6-bromoidalopirdine **24**.

Malheureusement aucune conversion n'a été observée lors de la réaction de borylation de Miyaura (Schéma 36). Deux modifications des conditions expérimentales seront à tester : protection de l'amine par un groupement boc et chauffage à reflux.

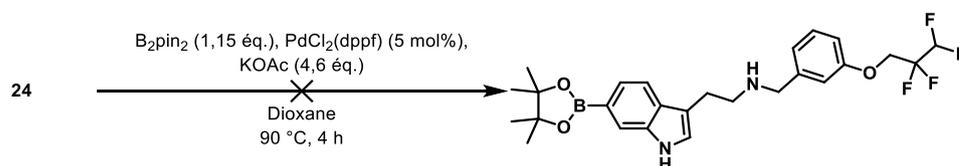


Schéma 36. Borylation de Miyaura

2.5.4. *Evaluation in vitro*

L'évaluation *in vitro* du composé **24** a été effectuée sur les récepteurs 5-HT₆R, pour voir si la modification du groupement en position 6 de l'indole influençait la liaison de la molécule aux 5-HT₆R.

 Tableau 11. Affinité sur les 5-HT₆R (% inhibition ou K_i) de **41** et **50**.

Composé	R	5-HT ₆ R(h)
		K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M
SB271046	-	3,0 ± 0,7 ¹
18	F	6,9 ± 1,2 106% / 88%
24	Br	6,2 ± 3,2 75% / 37%

Les valeurs de K_i sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences ; ¹Données de la réf. [137].

Nous pouvons voir dans le Tableau 11 qu'il n'y a pas de différence significative entre l'idaloipirdine **18** et le dérivé bromé **24**. Ceci permet de conclure, du fait que le fluor peut être remplacé par un autre halogène sans modifier son activité biologique vis-à-vis des 5-HT₆R. Ces travaux seront poursuivis prochainement.

3. Développement de prodrogues multi-cibles : inhibiteurs de l'AChE et agonistes des récepteurs 5-HT₄

Dans cette série, nous nous sommes basés sur les travaux du laboratoire : ceux-ci ont montré que les dérivés de l'acide 4-amino-5-chloro-2-méthoxybenzoïque (ou dérivé RS) couplés à une pipéridine alkylée étaient des agonistes des 5-HT₄R. Une molécule particulièrement intéressante, le MR33327, a ainsi été synthétisée et a montré des résultats biologiques prometteurs avec un $K_i(5\text{-HT}_4\text{R}(gp))$ de 14,3 nM, une IC_{50} de l'AChE(*h*) et de BuChE(*eq*), respectivement de 8,5 nM et 1835 nM. Cette molécule peut donc être considérée comme un MTDL.

La pharmacomodulation de ce produit va se produire en trois points (Figure 67) :

- X : synthèse des dérivés en séries amide, ester ou cétone, pour étudier l'influence biologique de ce groupement
- R : synthèses des dérivés phénoliques et carbamates, les premiers devant être ligands des 5-HT₄R, les seconds devant être uniquement inhibiteurs des cholinestérases.
- Y : étude de l'influence d'un méthyl et d'un carbone asymétrique

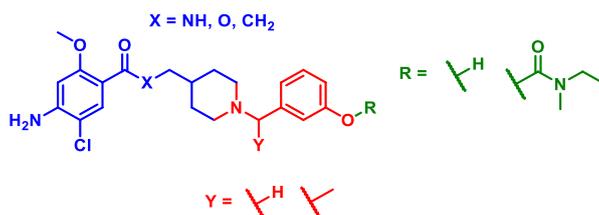


Figure 67. Pharmacomodulations de MR33327.

Mon objectif est donc pluriel : synthétiser des dérivés phénoliques du MR33327, ainsi que ses dérivés carbamoylés et étudier leurs effets biologiques sur les ChE et les 5-HT₄R. Le meilleur duo sera sélectionné. Un sel de fumarate sera synthétisé. Nous étudierons son profil pharmacologique, sa stabilité en présence d'enzyme et des tests *in vivo* seront effectués.

Par ailleurs, Hatat B. *et al.* ont montré récemment, que la substitution sur le groupement benzyle pouvait permettre une action sur 3 cibles.¹⁶⁶ En effet ces composés sont à la fois inhibiteurs de l'AChE, ligands des 5-HT₄R et ligands des 5-HT₆R. Nous testerons donc l'affinité de mes composés vis-à-vis des 5-HT₆R.

3.1. Accès synthétiques des dérivés carbamates et phénoliques

3.1.1. Analyse rétrosynthétique

L'objectif est de trouver des voies de synthèse convergentes entre ces molécules, afin de préserver de bons rendements dans l'esprit d'une potentielle application industrielle.

Une voie de synthèse convergente des séries amide, ester et cétone a été mise au point (Schéma 37).

Toutes ces molécules peuvent être divisées en 3 parties distinctes :

- une partie formée à partir de l'acide 4-amino-5-chloro-2-méthoxybenzoïque commercial
- une partie pipéridine protégée par un groupement *tert*-butoxycarbone (Boc)
- un motif benzénique portant le groupement carbamate ou phénol.

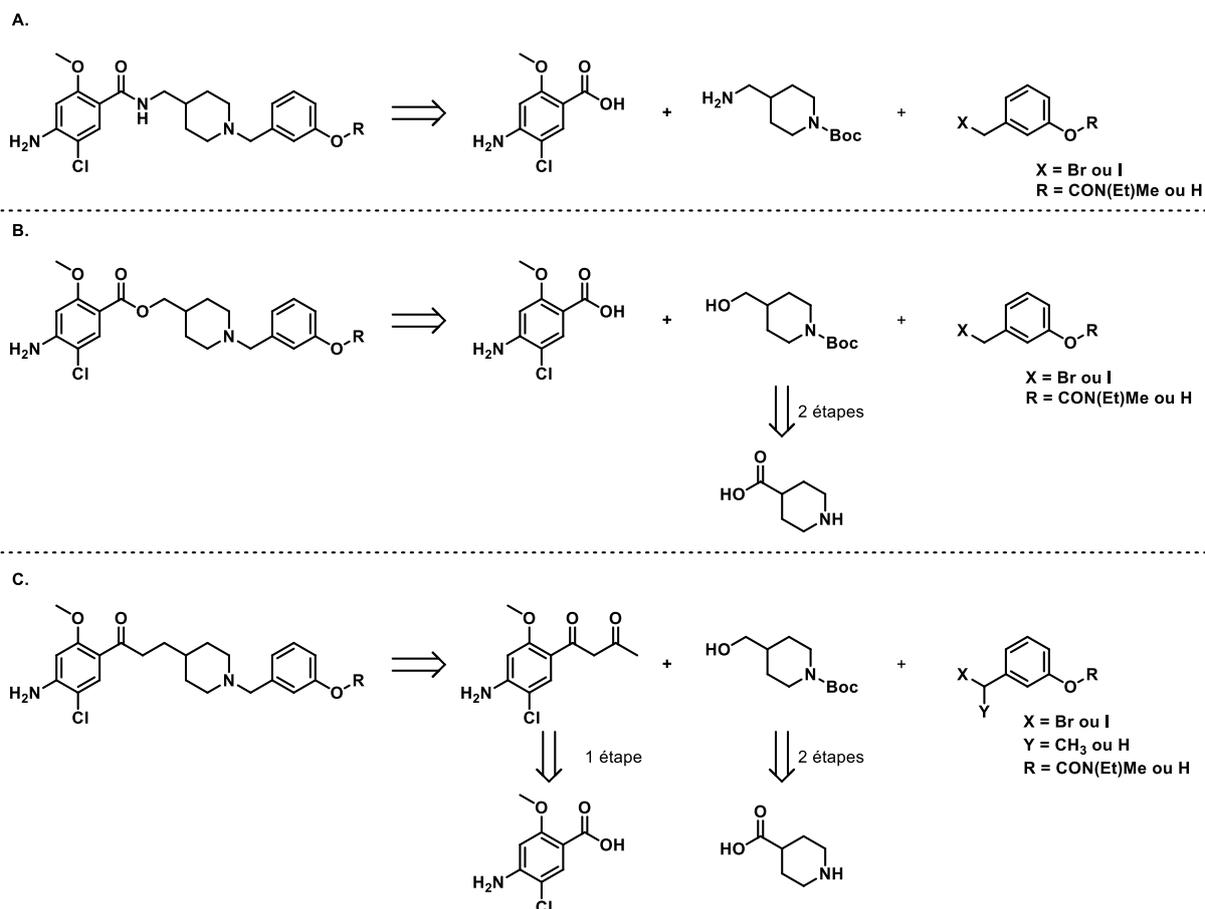


Schéma 37. Analyse rétrosynthétique ; A : série amide ; B : série ester ; C : série cétone.

3.1.2. Voie de synthèse des précurseurs RS-pipéridine-Boc

La première partie consiste à protéger la pipéridine et la coupler à un dérivé RS.

1.1.2.12. Protection des différentes pipéridines

1.1.2.12.1. Aminométhylpipéridine protégée

Pour former le 1-carboxylate de *tert*-butyl 4-(aminométhyl)pipéridine (**25**) nous partons de la 4-pyridineméthanamine commerciale. La protection sélective de la pipéridine est effectuée one-pot en 3 étapes : tout d'abord l'amine primaire est protégée sous forme d'imine par de la méthylisobutylcétone MIBK, puis une protection de la pipéridine avec le Boc₂O est réalisée. Enfin d'une

hydrolyse de l'imine permet d'obtenir le produit voulu **25** avec un rendement de 63% (Schéma 38).²²⁰

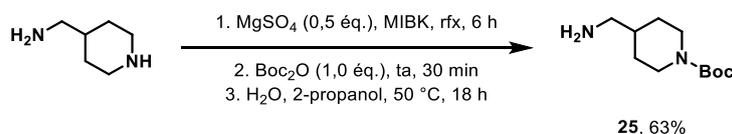


Schéma 38. Synthèse de l'aminométhylpipéridine protégée.

1.1.2.12.2. Hydroxy ou iodométhylpipéridine protégée

Ensuite, pour former le *tert*-butyl 4-(hydroxyméthyl)pipéridine-1-carboxylate (**27**) et le *tert*-butyl 4-(iodométhyl)pipéridine-1-carboxylate (**28**) nous partons de l'isonipécotate d'éthyle. Cette molécule commerciale est réduite par du LiAlH_4 au reflux de l'éther diéthylique, puis l'azote de la pipéridine est protégé par un groupement *tert*-butoxycarbonyle pour conduire au composé **27**, précurseur de la série ester. Enfin l'alcool est iodé pour former le composé **28**, précurseur de la série cétone (Schéma 39).

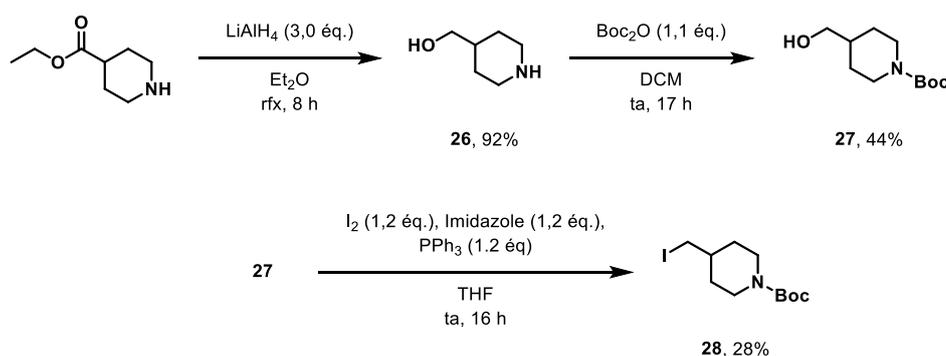


Schéma 39. Synthèse de l'hydroxy et de l'iodométhylpipéridines protégées.

1.1.2.13. Synthèse du précurseur amide, boc protégé

Tout d'abord, le précurseur amide protégé **29** est synthétisé par un couplage peptidique entre l'acide 4-amino-5-chloro-2-méthoxybenzoïque et le 1-carboxylate de *tert*-butyl 4-(aminométhyl)pipéridine **25**. Le chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDCI.HCl) permet d'activer l'acide carboxylique permettant ainsi l'attaque par l'amine nucléophile. Le faible rendement de la réaction (15%) peut s'expliquer par 2 effets : le lavage de la phase organique et la perte de produit sur la colonne de chromatographie faite de silice.

²²⁰ Laduron, F.; Tamborowski, V.; Moens, L.; Horváth, A.; De Smaele, D.; Leurs, S. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, *9* (1), 102–104.

²²¹ Sutton, J. C.; Bolton, S. A.; Davis, M. E.; Hartl, K. S.; Jacobson, B.; Mathur, A.; Ogletree, M. L.; Slusarchyk, W. A.; Zahler, R.; Seiler, S. M.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (9), 2233–2239.

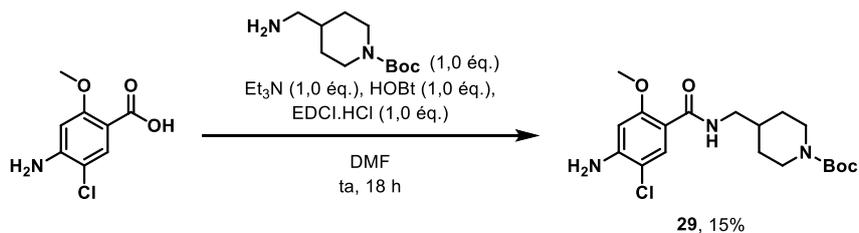


Schéma 40. Synthèse du précurseur amide, boc protégé.

1.1.2.14. Synthèse du précurseur ester, boc protégé

En série ester, le précurseur **30** est obtenu par une estérification entre l'acide de départ et le composé **27**, après activation par le carbonyldiimidazole CDI.¹²⁹

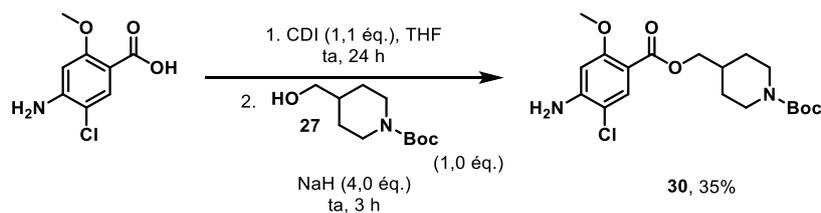


Schéma 41. Synthèse du précurseur ester, boc protégé.

1.1.2.15. Synthèse du précurseur cétone, boc protégé

En série cétone, nous commençons par former un β -cétioester **31** : l'acide est activé par le CDI,²²² puis couplé avec le malonate d'éthyle. Il s'ensuit une substitution en α du carbonyle, une saponification puis une décarboxylation pour obtenir le composé **32** (Schéma 42).²²³

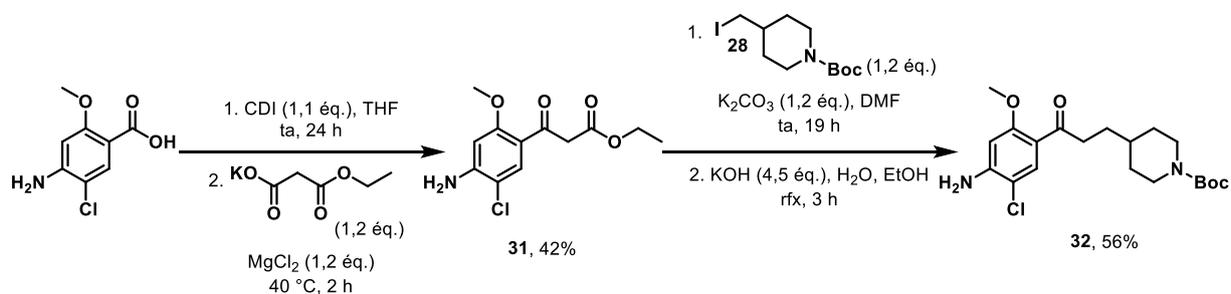


Schéma 42. Synthèse du précurseur cétone, boc protégé.

3.1.3. Synthèse des précurseurs carbamoylés et phénoliques

Pour obtenir les composés finaux, 4 précurseurs sont nécessaires : 2 dérivés carbamoylés et 2 dérivés phénoliques.

²²² Yang, W.; Wang, Y.; Roberge, J. Y.; Ma, Z.; Liu, Y.; Michael Lawrence, R.; Rotella, D. P.; Seethala, R.; Feyen, J. H. M.; Dickson, J. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (4), 1225–1228.

²²³ Kaspi, J.; Lerman, O.; Arad, O.; Alnabari, M.; Sery, Y. EP 1 386 607 B1, 2006.

3.1.4. Synthèse des précurseurs phénoliques

1.1.2.16. Dérivé halogéné primaire

La méthode de synthèse pour former les deux précurseurs phénoliques est différente. Une iodation sélective du 3-(hydroxyméthyl)phénol grâce à du KI/BF₃.Et₂O, permettant d'obtenir le composé **33** a été décrite par Bandgar *et al.* (Schéma 43).²²⁴

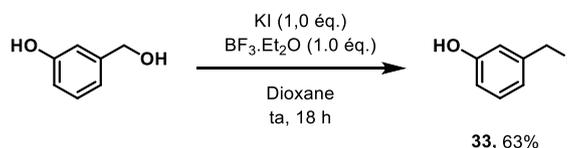


Schéma 43. Synthèse du précurseur **33**.

1.1.2.17 Dérivé halogéné secondaire

Pour le dérivé halogéné secondaire, nous avons décidé de partir de la 3-hydroxyacétophénone. Le phénol est ainsi protégé par un groupement triisopropylsilyl (TIPS) ou *tert*-butyldiphénylsilyl (TBPS), puis la cétone est réduite par du NaBH₄ (Schéma 44).

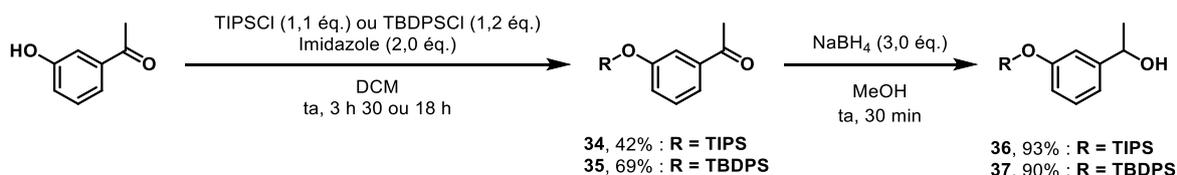


Schéma 44. Synthèse de **36** à **37**.

Les diverses réactions d'iodation avec de l'iodure de potassium ou du diiode, ou la réaction de bromation n'ont eu aucun résultat, et le du produit de départ a été récupéré inchangé (Schéma 45).

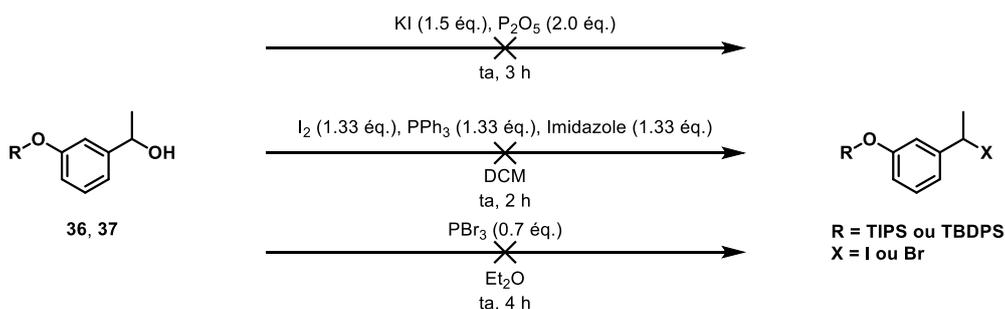
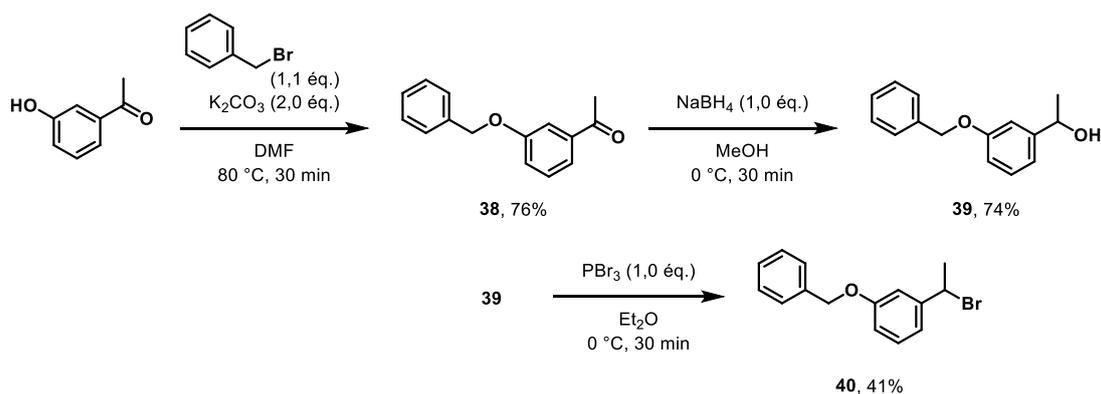


Schéma 45. Tentatives de synthèse des dérivés halogénés secondaires.

Le changement du groupement protecteur par un groupement benzyle, a permis d'obtenir le composé bromé **40** utilisé par la suite en mélange racémique (Schéma 46).

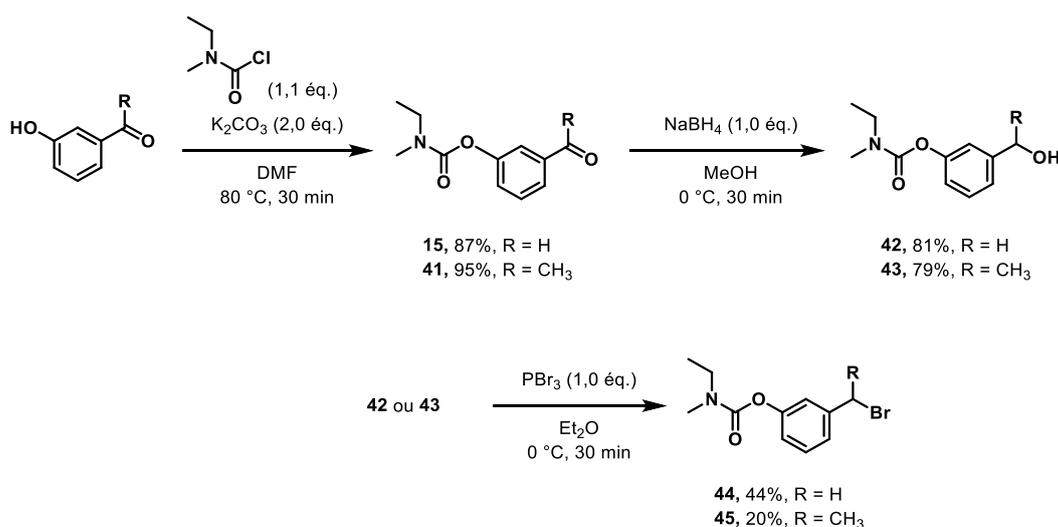
²²⁴ Bandgar, B. P.; Sadavarte, V. S.; Uppalla, L. S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (5), 951–953.


 Schéma 46. Synthèse du dérivé halogéné secondaire **40**.

1.1.2.18. Synthèse des précurseurs carbamoylés

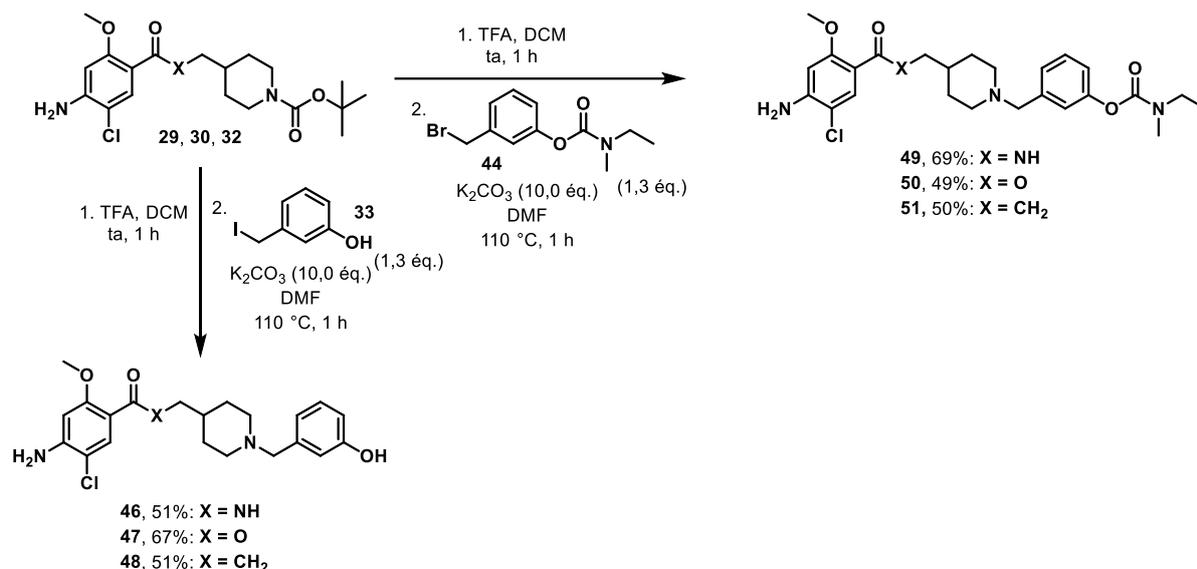
A partir du 3-hydroxybenzaldéhyde ou de la 3-hydroxyacetophénone, nous formons respectivement les dérivés carbamoylés **15** et **41**, grâce à une alkylation avec le chlorure d'éthyl(méthyl)carbamate, dans le DMF à 80 °C.

Par la suite l'aldéhyde et la cétone sont réduits par du NaBH₄, et les deux alcools sont bromés grâce à du PBr₃, permettant d'obtenir les composés **44** et **45** (Schéma 47).

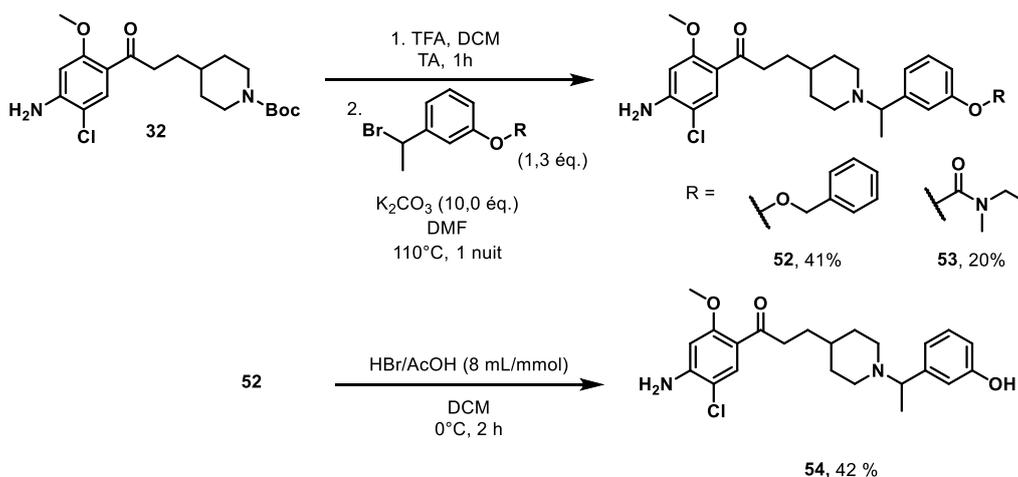

 Schéma 47. Synthèse des précurseurs carbamoylés **44** et **45**.

3.1.5. Voie de synthèse des produits phénoliques et carbamoylés

La dernière étape est commune dans toutes les séries : la pipéridine est déprotégée par de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le DCM. Le composé est concentré *in vacuo*, et une alkylation avec soit le 3-iodophénol pour former les dérivés phénoliques, soit le *N*-éthyl-*N*-méthylcarbamate de 3-(bromométhyl)phényle pour former les carbamates, est réalisé (Schéma 48).


 Schéma 48. Synthèse finale des prodrogues IACHe / agonistes des 5-HT₄R.

Pour les composés possédant un carbone asymétrique, les réactions de déprotection et d'alkylation se déroulent dans les mêmes conditions. S'en suit une déprotection de **52** par de l'acide bromhydrique dans l'éthanol (Schéma 49).


 Schéma 49. Synthèse finale des prodrogues IACHe / agonistes des 5-HT₄R possédant un carbone asymétrique.

3.2. Résultats *in vitro*

3.2.1. *Evaluation biologique in vitro* AChE/5-HT₄

Les résultats présents dans le Tableau 12 correspondent aux tests *in vitro* d'inhibition de l'AChE, d'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R et d'affinité vis-à-vis des 5-HT₆R. Le donécopride et tous ses dérivés n'ayant aucune affinités pour la BuChE, il nous est semblé inutile d'effectuer ce test.

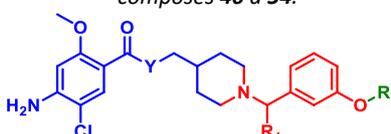
Les résultats sont forts intéressants. En effet, les dérivés carbamoylés (**49**, **50**, **51** et **53**) présentent tous une inhibition de l'AChE, avec une IC₅₀ du même ordre de grandeur que la rivastigmine (IC₅₀ entre 4.2 et 16.3 μM), et sont dénués d'effets sur les récepteurs 5-HT₄.

A l'inverse, les dérivés phénoliques correspondants (**46**, **47**, **48** et **54**) se trouvent être d'excellents ligands pour les récepteurs 5-HT₄ (K_i entre 0,6 et 36,1 nM). De plus le composé **48** est très intéressant car il couple les trois activités : à la fois ligand des 5-HT₄R, inhibiteur de l'AChE (de l'ordre de la centaine de nanomolaire) et faiblement ligand des 5-HT₆R. En parallèle nous pouvons observer que l'ajout d'un méthyl en série cétone influence peu l'inhibition par des carbamates (**51** et **53**), mais rend le dérivé phénolique complètement inopérant vis-à-vis d'AChE (**48** et **54**). L'influence de ce méthyl vis-à-vis des 5-HT₆R est encore à déterminer.

Au vu de ces résultats, la série cétone a été considérée comme la plus intéressante :

- **48** : triple activité
- **51** : IC₅₀ la plus basse et quasiment identique à celle de la rivastigmine

Tableau 12. Activité inhibitrice sur l'AChE(h) (% inhibition ou IC₅₀), affinité sur les 5-HT₄R et les 5-HT₆R (% inhibition ou K_i) des composés **46** à **54**.

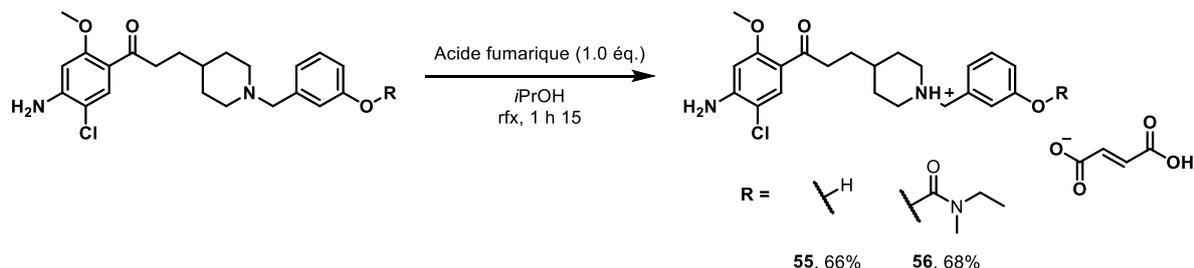


Composé	X	R	R ₁	AChE(h)	5-HT ₄ R(h)	5-HT ₆ R(h)
				IC ₅₀ (nM) (n=2)	K_i (nM) (n=3)	K_i (nM) (n=3)
				% inh. 10 ⁻⁶ M	% inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M	% inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M
RIV	-	-	-	4.150 ± 160 ¹	-	-
DPZ	-	-	-	7,0 ± 1,5	-	-
RS67333	-	-	-	403 ± 862 ²	5,1 ± 0,5 ²	-
SB271046	-	-	-	-	-	3,0 ± 0,7 ³
49	NH	CON(Me)Et	H	10.077 ± 2.988 12 %	n.d. 70 % / 13 %	n.d. 26 % / 24 %
46	NH	H	H	n.d. 4 %	5,8 ± 1,2 100 % / 70 %	n.d. 25 % / 23 %
50	O	CON(Me)Et	H	16.290 ± 240 7 %	n.d. 100 % / 23 %	n.d. 26 % / 5 %
47	O	H	H	n.d. 11 %	0,6 ± 0,4 100 % / 95 %	n.d. 20 % / 20 %
51	CH ₂	CON(Me)Et	H	4.151 ± 794 27 %	n.d. 85 % / 3 %	n.d. 19 % / 0 %
48	CH ₂	H	H	148,6 ± 34,9 82 %	5,1 ± 1,1 103 % / 79 %	422,0 ± 27,0 70 % / 10 %
53	CH ₂	CON(Me)Et	CH ₃	9.103 ± 759 8 %	n.d. 74 % / 11 %	n.d. 22 % / 15 %
54	CH ₂	OH	CH ₃	n.d. 17 %	36,1 ± 7,7 100 % / 38 %	n.d. 49 % / 0 %

Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; Les valeurs de K_i sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences ; ¹Données de la réf. [85] ; ²Données de la réf. [128] ; ³Données de la réf. [137].

Pour étudier ces molécules et effectuer d'autres évaluations biologiques, les fumarates de ces deux composés ont été synthétisés. (Schéma 50).

Pour des facilités de lecture le sel du composé carbamoylé **56** sera appelé **MR35213** et le composé phénolique **55** sera appelé **MR35212**.



Les résultats présentés dans le Tableau 13 correspondent aux tests *in vitro* d'inhibition de l'AChE et de la BuChE, d'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R et d'affinité vis-à-vis des 5-HT₆R des fumarates **MR35212** et **MR35213**.

La principale différence entre la forme sel et la forme base est la diminution d'un log de l'IC₅₀ du composé phénolique **MR35212** sur AChE. Les autres constantes étant du même ordre de grandeur.

Le composé **MR35213** est légèrement plus affiné pour la BuChE que pour l'AChE avec des IC₅₀ respectivement de 1,7 μM et 6,1 μM. A l'inverse, le composé **MR35212** est spécifique de l'AChE (IC₅₀ de 72 nM vs 22 μM). Notons aussi une diminution du K_i(5-HT₆R).

Au vu de ces premiers résultats encourageants, il convient de déterminer et de prouver la décarbamoylation du produit **MR35213** en présence d'AChE.

Tableau 13. Activité inhibitrice sur l'AChE(h) et la BuChE(eq) (% inhibition ou IC₅₀), affinité sur les 5-HT₄R et les 5-HT₆R (% inhibition ou K_i) de **MR35212** et **MR35213**.

Composé	R	AChE(h)	BuChE(eq)	5-HT ₄ R(h)	5-HT ₆ R(h)
		IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M	IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁵ M	K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M	K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M
RIV	-	4.150 ± 160 ¹	1.600 ± 30 ²	-	-
DPZ	-	7,0 ± 1,5	-	-	-
TAC	-	-	2,7 ± 0,2	-	-
RS67333	-	403 ± 86 ³	-	5,1 ± 0,5 ³	-
SB271046	-	-	-	-	3,0 ± 0,7 ⁴
55	H	72 ± 1,4	21.995 ± 1888	6,9 ± 1,2	142 ± 4,7
MR35212	H	90 %	80 %	100 % / 78 %	76 % / 39 %
56	CON(Me)Et	6.070 ± 404	1.715 ± 242	n.d.	n.d.
MR35213	CON(Me)Et	20 %	86 %	80 % / 16 %	26 % / 15 %

Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; Les valeurs de K_i sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences ; ¹Données de la réf. [85] ; ²Données de la réf. [86] ; ³Données de la réf. [128] ; ⁴Données de la réf. [137].

3.2.2. Profils pharmacologiques

1.1.2.19. Représentation de Lineweaver-Burk

Le phénol **MR35212** agit comme un inhibiteur non-compétitif, ce qui explique une interaction possible de **MR35212** avec le PAS de l'enzyme (Figure 68A).¹²⁹ Dans le même temps, le carbamate **MR35213** a montré une inhibition mixte illustrée par un graphique de Lineweaver-Burk similaire à celui obtenu avec un IACHé comme, la physostigmine (Figure 68B).²²⁵ Ceci étant conforme à nos prévisions.

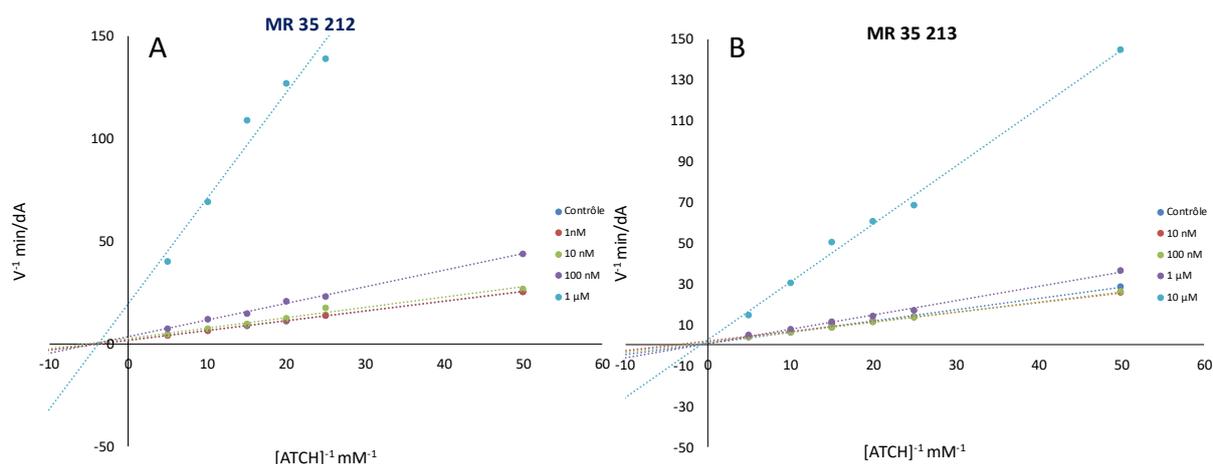


Figure 68. Représentation Lineweaver-Burk de la cinétique d'inhibition montrant que **MR35212** agit comme un inhibiteur non-compétitif de l'AChE (A) et **MR35213** comme un inhibiteur mixte de l'AChE (B).

1.1.2.20. Profils 5-HT₄ et 5-HT₆

Le profil pharmacologique de **MR35212** a été évalué vis-à-vis des 5-HT₄R et de 5-HT₆R (ainsi que **MR35213** comme témoin négatif). Le composé est donc agoniste partiel des 5-HT₄R, et faible antagoniste des 5-HT₆R (Figure 69 et Tableau 14).

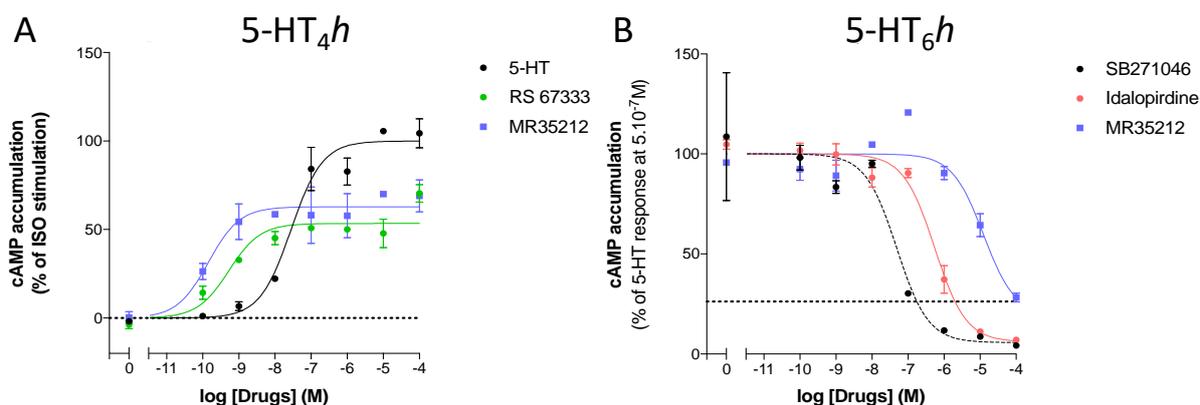


Figure 69. Profils pharmacologiques de **MR35212**, **RS67333** et **Idalopirdine**. (A) : activité agoniste vis-à-vis des 5-HT₄R_(α)(h) ; (B) : activité antagoniste vis-à-vis des 5-HT₆R(h).

²²⁵ Robaire, B.; Kato, G. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11* (6), 722–734.

Tableau 14. Profils pharmacologiques sur 5-HT₄R et/ou 5-HT₆R de **RS67333**, *Idalopirdine*, **MR35212** et **MR35213**. 5-HT et **SB271046** sont respectivement utilisés comme témoins agoniste des 5-HT₄R et antagoniste des 5-HT₆R.

	5-HT ₄ R(h)			5-HT ₆ R(h)		
	pEC ₅₀	% réponse agoniste par rapport au témoin	Profil	pIC ₅₀	% réponse antagoniste par rapport au témoin	Profil
RS67333	-8,8 ± 0,2 n = 2	48,7 ± 5,2 n = 3	Agoniste partiel	-	-	-
<i>Idalopirdine</i>	-	-	-	-6,2 ± 0,2 n = 2	101,2 ± 3,2 n = 2	Agoniste inverse
MR35212	-9,9 ± 0,0 n = 3	59,0 ± 3,9 n = 2	Agoniste partiel	-4,2 ± 0,6 n = 3	19,3 n = 1	Faible antagoniste
MR35213	-8,5 ± 0,4 n = 3	55,4 ± 3,6 n = 3	Agoniste partiel	-4,7 ± 1,3 n = 2	30,5 ± 11,2 n = 2	Antagoniste partiel

Les valeurs de pEC₅₀ et pIC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux ou trois expériences ; Les valeurs des % réponse agoniste ou antagoniste par rapport aux témoins sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux ou trois expériences.

Pour aller plus loin dans l'étude de ces molécules, les profils pharmacologiques du carbamate **MR35213** ont aussi été déterminés. De manière surprenante, **MR35213** est un agoniste partiel des 5-HT₄R et antagoniste partiel des 5-HT₆R, alors que celui-ci ne devrait avoir aucune affinité pour ces deux récepteurs (Figure 70 et Tableau 14). D'autres problèmes de reproductibilité sont aussi apparus.

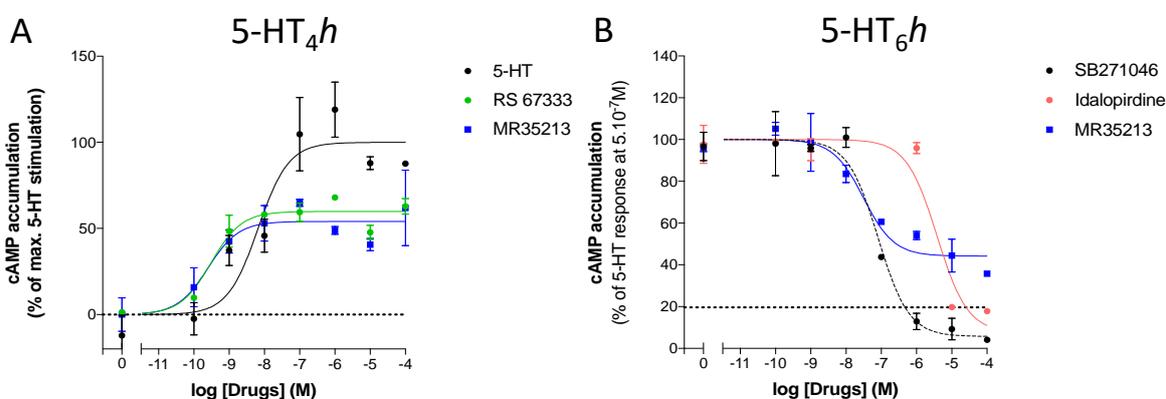


Figure 70. Profils pharmacologique de **MR35213**, *RS67333* et *Idalopirdine*. A : activité agoniste vis-à-vis des 5-HT₄R_(h) ; (B) : activité antagoniste vis-à-vis des 5-HT₆R(h).

Dans notre 1^{er} postulat, l'apparition d'une affinité vis-à-vis des 5-HTR serait due à une dégradation du produit dans le milieu réactionnel. Pour écarter cette hypothèse, nous avons mis en incubation pendant 24 h à 25 °C, **MR35213** dans du tampon HBS. Un contrôle HPLC est effectué à 0, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4, et 24h. Les résultats n'ont montré aucune différence en présence ou en absence de tampon, le produit étant donc considéré comme stable dans ce milieu.

Notre 2nd postulat correspond à une possible dégradation de notre produit, dû à la présence de l'AChE dans les cellules, mais ceci demeure sous la forme d'hypothèse.

Concernant l'interaction avec les 5-HT₆R de **MR35212**, deux tests seraient à réaliser :

- Premièrement le test de différenciation entre agoniste inverse et antagoniste sur les 5-HT₆R.
- Deuxièmement, le **MR35212** étant agoniste des 5-HT₄R, l'activation de ces récepteurs induit normalement une libération de sAPP α . Il serait intéressant d'effectuer ces tests permettant ainsi de prouver cette sécrétion et de la quantifier.

3.2.3. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay PAMPA

MR35213 est diffusé de façon passive à travers la BHE. À l'inverse le **MR35212** lui ne diffuse pas à travers la membrane (Tableau 15). Ceci permet de confirmer l'utilité de former une prodrogue.

Tableau 15. LogPe représentent les résultats du coefficient de perméabilité effective PAMPA de **MR35212** et **MR35213**.

	Perméabilité à pH 7,4		
	logPe	Pe 10 ⁻⁶ cm.s ⁻¹	Conclusion
Corticostérone	-4,84 ± 0,02	14,36 ± 0,50	Diffuse
Théophylline	-6,52 ± 0,05	0,31 ± 0,04	Ne diffuse pas
MR35212	-10,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	Ne diffuse pas
MR35213	-4,39 ± 0,12	42,38 ± 12,26	Diffuse

3.2.4. Evaluation de la décarbamylation du composé **MR35213** en présence d'AChE

3.2.4.1. Mise en place du protocole expérimental

3.2.4.1.1. Développement de la méthode avec **MR35213**

Nous avons commencé par préparer une gamme d'étalonnage avec un mélange **MR35212** et **MR35213** (100, 50, 25, 10 et 0 μ M avec $r^2 > 0,99$) (Schéma 50, page 111). Ensuite les échantillons ont été préparés dans du tampon phosphate (TpP) à pH 7,4, et mis en réaction à 37 °C à différentes concentrations d'enzyme. Au bout de 2 h, la réaction est stoppée par ajout d'AcOEt qui est ensuite extrait et évaporé. Les produits sont mis en solution dans de l'ACN puis analysés par une HPLC (Tableau 16).

Tableau 16. Conditions expérimentales de décarbamylation de **MR35213**.

[AChE _{ee}] (U/mL)	0	0,1	0,25
[MR35213] (μ M)	100	100	100
Nombre d'équivalent d'AChE	0	5,9.10 ⁻⁵	1,5.10 ⁻⁴
Volume final (μ L)	500	500	500
Solvant	TpP	TpP	TpP
Temps (h)	2	2	2
Température (°C)	37	37	37

Malheureusement l'analyse HPLC des échantillons n'a pas permis de mettre en évidence l'apparition des dérivés phénoliques et donc de la décarbamylation (Figure 71). L'absence de témoin positif nous a poussés à étudier et développer la méthode à partir de la physostigmine, un inhibiteur de l'AChE de référence.

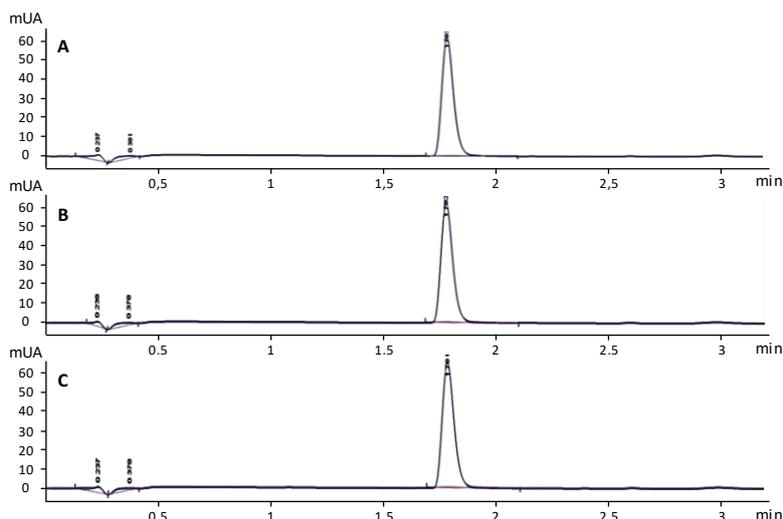


Figure 71. Essais de décarbamylation de **MR35213** par AChE(ee) ; (A) : **MR35213** (100 μ M) sans AChE(ee) (contrôle négatif) ; (B) : **MR35213** (100 μ M) en présence de 0,1 U/mL d'AChE(ee) ; (C) : **MR35213** (100 μ M) en présence de 0,25 U/mL d'AChE(ee) ; $\lambda = 330$ nm, incubation 37 °C, 2 h.

1.1.2.20.1. Développement de la méthode avec la physostigmine

De même que pour le premier test, une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère de physostigmine à 10 mM dans le DMSO, sans l'Eséroline (dérivé phénolique de la physostigmine) avec $r^2 > 0,99$.

Dans un premier temps nous avons décidé de multiplier la concentration en enzyme par 10 et de diviser la concentration de produit par 2, en gardant le même temps et la même température d'incubation. Nous avons ensuite continué à augmenter la concentration en enzyme tout en augmentant le temps d'incubation, toujours à 37 °C (Tableau 17).

Tableau 17. Conditions expérimentales de décarbamylation de la physostigmine.

[AChEee] (U/mL)	0	0,25	0	2,5	0	15	150
[Physostigmine] (μ M)	100	100	50	50	50	50	50
Nombre d'équivalent d'AChE	0	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0	$3,0 \cdot 10^{-3}$	0	$1,8 \cdot 10^{-2}$	0,18
Volume final (μ L)	500	500	500	500	500	500	500
Solvant	TpP	TpP	TpP	TpP	TpP	TpP	TpP
Temps (h)	2	2	2	2	18 h	18 h	18 h
Température (°C)	37	37	37	37	37	37	37

Aucune différence n'a été remarquée entre les différents tests et les témoins négatifs (Figure 72).

Heureusement, une méthode beaucoup plus détaillée a été décrite par Alix, F. *et al.*¹⁸³ Nous nous sommes donc basés sur ces travaux pour développer notre méthode, mais cette fois avec la rivastigmine.

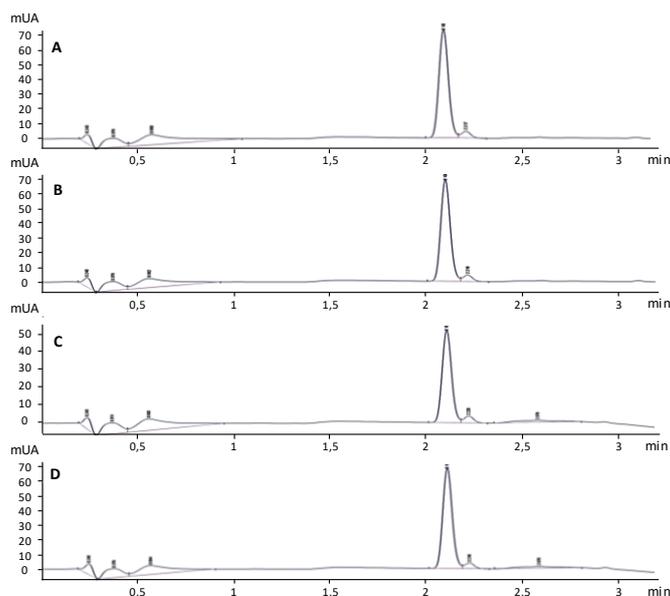


Figure 72 : Essais de décarbamoylation de la physostigmine par AChE(ee) ; (A) : Physostigmine (50 μ M) sans AChE(ee), incubation 37 $^{\circ}$ C, 2 h (contrôle négatif) ; (B) : Physostigmine (50 μ M) en présence de 0,25 U/mL d'AChE(ee), incubation 37 $^{\circ}$ C, 2 h ; (C) : Physostigmine (50 μ M) sans AChE(ee), incubation 37 $^{\circ}$ C, 18 h (contrôle négatif) ; (D) : Physostigmine (50 μ M) en présence de 0,25 U/mL d'AChE(ee), incubation 37 $^{\circ}$ C, 18 h ; λ = 247 nm.

1.1.2.20.2. Développement de la méthode avec la rivastigmine

Dans cette publication, la concentration en enzyme est nettement supérieure à celle que nous utilisons (196 U/mL au lieu de 150 U/mL) et une concentration en produit nettement inférieure (5 μ M au lieu de 50 μ M).

Une gamme d'étalonnage avec la rivastigmine, sans le 3-[(1S)-1-(diméthylamino)éthyl]phénol (dérivé phénolique de la rivastigmine), a été faite avec des concentrations de 50, 20, 10, 7,5, 5, 2, 1 et 0 μ M avec $r^2 > 0,99$. A 5 μ M l'absorbance de la rivastigmine est très faible, mais elle est détectable. Nous avons décidé de refaire ces tests, avec une concentration en AChE de 250 U/mL (large excès) pendant 18 h à 25 $^{\circ}$ C (Tableau 18).

Tableau 18. Conditions expérimentales de décarbamoylation de la rivastigmine.

[AChEee] (U/mL)	0	250
[RIV] (μ M)	5	5
Nombre d'équivalent d'AChE	0	3.0
Volume final (μ L)	250	250
Solvant	TpP	TpP
Temps (h)	18 h	18 h
Température ($^{\circ}$ C)	25	25

Les résultats de cette expérience sont très intéressants, car nous observons une disparition totale de la rivastigmine, et l'apparition d'un pic inconnu, très intense (Figure 73A) ; le témoin négatif, ne contenant que de la rivastigmine (Figure 73B). Un contrôle par analyse LCMS a permis de confirmer que la masse du produit obtenu correspondait bien à celle du métabolite de la rivastigmine. Nous avons donc confirmé notre méthode pour étudier les molécules synthétisées.

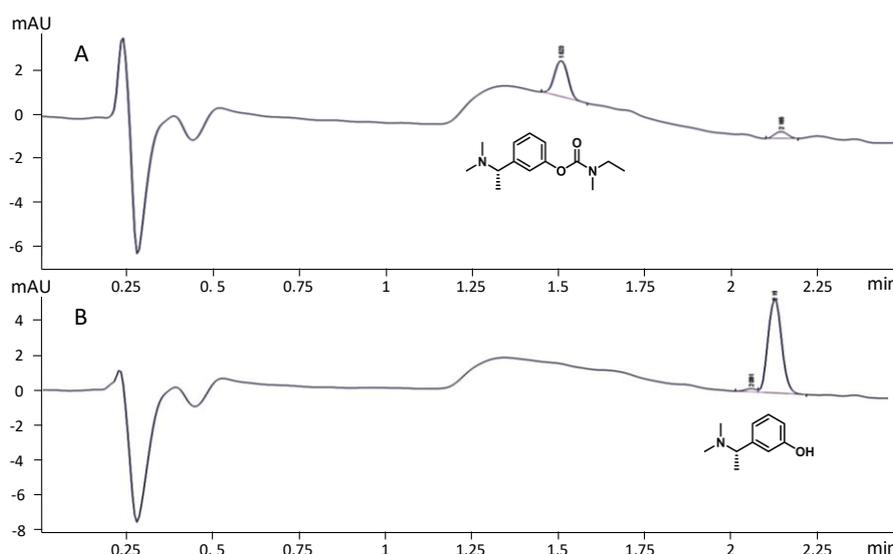


Figure 73. Décarbamylation de la rivastigmine par AChE(ee) ; (A) : rivastigmine (5 μM) sans AChE(ee) (contrôle négatif) ; (B) : rivastigmine (5 μM) en présence de 250 U/mL d'AChE(ee) ; λ = 265 nm, incubation 25 °C, 18 h.

3.2.4.2. Résultats de la décarbamylation de MR35213 en présence d'AChE(h)

En reprenant le protocole détaillé précédemment, les composés à 5 μM sont mis en solution à 25 °C, en présence de 250 U/mL d'enzyme pendant 18 h (Tableau 19).

Tableau 19. Conditions expérimentales de décarbamylation de la rivastigmine et de MR35213.

[AChEee] (U/mL)	Rivastigmine		MR35213	
	0	250	0	250
[Carbamate] (μM)	5	5	5	5
Nombre d'équivalent d'AChE	0	3,0	0	3,0
Volume final (μL)	250	250	250	250
Solvant	TpP	TpP	TpP	TpP
Temps (h)	18 h	18 h	18 h	18 h
Température (°C)	25	25	25	25

Le composé **MR35213** est quant à lui bien présent dans le témoin avec l'apparition d'un produit de dégradation inconnu (Figure 74C). En présence d'enzyme, nous obtenons la formation du composé **MR35212**, dont la masse a été confirmée par LCMS (Figure 74A). La concentration des phases aqueuses ne nous a pas apporté d'informations supplémentaires.

En conclusion, en présence d'AChE à 25 °C, à pH 7,4, le composé **MR35213** est hydrolysé et provoque la libération du composé **MR35212**. Cela permet en partie de confirmer notre hypothèse d'hydrolyse du carbamate.

Pour compléter les évaluations *in vitro* de ces molécules, plusieurs tests importants sont à envisager. Concernant l'interaction avec les ChE, quelques tests seraient intéressants : comme l'exploration de la cinétique de décarbamylation en variant le temps d'incubation des tests développés plus haut.

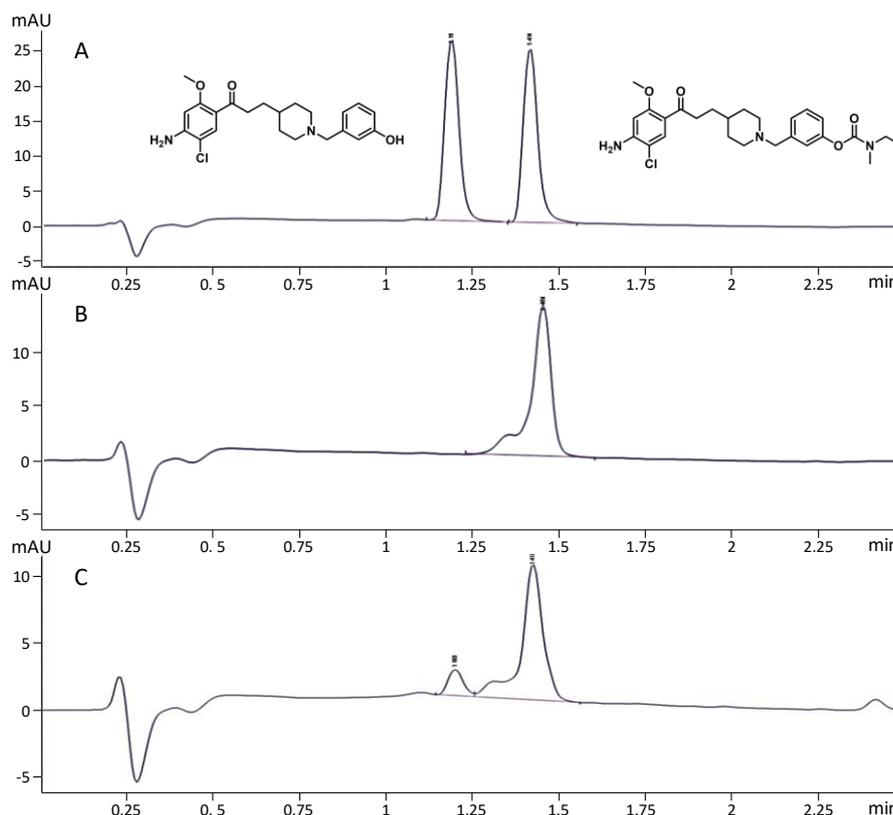
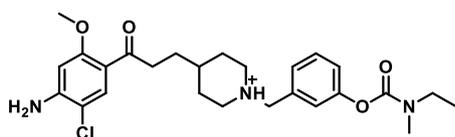


Figure 74. Décarbamylation de **MR35213** par l'AChE(*ee*) ; (A) : **MR35213** (5 μ M) et **22b** (5 μ M) sans AChE(*ee*) ; (B) : **MR35213** sans AChE(*ee*) (contrôle négatif). (C) : **MR35213** (5 μ M) en présence de 250 U/mL d'AChE (*ee*) ; $\lambda = 330$ nm, incubation 25°C, 18 h.

3.3. Résultats *in silico*

3.3.1. **MR35213**



Nous avons souhaité évaluer *in silico* si le dérivé carbamate **MR35213** pouvait accéder à la triade catalytique de l'AChE(*h*), notamment au résidu Ser203 jouant un rôle crucial lors de la

carbamoylation. Selon le mécanisme proposé de carbamoylation de la rivastagmine,²²⁶ l'approche du groupement carbamate vers la sérine commence par une liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène du groupe carbamate C=O et le groupe hydroxy de Ser203. Par conséquent, lors de l'étude d'amarrage de **MR35213** sur le site actif de l'AChE(*h*) (code PDB: 4EY7),⁷⁷ réalisée à l'aide du logiciel Gold 5.7.2 (v5.7.2, Centre de données cristallographiques de Cambridge, CCDC), une contrainte de liaison hydrogène entre le carbamate et le groupement hydroxyle de Ser203 a été appliquée. Parallèlement, la chaîne latérale de la Ser203 a été maintenue flexible pendant le docking. Les différentes poses générées de **MR35213** ont eu des scores de fit compris entre 85,44 et 100,64 et peuvent être divisées en deux groupes, se différenciant par la position du fragments méthoxyphényle et phényle. Dans le groupe 1 (Figure 75B), le groupe carbonyle a établi une liaison hydrogène avec la Ser293 en plus de

²²⁶ Bacalhau, P.; San Juan, A. A.; Goth, A.; Caldeira, A. T.; Martins, R.; Burke, A. J. *Bioorg. Chem.* **2016**, *67*, 105–109.

celle imposée ; dans le groupe 2 (Figure 75C), un π -stacking a été établi entre le noyau phénol de MR35213 et le noyau Tyr 337, ainsi qu'une éventuelle interaction *via* une liaison hydrogène entre le NH₂ de MR35213 et le C=O de Trp286.

MR35213 se situe dans le site actif de l'AChE avec le groupe carbamate à proximité de la Ser203, comme imposé par la contrainte, mais il est positionné beaucoup plus haut dans le site de liaison de l'AChE comparé au donépézil ou au donécopride (Figure 75).^{129,77} En conséquence, d'après nos résultats de modélisation moléculaire, MR35213 perd les interactions caractéristiques de la famille des ligands du donécopride, à savoir :

- Interaction entre NH⁺ du noyau pipéridine *via* la molécule d'eau située entre les groupes hydroxy de deux tyrosines (Tyr341 et Tyr337)
- Interaction *via* le groupe C=O avec le NH de la chaîne principale de Phe295
- Le fragment méthoxyphényle est placé un peu haut mais l'interaction *via* un π -stacking avec Trp286 reste possible.

D'autre part, le groupe C=O de MR35213 établit une nouvelle interaction *via* une liaison hydrogène avec le groupe hydroxy de la Ser293 dans le groupe 1. Ainsi, la partie « donécopride » liée au carbamate de MR35213 entraîne peu d'interactions en plus du groupe carbamate, et l'interaction avec le site de liaison AChE est réalisée principalement grâce au groupe carbamate.

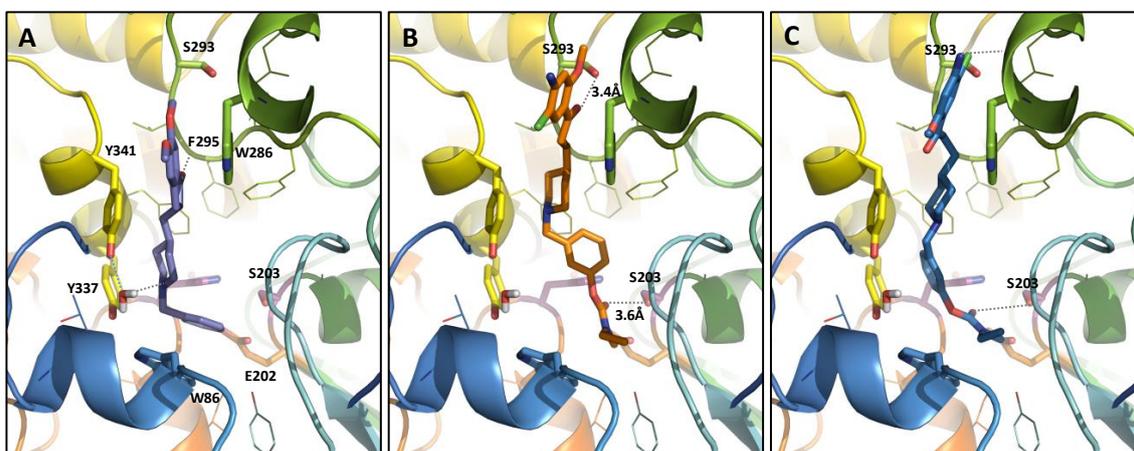
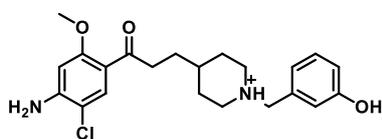


Figure 75. Position du donépézil à partir de la structure de rayon X (A) par rapport à MR35213 positionné dans les sites de liaison AChE(h) en utilisant les études de docking, groupe 1 (B) et groupe 2 (C). Le composé et les chaînes latérales des résidus sélectionnés du site de liaison sont représentés en bâtonnet et la protéine en ruban. Cette figure a été réalisée avec PyMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, États-Unis).

3.3.2. MR35212



Lors de l'étude du dérivé phénolique dans le site actif de l'AChE(h), nous avons utilisé la structure co-cristallisée avec le donépézil (4EY7),⁷⁷ comme dans l'étude du dérivé carbamate. L'acide

glutamique Glu202 a été protoné pour cette étude de docking. D'après nos calculs, le ligand MR35212 devrait être protoné au niveau de l'azote de la pipéridine.

Les résultats du docking prédisent que **MR35212** rentre de façon semblable, au donépézil et au donécopride dans le site actif. Il reproduit donc les interactions du donécopride dans le site actif de l'AChE :

- i. Interaction entre NH⁺ du noyau pipéridine *via* la molécule d'eau située entre les groupes hydroxy de deux tyrosines (Tyr341 et Tyr337)
- ii. Interaction *via* le groupe C=O avec le NH de la chaîne principale de Phe295
- iii. Interaction *via* un π -stacking avec Trp286.

Le docking a proposé deux orientations possible pour le groupement hydroxy (Figure 76). Lors de la première orientation, le groupement hydroxy est tourné vers Glu202 et une interaction par liaison H avec le résidu est possible. Ceci est un peu contradictoire avec les résultats des tests *in vitro* présentés après, où l'affinité de ce dérivé est moins bon que celle donécopride. Dans la seconde orientation, le groupement est situé dans la cavité sans établir une interaction particulière avec les résidus de la cavité.

Nous avons soumis les deux poses de **MR35212** à des simulations de dynamique moléculaire pour optimiser sa position. Ainsi la position du groupement hydroxy s'est tourné de l'autre côté et n'a pas d'interaction particulière par son intermédiaire avec le site actif. Cette conformation paraît logique vu les résultats *in vitro*.

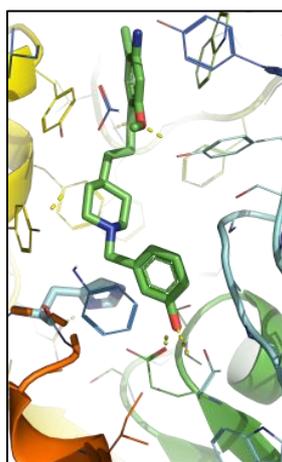


Figure 76. Position de **MR35212** positionné dans les sites de liaisons de l'AChE(h) en utilisant les études de docking. Le composé et les chaînes latérales des résidus sélectionnés du site de liaison sont représentés en bâtonnet et la protéine en ruban. Cette figure a été réalisée avec PyMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, États-Unis).

3.4. Résultats *in vivo*

De même que pour les molécules **MR35214** et **MR35215**, les molécules **MR35212** et **MR35213** ont été évaluées *in vivo* au laboratoire COMETE.

3.4.1. Screening pharmacologique et analyse de la toxicité

Quelle que soit la dose testée (1, 10 et 100 mg/kg), le dépistage toxicologique et pharmacologique préliminaire de **MR35212** n'a révélé aucun signe délétère, suggérant ainsi une LD₅₀ très supérieure à 100 mg/kg (Tableau 20).

A l'inverse, à une dose de 100 mg/kg, le composé **MR35213** présente des effets toxiques : une souris est décédée dans les 30 min après l'injection, et 3 autres souris ont présenté une forte hypomobilité et de forts tremblement (complètement réversible après 24 h). La LD₅₀ devrait donc être légèrement supérieur à 100 mg/kg.

Tableau 20. Propriétés pharmacologique et toxicologique de **MR35213** et **MR35212**.

Composé	Doses (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	Symptômes (doses toxiques)
MR35212	1-10-100	> 100	Pas de symptômes
MR35213	1-10-100	> 100	1-10 : pas de symptômes 100 : tremblement, hypomobilité, réversible en 24h
Amphétamine ¹	2	-	Hyperactivité, exophtalmie, irritabilité
Chlorpromazine ¹	10	-	Hypoactivité, ataxie, sommeil

¹Amphétamine (2 mg/kg) et chlorpromazine (10 mg/kg) sont utilisées respectivement comme références stimulantes et dépressives.

3.4.2. Activité locomotrice spontanée

Aucune des doses testées de **MR35212** et **MR35213** (1, 3 et 10 mg/kg) n'a cependant modifié l'activité locomotrice spontanée (Figure 77).

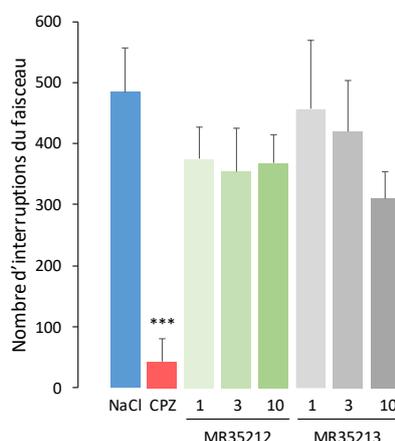


Figure 77. Effet de **MR35212** et **MR35213** sur l'activité locomotrice spontanée. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($n = 8$). Les médicaments ont été administrés par voie IP 30 minutes avant le test comportemental. Composés **MR35212** et **MR35213** : 1–3–10 mg/kg ; Chlorpromazine CPZ : 3 mg/kg (*** $p < 0,05$ NaCl, test SNK).

1.1.2.2.1. Mémoire de travail : alternance spontanée

Scopolamine : En ce qui concerne le déficit d'alternance spontanée induit par la scopolamine, un effet anti-amnésique a été observé après administration IP de **MR35212** uniquement de façon partielle à une dose de 1 mg/kg. Concernant le composé **MR35213**, nous obtenons un effet partiel aux doses de 1 et 10 mg/kg (Figure 78).

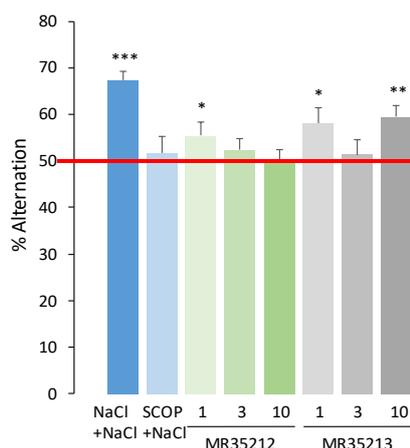


Figure 78. Effet de **MR35212** et **MR35213** sur la déficience induite par la scopolamine au cours du test de la réversion de l'alternance spontanée. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($n = 8$). Les médicaments ont été administrés en IP 30 minutes avant le test et la scopolamine a été administrée en SC 20 minutes avant le test. Composés **MR35212** et **MR35213** : 1–3–10 mg/kg ; Scopolamine : 0,5 mg/kg. (* $p < 0,5$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, test t univarié).

MK801 : En ce qui concerne le déficit de la mémoire de travail induit par ce composé, l'inversion de l'alternance spontanée a été observée après administration IP de **MR35212** de façon complète pour la dose de 3mg/kg. Concernant le composé **MR35213**, nous obtenons une inversion partielle à toutes les doses. Aucune toxicité n'est apparue pendant ce test (Figure 78).

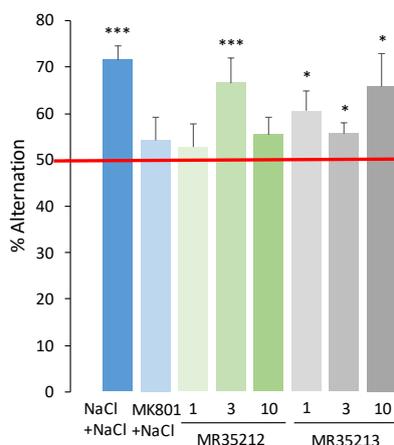


Figure 79. Effet de **MR35212** et **MR35213** sur la déficience induite par la scopolamine au cours du test de la réversion de l'alternance spontanée. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($n = 8$). Les médicaments ont été administrés en IP 30 minutes avant le test et la scopolamine a été administrée en SC 20 minutes avant le test. Composés **MR35212** et **MR35213** : 1–3–10 mg/kg ; MK801 : 0,1 mg/kg. (* $p < 0,5$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, test t univarié).

3.4.3. Conclusion

Le Tableau 21 permet de résumer ces résultats in vivo :

Tableau 21. Résumé des évaluations in vivo de **MR35212** et **MR35213**.

Composés	Screening (1, 10 et 100 mg/kg)	Activité locomotrice (1, 10 et 100 mg/kg)	Réversion de l'altération (1, 3 et 10 mg/kg)	
			SCOP	MK801
MR35212	✓	✓	Partielle à 1 mg/kg	Complète à 3 mg/kg
MR35213	LD ₅₀ ~ 100 mg/kg	✓	Partielle à 1 et 10 mg/kg	Partielle à 1, 3 et 10 mg/kg

Le dérivé **MR35212** bi- voire tripotent est dans la gamme de doses testées le plus intéressant (action marquée pour MK801 et dans une moindre mesure avec SCOP).

La prodrogue **MR35213** provoque donc une inversion partielle dans les deux tests à toutes les doses, et a donc une action supérieure au composé **MR35212**, qui n'est pas toujours actif et présente des incohérences (résultats positifs à 1 mg avec la scop et 3 mg avec le MK801).

Au vu de ces différents résultats nous pouvons dire que la prodrogue synthétisée satisfait à nos conditions : elle passe la BHE, est décarbamoylée de façon compétitive par l'AChE et permet l'inversion de la mémoire de travail des souris traitées par de la scop ou du MK801.

Ces premiers résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Molecules*.²²⁷

3.5. Projet TRIAD

3.5.1. Principe général

Comme nous l'avons vu précédemment, le projet TRIAD consiste à synthétiser des composés possédant trois activités : agoniste des 5-HT₄R avec un $K_i < 50$ nM, antagoniste des 5-HT₆R avec un $K_i < 100$ nM et inhibiteur de l'AChE avec une $IC_{50} < 500$ nM.

Le composé **48** présente deux de ces trois activités. En comparaison avec les travaux de Hatat *et al.*, seule la présence du phénol en position 3 permet d'avoir une triple activité. Les molécules ayant un phénol en position 2 et 4 sont uniquement inhibiteurs de l'AChE avec des IC_{50} étant respectivement de 57,4 et 6,0 nM.¹⁶⁶

Au vu des ressemblances structurales entre **48** et **18** (idalopirdine), nous avons décidé d'étudier l'influence du groupement tétrafluoropropyl en le fixant sur le phénol du composé **48** (Figure 80).

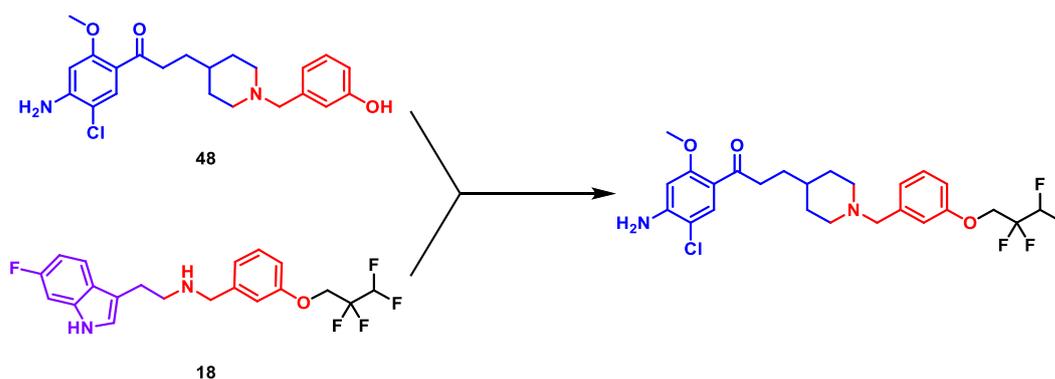


Figure 80. Compromis structurale entre **48** et **18**.

3.5.2. Accès synthétique

Pour la partie RS, nous utilisons le précurseurs **32**. Pour la partie benzylique nous partons du composé **16** synthétisé dans le chapitre précédent (Schéma 31), à partir duquel, dans des conditions identiques

²²⁷ Toublat, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Hatat, B.; Davis, A.; Since, M.; Corvaisier, S.; Freret, T.; Sopkova de Oliveira Santos, J.; Claeysen, S.; *et al. Molecules* **2019**, 24 (15), 2786.

décrites dans le Schéma 47, nous obtenons le composé **57** puis le précurseur **58** avec de bons rendements (Schéma 51).

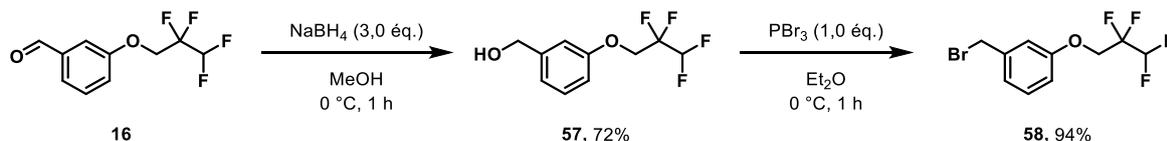


Schéma 51. Synthèse du précurseur **58**.

Le composé **32** est déprotégé par du TFA dans le DCM, et est *N*-alkylé par l'halogénure **58** (Schéma 52), formant ainsi le composé final **59**, avec un rendement de 59%.

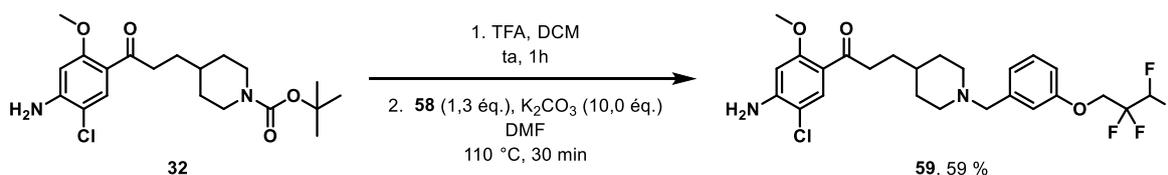


Schéma 52. Synthèse du composé final **59**.

3.5.3. *Evaluation biologique in vitro*

Trois tests ont été effectués : l'inhibition de l'AChE, l'interaction avec les 5-HT₄R et les 5-HT₆R.

D'après les résultats présentés dans le Tableau 22, le composé **59** est uniquement un ligand des récepteurs 5-HT₆. L'alkylation du phénol par un groupement autre qu'un carbamate, fait perdre à celui-ci ses autres activités sur AChE et 5-HT₄. Ceci a été aussi décrit par le Dr. Hatat avec un dérivé méthoxy en 3, qui n'est actif que sur 5-HT₆.

Tableau 22. Activité inhibitrice sur l'AChE(h) (% inhibition ou IC₅₀), affinité sur les 5-HT₄R et les 5-HT₆R (% inhibition ou K_i) de **59**.

Composé	X	AChE(h)	5-HT ₄ R(h)	5-HT ₆ R(h)
		IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M	K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M	K _i (nM) (n=3) % inh. 10 ⁻⁶ M / 10 ⁻⁸ M
DPZ	-	7,0 ± 1,5	-	-
RS67333	-	403 ± 86 ¹	5,1 ± 0,5 ¹	-
SB271046	-	-	-	3,0 ± 0,7 ²
48	H	148,6 ± 34,9 82 %	5,1 ± 1,1 103 % / 79 %	422,0 ± 27,0 70 % / 10 %
59	CH ₂ CF ₂ CHF ₂	n.d. 26%	n.d. 81% / 3%	73,2 ± 22 104% / 24%

Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; Les valeurs de K_i sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences ; ¹Données de la réf. [128] ; ²Données de la réf. [137].

4. Conclusion

En conclusion de cette première partie concernant la synthèse et l'évaluation biologique de prodrogues multicibles inhibitrices des cholinestérases et ligands des récepteurs sérotoninergiques, plusieurs résultats se sont montrés positifs.

L'objectif de cette partie était de synthétiser des promédicaments uniquement inhibiteur des ChE pouvant libérer suite à l'action de ces enzymes, un métabolite actif sur une autre cible thérapeutique.

Pour la première série chimique, les molécules dérivées de l'idalopirdine **MR35215** et **MR35214** sont bien respectivement inhibitrices de la BuChE et ligands des récepteurs 5-HT₆. L'analyse du profil pharmacologique de **MR35214** a montré que ce composé est un agoniste inverse des 5-HT₆R. De plus **MR35215** est un bon inhibiteur mixte de la BuChE dont les essais de décarbamoxylation ont prouvé que ce composé était instable en présence de l'enzyme.

Le couple ne présente aucune toxicité et n'altère pas l'activité locomotrice. Dans le test de l'alternance spontanée, les résultats varient suivant la molécule utilisée (scopolamine et MK801). En présence de scopolamine, **MR35214** est complètement inactif, et l'inversion est partielle à 1 et 10 mg/kg en présence de MK801. A l'inverse, en présence de scopolamine, l'inversion avec **MR35215** est partielle à 10 mg/kg. En présence de MK801, cette molécule est complètement inefficace. Il est donc difficile de conclure sur les résultats de ces deux molécules.

Pour la seconde série chimique, les molécules synthétisées et dérivées du composé **MR33327** ont toutes montré de bons résultats *in vitro* dans les séries amide et ester. Les dérivés cétoniques ont été plus intéressants car le composé **MR35212** (potentiel métabolite de **MR35213**) est actif sur 3 cibles thérapeutiques d'intérêt dans la maladie d'Alzheimer. Les analyses complémentaires de leur fumarate ont montré que **MR35213** libère **MR35212** en présence d'AChE, grâce à une méthode d'analyse développée au cours de cette thèse. De plus l'étude du profil pharmacologique a permis de montrer que **MR35212** est un agoniste partiel des récepteurs 5-HT₄ et un faible antagoniste des récepteurs 5-HT₆.

Les analyses *in vivo* ont permis de montrer que les LD₅₀ de **MR35212** et **MR35213** sont respectivement supérieures à 100 mg/kg et proche de 100 mg/kg, et ces deux molécules ne perturbent pas l'activité locomotrice des souris. L'étude de la mémoire de travail pour le test d'alternance spontanée s'est montrée concluante. En effet les résultats pour **MR35213** montrent une inversion partielle à quasiment toutes les doses testées (sauf 3 mg/kg avec la scop). A l'inverse le dérivé **MR35212** n'est efficace qu'à 1 mg/kg avec la scop et à la dose de 3 mg/kg avec MK801. La variabilité de ces résultats

vient sans doute du fait que la molécule ne passe pas la BHE de manière passive, justifiant ainsi l'intérêt de la prodrogue.

Ces premiers résultats nous ont encouragé à poursuivre notre stratégie des prodrogues. Comme nous l'avons vu, cette partie avait pour but de rendre actif le métabolite de la rivastigmine, mais ceci pose une limite structurale pour les molécules synthétisées : amine ionisable à pH physiologique, qui possèdent en méta un groupement carbamate. Pour se soustraire de cette limitation nous nous sommes intéressés à la synthèse de ligands autoimmolables que nous allons présenter dans le chapitre suivant.

*Chapitre 4. Ligands autoimmolables : les nouvelles
prodrogues pléiotropes*

La deuxième partie de mon travail a consisté à étendre le concept de prodrogues inhibitrices de ChE avec une libération de substances actives. Mais dans cette partie, la structure des substances actives ne possède pas d'analogie structurale avec la rivastigmine (azote protonable à distance adéquate du groupement carbamate).

Pour cela nous proposons de développer un autre type de prodrogues, déjà décrit dans d'autres aires thérapeutiques comme en oncologie, mais jamais étudié dans la maladie d'Alzheimer : les ligands autoimmolables.²²⁸

1. Ligands autoimmolables : concept, définition et exemples

1.1. Généralités

Les ligands autoimmolables (ou *self-immolative linker* en anglais) sont des prodrogues tripartites composées d'une amorce (*trigger*), d'un connecteur ou espaceur (*linker* ou *spacer*) et une unité effectrice (*effector unit*).²²⁹ Ils ont été décrits pour la première fois en 1981 par Carl *et al.*²³⁰ La fonction principale du linker est de libérer la substance active après l'activation de la prodrogue *via* une décomposition chimique spontanée. En effet, ce type de prodrogue conduit à la libération du composé actif par un processus en 2 étapes : il commence par une activation chimique (oxydation, réduction, pH) ou enzymatique (hydrolase, estérase) du *trigger*. Vient ensuite la rupture chimique spontanée du *linker* permettant la libération du composé actif.²³¹ Les réactions faisant suite à l'activation du trigger sont de plusieurs ordres : élimination, cyclisation, double élimination ou élimination / cyclisation.²³¹

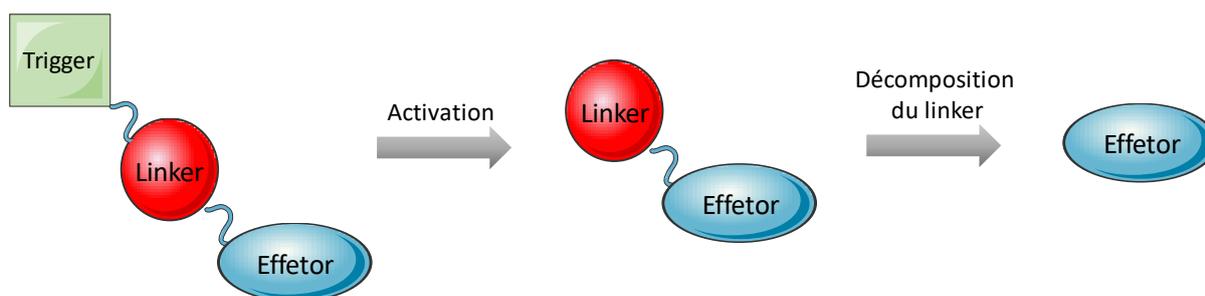


Figure 81. Description schématique de la dégradation d'un ligand autoimmolable.

Les différents processus peuvent être induits par différentes fonctions chimiques impliquant des atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre : phénol, énon, amine, énamine, hydroxylamine, sulfure, notamment. Ceux-ci vont libérer divers composés chimiques tels que des méthide quinones (dont nous

²²⁸ Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. Self-Immolative Dendrimers. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, 42 (37), 4494–4499.

²²⁹ Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J. C.; Gesson, J. P. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2002**, 2 (2), 155–185.

²³⁰ Carl, P. L.; Chakravarty, P. K.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Med. Chem.* **1981**, 24 (5), 479–480.

²³¹ Tranoy-Opalinski, I.; Fernandes, A.; Thomas, M.; Gesson, J.-P.; Papot, S. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2008**, 8 (6), 618–637.

allons parler par la suite) ou des aza-xylylènes. Au cours de cette étude nous nous intéressons principalement au linker de type méthide quinone dont l'utilisation et le principe sont détaillés ci-dessous.

1.1.1. Réaction d'élimination

Les réactions d'élimination se traduisent par une délocalisation électronique partant du trigger et entraînant la libération du substance active. Ceci conduit ainsi à la formation d'une *o*-méthide quinone ou une *p*-méthide quinone. Il existe 3 types d'éliminations : élimination 1,4,²²⁸ élimination 1,6²³² et élimination 1,8²³³ (Schéma 53).

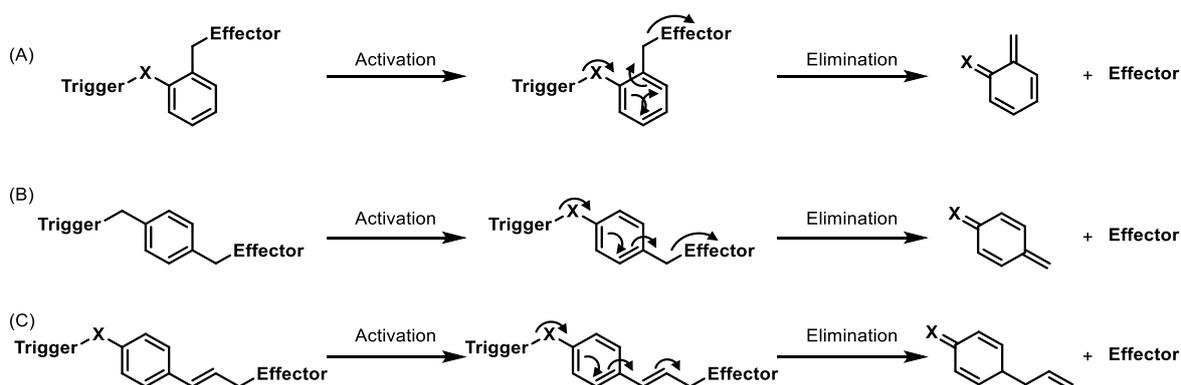


Schéma 53. Réactions d'élimination des ligands autoimmolables : A. élimination 1,4 ; B. élimination 1,6 ; C. élimination 1,8.

La Figure 82 représente des exemples des formes mésomères du phénate, permettant de comprendre pourquoi la substance active doit être en position *ortho* ou *para* de celui-ci.

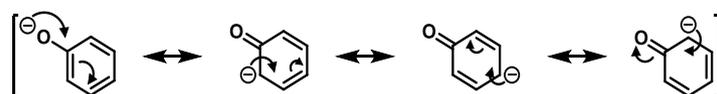


Figure 82. Formes mésomères du phénate après décarbamoxylation.

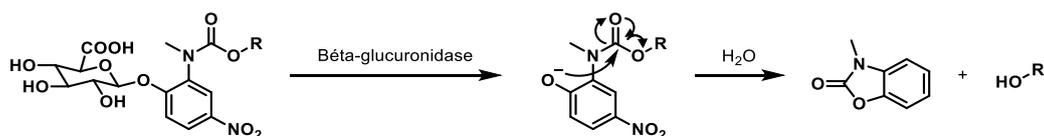
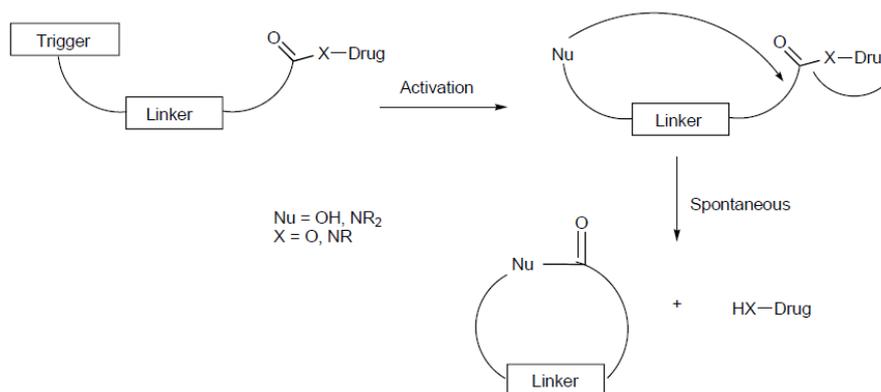
1.1.2. Réactions de cyclisation

Au-delà des réactions d'élimination, des réactions de cyclisation intramoléculaire permettent de libérer le métabolite actif. Cette stratégie consiste en la présence d'un groupe nucléophile qui une fois activé, attaque un carbonyle auquel est accroché le métabolite (Schéma 54).

Nous pouvons citer l'exemple de la β -glucuronidase qui suite à son action permet une cyclisation du linker provoquant la libération de l'effecteur actif (Schéma 55).²³¹

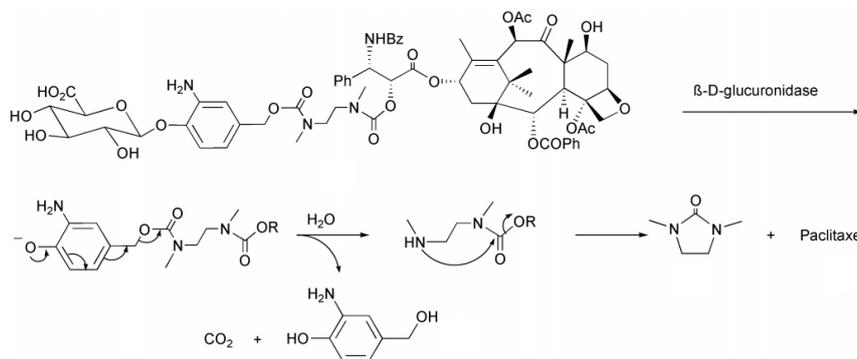
²³² Park, J.; Kim, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (8), 2332–2335.

²³³ Damen, E. W. P.; Nevalainen, T. J.; van den Bergh, T. J. M.; de Groot, F. M. H.; Scheeren, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10 (1), 71–77.



1.1.3. Réactions d'élimination/cyclisation ou cyclisation/élimination

Une autre possibilité est de fusionner ces 2 mécanismes : élimination puis cyclisation, comme c'est le cas des prodrogues du paclitaxel (Schéma 56).²³⁵ Il s'agit toujours ici du même système de relargage mais avec un espaceur supplémentaire.



A l'inverse, des prodrogues telles que celles de la doxorubicine provoquent la libération du composé actif après cyclisation suivie d'une élimination (Schéma 57).^{236,237}

Un autre concept a été développé par de Groot *et al.*, qui concerne l'utilisation de linkers dendritiques qui à la suite d'une activation, permet de libérer plusieurs substances actives par une double

²³⁴ Hutchins, J. E. C.; Fife, T. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (7), 2282–2286.

²³⁵ Bouvier, E.; Thiroit, S.; Schmidt, F.; Monneret, C. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (19), 3343–3352.

²³⁶ Gopin, A.; Pessah, N.; Shamis, M.; Rader, C.; Shabat, D. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (3), 327–332.

²³⁷ Amir, R. J.; Popkov, M.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F.; Shabat, D. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (28), 4378–4381.

élimination.²³⁸ De même Blencowe *et al.* ont créé des ligands qui une fois activés permettent de libérer trois molécules (Schéma 58).²³⁹

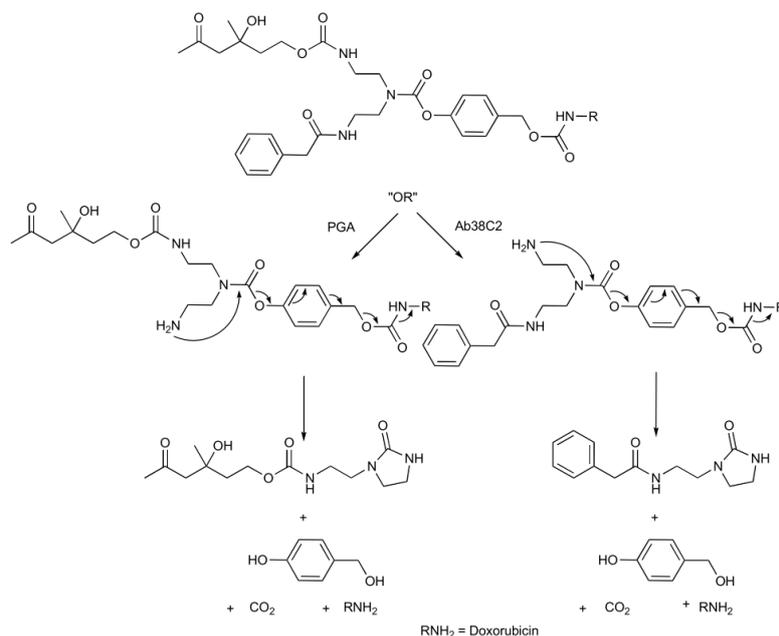


Schéma 57. Réaction de cyclisation suivie d'une élimination permettant la libération de doxorubicine.²³¹

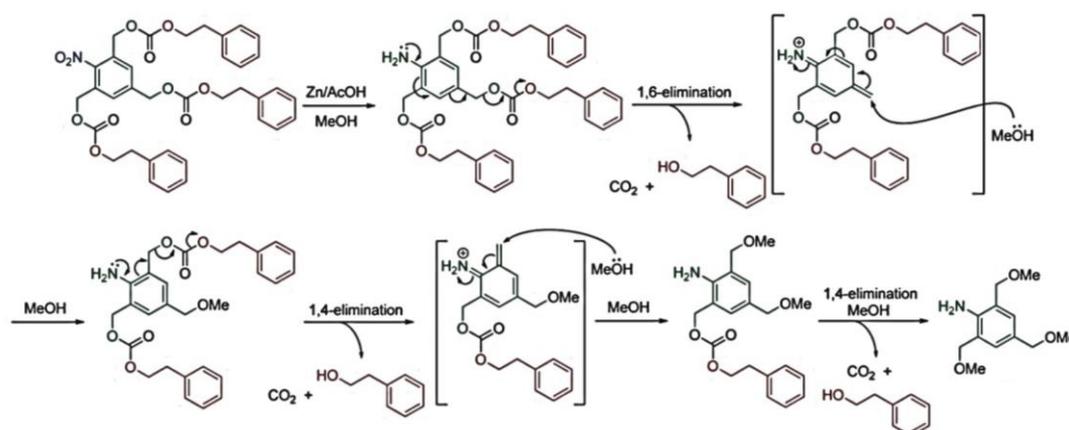


Schéma 58. Cascade d'élimination suivant la publication Blencowe *et al.*²³⁹

Ce mécanisme peut être expliqué par la réactivité des méthide quinones.

1.1.4. Réactivité des méthide quinones

1.1.4.1. Toxicité

La majorité des exemples cités précédemment conduisent à la libération de méthide quinones, composés réactifs dont l'éventuelle toxicité a été étudiée. Ces dernières ont en effet une forte analogie avec les quinones et la NAPQI (*N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine), métabolite toxique du paracétamol (Figure 83).

²³⁸ Groot, F. M. H.; Albrecht, C.; Koekkoek, R.; Beusker, P. H.; Scheeren, H. W. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, 42 (37), 4490–4494.

²³⁹ Blencowe, C. A.; Russell, A. T.; Greco, F.; Hayes, W.; Thornthwaite, D. W. *Polym. Chem.* **2011**, 2 (4), 773–790.

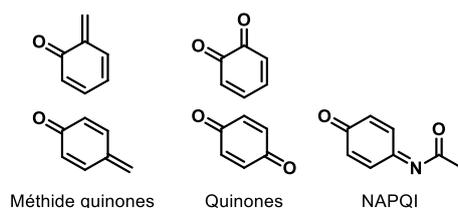


Figure 83. Comparaison des structures des méthide quinones, quinones et de la NAPQI.

Les *o*-quinones ont des activités biologiques variées : détoxification, chimioprévention et toxicité. Elles peuvent épuiser le GSH provoquant un stress oxydant ou une alkylation des protéines (PSH), induisant une activité chimiopréventive. Les effets toxiques résultent des adduits / oxydations de l'ADN qui entraînent une mutagenèse et l'inhibition de l'enzyme du cytochrome P450 ou de l'alkylation de protéines (Schéma 59).^{240,241}

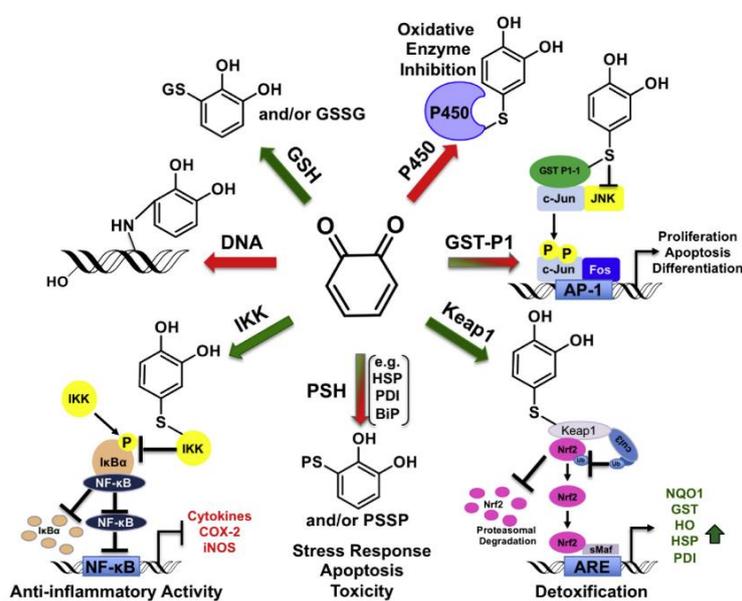


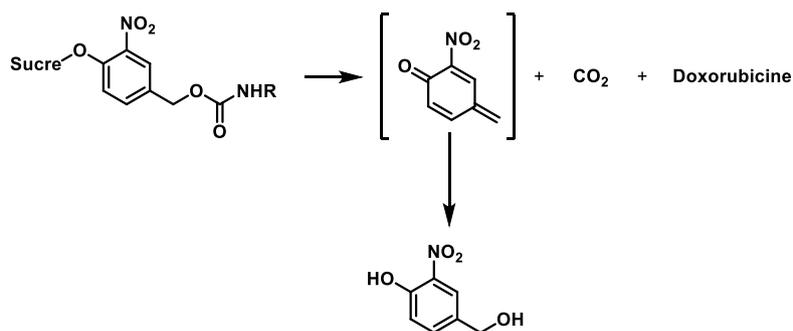
Schéma 59. Cibles biologiques des *o*-quinones.²⁴¹

Des études de toxicité ont ainsi été effectuées sur les méthide quinones. Par exemple, Azoulay *et al.* ont synthétisé une prodrogue de la doxorubicine qui à la suite de son activation va libérer une nitro-méthide quinone. Le but de ce travail était d'étudier l'influence de la méthide quinone sur la β -glucuronidase, enzyme cible de la doxorubicine. Il a été montré que celle-ci n'était pas un inhibiteur réversible de cette dernière et subissait une hydrolyse en nitro-hydroxyméthylphénol dans des conditions physiologiques (Schéma 60).²⁴²

²⁴⁰ Bolton, J. L.; Dunlap, T. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30* (1), 13–37.

²⁴¹ Bolton, J. L.; Dunlap, T. L.; Dietz, B. M. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *120* (April), 700–707.

²⁴² Azoulay, M.; Chalard, F.; Gesson, J.-P.; Florent, J.-C.; Monneret, C. *Carbohydr. Res.* **2001**, *332* (2), 151–156.



Ne réagit pas sur la bêta-glucuronidase

Schéma 60. Etude de la toxicité des nitro-méthide quinones.

D'autres études, à l'inverse, tendent à montrer la toxicité de ces molécules qui induiraient des modifications covalentes de l'ADN et de certaines protéines.²⁴³ Judy L. Bolton résume la situation actuelle par le titre de sa publication : *Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection?*²⁴⁴ La toxicité ou les effets protecteurs seront donc à étudier.

1.1.4.2. Hydrolyse des méthide quinones

L'hydrolyse des méthide quinones permet d'expliquer le mécanisme d'action de la prodrogue présentée dans le Schéma 58 : suite à la première élimination 1,6, la méthide quinone libérée est hydrolysée, permettant la réactivation du linker, entraînant une seconde élimination et ainsi de suite. Ceci est détaillé dans le Schéma 61 qui montre l'intérêt de l'hydrolyse dans la réactivation du linker.

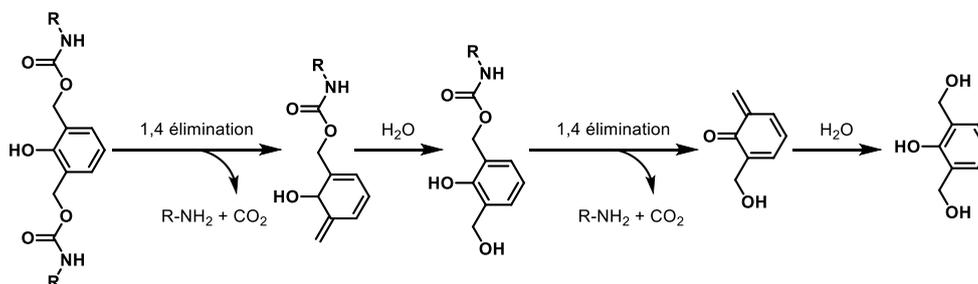


Schéma 61. Importance de l'eau dans les réactions d'élimination en chaîne.²²⁸

1.2. Applications

Ce système tripartite peut être utilisé dans de nombreux domaines. Nous pouvons citer l'aide au diagnostic clinique, comme la détection de sulfure d'hydrogène, du peroxyde d'hydrogène, des phosphatases alcalines ou encore du glutathion.²⁴⁵ Mais comme cité précédemment avec les

²⁴³ Wang, P.; Song, Y.; Zhang, L.; He, H.; Zhou, X. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (24), 2893–2913.

²⁴⁴ Bolton, J. *Org. Chem.* **2014**, *18* (1), 61–69.

²⁴⁵ Yan, J.; Lee, S.; Zhang, A.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (18), 6900–6916.

prodrogues du paclitaxel et de la doxorubicine, le principal axe de recherche et de développement concerne la synthèse de composés anticancéreux.^{246,247,248}

Ce système a aussi permis de développer des molécules à visées antibactériennes et antivirales.²⁴⁹ Actuellement dans la MA, aucune molécule thérapeutique basée sur ce concept n'a été décrite, mais uniquement quelques molécules à visée diagnostique en détectant la présence de ERO (H₂O₂)²⁵⁰ ou de H₂S.²⁵¹

1.3. Explication du projet

Comme nous l'avons précisé ci-dessus, la libération des molécules actives décrites dans le chapitre 3, présentent quelques limites. La principale limite est structurale : en effet le composé libéré actif doit posséder un phénol, qui en *méta* de celui-ci doit présenter une amine ionisable à pH physiologique. Les ligands autoimmolables permettraient donc de s'affranchir de cette contrainte. En partant d'une structure inspirée de la rivastigmine, il suffirait de fixer une seconde substance active en *ortho* ou *para* du carbamate, par une liaison éther, amine, carbamate ou soufré. Suite à l'action d'une cholinestérase, la libération d'un phénate provoquerait alors une délocalisation électronique (élimination 1,4 ou élimination 1,8) permettant la libération d'un composé actif, ainsi qu'une diméthylamino-méthide-quinone, potentiellement inactive (Figure 84).²⁴³

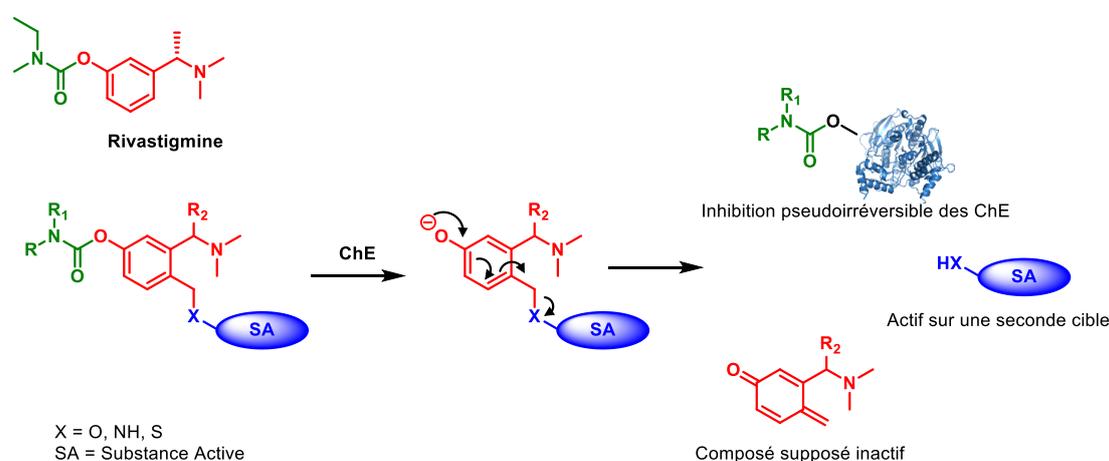


Figure 84. Prodrogues pléiotropes autoimmolables, la second substance active en position para du carbamate.

Ce chapitre sera divisé en trois parties : une première partie où nous essaierons de prouver le concept en synthétisant des molécules simples, sans amine, permettant de montrer la libération du composé

²⁴⁶ Acton, A. L.; Leroux, F.; Feula, A.; Melia, K.; Sambrook, M. R.; Hayes, W.; Russell, A. T. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (36), 5219–5222.

²⁴⁷ Davies, S.; Oliveira, B. L.; Bernardes, G. J. L. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17 (23), 5725–5730.

²⁴⁸ Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Bloomfield, A.; Dorton, R.; Nelson, M.; Vetzal, M.; Kleindl, P.; Hahn, S.; Wang, K.; Vlahov, I. R. *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30 (6), 1805–1813.

²⁴⁹ Kock, A.; Zuwala, K.; Smith, A. A. A.; Ruiz-Sanchis, P.; Wohl, B. M.; Tolstrup, M.; Zelikin, A. N. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (93), 14498–14500.

²⁵⁰ Lin, V. S.; Chen, W.; Xian, M.; Chang, C. J. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (14), 4596–4618.

²⁵¹ Seven, O.; Sozmen, F.; Simsek Turan, I. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, 239, 1318–1324.

secondaire en milieu basique. Par la suite nous présenterons les tentatives de synthèse des composés actifs en position *para* du carbamate et enfin une dernière partie qui présentera la synthèse des composés fixés en position *ortho*. Les différentes synthèses permettront ainsi d'obtenir des composés MTDL actifs sur deux cibles thérapeutiques. Ce même concept pourra en outre être appliqué à la préparation de senseur de l'activité de cholinestérases en libérant un fluorochrome après activation par les cholinestérases. Nous nous sommes inspirés du travail de Wang *et al.* qui ont utilisé des fluorochromes couplés à un inhibiteur de l'AChE pour visualiser l'activité de AChE dans le cerveau de souris stressées.²⁵² Des dérivés de la coumarine seront ici utilisés comme fluorochrome. Les molécules possédant une coumarine peuvent aussi être considérées comme MTDL. En effet ces molécules sont actuellement des scaffolds ayant une activité inhibitrice des monoamine oxydases B et anti-A β .²⁵³

2. Preuve de concept

Notre objectif est de démontrer, à partir de molécules simples, que la décarbamoxylation permet de relarguer 2 produits : *para* ou *ortho* méthide quinone, et un produit secondaire.

Dans un premier temps et pour faciliter les tests, nous fixerons sur l'hydroxybenzaldéhyde un composé secondaire, un fluorochrome, 4-(trifluorométhyl)-2*H*-chromen-2-one (TFMU). En tout 6 produits seront synthétisés : une série éthylméthylcarbamate avec le TFMU fixé en position *ortho* ou *para*, mais aussi en *méta* qui servira de témoin négatif ; et une série diméthylcarbamate qui comprendra aussi un TFMU fixé en *ortho*, *méta* ou *para* (Schéma 62). Nous utilisons le TFMU comme Hakamata *et al.* qui décrivent l'intérêt de l'utilisation de fluorochromes pour valider le mécanisme d'action de leurs molécules. Suite à l'action d'une estérase qui va cliver leurs prodrogues, un fluorochrome tel que le TFMU va être libéré, l'analyse étant donc réalisée par fluorescence.²⁵⁴

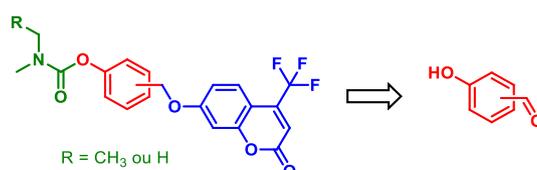


Schéma 62. Rétrosynthèse des 6 composés servant à prouver le concept.

Nous nous basons sur les réactions qui ont permis de synthétiser le composé **44**, à savoir une carbamoxylation d'un hydroxybenzaldéhyde, une réduction du carbonyl avec du NaBH₄ et enfin une bromation de l'alcool primaire avec du PBr₃. La dernière étape correspond à une *O*-alkylation avec le TFMU (Schéma 63).

²⁵² Wang, X.; Li, P.; Ding, Q.; Wu, C.; Zhang, W.; Tang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (5), 2061–2068.

²⁵³ Huang, M.; Xie, S.-S.; Jiang, N.; Lan, J.-S.; Kong, L.-Y.; Wang, X.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (3), 508–513.

²⁵⁴ Hakamata, W.; Tamura, S.; Hirano, T.; Nishio, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (4), 321–325.

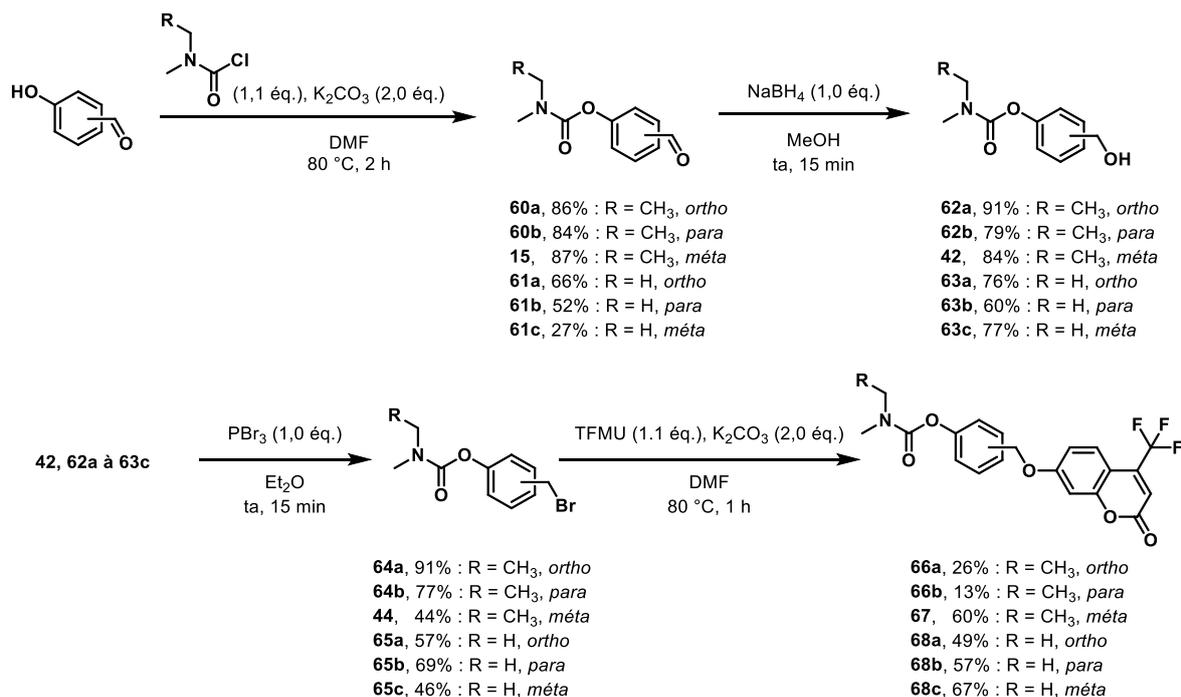


Schéma 63. Synthèse des composés **66a-b**, **67** et **68a-c**.

1.1. Décarbamylation en milieu basique

Le principe est simple : provoquer de façon chimique une décarbamylation, puis suivre par LCMS, et confirmer par RMN, la libération du TFMU ainsi que **69** ou **70**, pour les composés possédant un groupement en *ortho* (**66a** et **68a**) et *para* (**66b** et **66b**) du carbamate (Schéma 64).

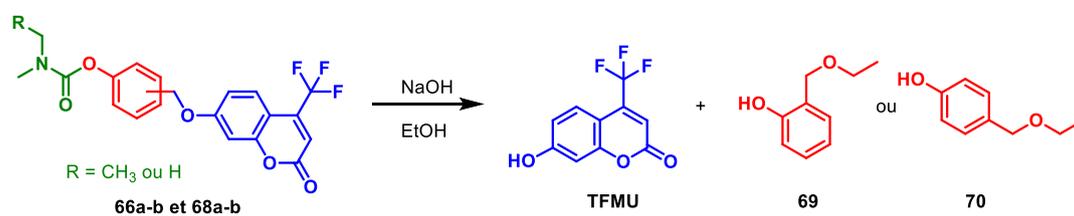


Schéma 64. Principe de la décarbamylation chimique de **66a-b** et **68a-b**.

Le but est aussi de montrer que la décarbamylation des composés *méta* **67** et **68c** ne provoque pas de délocalisation électronique conduisant à la libération de TFMU, mais uniquement le produit **A** (Schéma 65).

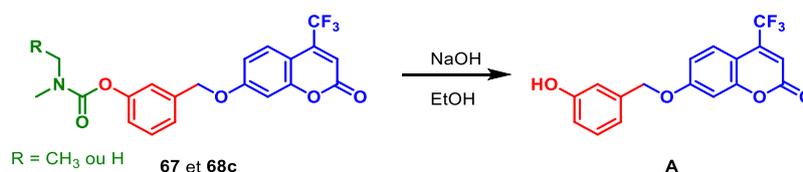


Schéma 65. Principe de la décarbamylation chimique de **67** et **68c**.

Pour effectuer la décarbamylation de façon optimale, les composés sont dilués dans l'éthanol et chauffés à 50 ou 70 °C, pour favoriser la solubilisation du produit.²⁵⁵ Après 5 min, 10 équ. d'hydroxyde

²⁵⁵ Deng, X.; Guan, Y.-Q.; Huo, N.-N.; Wang, Y.-J.; Lv, H.; Zhang, X.-M. *Synthesis (Stuttg)*. **2017**, 49 (16), 3726–3730.

de sodium sont ajoutés à la solution. Nous faisons des analyses des spectres LCMS à différents temps : matière première, après ajout de NaOH t_0 , 30 min, 2 h, 18 h et 1 weekend pour certaines réactions.

Après un temps défini spécifique au produit testé, le solvant est évaporé, et le brut est analysé par RMN. Nous effectuons ensuite des extractions/lavages en milieu acide, neutre puis basique. Tous les composés extraits sont analysés par RMN. Je ne présenterai ici que 3 molécules (*méta*, *para* et *ortho*), les spectres LCMS et la finalité des autres composés leur étant identiques.

2.1.1. *Méta*

Nous allons analyser le comportement de **67** (comportement identique pour **68c**). La réaction suit le protocole ci-dessus, à une température de 70 °C pendant 72 h. Une température élevée et un temps long permettent de confirmer la stabilité de la molécule. Le suivi LCMS est présenté dans la Figure 85 et le Schéma 66 représente les différents produits chimiques détectés.

En bas de la Figure 85, le composé **67** avant la réaction a un temps de rétention de 5,04 min (violet). Juste après l'ajout de NaOH, le composé est quasiment et instantanément consommé, la soude à cette température induisant une saponification ($t_R = 4,51$ min, rouge) : cette molécule n'a pas été isolée. Nous pouvons remarquer qu'une petite quantité de produit **71** commence à se former ($t_R = 4,05$ min, vert). Après 72 h d'incubation, la réaction est terminée, le milieu ne contenant que le produit final **71** ainsi que quelques petites impuretés. Le solvant a été évaporé et le brut analysé en RMN dans le D₂O, permettant de confirmer la structure du produit attendu **71**. La décarbamoxylation ne provoque donc pas de libération d'un produit secondaire lorsque celui-ci est positionné en position *méta* du carbamate.

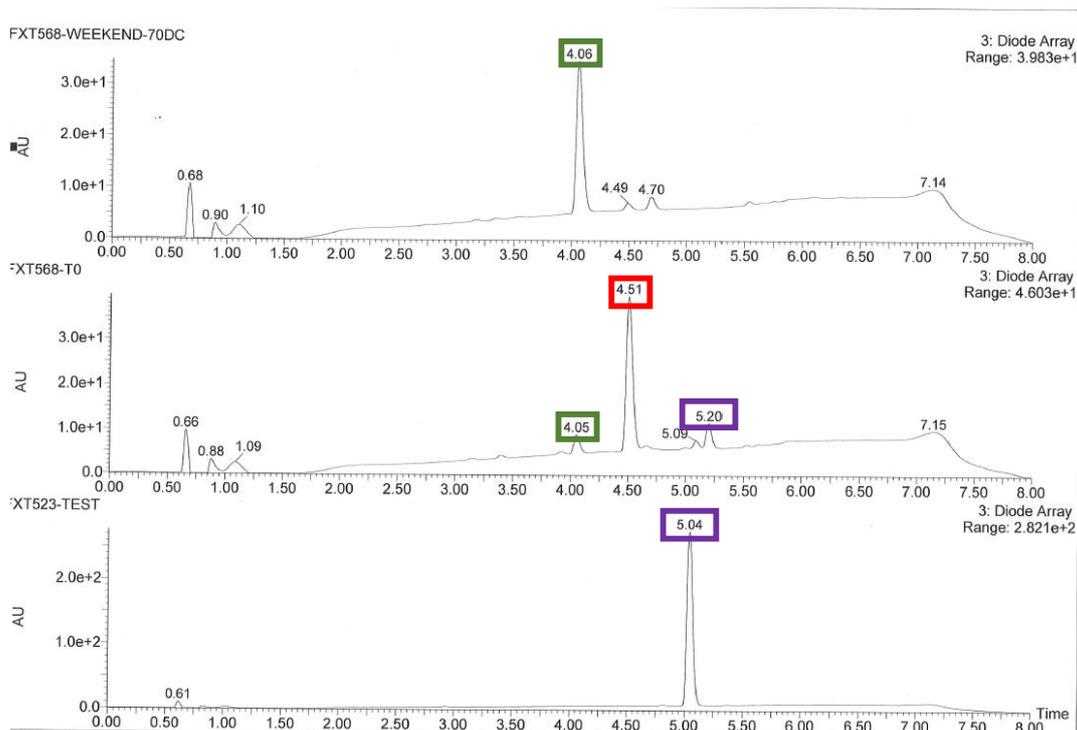


Figure 85. Suivi LCMS de la décarbamoylation de **67**.

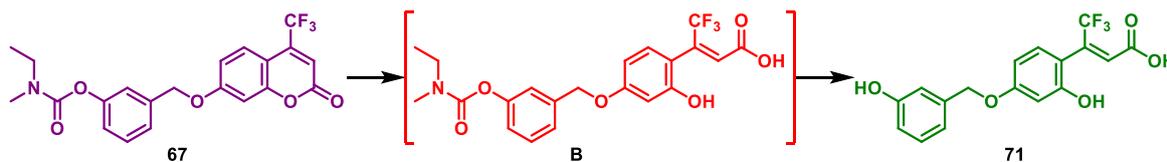
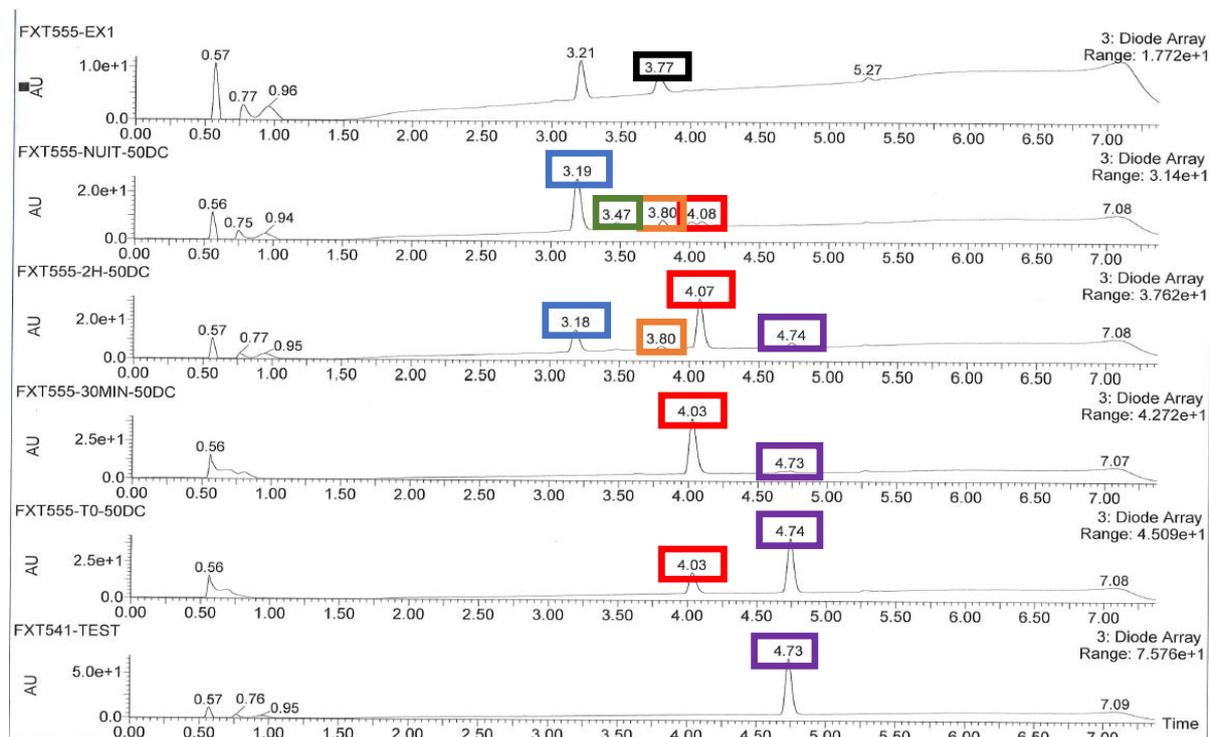


Schéma 66. Schéma de décarbamoylation de **67**.

2.1.2. Para

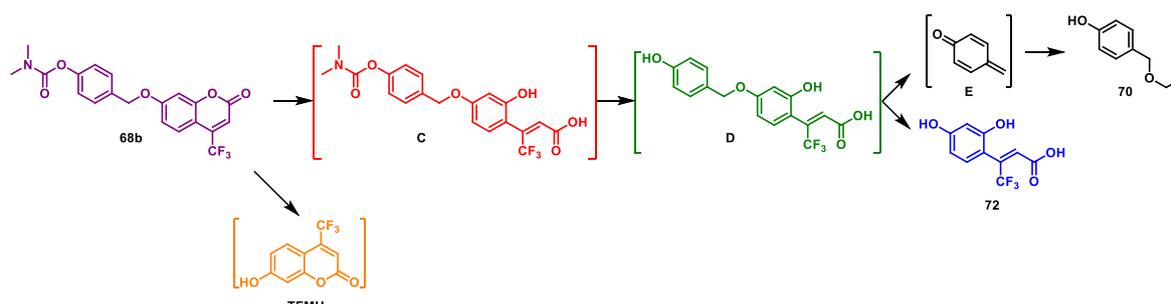
Suivant le protocole ci-dessus, nous avons analysé le comportement du composé **68b** (**66b** étant identique), après avoir chauffé à 50 °C pendant une nuit (Figure 86 et Schéma 67).

Au départ, le composé **68b** a un temps de rétention à 4,73 min (violet). A t_0 , juste après l'ajout de NaOH, **68b** commence à subir une saponification formant ainsi le composé **C** (rouge). A 30 min, **68b** est quasiment totalement consommé. Au bout de 2 h, nous commençons à voir la formation du TFMU (orange), ainsi que du TFMU avec un cycle ouvert (**72**, bleu). Après une nuit, nous pouvons considérer que la réaction est finie, ne restant que peu de produits intermédiaires. Le composé **72** est largement majoritaire, avec un peu de **C**, **D**. La très faible détection du composé **E** suppose que celui-ci est très instable et subit l'attaque nucléophile d'une molécule d'éthanol pour conduire au composé **70**.


 Figure 86. Suivi LCMS de la décarbamoylation de **68b**.

Le mélange est ensuite évaporé. Le brut a été lavé avec une solution aqueuse saturée en sel, puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. Ceci a permis d'obtenir le composé **70**, dont la structure a été confirmée par RMN. Une acidification de la phase aqueuse avec une solution de HCl 1N a permis d'obtenir, suite à une extraction, le composé **72**. La masse du composé **70** n'a pas été détectée ($152,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), mais on suppose que le t_R est de 3,77 min.

Nous pouvons ainsi dire que la décarbamoylation permet la libération d'un composé secondaire si celui-ci est positionné en *para* du groupement carbamate.


 Schéma 67. Schéma de décarbamoylation de **68b**.

2.1.3. Ortho

Pour ces derniers tests, intéressons-nous au composé **68a** (dont le comportement est identique à **66a**). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 87 et sur le Schéma 68, ce composé a un temps de rétention de 4,89 min (violet). Juste après l'ajout de NaOH, ce composé est instantanément saponifié pour former le composé **F** ($t_R = 4,12$ min, rouge). Au bout de 30 min, une très faible quantité du composé **G**

commence à apparaître. Au bout de 2 h une petite quantité de **72** se forme. Après une nuit à 50 °C, le composé **72** devient majoritaire, mais la matière première est toujours présente, et de nombreux produits secondaires apparaissent. Nous avons décidé de chauffer à 70 °C pour essayer de finir complètement la réaction. La matière est complètement convertie au bout de 24 h supplémentaires. Le composé **69** a été isolé après lavage avec une solution saturée de NaCl puis extraction. Par la suite après lavage acide, le composé **72** est de nouveau isolé.

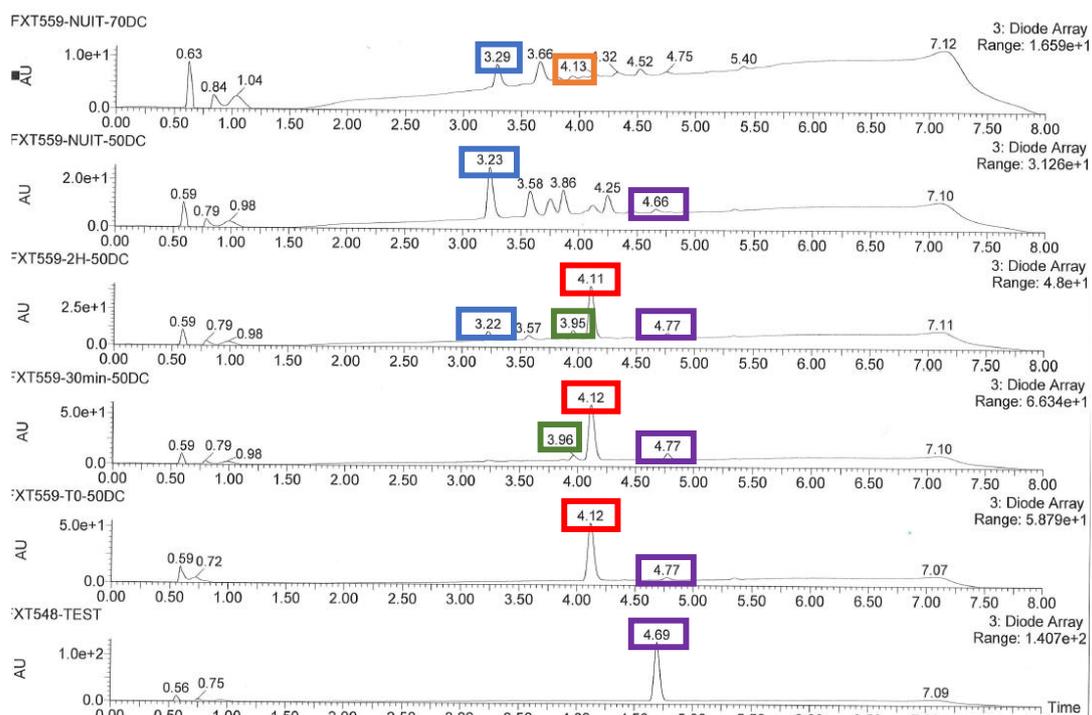


Figure 87. Suivi LCMS de la décarbamoylation de **68a**.

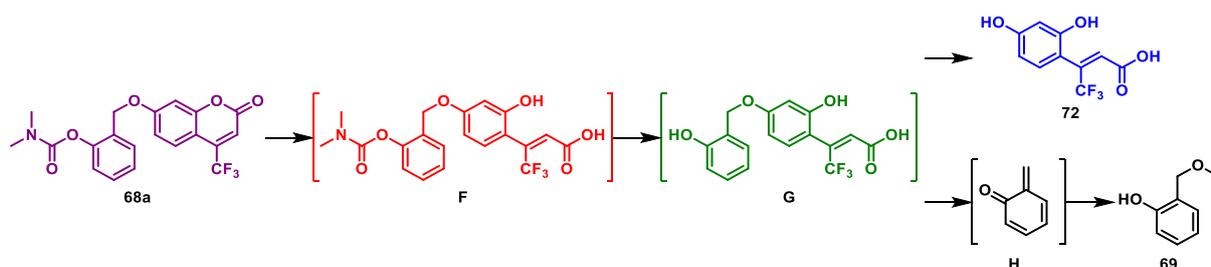


Schéma 68. Schéma de décarbamoylation de **68a**.

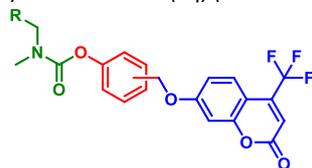
Nous pouvons tirer les mêmes conclusions que pour l'expérience précédente : à savoir que la décarbamoylation permet la libération d'un composé secondaire lorsque celui-ci est fixé en *ortho* du groupement carbamate. Mais celle-ci est nettement plus lente que pour les composés fixés en *para*.

2.2. Evaluation *in vitro*

Nous avons souhaité savoir si ces molécules possédaient une action sur l'AChE et la BuChE, pour par la suite effectuer des tests de décarbamoylation en présence de cholinestérases. Malheureusement la plupart des composés sont inactifs avec des IC₅₀ allant de 30 à 505 μM (Tableau 23). Les seuls composés

ayant une activité significative sur BuChE(eq) sont les composés substitués en *mé*ta (**67** et **68c**), avec une IC₅₀ allant de 2,1 à 3,2 μM, malheureusement ces composés ne libèrent pas de produits secondaires.

Tableau 23. Activité inhibitrice sur l'ACHe(h) et sur la BuChE(eq) (% inhibition ou IC₅₀), des composés **66a-b**, **67**, **68a-c**.



Composés	R	Position du TFMU	ACHe(h)	BuChE(eq)
			IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M	IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M
RIV	-	-	4.150 ± 160 ¹	1.800 ± 30 ²
DPZ	-	-	11,1 ± 0,4 97%	-
TAC	-	-	-	2,7 ± 0,2 90%
66a	CH ₃	<i>Ortho</i>	37.100 ± 5.431 4%	37.230 ± 5.275 39%
66b	CH ₃	<i>Para</i>	14.180 ± 2.192 6%	33.575 ± 1.676 16%
67	CH ₃	<i>Mé</i> ta	30.585 ± 6.314 8%	2.101 ± 929 50%
68a	H	<i>Ortho</i>	163.150 ± 16.758 13%	10.463 ± 1.495 30%
68b	H	<i>Para</i>	40.490 ± 19.177 9%	504.950 ± 233.416 0%
68c	H	<i>Mé</i> ta	266.200 ± 6.788 11%	3.219 ± 105 87%

Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; ¹Données de la réf. [85] ; ²Données de la réf. [86].

L'analyse a aussi été réalisée dans les mêmes conditions avec une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et d'émission de 460 nm (correspondant au TFMU). Au cours du temps, aucune variation de l'intensité de fluorescence n'a été observée. Ceci est sans doute dû à des IC₅₀ très élevées et à une non-reconnaissance des carbamates par l'enzyme.

2.3. Conclusion

Au vu de tous ses résultats, nous pouvons confirmer que des produits fixés en position *ortho* et *para* du carbamate peuvent être libérés suite à une décarbamoylation. Ce qui n'est pas le cas en position *mé*ta.

De plus, grâce aux résultats biologiques, deux choix s'offrent à nous : soit considérer que l'amine tertiaire en *mé*ta est importante et ainsi synthétiser des composés dérivés de la rivastigmine et insérer

en *ortho* ou *para* du carbamate une seconde molécule libérable, soit considérer qu'un groupement hydrophobe aromatique est aussi important et ainsi synthétiser des composés possédant un groupement naphtalène en position *méta* du carbamate et des groupements partant en position *ortho* ou *para* (Figure 88).

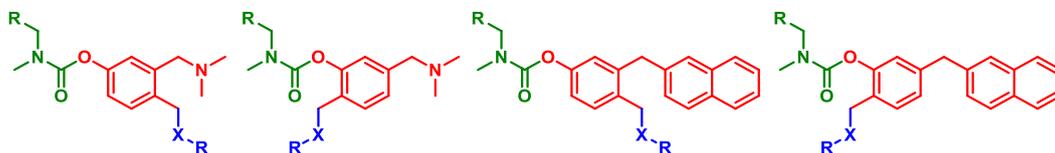


Figure 88. Exemple de structures potentiellement actives sur les ChE, dont l'inhibition provoquera la libération d'un métabolite secondaire potentiellement actif sur une autre cible thérapeutique.

3. Synthèses des composés présentant un groupement naphtalène

Dans cette partie nous allons parler d'un projet concernant la synthèse de composés possédant un groupement encombrant en position *méta* du carbamate. En effet, suite aux résultats biologiques présentés dans le Tableau 23 (page 142) nous avons remarqué que seule la présence d'un groupement encombrant en position *méta* permettait une inhibition de la BuChE(*eq*) (avec une IC₅₀ allant de 2 à 3 μM) (Figure 89).

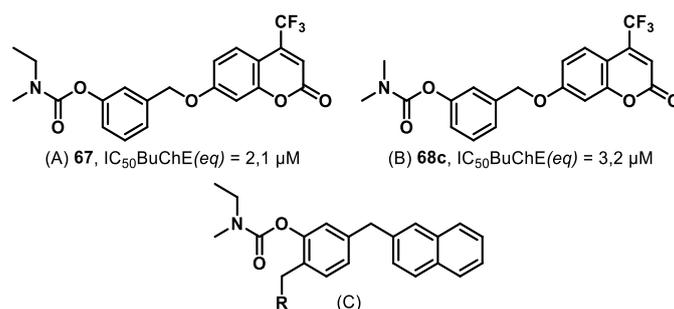


Figure 89. A. Structure et activité de **67** ; B. Structure et activité de **68c** ; C. Structure des composés à synthétiser et supposés être actifs sur la BuChE(*eq*).

Une des rétrosynthèses consiste à effectuer une amination-réductrice ou une réaction de Mitsunobu pour obtenir les composés finaux (Schéma 69). La flèche B correspond à la formation du groupement carbamate à partir du chlorure de *N*-éthyl-*N*-méthylcarbamoyle. Enfin la première étape correspond à la formation d'un ester boronique et une réaction de Suzuki.

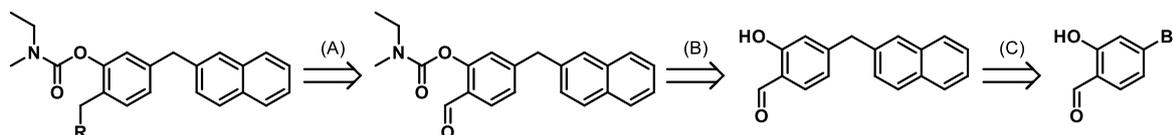


Schéma 69. Rétrosynthèse des dérivés possédant un groupement naphtalène.

Seule la première étape a été réalisée. Nous avons obtenu l'ester boronique **73**, à partir du bis(pinacolato)diborone (BPin)₂, avec un rendement de 79%.²⁵⁶ L'étape suivante sera un couplage de

²⁵⁶ Mamiya, F.; Ousaka, N.; Yashima, E. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, 54 (48), 14442–14446.

Suzuki avec le 2-(bromométhyl)naphthalène (Schéma 70). Ces travaux seront poursuivis afin de vérifier cette hypothèse.

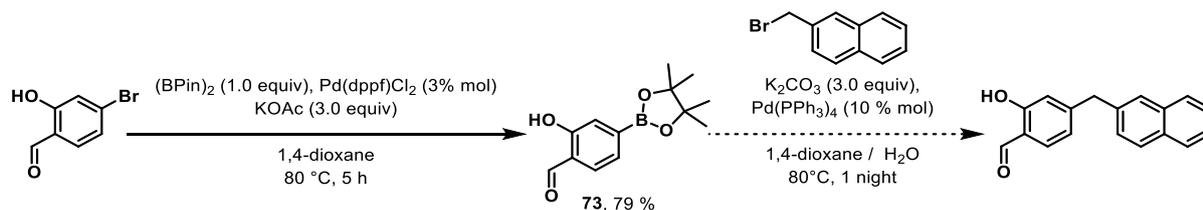


Schéma 70. Synthèse de l'ester boronique **73** suivi de la réaction de Suzuki.

4. Synthèses de ligands dont le groupement partant se situe en position para du carbamate

Comme cela a été montré dans le chapitre 4.2.2, les ligands dont le groupement partant se situe en position *para* du carbamate sont plus sensibles à la décarbamoylation et à la libération du produit secondaire, que ceux en position *ortho*. Nous avons donc logiquement souhaité commencer par la synthèse de ces composés.

4.1. Analyse rétrosynthétique et travaux antérieurs

Pour synthétiser ces ligands, plusieurs voies de rétrosynthèse ont été étudiées au laboratoire (A/B/C/D) :

Voie A : acide 4-méthoxybenzoïque (Schéma 71) :

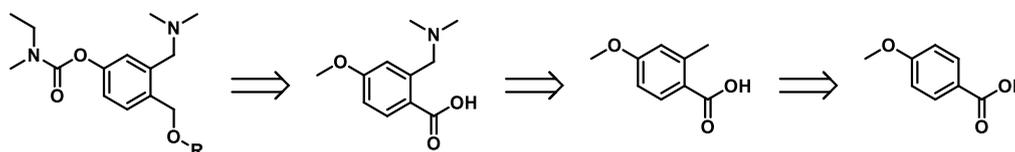


Schéma 71. 1^{ère} Analyse rétrosynthétique des ligands en position *para* du carbamate.

Cette voie passe par une méthylation du cycle en *ortho* de l'acide, puis la formation de l'amine tertiaire. Enfin l'alcool est déprotégé pour former le carbamate, l'acide réduit et le substituant est fixé.

Voie B : 4-hydroxybenzaldéhyde (Schéma 72) :

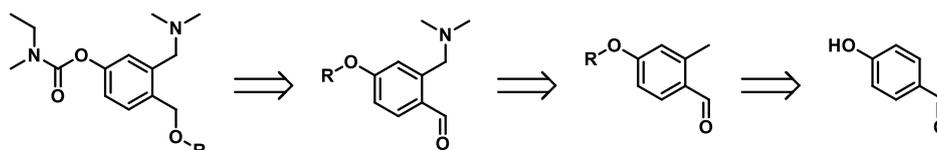


Schéma 72. 2^{ème} analyse rétrosynthétique des ligands en position *para* du carbamate.

Cette voie de synthèse commence par une protection du phénol, suivie d'une méthylation en *ortho* de l'aldéhyde. Ensuite les réactions sont les mêmes que celles de la voie A.

Voie C : 3-hydroxybenzaldéhyde (Schéma 73) :

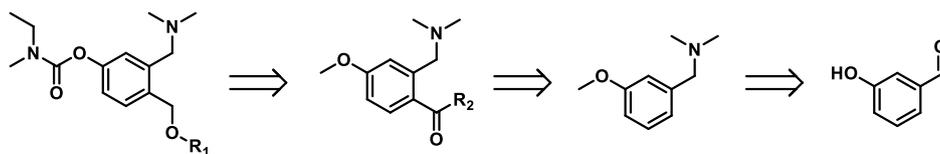


Schéma 73. 3ème analyse rétrosynthétique des ligands en position para du carbamate.

La troisième stratégie consiste en une réaction de C-H activation à partir de la [(3-méthoxyphényl)méthyl]diméthylamine.²⁵⁷ Ce principe consiste à introduire sur un cycle un groupement carbonylé, grâce à un groupement directeur. L'avantage de cette méthode est la réduction du nombre d'étapes pour la formation de la liaison C-C.

Voie D : toujours à partir du 3-hydroxybenzaldéhyde (Schéma 74) :

La quatrième stratégie consiste en une formylation suite à une lithiation, à partir d'un dérivé du 3-hydroxybenzaldéhyde.

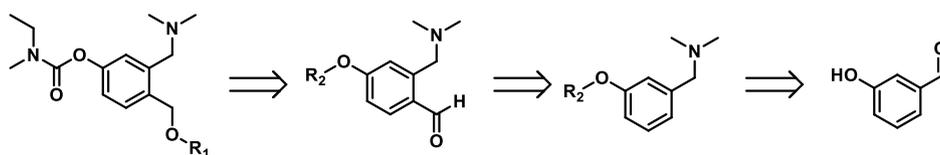


Schéma 74. 4ème analyse rétrosynthétique des ligands en position para du carbamate.

Les voies A, B et C ont été étudiées au laboratoire par H. Encoignard lors de son stage de master 1, co-encadré par les Dr. M. Jouanne et J. Lalut.

Voie A (Schéma 75) :

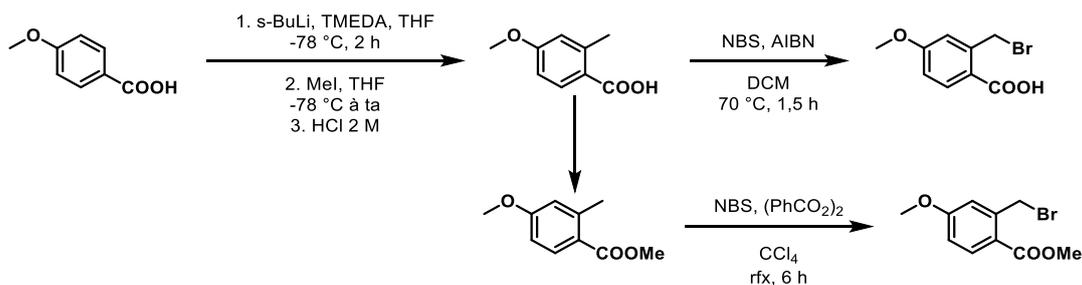


Schéma 75. Voie de synthèse A.

Les premiers tests effectués selon cette voie de synthèse se sont montrés peu concluants. En effet, l'étape de méthylation basée sur les travaux de Nguyen *et al.* n'est pas régiosélective et engendre des composés monométhylés et diméthylés, non séparables.²⁵⁸ L'étape suivante de bromation a tout de même été tentée mais a été peu opérante. Il a été ensuite décidé de procéder à une étape

²⁵⁷ Yu, W.-Y.; Sit, W. N.; Lai, K.-M.; Zhou, Z.; Chan, A. S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (11), 3304–3306.

²⁵⁸ Nguyen, T.-H.; Chau, N. T. T.; Castanet, A.-S.; Nguyen, K. P. P.; Mortier, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (9), 3419–3429.

d'estérification pour améliorer la conversion pour la bromation. Mais ceci n'a permis ni d'augmenter le taux de conversion, ni d'améliorer les conditions de séparation. Cette voie a donc été abandonnée.

Voie B (Schéma 76) :

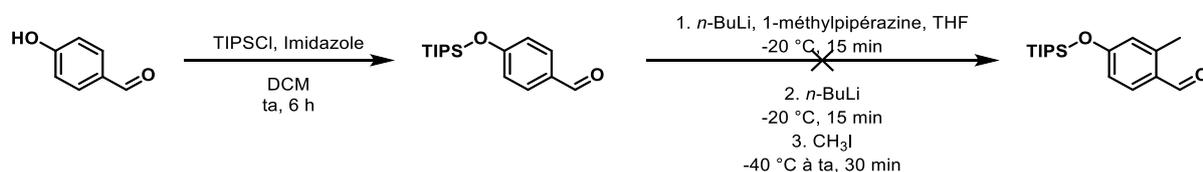


Schéma 76. Voie de synthèse B.

Suite à la protection du phénol par un groupement TIPS, la méthylation en *ortho* de l'aldéhyde peut être effectuée par lithiation. Dans un premier temps, comme le décrivent Roschangar *et al.*,²⁵⁹ l'aldéhyde est protégé par la 1-méthylpipérazine. Cette étape est limitante car le produit final obtenu correspond à l'attaque nucléophile du butyl sur le carbone de l'aldéhyde, formant ainsi un alcool secondaire. Faute de résultats encourageants, cette voie de synthèse n'a pas été exploitée plus longtemps.

Voie C (Schéma 77) :

Dans cette synthèse nous chercherons à introduire, grâce à un groupement directeur, un groupement carbonyle par une réaction de C-H fonctionnalisation. Des travaux de ce type ont été réalisés en 2008 par l'équipe de Yu *et al.* avec des groupements directeurs de type pyridinique.²⁵⁷ Les second travaux ayant orienté les essais sont plus récents (Li *et al.*).²⁶⁰ Ils ont appliqué la réaction de C-H activation sur un ensemble de réactifs similaires aux nôtres (Schéma 77).

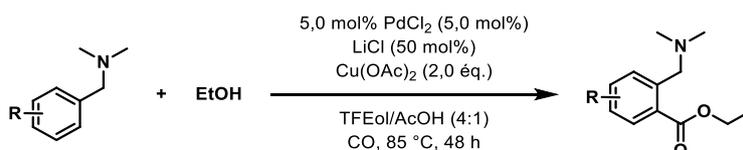


Schéma 77. Conditions réactionnelles proposées par Li *et al.* pour réaliser une C-H activation.²⁶⁰

C'est en s'appuyant sur ces travaux que plusieurs conditions ont été testées pour aboutir au produit carbonyle (Tableau 24).

Tableau 24. Conditions expérimentales de C-H activation.

Réaction	Carbonyle		Oxydant		Catalyseur		Solvant	Température	Temps
	Carb.	Eq.	Oxy.	Eq.	Cat.	Eq.			
1	DEAD	4 x 0,25 / h	TBHP	3 x 1,0	Pd(OAc) ₂	0,05	DCE	100 °C	6 h
2	DEAD	4 x 0,25 / h	Cu(OAc) ₂	0,1	Pd(OAc) ₂	0,05	DCE	100 °C	12 h
3	DEAD	4 x 0,25 / h	CAN	3,0	Pd(OAc) ₂	0,05	DCE	100 °C	6 h
4	DEAD	2,0	Cu(OAc) ₂	0,1	PdCl ₂	0,05	EtOH / AcOH	85 °C	48 h

²⁵⁹ Roschangar, F.; Brown, J. C.; Cooley, B. E.; Sharp, M. J.; Matsuoka, R. T. *Tetrahedron* **2002**, *58* (9), 1657–1666.

²⁶⁰ Li, H.; Cai, G.-X.; Shi, Z.-J. *Dalt. Trans.* **2010**, *39* (43), 10442–10446.

Aucune de ces réactions n'a permis d'isoler le produit attendu, hypothétiquement expliqué par la présence de molécules d'eau dans certains de nos réactifs utilisés. La différence entre les conditions réactionnelles des travaux rapportés dans les publications et celles présentées ici peut justifier l'absence de produits désirés formés. Les conditions anhydres, permises par l'utilisation du monoxyde de carbone atmosphérique pour introduire le carboxyle dans le palladacycle, explique probablement leur réussite. Dans nos travaux, le trifluoroéthanol a également été substitué par de l'éthanol. Les conditions testées n'ayant pas été couronnées de succès, nous allons passer à la voie D.

4.2. Voie de synthèse D

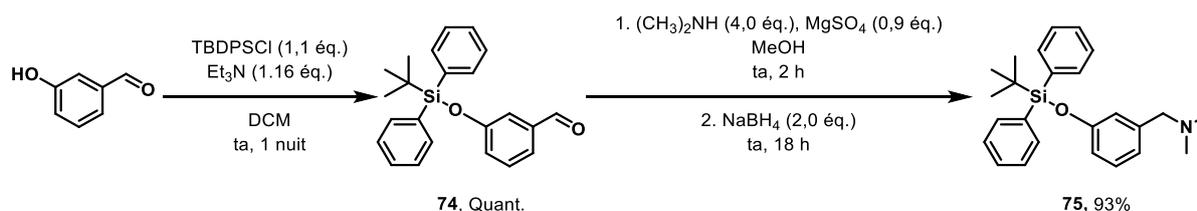
4.2.1. Voie de synthèse commune

Cette voie de synthèse se décompose en sept étapes, avec comme produit de départ le 3-hydroxybenzaldéhyde :

1. Protection du phénol par un groupement silylé
2. Amination réductrice pour former une diméthylamine
3. Formylation en *para* de l'amine
4. Déprotection
5. Formation du groupement carbamate
6. Réduction de l'aldéhyde
7. Alkylation permettant d'obtenir le produit final

Le groupement protecteur utilisé est le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS). Ce groupement protecteur présente de nombreux avantages : stable en milieu acide et basique à différentes températures, ainsi qu'en présence d'une base lithiée. Son encombrement permet de limiter la formylation du cycle en position *ortho* de ce groupement. Il est déprotégé grâce à du tétra-*n*-butylammonium (TBAF).

La protection s'effectue dans du dichlorométhane en présence de triéthylamine et de TBDPSCI et conduit à l'aldéhyde **74** avec un rendement quantitatif (Schéma 78).²⁶¹ S'en suit une amination réductrice qui permet la formation du composé **75** avec un rendement de 93%.



²⁶¹ Roeschlaub, C. A.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 58 (14), 2243–2248.

La réaction suivante consiste en une formylation : formation d'un groupement aldéhyde sur le cycle, en *para* du carbamate.

Voici plusieurs réactions permettant d'effectuer une formylation (Figure 90) :

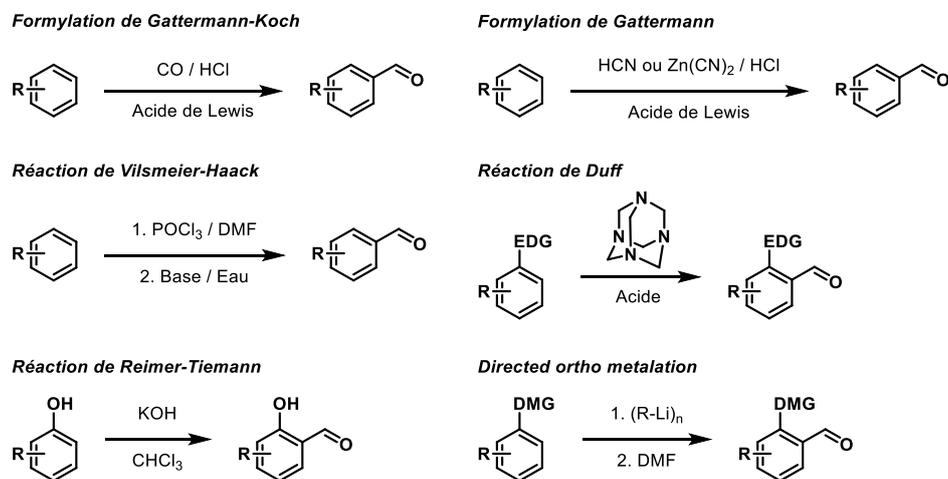


Figure 90. Réactions de formylation.

Tout d'abord, la réaction de Gattermann est une réaction chimique dans laquelle des composés aromatiques sont formylés par un mélange d'acide cyanhydrique et d'acide chlorhydrique en présence d'un catalyseur (acide de Lewis), comme l' AlCl_3 .²⁶² Par la suite, la réaction de Gattermann-Koch a été décrite. Il s'agit d'une variante de la réaction de Gattermann dans laquelle le monoxyde de carbone (CO) est utilisé à la place de l'acide cyanhydrique.²⁶³ Comme autre exemple très connu, la réaction de Vilsmeier-Haack (aussi appelée réaction de Vilsmeier) : réaction entre un amide substitué (DMF) et le trichlorure de phosphore formant le réactif de Vilsmeier. Par la suite ce réactif est mélangé avec un dérivé benzénique riche en électron pour produire, après hydrolyse de l'iminium intermédiaire, un benzaldéhyde par substitution électrophile aromatique. Cette réaction est nommée d'après Anton Vilsmeier et Albrecht Haack.²⁶⁴ Les études de Duff et Bills permirent de développer la réaction de formylation en position *ortho* d'un groupement donneur d'électron. Celle-ci est menée en présence d'hexamine, d'acide et d'un dérivé benzénique.^{265,266} La réaction de Reimer-Tiemann est quant à elle une réaction organique utilisée pour l'*ortho*-formylation de phénols.²⁶⁷

Enfin la métallation *ortho* dirigée de Snieckus, décrite par ce dernier en 1980,²⁶⁸ permet par l'utilisation d'une base lithiée, d'activer un cycle aromatique en position *ortho* d'un groupement directeur (DMG). La métallation dirigée est définie comme la déprotonation d'un atome de carbone hybridé sp^2 (substrat

²⁶² Gattermann, L.; Berchemann, W. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1898**, 31 (2), 1765–1769.

²⁶³ Gattermann, L.; Koch, J. A. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1897**, 30 (2), 1622–1624.

²⁶⁴ Vilsmeier, A.; Haack, A. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*. **1927**, 60 (1), 119–122.

²⁶⁵ Duff, J. C.; Bills, E. J. *J. Chem. Soc.* **1932**, 1987–1988.

²⁶⁶ Duff, J. C.; Bills, E. J. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1305–1308.

²⁶⁷ Reimer, K.; Tiemann, F. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1876**, 9 (1), 824–828.

²⁶⁸ A. Snieckus, V. *Heterocycles* **1980**, 14 (10), 1649–1676.

aromatique ou oléfinique) positionné en α d'un substituant contenant un hétéroatome. Les contributions de V. Snieckus et de ses collaborateurs au cours des deux dernières décennies ont considérablement élargi le champ d'application de cette méthode, souvent appelée *ortho*-métallation dirigée par Snieckus (DoM), Schéma 79.

La réaction de DoM présente les caractéristiques suivantes :²⁶⁹

1. Le DMG doit être résistant à l'attaque nucléophile par le réactif de métallation et doit contenir au moins un hétéroatome pouvant se coordonner avec l'atome de métal ;
2. La formation d'un intermédiaire à 5 chaînons est la plus favorable ;
3. Les meilleurs DMG sont stériquement exigeants ou ne sont pas chargés ;
4. Les DMG peuvent être classés en fonction de l'atome par lequel le groupe est attaché au cycle aromatique : il existe un carbone lié (par exemple, CONR₂), un azote lié (par exemple, NHCOR), un oxygène lié (par exemple, OCONR₂), un soufre lié (par exemple, SO₂R) ;
5. Les DMG les plus populaires sont les amides tertiaires et les O-carbamates ;
6. Les DMG peuvent être classés en fonction de la force de leurs effets directeurs, mais le classement change considérablement en fonction du solvant, de la température et de la base utilisée pour générer l'espèce métallée : par exemple en utilisant du *n*-BuLi dans du THF à -78 °C, les groupements les plus directeurs sont SO₂*t*-Bu > CON(*i*-Pr)₂ > OCON(*i*-Pr)₂ > OMOM ;
7. Dans une procédure typique, la solution du substrat est traitée avec un réactif alkyllithium à -78 °C sous atmosphère inerte, suivie de l'addition de l'électrophile ;
8. Les substrats avec des DMG ayant un proton acide, nécessitent l'ajout d'au moins deux équivalents du réactif alkyllithium ;
9. Etant donné que les alkyllithiums existent principalement sous forme d'agrégats dans des solvants hydrocarbonés, l'addition de solvants basiques et des amines tertiaires ou des ligands bidentés (par exemple, TMEDA) est nécessaire pour décomposer les agrégats en monomères et dimères afin d'améliorer leur basicité ;
10. Lorsque le DMG est un carbamate (OCONR₂), un décalage facile du 1,3-acyle se produit après la fin de l'*ortho*-lithiation pour donner un alicyclamide (réarrangement anionique *ortho*-Fries).

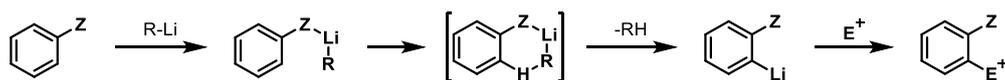


Schéma 79. Mécanisme réactionnel de lithiation *ortho* dirigée.

²⁶⁹ Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, 1st ed.; Academic Press, Ed.; 2005.

Les DMG sont classés en 3 groupes : fortement, moyennement et faiblement orienteur :

- Fortement : -OCONR₂, -CONR₂, -CN,
- Moyennement : -NR₂, -OMe, -CF₃
- Faiblement : -Ph, -CH₂O⁻

Nous nous sommes donc basés sur la réaction de lithiation puis formylation pour former notre groupement carbonyle en *para* du TBDPS et en *ortho* de la diméthyle amine. Pour ce faire, une vingtaine de variation de conditions expérimentales ont été testées. Le but de cette méthodologie est d'obtenir le meilleur taux de conversion avec un faible taux de produits secondaires (Schéma 80). Les différents paramètres testés sont les suivants :

- **La base :**
 - *sec*-BuLi ou *tert*-BuLi, cette dernière étant plus encombrée elle permet de diminuer le risque de formylation en *ortho* du TBDPS.
 - Nombre d'équivalent
- Présence ou absence de ***N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine** (TMEDA) : Les organolithiens ont tendance à former des associations dans les éthers et les hydrocarbures. Dans ces solvants, ils se trouvent sous forme de tétramères, hexamères *etc.* La TMEDA est un agent complexant particulièrement fort du lithium dans ces composés, grâce aux doublets non liants de l'azote. Il est fréquemment utilisé comme co-solvant des organolithiens. En présence de TMEDA, les possibilités d'association diminuent car les sites acides du métal sont complexés et la polarité de la liaison C-Li est considérablement accrue.
- **Equivalent de DMF**
- **Solvant :**
 - Le solvant traditionnellement utilisé est le THF anhydre à -78 °C. A des températures plus élevées, le THF est déprotoné par la base lithiée, pouvant donner de l'énolate d'acétaldéhyde et d'éthylène, et par conséquent consommer la base. Ainsi plusieurs solvants ont été testés : THF, diéthyléther et le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE)
 - Dilution : la dilution du produit dans le solvant peut avoir une incidence importante, principalement sur la formation de produits secondaires. En effet, une molécule très réactive dans un milieu très concentré va avoir tendance à réagir avec une molécule similaire, avant l'ajout de l'électrophile. A l'inverse la base lithiée sera beaucoup moins réactive dans un milieu trop dilué.

- **Température** : plus la température est élevée, plus la réactivité sera importante, au risque d'avoir de nombreux sous-produits. Nous avons fait varier la température avant l'ajout de l'électrophile. Ensuite nous laisserons remonter la réaction à température ambiante.
- **Temps de réaction** : 2 temps peuvent varier : le temps de mise en contact entre la base et le produit de départ, et le temps de contact entre le milieu réactionnel et l'électrophile. Ici nous ne ferons varier que le 1^{er} temps.
- Dans toutes ces conditions, les réactions sont réalisées sous azote, et sont stoppées par ajout d'eau. Les réactions sont ensuite extraites avec de l'acétate d'éthyle et le brut est analysé par RMN.

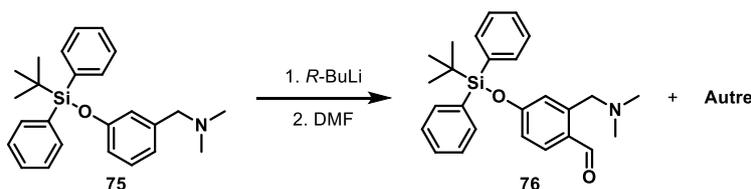


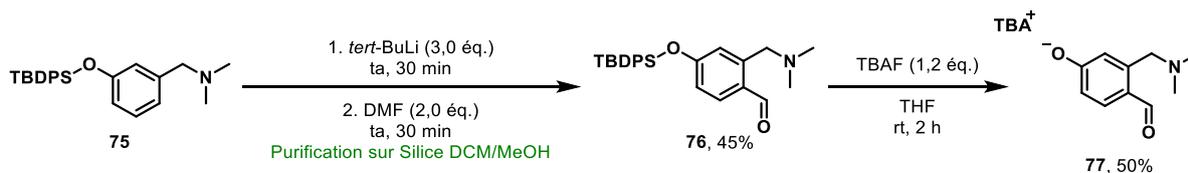
Schéma 80. Schéma de méthodologie lithiation/formylation.

Les résultats des études méthodologiques ont permis de trouver les meilleures conditions expérimentales (Tableau 25) : le produit **75** est solubilisé dans de **l'éther (5 mL/mmol)** dans un ballon tricol sous azote. Le **tert-BuLi (3,0 éq.)** est ajouté goutte à goutte à **température ambiante**. Après **30 min** de mélange, le DMF (**2,0 éq.**) est ajouté goutte à goutte à température ambiante. Au bout de 30 min la réaction est stoppée par de l'eau, et est extraite par de l'AcOEt. Après évaporation le brut est purifié suivant 2 méthodes que je vais détailler.

Tableau 25. Conditions expérimentales de lithiation/formylation pour former un groupement carbonyle en position para du groupement silylé.

Base		Eq. Réactif		Solvant		Conditions		Résultat	
<i>R</i> -BuLi	Eq.	TMEDA	DMF	Solvant	Volume (mL/mmol)	Temp. (°C)	Temps (min)	Taux de conversion (%)	76 / Autre (%)
<i>sec</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	-78	30	0	-
<i>sec</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	-40	30	0	-
<i>sec</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	0	30	0	-
<i>sec</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	20	30	0	-
<i>sec</i> -BuLi	1,5	0	2,0	THF	50	20	30	0	-
<i>sec</i> -BuLi	1,5	0	2,0	THF	5	20	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	-78	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	-40	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	0	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	1,5	2,0	THF	50	20	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	THF	50	20	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	THF	5	20	30	0	-
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	-78	30	8	20 / 80
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	-40	30	37	42 / 58
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	-10	30	61	67 / 33
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	0	30	42	69 / 31
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	20	30	50	57 / 43
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	MTBE	5	20	30	50	59 / 41
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O préseché	5	20	30	35	53 / 47
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	20	45	47	60 / 40
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	2,0	Et ₂ O	5	20	60	39	50 / 50
<i>tert</i> -BuLi	3,0	0	2,0	Et ₂ O	5	20	30	83	100 / 0
<i>tert</i> -BuLi	1,5	0	4,0	Et ₂ O	5	20	30	47	56 / 44

L'application de ces conditions expérimentales (Schéma 81), suivi par une purification sur colonne de silice avec un mélange DCM/MeOH allant d'un gradient 100/0 vers 80/20, permet d'obtenir le composé **76** avec un rendement de 45 %. Le phénol est ensuite déprotégé grâce à du fluorure de tétra-*N*-butylammonium (TBAF), nous permettant d'obtenir le sel **77** avec un rendement de 50 %, soit un rendement global de 22,5 %.



Pour améliorer le rendement de la première étape, la silice a été préalablement désactivée par de l'ammoniaque, pour se retrouver avec un gradient de DCM/MeOH/NH₃, 90/10/0,5. De façon

surprenante, dans ces conditions, le produit se déprotège, permettant d'obtenir directement le composé **78** avec un rendement de 35 % (Schéma 82).

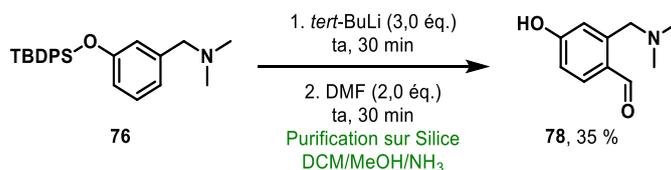


Schéma 82. Purification en milieu basique du composé **76**.

Le carbamate **80** est ensuite formé, et l'aldéhyde est réduit suivant les protocoles décrits précédemment (Schéma 83).

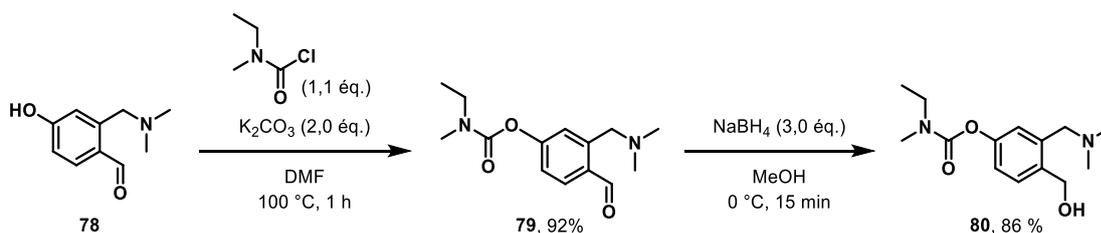


Schéma 83. Formation du composé **80**.

4.2.2. Série Ether

Principalement deux méthodes permettent d'obtenir une liaison éther à partir d'un alcool primaire : une réaction de Mitsunobu et une *O*-alkylation d'un dérivé halogéné.

4.2.2.1. Réaction de Mitsunobu

Ces deux méthodes ont été testées pour effectuer cette réaction :

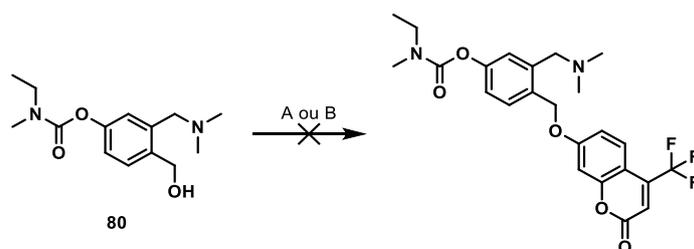


Schéma 84. Essais de réactions de Mitsunobu à partir du composé **80**.

La réaction de Mitsunobu permet la conversion d'alcools primaires et secondaires en esters, éthers de phényle, thioéthers et divers autres composés. Elle se déroule en 4 étapes (Schéma 85) :

1. Fixation de la PPh_3 sur un dérivé diazoïque
2. Déprotonation d'un nucléophile acide
3. Activation de l'alcool sur le palladium, formant ainsi un bon groupement partant
4. Substitution nucléophile d'ordre 2

L'ordre d'ajout des réactifs est donc très important, dans un premier temps le DIAD est mélangé avec la phosphine. Ensuite le nucléophile est ajouté et l'alcool primaire est ajouté en dernier.

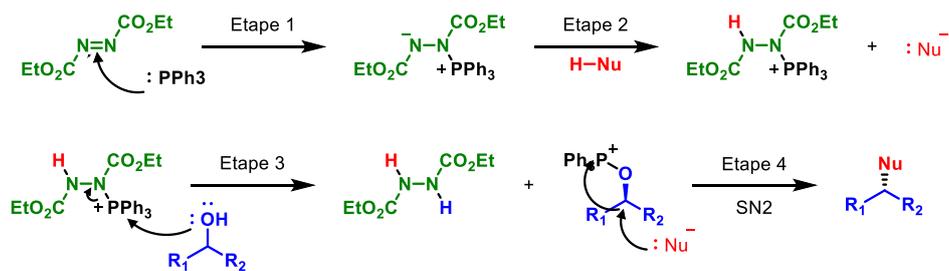


Schéma 85. Mécanisme de la réaction de Mitsunobu.²⁶⁹

La méthode A utilisée correspond à l'utilisation des réactifs classiques lors de cette réaction :

- Base : Diisopropyl azodicarboxylate DIAD, 1,3 éq.
- Phosphine : Triphénylphosphine PPh₃, 1,3 éq.
- Alcool primaire : **80**, 1,0 éq.
- Nucléophile : TFMU, 1,3 éq.
- Solvant : THF
- Température : ta

Malheureusement aucune conversion n'a été visible après 24 h à température ambiante.

Nous avons donc suivi la méthode décrite dans la publication de Hakamata *et al.*,²⁵⁴ qui utilise le TFMU comme nucléophile :

- Base : 1,1'-(Azodicarbonyl)dipipéridine ADDP, 6,0 éq.
- Phosphine : Tributylphosphine TBP, 6,0 éq.
- Alcool primaire : **80**, 1,0 éq.
- Nucléophile : TFMU, 1,2 éq.
- Solvant : THF
- Température : ta

Malheureusement les résultats ont été identiques à ceux de la méthode A.

4.2.2.2. O-Alkylation

Ces résultats étant infructueux, la seconde méthode consiste en une substitution de l'alcool primaire en bromure primaire, puis en une O-alkylation par le TFMU.

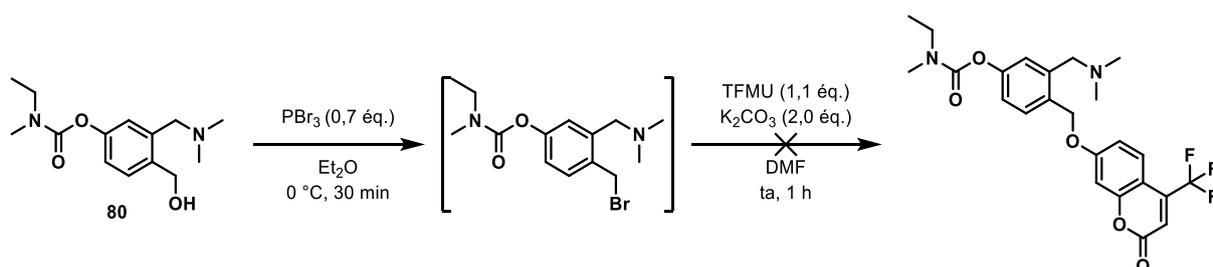


Schéma 86. Tentative de bromation et O-alkylation du composé **80**.

La première réaction a permis d'obtenir le dérivé bromé, à première vue non stable en mélange avec un second produit inconnu. Le brut a donc directement été mis en réaction avec le K_2CO_3 et le DMF. Au bout d'une heure, en LCMS et en RMN le produit de départ avait complètement disparu, et la quantité de produit secondaire inconnu avait augmenté.

Nous avons donc recommencé la réaction de bromation, évaporé, extrait, puis mis en solution dans du DMF uniquement avec de la base. Le produit bromé avait été complètement consommé, ne laissant que le produit secondaire **81** seul en solution. Après analyse 2D RMN et des spectres LCMS, il s'est avéré que ce composé n'est autre que le produit induit par une cyclisation intramoléculaire, dû à l'attaque du doublet de l'amine secondaire sur l'halogénure adjacent (Schéma 87).

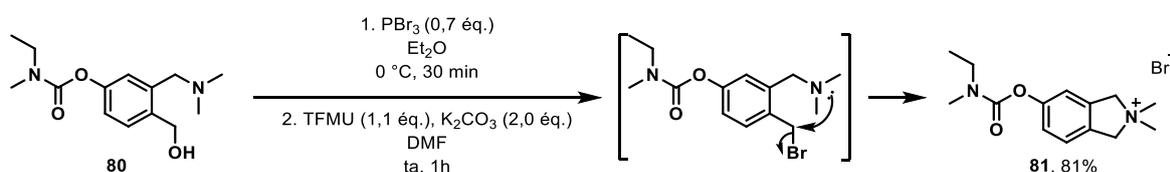


Schéma 87. Cyclisation intramoléculaire du composé **80**.

Différentes tentatives pour ouvrir le cycle, par du TFMU préalablement déprotoné par du NaH, ont été tentées, mais ont toutes échoué.

En 2016, Ramachandran *et al.* décrivent une méthode permettant de protéger sélectivement l'amine par un groupement borane. Cette réaction met en jeu un mélange $NaBH_4$ - $NaHCO_3$ dans du THF. Le produit à protéger est ensuite ajouté, ainsi qu'un mélange de H_2O /THF.²⁷⁰ Aucune conversion n'a malheureusement été détectée après 48 h (Schéma 88).

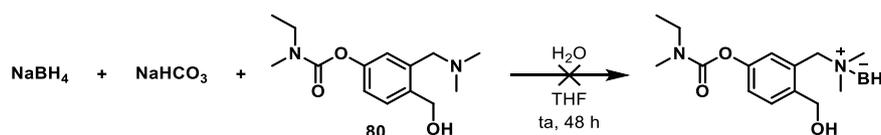


Schéma 88. Protection sélective de l'amine par un borane.

Etant bloqué à cette étape, 2 autres stratégies de synthèses ont été développées pour cette série éther qui seront décrites dans le chapitre 4.4.3 (pages 157).

4.2.3. Série Amine

Nous avons souhaité fixer deux types de molécules : un fluorochrome (pour prouver le mécanisme) et une substance active (la mémantine).

²⁷⁰ Ramachandran, P. V.; Kulkarni, A. S.; Zhao, Y.; Mei, J. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (80), 11885–11888.

4.2.3.1. Fluorochrome

Nous avons choisi le groupement dansyl comme fluorochrome. Nous avons effectué une amination réductrice à partir du composé **79** avec de l'ammoniac pour obtenir une amine primaire, qui après purification est remise en réaction avec le chlorure de dansyle. A la suite de plusieurs purifications successives avec différents solvants : DCM/MeOH/NH₃, CHX/AcOEt/NH₃, et en raison de la faible quantité de produit de départ, il s'est avéré impossible d'isoler le composé final du composé aminé (Schéma 89).

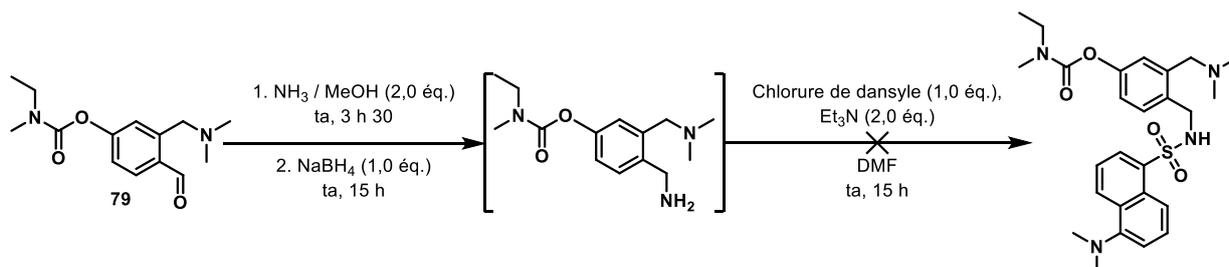


Schéma 89. Fixation du chlorure de dansyle en position para du carbamate.

Nous avons aussi essayé de fixer la 6-aminocoumarine par amination réductrice, mais comme pour la réaction précédente, la purification sur silice et en phase inverse s'est avérée très compliquée et le produit n'a pas pu être isolé.

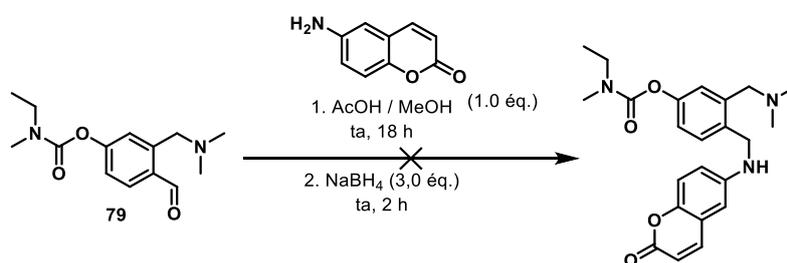


Schéma 90. Fixation de la 6-aminocoumarine en position para du carbamate.

4.2.3.2. Mémantine

La mémantine est un antagoniste des récepteurs NMDA actuellement sur le marché (voir chapitre 2.2.1.3). Cette molécule possède une amine primaire, permettant d'effectuer une amination réductrice. La méthode utilisée ici est tirée de la publication de Levesque *et al.*, qui utilise le ZnCl₂ comme activateur de l'imine et le NaCNBH₃ comme réducteur (Schéma 91).²⁷¹

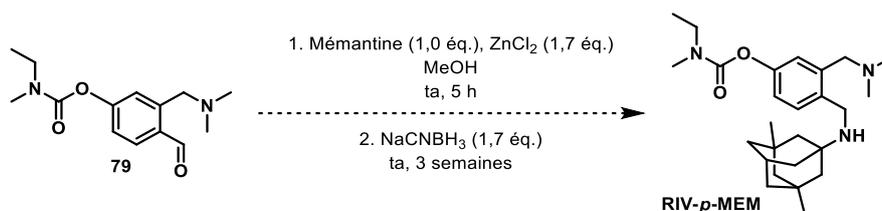


Schéma 91. Fixation de la mémantine en para du carbamate par la méthode de Levesque.²⁷¹

²⁷¹ Levesque, P.; Fournier, P.-A. J. *Org. Chem.* **2010**, 75 (20), 7033–7036.

La réaction étant en cours de synthèse, le résultat n'est pas encore défini.

4.3. Autre voie de synthèse des dérivés éthers en position para du carbamate

L'élément limitant est le groupement amine, le but ici est donc de masquer sa réactivité et de la révéler lors de la dernière étape ; pour ceci nous allons partir de deux groupements différents : un groupement nitrile et un groupement amide.

4.3.1. Nitrile

Le 3-hydroxybenzonnitrile est protégé par 3 groupements différents : TBDPS, TIPS et CON(Me)Et, pour former les 3 composés **82**, **83** et **84** (Schéma 92).

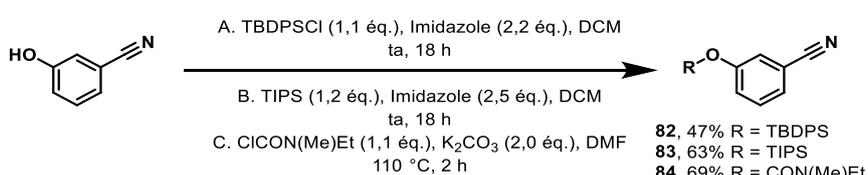


Schéma 92. Protection du 3-hydroxybenzonnitrile.

Les différentes conditions de lithiation/formylation sont testées sur ces composés d'après les travaux de Cailly *et al.* (Schéma 93).²⁷² La synthèse consiste à former *in situ* du LiTMP, base lithiée plus réactive. Deux équivalents sont utilisés dans cette réaction. Dans un premier temps la base vient s'ajouter sur une fonction nitrile. Le composé obtenu favorise l'approche d'une deuxième molécule de base pour donner un intermédiaire très favorable pour la lithiation. Puis le LiTMP arrache le proton acide, donnant un dianion qui peut relarguer une molécule de LiTMP et l'espèce lithiée qui réagira avec l'électrophile. Nous pouvons dire que cette réaction est de type catalytique.²⁷³

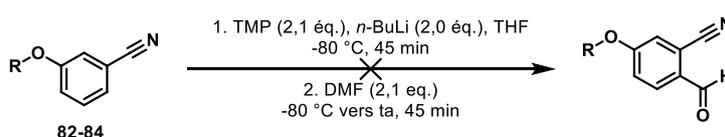
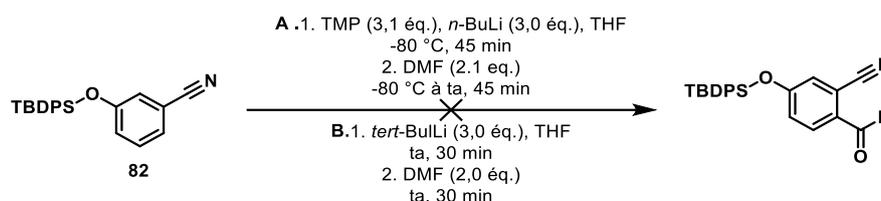


Schéma 93. Lithiations/formylation des composés **82–84**.

Malheureusement, les spectres RMN et LCMS des différentes réactions sont ininterprétables, car conduisant à un mélange complexe de produits. Deux autres réactions sur le composé **82** ont été testées (Schéma 94) : la concentration de LiTMP étant augmentée pour la première, pour la seconde nous reprenons les conditions décrites dans le Schéma 81. Les résultats se sont révélés être identiques au test précédent.

²⁷² Cailly, T.; Fabis, F.; Lemaître, S.; Bouillon, A.; Rault, S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (1), 135–137.

²⁷³ Krizan, T. D.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (13), 2681–2682.

Schéma 94. Essais de lithiation/formylation du composé **82**.

Ne pouvant pas effectuer directement une formylation, nous décidons d'effectuer une *ortho*-halogénéation sélective par une méthode de C-H activation décrite par Du *et al.*²⁷⁴ Cette méthode permet d'activer de façon sélective la position *ortho* d'un DMG.²⁷⁴

L'activation de la liaison C-H catalysée par un métal de transition a émergé au cours de la dernière décennie permettant la fonctionnalisation directe des liaisons C (sp²)-H. En partant d'un composé portant un groupe directeur (DG), des liaisons C-C ou C-hétéroatomes peuvent être obtenues au niveau de la liaison C-H adjacente à partir d'un intermédiaire palladacycle clé.²⁷⁵ La formation d'une liaison C-halogène représente un bon moyen d'introduire sélectivement des atomes d'halogène à partir d'une liaison C-H inactivée, en évitant la synthèse de précurseurs et en utilisant des conditions plus douces que la SE_{AR}.²⁷⁶ Pour cette étude nous nous sommes inspirés des travaux des Dr Dubost et Babin membres du laboratoire, ayant développé cette méthode pour la synthèse de composés iodés.²⁷⁷

Pour cette méthode ils utilisent comme catalyseur l'acétate de palladium, de l'acide *para*-toluènesulfonique et du *N*-iodosuccinimide.

Le mécanisme de la réaction n'est pas connu et reste une hypothèse. Plusieurs études mécanistiques ont cependant été suggérées dans la littérature et trois mécanismes distincts sont décrits. Le plus couramment observé, appelé système Pd(II)/Pd(IV), est basé sur un cycle catalytique en 4 étapes (Schéma 95) :²⁷⁸

1. *Coordination* : Chélation du DMG
2. *Activation* : Interaction du complexe avec la liaison C-H se trouvant en *ortho* du DG par déprotonation-métallation formant le palladacycle
3. *Insertion oxydante* : insertion de la liaison R-X dans le palladacycle
4. *Elimination réductrice* : libération du substrat fonctionnalisé et du palladium

²⁷⁴ Du, B.; Jiang, X.; Sun, P. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (6), 2786–2791.

²⁷⁵ Gensch, T.; Hopkinson, M. N.; Glorius, F.; Wencel-Delord, *JChem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (10), 2900–2936.

²⁷⁶ Petrone, D. A.; Ye, J.; Lautens, M. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (14), 8003–8104.

²⁷⁷ Dubost, E.; Babin, V.; Benoist, F.; Hébert, A.; Barbey, P.; Chollet, C.; Bouillon, J.-P.; Manrique, A.; Pieters, G.; Fabis, F.; *et al. Org. Lett.* **2018**, *20* (19), 6302–6305.

²⁷⁸ Ackermann, L. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 1315–1345.

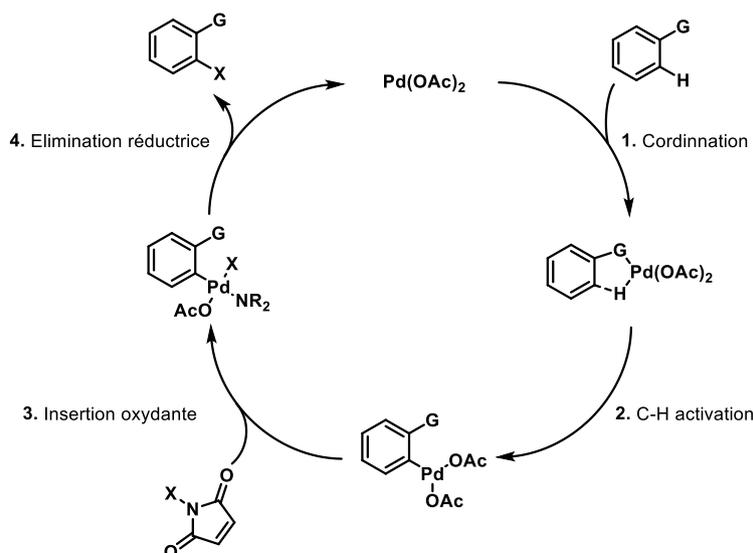
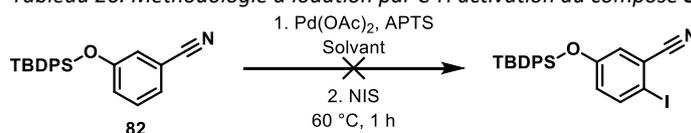


Schéma 95. Mécanisme théorique de la C-H activation catalysé par $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (G représente le groupement directeur DMG).²⁷⁴

En partant de ces publications, nous avons effectué une étude méthodologique à partir du composé **82** (Tableau 26).

Tableau 26. Méthodologie d'iodation par C-H activation du composé **82**.



Eq. Réactifs			Solvant	Conditons		Résultat
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	APTS	NIS		Température (°C)	Temps (h)	Taux de conversion (%)
1,0	2,0	2,0	MeOD	60	24	Produits de dégradation
1,0	2,0	2,0	DCE	60	24	Produits de dégradation
10%	2,0	2,0	DCE	60	15	0
1,0	2,0	2,0	DCE	80	15	Produits de dégradation
5%	1,0	1,1	DCE	80	15	0

L'utilisation de solvant deutéré comme solvant de réaction permet de suivre la réaction par spectrométrie RMN. Le 1,2-dichloroéthane (DCE) est utilisé ici car c'est l'un des solvants de référence pour ce type de réaction. Dans nos hypothèses, les conditions en quantité stœchiométrique permettent de confirmer la formation du palladacycle ainsi que le produit final. Les tests en conditions catalytiques sont réalisés pour éviter la consommation de produit inutile, le complexe $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, étant régénéré après la formation d'un produit final.

Malheureusement aucune réaction n'a été concluante. Nous obtenons des produits de dégradation lorsque le $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ est utilisé en quantité stœchiométrique, et aucune conversion n'est observée lors de l'utilisation de quantité catalytique.

Nous avons donc décidé de protéger le phénol par un groupement protecteur moins encombrant : le groupement méthoxy (Schéma 96).

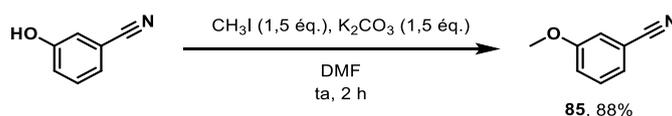
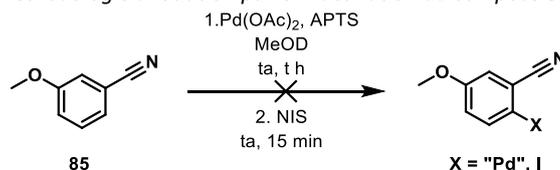


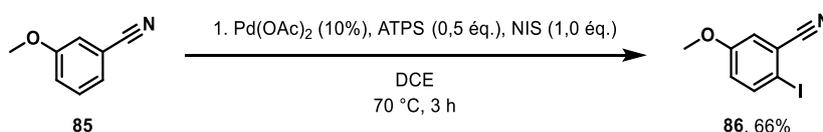
Schéma 96. Protection du 3-hydroxynitrile par de l'iodométhane.

A partir de ce composé **85**, la réaction de C-H activation a été testée dans diverses conditions, toujours dans le méthanol deutéré (MeOD) pour faciliter le suivi de la réaction et l'analyse RMN de celle-ci, en s'abstenant des diverses opérations d'évaporations, neutralisation et extraction (Tableau 27).

 Tableau 27. Méthodologie d'iodation par C-H activation du composé **85** dans le MeOD.


Eq. Réactifs			Solvant	Conditions		Résultat
Pd(OAc) ₂	APTS	NIS		Température (°C)	Temps (h)	Taux de conversion (%)
1,0	2,0	-	MeOD	60	24	Formation du palladacycle
1,0	2,0	2,0	MeOD	60	24	Ininterprétable
10%	0,5	-	MeOD	60	15	Formation du palladacycle
10%	0,5	2,0	MeOD	60	15	52

Dans des conditions catalytiques, dans le MeOD (qui n'est pas le meilleur solvant de réaction), nous obtenons un taux de conversion de l'ordre de 52%. Nous avons donc refait cette réaction dans le DCE en augmentant la température de 10 °C. La réaction a été stoppée après 3 h de chauffage, qui après traitement et purification nous permet d'obtenir le composé **86** avec un rendement de 66% (taux de conversion de 88%, Schéma 97). Nous n'utilisons ici que 1.0 éq. de NIS pour éviter les réactions secondaires de diiodation.


 Schéma 97. Réaction de C-H activation du composé **85**.

La réaction suivante consiste en un échange halogène/métal puis une formylation. Diverses réactions d'échange avec du *n*-BuLi,²⁷⁹ *i*-PrMgCl (réactif de Grignard),^{280,281} et *i*-PrMgCl.LiCl^{282,283} ont été testées.

²⁷⁹ Zhang, L.; Liu, C.; Duan, Z.; Mathey, F. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017 (18), 2504–2509.

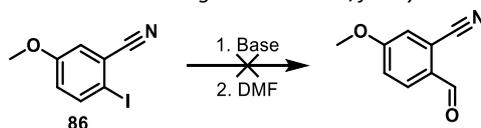
²⁸⁰ Zimmerman, S. S.; Khatri, A.; Garnier-Amblard, E. C.; Mullasseril, P.; Kurtkaya, N. L.; Gyoneva, S.; Hansen, K. B.; Traynelis, S. F.; Liotta, D. C. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (6), 2334–2356.

²⁸¹ Knochel, P.; Dohle, W.; Gommernann, N.; Kneisel, F. F.; Kopp, F.; Korn, T.; Sapountzis, I.; Vu, V. A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, 42 (36), 4302–4320.

²⁸² Krasovskiy, A.; Knochel, P. A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, 43 (25), 3333–3336.

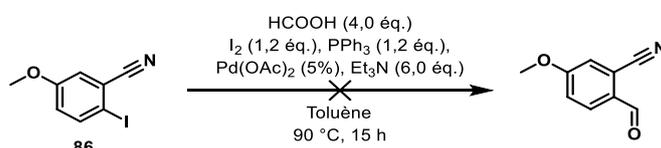
²⁸³ Maji, M. S.; Murarka, S.; Studer, A. *Org. Lett.* **2010**, 12 (17), 3878–3881.

Aucune conversion n'a été observée, peut-être en raison d'une compétition entre la réaction halogène/métal, et la réaction nitrile/métal (Tableau 28).

Tableau 28. Méthodologie de lithiation/formylation de **86**.

Réactif		Eq. Réactif		Solvant		Conditions		Résultat
Réactif	Eq.	TMP	DMF	Solvant	Volume (L/mol)	Temp. (°C)	Temps (min)	Taux de conversion (%)
<i>n</i> -BuLi	1,1	-	5,0	THF		-78	60	Produits dégradation
<i>n</i> -BuLi	2,0	-	5,0	THF		-78	60	Produits dégradation
<i>n</i> -BuLi	2,0	2,1	5,0	THF		-78	30	Produits dégradation
<i>n</i> -BuLi	2,0	2,1	5,0	THF		-78	60	Produits dégradation
<i>i</i> -PrMgCl	1,1	-	5,0	THF		-15	30	Produits dégradation
<i>i</i> -PrMgCl	1,1	-	5,0	THF		-15	120	Produits dégradation
<i>i</i> -PrMgCl.LiCl	1,1	-	5,0	THF		-15	30	Produits dégradation
<i>i</i> -PrMgCl.LiCl	1,1	-	5,0	THF		-15	120	Produits dégradation

La réaction suivante est inspirée par la publication de Sun *et al.* de 2017.²⁸⁴ Elle consiste à effectuer une formylation d'iodure d'aryle en utilisant l'acide formique comme donneur de carbonyl. Le mécanisme théorique comprend un intermédiaire avec un palladacycle et une réduction de l'acide formique par du diiode et de la triphénylphosphine (Schéma 98). Mais à l'arrêt de la réaction, seuls les produits de départ se trouvaient dans le mélange réactionnel.

Schéma 98. Formylation de l'iodure de nitrile catalysée par le palladium avec HCOOH comme source de CO.²⁸⁴

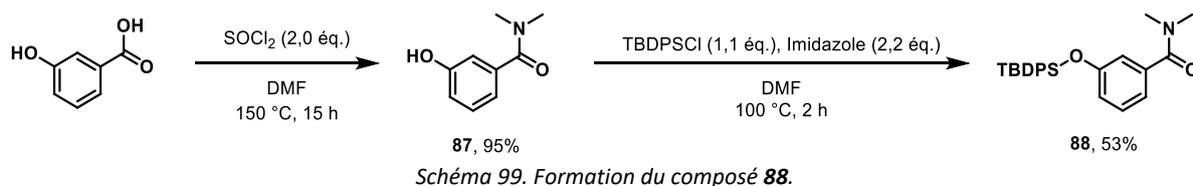
Au vu de ces résultats et de l'absence de réaction simple permettant d'obtenir notre scaffold voulu, nous avons décidé d'arrêter cette série nitrile et nous nous sommes intéressés à la série amide. Il est à noter que l'étude des séries nitrile et amide ont été effectuées en parallèle, ce qui explique la ressemblance des tableaux de méthodologie des différentes réactions.

4.3.2. Amide

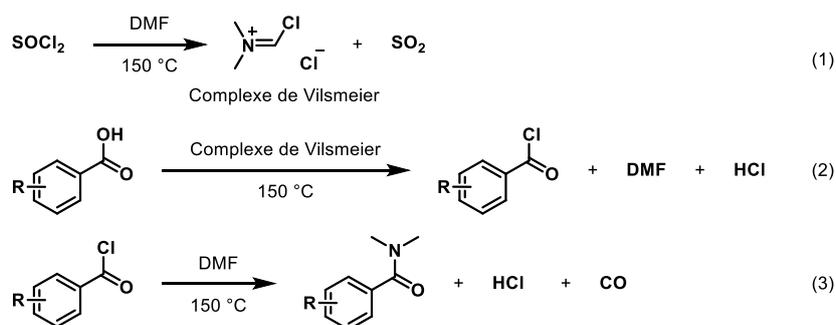
Comme précédemment nous avons débuté la synthèse par la formation d'un amide en position *méta* d'un phénol protégé par du TBDPS (Schéma 99). La première étape consiste à former le diméthylamide à partir d'acide acétique. Kumagai *et al.* ont développé une méthode utilisant du chlorure de thionyle et du DMF à haute température (150 °C).²⁸⁵

²⁸⁴ Sun, G.; Lv, X.; Zhang, Y.; Lei, M.; Hu, L. *Org. Lett.* **2017**, *19* (16), 4235–4238.

²⁸⁵ Kumagai, T.; Anki, T.; Ebi, T.; Konishi, A.; Matsumoto, K.; Kurata, H.; Kubo, T.; Katsumoto, K.; Kitamura, C.; Kawase, T. *Tetrahedron* **2010**, *66* (46), 8968–8973

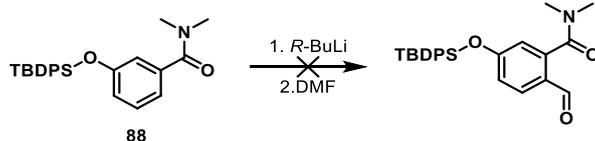


D'un point de vue mécanistique théorique, la réaction se déroulerait en 3 étapes comme présenté dans le Schéma 100.



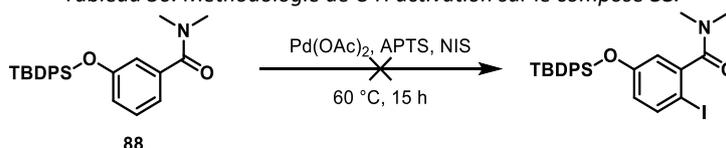
Par la suite, comme dans le chapitre 4.4.3.1, les essais de lithiation/formylation, à partir du composé **88**, n'ont pas donné le produit voulu (Tableau 29).

Tableau 29. Méthodologie de lithiation/formylation du composé **88**.

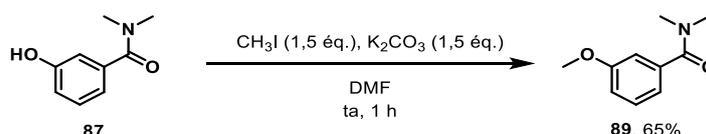


Base		Eq. Réactif		Solvant		Conditions		Résultat
R-BuLi	Eq.	TMEDA	DMF	Solvant	Volume (L/mol)	Temp. (°C)	Temps (min)	Taux de conversion (%)
<i>n</i> -BuLi	1,1	0	2,0	THF	3,5	-78	30	0
<i>n</i> -BuLi	2,0	0	2,0	THF	3,5	-78	30	0
<i>sec</i> -BuLi	1,1	0	2,0	THF	3,5	-78	30	0
<i>sec</i> -BuLi	1,1	1,1	2,0	THF	3,5	-78	30	0
<i>sec</i> -BuLi	1,1	0	2,0	THF	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>sec</i> -BuLi	1,1	1,1	2,0	THF	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>sec</i> -BuLi	2,0	0	2,0	THF	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>sec</i> -BuLi	2,0	2,0	2,0	THF	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>tert</i> -BuLi	1,1	0	2,0	Ether	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>tert</i> -BuLi	1,1	,1,	2,0	Ether	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>tert</i> -BuLi	2,0	0	2,0	Ether	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>tert</i> -BuLi	2,0	2	2,0	Ether	3,5	ta	30	Produits dégradation
<i>tert</i> -BuLi	3,0	0	2,0	Ether	3,5	ta	30	0

Comme les résultats n'étaient pas concluants, nous avons essayé la méthode de C-H activation à partir du composé **88** (Tableau 30). Les RMN et LCMS des réactions étant difficilement interprétables nous avons décidé d'utiliser un groupement protecteur du phénol moins encombrant et plus simple, le méthoxy.

Tableau 30. Méthodologie de C-H activation sur le composé **88**.

Eq. Réactifs			Solvant	Conditons	
Pd(OAc) ₂	APTS	NIS		Température (°C)	Temps (h)
1,0	2,0	2,0	MeOD	60	15
10%	2,0	2,0	DCE	60	15
1,0	2,0	2,0	DCE	60	15
1,0	2,0	2,0	ACN	80	15
1,0	0	2,0	ACN	80	15

Schéma 101. Synthèse du composé **89**.

Comme dans la partie précédente, nous nous sommes intéressés aux réactions de C-H activation. Mais pour gagner une étape de réaction et comme cela est peu décrit, nous avons essayé de fixer directement un carbonyl sur le cycle aromatique sans passer par un dérivé halogéné. Les principales méthodes décrites permettent de fixer un groupement ester éthylique. D'autres méthodes de C-H activation permettent d'effectuer une formylation mais en utilisant comme réactif le monoxyde de carbone, qui au vu de sa toxicité n'a pas été retenu.²⁸⁶ Plusieurs complexes du palladium ont été testés (Pd(OAc)₂,²⁷⁵ Pd(TFA)₂/dppp,²⁸⁷ PdCl₂(PPh₃)₂). D'autres catalyseurs peuvent être utilisés tel que le RuCl₂(PPh₃)₃.²⁸⁸ Différents activateurs ont été testés : le Cu(OAc)₂,²⁵⁷ l'oxone,²⁵⁷ l'APTS^{289,290} ainsi que l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP).^{257,287} Les réactifs couramment utilisés sont le DEAD,²⁵⁷ le glyoxylate d'éthyle²⁸⁷ et le chloroformiate d'éthyle.²⁸⁸

Les résultats présentés dans le Tableau 31 montrent qu'aucune des conditions n'a été opérante. Deux résultats s'imposent : soit rien ne se produit et nous obtenons le produit de départ ; soit une réaction s'effectue est nous obtenons en plus du produit de départ un mélange de produits de dégradation. Nous avons donc décidé de continuer les tests d'iodation par C-H activation (Tableau 32).

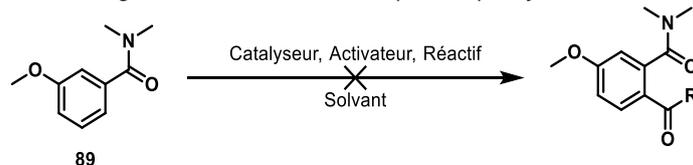
²⁸⁶ Orito, K.; Horibata, A.; Nakamura, T.; Ushito, H.; Nagasaki, H.; Yuguchi, M.; Yamashita, S.; Tokuda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (44), 14342–14343.

²⁸⁷ Wang, S.; Yang, Z.; Liu, J.; Xie, K.; Wang, A.; Chen, X.; Tan, Z. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (79), 9924.

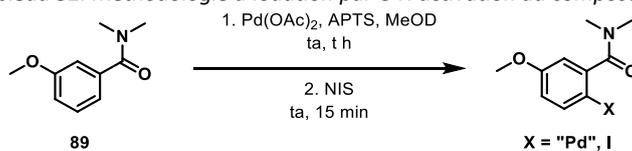
²⁸⁸ Kochi, T.; Urano, S.; Seki, H.; Mizushima, E.; Sato, M.; Kakiuchi, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (8), 2792–2793.

²⁸⁹ Bedford, R. B.; Haddow, M. F.; Mitchell, C. J.; Webster, R. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50* (24), 5524–5527.

²⁹⁰ Huang, Y.; Li, G.; Huang, J.; You, J. *Org. Chem. Front.* **2014**, *1* (4), 347.

Tableau 31. Méthodologie C-H activation sur le composé **89** pour former un dérivé carbamoylé.


R	Réactifs					Conditions			Résultat	
	Catalyseur	Eq.	Activateur	Eq.	Réactif	Eq.	Solvant	Temp. (°C)	Temps (h)	Conversion (%)
OEt	Pd(OAc) ₂	5%	Cu(OAc) ₂	10%	DEAD	2,0	DCE	100	15	0
OEt	Pd(OAc) ₂	5%	Oxone	3,0	DEAD	2,0	DCE	100	15	0
OEt	Pd(OAc) ₂	10%	Oxone	3,0	DEAD	2,0	DCE	100	15	0
OEt	Pd(OAc) ₂	5%	APTS	0,5	DEAD	2,0	DCE	100	15	0
OEt	Pd(OAc) ₂	10%	APTS	0,5	DEAD	2,0	DCE	100	15	0
OEt	Pd(TFA) ₂ / dppp	10%	TBHP	4,0	Glyoxylate d'éthyle	2,0	Toluène	120	15	Produis de dégradation
OEt	Pd(OAc) ₂ / dppp	10%	TBHP	4,0	Glyoxylate d'éthyle	2,0	Toluène	120	15	Produis de dégradation
OEt	Pd(OAc) ₂	1,0	APTS	2,0	Glyoxylate d'éthyle	1,0	DCE	80	15	Produis de dégradation
OEt	Pd(OAc) ₂	1,0	APTS	2,0	DEAD	1,0	DCE	80	15	Produis de dégradation
OEt	Pd(OAc) ₂	1,0	APTS	2,0	Chloroformate d'éthyle	1,0	DCE	80	15	Produis de dégradation
OEt	Pd(OAc) ₂	1,0	APTS	2,0	Chloroformate d'éthyle	2,0	DCE	80	15	Produis de dégradation
OEt	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	10%	K ₂ CO ₃	3,0	Chloroformate d'éthyle	2,5	Toluène	120	15	Produis de dégradation
H	Pd(OAc) ₂	1,0	APTS	2,0	DMF	1,0	DCE	80	15	Produis de dégradation

 Tableau 32. Méthodologie d'iodation par C-H activation du composé **89**.


Eq. Réactifs			Solvant	Conditions		Résultat
Pd(OAc) ₂	APTS	NIS		Température (°C)	Temps (h)	Taux de conversion (%)
1,0	2,0	-	MeOD	60	24	Formation du palladacycle
1,0	2,0	2,0	MeOD	60	24	100%
10%	0,5	-	MeOD	60	15	Formation du palladacycle
10%	0,5	2,0	MeOD	80	15	53

Comme précédemment, l'iodation catalysée par le $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ se trouve être une méthode intéressante. Des essais ont ensuite été réalisés avec du NIS et NBS dans le DCE pour étudier l'effet de l'halogène sur le rendement de la réaction (Schéma 102).

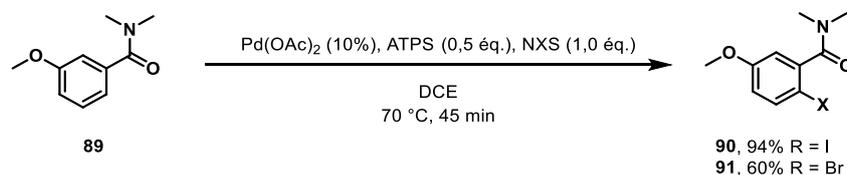


Schéma 102. Iodation et bromation par C-H activation du composé **89**.

L'intérêt de l'iodation en comparaison de la bromation est confirmée par cette réaction avec un rendement de 94% pour le composé iodé et de 60% pour le composé bromé.

Il nous a semblé intéressant de connaître l'impact des différents réactifs sur l'halogénéation. Nous avons notamment effectué les tests avec du NBS (Tableau 33). Comme nous pouvons le voir, le palladium a un effet très important. En effet, en présence de palladium, le brome vient se fixer en position *ortho* de l'amide, alors que sans lui, le brome se fixe en position *para*. En absence de C-H activation, l'halogénéation s'effectue par substitution électrophile aromatique (SEAr) et ceci de manière beaucoup plus lente.

Tableau 33. Méthodologie de bromation du composé **89**.

Eq. Réactifs				Conditons		Pourcentage de produit (%)		
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	APTS	NBS	Temps (h)	91	I	89		
10%	0,5	1,0	0,75	79	12	9		
0	0	1,0	2		65	35		

Par la suite la formylation à partir du composé **90** avec de l'acide formique n'a pas été couronnée de succès avec absence de conversion (Schéma 103).

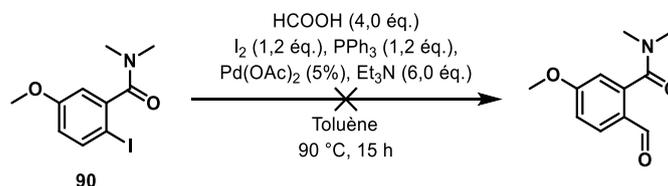
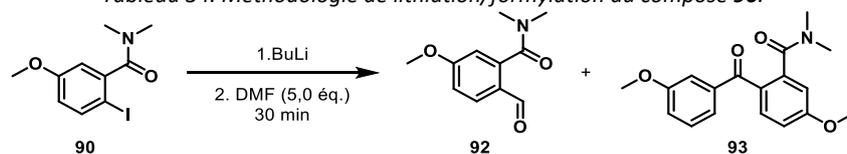


Schéma 103. Formylation du composé **90** catalysée au palladium avec HCOOH comme source de CO .²⁸⁴

Comme dans la partie précédente, nous avons donc effectué des essais de lithiation/formylation.²⁹¹ D'après les résultats présentés dans le Tableau 34, seul le *n*-BuLi à 1,1 éq. à -78 °C permet d'obtenir le

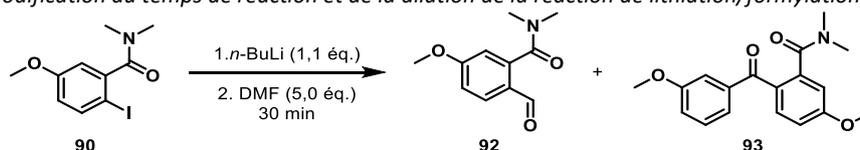
²⁹¹ Hoye, T. R.; Humpal, P. E.; Moon, B. J. *Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (20), 4982–4983.

meilleur résultat. Le produit secondaire obtenu est dû à la réaction du réactif sur un intermédiaire lithié nucléophile.

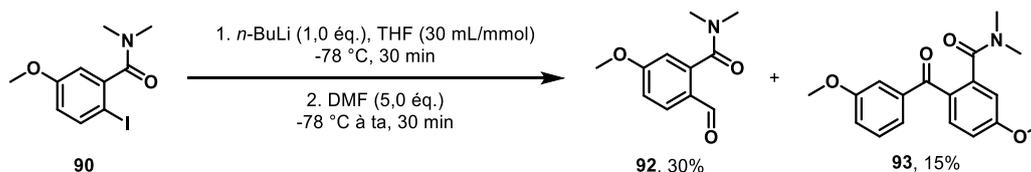
 Tableau 34. Méthodologie de lithiation/formylation du composé **90**.


Réactifs		Solvant		Conditions			Résultat	
R-BuLi	Eq.	DMF	Solvant	Volume (L/mol)	Temp. (°C)	Temps (min)	Taux de conversion (%)	92 / 93 (%)
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	30	77	54 / 23
<i>n</i> -BuLi	2,0	5,0	THF	5	-78	30	Produits de dégradation	-
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	ta	30	Produits de dégradation	-
<i>sec</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	30	100	-
<i>sec</i> -BuLi	2,0	5,0	THF	5	-78	30	Produits de dégradation	-
<i>sec</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	ta	30	Produits de dégradation	-
<i>tert</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	30	10	0 / 10
<i>tert</i> -BuLi	2,0	5,0	THF	5	-78	30	Produits de dégradation	-
<i>tert</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	ta	30	Produits de dégradation	-

Pour diminuer la quantité de produits secondaires et améliorer le taux de conversion, le temps de réaction entre le *n*-BuLi et le réactif, ainsi que la quantité de solvant sont modifiés (Tableau 35). Les meilleurs résultats se trouvent présentés dans le Schéma 104.

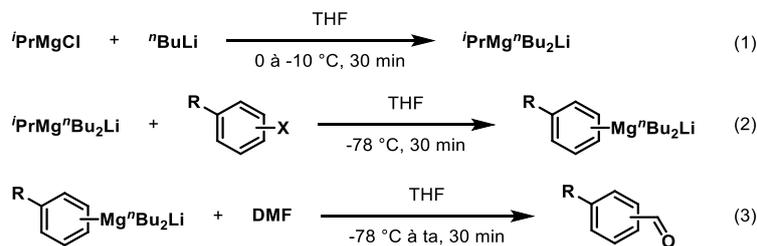
 Tableau 35. Modification du temps de réaction et de la dilution de la réaction de lithiation/formylation du composé **90**.


Réactifs		Solvant		Conditions		
R-BuLi	Eq.	DMF	Solvant	Volume (L/mol)	Temp. (°C)	Temps (min)
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	30
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	35
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	40
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	5	-78	45
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	30	-78	30
<i>n</i> -BuLi	1,0	5,0	THF	30	-100	30

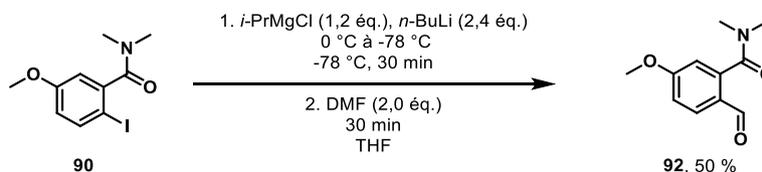

 Schéma 104. Meilleures conditions de synthèse du composé **92**.

Cette synthèse présente trois inconvénients : un faible rendement, une non reproductibilité de la réaction et une purification compliquée. En effet, le composé ayant été synthétisé plusieurs fois, le rendement après purification était compris entre 5 à 30%.

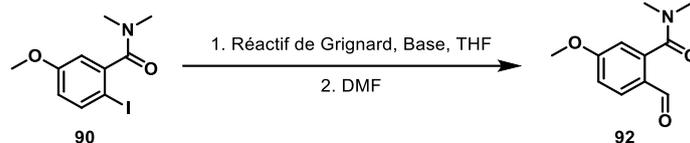
Comme dans le Tableau 28, nous avons utilisé les réactifs de Grignard *i*-PrMgCl²⁸⁰ et *i*-PrMgCl.LiCl.²⁸² les deux derniers essais sont inspirés d'une publication fort intéressante et fort surprenante de Xu *et al.*²⁹² En effet il utilise un mélange de *i*-PrMgCl / *n*-BuLi comme réactif de Grignard. Ces composés sont dans un premier temps mis en réaction à 0°C puis mélangés pendant 30 min à -10 °C dans du THF (Schéma 105.1). La réaction est ensuite refroidie à -78°C et le composé iodé est ajouté au goutte à goutte (Schéma 105.2). Après 30 min de réaction, le DMF est ajouté et est mélangé pendant 30 min de -78 °C à température ambiante (Schéma 105.3).


 Schéma 105. Mécanisme théorique de la méthode de Xu *et al.*²⁹²

D'après les résultats contenus dans le Tableau 36, seule la méthode du Schéma 105 nous donne un taux de conversion supérieur à 50%. Nous allons donc utiliser cette méthode pour synthétiser le composé **92** avec un rendement de 50% (Schéma 106).

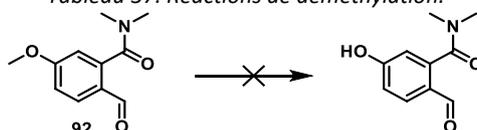

 Schéma 106. Synthèse du composé **92** à partir de la méthode de Xu *et al.*

²⁹² Xu, J.; Jain, N.; Sui, Z. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (34), 6399–6402.

Tableau 36. Méthodologie de formylation de **90** avec un réactif de Grignard.


Réactif		Solvant		Conditions		Résultats			
Réactif de Grignard	Eq.	R-BuLi	Eq.	Eq. DMF	Solvant	Volume (L/mol)	Temp. (°C)	Temps (min)	Taux de conversion (%)
<i>i</i> -PrMgCl	1,1	-	-	5,0	THF		-15	30	0
<i>i</i> -PrMgCl	1,1	-	-	5,0	THF		-15	120	0
<i>i</i> -PrMgCl.LiCl	2,0	-	-	5,0	THF		-15	30	20
<i>i</i> -PrMgCl.LiCl	2,0	-	-	5,0	THF		-15	120	20
<i>i</i> -PrMgCl	1,2	<i>n</i> -BuLi	2,4	2,0	THF		-78	30	55
<i>i</i> -PrMgCl	1,2	<i>n</i> -BuLi	2,4	2,0	THF		-78	60	55

Tableau 37. Réactions de déméthylation.



Réactifs				Conditions			Résultats
Réactif 1	Eq.	Réactif 2	Eq.	Solvant	Temp. (°C)	Temps (h)	
AlCl ₃	1,5	NaI	1,5	ACN	Rfx	15	Produit de départ
AlCl ₃	3,0	NaI	3,0	ACN	Rfx	15	Produit de départ et produit secondaire inconnu
BBr ₃	2,0 + 2,0	-	-	DCM	0	1	Produit de départ et produit secondaire inconnu
BBr ₃	4,0	-	-	DCM	0 puis ta	15	Produit de départ et produit secondaire inconnu
HBr 33% dans AcOH	8 mL/mmol	-	-	-	ta	1	Produits de dégradation
HBr 33% dans AcOH	8 mL/mmol	-	-	-	ta	15	Produits de dégradation
PhSH	1,0	K ₂ CO ₃	5%	NMP	Rfx	1,30	Produits de dégradation
Ph ₂ S ₂	0,6	CaH ₂	1,6	NMP	Rfx	1	Produits de dégradation

L'étape suivante est une déméthylation du composé **92**. Le Tableau 37 représente toutes les différentes réactions testées pour effectuer cette déprotection. Les réactifs utilisés sont les acides de Lewis, chlorure d'aluminium²⁹³ et tribromure de brome,²⁹⁴ mais aussi l'acide bromhydrique dans l'acide acétique,¹⁸⁸ le thiophénol²⁹⁵ et enfin le disulfure de diphenyle.²⁹⁶

²⁹³ Moher, E. D.; Grieco, P. A.; Collins, J. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (15), 3789–3790.

²⁹⁴ Haydon, D. J.; Bennett, J. M.; Brown, D.; Collins, I.; Galbraith, G.; Lancett, P.; Macdonald, R.; Stokes, N. R.; Chauhan, P. K.; Sutariya, J. K.; et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (10), 3927–3936.

²⁹⁵ Chakraborti, A. K.; Sharma, L.; Nayak, M. K. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (18), 6406–6414.

²⁹⁶ Gavande, N. S.; Kundu, S.; Badgujar, N. S.; Kaur, G.; Chakraborti, A. K. *Tetrahedron* **2006**, *62* (17), 4201–4204.

En raison d'échecs répétitifs, nous avons décidé d'essayer de déméthyle le composé iodé, avant l'échange halogène / métal et la formylation, avec du BBr_3 . Comme nous le voyons dans le Schéma 107 la réaction est complète avec un rendement quantitatif.

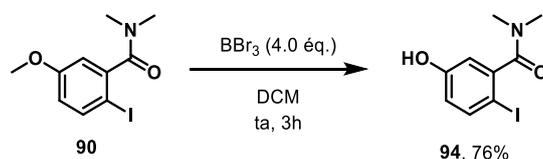


Schéma 107. Déméthylation du composé **90**.

Malheureusement par absence de temps, la suite réactionnelle n'a pu être effectuée. Les prochaines étapes sont présentées dans le Schéma 108.

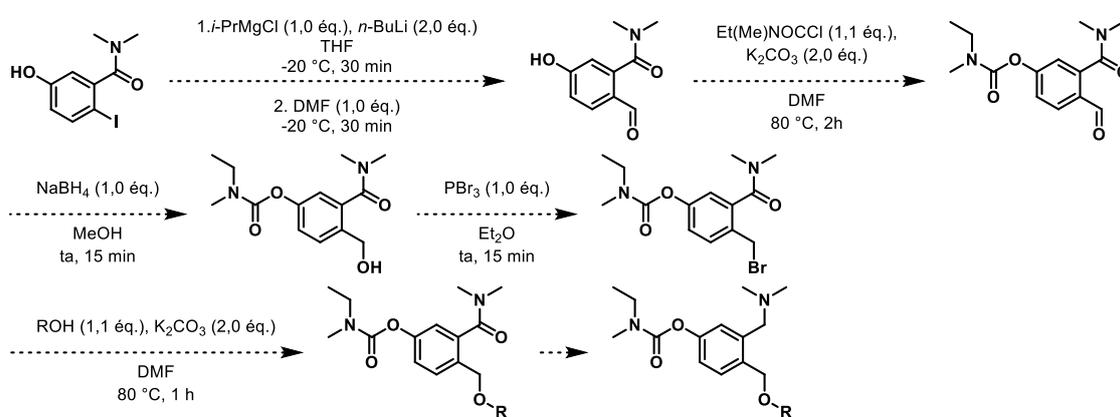


Schéma 108. Perspective de synthèse pour obtenir les composés finaux avec une liaison éther en position para du carbamate.

4.3.3. Carbamate

Une dernière série a été imaginée : protéger le phénol directement par le groupement éthylméthylcarbamate (Schéma 109). Mais au vu du très faible rendement de la réaction, cette voie a été vite abandonnée.

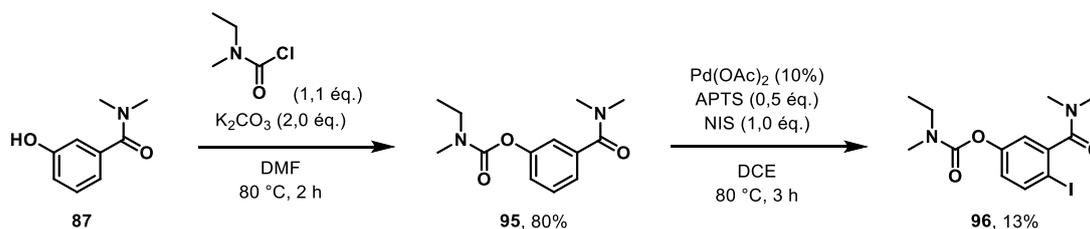
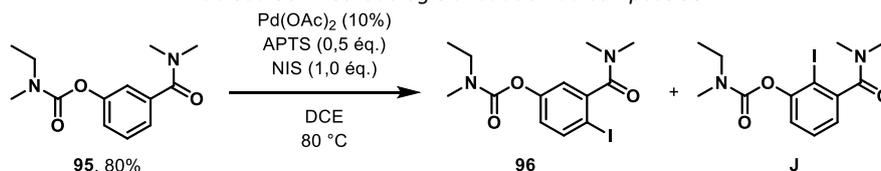


Schéma 109. Formation du composé iodé **86** en position para du carbamate.

Cette synthèse nous a permis aussi d'étudier l'influence du palladium et de l'APTS. Les résultats présentés dans le Tableau 38 nous montrent que le palladium nous permet d'augmenter le taux de formation du composé souhaité, mais surtout de diminuer le temps de réaction.

Tableau 38. Méthodologie d'iodation du composé 95.



Réactif		Résultats	
Eq. Pd(OAc) ₂ (mmol %)	Eq. APTS	Taux de conversion	96 / J (%)
100	0,5	100	50 / 50
50	0,5	100	67 / 33
10	0,5	100	40 / 60
0	0,5	20	20 / 0
0	0	0	-

4.4. Perspectives de synthèse de composés possédant un second groupement carbamate.

La liaison carbamate étant moins stable qu'une liaison éther, il peut être intéressant de former cette liaison dans nos molécules pour faciliter la libération du produit actif secondaire. Voici un exemple de synthèse à partir de la mémantine. Il existe de nombreuses possibilités de former des groupements carbamate, l'une d'elle s'effectue en 2 étapes à partir d'une amine primaire (Schéma 110).⁹⁵ La première consiste à former un chlorure de carbamoyle à partir d'une amine en présence de triphosgène et de DIPEA.²⁹⁷ Le seconde étape consiste en l'introduction de ce groupement activé sur l'alcool benzylique.

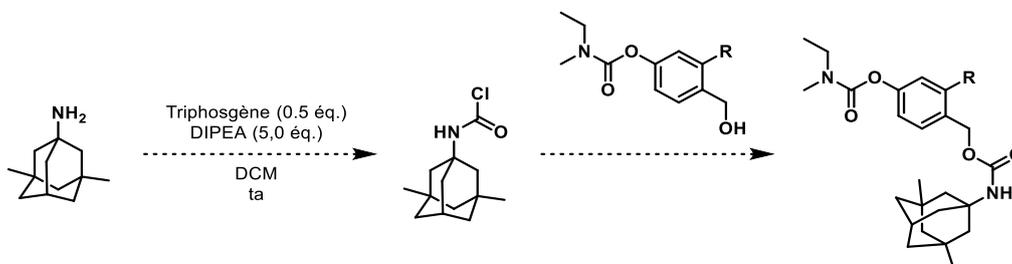


Schéma 110. Synthèse d'un groupement carbamate à partir d'une amine et de triphosgène.

5. Synthèses des composés dont le groupement partant se situe en position ortho du carbamate

5.1. Analyse rétrosynthétique

Pour la synthèse des composés positionnés en *ortho* du carbamate, celle-ci consiste en une amination réductrice ou réaction de Mitsunobu (Schéma 111A). Le groupement carbonyle est formé par

²⁹⁷ Mcgeehan, G.; Simpson, R. D.; Zeng, W.; Baldwin, J. J.; Claremon, D. A.; Dillard, L. W.; Ishchenko, A. V.; Yuan, J.; Xu, Z.; Cacatian, S.; *et al.* WO 2006083924 A1, 2006.

lithiation/formylation (Schéma 111B). Enfin la première étape correspond à une amination-réductrice du composé **15** (Schéma 111C).

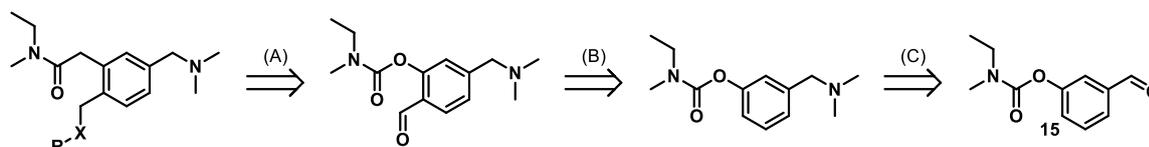


Schéma 111. Analyse rétrosynthétique des ligands en position ortho du carbamate.

5.2. Synthèse des ligands en position ortho du carbamate

5.2.1. Voie de synthèse commune

La première étape permet de synthétiser le composé **97** grâce à une amination-réductrice à partir du composé **15** et de la diméthylamine en solution dans le méthanol (Schéma 112).

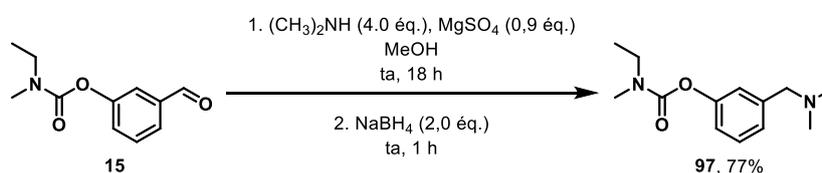


Schéma 112. Synthèse du composé **97** à partir de **15** par amination-réductrice.

La réaction de formylation pour former le composé **101** commence par une lithiation du composé **97**. Dans des travaux précédents au laboratoire, cette réaction a été effectuée sur des structures proches. Les meilleures conditions correspondaient à l'utilisation de *s*-BuLi à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min. Le Tableau 39 résume les différentes conditions expérimentales basées sur les études précédentes. Il s'agit dans un premier temps de modifier la température de réaction du *s*-BuLi.

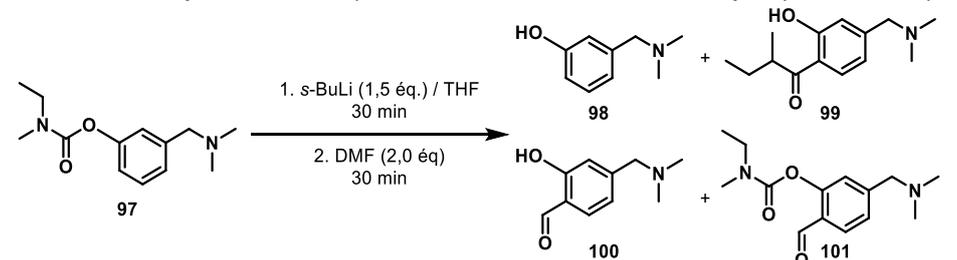
Les résultats sont assez intéressants, nous pouvons voir qu'en général, la présence de BuLi entraîne une décarbamoxylation. A température ambiante, nous obtenons un produit secondaire **99** issu de la réaction du *s*-BuLi sur le carbonyle formé après la formylation.

La modification de la température ne permettant pas d'obtenir le produit final, nous avons décidé d'ajouter du tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dans l'hexane, le butyllithium forme un hexamère, mais en présence de TMEDA il forme un tétramère solvato de plus haute réactivité.²⁹⁸ De plus Nguyen *et al.* démontrent dans une publication de 2007 que l'association *s*-BuLi/TMEDA à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ favorise la métallation en position *ortho* d'un carbonyle.²⁵⁸ Les meilleures conditions consistent à mettre en mélange pendant 5 min le composé **97** et du TMEDA à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le *s*-BuLi est ensuite ajouté au goutte à goutte puis mis à agiter pendant 30 min. Nous additionnons le DMF et laissons la température remonter à TA pendant 30 min. La réaction est ensuite quenchée et purifiée par chromatographie flash en utilisant un mélange DCM/MeOH. Nous obtenons ainsi le composé **100** avec

²⁹⁸ Lewis, H. L.; Brown, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92 (15), 4664–4670.

un rendement de 79% (Schéma 113). La carbamoylation de **100** nous donne la molécule **101** (avec un rendement de 88%), qui nous servira de molécule de base pour les séries éthers et amines.

Tableau 39. Etude de l'influence de la température et du TMEDA sur la lithiation/formylation du composé **97**.



Réactifs	Conditions	Résultats	
Eq. TMEDA	Temp. (°C)	Taux de conversion	
0	-78	0	
0	-40	Produits de dégradation	
0	-10	0	
0	0	100	
0	ta	26	
1,5	-78	100	

			Résultats
			98 / 99 / 100 / 101 (%)
0	-78	0	-
0	-40	Produits de dégradation	
0	-10	0	-
0	0	100	Mélange des composés 98 et 100
0	ta	26	0 / 26 / 0 / 0
1,5	-78	100	0 / 0 / 50 / 50

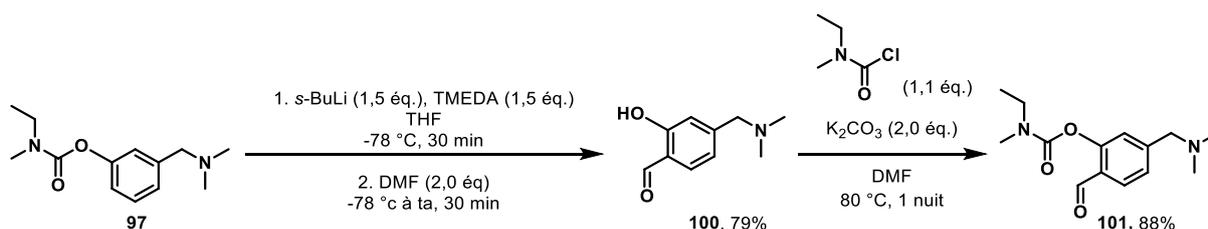


Schéma 113. Synthèse du composé **101** par lithiation/formylation de **97**.

En parallèle, il nous a paru intéressant de synthétiser et caractériser les composés secondaires **98** et **99** (Schéma 114).

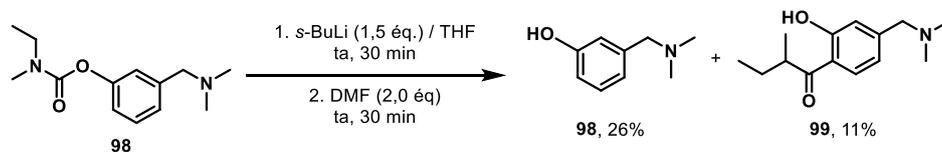


Schéma 114. Réaction à TA pour isoler et caractériser les composés **98** et **99**.

5.2.2. Série Ether

La synthèse du composé **103** consiste en une réduction de l'aldéhyde par du NaBH_4 , suivi d'une bromation et d'une substitution nucléophile par du TFMU. Le rendement de cette réaction est de 4 %, l'étape de bromation formant un dérivé peu stable (Schéma 115). Une très faible quantité de produit a été synthétisée (quelques milligrammes) et ceci n'a pas pu être reproduit. Pour augmenter ce rendement, plusieurs essais de réaction de Mitsunobu ont été réalisés dans différentes conditions expérimentales (Schéma 116). Aucun résultat concluant n'a été obtenu.

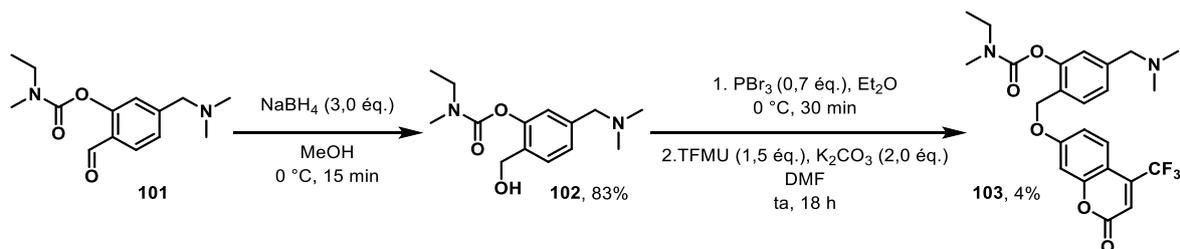


Schéma 115. Formation du composé final **103** par réduction et substitution nucléophile.

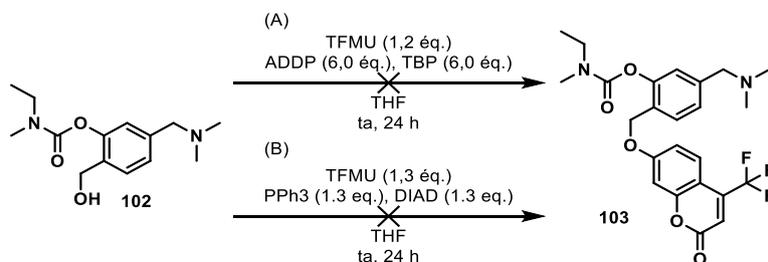


Schéma 116. Formation de **103** à partir de **102** par la réaction de Mitsunobu ; A. Conditions expérimentale de la réf. [254] ; B. Conditions classiques.

5.2.3. Série Amine

5.2.3.1. Fluorochrome

En série amine, nous avons installé un fluorochrome, la 6-aminocoumarine à notre molécule **101** par amination-réductrice (Schéma 117). Nous avons obtenu cette molécule avec un rendement de 51% et celle-ci sera utilisée pour effectuer des tests *in vitro* d'affinité sur l'AChE et la BuChE, ainsi que des tests de décarbamoylation.

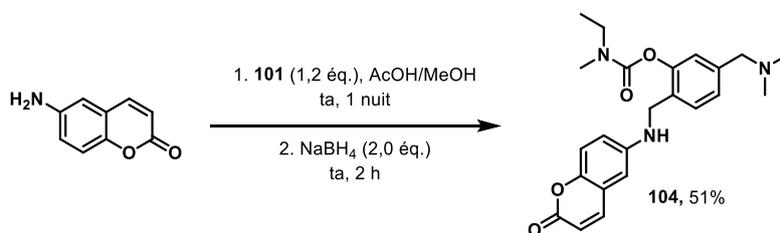


Schéma 117. Fixation de la 6-aminocoumarine en ortho du carbamate par amination-réductrice.

5.2.3.2. Mémantine

Comme en position *para* du carbamate, cette fois plusieurs tests ont été effectués pour fixer la mémantine en position *ortho* du composé **101**. Trois méthodes ont été tentés :

1. Schéma 118.A : Réduction de l'imine par le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ dans le DCM : aucune conversion après une nuit.
2. Schéma 118.B : Réduction de l'imine par le NaBH_4 dans le MeOH : 100 % de conversion. Deux colonnes en phase inverse ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) n'ont pas permis de séparer le composé final et la mémantine, et l'utilisation de silice en phase normal (DCM/MeOH) a provoqué une dégradation des produits.
3. Schéma 118.C : Réduction de l'imine avec ZnCl_2 : en cours de réalisation.²⁷¹

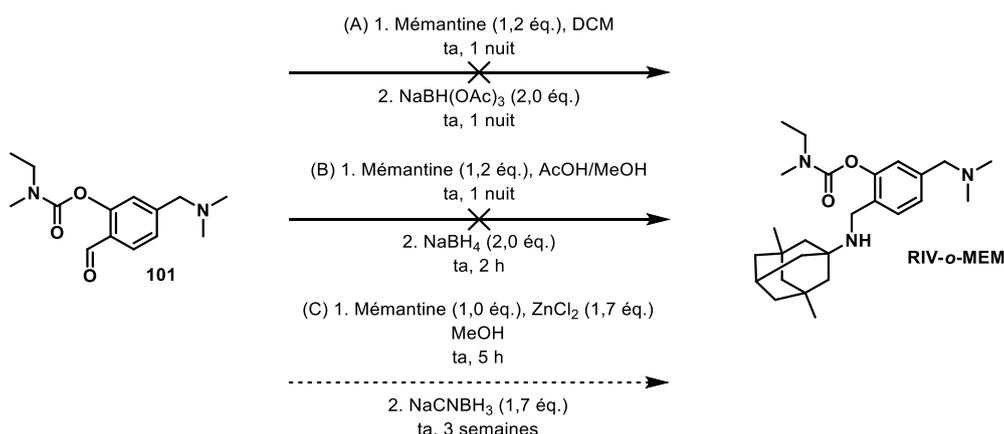


Schéma 118. Fixation de la mémantine en ortho du carbamate par amination-réductrice ; A : Réducteur NaBH(OAc)₃ ; B : Réducteur NaBH₄ ; C : Réducteur ZnCl₂.

5.3. Résultats *in vitro*

D'après les résultats *in vitro*, présentés dans le Tableau 40, nous voyons que le composé **102** est complètement inactif sur les cholinestérases, alors que le composé **104** est un inhibiteur de la BuChE(*eq*) avec une IC₅₀ de 7 μM (du même ordre de grandeur que les inhibiteurs compétitifs comme la rivastigmine). Les tests de stabilité seront donc à faire en présence de BuChE et non d'AChE.

Tableau 40. Activité inhibitrice sur l'AChE(*h*) et sur la BuChE(*eq*) (% inhibition ou IC₅₀), des composés **102** et **104**.

Composés	R	AChE(<i>h</i>)	BuChE(<i>eq</i>)
		IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M	IC ₅₀ (nM) (n=2) % inh. 10 ⁻⁶ M
RIV	-	4.150 ± 160 ¹	1.800 ± 30 ²
DPZ	-	11,1 ± 0,4 97%	-
TAC	-	-	2,7 ± 0,2 90%
102	OH	25.575 ± 2.991 5%	27.785 ± 4.533 20%
104	6-aminocoumarine	48.385 ± 6.428 9%	7.021 ± 0.733 59%

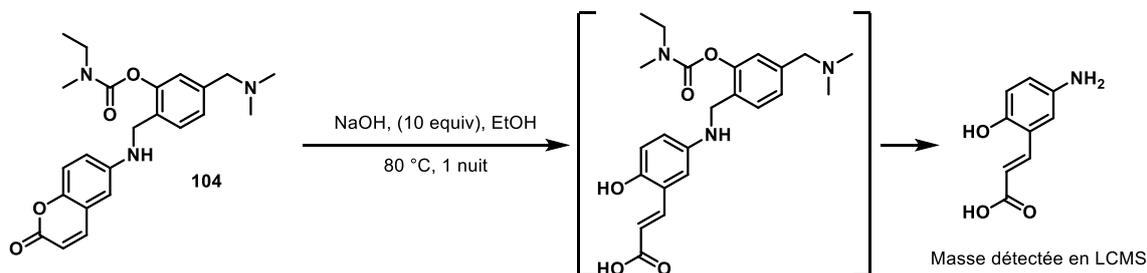
Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (SEM) d'au moins deux expériences ; ¹Données de la réf. [85] ; ²Données de la réf. [86].

5.4. Décarbamoxylation *in vitro*

5.4.1. Evaluation de la décarbamoxylation du composé **104** en milieu basique

Les tests de décarbamoxylation en absence d'enzyme sont effectués à partir de la soude à 80 °C. Lors du suivi de la réaction, nous observons l'ouverture du cycle lactone très rapidement (plus de **104** à 1 h), puis la décarbamoxylation s'effectue de manière un peu plus lente conduisant ainsi à la libération de l'acide 3-(5-amino-2-hydroxyphenyl)prop-2-énoïque (réaction complète après 18h). Le spectre de

masse prouve la présence de l'acide, mais l'analyse RMN s'est avérée être compliquée à analyser avec de nombreux produits de dégradation.



5.4.2. Evaluation de la décarbamoylation du composé **104** en présence de BuChE

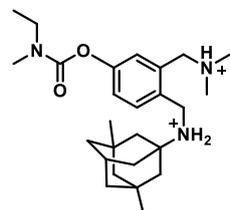
Il conviendra d'effectuer le test de décarbamoylation du composé **104** en présence d'un excès de BuChE (250 U/mL pour 5 μ M de produit), pendant 18h à 25 °C. Cette réaction devrait permettre l'inhibition de la BuChE, et la libération de la 6-aminocoumarine et de la 3-[(diméthylamino)méthyl]-6-méthylidencyclohexa-2,4-dien-1-one.

Pour vérifier l'activité potentielle des composés RIV-p-MEM et RIV-o-MEM sur l'AChE(h) et la BuChE(h), des études de docking et de modélisation moléculaire ont été menées pour ces deux composés. Ici seront présentés les premiers résultats uniquement sur l'AChE(h), les autres études étant en cours.

6. Résultats *in silico* de RIV-p-MEM et RIV-o-MEM

Comme dans le chapitre 3.2.2, nous avons utilisé pour le docking la structure de l'AChE(h) co-cristallisée avec le donépézil (4EY7),⁷⁷ avec Glu202 protoné, la chaîne latérale de la Ser203 ayant été rendue flexible. Le calcul de la protonation du ligand a prédit une protonation de la diméthylamine et de l'amine secondaire à pH = 7,4 de RIV-P-MEM et RIV-o-MEM.

6.1. RIV-p-MEM



Le docking a généré neuf poses pour le composé **RIV-p-MEM**, pour lesquelles la mémantine est orientée vers la triade catalytique. Comme aucune de ces poses ne présentait de liaison H entre le C=O du carbamate et le OH de la Ser203, une contrainte de liaison H entre les deux groupements a été imposée au cours du docking suivant.

docking suivant.

Les poses proposées au cours du second docking établissent la liaison H entre C=O et OH mais les valeurs de scores de fit sont moins élevés qu'au cours du premier docking. D'après le résultat du docking, le composé pourrait rentrer dans le site actif de l'AChE(h) en rapprochant le carbamate à la

Ser203 et l'affinité devrait être de l'ordre de la rivastigmine. Il n'y a pas d'autres interactions que celle du groupement carbamate.

Une simulation de dynamique moléculaire de 50 ns a été réalisée sur ce complexe et a montré que le motif mémantine n'entraîne pas la sortie du composé du site actif de l'AChE.

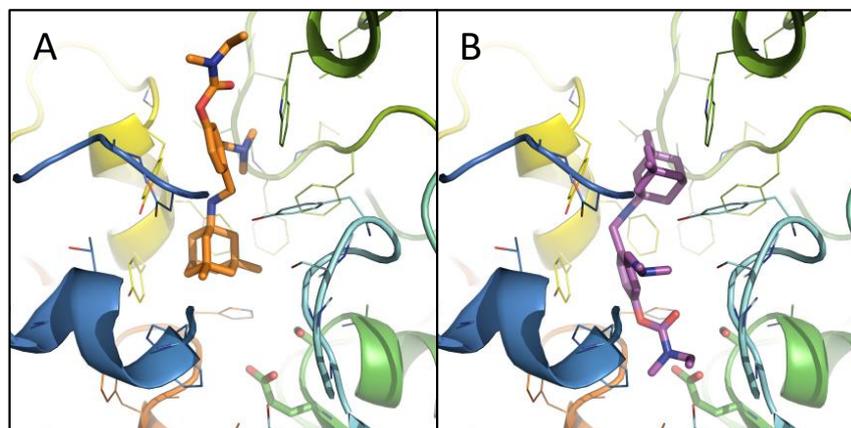
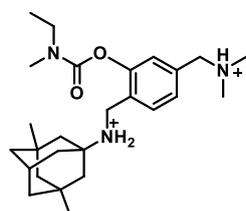


Figure 91. A. Positionnement de **RIV p-MEM** sans contrainte dans la gorge aromatique de l'AChE ; B. Positionnement de CPM avec contrainte, liaison hydrogène entre C=O du carbamate et OH de la Ser198. Le composé et les chaînes latérales des résidus sélectionnés du site de liaison sont représentés en bâtonnet et la protéine en ruban. Cette figure a été réalisée avec PyMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, États-Unis).

6.2. RIV-o-MEM



Le docking a généré six poses pour le composé **RIV-o-MEM**, dont deux solutions où la mémantine se trouve en face de la Ser203, trois solutions où la diméthylamine protonée se positionne face à la Ser203, et une dernière solution où la molécule se trouve très éloignée de la Ser203. Comme aucune de ces poses ne présentait de liaison H entre le C=O du carbamate et le OH de la Ser203, une contrainte de liaison H entre les deux groupements a été imposée au cours du docking suivant.

Les poses proposées au cours du second docking établissent la liaison H entre C=O et OH mais les valeurs de scores de fit sont moins élevées qu'au cours du premier docking. D'après le résultat du docking, le composé pourrait rentrer dans le site actif de l'AChE(*h*) en rapprochant le carbamate de la Ser203 (Figure 92).

Une simulation de dynamique moléculaire de 50 ns a été réalisée sur ce complexe et a montré que le groupement mémantine n'entraîne pas la sortie du composé du site actif de l'AChE.

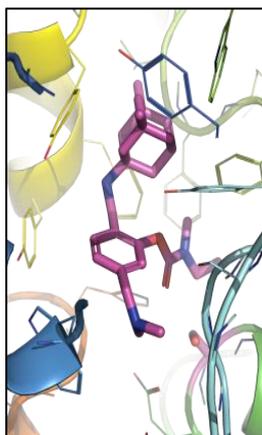


Figure 92. Position de RIV-o-MEM positionné dans les sites de liaisons de l'AChE(h) en utilisant les études de docking. Le composé et les chaînes latérales des résidus sélectionnés du site de liaison sont représentés en bâtonnet et la protéine en ruban. Cette figure a été réalisée avec PyMOL (DeLano Scientific, 2002, San Carlo, États-Unis).

7. Conclusion

Cette partie s'intéressait aux ligands autoimmolables pléiotropes. Pour rappel, les ligands autoimmolables étudiés ci-dessus sont en fait des composés qui permettent de libérer, suite à une réaction chimique ou enzymatique suivie par un mécanisme de relocalisation électronique, un dérivé se positionnant en position *ortho* ou *para* du groupement modifié. La synthèse de prodrogues pléiotropes autoimmolables permet dans ce projet de thèse d'augmenter considérablement la variabilité structurale des composés à relarguer en comparaison des prodrogues pléiotropes du chapitre 3.

La synthèse de 6 composés simples possédant un groupement carbamate (éthylméthyl ou diméthyl), un cycle aromatique et un fluorochrome (TFMU) nous a permis de démontrer plusieurs choses. D'une part lorsque TFMU est positionné en position *ortho* (**66a** et **68a**) et *para* (**66b** et **68b**) du carbamate, l'ajout d'hydroxyde de sodium à 80 °C provoque une décarbamoylation, une relocalisation électronique et la libération du TFMU (dont la lactone a subi une saponification) et la formation d'une méthide quinone par élimination 1,4 ou 1,6. Ceci n'est pas exact en position *méta* (**67** et **68c**) où seule la décarbamoylation se produit. D'autre part l'analyse *in vitro* de ces molécules, montrent que seuls les composés **67** et **68c** sont inhibiteurs de la BuChE(*eq*) et aucun n'a d'activité anti-AChE(*h*), cela ouvrant deux hypothèses :

1. La présence du groupement amine en *méta* apparaît indispensable pour l'activité inhibitrice anti-ChE (cf. rivastigmine)
2. La présence d'un groupement encombrant en *méta* permettrait une inhibition spécifique de la BuChE.

Suite à cette dernière hypothèse une nouvelle stratégie a été proposée qui consiste à synthétiser des composés possédant un groupement naphthalène en *méta* et la substance active secondaire à relarguer en position *ortho*.

Les autres projets consistent à synthétiser divers composés variant en plusieurs points :

- Liaison chimique entre le ligand autoimmolable et le métabolite secondaire : éther, amine ou carbamate
- La position du métabolite secondaire vis-à-vis du carbamate : *ortho* ou *méta*
- Le rôle du métabolite secondaire : fluorochrome permettant de faciliter les études *in vitro* de décarbamylation comme le TFMU et dansylamide, ou une substance active tel que la mémantine.

Les tentatives de synthèse ont permis de développer de nouvelles voies de lithiation/formylation, de C-H activation catalysées au palladium et l'utilisation de réactif de Grignard. Malheureusement uniquement deux molécules finales ont pu être synthétisées et une seule a pu être testée biologiquement en raison des difficultés de synthèse rencontrées. La voie de synthèse est désormais mise au point et sera prochainement valorisée par l'introduction de composés de nature variée. Cette unique molécule a montré des intérêts dans l'inhibition de la BuChE, et les premiers tests de relargages suite à la décarbamylation par de l'hydroxyde de sodium se sont montrés concluants. Des examens complémentaires de décarbamylation et relargage en présence d'enzyme seront à effectuer. Les essais sur la BuChE seront à refaire sur BuChE(*h*). Deux molécules ayant comme métabolite la mémantine sont actuellement en cours de synthèse, les résultats *in silico* sur l'ACH(*h*) étant concluants (mais devront être complétés par une analyse sur BuChE(*h*)) et nous espérons que celles-ci auront des propriétés biologiques intéressantes.

Conclusion – Perspectives

Comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, la maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative multifactorielle. Elle se caractérise principalement par la formation de plaques amyloïdes, induites entre autre par une surexpression de β -sécrétase impliquant la formation de fragment A β constitutif de ces plaques, ainsi que par l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Diverses hypothèses sont avancées pour expliquer les symptômes cette maladie, dont un déficit cholinergique induit par la neurodégénérescence.

Actuellement les principaux médicaments possédant une AMM en France sont des inhibiteurs de cholinestérase, dont la rivastigmine. Cette molécule inhibe de façon covalente et compétitive l'AChE et la BuChE au niveau de leur actif. Cette inhibition procède de la carbamoylation des cholinestérases et entraîne la libération du dérivé phénolique de rivastigmine, qui est lui inactif. Ces inhibiteurs de ChE, toutefois, ne présentent qu'une activité symptomatique. Ils perdent en outre leur relative efficacité avec l'évolution de la maladie et ne sont utilisés que dans les formes précoces et intermédiaires de celle-ci.

Actuellement les nombreuses molécules dans les différentes phases d'essais cliniques visent diverses cibles et notamment le peptide A β et la protéine tau. Le système sérotoninergique fait partie des cibles intéressantes, principalement les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆, et certains de leurs ligands ont été évaluées chez l'Homme en clinique, tels que le RS67333 (agoniste des 5-HT₄R) et l'idalopirdine (antagoniste des 5-HT₆R). Malheureusement, aucune molécule n'a pu atteindre le stade de mise sur le marché.

Pour essayer d'améliorer l'efficacité des nouveaux traitements, un nouveau concept a été imaginé. Celui des multi-target directed ligands (MTDL), qui vise plusieurs cibles définies et induisent une synergie d'action. Ainsi le CERMN a synthétisé de nombreuses molécules MTDL, dont le donécopride, inhibiteur de l'AChE et agoniste des 5-HT₄R, et actuellement en essais précliniques.

Parallèlement une autre équipe a proposé un MTDL d'une autre nature : le ladostigil. Cette molécule est d'abord IChE, qui suite à son inhibition va libérer une molécule IMAO. Elle possède donc les caractéristiques des prodrogues ainsi que celle des MTDL et peut être qualifiée prodrogue pléiotrope (ou promédicament multicible).

Le principe de ce travail a été de synthétiser de nouvelles prodrogues pléiotropes basées sur le scaffold de la rivastigmine. Deux nouveaux types de molécules ont été développés (Figure 93).

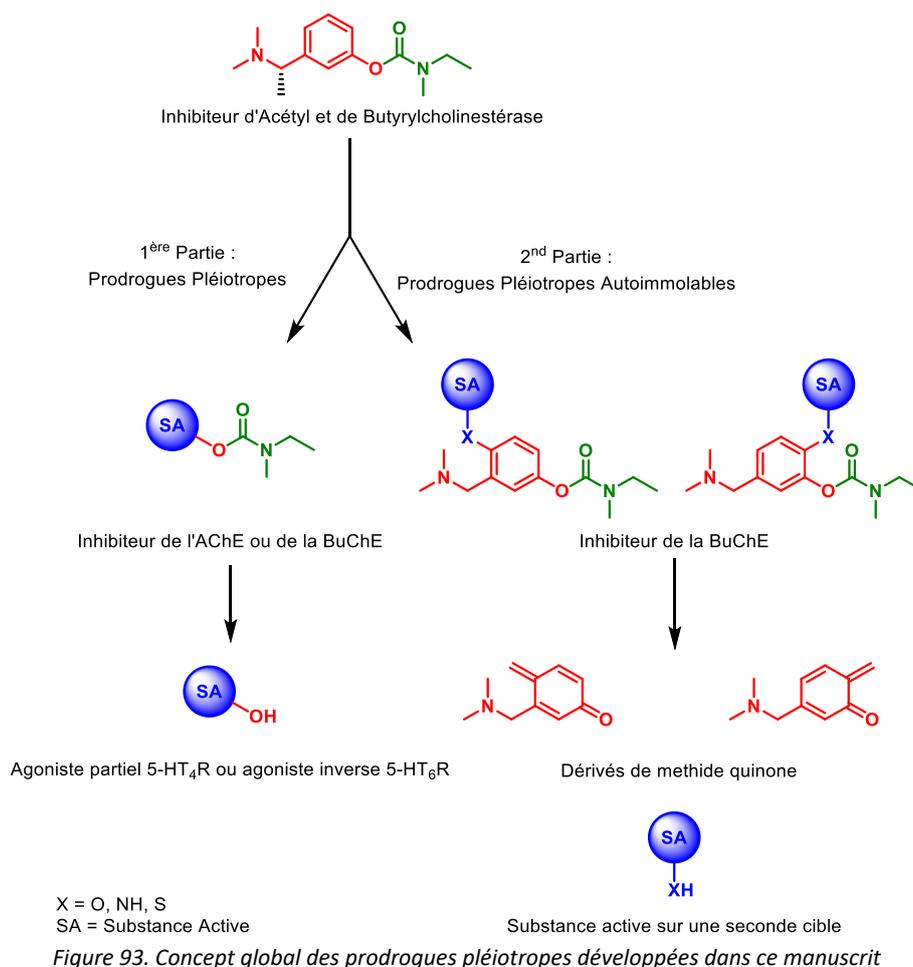


Figure 93. Concept global des prodrugs pléiotropes développées dans ce manuscrit

Dans une première série, des composés possédant le motif *m*-hydroxybenzylamine du métabolite de la rivastigmine ont été désignés pour exprimer, soit un effet agoniste partiel des 5-HT₄R, soit un effet agoniste inverse des 5-HT₆R. Ces composés ont ensuite été carbamoylés sur le modèle de la rivastigmine, en prodrugs dénuées d'affinité pour les 5-HTR (pour éviter d'éventuels effets périphériques), susceptible d'être activées par inhibition des cholinestérases centrales et de libérer dans le cerveau leur second principe actif. Cette approche a démontré son intérêt. Celui-ci est cependant limité par la nécessité de la présence un motif *m*-hydroxybenzylamine dans la structure du principe actif devant être libéré par la prodrogue.

Pour contourner cette limitation structurale, un second type de prodrogue pléiotrope a été développé : les prodrugs pléiotropes autoimmolables. Ces molécules, surtout décrites en oncologie, comprennent trois portions : *trigger*, *linker* et effecteur. Une fois le *trigger* détaché de la molécule, le *linker* subit une relocalisation électronique permettant de libérer un effecteur, si celui-ci est positionné en *ortho* ou *para* du *trigger*.

La synthèse de composés actifs, en position *para* du carbamate, a permis de développer de nouvelles stratégies de synthèse mais n'a pas permis d'obtenir les composés finaux voulus.

Pour les substances actives positionnées en position *ortho*, une molécule a été synthétisée. Les premières analyses montrent une libération de la substance active secondaire suite à une décarbamoxylation en milieu basique. De nouveaux essais de décarbamoxylation en présence de BuChE sont prévus dans un temps proche. Il conviendra de finaliser la synthèse de substances actives en position *para*.

Ce concept de prodrogue pléiotrope autoimmolable permettra le développement de molécules ayant une grande variabilité structurale et donc une grande variabilité de cible et d'action. Nous pouvons imaginer des substances actives secondaires ayant des actions antioxydante, de chélation d'ions ou encore des inhibiteurs de GSK3.

Partie Expérimentale

1. General experimental conditions

Reactant and reagents: All commercially available compounds were used as received. Other reagents were used as provided by chemical companies. All reactions involving air and moisture sensitive reagents were performed under N₂ using syringe-septum cap technique. Column chromatography was performed on silica gel (60 Å, particle size 35-70 µm) or RP-18 (50 µm). All reported solvent mixture are volume measures.

¹H, ¹³C, ¹⁹F NMR spectrometer ¹H and ¹³C spectra were recorded, respectively, at 400 MHz and 100 MHz with a Jeol Lambda 400 MHz NMR spectrometer and a Bruker Advance 400 MHz spectrometer. ¹⁹F NMR spectra were recorded at 282 MHz with a Bruker Advance 400 spectrometer. CDCl₃ or DMSO or CD₃OD or CD₃CN were used as solvents. ¹H and ¹³C chemical shift (δ) are quoted in parts per million (ppm) relative to residual solvent peaks as appropriate. ¹⁹F spectra were externally referenced to CFCl₃. The coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). The NMR signals were designated as follows: br s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), or a combination of the above.

LC-MS (ESI) analyses were realized with Waters Alliance 2695 as separating module using the following gradients: A (95%) /B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min. (A = H₂O, B = CH₃CN; each containing HCOOH: 0.1 %; column XBridge C18 2.5 µm/4.6x50 mm; flow rate 0.8 mL/min) MS were obtained on a SQ detector by positive ESI. Mass spectrum data are reported as *m/z*.

High resolution mass spectra (HRMS) were recorder on a Waters Acquity UPLC H-ClassXevo G2-XS spectrometer using positive electrospray ionization (ESI).

Melting Point were determined on a Kofler melting point apparatus or measured on a Stuart Automatic Melting point SMP-50 apparatus.

Infrared spectra (IR) were obtained on a PERKIN-ELMER FT-IR spectrometer and are reported in terms of frequency of absorption (cm⁻¹) using KBr discs. Data are reported as fellows: stretching vibration (ν) and bending vibration (δ).

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on pre-coated sheets of silica gel 60F254. Visualisation was performed with a UV light. Silica gel technical grade 0.063-0.200 mm-60 Å was used for all column chromatography.

Flash Chromatographies were performed on a VWR SPOT II Essential instrument with silica gel 0.040-0.063 mm-60 Å. Column's size and flow rate were used according to manufacturer's recommendation.

X-ray diffraction experiments: Single crystal X-ray analyses were carried out using graphite-monochromatized Mo K α radiation on a Bruker-Nonius Kappa II diffractometer equipped with a CCD area detector or on BRUKER D8 Quest diffractometer with a PHOTON2 detector. The crystal structure was solved by direct methods using the SHELX97 package²⁹⁹ and refined using SHELXL.³⁰⁰ The refinement was based on F^2 for all reflections, and all non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atom positions were determined either *via* difference Fourier maps and refined with isotropic atomic displacement parameters or were calculated and fixed in ideal geometry, depending on data quality.

IUPAC nomenclature was used for all compounds. For the description of NMR spectra, the numbering used for hydrogens can be different than the IUPAC numbering. Compounds, that are not fully characterized, may already have been described in the literature, according to the references cited.

Yields refer to chromatographically and spectroscopically (¹H NMR) homogeneous materials, and are mostly unoptimized. NMR spectroscopy (¹H) was used to determine the proportions of mixture.

2. Chemistry

2.1. General procedures

General Procedure A, for phenol protection in acetone: To a stirred solution of phenol derivative (1.0 equiv) in acetone, was added K₂CO₃ (2.0 equiv), at 0 °C. After 5 min, the benzyl bromide (1.5 equiv) was added in the mixture. The solution was then stirred for 1 night at rt. The mixture was extracted by EtOAc, and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃, then brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo* to afford protected compound.

General procedure B, for reduction of nitrile and nitroalkene: To a stirred solution of nitrile or nitroalkene (1.0 equiv) in Et₂O was added LiAlH₄ (6.0 equiv) at 0 °C. The mixture was stirred for 3 h or 1 night at rt. The reaction was then slowly quenched with Fieser workup to afford a granular inorganic precipitate. The solution was filtered over a pad of celite, the solid was washed with EtOAc, then the filtrate was concentrated *in vacuum*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), and concentrated *in vacuo* to afford amine compound.

General procedure C, for synthesis of indole carbaldehydes (Vilsmeier-Haack reaction): Phosphorus oxychloride (2.5 equiv) was added dropwise to DMF (5 mL per 1 mL of POCl₃) with ice-bath cooling. The mixture was stirred for 5 minutes then the chosen indole (1 equiv) was added as a dimethyl

²⁹⁹ Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **1990**, *46* (6), 467–473.

³⁰⁰ Sheldrick, G. M. A Short History of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64* (1), 112–122.

formamide solution (10 mL per 1 g of indole). The mixture was then allowed to warm to rt and stirred for 3 hours. The reaction became a heavy suspension that required vigorous stirring. 3.8 M aqueous potassium hydroxide (10 equiv) was added *via* a dropping funnel and the mixture was heated to reflux overnight. It was cooled to rt before adding saturated aqueous NaHCO₃ and EtOAc until the mixture became clear and the organic layer separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over saturated aqueous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to furnish the desired aldehyde which required no further purification.

General procedure D, for the synthesis of nitro olefins: Aldehyde (1.0 equiv) and ammonium acetate (3.0 equiv) were refluxed in nitromethane (20 mL per 1 g of aldehyde) for 1 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue washed with water and filtered. The residue was purified by flash chromatography eluting with 2:1 EP/EtOAc to furnish the desired nitro olefin.

General procedure E, for reductive amination with NaBH(OAc)₃: To a stirred solution of amine (1.0 equiv) in MeOH, was added aldehyde (1.6 equiv) and few drops of acetic acid. The reaction was stirred at rt for 1 night. NaBH(OAc)₃ (3.0 equiv) was added and the solution was stirred at rt for 5 h. The solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), and concentrated *in vacuo* to afford amine compound.

General Procedure F, for alkylation in DMF: To a stirred solution of alcohol or phenol derivative (1.0 equiv) in DMF, was added K₂CO₃ (2.0 equiv), at 0 °C. After 5 min, the halogenated derivative (1.1 equiv) was added in the mixture. The solution was then stirred for 2 h at 80 °C. The mixture was extract by EtOAc, and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃, then brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo* to afford protected compound.

General procedure G, for the formation of fumarate salt: To a stirred solution of basic compound (1.0 equiv) in *i*PrOH was added fumaric acid (0.95 equiv). The solution was refluxed. The mixture was then concentrated *in vacuo*. The residue was triturated in Et₂O and then filtrated to afford fumarate salt.

General procedure H, for phenol protection with imidazole: To a stirred solution of phenol derivative (1.0 equiv) in DCM, was added imidazole (2.0 equiv), at 0 °C. After 5 min, the protecting group (1.1 equiv) was added in the mixture. The solution was then stirred for 1 night at rt. The mixture was extracted by DCM. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column and concentrated *in vacuo* to afford protected compound.

General procedure I, for reduction of aldehyde or ketone: To a stirred solution of aldehyde or ketone derivative (1.0 equiv) in MeOH was reduced with NaBH₄ (1.0 or 3.0 equiv) at 0 °C or rt for 30 min. The reaction was stopped by saturated aqueous NH₄Cl. The solvent was removed *in vacuo* and the crude was dissolved with EtOAc, then the organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford alcohol compound.

General procedure J, for bromination of alcohol: To a stirred solution of alcohol derivative (1.0 equiv) in Et₂O, was added phosphorus tribromide (1.0 equiv) at 0 °C. After a stirring for 30 min, the reaction was quenched by saturated aqueous NaHCO₃ and extracted 3 times by Et₂O. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was evaporated *in vacuo* to afford bromide compound without purification.

General procedure K, for the deprotection/alkylation of the piperidine moiety: To a stirred solution of *tert*-butyl piperidine-1-carboxylate derivative (1.0 equiv) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1 h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. The residue obtained (1.0 equiv) was dissolved in DMF (10 mL/mmol) and alkyl-halogenated derivatives (1.3 equiv) and K₂CO₃ (10.0 equiv) were added. The resulting mixture was stirred at 110 °C for 2-15 h, then concentrated *in vacuo*. EtOAc was added, the organic layer was washed several times with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10) and concentrated *in vacuo* to afford alkylated compound.

General procedure L, for reductive amination with dimethylamine: To a stirred solution of aldehyde (1.0 equiv) in MeOH, was added dimethylamine (4.0 equiv) and MgSO₄ (0.9 equiv). The reaction was stirred at rt or refluxed for 1 night. NaBH₄ (2.0 equiv) was added and the solution was stirred at rt for 2 h. The solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), and concentrated *in vacuo* to afford amine compound.

General Procedure M, for methoxy protection in DMF: To a stirred solution of phenol derivative (1.0 equiv) in DMF, was added K₂CO₃ (2.0 equiv), at 0 °C. After 5 min, the iodomethane (1.5 equiv) was added in the mixture. The solution was then stirred for 2 h at rt. The reaction was quenched by a saturated aqueous Na₂S₂O₃, was extracted by EtOAc, and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃, then brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo* to afford protected compound.

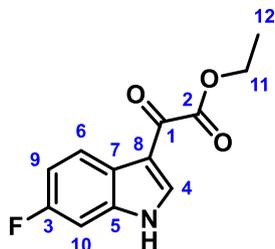
General Procedure N, for C-H activation catalysed by palladium: To a stirred solution of **75**, **80**, **81** et **86** in DCE, was added palladium(II) acetate (10% mol), APTS (0.5 equiv) and *N*-halogenosuccinimide

(1.0 equiv). The resulting mixture was stirred at 70 °C or 80 °C for 45 min or 3 h. The resulting mixture was stirred at 70 °C for 3 h. The solution was filtered through a pad of celite, washed saturated aqueous Na₂S₂O₃ and brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O), gradient 50:50 to 0:100) and concentrated *in vacuo* to afford halogen compound.

General procedure O, for reductive amination with NaBH₄: To a stirred solution of amine (1.0 equiv) in MeOH, was added aldehyde (1.0 equiv) and few drops of acetic acid. The reaction was stirred at rt or refluxed for 1 night. NaBH₄ (2.0 equiv) was added and the solution was stirred at rt for 2 h. The solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), and concentrated *in vacuo* to afford amine compound.

Fieser Workup: At 0 °C, was added 1 mL of water per 1 g of LiAlH₄, 1 mL of 15 % NaOH solution water per 1 g of LiAlH₄, then 3 mL of water per 1 g of LiAlH₄.³⁰¹

³⁰¹ Fieser, L. F.; Fieser, M.; Ho, T. *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*; Wiley, 2016.

2.2. Synthesis of compounds**Ethyl 2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate **1****Chemical Formula: C₁₂H₁₀FNO₃Molecular Weight: 235.21 g.mol⁻¹

Oxalyl chloride (4.4 mL, 2.3 equiv) in Et₂O (45 mL) was added during 5 min to a solution of indole (3.0 g, 22.2 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (66 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at rt for 6 h. The Et₂O was removed by evaporation and absolute EtOH (111 mL) was added. The resulting solution was kept at rt for 16 h. Evaporation of EtOH afforded a residue which was crystallized from a mixture Et₂O-hexane and filtration to give the product **1** as a yellow powder (5.13 g, 98% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 12.42 (br s, 1H, H_{NH}), 8.45 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.2 Hz, H₄), 8.14 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.5 Hz, H₆), 7.35 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.5 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₀), 7.14 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₉), 4.35 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁), 1.33 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₂);

¹³C NMR (DMSO, 101 MHz) δ 179.0, 163.3, 159.7 (d, ¹J_{CF} = 238.0 Hz), 139.0 (d, ⁵J_{CF} = 1.9 Hz), 136.9 (d, ³J_{CF} = 12.7 Hz), 122.3 (d, ³J_{CF} = 10.0 Hz), 122.1, 112.4, 111.1 (d, ²J_{CF} = 23.9 Hz), 99.2 (d, ²J_{CF} = 25.9 Hz), 61.7, 13.9;

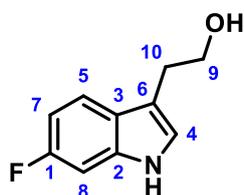
¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz) δ -118.2 (td, ³J_{FH} = 9.6 Hz, ⁴J_{FH} = 5.5 Hz);

MS *m/z* [M-H]⁻ 234.3;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₂H₁₁FNO₃ [M+H]⁺ 236.0723, found 236.0721;

m.p. 224 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3201 (N-H, broad), 1729 (C=O), 1623 (C=O), 1222 (C-O).

2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethanol 2Chemical Formula: C₁₀H₁₀FNOMolecular Weight: 179.17 g.mol⁻¹

Ethyl 2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate **1** (1.0 g, 4.25 mmol, 1.0 equiv) was reduced with LiAlH₄ (1.1 g, 28.99 mmol, 6.8 equiv) by refluxing in THF (17 mL) for 2 h. The reaction was then slowly quenched with 1.1 mL of water, 1.1 mL of 15% NaOH solution followed by 3.3 mL of water to afford a granular inorganic precipitate. After the night, the solution was filtered over a pad of celite, the solid was washed with EtOAc, then the filtrate was concentrated *in vacuo* to give reduced compound as a brown oil (800 mg, quantitative yield). The product **2** was directly engaged in the next step without purification.

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.51 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.3 Hz, H₅), 7.06 (s, 1H, H₄), 7.05 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₈), 6.89 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.5 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₇), 3.89 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H₉), 3.01 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H₁₀);

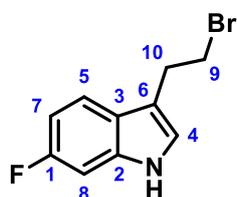
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 160.2 (d, ¹J_{CF} = 237.8 Hz), 136.4 (d, ³J_{CF} = 12.5 Hz), 124.2, 122.8 (d, ⁵J_{CF} = 3.6 Hz), 119.7 (d, ³J_{CF} = 10.2 Hz), 112.3, 108.4 (d, ²J_{CF} = 24.6 Hz), 97.6 (d, ²J_{CF} = 26.0 Hz), 62.7, 28.8;

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -121.0 (td, ³J_{FH} = 9.7 Hz, ⁴J_{FH} = 5.3 Hz);

MS *m/z* [M-H]⁻ 178.34;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3418 (O-H), 3311 (N-H, broad), 1138 (C-O).

3-(2-bromoethyl)-6-fluoro-1H-indole 3Chemical Formula: C₁₀H₉BrFNMolecular Weight: 242.09 g.mol⁻¹

To a solution of 2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethanol **2** (794 mg, 4.43 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (67 mL) was added phosphorus tribromide (0.1 mL, 1.46 mmol, 0.33 equiv) at 0 °C. After a stirring of 19 h, the supernatant ether solution was decanted, washed once with saturated aqueous NaHCO₃, then with water and dried over anhydrous MgSO₄. Removal of the ether *in vacuo* at rt, because the bromide derivative was very sensitive to heat and moisture. The red oil obtained **3** (555 mg, 54% yield) was used directly for the next step.

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.03 (br s, 1H, H_{NH}), 7.49 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.2 Hz, H₅), 7.09-7.03 (m, 2H, H₄, H₈), 6.91 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.6 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H₇), 3.63 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H₉), 3.31 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H₁₀);

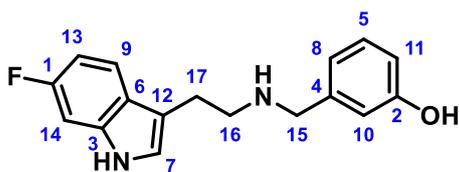
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 160.2 (d, ¹J_{CF} = 238.0 Hz), 136.2 (d, ³J_{CF} = 12.5 Hz), 123.7, 122.6 (d, ⁵J_{CF} = 3.5 Hz), 119.4 (d, ³J_{CF} = 10.2 Hz), 113.8, 108.6 (d, ²J_{CF} = 24.6 Hz), 97.7 (d, ²J_{CF} = 26.1 Hz), 32.8, 29.3;

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -120.9 (td, ³J_{FH} = 9.5 Hz, ⁴J_{FH} = 5.2 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 242.32/244.24;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 34230 (N-H, broad), 800 (C-Br).

3-[[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenol **4**Chemical Formula: C₁₇H₁₇FN₂OMolecular Weight: 284.33 g.mol⁻¹**Method 1**

3-(2-bromoethyl)-6-fluoro-1*H*-indole (510 mg, 2.21 mmol, 1.0 equiv) **3**, 3-(aminomethyl)phenol (259 mg, 1.46 mmol, 1.0 equiv) and K₂CO₃ (582 mg, 4.21 mmol, 2.0 equiv) were stirred in DMF (5 mL) for 19 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude was dissolved with EtOAc, then the organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. After a purification by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), the compound **4** was obtained as a brown powder (60 mg, 4% isolated yield).

Method 2

To a stirred solution of *N*-[(3-benzyloxyphenyl)methyl]-2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethanamine **8** (527 mg, 1.41 mmol, 1.0 equiv) in MeOH (120 mL) was charged Pd/C 10% (150 mg, 10mol%) and the mixture was stirred for 60 h under H₂ at rt. The solution was filtered through a pad of celite and evaporated. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 95:5) and concentrated *in vacuo* to afford the compound **4** as a brown powder (149 mg, 37% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.49 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.2 Hz, H₉), 7.21 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₅), 7.12 (s, 1H, H₇), 7.06 (dd, 1H, ³J_{HF} = 10.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H₁₄), 6.89-6.85 (m, 2H, H₈, H₁₀), 6.84-6.78 (m, 2H, H₁₁, H₁₃), 4.00 (s, 2H, H₁₅), 3.17 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H₁₆), 3.09 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H₁₇);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 161.2 (d, ¹J_{CF} = 235.3 Hz), 159.1, 138.1 (d, ³J_{CF} = 12.5 Hz), 136.0, 131.1, 125.0, 124.4 (d, ⁵J_{CF} = 3.3 Hz), 121.4, 120.0 (d, ³J_{CF} = 10.3 Hz), 117.3, 116.8, 111.4, 108.4 (d, ²J_{CF} = 24.9 Hz), 98.3 (d, ²J_{CF} = 26.0 Hz), 52.7, 49.0, 23.9;

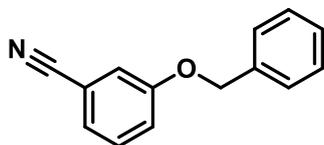
¹⁹F NMR (MeOD, 376 MHz) δ -124.1 (td, ³J_{FH} = 9.8 Hz, ⁴J_{FH} = 5.2 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 285.48;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₇H₁₈FN₂O [M+H]⁺ 285.1403, found 285.1405.

m.p. 75.0 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3427 (N-H, broad).

3-benzyloxybenzonitrile 5Chemical Formula: C₁₄H₁₁NOMolecular Weight: 209.25 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzonitrile (1.0 g, 8.39 mmol, 1.0 equiv) and benzyl bromide (2.15 g, 12.59 mmol, 1.5 equiv), following the **general procedure A**, and the expected compound **5** was isolated as a white crystal (1.77 g, quantitative isolated yield).

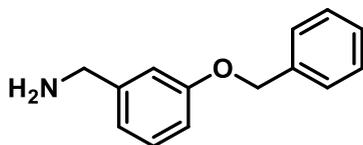
Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.48-7.37 (m, 6H), 7.28-7.22 (m, 3H), 5.10 (s, 2H);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 158.7, 135.8, 130.4 (2C), 128.7, 128.3 (2C), 127.5, 124.7, 120.1, 118.7, 117.8, 113.1, 70.2;

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰²

³⁰² Huang, K.; Chen, H.; Lin, G. An Efficient Method for the Preparation of Nitriles *via* the Dehydration of Aldoximes with Phthalic Anhydride. *J. Chinese Chem. Soc.* **2004**, *51* (3), 619–627.

(3-benzyloxyphenyl)methanamine 6Chemical Formula: C₁₄H₁₅NOMolecular Weight: 213.28 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzonitrile **5** (1.64 g, 7.83 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure B**, during 1 night, and the expected compound **6** was isolated as a white powder (300 mg, 20% isolated yield).

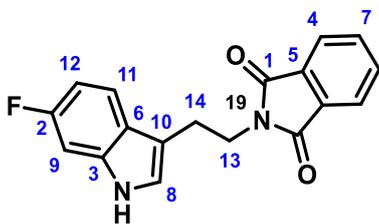
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.40-7.24 (m, 5H), 7.19 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz), 6.92 (m, 1H), 6.85 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz), 6.81 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz), 4.99 (s, 2H), 3.75 (s, 2H), 2.03 (br s, 2H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 158.9, 144.4, 136.9, 129.4, 128.4 (2C), 127.8, 127.3 (2C), 119.5, 113.5, 113.0, 69.7, 46.0;

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰³

³⁰³ Domínguez, J. L.; Fernández-Nieto, F.; Castro, M.; Catto, M.; Paleo, M. R.; Porto, S.; Sardina, F. J.; Brea, J. M.; Carotti, A.; Villaverde, M. C.; *et al. J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (1), 135–148.

2-[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethyl]isoindoline-1,3-dione **7**Chemical Formula: C₁₈H₁₃FN₂O₂Molecular Weight: 308.10 g.mol⁻¹

To a solution of 2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethan-1-ol **2** (1.0 g, 5.58 mmol, 1 equiv) in THF (30 mL) was added phthalimide (1.23 g, 8.37 mmol, 1.5 equiv) and triphenylphosphine (2.20 g, 8.37 mmol, 1.5 equiv) with ice-bath cooling. DIAD (1.69 g, 8.37 mmol, 1.5 equiv) in the THF (10 mL) was added dropwise in the mixture. The mixture was then allowed to warm to rt and stirred for 8 hours. After adding EtOAc and brine, the organic layer was washed, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20), to give **7** as a yellow oil (1.72 g, quantitative isolated yield).

Spectral and analytical data

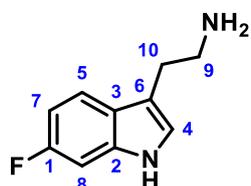
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.04 (s, 1H, H_{NH}), 7.83 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ⁴J_{HH} = 3.0 Hz, H₇), 7.70 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ⁴J_{HH} = 3.0 Hz, H₄), 7.62 (dd, 1H, ³J_{HF} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 5.3 Hz, H₁₂), 7.06 (d, 1H, ³J_{HH} = 2.3 Hz, H₈), 7.02 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.6 Hz, ³J_{HF} = 2.1 Hz, H₉), 6.88 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 9.6 Hz, ⁴J_{HF} = 8.7 Hz, ⁵J_{HH} = 2.3 Hz, H₁₁), 3.99 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, H₁₃), 3.12 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, H₁₄);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 168.5 (2C), 160.2 (d, J_{CF} = 237.6 Hz), 136.2 (d, J_{CF} = 12.4 Hz), 134.1 (2C), 132.2 (2C), 124.1, 123.3 (2C), 122.4 (d, J_{CF} = 1.6 Hz), 119.7 (d, J_{CF} = 10.2 Hz), 112.7, 108.4 (d, J_{CF} = 24.5 Hz), 97.6 (d, J_{CF} = 26.1 Hz), 38.6, 24.5;

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3218, 2981, 1716, 1437, 1234, 119, 721, 541;

2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethanamine 8Chemical Formula: C₁₀H₁₁FN₂Molecular Weight: 178.21 g.mol⁻¹**Method 1**

To a solution of 2-[2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethyl]isoindoline-1,3-dione **7** (1.915 g, 6.21 mmol, 1.0 equiv) in EtOH (100 mL) was added hydrazine hydrate (1.92 mL, 1 mL per g of phthalimide compound). The mixture was refluxed for 8 h. The mixture was filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude was dissolved in EtOAc and washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), to obtain **8** as a brown oil (111 mg, 10% isolated yield).

Method 2

Starting from 6-fluoro-3-[(*E*)-2-nitrovinyl]-1H-indole **10** (768 mg, 3.72 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure B**, during 3 h. The expected compound **8** was isolated as a brown oil (264 mg, 40% isolated yield).

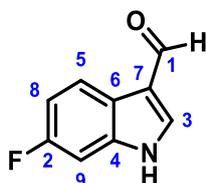
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.76 (br s, 1H, H_{NH}), 7.49 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.4 Hz, H₅), 7.01 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₈), 6.97 (s, 1H, H₄), 6.88 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.6 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₇), 3.03 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H₉), 2.88 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H₁₀), 1.49 (s, 2H, H_{NH2});

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 160.0 (d, ¹J_{CF} = 237.2 Hz), 136.4 (d, ³J_{CF} = 12.4 Hz), 124.2, 122.5 (d, ⁵J_{CF} = 3.5 Hz), 119.6 (d, ³J_{CF} = 10.2 Hz), 113.6, 108.0 (d, ²J_{CF} = 24.5 Hz), 97.5 (d, ¹J_{CF} = 25.9 Hz), 42.3, 29.4;

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -121.5 (td, ³J_{FH} = 9.6 Hz, ⁴J_{FH} = 5.4 Hz);

* Spectral and analytical data matched with literature.²⁰³

6-fluoro-1H-indole-3-carbaldehyde 9Chemical Formula: C₉H₆FNOMolecular Weight: 163.15 g.mol⁻¹

Starting from 6-fluoroindole (2.0 g, 14.8 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure C**. The expected compound **9** was isolated as an orange powder (2.27 g, 94% yield).

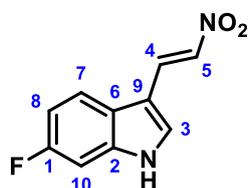
Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 9.85 (s, 1H, H₁), 8.11 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.6 Hz, H₅), 8.06 (s, 1H, H₃), 7.17 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.4 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₉), 7.00 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.7 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₈);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 187.2, 161.9 (d, ¹J_{CF} = 238.8 Hz), 140.1 (d, ⁵J_{CF} = 1.5 Hz), 139.0 (d, ³J_{CF} = 12.4 Hz), 123.4 (d, ³J_{CF} = 9.8 Hz), 122.1, 120.0, 118.8 (d, ²J_{CF} = 24.3 Hz), 99.4 (d, ²J_{CF} = 26.3 Hz);

¹⁹F NMR (MeOD, 376 MHz) δ -120.3 (td, ³J_{FH} = 9.5 Hz, ⁴J_{FH} = 5.6 Hz);

* Spectral and analytical data matched with literature.²⁰³

6-fluoro-3-[(E)-2-nitrovinyl]-1H-indole 10Chemical Formula: C₁₀H₇FN₂O₂Molecular Weight: 178.21 g.mol⁻¹

Starting from 6-fluoro-1H-indole-3-carbaldehyde **9** (2.95 g, 18.10 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure D**. The expected compound **10** was isolated as a yellow oil (1.95 g, 52% isolated yield).

Spectral and analytical data

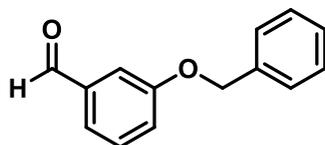
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.33 (d, 1H, ³J_{HH} = 13.4 Hz, H₄), 7.91 (s, 1H, H₃), 7.87 (d, 1H, ³J_{HH} = 13.4 Hz, H₅), 7.80 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ⁴J_{HF} = 5.0 Hz, H₇), 7.19 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.4 Hz, ⁴J_{HF} = 2.3 Hz, H₁₀), 7.04 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.6 Hz, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H₈);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 161.8 (d, ¹J_{CF} = 239.0 Hz), 139.7 (d, ³J_{CF} = 12.3 Hz), 136.4 (d, ⁵J_{CF} = 2.2 Hz), 135.0, 133.0, 122.7, 122.4 (d, ³J_{CF} = 10.2 Hz), 111.2 (d, ²J_{CF} = 24.5 Hz), 110.1, 99.8 (d, ²J_{CF} = 26.2 Hz);

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -121.1 (td, ³J_{FH} = 9.7 Hz, ⁴J_{FH} = 5.0 Hz);

* Spectral and analytical data matched with literature.²⁰³

3-benzyloxybenzaldehyde **11**



Chemical Formula: C₁₄H₁₂O₂

Molecular Weight: 212.25 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzaldehyde (2.17 g, 17.74 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure A**, the expected compound **11** was isolated as a white powder (2.48 g, 66% isolated yield).

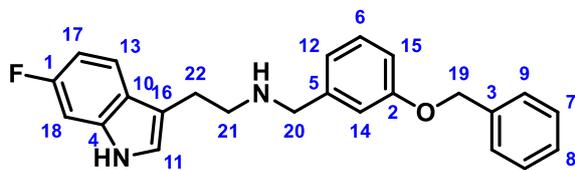
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.98 (s, 1H), 7.50-7.33 (m, 8H), 7.26 (m, 1H), 5.13 (s, 2H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 192.2, 159.4, 137.9, 136.4, 130.2, 128.8 (2C), 128.3, 127.7 (2C), 123.8, 122.3, 113.3, 70.3;

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁴

³⁰⁴ Patel, B. A.; Krishnan, R.; Khadtare, N.; Gurukumar, K. R.; Basu, A.; Arora, P.; Bhatt, A.; Patel, M. R.; Dana, D.; Kumar, S.; *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (11), 3262–3271.

N-[(3-benzyloxyphenyl)methyl]-2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethanamine 12Chemical Formula: C₂₄H₂₃FN₂OMolecular Weight: 374.46 g.mol⁻¹

Starting from 2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethanamine **8** (458 mg, 2.57 mmol, 1.0 equiv) and 3-benzyloxybenzaldehyde **11** (873 mg, 4.11 mmol, 1.6 equiv), following the **general procedure E**. The expected compound **12** was isolated as a brown powder (527 mg, 55% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.49 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HF} = 5.3 Hz, H₁₃), 7.42 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H₉), 7.34 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H₇), 7.33 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₆), 7.28 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H₈), 7.15 (s, 1H, H₁₁), 7.13 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H₁₄), 7.07 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₈), 7.05-7.02 (m, 2H, H₁₅, H₁₂), 6.82 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.6 Hz, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HF} = 2.4 Hz, H₁₇), 5.09 (s, 2H, H₁₉), 4.14 (s, 2H, H₂₀), 3.25 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H₂₁), 3.14 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H₂₂);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 161.3 (d, ¹J_{CF} = 235.6 Hz), 160.6, 138.3, 138.2 (d, ³J_{CF} = 12.6 Hz), 134.4, 131.4, 129.5 (2C), 129.0, 128.6 (2C), 124.9, 124.7 (d, ⁵J_{CF} = 3.4 Hz), 123.1, 119.9 (d, ³J_{CF} = 10.3 Hz), 117.3, 116.9, 110.7, 108.5 (d, ²J_{CF} = 24.9 Hz), 98.4 (d, ²J_{CF} = 26.0 Hz), 71.0, 52.2, 48.7, 23.4;

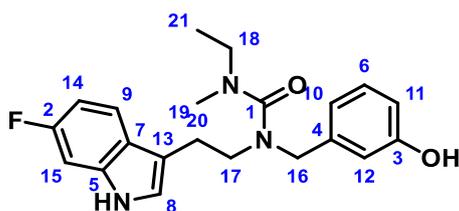
¹⁹F NMR (MeOD, 376 MHz) δ -121.0 (td, ³J_{FH} = 9.6 Hz, ⁴J_{FH} = 5.3 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 375.51;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₄H₂₄FN₂O [M+H]⁺ 375.1873, found 375.1873;

m.p. 128.1 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3432 (N-H, broad).

1-ethyl-3-[2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethyl]-3-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-1-methyl-urea 13Chemical Formula: C₂₁H₂₄FN₃O₂Molecular Weight: 369.44 g.mol⁻¹

To a stirred solution of 3-[[2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenol **4** (94 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv) in acetone, was added K₂CO₃ (91 mg, 0.66 mmol, 2.0 equiv), at 0 °C. After 5 min, the ethylmethylcarbamoyl chloride (40 μL, 0.36 mmol, 1.1 equiv) was added in the mixture. The solution was then stirred for 1 night at rt. The mixture was extract by EtOAc, and the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃, then brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo* to afford two compounds:

- 1-ethyl-3-[2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethyl]-3-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-1-methyl-urea **13** : brown oil, 10 mg, 8% isolated yield
- [3-[[[ethyl(methyl)carbamoyl]-[2-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)ethyl]amino]methyl]phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate **14** : brown oil, 22 mg, 15% isolated yield

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.37 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.4 Hz, H₉), 7.13 (t, H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₅), 7.00 (dd, 1H, ³J_{HF} = 10.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₅), 6.99 (s, 1H, H₈), 6.75 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.6 Hz, ⁴J_{HH} = 8.7 Hz, ⁵J_{HH} = 2.2 Hz, H₁₄), 6.72-6.67 (m, 3H, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 4.32 (s, 2H, H₁₆), 3.37 (dd, H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H₁₇), 3.11 (q, H, ³J = 7.2 Hz, H₁₈), 2.94 (dd, H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H₂₀), 2.72 (s, 3H, H₁₉), 1.04 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₁);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 166.9, 161.1 (d, ¹J_{CF} = 234.8 Hz), 158.9, 140.9, 138.0 (d, ³J_{CF} = 12.6 Hz), 130.6, 125.4, 124.1 (d, ⁵J_{CF} = 3.4 Hz), 120.1 (d, ³J_{CF} = 10.4 Hz), 119.8, 115.4, 115.2, 113.3, 107.9 (d, ²J_{CF} = 24.8 Hz), 98.1 (d, ²J_{CF} = 25.8 Hz), 53.1, 49.0, 46.2, 36.0, 24.4, 12.8;

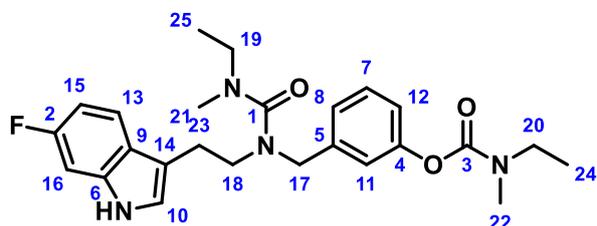
¹⁹F NMR (MeOD, 376 MHz) δ -124.8 (td, ³J_{FF} = 10.1 Hz, ⁴J_{FF} = 5.3 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 370.49;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3195, 2918, 1587, 486, 1454, 1414, 1225, 1138.

[3-[[[ethyl(methyl)carbamoyl]-[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino]methyl]phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 14



Chemical Formula: C₂₅H₃₁FN₄O₃

Molecular Weight: 454.55 g.mol⁻¹

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.46 (s, 1H, H_{NH}), 7.40 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.3 Hz, H₁₃), 7.29 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₇), 7.05 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H₈), 7.04 – 6.95 (m, 2H, H₁₂, H₁₁), 6.96 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₁₆), 6.87 – 6.76 (m, 2H, H₁₀, H₁₅), 4.37 (s, 2H, H₁₇), 3.49 – 3.38 (m, 2H, H₂₀), 3.36 (dd, 2H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ³J_{HH} = 6.4 Hz, H₁₈), 3.16 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₉), 3.06 (s, 1.5H, H₂₂, rota A), 2.99 (s, 1.5H, H₂₂, rota B), 2.94 (dd, 2H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ³J_{HH} = 6.4 Hz, H₂₃), 2.74 (s, 3H, H₂₁), 1.23 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₂₄, rota A), 1.19 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₄, rota B), 1.07 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₂₅);

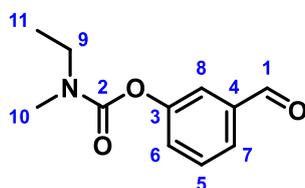
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 165.2, 160.0 (d, ¹J_{CF} = 236.8 Hz), 154.7 (rota A), 154.54 (rota B), 151.8, 140.0 (rota A), 139.9 (rota B), 136.2 (d, ³J_{CF} = 12.6 Hz), 129.5 (rota A), 129.4 (rota B), 124.2 (rota A), 124.2 (rota B), 124.1, 122.5 (d, ⁵J_{CF} = 3.5 Hz), 121.0 (rota A), 120.9 (rota B), 120.7 (rota A), 120.6 (rota B), 119.5 (d, ³J_{CF} = 10.3 Hz), 113.2, 107.9 (d, ²J_{CF} = 24.5 Hz), 97.5 (d, ²J_{CF} = 26.0 Hz), 52.0, 48.54 (rota A), 48.51 (rota B), 45.2, 44.2, 35.8, 34.4 (rota A), 34.0 (rota B), 23.5, 13.4 (rota A), 12.8, 12.6 (rota B);

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -121.8 (q, ³J_{FF} = 9.2 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 455.57;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} not determined.

(3-formylphenyl) N-ethyl-N-methylcarbamate 15Chemical Formula: C₁₁H₁₃NO₃Molecular Weight: 207.23 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzaldehyde (2.0 g, 16.38 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (1.87 mL, 18.02 mmol, 1.2 equiv), following the **general procedure F**. The expected compound **15** was isolated as a yellowish oil (2.96 g, 87% isolated yield).

Spectral and analytical data

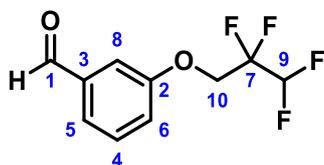
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.02 (s, 1H, H₁), 7.76 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₇), 7.65 (ddd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, ⁵J_{HH} = 0.4 Hz, H₈), 7.61 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁵J_{HH} = 0.4 Hz, H₅), 7.46 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₆), 3.41 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉), 3.00 (s, 3H, H₁₀), 1.19 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁);

¹³C NMR (DMSO, 101 MHz, 363K) δ 191.6, 152.8, 151.6, 137.2, 129.6, 127.2, 125.6, 121.4, 43.2, 33.3, 12.0;

MS *m/z* [M+H]⁺ 208.40;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₁H₁₄NO₃ [M+H]⁺ 208.0974, found 208.0976;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 2974 (CHO), 1721 (C=O), 1234 (C-O).

3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)benzaldehyde 16Chemical Formula: C₁₀H₈F₄O₂Molecular Weight: 236.17 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzaldehyde (1.0 g, 8.19 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (1.4 mL, 12.28 mmol, 1.5 equiv), following the **general procedure F**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 95:5). and concentrated *in vacuo* to afford the compound **16** as a colorless oil (815 mg, 54% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.98 (s, 1H, H₁), 7.56 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₅), 7.50 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.41 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₈), 7.22 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₆), 6.07 (tt, 1H, ²J_{HF} = 53.1 Hz, ³J_{HF} = 4.2 Hz, H₉), 4.41 (tt, 2H, ³J_{HF} = 12.1 Hz, ⁴J_{HF} = 1.5 Hz, H₁₀);

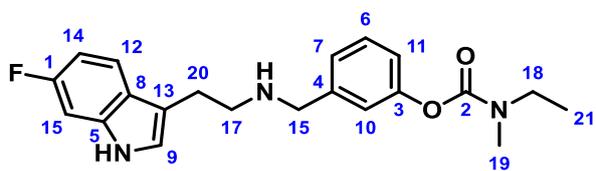
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 191.6, 158.0, 138.1, 130.6, 125.3, 122.0, 114.4 (tt, ¹J_{CF} = 249.9 Hz, ²J_{CF} = 27.2 Hz), 112.9, 109.0 (tt, ¹J_{CF} = 249.9 Hz, ²J_{CF} = 34.7 Hz), 65.2 (t, ²J_{CF} = 29.8 Hz);

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -124.8 (tq, 2F, ³J_{FH} = 12.1 Hz, ⁴J_{FH} = ⁴J_{FH} = 4.3 Hz), -139.1 (dt, 2F, ³J_{FF} = 53.1 Hz, ⁴J_{FF} = 3.5 Hz);

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI no found;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 2929 (CHO), 1706 (C=O), 1104 (C-O).

3-[[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **17**Chemical Formula: C₂₁H₂₄FN₃O₂Molecular Weight: 369.44 g.mol⁻¹

Starting from 2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethanamine **8** (491 mg, 2.76 mmol, 1.0 equiv) and (3-formylphenyl) *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **15** (914 mg, 4.41 mmol, 1.6 equiv), following the **general procedure E**. The expected compound **17** was isolated as a brown oil (211 mg, 21% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.60 (s, 1H, H_{NH}), 7.48 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.4 Hz, H₁₂), 7.28 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, H₆), 7.14 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, H₇), 7.11-7.05 (m, 3H, H₁₅, H₉, H₁₀), 6.96 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₁), 6.79 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 10.0 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₄), 3.78 (s, 2H, H₁₅), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₈), 2.97 (s, 3H, H₁₉), 2.86 (m, 4H, H₁₇, H₂₀), 1.17 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₂₁);

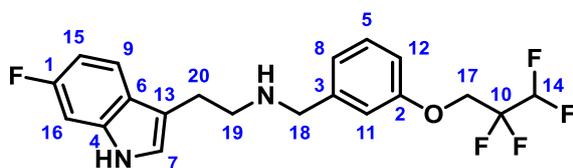
¹³C NMR (DMSO, 101 MHz, 363K) δ 158.5 (d, ¹J_{CF} = 232.9 Hz), 153.2, 151.1, 142.1, 135.8 (d, ³J_{CF} = 12.6 Hz), 128.2, 123.9, 123.8, 122.5 (d, ⁵J_{CF} = 2.1 Hz), 120.4, 119.2, 118.7 (d, ³J_{CF} = 10.6 Hz), 122.7, 106.0 (d, ²J_{CF} = 24.7 Hz), 96.7 (d, ²J_{CF} = 24.9 Hz), 52.0, 49.0, 43.0, 33.2, 25.0, 12.1;

¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz) δ -124.5 (td, ³J_{FF} = 9.9 Hz, ⁴J_{FF} = 5.4 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 370.53;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₁H₂₅FN₃O₂ [M+H]⁺ 370.1931, found 370.1929;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3426 (N-H, broad), 1706 (C=O), 1168 (C-O).

2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)-*N*-[[3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phenyl]methyl]ethanamine **18**Chemical Formula: C₂₀H₁₉F₅N₂OMolecular Weight: 398.38 g.mol⁻¹

Starting from 2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethanamine **8** (185 mg, 1.04 mmol, 1.0 equiv) and 3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)benzaldehyde **16** (270 mg, 1.14 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure E**. The expected compound **18** was isolated as a brown oil (21 mg, 5% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.43 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.4 Hz, H₉), 7.24 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₅), 7.03 (s, 1H, H₇), 7.02 (dd, 1H, ³J_{HF} = 10.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₆), 6.93 (m, 1H, H₈), 6.92 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H₁₁), 6.88 (m, 1H, H₁₂), 6.76 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₅), 6.31 (tt, 1H, ²J_{HF} = 52.8 Hz, ³J_{HF} = 5.4 Hz, H₁₄), 4.38 (tt, 2H, ³J_{HF} = 12.4 Hz, ⁴J_{HF} = 1.6 Hz, H₁₇), 3.75 (s, 2H, H₁₈), 2.98-2.92 (m, 2H, H₂₀), 2.91-2.85 (m, 2H, H₁₉);

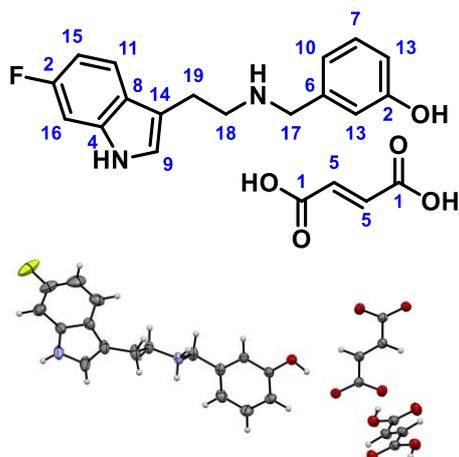
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 161.2 (d, ¹J_{CF} = 253.2 Hz), 159.2, 142.4, 138.1 (d, ³J_{CF} = 12.1 Hz), 130.7, 125.4, 123.9 (d, ⁵J_{CF} = 3.0 Hz), 123.3, 120.1 (d, ³J_{CF} = 10.1 Hz), 116.2 (tt, ¹J_{CF} = 248.0 Hz, ²J_{CF} = 26.6 Hz), 115.6, 114.6, 113.6, 110.0 (tt, ¹J_{CF} = 247.5 Hz, ²J_{CF} = 33.1 Hz), 108.0 (d, ²J_{CF} = 24.7 Hz), 98.2 (d, ²J_{CF} = 25.8 Hz), 66.3 (t, ²J_{CF} = 29.4 Hz), 53.9, 50.1, 26.0;

¹⁹F NMR (MeOH, 376 MHz) δ -124.6 (td, 1F, ³J_{FF} = 9.9 Hz, ⁴J_{FF} = 5.4 Hz), -127.4-127.5 (m, 2F), -141.6 (dt, 2F, ³J_{FF} = 52.8 Hz, ⁴J_{FF} = 4.8 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 399.52;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₀H₂₀F₅N₂O [M+H]⁺ 399.1496, found 399.1502;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3425.6 (N-H, broad), 1104.5 (C-O).

3-[[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenol, fumarate salt **19** / MR35214Chemical Formula: C₂₁H₂₁FN₂O₅Molecular Weight: 400.14 g.mol⁻¹

Starting from 3-[[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenol **4** (240 mg, 0.84 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure G**. The mixture was stirred at reflux for 1 h. The expected compound **19** was obtained as a yellow powder (212 mg, 63 yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.48 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.4 Hz, H₁₁), 7.25 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H₇), 7.15 (s, 1H, H₉), 7.06 (dd, 1H, ³J_{HF} = 9.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H₁₆), 6.93-6.89 (m, 2H, H₁₂, H₁₀), 6.88-6.79 (m, 2H, H₁₃, H₁₅), 6.70 (s, 2H, H₅), 4.13 (s, 2H, H₁₇), 3.28 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H₁₈), 3.14 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H₁₉);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 171.3 (2C), 161.3 (d, ¹J_{CF} = 235.6 Hz), 159.4, 138.2 (d, ³J_{CF} = 12.6 Hz), 136.2 (2C), 133.9, 131.4, 124.8, 124.7 (d, ⁵J_{CF} = 3.6 Hz), 121.6, 119.9 (d, ³J_{CF} = 10.3 Hz), 117.7, 117.5, 110.6, 108.5 (d, ²J_{CF} = 24.9 Hz), 98.5 (d, ²J_{CF} = 26.0 Hz), 52.1, 48.7, 2 3.2;

¹⁹F NMR (MeOD, 376 MHz) δ -124.0 (td, ³J_{FH} = 9.9 Hz, ⁴J_{FH} = 5.4 Hz);

MS *m/z* [M+H-C₄H₄O₄]⁺ 285.50;

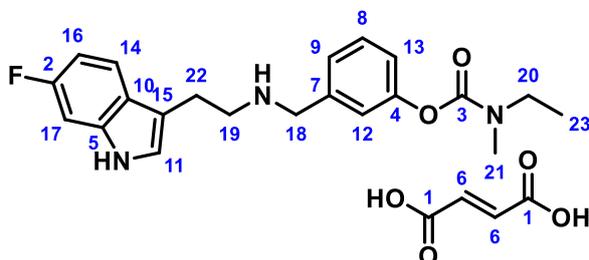
HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₄ [M+H]⁺ 285.1403, found 285.1404;

M.p. > 250 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3358, 3047, 1693, 1593, 1458, 1278;

RX (ORTEP) Crystal size: 0.62×0.29×0.19mm. Formula C₂₁H₂₁FN₂O₅, molecular weight 400.40, crystal system monoclinic, space group C2/C, *a* = 20.3537(16) Å, *b* = 13.9674(16) Å, *c* = 14.8582(14) Å, α = 90°, β = 113.160(4)°, γ = 90°, *V* = 3883.6(7) Å³, *Z* = 8, calculated density = 1.370 g/cm³, μ = 0.105 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.137, R[F²>2s(F²)] = 0.057, wR(F²) = 0.164, *S* = 1.03.

**3-[[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate, fumarate salt
20 / MR35215**



Chemical Formula: C₂₅H₂₈FN₃O₆

Molecular Weight: 485.20 g.mol⁻¹

Starting from 3-[[2-(6-fluoro-1*H*-indol-3-yl)ethylamino]methyl]phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **17** (360 mg, 0.97 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure G**. The mixture was stirred at reflux for 1 h. The expected compound **20** was obtained as a beige powder (345 mg, 73% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.50 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HF} = 5.1 Hz, H₁₄), 7.47 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₈), 7.33 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₉), 7.24 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₁₂), 7.19 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₁₃), 7.16 (s, 1H, H₁₁), 7.06 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 2.3 Hz, ⁵J_{HH} = 0.5 Hz, H₁₇), 6.83 (ddd, 1H, ³J_{HF} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H₁₆), 6.69 (s, 2H H₆), 4.22 (s, 1H H₁₈), 3.51 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₀, rota A), 3.41 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₀, rota B), 3.33-3.31 (m, 2H, H₁₉), 3.15 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₂₂), 3.11 (s, 1.5H, H₂₁, rota A), 2.99 (s, 1.5H, H₂₁, rota B), 1.27 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₃, rota A), 1.19 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₃, rota B);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 172.0 (2C), 161.3 (d, ¹J_{CF} = 235.7 Hz), 156.1, 153.3, 138.2 (d, ³J_{CF} = 12.5 Hz), 136.4 (2C), 134.3, 131.3, 127.9, 124.9, 124.7 (d, ⁵J = 3.4 Hz), 124.5 (d, J = 7.4 Hz), 124.1, 119.9 (d, ³J = 10.3 Hz), 110.4, 108.5 (d, ²J = 24.9 Hz), 98.4 (d, ²J = 25.9 Hz), 51.7, 49.0, 45.3 (rota A), 45.2 (rota B), 34.6 (rota A), 34.3 (rota B), 23.3, 13.4 (rota A), 12.6 (rota B);

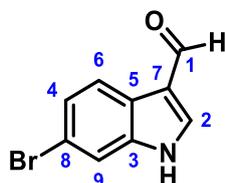
¹⁹F NMR (MeOD, 376 MHz) δ -124.0 (td, ³J_{FF} = 9.8 Hz, ⁴J_{FF} = 5.4 Hz);

MS *m/z* [M+H-C₄H₄O₄]⁺ 370.58;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₁H₂₅N₃O₂F [M+H]⁺ 370.1931, found 370.1932;

M.p. > 250 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 2976, 1699, 1240, 1165.

6-bromo-1H-indole-3-carbaldehyde 21Chemical Formula: C₉H₆BrNOMolecular Weight: 224.06 g.mol⁻¹

Starting from 6-bromoindole (1.00 g, 5.10 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure C**. The expected compound **21** was isolated as a brown powder (1.01 g, 89% yield).

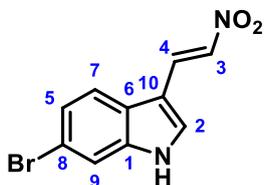
Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 9.60 (s, 1H, H₁), 8.12 (s, 1H, H₂), 8.07 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁵J_{HH} = 0.6 Hz, H₆), 7.66 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁵J_{HH} = 0.6 Hz, 1H, H₉), 7.36 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₄);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 187.3, 140.1, 139.7, 126.7, 124.6, 123.7, 120.0, 118.1, 116.1;

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁵

³⁰⁵ Schäfer, D.; Weiß, P.; Ermert, J.; Castillo Meleán, J.; Zarrad, F.; Neumaier, B. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (27), 4621–4628.

6-bromo-3-[(E)-2-nitrovinyl]-1H-indole 22Chemical Formula: C₁₀H₇BrN₂O₂Molecular Weight: 267.08 g.mol⁻¹

Starting from 6-bromo-1H-indole-3-carbaldehyde **21** (451 mg, 2.01 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure D**. The expected compound **22** was isolated as a yellow powder (506 mg, 94% isolated yield).

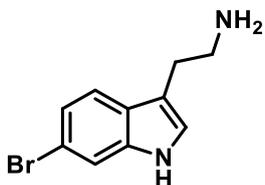
Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 8.35 (d, 1H, ³J_{HH} = 13.5 Hz, H₃), 7.89 (s, 1H, H₂), 7.89 (d, 1H, ³J_{HH} = 13.5 Hz, H₄), 7.77 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, H₇), 7.66 (d, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H₉), 7.38 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₅);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 140.3, 136.2, 134.7, 133.4, 126.1, 125.2, 122.7, 117.8, 116.5, 110.0.

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁶

³⁰⁶ Brogan, J. T.; Stoops, S. L.; Crews, B. C.; Marnett, L. J.; Lindsley, C. W. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, 2 (11), 633–639.

2-(6-bromo-1*H*-indol-3-yl)ethanamine 23Chemical Formula: C₁₀H₁₁BrN₂Molecular Weight: 239.12 g.mol⁻¹

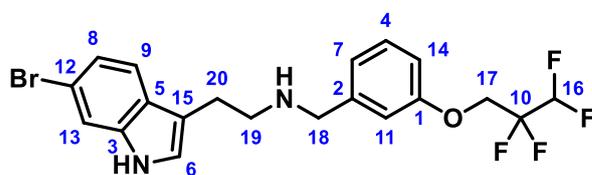
Starting from 6-bromo-3-[(*E*)-2-nitrovinyl]-1*H*-indole **22** (213 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv) following the **general procedure B**, during 3 h. The expected compound **23** was isolated as a brown oil (50 mg, 26% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.50 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 0.4 Hz), 7.45 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz), 7.11 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz), 7.09 (s, 1H), 2.98 – 2.92 (m, 2H), 2.92 – 2.87 (m, 2H);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 139.0, 127.6, 124.6, 122.7, 120.7, 115.8, 115.1, 113.4, 42.8, 28.7.

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁶

2-(6-bromo-1H-indol-3-yl)-N-[[3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phenyl]methyl]ethanamine **24**Chemical Formula: C₂₀H₁₉BrF₄N₂OMolecular Weight: 459.28 g.mol⁻¹

Starting from 2-(6-bromo-1H-indol-3-yl)ethanamine **23** (310 mg, 1.30 mmol, 1.0 equiv) and 3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)benzaldehyde **16** (306 mg, 1.30 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure E** at rt for 1 night. The expected compound **24** was isolated as a brown oil (260 mg, 44% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.49 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₁₃), 7.38 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, H₉), 7.22 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H₄), 7.07 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HF} = 1.7 Hz, H₈), 7.04 (s, 1H, H₆), 6.92 (s, 1H, H₁₁), 6.93-6.89 (m, 1H, H₇), 6.89-6.84 (m, 1H, H₁₄), 6.30 (tt, 1H, ²J_{HF} = 52.6 Hz, ³J_{HF} = 5.3 Hz, H₁₀), 4.37 (tt, 2H, ³J_{HH} = 12.4 Hz, ⁴J_{HF} = 1.6 Hz, H₁₇), 3.73 (s, 2H, H₁₈), 2.97-2.90 (m, 2H, H₂₀), 2.90-2.84 (m, 2H, H₁₉);

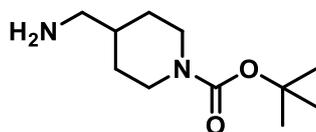
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 159.1, 142.0, 138.9, 130.8, 127.5, 124.4, 123.4, 122.7, 120.7, 116.2 (tt, ¹J_{CF} = 248.8 Hz, ²J_{CF} = 26.5 Hz), 115.8, 115.7, 115.2, 114.6, 113.7, 110.8 (tt, ¹J_{CF} = 248.1 Hz, ²J_{CF} = 33.5 Hz), 66.3 (t, ²J_{CF} = 29.4 Hz), 53.8, 50.0, 25.7;

¹⁹F NMR (MeOH, 376 MHz) -127.2 - -127.4 (m, 2F), -141.5 (dt, 2F, ²J_{FF} = 52.5 Hz, ³J_{FF} = 4.8 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 459.56-461.55;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₀H₂₀N₂OBrF₄ [M+H]⁺ 459.0695, found 459.0690;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3428, 2923, 2850, 1612, 1383, 1107.

Tert-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate 25Chemical Formula: C₁₁H₂₂N₂O₂Molecular Weight: 214.31 g.mol⁻¹

To a solution of 4-piperidylmethanamine (574 mg, 5.03 mmol, 1.0 equiv) in MIBK (10 mL/mmol), was added MgSO₄ (303 mg, 2.51 mmol, 0.5 equiv) and was heated to reflux under nitrogen. After the reaction mixture was cooled to 0 °C and was added dropwise to a solution of Boc₂O (1.10 g, 5.03 mmol, 1.0 equiv) dissolved in a minimum of MIBK. After stirring for 30 min at rt, water (1 mL, 0.2 mL/mmol) was added to dissolve inorganic salts. The aqueous layer was split off, and MIBK was evaporated *in vacuo* leading to the imine intermediate. Water (0.5 mL) and 2-propanol (5 mL) were then added, and the mixture was heated to 50 °C until completion of the hydrolysis. After the solution was concentrated *in vacuo* to afford amine compound **25** as a brown oil (678 mg, 63% yield).

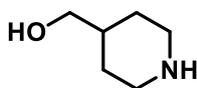
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.18 – 3.99 (m, 2H), 2.73 – 2.61 (m, 3H), 2.57 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz), 1.44 (s, 9H), 1.07 (qd, 2H, ³J_{HH} = 12.5 Hz, ⁴J_{HH} = 4.4 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 155.0, 79.4, 47.9 (2C), 43.5, 39.5 (2C), 29.9, 28.6 (3C).

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁷

³⁰⁷ Vallone, A.; D'Alessandro, S.; Brogi, S.; Brindisi, M.; Chemi, G.; Alfano, G.; Lamponi, S.; Lee, S. G.; Jez, J. M.; Koolen, K. J. M.; *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 698–718.

4-piperidinylmethanol 26Chemical Formula: C₆H₁₃NOMolecular Weight: 115.18 g.mol⁻¹

To a solution of ethyl isonipecotate (2.0 mL, 13.00 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (150 mL) was added portionwise LiAlH₄ (1.48 g, 39.00 mmol, 3.0 equiv) at 0 °C and the reaction mixture was refluxed for 7h. The mixture was then cooled to 0 °C and the reaction was then slowly quenched with 1.5 mL of water, 1.5 mL of 15% NaOH solution followed by 4.5 mL of water to afford a granular inorganic precipitate. The white solid was filtered and washed several times with EtOAc. Evaporation of the filtrate *in vacuo* provided 1.38 g (92% yield) of compound **26** as a colorless oil.

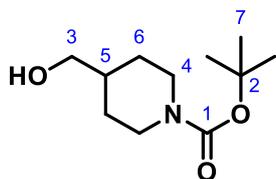
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.40-3.34 (m, 2H), 3.08-2.99 (m, 2H), 2.59-2.50 (m, 2H), 2.00 (s, 1H), 1.72-1.61 (m, 2H), 1.55 (m, 1H), 1.21-1.00 (m, 2H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 68.2, 46.5 (2C), 39.2, 30.1 (2C).

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁸

³⁰⁸ Boyer, N.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G.; Jubault, P.; Quirion, J. C. *European J. Org. Chem.* **2008**, 25, 4277–4295.

Tert-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate 27Chemical Formula: C₁₁H₂₁NO₃Molecular Weight: 215.29 g.mol⁻¹

To a solution of 4-piperidylmethanol **26** (1.54 g, 13.38 mmol, 1.0 equiv) in DCM (54 mL) was added di-*tert*-butyldicarbonate (3.21 g, 14.72 mmol, 1.1 equiv). The solution was stirred for 1 night at rt. The mixture was then diluted with water and the aqueous layer was extracted several times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 70:30) to give 1.28 g (44% isolated yield) of compound **27** as white solid.

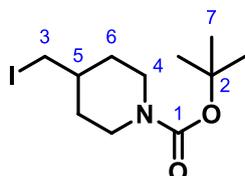
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.21-4.04 (m, 2H, H₄), 3.50 (t, 2H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H₃), 2.77-2.62 (m, 2H, H₄), 1.75-1.67 (m, 2H, H₆), 1.63 (m, 1H, H₅), 1.48-1.40 (m, 10H H₇, H_{OH}), 1.20-1.07 (m, 2H, H₆);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 155.0, 79.5, 67.8, 43.7 (2C), 39.0, 28.7 (2C), 28.6 (3C).

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰⁹

³⁰⁹ Saitton, S.; Del Tredici, A. L.; Saxin, M.; Stenström, T.; Kihlberg, J.; Luthman, K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (9), 1647–1654.

Tert-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate 28Chemical Formula: C₁₁H₂₀INO₃Molecular Weight: 215.29 g.mol⁻¹

To a solution of *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **27** (1.28 g, 5.95 mmol, 1.0 equiv), imidazole (486 mg, 7.13 mmol, 1.2 equiv) and triphenylphosphine (1.87 g, 7.13 mmol, 1.2 equiv) in dry THF (18 mL) was added drop-wise a solution of iodine (1.81 g, 7.13 mmol, 1.2 equiv) in dry THF (18 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 1 night. The mixture was quenched with a saturated aqueous Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The crude was several times diluted with cold Et₂O, and white crystals were filtered. After concentration of filtrate *in vacuo*, the compound **28** was obtained as a colorless oil (550 mg, 28% isolated yield).

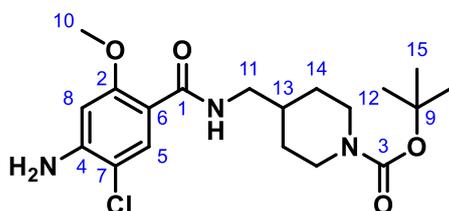
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.17-3.98 (m, 2H), 3.06 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.4 Hz), 2.71-2.57 (m, 2H), 1.82-1.74 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.16-1.03 (m, 2H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 154.5, 79.4, 43.6 (2C), 38.5, 32.4 (2C), 28.3 (3C), 13.3.

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁰

³¹⁰ Villalobos, A.; Blake, J. F.; Biggers, C. K.; Butler, T. W.; Chapin, D. S.; Chen, Y. L.; Ives, J. L.; Jones, S. B.; Liston, D. R.; Nagel, A. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2721–2734.

Tert-butyl 4-[[[4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)amino]methyl]piperidine-1-carboxylate 29Chemical Formula: C₁₉H₂₈ClN₃O₄Molecular Weight: 397.90 g.mol⁻¹

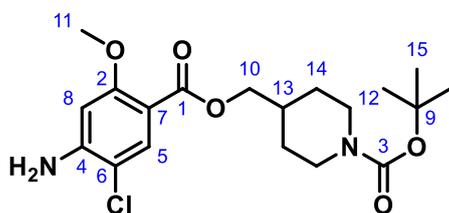
To a solution of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (1.19 g, 5.92 mmol, 1.0 equiv) in DMF (38 mL) were added Et₃N (825 μL, 5.92 mmol, 1.0 equiv) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **25** (1.27 g, 5.92 mmol, 1.0 equiv). The mixture was cooled to -5 °C, and HOBT (798 mg, 5.92 mmol, 1.0 equiv) and EDCI·HCl (1.14 g, 5.92 mmol, 1.0 equiv) were then added. The mixture was then stirred 1 night. After dilution with water, the solution was extracted 3 times with EtOAc. The organic layers were combined, washed 3 times with saturated aqueous NaHCO₃, and 1 times with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified on silica gel (gradient of elution: DCM to DCM/MeOH 9/1) to provide 350 mg of desired product **29**, beige powder (15% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 8.10 (s, 1H, H₅), 7.75 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.3 Hz, H_{NH}), 6.26 (s, 1H, H₈), 4.39 (br s, 2H, H_{NH}), 4.20-4.03 (m, 2H, H₁₂), 3.90 (s, 3H, H₁₀), 3.32 (br s, 2H, H₁₁), 2.74-2.62 (m, 2H, H₁₂), 1.70-1.61 (m, 3H, H₁₃, H₁₄), 1.44 (s, 9H, H₁₅), 1.25-1.10 (m, 2H, H₁₄);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 164.8, 157.5, 154.9, 146.8, 133.2, 112.5, 111.7, 97.9, 79.5, 56.3, 45.1, 44.1 (2C), 36.6, 30.0 (2C), 28.6 (3C).

* Spectral and analytical data matched with literature.¹²⁹

Tert-butyl 4-[(4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)oxymethyl]piperidine-1-carboxylate 30Chemical Formula: C₁₉H₂₇ClN₂O₅Molecular Weight: 398.88 g.mol⁻¹

To a suspension of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (487 mg, 2.42 mmol, 1.0 equiv) in dry THF (55 mL) was added CDI (431 mg, 2.66 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at rt for 24 h, and then a solution of *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **27** (520 mg, 2.42 mmol, 1.1 equiv) in dry THF (10 mL) and NaH 95% (244 mg, 9.66 mmol, 4.0 equiv) were added. This new mixture was stirred 3 h at rt and then concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc, washed with water, dried over MgSO₄, and concentrated under *in vacuo*. The crude product was then purified by chromatography on alu mine gel column (gradient of elution: DCM (100%) to EtOAc (100%)). The compound **30** was obtained as a colorless oil (100 mg, 10% isolated yield).

Spectral and analytical data

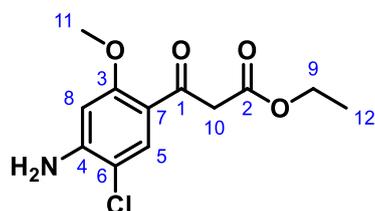
¹H NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 7.78 (s, 1H, H₅), 6.28 (s, 1H, H₈), 4.53 (s, 2H, H_{NH}), 4.12 (m, 2H, H₁₂), 4.08 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.4 Hz, H₁₀), 3.81 (s, 3H, H₁₁), 2.78-2.64 (m, 2H, H₁₂), 1.89 (m, 1H, H₁₃), 1.79-1.69 (m, 2H, H₁₄), 1.44 (s, 9H, H₁₅), 1.31-1.18 (m, 2H, H₁₄);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 164.7, 160.4, 154.9, 148.0, 133.3, 110.0, 109.6, 98.3, 79.5, 68.4, 56.2, 43.6 (2C), 35.8, 28.9 (2C), 28.6 (3C);

MS *m/z* [M+H-Boc]⁺ 299.53/301.59;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₉H₂₇ClN₂NaO₅ [M+H]⁺ 421.1506, found 421.1508;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3445, 3327, 3213, 2975, 2925, 2852, 1695, 1624, 1602, 1421, 1237, 1173.

Ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate 31Chemical Formula: C₁₂H₁₄ClNO₄BrNOMolecular Weight: 271.70 g.mol⁻¹

To a mixture of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (2.0 g, 9.92 mmol, 1.0 equiv) and CDI (1.77 g, 10.91 mmol, 1.1 equiv), dry THF (100 mL) (caution: gas evolution) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 8 h, and then, potassium 3-ethoxy-3-oxopropanoate (2.03 g, 11.90 mmol, 1.2 equiv) and MgCl₂ (1.13 g, 11.90 mmol, 1.2 equiv) were added portionwise. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h. Evaporation of the solvent provided a residue that was diluted in water. The mixture was extracted with DCM. The organic layer was washed with water, saturated aqueous NaHCO₃, and brine, and then, it was dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent provided a crude product that was purified by column on silica, eluting with a gradient of 20–30% EtOAc/CHX to give the compound **7** (1.14 g, 42% isolated yield) as a white solid.

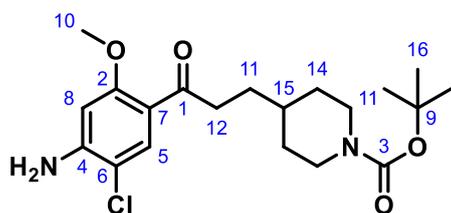
Spectral and analytical data

m.p. 124 °C;

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.91 (s, 1H, H₅), 6.23 (s, 1H, H₈), 4.59 (s, 2H, H_{NH}), 4.17 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₁₂), 3.87 (s, 2H, H₁₀), 3.82 (s, 3H, H₁₁), 1.24 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₉);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 189.8, 168.8, 160.0, 148.9, 132.6, 117.4, 111.8, 97.2, 61.0, 55.6, 50.6, 14.3;

* Spectral and analytical data matched with literature.¹²⁸

Tert-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **32**Chemical Formula: C₂₀H₂₉ClN₂O₄Molecular Weight: 396.91 g.mol⁻¹

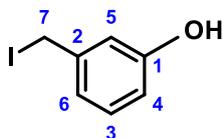
To a DMF (30 mL) solution of compound ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate **31** (860 mg, 3.17 mmol, 1.0 equiv) and the compound *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate **28** (1.24 g, 3.81 mmol, 1.2 equiv) was added K₂CO₃ (877 mg, 6.35 mmol, 2.0 equiv), and the mixture was stirred at rt for 1 night. The reaction mixture was diluted with water, and product was extracted with EtOAc. Combined organic layer was washed with water and brine and then dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent gave a crude mixture (2.04 g, 4.34 mmol), which was directly dissolved in EtOH (87 mL). To the solution, H₂O (17 mL) and KOH (1.1 g, 19.6 mmol, 4.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 3h. EtOH was evaporated. The mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine. Evaporation of the solvent provided a crude product, which was purified by column on silica, eluting with a gradient of 0–20% of EtOAc/DCM to give the compound **32** as a colorless solid (710mg, 56% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.79 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.16-3.98 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.94-2.87 (m, 2H), 2.73-2.60 (m, 2H), 1.71-1.63 (m, 2H), 1.62-1.56 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.40 (m, 1H), 1.16-1.04 (m, 2H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 198.9, 159.6, 155.0, 147.8, 132.4, 119.0, 111.4, 97.7, 79.3, 55.8, 44.0 (2C), 40.8, 35.9, 32.2 (2C), 31.3, 28.6 (3C);

* Spectral and analytical data matched with literature.¹²⁸

3-(iodomethyl)phenol 33Chemical Formula: C₇H₇IOMolecular Weight: 234.04 g.mol⁻¹

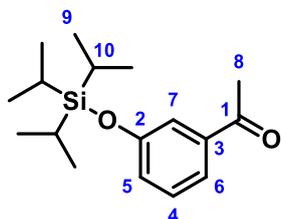
To a dioxane (50 mL) solution of 3-(hydroxymethyl)phenol (3.0 g, 24.17 mmol, 1.0 equiv) and potassium iodide (4.01 g, 24.17 mmol, 1.0 equiv) was added boron trifluoride diethyl etherate (BF₃.Et₂O) (3.43 g, 24.17 mmol, 1.0 equiv). The reaction mixture was stirred at rt for 17h30. The mixture was poured into cold water and extracted with Et₂O (3 x 50 mL). The organic layer was washed with water and brine. The solvent was evaporated *in vacuo*. After a purification by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 90:10), the compound **33** was obtained as a white powder (3.56 g, 63% isolated yields).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.16 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H₃), 6.95 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₄), 6.85 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H₅), 6.72 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₆), 4.90 (s, 1H, H_{OH}), 4.40 (s, 2H, H₇);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 155.7, 141.1, 130.2, 121.4; 115.8, 115.2, 5.3;

* Spectral and analytical data matched with literature.²²⁴

1-(3-triisopropylsilyloxyphenyl)ethanone 34Chemical Formula: C₁₇H₂₈O₂SiMolecular Weight: 292.49 g.mol⁻¹

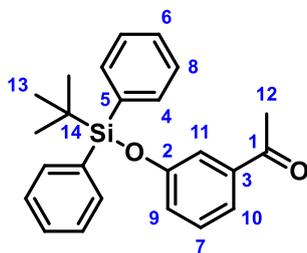
Starting from 3-hydroxybenzaldehyde (1.06 g, 7.76 mmol, 1.0 equiv) and triisopropylsilyl chloride (1.14 mL, 8.53 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure H**. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo*. The expected compound **34** was obtained as a brown oil (948 mg, 42% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.52 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H₆), 7.45 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H₇), 7.30 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₄), 7.08 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₅), 2.57 (s, 3H, H₈), 1.34-1.21 (m, 3H, H₁₀), 1.10 (d, 18H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 198.1, 156.5, 138.7, 129.6, 124.8, 121.4, 119.3, 26.9, 18.0 (6C), 12.8 (3C);

* Spectral and analytical data matched with literature.²⁸¹

1-[3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxyphenyl]ethenone 35Chemical Formula: C₂₄H₂₆O₂SiMolecular Weight: 374.56 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzaldehyde (3.90 g, 31.94 mmol, 1.0 equiv), *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (16.34 mL, 63.89 mmol, 2.0 equiv), following the **general procedure H**. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 95:5) and concentrated *in vacuo*. The expected compound **35** was obtained as a colorless oil (7.92 g, 69% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.76-7.70 (m, 4H, H₄), 7.48 (m, 1H, H₁₀), 7.45-7.36 (m, 7H, H₆, H₈, H₁₁), 7.17 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₇), 6.92 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₉), 2.40 (s, 3H, H₁₂), 1.14 (s, 9H, H₁₃);

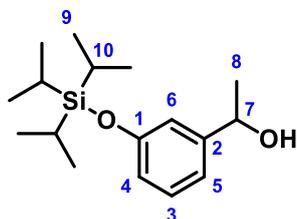
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 198.0, 155.9, 138.5, 135.6 (4C), 132.6 (2C), 130.2 (2C), 129.5, 128.0 (4C), 124.5, 121.1, 119.7, 26.7, 26.6 (3C), 19.60;

²⁹Si NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ -5.0;

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3071, 2960, 2934, 2857, 1687, 1582, 1428, 1283, 1114, 929, 701, 501.

1-(3-triisopropylsilyloxyphenyl)ethanol 36Chemical Formula: C₁₇H₃₀O₂SiMolecular Weight: 294.51 g.mol⁻¹

Starting from 1-(3-triisopropylsilyloxyphenyl)ethenone **34** (846 mg, 2.89 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (324 mg, 8.67 mmol, 3.0 equiv) at rt for 30 min, following the **general procedure I**. The expected compound **36** was obtained as a brown oil (789 mg, 93% isolated).

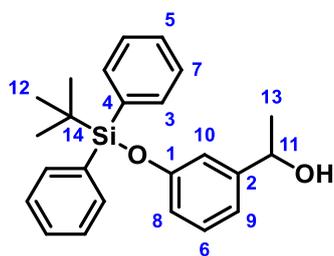
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.18 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H, H₃), 6.92 (dt, 1H, ³J_{HH} = 10.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H₅), 6.91 (s, 1H, H₆), 6.78 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₄), 4.81 (q, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H₇), 1.45 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H₈), 1.33-1.19 (m, 3H, H₁₀), 1.11 (d, 18H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 156.3, 147.6, 129.4, 118.9, 118.0, 117.0, 70.3, 25.2, 18.0 (6C), 12.8 (3C);

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹¹

³¹¹ J oncour, A.; Liu, J.-M.; Décor, A.; Thoret, S.; Wdzieczak-Bakala, J.; Bignon, J.; Baudoin, O. *ChemMedChem* **2008**, *3* (11), 1731–1739.

1-[3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxyphenyl]ethanol **37**Chemical Formula: C₂₄H₂₈O₂SiMolecular Weight: 376.57 g.mol⁻¹

Starting from 1-[3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxyphenyl]ethenone **35** (121 mg, 0.32 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (49 mg, 1.29 mmol, 3.0 equiv) at rt for 30 min, following the **general procedure I**. The expected compound **37** was obtained as a colorless oil (109 mg, 90% isolated).

Spectral and analytical data

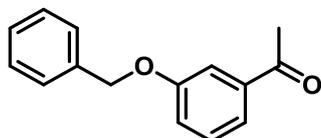
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.74-7.70 (m, 4H, H₃), 7.46-7.40 (m, 2H, H₅), 7.39-7.34 (m, 4H, H₇), 7.05 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₆), 6.87 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₉), 6.77 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H₁₀), 6.66 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₈), 4.70 (q, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₁₁), 1.66 (s, 1H, H_{OH}), 1.32 (d, 3H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₁₃), 1.13 (s, 9H, H₁₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 155.8, 147.4, 135.7 (4C), 133.0 (2C), 130.0 (2C), 129.3, 127.9 (4C), 118.8, 118.1, 117.0, 70.2, 26.7 (3C), 25.0, 19.6;

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3420, 2957, 2928, 2855, 1724, 1584, 1427, 1278, 116, 11010, 965, 700, 499.

1-(3-benzyloxyphenyl)ethanone 38Chemical Formula: C₁₅H₁₄O₂Molecular Weight: 226.28 g.mol⁻¹

Starting from 3-acetophenone (1.50 g, 11.02 mmol, 1.0 equiv) and benzyl bromide (1.48 mL, 12.12 mmol, 1.1 equiv) following the **general procedure F**. The expected compound **38** was isolated as a brown oil (1.90 g, 76% yield).

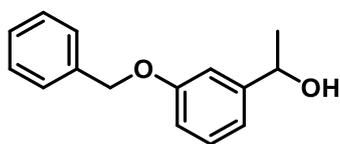
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.59 – 7.57 (m, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 1H), 7.47-7.32 (m, 6H), 7.19 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, ⁴J_{HH} = 0.8 Hz), 5.12 (s, 2H), 2.59 (s, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 198.0, 159.1, 138.6, 136.6, 129.7, 128.8 (2C), 128.3, 127.7 (2C), 121.4, 120.4, 113.7, 70.3, 26.9.

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹²

³¹² Aggarwal, R.; Birkbeck, A. A.; Giles, R. G. F.; Green, I. R.; Gruchlik, Y.; Oosthuizen, F. J. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56* (5), 489.

1-(3-benzyloxyphenyl)ethanol 39Chemical Formula: C₁₅H₁₆O₂Molecular Weight: 228.29 g.mol⁻¹

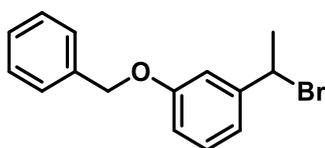
Starting from 1-(3-benzyloxyphenyl)ethanone **38** (1.62 g, 7.15 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (271 mg, 7.15 mmol, 1.0 equiv) at 0 °C for 30 min following the **general procedure I**. The expected compound **39** was obtained as a yellow oil (1.20 g, 74% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.48 – 7.38 (m, 4H), 7.37 – 7.32 (m, 1H), 7.28 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz), 7.05 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz), 6.97 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz), 6.90 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 0.8 Hz), 5.08 (s, 2H), 4.87 (q, 1H, ³J_{HH} = 6.4 Hz), 1.49 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.4 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 159.1, 147.7, 137.1, 129.7, 128.7 (2C), 128.1, 127.6 (2C), 118.1, 113.8, 112.0, 70.4, 70.0, 25.2.

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹²

1-benzyloxy-3-(1-bromoethyl)benzene 40Chemical Formula: C₁₅H₁₅BrOMolecular Weight: 291.19 g.mol⁻¹

Starting from 1-(3-benzyloxyphenyl)ethanol **38** (1.13 mg, 4.95 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure J**. The expected compound **40** was obtained as a brown oil (600 mg, 42% yield).

Spectral and analytical data

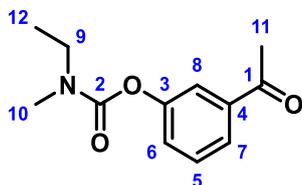
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.47 – 7.38 (m, 4H), 7.37 – 7.32 (m, 1H), 7.28 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz), 7.09 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz), 7.04 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz), 6.91 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz), 5.18 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz), 5.08 (s, 2H), 2.04 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 159.0, 144.9, 136.9, 129.8, 128.8 (2C), 128.2, 127.7 (2C), 119.5, 114.7, 113.7, 70.2, 49.5, 26.9;

MS *m/z* [M-H]⁻ 290.86-292.87;

HRMS/ESI *not determined*;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 1597, 1584, 486, 1421, 1258, 1159, 1025, 733, 694.

(3-acetylphenyl) N-ethyl-N-methyl-carbamate 41Chemical Formula: C₁₂H₁₅NO₃Molecular Weight: 221.26 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxyacetophnone (1.48 g, 10.83 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (1.24 mL, 11.96 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure F**. The expected compound **41** was isolated as a colorless oil (2.28 g, 95% isolated yield).

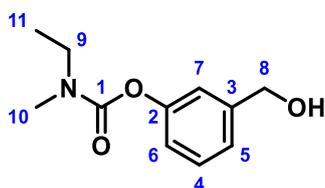
Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.79 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₇), 7.65 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₇), 7.52 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₅), 7.39 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₆), 3.41 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉), 3.00 (s, 3H, H₁₀), 2.57 (s, 3H, H₁₁), 1.19 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₂);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 196.5, 152.9, 151.3, 137.9, 129.0, 125.8, 124.3, 120.5, 43.1, 33.3, 26.1, 12.1;

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹³

³¹³ Nagai, T.; Sakurai, S.; Natori, N.; Hataoka, M.; Kinoshita, T.; Inoue, H.; Hanaya, K.; Shoji, M.; Sugai, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (7), 1304–1313.

[3-(hydroxymethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **42**Chemical Formula: C₁₁H₁₅NO₃Molecular Weight: 209.25 g.mol⁻¹

Starting from (3-formylphenyl) *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **15** (1.06 g, 5.12 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (561 mg, 14.82 mmol, 3.0 equiv) at 0 °C for 30 min, following the **general procedure I**. The expected compound **42** was obtained as a yellow oil (900 mg, 84% yield).

Spectral and analytical data

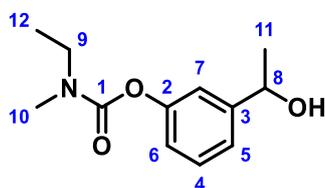
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.30 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.14 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₅), 7.07 (s, 1H, H₇), 6.9 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ⁴J_{HH} = 0.6 Hz, H₆), 4.94 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H_{OH}), 4.52 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H₈), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉), 2.97 (s, 3H, H₁₀), 1.17 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 153.2, 151.1, 143.7, 128.2, 122.3, 119.2, 119.0, 62.2, 43.0, 33.2, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 210.47;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₁H₁₅NNaO₃ [M+Na]⁺ 232.0950, found 232.0948;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3419, 2975, 2937, 2877, 1704, 1436, 1402, 1238, 1170, 1088, 1030, 758, 691.

[3-(1-hydroxyethyl)phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 43Chemical Formula: C₁₂H₁₇NO₃Molecular Weight: 223.27 g.mol⁻¹

Starting from (3-acetylphenyl) N-ethyl-N-methyl-carbamate **41** (2.21 g, 10.00 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (1.14 g, 29.99 mmol, 3.0 equiv) 0 °C for 30 min following the **general procedure I**. The expected compound **43** was obtained as a yellow oil (1.76 g, 79% yield).

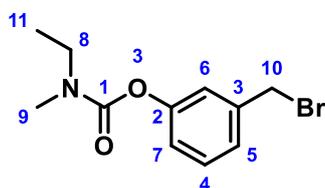
Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.30 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.17 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₅), 7.10 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H₇), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₆), 4.91 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H_{OH}), 4.74 (qd, 1H, ³J_{HH} = 6.4 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H₈), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉), 2.97 (s, 3H, H₁₀), 1.35 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.4 Hz, H₁₁), 1.17 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₂);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 153.2, 151.0, 148.5, 128.1, 121.4, 119.1, 118.0, 67.3, 43.0, 33.2, 25.1, 12.1;

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁴

³¹⁴ Hua, Y.-G.; Han, L.-P.; Yang, Q.-Q.; Wang, M.-J.; Zhang, E.; Liu, H.-M. *A ChemistrySelect* **2018**, 3 (5), 1385–1387.

[3-(bromomethyl)phenyl] N-ethyl-N-methylcarbamate 44Chemical Formula: C₁₁H₁₄BrNO₂Molecular Weight: 272.14 g.mol⁻¹

Starting from [3-(hydroxymethyl)phenyl] N-ethyl-N-methylcarbamate **42** (350 mg, 1.67 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure J**. The expected compound **44** was isolated as a colorless oil (200 mg, 44% isolated yield).

Spectral and analytical data 363 K

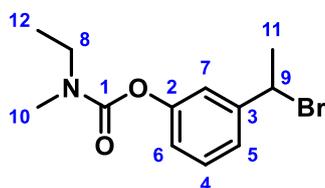
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.36 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.28 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₅), 7.21 (t, 1H, ³J_{HH} = 1.3 Hz, H₆), 7.16 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₇), 4.67 (s, 2H, H₁₀), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₈), 2.98 (s, 3H, H₉), 1.17 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 153.0, 151.1, 138.8, 128.9, 125.2, 121.8, 121.1, 43.1, 33.3, 33.0, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 272.44 / 274.47;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₁H₁₅BrNO₂ [M+H]⁺ 272.0286, found 272.0287 / 274.0267;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3438.5, 2972, 2931, 1719, 1395, 1248, 1161, 691.

[3-(1-(bromomethyl)phenyl) N-ethyl-N-methylcarbamate 45Chemical Formula: C₁₂H₁₆BrNO₂Molecular Weight: 285.17 g.mol⁻¹

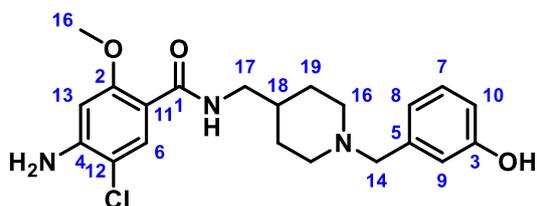
Starting from [3-(1-hydroxyethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate **43** (502 mg, 2.24 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure J**. The expected compound **45** was obtained as a yellow oil (130 mg, 20% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.32 (s, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.27 – 7.24 (m, 1H, H₅), 7.22 – 7.18 (m, 1H, H₇), 7.07 – 7.03 (m, 1H, H₆), 5.17 (q, 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H₉), 3.47 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₈, rota A), 3.41 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₈, rota B), 3.07 (s, 3H, H₁₀, rota A), 2.99 (s, 3H, H₁₀, rota B), 2.03 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H₁₁), 1.25 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₂, rota A), 1.19 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₂, rota B).

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁵

³¹⁵ Liu, Hong min; Zhang, En; Zhang, Baoyin; Lv, Aiqiao; Li, Cong; Fang, Y. CN 102617403, 2012.

4-amino-5-chloro-N-[[1-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]methyl]-2-methoxybenzamide 46Chemical Formula: C₂₁H₂₆ClN₃O₃Molecular Weight: 403.91 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[[[(4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)amino]methyl]piperidine-1-carboxylate **29** (187 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv) and 3-(iodomethyl)phenol **33** (143 mg, 0.61 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **46** was isolated as a beige powder (97 mg, 51% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.79 (s, 1H, H₆), 7.14 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁵J_{HH} = 1.2 Hz, H₇), 6.79 (m, 1H, H₈), 6.78 (m, 1H, H₉), 6.71 (m, 1H, H₁₀), 6.50 (s, 1H, H₁₃), 3.91 (s, 3H, H₁₆), 3.53 (s, 2H, H₁₄), 3.28 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H₁₇), 3.02-2.96 (m, 2H, H₁₆), 2.16-2.08 (m, 2H, H₁₆), 1.78-1.71 (m, 2H, H₁₉), 1.65 (m, 1H, H₁₈), 1.42-1.28 (m, 2H, H₁₉);

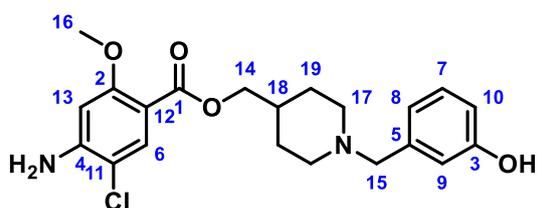
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 167.3, 159.4, 158.6, 150.2, 138.9, 133.1, 130.3, 122.1, 117.8, 115.6, 111.6, 111.5, 98.6, 64.0, 56.6, 54.3 (2C), 45.9, 37.1, 30.3 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ 404.64-406.64;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₁H₂₇N₃NaO₃ [M+H]⁺ 404.1741, found 404.1736;

M.p. 92-105 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3391, 3204, 2928, 1627, **1592**, 1544, 1462, 1253, 1211, 1148, 770.

[1-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]methyl 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoate 47Chemical Formula: C₂₁H₂₅ClN₂O₄Molecular Weight: 404.89 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[(4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)oxymethyl] piperidine-1-carboxylate **30** (95 mg, 0.24 mmol, 1.0 equiv) and 3-(iodomethyl)phenol **33** (145 mg, 0.62 mmol, 2.6 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **47** was isolated as a white powder (65 mg, 67% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.70 (s, 1H, H₆), 7.13 (m, 1H, H₇), 6.81-6.77 (m, 2H, H₈, H₉), 6.69 (m, 1H, H₁₀), 6.46 (s, 1H, H₁₃), 4.08 (d, 2H, ³J_{HH} = 4.0 Hz, H₁₄), 3.80 (s, 3H, H₁₆), 3.47 (s, 2H, H₁₅), 3.00-2.93 (m, 2H, H₁₇), 2.11-2.02 (m, 2H, H₁₇), 1.82-1.72 (m, 3H, H₁₈, H₁₉), 1.50-1.37 (m, 12H, H₁₉);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 166.7, 162.0, 158.5, 151.5, 139.7, 133.9, 130.2, 122.0, 117.7, 115.3, 110.3, 108.5, 98.7, 69.5, 64.3, 56.2, 54.3 (2C), 36.7, 29.5 (2C);

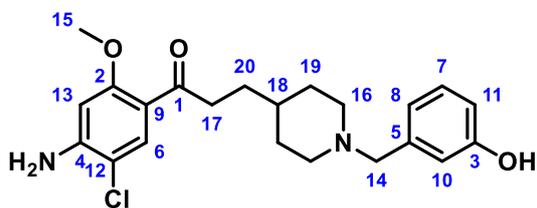
MS *m/z* [M+H]⁺ 405.66/407.65;

HRMS *m/z* calcd. for C₂₁H₂₆N₂O₄Cl [M+H]⁺ 405.1581, found 405.1582;

M.p. 140 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3439, 3302, 3213, 2921, 2852, 1695, 1599, 1449, 1240, 1229, 767, 697.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one
48



Chemical Formula: C₂₂H₂₇ClN₂O₃

Molecular Weight: 402.92 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **32** (300 mg, 0.76 mmol, 1.0 equiv) and 3-(iodomethyl)phenol **33** (212 mg, 0.91 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **48** was isolated as a white powder (150 mg, 51% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.64 (s, 1H, H₆), 7.12 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H₇), 6.79 – 6.75 (m, 1H, H₈), 6.76 (s, 1H, H₁₀), 6.69 (m, 1H, H₁₁), 6.44 (s, 1H, H₁₃), 3.85 (s, 3H, H₁₅), 3.42 (s, 2H, H₁₄), 2.93 – 2.86 (m, 4H, H₁₆, H₁₇), 2.15 (s, 2H, H_{NH}), 2.03 – 1.94 (m, 2H, H₁₆), 1.73 – 1.67 (m, 2H, H₁₉), 1.58 – 1.51 (m, 2H, H₂₀), 1.32 – 1.22 (m, 3H, H₁₈, H₁₉);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 201.1, 161.7, 158.5, 151.7, 139.7, 132.9, 130.2, 122.0, 117.9, 117.7, 115.3, 111.6, 98.1, 64.4, 56.1, 54.8 (2C), 41.7, 36.8, 32.8 (2C), 32.7;

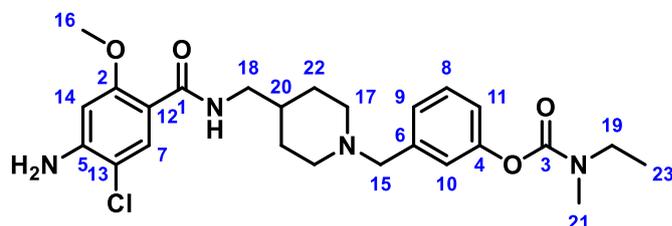
MS *m/z* [M+H]⁺ 403.60/405.61;

HRMS/ESI calcd. for C₂₂H₂₈ClN₂O₃ [M+H]⁺ 403.1788, found 403.1801;

m.p. 162.0 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3469, 3321, 3204, 2920, 2853, 1624, 1580, 1450, 1216.

[3-[[4-[[[(4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)amino]methyl]-1-piperidyl]methyl]phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 49



Chemical Formula: C₂₅H₃₃ClN₄O₄

Molecular Weight: 489.01 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[[[(4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)amino]methyl]piperidine-1-carboxylate **29** (148 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv) and [3-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **44** (132 mg, 0.48 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **49** was isolated as a yellow oil (126 mg, 69% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.72 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, H_{NH}), 7.68 (s, 1H, H₇), 7.29 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₈), 7.12 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₉), 7.04 (s, 1H, H₁₀), 6.98 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₁₁), 6.53 (s, 1H, H₁₄), 5.61 (br s, 2H, H_{NH2}), 3.84 (s, 3H, H₁₆), 3.48 (s, 2H, H₁₅), 3.38 (q, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H₁₉), 3.20 (t, 2H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, H₁₈), 2.97 (s, 3H, H₂₁), 2.85-2.79 (m, 2H, H₁₇), 2.04-1.95 (m, 2H, H₁₇), 1.67-1.60 (m, 2H, H₂₂), 1.50 (m, 1H, H₂₀), 1.31-1.19 (m, 2H, H₂₂), 1.16 (t, 3H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H₂₃);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 163.4, 157.0, 153.2, 151.1, 147.7, 139.9, 131.0, 128.2, 124.7, 121.2, 119.5, 111.3, 109.0, 97.9, 61.4, 55.7, 52.4 (2C), 44.0, 43.1, 35.3, 33.3, 29.2 (2C), 12.1;

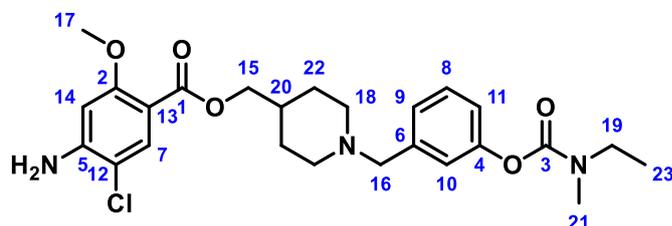
MS *m/z* [M+H]⁺ 489.61/491.70;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₉H₃₄ClN₄O₄ [M+H]⁺ 489.2269, found 489.2268;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3400, 2921, 1709, 1631, 1592, 1243, 1164, 688.

[1-[[3-[ethyl(methyl)carbamoyl]oxyphenyl]methyl]-4-piperidyl]methyl
methoxybenzoate 50

4-amino-5-chloro-2-

Chemical Formula: C₂₅H₃₂ClN₃O₅Molecular Weight: 490.00 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[(4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoyl)oxymethyl] piperidine-1-carboxylate **30** (143 mg, 0.36 mmol, 1.0 equiv) and [3-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **44** (127 mg, 0.47 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **50** was isolated as a colorless oil (86 mg, 49% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.57 (s, 1H, H₇), 7.30 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₈), 7.13 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₉), 7.05 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₁₀), 6.98 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H₁₁), 6.50 (s, 1H, H₁₄), 5.81 (br s, 2H, H_{NH}), 4.03 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, H₁₅), 3.75 (s, 3H, H₁₇), 3.48 (s, 2H, H₁₆), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₉), 2.97 (s, 3H, H₂₁), 2.87-2.79 (m, 2H, H₁₈), 2.06-1.96 (m, 2H, H₁₈), 1.73-7.63 (m, 3H, H₂₀, H₂₂), 1.42-1.26 (m, 2H, H₂₂), 1.17 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₂₃);

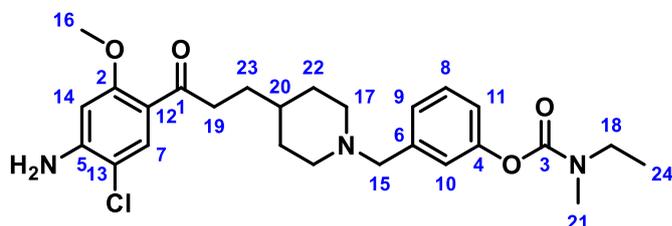
¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 163.7, 159.3, 153.2, 151.1, 149.1, 140.0, 131.6, 128.2, 124.6, 121.1, 119.4, 108.0, 107.8, 98.4, 67.4, 61.4, 55.5 (2C), 52.3, 43.0, 34.7, 33.2, 28.1 (2C), 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 490.70/492.71;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₅H₃₃ClN₃O₅ [M+H]⁺ 490.2109, found 490.2106;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3470, 3352, 3213, 2936, 2804, 2760, 1709, 1622, 1602, 1237, 1167, 694.

[3-[[4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]-1-piperidyl]methyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate 51



Chemical Formula: C₂₆H₃₄ClN₃O₄

Molecular Weight: 488.03 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **32** (123 mg, 0.31 mmol, 1.0 equiv) and [3-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **44** (110 mg, 0.40 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **51** was isolated as a brown oil (80 mg, 50% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.51 (s, 1H, H₇), 7.29 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₈), 7.12 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₉), 7.03 (s, 1H, H₁₀), 6.97 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₁₁), 6.51 (s, 1H, H₁₄), 5.84 (s, 2H, H_{NH2}), 3.81 (s, 3H, H₁₆), 3.45 (s, 2H, H₁₅), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₈), 2.97 (s, 3H, H₂₁), 2.85-2.76 (m, 4H, H₁₇, H₁₉), 2.01-1.96 (m, 2H, H₁₇), 1.66-1.59 (m, 2H, H₂₂), 1.50 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₂₃), 1.28-1.12 (m, 6H, H₂₀, H₂₂, H₂₄);

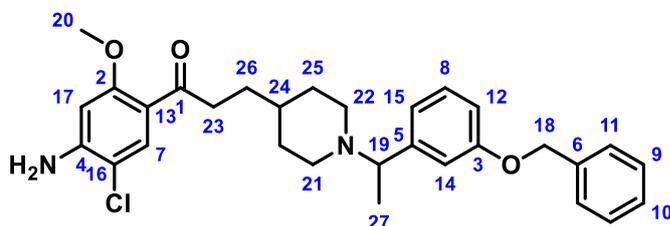
¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 196.9, 159.0, 153.6, 151.0, 149.1, 140.2, 130.5, 128.2, 124.7, 121.1, 119.4, 116.7, 109.2, 97.6, 61.5, 55.3, 52.8 (2C), 43.0, 41.1, 34.7, 33.2, 31.5 (2C), 30.6, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 488.75/490.74;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₆H₃₄ClN₃O₄ [M+H]⁺ 488.2316, found 488.2323;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3439, 2918, 2852, 1713, 1621, 1589, 1250, 1167.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[1-(3-benzyloxyphenyl)ethyl]-4-piperidyl]propan-1-one 52



Chemical Formula: C₃₀H₃₅ClN₂O₃

Molecular Weight: 507.07 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **8** (344 mg, 0.87 mmol, 1.0 equiv) and [3-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **22** (328 mg, 1.13 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure E**. The expected compound **23b** was isolated as a yellowish oil (180 mg, 41% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.64 (s, 1H, H₇), 7.42 – 7.38 (m, 2H, H₁₁), 7.35 – 7.30 (m, 2H, H₉), 7.28 – 7.23 (m, 1H, H₁₀), 7.19 (t, ³J_{HH} = .9 Hz, 1H, H₈), 6.91 (dd, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 0.7 Hz, 1H, H₁₄), 6.86 (ddd, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = .7 Hz, 1H, H₁₅), 6.84 (dd, ³J_{HH} = 7.9, ⁴J_{HH} = 0.8 Hz, 1H, H₁₂), 6.41 (s, 1H, H₁₇), 5.05 (s, 2H, H₁₈), 3.81 (s, 3H, H₂₀), 3.33 (m, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 1H, H₁₉), 3.07 – 3.00 (m, 1H, H₂₁), 2.87 – 2.81 (m, 3H, H₂₃), 2.77 – 2.72 (m, 1H, H₂₂), 1.94 – 1.85 (m, 1H, H₂₁), 1.79 – 1.71 (m, 1H, H₂₂), 1.71 – 1.64 (m, 1H, H₂₅), 1.60 – 1.54 (m, 1H, H₂₅), 1.49 (q, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 1H, H₂₆), 1.35 (d, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 3H, H₂₇), 1.29 – 1.23 (m, 1H, H₂₅), 1.18 – 1.06 (m, 2H, H₂₄, H₂₅);

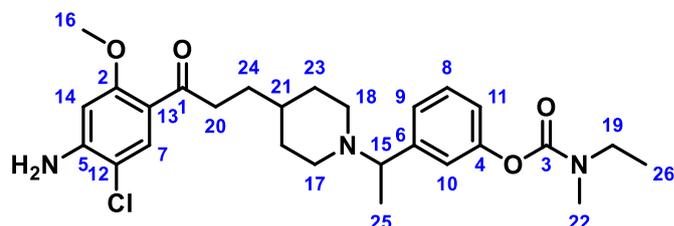
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 200.1, 161.6, 160.1, 151.2, 145.1, 138.7, 132.9, 130.3, 129.5 (2C), 128.8, 128.6 (2C), 121.7, 117.9, 115.6, 114.8, 111.6, 98.1, 70.8, 66.6, 56.1, 52.6, 51.6, 41.7, 36.7, 33.0 (2C), 32.6, 19.8;

MS *m/z* [M+H]⁺ 506.73/508.75;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₃₀H₃₆ClN₂O₃ [M+H]⁺ 507.2414, found 507.2415;

IR (neat, cm⁻¹) not determined.

[3-[1-[4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-oxo-propyl]-1-piperidyl]ethyl]phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 53



Chemical Formula: C₂₇H₃₆ClN₃O₄

Molecular Weight: 502.05 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **32** (120 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv) and 1-benzyloxy-3-(1-bromoethyl)benzene **45** (104 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv), following the **general procedurce K**. The expected compound **53** was isolated as a yellowish oil (31 mg, 20% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.64 (s, 1H, H₇), 7.34 (t, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H, H₈), 7.18 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H, H₉), 7.09 (t, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, H₁₀), 7.01 (dd, ³J_{HH} = 7.8, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, H₁₁), 6.50 (s, 1H, H₁₄), 3.84 (s, 3H, H₁₆), 3.56 – 3.47 (m, 2H, H₁₅, H₁₉, rota A), 3.40 (q, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 1H, H₁₉, rota B), 3.20 – 3.13 (m, 1H, H₁₇), 3.10 (s, 1.5H, H₂₂, rota A), 2.98 (s, 1.5H, H₂₂, rota B), 2.92 – 2.84 (m, 3H, H₁₈, H₂₀), 2.1 – 2.03 (m, 1H, H₁₇), 2.00 – 1.91 (m, 1H, H₁₈), 1.80 – 1.73 (m, 1H, H₂₃), 1.70 – 1.64 (m, 1H, H₂₃), 1.57 – 1.49 (m, 1H, H₂₄), 1.43 (d, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 3H, H₂₅), 1.36 – 1.15 (m, 6H, H₂₁, H₂₃, H₂₆);

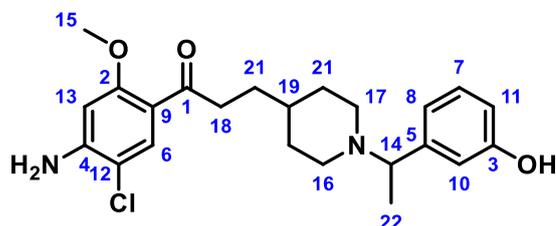
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 201.0, 161.6, 156.4 (rota A), 156.3 (rota B), 152.9, 151.7, 144.9, 132.9, 130.2, 126.3, 122.6 (rota A), 122.5 (rota B), 122.0, 117.9, 111.6, 98.1, 66.3, 56.1, 52.5, 51.7, 45.2, 41.6, 36.6, 34.5 (rota A), 34.3 (rota B), 32.8 (2C), 32.6, 19.5, 13.4 (rota A), 12.6 (rota B);

MS *m/z* [M+H]⁺ 502.79/504.79;

HRMS/ESI calcd. for C₂₇H₃₇ClN₃O₄ [M+H]⁺ 502.2473, found 502.2477;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3434, 2992, 2851, 1725, 1620, 1399, 1262, 1240, 1162, 1027.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[1-(3-hydroxyphenyl)ethyl]-4-piperidyl]propan-1-one
54



Chemical Formula: C₂₃H₂₉ClN₂O₃

Molecular Weight: 416.95 g.mol⁻¹

To a mixture of 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[1-(3-benzyloxyphenyl)ethyl]-4-piperidyl]propan-1-one **52** (146 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv) in DCM, was added HBr in acetic acid (2.3 mL, 8 mL/mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h, then quenched with ice water and evaporated. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10 with NH₃ 0.5%). The expected compound **54** was isolated as a yellowish oil (50 mg, 42% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.64 (s, 1H, H₆), 7.13 (t, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H, H₇), 6.79 – 6.73 (m, ²H, H₈, H₁₀), 6.68 (ddd, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 1H, H₁₁), 6.44 (s, 1H, H₁₃), 3.85 (s, 3H, H₁₅), 3.36 (q, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1H, H₁₄), 3.18 – 3.12 (m, 1H, H₁₆), 2.91 – 2.82 (m, 2H, H₁₈, H₁₇), 2.06 – 1.98 (m, 1H, H₁₆), 1.94 – 1.86 (m, 1H, H₁₇), 1.78 – 1.72 (m, 1H, H₂₀), 1.69 – 1.63 (m, 1H, H₂₀), 1.56 – 1.50 (m, 1H, H₂₁), 1.40 (d, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 3H, H₂₂), 1.36 – 1.21 (m, 3H, H₁₉, H₂₀);

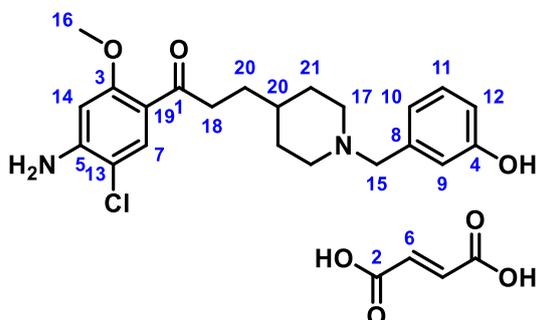
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 201.1, 161.7, 158.6, 151.7, 144.9, 132.9, 130.3, 120.3, 117.9, 115.9, 115.3, 111.6, 98.1, 66.8, 56.1, 52.7, 51.8, 41.7, 36.7, 32.9 (2C), 32.7, 19.8;

MS *m/z* [M+H]⁺ 416.86/418.86;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₃H₃₀ClN₂O₃ [M+H]⁺ 417.1945, found 417.1949;

IR (neat, cm⁻¹) *in progress*.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one fumaric acid salt 55 / MR35212



Chemical Formula: C₂₆H₃₁ClN₂O₇

Molecular Weight: 518.99 g.mol⁻¹

Starting from 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one **48** (135 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure G**. The mixture was stirred at reflux for 1 h 15. The expected compound **55** was obtained as a white powder (116 mg, 66% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.65 (s, 1H, H₇), 7.26 (t, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H₉), 6.94 – 6.89 (m, 2H, H₁₀, H₁₁), 6.89 – 6.83 (m, 1H, H₁₂), 6.69 (s, 2H, H₆), 6.44 (s, 1H, H₁₄), 4.10 (s, 2H, H₁₅), 3.85 (s, 3H, H₁₆), 3.43 – 3.35 (m, 2H, H₁₇), 2.99 – 2.90 (m, 2H, H₁₈), 2.90 – 2.78 (m, 2H, H₁₇), 2.00 – 1.87 (m, 2H, H₂₁), 1.66 – 1.51 (m, 3H, H₂₀), 1.51 – 1.38 (m, 2H, H₂₁);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) 200.3, 172.6 (2C), 161.7, 159.3, 151.8, 136.6 (2C), 132.9, 132.7, 131.2, 122.9, 118.8, 117.7, 111.7, 98.0, 61.7, 56.1, 53.5 (2C), 41.3, 34.7, 31.6 (2C), 30.5 (2C);

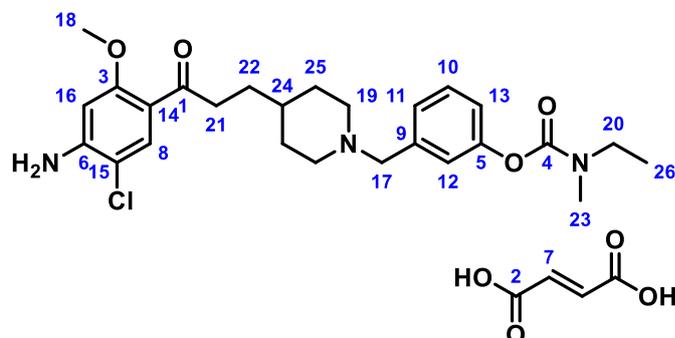
MS *m/z* [M+H]⁺ 403.60/405.61;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₂H₂₈N₂O₃Cl [M+H]⁺ 403.1788, found 403.1790;

M.p. > 250 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3331, 3207, 1622, 1584, 1454, 1362, 1215.

[3-[[4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]-1-piperidyl]methyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate fumaric acid salt **56 / MR35213**



Chemical Formula: C₃₀H₃₈ClN₃O₈

Molecular Weight: 604.10 g.mol⁻¹

Starting from [3-[[4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]-1-piperidyl]methyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate **51** (135 mg, 0.28 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure G**. The mixture was stirred at reflux for 1 h 15. The expected compound **56** was obtained as a white powder (114 mg, 68% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.66 (s, 1H, H₈), 7.49 (t, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.36 (dt, ³J_{HH} = 7.9, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₁₁), 7.30 (t, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, 1H, H₁₂), 7.23 (dd, ³J_{HH} = 8.1, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, 1H, H₁₃), 6.70 (s, 2H, H₇), 6.44 (s, 1H, H₁₆), 4.26 (s, 2H, H₁₇), 3.85 (s, 3H, H₁₈), 3.56 – 3.36 (m, 4H, H₁₉, H₂₀), 3.10 (s, 1.5H, H₂₃, rota A), 2.99 (s, 1.5H, H₂₃, rota B), 2.98 – 2.89 (m, 4H, H₁₉, H₂₁), 2.00 – 1.90 (m, 2H, H₂₅), 1.66 – 1.54 (m, 3H, H₂₂, H₂₄), 1.54 – 1.40 (m, 2H, H₂₅), 1.26 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1.5H, H₂₆, rota A), 1.18 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1.5H, H₂₆, rota B);

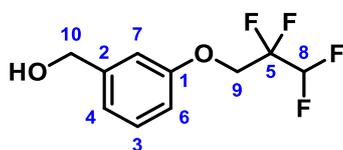
¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 200.1, 171.2 (2C), 161.7, 156.1 (rota A), 156.0 (rota B), 153.2, 151.8, 136.2 (2C), 132.9, 132.3 (rota A), 132.2 (rota B), 131.3, 129.3, 125.9 (rota A), 125.8 (rota B), 124.6 (rota A), 124.5 (rota B), 117.7, 111.7, 98.0, 60.8, 56.1, 53.5 (2C), 45.3 (rota A), 45.2 (rota B), 41.2, 34.6 (rota A), 34.3 (rota B), 34.5, 31.5, 30.3 (2C), 13.4 (rota A), 12.6 (rota B);

MS *m/z* [M+H]⁺ 488.75/490.74;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₆H₃₅ClN₃O₄ [M+H]⁺ 488.2316, found 488.2318;

M.p. > 250 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3439, 2918, 2852, 1713, 1621, 1589, 1250, 1167.

[3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phenyl]methanol 57Chemical Formula: C₁₀H₁₀F₄O₂Molecular Weight: 238.18 g.mol⁻¹

Starting from 3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)benzaldehyde **16** (816 mg, 3.46 mmol) and NaBH₄ (392 mg, 10.37 mmol, 3.0 equiv) at 0 °C for 1 h following the **general procedure I**. The expected compound **57** was obtained as a colorless oil (596 mg, 72% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.29 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₃), 6.98 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, H₄), 6.92 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H₇), 6.84 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, H₆), 6.07 (tt, 1H, ²J_{HF} = 53.2 Hz, ³J_{HF} = 5.0 Hz, H₈), 4.50 (s, 2H, H₁₀), 4.32 (tt, 2H, ³J_{HF} = 12.0 Hz, ⁴J_{HF} = 1.6 Hz, H₉), 3.17 (s, 1H, H_{OH});

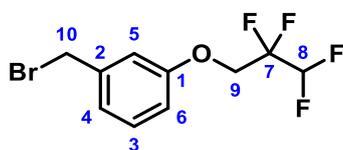
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 157.6, 143.0, 129.9, 120.7, 114.7 (tt, ¹J_{CF} = 249.7 Hz, ²J_{CF} = 26.8 Hz), 113.8, 113.0, 109.2 (tt, ¹J_{CF} = 249.2 Hz, ²J_{CF} = 34.0 Hz), 65.2 (t, ²J_{CF} = 30.1 Hz), 64.6;

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -125.1– -125.4 (m, 2F), -139.6 (dt, 2F, J_{FH} = 53.2 Hz, ⁴J_{FF} = 5.1 Hz);

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI no found;

IR (neat, cm⁻¹) 3358, 2944, 2890, 1590, 1490, 1452, 1269, 1204, 1108, 837, 691, 555.

1-(bromomethyl)-3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)benzene 58Chemical Formula: C₁₀H₉BrF₄OMolecular Weight: 301.08 g.mol⁻¹

Starting from [3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phenyl]methanol **57** (380 mg, 1.61 mmol, 1.0 equiv) and following the **general procedure I**, at 0 °C for 1 h. The expected compound **58** was isolated as a colorless oil (457 mg, 94% isolated yields).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.31 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₃), 7.09 (td, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H₄), 6.99 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H₅), 6.88 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, H₆), 6.06 (tt, 1H, ²J_{HF} = 52.9 Hz, ³J_{HF} = 4.7 Hz, H₈), 4.47 (s, 2H, H₁₀), 4.37 (tt, 2H, ³J_{HF} = 12.3 Hz, ⁴J_{HF} = 1.6 Hz, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 157.5, 139.8, 130.0, 123.1, 115.5, 114.8, 114.6 (tt, ¹J_{CF} = 249.9 Hz, ²J_{CF} = 26.9 Hz), 109.1 (tt, ¹J_{CF} = 249.5 Hz, ²J_{CF} = 34.3 Hz), 65.3 (t, ²J_{CF} = 30.1 Hz), 32.9;

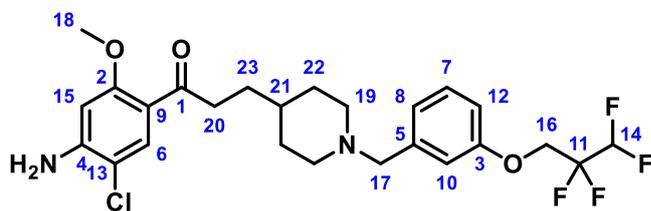
¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -125.1 (tq, 2F, ³J_{FF} = 12.3 Hz, ⁴J_{FF} = ⁴J_{FF} = 4.8 Hz), -139.4 (dt, 2F, ³J_{FF} = 53.9 Hz, ⁴J_{FF} = 5.1 Hz);

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI *in progress*;

IR (neat, cm⁻¹) 3429, 2934, 1590, 1450, 1270, 1108, 834, 693, 555.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-[[3-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phenyl]methyl]-4-piperidyl]propan-1-one 59



Chemical Formula: C₂₅H₂₉ClF₄N₂O₃

Molecular Weight: 516.96 g.mol⁻¹

Starting from *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **32** (150 mg, 0.38 mmol, 1.0 equiv) and [3-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **58** (145 mg, 0.48 mmol, 1.3 equiv), following the **general procedure K**. The expected compound **59** was isolated as a white powder (115 mg, 59% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.78 (s, 1H, H₆), 7.24 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₇), 6.98 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₈), 6.94 (s, 1H, H₁₀), 6.80 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, H₁₂), 6.25 (s, 1H, H₁₅), 6.08 (tt, 1H, ²J_{HF} = 53.5 Hz, ³J_{HF} = 5.0 Hz, H₁₄), 4.46 (s, 2H, H_{NH}), 4.34 (tt, 2H, ³J_{HF} = 11.9 Hz, ⁴J_{HF} = 1.5 Hz, H₁₆), 3.83 (s, 3H, H₁₈), 3.47 (s, 2H, H₁₇), 2.92-2.84 (m, 4H, H₁₉, H₂₀), 2.00-1.90 (m, 2H, H₁₉), 1.71-1.64 (m, 2H, H₂₂), 1.63-1.56 (m, 2H, H₂₃), 1.33-1.25 (m, 3H, H₂₁, H₂₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 199.2, 159.6, 157.5, 147.8, 140.8, 132.4, 129.5, 123.4, 119.1, 115.4, 114.6 (t, ²J_{CF} = 26.9 Hz), 113.3, 111.4, 109.1 (tt, ¹J_{CF} = 251.7 Hz, ²J_{CF} = 33.9 Hz), 97.7, 65.4 (t, ²J_{CF} = 29.8 Hz), 63.3, 55.8, 54.0 (2C), 41.0, 35.6, 32.3 (2C), 31.4;

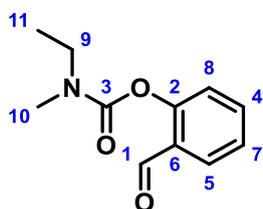
¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -124.9 - -125.7 (m, 2F), -139.7 (dt, 2F, ³J_{FH} = 53.5 Hz, ⁴J_{FF} = 6.1 Hz);

MS *m/z* [M+H]⁺ 517.62-519.61;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₅H₃₀ClF₄N₂O₃ [M+H]⁺ 517.1921, found 517.1903,

m.p. 111 °C;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3486, 3331, 3216, 2944, 2858, 2794, 1464, 1624, 1573, 1601, 1452, 1303, 1265, 1213, 1129, 1110.

(2-formylphenyl) N-ethyl-N-methyl-carbamate 60aChemical Formula: C₁₁H₁₃NO₃Molecular Weight: 207.23 g.mol⁻¹

Starting from 2-hydroxybenzaldehyde (900 μ L, 8.48 mmol, 1.0 equiv), and *N*-ethyl-*N*-methylcarbamoyl chloride (1.02 mL, 9.32 mmol, 1.1 equiv) following the **general procedure F**. The expected compound **60a** was obtained as a yellow oil (1.52 g, 86% yield).

Spectral and analytical data

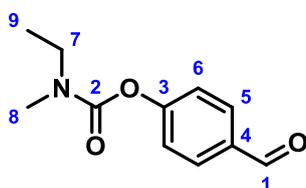
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.11 (s, 1H, H₁), 7.85 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₅), 7.75 – 7.67 (m, 1H, H₄), 7.42 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₇), 7.29 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₈), 3.43 (m, 2H, H₉), 3.03 (s, 3H, H₁₀), 1.20 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁);

¹³C NMR (DMSO, 101 MHz, 363K) δ 188.5, 152.8, 152.1, 134.6, 129.1, 128.2, 125.2, 123.1, 43.2, 38.9, 33.4;

MS *m/z* [M+H]⁺ 208.02;

HRMS/ESI *in progress*;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 2975, 1726, 1703, 1214, 1155, 756.

(4-formylphenyl) *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate 60bChemical Formula: C₁₁H₁₃NO₃Molecular Weight: 207.23 g.mol⁻¹

Starting from 4-hydroxybenzaldehyde (1.0 g, 8.19 mmol, 1.0 equiv), and *N*-ethyl-*N*-methylcarbamoyl chloride (986 μ L, 9.01 mmol, 1.1 equiv) following the **general procedure F**. The expected compound **60b** was obtained as a yellow oil (1.42 g, 84% yield).

Spectral and analytical data

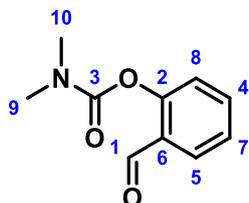
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.00 (s, 1H, H₁), 7.98 – 7.87 (m, 2H, H₅), 7.40 – 7.29 (m, 2H, H₆), 3.41 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₇), 3.00 (s, 3H, H₈), 1.18 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉);

¹³C NMR (DMSO, 101 MHz, 363K) δ 191.0, 155.8, 152.4, 132.9, 130.3 (2C), 121.6 (2C), 43.2, 33.3, 12.0;

MS m/z [M+H]⁺ 208.02;

HRMS/ESI m/z calcd. for C₁₁H₁₄NO₃ [M+H]⁺ 208.0974, found 208.0976;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 2977, 1718, 1696, 1214, 1157.

2-formylphenyl *N,N*-dimethylcarbamate 61aChemical Formula: C₁₀H₁₁NO₃Molecular Weight: 193.20 g.mol⁻¹

Starting from 2-hydroxybenzaldehyde (2.6 mL, 24.48 mmol, 1.0 equiv) and dimethylcarbamoyl chloride (3.38 mL, 36.73 mmol, 1.5 equiv) following the **general procedure F**. The compound **61a** expected was obtained as a brown oil (3.10 g, 66% yield).

Spectral and analytical data

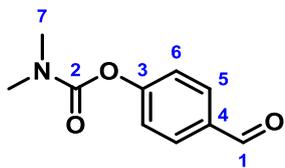
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.20 (s, 1H H₁), 7.87 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₅), 7.61 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₄), 7.34 (tt, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₇), 7.24 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₈), 3.17 (s, 3H, H₉), 3.04 (s, 3H, H₁₀);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 199.0, 154.3, 153.1, 135.3, 130.0, 128.6, 125.9, 123.8, 37.0, 36.7;

MS *m/z* [M+H]⁺ 194.00;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₂NO₃ [M+H]⁺ 194.0817, found 194.0819;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 2936, 1730, 1695, 1385, 1215, 1160, 759.

4-formylphenyl *N,N*-dimethylcarbamate 61bChemical Formula: C₁₀H₁₁NO₃Molecular Weight: 193.20 g.mol⁻¹

Starting from 4-hydroxybenzaldehyde (1.99 g, 16.37 mmol, 1.0 equiv) and dimethylcarbamoyl chloride (1.66 mL, 18.01 mmol, 1.1 equiv) following the **general procedure F**. The expected compound **61b** was obtained as a yellow oil (1.66 g, 52% yield).

Spectral and analytical data

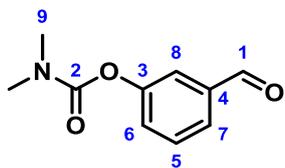
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.11 (s, 1H, H₁), 7.98 – 7.88 (m, 2H, H₅), 7.41 – 7.30 (m, 2H, H₆), 3.05 – 2.96 (m, 6H, H₇);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 191.0, 155.8, 152.8, 132.9, 130.3 (2C), 121.7(2C), 35.9 (2C).

MS *m/z* [M+H]⁺ 193.98;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₂NO₃ [M+H]⁺ 194.0817, found 194.0818;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3439, 2931, 2827, 2740, 1726, 1699, 1219, 1157, 861, 513.

3-formylphenyl *N,N*-dimethylcarbamate 61cChemical Formula: C₁₀H₁₁NO₃Molecular Weight: 193.20 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzaldehyde (3.0 g, 24.57 mmol, 1.0 equiv) and dimethylcarbamoyl chloride (2.49 mL, 27.02 mmol, 1.1 equiv) following the **general procedure F**. The expected compound **61c** was obtained as a brow oil (1.28 g, 27% yield).

Spectral and analytical data

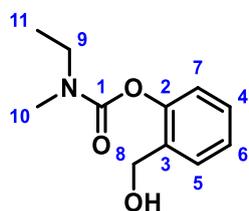
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.02 (s, 1H, H₁), 7.76 (dt, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₇), 7.65 (dd, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₈), 7.61 (t, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H, H₅), 7.47 (ddd, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₆), 3.02 (s, 6H, H₉);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 191.6, 153.2, 151.7, 137.2, 129.6, 127.2, 125.7, 121.4, 35.8;

MS *m/z* [M+H]⁺ 194.02;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₂NO₃ [M+H]⁺ 194.0817, found 194.0817;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3380, 2935, 17247, 1698, 1358, 1240, 1169, 788.

[2-(hydroxymethyl)phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 62aChemical Formula: C₁₁H₁₅NO₃Molecular Weight: 209.25 g.mol⁻¹

Starting from (2-formylphenyl) N-ethyl-N-methylcarbamate **60a** (1.01 g, 4.87 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **62a** was obtained as a yellow oil (0.95 g, 94% yield).

Spectral and analytical data

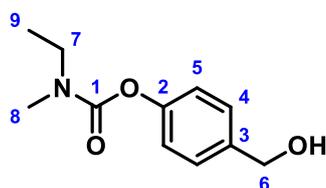
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.49 (dd, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H₅), 7.25 (td, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H₄), 7.20 (td, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, H₆), 7.05 (dd, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, H₇), 4.80 (t, ³J_{HH} = 5.2 Hz, 1H, H_{OH}), 4.47 (d, ³J_{HH} = 5.2 Hz, 2H, H₈), 3.40 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H₉), 2.98 (s, 3H, H₁₀), 1.18 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 3H, H₁₁).

¹³C NMR (DMSO, 101 MHz, 363K) δ 153.0, 148.2, 134.1, 127.3, 126.8, 124.5, 121.5, 57.6, 43.1, 33.3, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 192.01;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₁H₁₅NO₃Na [M+Na]⁺ 232.0950, found 232.0949;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3422, 2934, 1707, 1392, 1240, 1178.

[4-(hydroxymethyl)phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 62bChemical Formula: C₁₁H₁₅NO₃Molecular Weight: 209.25 g.mol⁻¹

Starting from (4-formylphenyl) N-ethyl-N-methyl-carbamate **60b** (942 mg, 4.55 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 70/30 to 50/50), and concentrated *in vacuo* to afford the product **62b**, as a yellow oil (756 mg, 79% isolated yield).

Spectral and analytical data

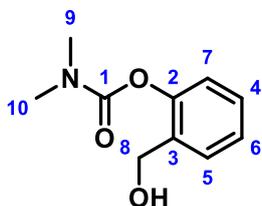
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.35 – 7.27 (m, 2H, H₅), 7.09 – 7.01 (m, 2H, H₄), 4.87 (br s, 1H, H_{OH}), 4.50 (s, 2H, H₆), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₇), 2.97 (s, 3H, H₈), 1.17 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉);

¹³C NMR (DMSO, 101 MHz, 363K) δ 153.3, 149.8, 138.8, 126.8 (2C), 120.7 (2C), 62.1, 43.0, 33.2, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 210.05;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₁H₁₆NO₃ [M+H]⁺ 210.1130, found 210.1132;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3425, 2921, 1716, 1703, 1400, 1210, 1170.

[2-(hydroxymethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 63aChemical Formula: C₁₀H₁₃NO₃Molecular Weight: 195.22 g.mol⁻¹

Starting from (2-formylphenyl) *N,N*-dimethylcarbamate **61a** (2.92 g, 15.09 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **63a** was obtained as an orange oil (2.25 g, 76% yield).

Spectral and analytical data

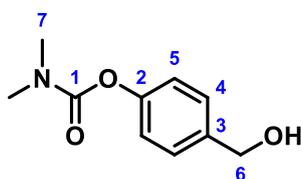
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.43 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₅), 7.29 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₄), 7.21 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₆), 7.05 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₇), 4.52 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H₈), 3.11 (s, 3H, H₁₀), 3.04 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H_{OH}), 2.99 (s, 3H, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 155.5, 149.2, 133.4, 133.0, 128.9, 126.1, 122.3, 60.3, 36.9, 36.6;

MS *m/z* [M+H]⁺ 196.00;

HRMS/ESI *in progress*;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3479, 3081, 2958, 2917, 1709, 1181, 754.

[4-(hydroxymethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 63bChemical Formula: C₁₀H₁₃NO₃Molecular Weight: 195.20 g.mol⁻¹

Starting from (4-formylphenyl) *N,N*-dimethylcarbamate **61b** (1.64 g, 8.50 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **63b** was obtained as a colorless oil (1.00 g, 60% yield).

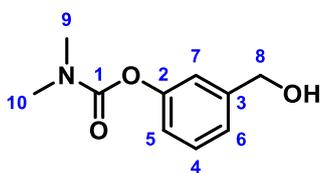
Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.34 – 7.27 (m, 2H, H₅), 7.09 – 7.00 (m, 2H, H₄), 4.88 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H_{OH}), 4.5 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H₆), 2.99 (s, 6H, H₇);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 153.7, 149.9, 138.8, 126.7 (2C), 120.7 (2C), 62.1, 35.8 (2C);

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₄NO₃ [M+H]⁺ 196.0974, found 196.0973;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3419, 2930, 2872, 2523, 1716, 1696, 1389, 1216, 1009, 527.

[3-(hydroxymethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 63cChemical Formula: C₁₀H₁₃NO₃Molecular Weight: 195.22 g.mol⁻¹

Starting from (3-formylphenyl) *N,N*-dimethylcarbamate **61c** (1.28 g, 6.61 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **63c** was obtained as a brown oil (1.00 g, 77% yield).

Spectral and analytical data

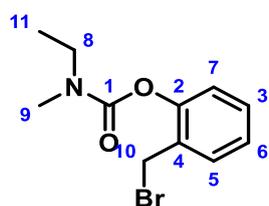
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.31 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.14 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₅), 7.04 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, H₇), 6.96 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₆), 5.27 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H_{OH}), 4.50 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H₇), 3.04 (s, 3H, H₉), 2.90 (s, 3H, H₁₀);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 151.1, 151.3, 144.2, 128.8, 122.9, 120.1, 119.7, 62.4, 36.3, 36.1.

MS *m/z* [M+H]⁺ 196.00;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₃NO₃Na [M+Na]⁺ 218.0793, found 218.0794;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3422, 3060, 2934, 1707, 1392, 1240, 1178.

[2-(bromomethyl)phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 64aChemical Formula: C₁₁H₁₄BrNO₂Molecular Weight: 272.14 g.mol⁻¹

Starting from [2-(hydroxymethyl)phenyl] N-ethyl-N-methylcarbamate **62a** (691 mg, 3.30 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **64a** was obtained as a yellow oil (813 mg, 91% yield).

Spectral and analytical data

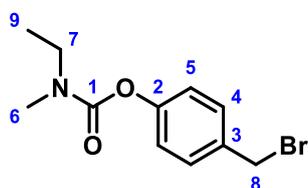
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.50 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₅), 7.36 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H₃), 7.20 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₆), 7.18 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₇), 4.58 (s, 2H, H₁₀), 3.44 (m, 2H, H₈), 3.03 (s, 3H, H₉), 1.21 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H₁₁);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 151.3, 149.4, 130.3, 129.4, 129.2, 124.8, 122.5, 43.2, 33.3, 28.2, 12.0;

MS *m/z* [M+H]⁺ 271.88 – 273.89;

HRMS/ESI *in progress*;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 2342, 2921, 1700, 1400, 1226, 752.

[4-(bromomethyl)phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 64bChemical Formula: C₁₁H₁₄BrNO₂Molecular Weight: 272.14 g.mol⁻¹

Starting from [4-(hydroxymethyl)phenyl] N-ethyl-N-methylcarbamate **62b** (699 mg, 3.34 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **64b** was obtained as a yellow oil (701 mg, 77% yield).

Spectral and analytical data

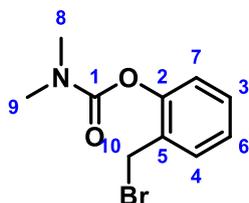
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.35 – 7.27 (m, 2H, H₅), 7.09 (dd, 2H, J = 8.6, 3.0 Hz, H₄), 4.49 (s, 2, H₈), 3.46 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₇, rota 1), 3.40 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₇, rota 2), 3.06 (s, 1.5H, H₆, rota 1), 2.99 (s, 1.5H, H₆, rota 2), 1.24 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉, rota 1), 1.19 (t, 1.5H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₉, rota 2);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 154.4 (rota 1), 154.3 (rota 2), 151.6, 134.6, 130.2 (2C), 122.2 (2C), 44.2, 34.4 (rota 1), 34.0 (rota 2), 33.1, 13.4 (rota 1), 12.6 (rota 2);

MS *m/z* [M+H]⁺ 271.88 – 273.88;

HRMS/ESI *in progress*;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3432, 2969, 1720, 1400, 1215, 1170, 599.

[2-(bromomethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 65aChemical Formula: C₁₀H₁₂BrNO₂Molecular Weight: 258.12 g.mol⁻¹

Starting from [2-(hydroxymethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate **63a** (1.73 g, 3.30 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure B**. The expected compound **65a** was obtained as an orange oil (1.30 g, 57% yield).

Spectral and analytical data

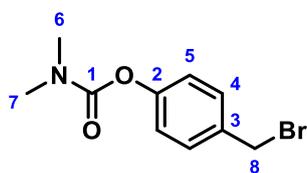
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.39 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₄), 7.33 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₃), 7.22 – 7.13 (m, 2H, H₆, H₇), 4.45 (s, 2H, H₁₀), 3.19 (s, 3H, H₉), 3.04 (s, 3H, H₈).

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 154.1, 149.8, 130.6, 129.9, 129.8, 125.7, 123.1, 36.9, 36.6, 28.2;

MS *m/z* [M+H]⁺ 257.88 – 259.91;

HRMS/ESI for C₁₀H₁₃BrNO₂ [M+H]⁺ 258.0130, found 258.0131;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 2934, 1725, 1387, 1227, 1163, 754.

4-(bromomethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 65bChemical Formula: C₁₀H₁₂BrNO₂Molecular Weight: 258.12 g.mol⁻¹

Starting from [4-(hydroxymethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate **63b** (989 mg, 5.07 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **65b** was obtained as a colorless oil (900 mg, 69% yield).

Spectral and analytical data

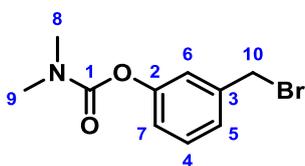
¹H NMR (MeOD, 400 MHz, 363K) δ 7.48 – 7.39 (m, 2H, H₅), 7.12 – 7.04 (m, 2H, H₄), 4.58 (s, 2H, H₈), 3.11 (s, 3H, H₇), 2.99 (s, 3H, H₆);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz, 363K) δ 156.5, 152.7, 137.0, 131.2 (2C), 123.2 (2C), 36.9, 36.7, 33.3;

MS *m/z* [M+H]⁺ 257.88 – 259.89;

HRMS/ESI *not determined*;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3420, 2932, 1719, 1389, 1217, 1171, 589.

[3-(bromomethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 65cChemical Formula: C₁₀H₁₂BrNO₂Molecular Weight: 258.12 g.mol⁻¹

Starting from [3-(hydroxymethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate **63c** (885 mg, 5.07 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure I**. The expected compound **65c** was obtained as an orange oil (600 mg, 46% yield).

Spectral and analytical data

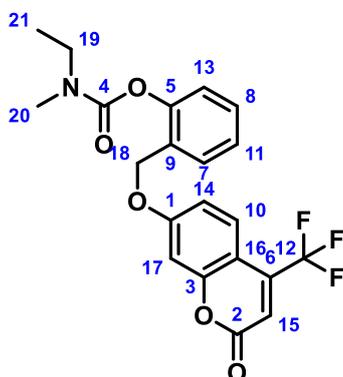
¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.35 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₄), 7.28 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, H₅), 7.18 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, H₆), 7.05 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H₇), 4.56 (s, 2H, H₁₀), 3.12 (s, 3H, H₈), 2.99 (s, 3H, H₉);

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 156.5, 152.9, 141.2, 130.6, 127.2, 123.6, 122.8, 36.9, 36.7, 33.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 257.88 – 259.89;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₃BrNO₂ [M+H]⁺ 258.0130, found 258.0131;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3436, 2925, 1721, 1389, 1248, 1167.

[2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 66aChemical Formula: C₂₁H₁₈F₃NO₅Molecular Weight: 421.37 g.mol⁻¹

Starting from [2-(bromomethyl)phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate **64a** (813 mg, 2.99 mmol, 1.0 equiv) and TFMU following the **general procedure C**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, 100:0 to 50:50) and concentrated *in vacuo* to afford the product **66a**, as a white powder (330 mg, 26% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.64 (dq, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁵J_{HF} = 2.0 Hz, H₁₀), 7.54 (dd, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H₇), 7.40 (td, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, H₈), 7.26 (td, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₁₁), 7.21 (dd, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₁₃), 7.16 (d, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₇), 7.10 (dd, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₄), 6.77 (s, 1H, H₁₅), 5.22 (s, 2H, H₁₈), 3.36 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H₁₉), 2.94 (s, 3H, H₂₀), 1.11 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₂₁).

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 161.8, 158.0, 155.4, 152.7, 149.5, 139.3 (d, ²J_{CF} = 32.0 Hz), 129.1, 128.9, 127.7, 125.4, 124.8, 122.4, 121.3 (q, ¹J_{CF} = 275.7 Hz), 113.3, 112.8 (d, ³J_{CF} = 6.2 Hz), 106.3, 102.3, 65.9, 43.1, 33.2, 12.0;

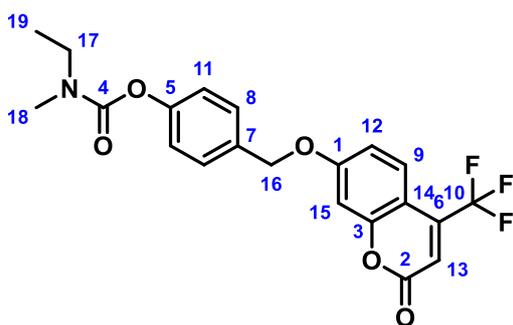
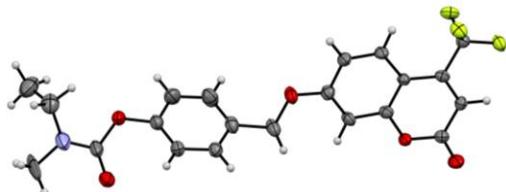
¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz, 363K) δ -63.6 (d, J = 18.0 Hz)

MS *m/z* [M+H]⁺ 421.81;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₁H₁₈F₃NO₅Na [M+Na]⁺ 444.1035, found 444.1034;

M.p. 107.4 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3450, 2924, 1750, 1723, 1612, 1278, 1129, 754, 651.

[4-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate **66b**Chemical Formula: C₂₁H₁₈F₃NO₅Molecular Weight: 421.30 g.mol⁻¹

Starting from [4-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate **64b** (645 mg, 2.37 mmol, 1.0 equiv) and TFMU, following the **general procedure C**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, 100:0 to 50:50) and concentrated *in vacuo* to afford the product **66b**, as a white powder (120 mg, 13% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.63 (dq, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁵J_{HF} = 2.0 Hz, 1H, H₉), 7.53 – 7.44 (m, 2H, H₉), 7.20 – 7.13 (m, 4H, H₁₅, H₁₁, H₁₂), 6.77 (s, 1H, H₁₃), 5.27 (s, 2H, H₁₆), 3.39 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H₁₇), 2.97 (s, 3H, H₁₈), 1.17 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₁₉).

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 161.8, 158.0, 155.5, 153.1, 151.0, 139.5, 132.3, 128.3 (2C), 125.4, 122.7, 121.2 (2C), 113.5, 112.7, 106.3, 102.5, 69.4, 43.1, 33.3, 12.1;

¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz, 363K) δ -63.5 (d, *J* = 17.0 Hz)

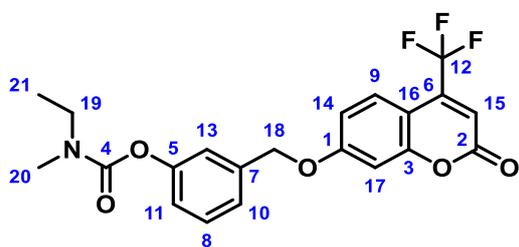
MS *m/z* [M+H]⁺ 421.78;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₁H₁₉F₃NO₅ [M+H]⁺ 422.1215, found 422.1219;

M.p. 109.1 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3439, 3087, 1737, 1713, 1611, 1193;

RX (ORTEP) Crystal size: 0.52×0.24×0.20mm. Formula C₂₁H₁₈F₃NO₅, molecular weight 421.36, crystal system triclinic, space group *P1*, *a* = 4.6615(3) Å, *b* = 10.9066(8) Å, *c* = 19.3362(15) Å, α = 94.243(3)°, β = 90.798(3)°, γ = 100.841(3)°, *V* = 962.49(12) Å³, *Z* = 2, calculated density = 1.454 g/cm³, μ = 0.122 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.028, *R*[*F*²>2*s*(*F*²)] = 0.069, *wR*(*F*²) = 0.194, *S* = 1.02.

[3-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate 67Chemical Formula: C₂₁H₁₈F₃NO₅Molecular Weight: 421.37 g.mol⁻¹

Starting from [3-(bromomethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate **44** (177 mg, 0.65 mmol, 1.0 equiv) and TFMU, following the **general procedure C**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, 100:0 to 30:100) and concentrated *in vacuo* to afford the product **67**, as a colorless oil (150 mg, 60% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.63 (dq, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁵J_{HF} = 2.0 Hz, 1H, H₉), 7.39 (t, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H, H₈), 7.24 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H, H₁₀), 7.25 – 7.19 (m, 1H, H₁₃), 7.11 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.99 (dd, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₄), 6.93 (d, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₇), 6.62 (s, 1H, H₁₅), 5.14 (s, 2H, H₁₈), 3.48 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1H, H₁₉, rota 1), 3.41 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1H, H₁₉, rota 2), 3.08 (s, 1.5H, H₂₀, rota 1), 3.00 (s, 1.5H, H₂₀, rota 2), 1.25 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1.5H, H₂₁, rota 1), 1.20 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 1.5H, H₂₁, rota 2).

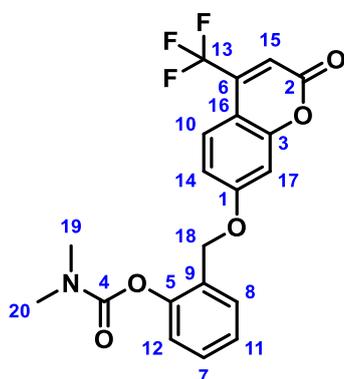
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 162.5, 159.5, 156.4, 154.5 (rota 1), 154.4 (rota 2), 152.0, 141.7 (q, ²J_{CF} = 32.9 Hz), 136.9 (rota 1), 136.9 (rota 2), 129.8, 126.6 (d, ⁴J_{CF} = 2.3 Hz), 124.2 (rota 1), 124.1 (rota 2), 122.0, 121.7 (q, ¹J_{CF} = 275.6 Hz), 121.0, 114.1, 112.5 (q, ³J_{CF} = 5.8 Hz), 107.4, 102.6, 70.2, 44.3 (rota 1), 44.2 (rota 2), 34.4 (rota 1), 34.0 (rota 2), 13.4 (rota 1), 12.6 (rota 2);

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -64.0

MS *m/z* [M+H]⁺ 421.81;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₁H₁₉F₃NO₅ [M+H]⁺ 422.1215, found 422.1218;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3446, 1719, 1612, 1405, 1276, 1162, 1136, 745.

[4-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 68aChemical Formula: C₂₀H₁₆F₃NO₅Molecular Weight: 407.35 g.mol⁻¹

Starting from [2-(bromomethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate **65a** (611 mg, 1.97 mmol, 1.0 equiv) and TFMU, following the **general procedure C**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, 70:30 to 50:50) and concentrated *in vacuo* to afford the product **68a**, as a white powder (395 mg, 49% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.63 (dq, ³J_{HH} = 8.9, ⁵J_{HF} = 1.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (dd, ³J_{HH} = 7.8, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, H₈), 7.38 (td, ³J_{HH} = 7.8, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, H₇), 7.17 (td, J = 7.8, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, H₁₁), 7.19 (dd, ³J_{HH} = 7.8, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.98 (dd, ³J_{HH} = 8.9, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₄), 6.95 (d, ³J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₇), 6.62 (d, ³J_{HF} = 0.9 Hz, 1H, H₁₅), 5.15 (s, 2H, H₁₈), 3.08 (s, 3H, H₂₀), 3.02 (s, 3H, H₁₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 162.6, 159.5, 156.4, 154.4, 149.5, 141.7 (d, ²J_{CF} = 32.8 Hz), 129.8, 129.1, 128.0, 126.6 (d, ⁴J_{CF} = 2.3 Hz), 126.0, 123.1, 121.7 (d, ¹J_{CF} = 275.6 Hz), 114.0, 112.5 (q, ³J_{CF} = 5.7 Hz), 107.4, 102.5, 66.3, 37.0, 36.6;

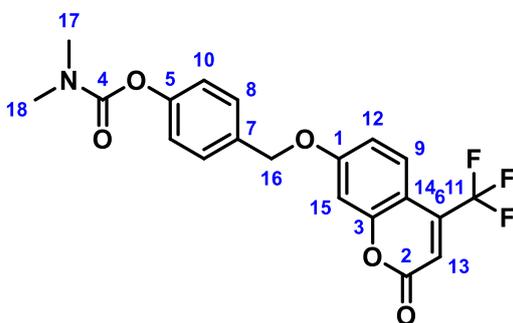
¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -64.7 (d, J = 1.8 Hz)

MS *m/z* [M+H]⁺ 407.77;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₀H₁₇FNO₅ [M+H]⁺ 408.1059, found 408.1064;

M.p. 117.3 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3422, 1707, 1484, 1392, 1240, 1178.

[4-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 68bChemical Formula: C₂₀H₁₆F₃NO₅Molecular Weight: 407.35 g.mol⁻¹

Starting from [4-(bromomethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate **65b** (642 mg, 2.48 mmol, 1.0 equiv) and TFMU, following the **General procedure C**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, 100:0 to 50:50) and concentrated *in vacuo* to afford the product **68b**, as a white powder (576 mg, 57% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.63 (dt, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁵J_{HF} = 2.1 Hz, 1H, H₉), 7.53 – 7.45 (m, 2H, H₈), 7.26 (d, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, 1H, H₁₅), 7.18 – 7.10 (m, 3H, H₁₀, H₁₂), 6.87 (s, 1H, H₁₃), 5.26 (s, 2H, H₁₆), 3.04 (s, 3H, H₁₈), 2.90 (s, 3H, H₁₇);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 162.0, 158.7, 155.8, 153.9, 151.2, 138.2, 132.8, 129.1 (2C), 125.9, 122.1 (2C), 118.8, 114.0, 113.4, 106.6, 102.6, 69., 36.3, 36.1;

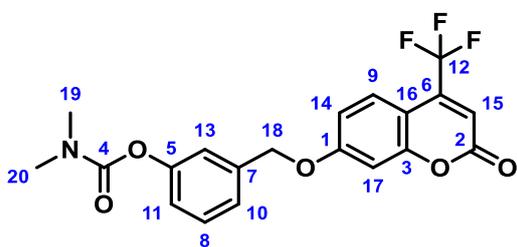
¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz, 363K) δ -63.6;

MS *m/z* [M+H]⁺ 407.81;

HRMS/ESI for C₂₀H₁₇F₃NO₅ [M+H]⁺ 408.1059, found 408.1060;

M.p. 140.1 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3436, 3087, 2942, 1747, 1717, 1616, 1277, 1150, 871.

[3-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate 68cChemical Formula: C₂₀H₁₆F₃NO₅Molecular Weight: 407.35 g.mol⁻¹

Starting from [3-(bromomethyl)phenyl] *N,N*-dimethylcarbamate **65c** (572 mg, 2.22 mmol, 1.0 equiv) and TFMU, following the **general procedure C**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, 100:0 to 30:100) and concentrated *in vacuo* to afford the product **68c**, as a colorless oil (502 mg, 67% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.63 (dq, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁵J_{HF} = 2.0 Hz, 1H, H₉), 7.39 (t, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H, H₈), 7.28 – 7.21 (m, 1H, H₁₀), 7.22 (t, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H₁₃), 7.11 (ddd, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, H₁₁), 6.99 (dd, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H₁₄), 6.93 (d, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₇), 6.63 (s, 1H, H₁₅), 5.15 (s, 2H, H₁₈), 3.11 (s, 3H, H₂₀), 3.02 (s, 3H, H₁₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 162.5, 159.5, 156.4, 154.8, 152.0, 141.5, 136.9, 129.8, 126.6 (d, ⁴J_{CF} = 2.0 Hz), 124.2, 122.0, 121.6, 120.9, 114.1, 112.6, 107.4, 102.6, 70.2, 36.9, 36.6;

¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -64.7;

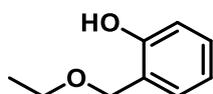
MS *m/z* [M+H]⁺ 407.77;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₀H₁₇F₃NO₅ [M+H]⁺ 408.1059, found 408.1061;

M.p. 116.2 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3427, 2924, 1744, 1721, 1611, 1279, 120, 1131, 870.

2-(ethoxymethyl)phenol 69



Chemical Formula: C₉H₁₂O₂

Molecular Weight: 152.19 g.mol⁻¹

Spectral and analytical data

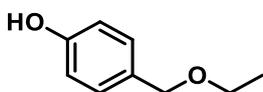
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.21 (td, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, 1H), 7.01 (dd, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, 1H), 6.89 (dd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 1H), 6.34 (td, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.61 (q, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 2H), 1.29 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 156.5, 129.5, 128.1, 122.4, 119.9, 116.6, 72.4, 66.4, 15.2;

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁶

³¹⁶ Herzig, Y.; Lerman, L.; Goldenberg, W.; Lerner, D.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (11), 4130–4140.

4-(ethoxymethyl)phenol 70



Chemical Formula: C₉H₁₂O₂

Molecular Weight: 152.19 g.mol⁻¹

Spectral and analytical data

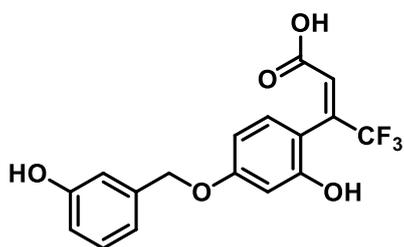
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.24 – 7.19 (m, 2H), 6.81 – 6.77 (m, 2H), 4.43 (m, 2H), 3.52 (q, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 2H), 1.23 (t, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 156.5, 129.5, 128.1, 122.4, 119.9, 116.6, 72.4, 66.4, 15.2.

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁷

³¹⁷ Pearce, V.; Nawaz, Z.; Xiao, W.; Wiedenfeld, D.; Boyle, N.; Smith, D. J. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *84* (4), 431–439.

4,4,4-trifluoro-3-[2-hydroxy-4-[(3-hydroxyphenyl)methoxy]phenyl]but-2-enoic acid 71



Chemical Formula: C₁₇H₁₃F₃O₅

Molecular Weight: 354.28 g.mol⁻¹

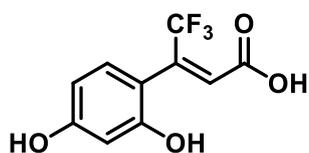
Spectral and analytical data

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 7.21 (t, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H), 6.98 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H), 6.80 – 6.77 (m, 2H), 6.74 (q, ⁴J_{HF} = 1.5 Hz, 1H), 6.71 – 6.67 (m, 1H), 6.38 – 6.33 (m, 2H), 4.97 (s, 2H)

¹⁹F NMR (D₂O, 376.1 MHz) δ -65.8;

MS *m/z* [M-H]⁻ 352.74.

3-(2,4-dihydroxyphenyl)-4,4,4-trifluorobut-2-enoic acid 72



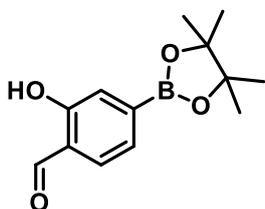
Chemical Formula: C₁₀H₇F₃O₄

Molecular Weight: 248.16 g.mol⁻¹

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.61 (qd, ³J_{HH} = 8.9 Hz, ⁵J_{HF} = 1.9 Hz, 1H), 6.93 (d, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, 1H), 6.89 (ddd, ³J_{HH} = 8.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H);

MS m/z [M-H]⁻ 246.87.

2-hydroxy-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzaldehyde 73Chemical Formula: C₁₃H₁₇BO₄Molecular Weight: 248.08 g.mol⁻¹

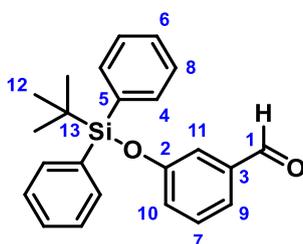
To a solution of 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyde (709 mg, 3.53 mmol, 1.0 equiv) in dioxane (35 mL) were added bis(pinacolato)diboron (Bpin)₂ (896 mg, 3.53 mmol, 1.0 equiv), [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II) dichloride Pd(dppf)Cl₂ (77 mg, 0.11 mmol, 3% mol) and potassium acetate (1.04 g, 10.58 mmol, 3.0 equiv) and was stirred 5 h at 80 °C under N₂. After cooling to rt, the solvent was evaporated to dryness *in vacuo*. The residue was dissolved in *n*-hexane, the solution was washed with brine, and dried over MgSO₄ and filtered. The solvent removed *in vacuo* to obtain compound **73** as a brown powder (698 mg, 80% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.83 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 7.57 – 7.53 (m, 1H), 7.43 – 7.40 (m, 2H), 1.35 (s, 12H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 197.0, 160.7, 132.8, 125.5, 124.0, 122.1, 84.6, 25.0 (6C);

* Spectral and analytical data matched with literature²⁵⁶

3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxybenzaldehyde **74**Chemical Formula: C₂₃H₂₄O₂SiMolecular Weight: 360.53 g.mol⁻¹

To a solution of 3-hydroxybenzaldehyde (3.0 g, 24.57 mmol, 1.0 equiv) in DCM (20 mL) was added *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (7.03 mL, 27.02 mmol, 1.1 equiv) and Et₃N (3.97 mL, 28.50 mmol, 1.16 equiv) and the reaction mixture was stirred at rt for 15 h, then concentrated *in vacuo*. EtOAc was added, the organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Evaporation of the filtrate *in vacuo* provided 8.88 g (quantitative yield) of compound **74** as a colorless oil.

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.82 (s, 1H, H₂), 7.75-7.70 (m, 4H, H₄), 7.48-7.42 (m, 2H, H₆), 7.42-7.36 (m, 5H, H₈, H₁₀), 7.31 (ddd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₁₁), 7.22 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H₇), 6.97 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H₉), 1.14 (s, 9H, H₁₂);

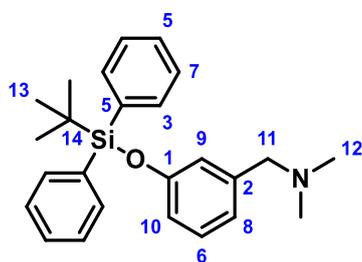
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 192.2, 156.4, 137.8, 135.6 (4C), 132.3 (2C), 130.3 (2C), 129.9, 128.0 (4C), 126.1, 122.9, 120.4, 26.6 (3C), 19.6;

MS *m/z* no found;

²⁹Si NMR (CDCl₃, 99.4 MHz) δ -4.6;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3419, 2928, 2855, 1702, 1583, 1481, 1276, 1113, 832, 700, 500.

1-[3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxyphenyl]-*N,N*-dimethylmethanamine 75Chemical Formula: C₂₅H₃₁NOSiMolecular Weight: 389.61 g.mol⁻¹

Starting from 3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxybenzaldehyde **74** (1.53 g, 4.23 mmol, 1.0 equiv), following the **general procedure L**. The expected compound **75** was isolated as a yellowish yellow oil (1.53 g, 93% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.74-7.70 (m, 4H, H₃), 7.44-7.39 (m, 2H, H₅), 7.38-7.33 (m, 4H, H₇), 7.01 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₆), 6.81 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₈), 6.75 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₉), 6.62 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₁₀), 3.25 (s, 2H, H₁₁), 2.11 (s, 6H, H₁₂), 1.10 (s, 9H, H₁₃);

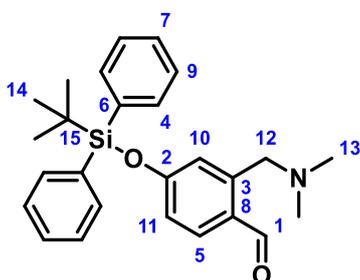
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 155.6, 140.2, 135.7 (4C), 133.1 (2C), 129.9 (2C), 129.0, 128.7 (4C), 122.1, 120.9, 118.41, 64.2, 45.3, 26.7 (2C), 19.6 (3C);

²⁹Si NMR (CDCl₃, 99.4 MHz) δ -6.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 390.63;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₅H₃₂NOSi [M+H]⁺ 390.2247, found 390.2253;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3071, 2934, 2858, 2814, 2772, 1586, 1485, 1428, 1277, 1114, 1002, 989, 834, 701, 612, 502.

4-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy-2-[(dimethylamino)methyl]benzaldehyde **76**Chemical Formula: C₂₆H₃₁NO₂SiMolecular Weight: 417.62 g.mol⁻¹

To a solution of 1-[3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxyphenyl]-*N,N*-dimethylmethanamine **75** (2.22 g, 5.57 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (22 mL) was added dropwise *tert*-BuLi (9.51 mL, 17.12 mmol, 3.0 equiv) at rt and the reaction mixture was stirred for 30 min. DMF (0.88 mL, 11.41 mmol, 2.0 equiv) was added the reaction mixture was stirred for 30 min, and quenched with water. EtOAc was added, the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:20) and concentrated *in vacuo* to afford the product **76**, as a colorless oil (1.07 g, 45% isolated yield).

Spectral and analytical data

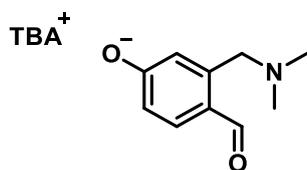
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.17 (s, 1H, H₁), 7.71-7.67 (m, 4H, H₄), 7.65 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, H₅), 7.46-7.41 (m, 2H, H₇), 7.40-7.34 (m, 4H, H₉), 6.74 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, H₁₁), 6.73 (s, 1H, H₁₀), 3.52 (s, 2H, H₁₂), 2.08 (s, 6H, H₁₃), 1.11 (s, 9H, H₁₄);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 191.1, 160.2, 144.0, 135.5 (4C), 132.5, 132.2 (2C), 130.3 (2C), 128.7, 128.1 (4C), 122.0, 119.0, 60.9, 45.3 (2C), 26.5 (3C), 19.6;

MS *m/z* [M+H]⁺ 418.61;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₆H₃₂NOSi [M+H]⁺ 418.2202, found 418.2203;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3447, 1639, 1577, 1428, 1278, 1113, 701, 504.

Tetra-*n*-butylammonium 3-[(dimethylamino)methyl]-4-formylbenzen-1-olate 77Chemical Formula: C₂₆H₄₈N₂O₂Molecular Weight: 420.68 g.mol⁻¹

To a solution of 4-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy-2-[(dimethylamino)methyl]benzaldehyde **75** (1.88 g, 4.51 mmol, 1.0 equiv) in THF (30 mL) was added tetra-*n*-butylammonium fluoride TBAF (5.41 mL, 5.41 mmol, 1.0 equiv) at rt and the reaction mixture was stirred for 2 h. The reaction concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH (+NH₄OH 0.5%), gradient 100:0 to 90:10) and concentrated *in vacuo* to afford the product **77**, as a colorless oil (670 mg, 50% isolated yield).

Spectral and analytical data

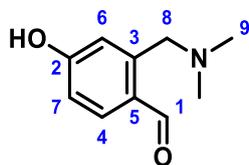
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.01 (s, 1H), 7.62 – 7.58 (m, 1H), 6.77 – 6.73 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.19 – 3.12 (m, 8H), 2.14 (s, 6H), 1.58 – 1.47 (m, 8H), 1.32 (sx, 8H, ³J_{HH} = 7.3 Hz), 0.90 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ not determined;

MS *m/z* [M+H]⁺ 180.45;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} not determined.

2-[(dimethylamino)methyl]-4-hydroxybenzaldehyde **78**Chemical Formula: C₁₀H₁₃NO₂Molecular Weight: 179.22 g.mol⁻¹

To a solution of 1-[3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxyphenyl]-*N,N*-dimethylmethanamine **75** (1.16 g, 2.99 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (11 mL) was added dropwise *tert*-BuLi (5.64 mL, 8.96 mmol, 3.0 equiv) at rt and the reaction mixture was stirred for 30 min. DMF (0.46 mL, 5.98 mmol, 2.0 equiv) was added the reaction mixture was stirred for 30 min, and quenched with water. EtOAc was added, the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH (+NH₄OH 0.5%), gradient 100:0 to 90:10) and concentrated *in vacuo* to afford the product **78**, as a colorless oil (370 mg, 35% isolated yield).

Spectral and analytical data

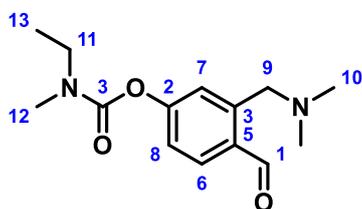
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.92 (s, 1H, H₁), 7.64 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H₄), 6.79 (m, 2H, H₆, H₇), 3.93 (s, 2H, H₈), 2.52 (s, 6H, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 191.4, 166.3, 140.4, 136.6, 125.3, 120.3, 116.8, 60.0, 44.5 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ 180.45;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₄NO₂ [M+H]⁺ 180.1025, found 180.1026;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 2821, 1673, 1578, 1468, 1311, 1271, 1214, 1101, 840, 628.

[3-[(dimethylamino)methyl]-4-formylphenyl] N-ethyl-N-methylcarbamate 79Chemical Formula: C₁₄H₂₀N₂O₃Molecular Weight: 264.33 g.mol⁻¹

Starting from 2-[(dimethylamino)methyl]-4-hydroxybenzaldehyde **78** (305 mg, 1.70 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (205 μ L, 1.87 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure F**. The expected compound **79** was isolated as a brown oil (414 mg, 92% yield).

Spectral and analytical data

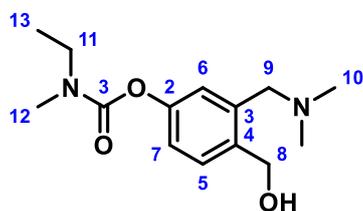
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.30 (s, 3H, H₁), 7.82 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, H₆), 7.24 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₇), 7.21 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₈), 3.77 (s, 2H, H₉), 3.40 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁), 2.99 (s, 3H, H₁₂), 2.20 (s, 6H, H₁₀), 1.18 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₃);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 190.5, 154.7, 152.4, 143.1, 131.3, 129.9, 122.6, 120.0, 59.1, 44.2 (2C), 43.2, 33.3, 12.0;

MS m/z [M+H]⁺ 265.53;

HRMS/ESI m/z calcd. for C₁₄H₂₁N₂O₃ [M+H]⁺ 265.1552, found 265.1553;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 2941, 2770, 1726, 1399, 1234, 1161.

[3-[(dimethylamino)methyl]-4-(hydroxymethyl)phenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **90**Chemical Formula: C₁₄H₂₂N₂O₃Molecular Weight: 266.34 g.mol⁻¹

Starting from [3-[(dimethylamino)methyl]-4-formylphenyl] *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **79** (962 mg, 3.64 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (413 mg, 10.92 mmol, 3.0 equiv) at rt for 15 min. following the **general procedure I**. The expected compound **80** was obtained as a yellow oil (836 mg, 86% yield).

Spectral and analytical data

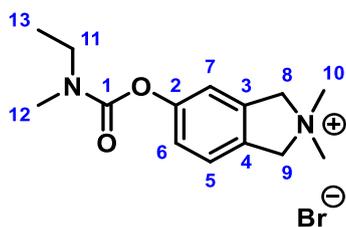
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.36 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H₅), 7.04 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, H₆), 6.99 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, H₇), 5.26 (br s, 1H, H_{OH}), 4.55 (s, 2H, H₈), 3.44 (s, 2H, H₉), 3.39 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₁), 2.97 (s, 3H, H₁₂), 2.18 (s, 6H, H₁₀), 1.17 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₃);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 153.3, 149.8, 137.6, 137.5, 128.3, 122.3, 119.5, 60.7, 60.4, 44.2 (2C), 43.0, 33.2, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 267.54;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₄H₂₃N₂O₃ [M+H]⁺ 267.1709, found 267.1707;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3426, 2941, 2826, 1721, 1467, 1398, 1242, 1165, 1019.

(2,2-dimethylisoindolin-2-ium-5-yl) *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate bromide **81**Chemical Formula: C₁₄H₂₁BrN₂O₂Molecular Weight: 329.24 g.mol⁻¹

To a solution of 3-[(dimethylamino)methyl]-4-(hydroxymethyl)phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **80** (76 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O, was added PBr₃ (54 mg, 0.20 mmol, 0.7 equiv) in an ice bath. The solution was stirred during 30 min at 0 °C and concentrated *in vacuo*. After was added K₂CO₃ (79 mg, 0.57 mmol, 2.0 equiv) in DMF, and was stirred during 30 min at rt. Then the solution was filtered, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to obtain a compound **81** as a white powder (41 mg, 81% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.45 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, H₅), 7.26 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H₇), 7.17 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H₆), 4.90 (s, 2H, H₈), 4.88 (s, 2H, H₉), 3.39 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₁₁), 3.35 (s, 6H, H₁₀), 2.98 (s, 3H, H₁₂), 1.17 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₁₃);

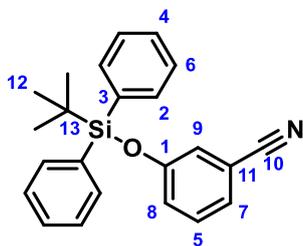
¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 152.9, 151.5, 134.4, 129.6, 123.7, 121.7, 116.7, 69.5, 69.4, 51.9 (2C), 43.1, 33.3, 12.1;

MS [M+H-Br]⁺ 249.62;

HRMS/ESI for C₁₄H₂₁N₂O₂ [M-Br]⁺ 249.1603, found 249.1603;

M.p. not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3424, 1716, 1401, 1166, 1087.

3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxybenzonitrile **82**

Chemical Formula: C₂₃H₂₃NOSi
Molecular Weight: 357.53 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzonitrile (1.00 g, 8.39 mmol, 1.0 equiv) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (2.36 mL, 9.23 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure H**. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 90:10) and concentrated *in vacuo*. The expected compound **82** was obtained as a colorless oil (1.40 g, 47% isolated yield).

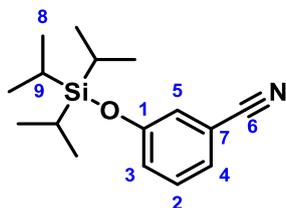
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.70-7.65 (m, 4H, H₂), 7.49-7.43 (m, 2H, H₄), 7.41-7.36 (m, 4H, H₆), 7.16-7.13 (m, 2H, H₅, H₇), 7.05-7.03 (m, 1H, H₉), 6.96-6.90 (m, 1H, H₈), 1.11 (s, 9H, H₁₂);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 156.0, 135.5 (4C), 131.9 (2C), 130.4 (2C), 130.3, 128.1 (4C), 125.1, 124.8, 123.3, 118.7, 113.1, 26.5 (3C), 19.6;

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁸

³¹⁸ Wübbolt, S.; Oestreich, M. *Synlett* **2017**, 28 (18), 2411–2414.

3-triisopropylsilyloxybenzonitrile 83Chemical Formula: C₁₆H₂₅NOSiMolecular Weight: 275.47 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzonitrile (500 mg, 4.20 mmol, 1.0 equiv) and triisopropylsilyl chloride (1.54 mL, 5.04 mmol, 1.2 equiv), following the **general procedure H**. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 90:10) and concentrated *in vacuo*. The expected compound **83** was obtained as a colorless oil (1.49 g, 63% isolated yield).

Spectral and analytical data

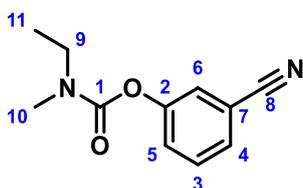
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.31 (td, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁵J_{HH} = 0.6 Hz, 1H, H₂), 7.22 (dt, ³J_{HH} = 7.9, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₄), 7.12 (ddd, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, ⁵J_{HH} = 0.6 Hz, 1H, H₅), 7.10 (ddd, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₃), 1.32–1.19 (m, 3H, H₆), 1.09 (d, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 18H, H₆);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 156.5, 130.5, 125.0, 124.9, 123.3, 118.9, 113.2, 17.9 (6C), 12.7 (3C);

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI no found;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3070, 2946, 2868, 2229, 1596, 1480, 1288, 683.

(3-cyanophenyl) N-ethyl-N-methyl-carbamate 84Chemical Formula: C₁₁H₁₂N₂O₂Molecular Weight: 204.23 g.mol⁻¹

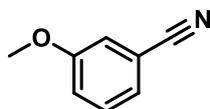
Starting from 3-hydroxybenzonitrile (500 mg, 4.20 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (506 μ L, 4.62 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure F**. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 60:40 to 50:50) and the expected compound **84** was isolated as a yellowish oil (591 mg, 69% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.64 (dt, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 1H, H₄), 7.62 (t, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 1H, H₆), 7.58 (t, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H, H₃), 7.49 (ddd, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₅), 3.40 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H₉), 2.99 (s, 3H, H₁₀), 1.18 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₁₁);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 191.6, 152.8, 151.6, 137.2, 129.6, 127.2, 125.6, 121.4, 43.2, 33.3, 12.0;

* Spectral and analytical data matched with literature.¹⁹⁷

3-methoxybenzonitrile 85Chemical Formula: C₈H₇NOMolecular Weight: 133.15 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxybenzonitrile (2.00 g, 16.79 mmol, 1.0 equiv) and iodomethane (1.57 mL, 25.18 mmol, 1.5 equiv) in DMF (50 mL), following the **general procedure M**, during 2 h at rt. The expected compound **85** was obtained as a colourless oil (1.96 g, 88% yield).

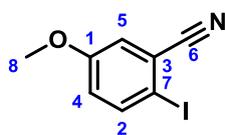
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.40-7.30 (m, 1H, H₄), 7.21 (dt, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, H₄), 7.15-7.07 (m, 2H, H₄), 3.81 (s, 3H, H₂)

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 159.6, 130.4, 124.5, 119.3, 118.8, 116.9, 113.1, 55.5;

* Spectral and analytical data matched with literature.³¹⁹

³¹⁹ Zhan, W.; Tong, M.; Ji, L.; Zhang, H.; Ge, Z.; Wang, X.; Li, R. *Chinese Chem. Lett.* **2019**, *30* (5), 973–976.

2-iodo-5-methoxybenzonitrile 86Chemical Formula: C₈H₆INOMolecular Weight: 259.05 g.mol⁻¹

Starting from 3-methoxybenzonitrile **85** (525 mg, 3.94 mmol, 1.0 equiv), palladium(II) acetate (89 mg, 0.39 mmol, 10 mol%), APTS (375 mg, 1.97 mmol, 0.5 equiv) and *N*-iodosuccinimide (887 mg, 3.94 mmol, 1.0 equiv) in DCE (24 mL) following the **general procedure N**, at 70 °C during 3 h. The expected compound **86** was isolated as a white powder (672 mg, 66% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.75 (d, ³J_{HH} = 8.9 Hz, 1H, H₂), 7.13 (d, ⁴J_{HH} = 3.0 Hz, 1H, H₅), 6.86 (dd, ³J_{HH} = 8.9, ⁴J_{HH} = 3.0 Hz, 1H, H₄), 3.82 (s, 3H, H₈);

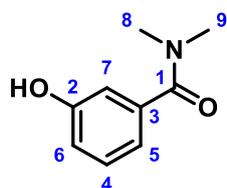
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 159.6, 140.4, 121.25, 121.13, 119.4, 119.3, 86.5, 55.9;

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI no found;

M.p. 87.4 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3348, 2227, 1591, 1562, 1464, 1275.

3-hydroxy-*N,N*-dimethyl-benzamide 87Chemical Formula: C₉H₁₁NO₂Molecular Weight: 165.19 g.mol⁻¹

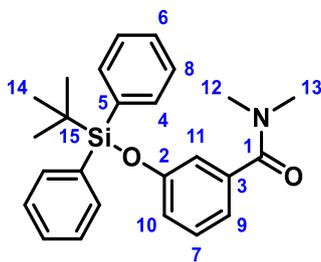
To a solution of 3-hydroxybenzoic acid (3.00 g, 21.72 mmol, 1.0 equiv) in DMF (50 mL), was added dropwise, in an ice bath, thionyl chloride (3.15 mL, 43.44 mmol, 2.0 equiv). After stirring at 150 °C during 1 night, we made 3 extractions with EtOAc and 3 washings with brine the mixture was then diluted with water and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc and the organic layer was washed three times by brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The compound **87** was obtained as a brown powder (3.40 g, 95% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 7.21 (t, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H, H₄), 6.81 (ddd, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, H₆), 6.77 (dt, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, H₅), 6.73 (dd, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, H₇), 2.95 (s, 3H, H₉), 2.88 (s, 3H, H₈);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz) δ 170.0, 157.1, 137.8, 129.4, 117.3, 116.1, 113.6, 38.9, 34.6;

* Spectral and analytical data matched with literature.³⁰²

3-[*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy-*N,N*-dimethyl-benzamide **88**Chemical Formula: C₂₅H₂₈NO₂SiMolecular Weight: 403.60 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxy-*N,N*-dimethyl-benzamide **87** *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (3.0 mL, 11.72 mmol, 1.1 eq.) following the **general procedure H**. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo*. The expected compound **88** was obtained as a brown oil (2.19 g, 53% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.74–7.69 (m, 4H, H₄), 7.44–7.38 (m, 2H, H₆), 7.38–7.33 (m, 4H, H₈), 7.13 (t, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H, H₇), 6.93 (dt, ³J_{HH} = 7.9, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₉), 6.83 (ddd, ³J_{HH} = 7.9, ⁴J_{HH} = 2.5, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₁₀), 6.72 (dd, J = 2.5, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, H₁₁), 2.97 (s, 3H, H₁₃), 2.60 (s, 3H, H₁₂), 1.10 (s, 9H, H₁₄).

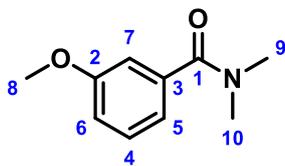
¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 171.2, 155.3, 137.4, 135.6 (4C), 132.5 (2C), 130.1 (2C), 129.6, 127.9 (4C), 121.0, 120.0, 118.3, 39.2, 35.3, 26.5 (3C), 19.5;

²⁹Si NMR (CDCl₃, 99.4 MHz) δ *in progress*;

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₅H₃₀NO₂Si [M+H]⁺ 405.4246, found 404.2059;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3447, 2930, 286, 1639, 1577, 1428, 1278, 701.

3-methoxy-*N,N*-dimethyl-benzamide 89Chemical Formula: C₁₀H₁₃NO₂Molecular Weight: 179.22 g.mol⁻¹

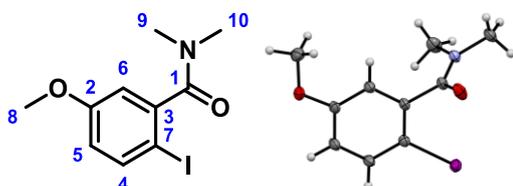
Starting from 3-hydroxy-*N,N*-dimethyl-benzamide **88** (2.39 g, 14.48 mmol, 1.0 equiv) and iodomethane (1.35 mL, 21.72 mmol, 1.5 equiv), following the **general procedure M**, during 1 h at rt. The expected compound **89** was obtained as an orange oil (1.69 g, 65% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.30 (td, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, H₄), 6.98 – 6.91 (m, 3H, H₅, H₇, H₆), 3.82 (s, 3H, H₈), 3.31 (s, 3H, H₁₀), 2.97 (s, 3H, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 171.5, 159.6, 137.8, 129.6, 119.3, 115.6, 112.5, 55.5, 39.7, 35.5;

* Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁸

2-iodo-5-methoxy-*N,N*-dimethylbenzamide 90Chemical Formula: C₁₀H₁₁INO₂Molecular Weight: 305.12 g·mol⁻¹

Starting from 3-methoxy-*N,N*-dimethyl-benzamide **89** (4.01 g, 22.38 mmol, 1.0 equiv), palladium(II) acetate (502 mg, 2.24 mmol, 10 mol%), APTS (2.13 g, 11.19 mmol, 0.5 equiv) and *N*-iodosuccinimide (6.41 g, 22.38 mmol, 1.0 equiv) in DCE (136 mL), following the **general procedure N**, at 70 °C during 45 min. The expected compound **90** was isolated as a white powder (6.41 g, 94% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.73 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1H, H₄), 6.85 (d, ⁴J_{HH} = 3.1 Hz, 1H, H₆), 6.78 (dd, ³J_{HH} = 8.8, ⁴J_{HH} = 3.1 Hz, 1H, H₅), 3.80 (s, 3H, H₈), 3.10 (s, 3H, H₁₀), 2.87 (s, 3H, H₉).

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 172.2, 161.7, 144.5, 141.2, 117.9, 114.0, 81.0, 56.1, 38.9, 35.0;

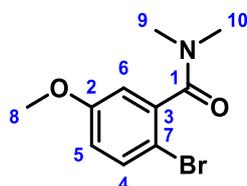
MS *m/z* [M+H]⁺ 306.38;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₀H₁₃NO₂I [M+H]⁺ 305.9991, found 305.9994;

M.p. 129.0 °C;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3443, 2925, 1630, 158, 1235.

RX (ORTEP) Crystal size: 0.69×0.18×0.10mm. Formula C₁₀H₁₀INO₂, molecular weight 305.11, crystal system orthorhombic, space group *P2₁2₁2₁*, *a* = 6.0692(2) Å, *b* = 10.4214(3) Å, *c* = 17.3648(5) Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°, *V* = 1098.32(6) Å³, *Z* = 4, calculated density = 1.845 g/cm³, μ = 2.891 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.036, *R*[*F*²>2*s*(*F*²)] = 0.018, *wR*(*F*²) = 0.036, *S* = 1.09.

2-bromo-5-methoxy-*N,N*-dimethylbenzamide 91Chemical Formula: C₁₀H₁₂BrNO₂Molecular Weight: 258.12 g.mol⁻¹

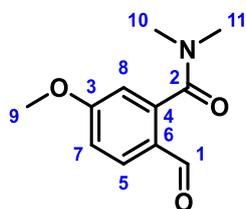
Starting from 3-methoxy-*N,N*-diimethyl-benzamide **89** (233 mg, 1.30 mmol, 1.0 equiv), palladium(II) acetate (29 mg, 0.13 mmol, 10 mol%), APTS (124 mg, 0.65 mmol, 0.5 equiv) and *N*-bromosuccinimide (232 mg, 1.30 mmol, 1.0 equiv) in DCE (8 mL), following the **general procedure N**, at 70 °C during 45 min. The expected compound **91** was isolated as a white powder (200 mg, 60% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.53 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1H, H₄), 6.94 (dd, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ⁴J_{HH} = 3.1 Hz, 1H, H₅), 6.90 (d, ⁴J_{HH} = 3.1 Hz, 1H, H₆), 3.83 (s, 3H, H₈), 3.12 (s, 3H, H₁₀), 2.90 (s, 3H, H₉).

¹³C NMR (MeOD, 101 MHz) δ 171.1, 160.8, 140.1, 134.8, 117.8, 114.2, 109.9, 56.2, 38.7, 34.9;

* Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁸

2-formyl-5-methoxy-*N,N*-dimethylbenzamide 92Chemical Formula: C₁₁H₁₃NO₃Molecular Weight: 207.23 g.mol⁻¹**Method A**

To a solution of *i*PrMgCl (2,04 mL, 4.08 mmol, 1.2 equiv) in dry THF (5.1 mL) was added slowly *n*-Butyllithium (3.40 mL, 8.16 mmol, 2.4 equiv) and stirred at 0 °C to -78 °C. A solution of 2-iodo-5-methoxy-*N,N*-dimethylbenzamide **90** (1.04 g, 3.40 mmol, 1.0 equiv) in dry THF (5.1 mL) was added dropwise, and stirred at -78 °C for 1h. Then DMF (0.53 mL, 6.80 mmol, 2.0 eq.) was then added, the resulting mixture was stirred at rt for 30 min and quenched with water. The mixture was extracted twice by Et₂O. The organic fractions were combined, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 50:50) and concentrated *in vacuo* to afford compound **92** as a colorless oil (350 mg, 50% isolated yield).

Method B

To a solution of 2-iodo-5-methoxy-*N,N*-dimethylbenzamide **90** (1.50 g, 4.94 mmol, 1.0 equiv) in dry THF (100 mL) was added slowly *n*-Butyllithium (2.3 M in THF, 2.15 mL, 4.94 mmol, 1.0 equiv) and stirred at -78 °C for 30 min. DMF (1.91 mL, 24.70 mmol, 5.0 eq.) was then added, the resulting mixture was stirred at rt for 30 min and quenched with water (50 mL). The mixture was extracted twice by Et₂O. The organic fractions were combined, dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude was purified by chromatography on silica gel column (CHX/EtOAc, gradient 100:0 to 50:50) and concentrated *in vacuo* to afford two compounds:

- 2-formyl-5-methoxy-*N,N*-dimethylbenzamide **92**: colorless oil, 307 mg, 30% isolated yield
- 5-methoxy-2-(3-methoxybenzoyl)-*N,N*-dimethylbenzamide **93**: colorless oil, 230 mg, 15% isolated yield

Spectral and analytical data

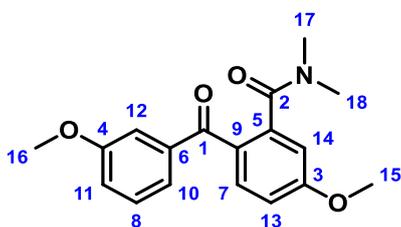
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.88 (s, 1H, H₁), 7.86 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, H₅), 7.00 (dd, ³J_{HH} = 8.6, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₇), 6.83 (d, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₈), 3.88 (s, 3H, H₉), 3.16 (s, 3H, H₁₀), 2.79 (s, 3H, H₁₁).

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 189.3, 169.4, 164.4, 141.0, 133.3, 126.0, 114.8, 112.6, 77.5, 77.2, 76.8, 55.9, 38.6, 34.9;

MS *m/z* [M+H]⁺ 208.02;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₁H₁₃NONa [M+Na]⁺ 230.0793, found 230.0795;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3432, 2931, 1637, 1595, 1574, 1285, 1243, 1038.

5-methoxy-2-(3-methoxybenzoyl)-*N,N*-dimethylbenzamide 93Chemical Formula: C₁₈H₁₉NO₄Molecular Weight: 313.35 g.mol⁻¹**Spectral and analytical data**

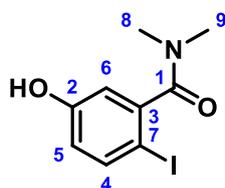
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.54 – 7.50 (m, 1H, H₇), 7.32 – 7.23 (m, 3H, H₈, H₁₂, H₁₀), 7.07–7.03 (m, 1H, H₁₁), 6.88–6.83 (m, 2H, H₁₃, H₁₄), 3.83 (s, 3H, H₁₅), 3.78 (s, 3H, H₁₆), 2.96 (s, 3H, H₁₈), 2.83 (s, 3H, H₁₇).

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 195.2, 170.6, 162.3, 159.5, 140.9, 139.1, 133.2, 129.2, 128.3, 122.8, 119.2, 114.0, 113.2, 113.1, 55.7, 55.5, 38.8, 34.8;

MS *m/z* [M+H]⁺ 313.97;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₈H₁₉NO₄ [M+Na]⁺ 336.1212, found 336.1214;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3432, 2931, 1637, 159, 1285, 1038.

5-hydroxy-2-iodo-*N,N*-dimethylbenzamide 94Chemical Formula: C₉H₁₀I₂NO₂Molecular Weight: 291.09 g.mol⁻¹

To a solution of 2-iodo-5-methoxy-*N,N*-dimethyl-benzamide **90** (55 mg, 0.18 mmol, 1.0 equiv) in DCM (1 mL) was added slowly BBR₃ (0.72 mL, 1.0 M in THF, 0.72 mmol, 4.0 equiv) and stirred at 0 °C. After 10 min the mixture was stirred at rt for 3 h, and quenched with ice water. The mixture was extracted by dichloromethane twice. The organic fractions were combined, dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The compound **94** was obtained as a yellow oil (40 mg, 76% yield).

Spectral and analytical data

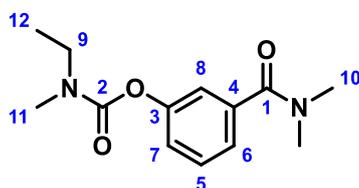
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.48 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, H₄), 6.67 (d, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, H₆), 6.51 (dd, ³J_{HH} = 8.6, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, H₅), 3.12 (s, 3H, H₉), 2.86 (s, 3H, H₈);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 171.9, 157.7, 151.9, 139.9, 119.4, 115.3, 78.8, 38.8, 35.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 291.86;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₉H₁₁I₂NO₂ [M+H]⁺ 291.9834, found 291.9839;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3394, 3145, 2924, 1617, 1295.

3-(dimethylcarbamoyl)phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate 95Chemical Formula: C₁₃H₁₈N₂O₃Molecular Weight: 250.30 g.mol⁻¹

Starting from 3-hydroxy-*N,N*-dimethyl-benzamide **87** (2.39 g, 14.48 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (1.27 mL, 11.62 mmol, 1.2 equiv), following the **general procedure F**. The expected compound **95** was obtained without purification as a yellow oil (3.08 g, 80% yield).

Spectral and analytical data

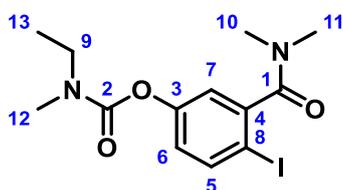
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.44 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₅), 7.23 (dt, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HF} = 1.3 Hz, H₇), 7.20 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H₆), 7.16 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, H₈), 3.40 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H₉), 2.99 (s, 3H, H₁₁), 2.96 (s, 6H, H₁₀), 1.18 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H₁₂);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 169.8, 153.9, 151.8, 138.3, 129.6, 123.8, 122.8, 120.7, 44.0, 37.3 (2C), 34.2, 13.0;

MS *m/z* [M+H]⁺ 251.49;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₃H₁₉N₂O₃ [M+H]⁺ 251.1396, found 251.1400;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{\max} 3482, 2934, 1720, 1636, 1395, 1233, 1179.

[3-(dimethylcarbamoyl)-4-iodo-phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 96Chemical Formula: C₁₃H₁₇IN₂O₃Molecular Weight: 376.19 g.mol⁻¹

Starting from 3-(dimethylcarbamoyl)phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **95** (1.03 g, 4.11 mmol, 1.0 equiv), palladium(II) acetate (92 mg, 0.41 mmol, 10 mol%), APTS (391 mg, 2.06 mmol, 0.5 equiv) and *N*-iodosuccinimide (925 mg, 4.11 mmol, 1.0 equiv) in DCE (25 mL), following the **general procedure N**, at 80 °C during 3 h. After a purification by flash chromatography on silica gel column (EP/Et₂O, gradient 100:0 to 30:70), the compound **96** was obtained as a pale yellow oil (200 mg, 13% isolated yield).

Spectral and analytical data 363 K

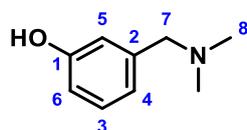
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.83 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, H₅), 7.05 (d, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, H₇), 6.96 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, H₆), 3.38 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H₉), 3.01 (s, 3H, H₁₁), 2.97 (s, 3H, H₁₂), 2.78 (s, 3H, H₁₀), 1.16 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₁₃);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 168.3, 152.5, 151.3, 143.3, 139.1, 123.2, 120.1, 86.6, 43.1, 37.3, 33.7, 33.3, 12.0;

MS *m/z* [M+H]⁺ 376.79;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₃H₁₈IN₂O₃ [M+H]⁺ 377.0362, found 377.0367;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 3439, 2931, 1720, 1640, 1397, 1180.

3-[(dimethylamino)methyl]phenol **98**Chemical Formula: C₉H₁₃NOMolecular Weight: 151.21 g.mol⁻¹

To a solution of 3-[(dimethylamino)methyl]phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **97** (209 mg, 0.88 mmol, 1.0 equiv) in dry THF, was added slowly *s*-Butyllithium (1.0 M in THF, 1.33 mL, 1.33 mmol, 1.5 equiv) and the mixture was stirred at rt for 30 min. DMF (0.14 mL, 1.17 mmol, 2.0 equiv) was then added, the resulting mixture was stirred at rt for 30 min. The reaction was quenched with water. The organic layer was removed and the aqueous phase was washed with EtOAc. The organic fractions were combined, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. After a purification by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), we obtained 2 products:

- 4-[(dimethylamino)methyl]-2-hydroxybenzaldehyde **98**: yellow oil, 35 mg, 26 % isolated yield.
- 1-[4-[(dimethylamino)methyl]-2-hydroxyphenyl]-2-methylbutan-1-one **99**: colorless oil, 22 mg, 11 % isolated yield

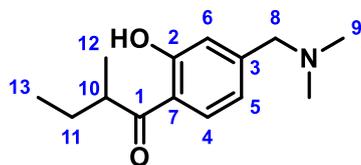
Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.13 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, H₃), 6.76 (td, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H₄), 6.72 (m, 1H, H₆), 6.69 (m, 1H, H₅), 3.41 (s, 2H, H₇), 2.26 (s, 6H, H₈);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 157.2, 138.5, 129.5, 121.4, 117.2, 115.6, 64.0, 45.0 (2C);

* Spectral and analytical data matched with literature³²⁰

³²⁰ Vallée, C.; Chauvin, Y.; Basset, J.-M. M.; Santini, C. C.; Galland, J.-C. C. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (14), 1835–1847.

1-[4-[(dimethylamino)methyl]-2-hydroxyphenyl]-2-methylbutan-1-one 99Chemical Formula: C₁₄H₂₁NO₂Molecular Weight: 235.33 g.mol⁻¹**Spectral and analytical data**

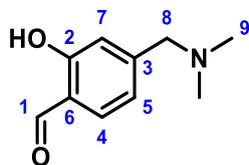
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 12.5 (s, 1H, H_{OH}), 7.73 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, H₄), 6.93 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₆), 6.89 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H₅), 3.42 (sx, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H₁₀), 3.41 (s, 2H, H₈), 2.26 (s, 6H, H₉), 1.90-1.46 (m, 2H, H₁₁), 1.21 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H₁₂), 0.93 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H₁₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 210.5, 163.3, 148.4, 130.3, 119.5, 118.8, 117.8, 64.0, 45.6 (2C), 41.7, 27.0, 17.2, 11.9;

MS *m/z* [M+H]⁺ 236.56;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₄H₂₂NO₂ [M+H]⁺ 236.1651, found 236.1652;

IR (neat, cm⁻¹) *v*_{max} 2967, 2937, 2877, 1637, 1458, 1384, 1203, 800.

4-[(dimethylamino)methyl]-2-hydroxybenzaldehyde 100Chemical Formula: C₁₀H₁₃NO₂Molecular Weight: 179.22 g.mol⁻¹

To a solution of 3-[(dimethylamino)methyl]phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **97** (2.56 g, 10.85 mmol, 1.0 equiv) in dry THF, was added slowly TMEDA and stirred at -78 °C for 5 min. *s*-Butyllithium (1.3 M in THF, 12.52 mL, 16.27 mmol, 1.5 equiv), was added slowly, the solution was stirred at -78 °C for 30 min. DMF (1.68 mL, 21.70 mmol, 2.0 equiv) was then added, the resulting mixture was stirred at rt for 30 min and quenched with water. The organic layer was removed and the aqueous phase washed with EtOAc. The organic fractions were combined, dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. After a purification by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), the compound **100** was obtained as a yellow oil (1.54 g, 79% isolated yield).

Spectral and analytical data

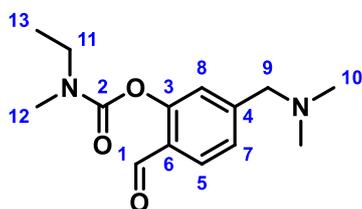
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 11.03 (br s, 1H, H_{OH}), 9.86 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 0.4 Hz, H₁), 7.50 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₄), 7.01 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H₅), 6.95 (s, 1H, H₇), 3.43 (s, 2H, H₈), 2.25 (s, 6H, H₉);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 196.2, 161.9, 149.8, 133.8, 120.5, 119.8, 111.7, 64.2, 45.7 (2C);

MS *m/z* no found;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3435, 2921, 2344, 1633, 1383, 1262, 1113, 1015, 802.

5-[(dimethylamino)methyl]-2-formylphenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **101**Chemical Formula: C₁₄H₂₀N₂O₃Molecular Weight: 264.33 g.mol⁻¹

Starting from 4-[(dimethylamino)methyl]-2-hydroxybenzaldehyde **100** (1.54 g, 8.59 mmol, 1.0 equiv) and ethylmethylcarbamic chloride (1.04 mL, 9.45 mmol, 1.1 equiv), following the **general procedure F**. The expected compound **101** was isolated as a yellowish oil (1.97 g, 87% isolated yield).

Spectral and analytical data

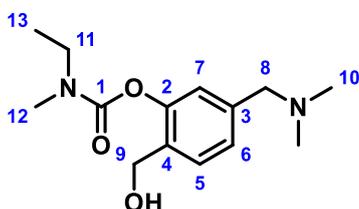
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 10.07 (s, 1H, H₁), 7.80 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₅), 7.35 (D, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H₇), 7.23 (s, 1H, H₈), 3.53 (s, 2H, H₉), 3.47-3.38 (m, 2H, H₁₁), 3.02 (s, 3H, H₁₂), 2.23 (s, 6H, H₁₀), 1.20 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H₁₃);

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 188.2, 152.8, 152.1, 146.7, 129.0, 127.1, 125.3, 123.0, 62.1, 44.4 (2C), 43.2, 33.4, 12.0;

MS *m/z* [M+H]⁺ 265.54;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₁₄H₂₁N₂O₃ [M+H]⁺ 265.1552, found 265.1552;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3451, 2972, 2925, 1725, 1694, 1611, 1391, 1157, 812.

5-[(dimethylamino)methyl]-2-(hydroxymethyl)phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **102**Chemical Formula: C₁₄H₂₂N₂OMolecular Weight: 266.34 g.mol⁻¹

Starting from 5-[(dimethylamino)methyl]-2-formylphenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **101** (1.02 g, 3.86 mmol, 1.0 equiv) and NaBH₄ (438 mg, 11.58 mmol, 3.0 equiv) at 0 °C for 30 min, following the **general procedure I**. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10) and concentrated *in vacuo* to afford the product **102** as a colorless oil (850 mg, 83% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.41 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H₅), 7.12 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, H₆), 6.99 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, H₇), 4.76 (br s, 1H, H_{OH}), 4.45 (s, 2H, H₉), 3.40 (q, 2H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H₁₁), 3.37 (s, 2H, H₈), 2.98 (s, 3H, H₁₂), 2.18 (s, 6H, H₁₀), 1.18 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H₁₃);

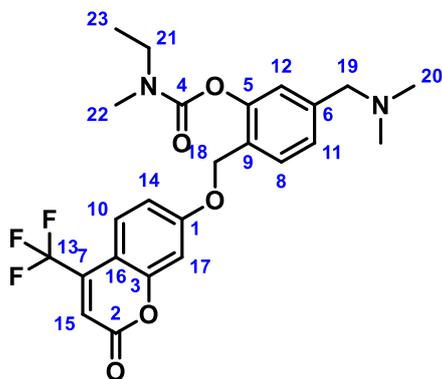
¹³C NMR (DMSO, 126 MHz, 363K) δ 153.0, 148.0, 138.2, 132.5, 127.1, 124.7, 121.7, 62.4, 57.5, 44.4 (2C), 43.1, 33.2, 12.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ 267.54;

HRMS/ESI *in progress*;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3420, 2935, 2855, 2817, 2772, 1720, 1456, 1399, 1236, 1163, 1029, 751.

[5-[(dimethylamino)methyl]-2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxymethyl]phenyl] *N*-ethyl-*N*-methyl-carbamate **103**



Chemical Formula: C₂₄H₂₅F₃N₂O₅

Molecular Weight: 478.47 g.mol⁻¹

Starting from 5-[(dimethylamino)methyl]-2-(hydroxymethyl)phenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate **102** (139 mg, 0.49 mmol, 1.0 equiv) and PBr₃ (34 μL, 37 mmol, 0.7 equiv) in Et₂O (8mL), following the **general procedure J**. The expected compound was directly stirred in acetone (10 mL) with TFMU (231 mg, 0.52 mmol, 1.1 equiv) and K₂CO₃ (208 mg, 2.09 mmol, 4.0 equiv), at rt during 18 h. The solvent was evaporated to dryness *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc, and the solution was washed with brine, and dried over MgSO₄ filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20) and concentrated *in vacuo* to afford the product **103** as a yellow oil (10 mg, 4% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, 363K) δ 7.64 (dq, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁵J_{HF} = 2.1 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H, H₈), 7.18 (dd, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, 1H, H₁₁), 7.16 (d, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₇), 7.14 (d, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, 1H, H₁₂), 7.10 (dd, ³J_{HH} = 9.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H₁₄), 6.77 (s, 1H, H₁₅), 5.19 (s, 2H, H₁₈), 3.43 (s, 2H, H₁₉), 3.36 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H₂₁), 2.93 (s, 3H, H₂₂), 2.19 (s, 6H, H₂₀), 1.10 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₂₃).

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz,) δ 162.5, 159.2, 156.3, 153.7 (rota A), 153.5 (rota B), 150.2, 141.5, 139.8 (q, ²J_{CF} = 31.9 Hz), 130.2 (rota A), 130.1 (rota B), 127.0, 126.3, 126.0, 123.6 (rota A), 123.5 (rota B), 122.2 (q, ¹J_{CF} = 274.5 Hz), 114.3, 113.9 (q, ³J_{CF} = 5.9 Hz), 107.1, 102.8, 66.6 (rota A), 66.5 (rota B), 63.0, 45.4 (2C), 44.0 (rota A), 43.9 (rota B), 34.4 (rota A), 34.0 (rota B), 13.4 (rota A), 12.7 (rota B);

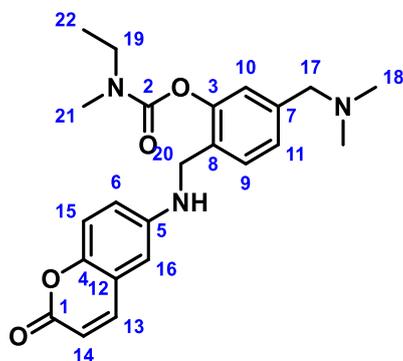
¹⁹F NMR (DMSO, 376 MHz) δ -63.5 (d, ⁵J_{FF} = 5.7 Hz, 3F);

MS *m/z* [M+H]⁺ 479.68;

HRMS/ESI not determined;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} not determined.

[5-[(dimethylamino)methyl]-2-[[[(2-oxochromen-6-yl)amino]methyl]phenyl] N-ethyl-N-methyl-carbamate 104



Chemical Formula: C₂₃H₂₇N₃O₄

Molecular Weight: 409.20 g.mol⁻¹

Starting from 6-aminochromen-2-one (57 mg, 0.36 mmol, 1.0 equiv) and 5-[(dimethylamino)methyl]-2-formylphenyl *N*-ethyl-*N*-methylcarbamate (113 mg, 0.43 mmol, 1.2 equiv) following the **general procedure P**. The expected compound **104** was isolated as a yellow oil (90 mg, 51% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.59 (d, ³J_{HH} = 9.5 Hz, 1H, H₆), 7.32 (d, ³J_{HH} = Hz, 1H, H₉), 7.19 – 7.07 (m, 3H, H₁₄, H₁₀, H₁₁), 6.83 (dd, ³J_{HH} = 8.9, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, H₁₃), 6.59 (d, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, H₁₆), 6.36 (d, ³J_{HH} = 9.5 Hz, 1H, H₁₅), 4.26 – 4.22 (m, 3H, H_{NH}, H₂₀), 3.44 – 3.38 (m, 3H, H₁₇, H₁₉ rota A), 3.34 (q, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 1H, H₁₉ rota B), 3.00 (s, 1.5H, H₂₁ rota A), 2.93 (s, 1.5H, H₂₁ rota B), 2.25 (s, 6H, H₁₈), 1.15 (t, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 1.5H, H₂₂ rota A), 1.10 (t, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 1.5H, H₂₂ rota B);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 161.5, 154.8 (rota A), 154.6 (rota B), 149.8, 146.9, 145.2, 143.7, 140.2, 129.7, 129.2, 126.7 (rota A), 126.6 (rota B), 123.6 (rota A), 123.5 (rota B), 119.5, 118.4, 117.6, 116.8, 108.4, 63.7, 45.5 (2C), 44.3 (rota A), 44.2 (rota B), 44.0 (rota A), 43.9 (rota B), 34.5 (rota A), 34.0 (rota B), 13.3 (rota A), 12.6 (rota B);

MS *m/z* [M+H]⁺ 409.91;

HRMS/ESI *m/z* calcd. for C₂₃H₂₈N₃O₄ [M+H]⁺ 410.2080, found 410.2083;

IR (neat, cm⁻¹) ν_{max} 3428, 1713, 1572, 1398, 1162, 1103.

3. In silico studies

The initial model of compound studied was built from donepezil X-ray structure,¹²⁹ and its protonation state at pH 7.4 was predicted using standard tools of the ChemAxon Package (<http://www.chemaxon.com/>). The majority microspecies protonated on piperidine nitrogen at this pH was used for docking studies.

The crystallographic coordinates of human acetylcholinesterase used in this study were obtained from X-ray structure of the donepezil/AChE complex (PDB ID 4EY7, a structure refined to 2.35 Å with an R factor of 17.7%). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands.⁷⁷ The AChE amino acid protonation state was checked before the docking study using the PropKA software and the proposed protonation for Glu202 was applied.

The crystallographic coordinates of human butyrylcholinesterase used in this study were obtained from X-ray structure of the (*S*)-*N*-(1-((2-cycloheptylethyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-*N,N*-dimethylbutan-1-aminium / BuChE complex (PDB ID 6QAB, a structure refined to 2.49 Å with an R factor of 19.2%). Structures of human butyrylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands²¹³ The BuChE amino acid protonation state was checked before the docking study using the PropKA software and the proposed protonation for Glu202 was applied.

The docking of the compound into the AChE was carried out with the GOLD program (v5.7.2, Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC) using the default parameter.^{321,322} This program applies a genetic algorithm to explore conformational spaces and ligand binding modes. To evaluate the proposed ligand positions, the ChemPLP fitness function was used. The binding site in the AChE model was defined as a 7 Å sphere from the co-crystallized donepezil ligand, and a water molecule interacting with a protonated piperidine ring of donepezil was conserved during the docking (residue number 931). The Ser203 side chain was kept flexible and a hydrogen bond constraint between Ser203 side chain and carbonyl oxygen was applied during the docking.

4. In vitro biological studies

4.1. In vitro tests of AChE and BuChE biological activity

Inhibitory capacity of compounds on AChE biological activity was evaluated through the use of the spectrometric method of Ellman.²⁰⁵ Acetyl- or butyrylthiocholine iodide and 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) were purchased from Sigma-Aldrich. Lyophilized BuChE from equine serum (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.2 M phosphate buffer pH 7.4 such as to have enzyme solutions stock

³²¹ Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245* (1), 43–53.

³²² Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727–748.

with 2.5 units/ mL enzyme activity. AChE from human erythrocytes (buffered aqueous solution, ≥ 500 units/mg protein (BCA), Sigma-Aldrich) was diluted in 20 mM HEPES buffer pH 8, 0.1% Triton X-100 such as to have enzyme solution with 0.25 unit/mL enzyme activity. In the procedure, 100 μ L of 0.3 mM DTNB dissolved in phosphate buffer pH 7.4 were added into the 96-well plate followed by 50 μ L of test compound solution and 50 μ L of enzyme (0.05 U final). After 5 min of preincubation at 25 °C, the reaction was then initiated by the injection of 50 μ L of 10 mM acetyl- or butyrylthiocholine iodide solution. The hydrolysis of acetyl- or butyrylthiocholine was monitored by the formation of yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as the result of the reaction of DTNB with thiocholine, released by the enzymatic hydrolysis of acetyl- or butyrylthiocholine, at a wavelength of 412 nm using a 96-well microplate plate reader (TECAN Infinite M200, Lyon, France). Test compounds were dissolved in analytical grade DMSO. Donepezil was used as a reference standard. The rate of absorbance increase at 412 nm was followed every minute for 10 min. Assays were performed with a blank containing all components except acetyl- or butyrylthiocholine, in order to account for nonenzymatic reaction. The reaction slopes were compared and the percent inhibition due to the presence of test compounds was calculated by the following expression: $100 - (v_i/v_0 \times 100)$, where v_i is the rate calculated in the presence of inhibitor and v_0 is the enzyme activity.

First screening of AChE and BuChE activity was carried out at a 10^{-6} or 10^{-5} M concentration of compounds under study. For the compounds with significant inhibition ($\geq 50\%$), IC_{50} values were determined graphically by plotting the % inhibition versus the logarithm of six inhibitor concentrations in the assay solution using the Origin software.

4.2. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT₄R

For competition studies, 2.5 μ g of proteins (5-HT_{4(b)} membrane preparations, HTS110M, Eurofins. Eurofins' 5-HT_{4(b)} membrane preparations were crude membrane preparations made from their proprietary stable recombinant cell lines to ensure high-level of GPCR surface expression.) were incubated in duplicate at 25 °C for 60 min in the absence or the presence of 10^{-6} or 10^{-8} M of each drug (RS67333 was used as a reference standard) and 0.2 nM [³H]-GR113808 (NET 1152, Perkin Elmer) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25 °C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) presoaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 1 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4 °C). Non-specific binding was evaluated in parallel in the presence of 30 μ M serotonin.

For some of these compounds, affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the GraphPad Prism 6 software and expressed as $K_i \pm SD$.

4.3. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT₆R.

Drugs were evaluated through their possibility to compete for the binding of [³H]-LSD on membranes of HEK-293 cells transiently expressing the human 5-HT₆ receptors (ref. RBHS6M, Perkin Elmer). In brief, 4 µg of proteins were incubated at 37 °C for 60 min in duplicate in the absence or the presence of 10⁻⁶ or 10⁻⁸M of each drug (idalopirdine was used as a reference standard) and 2.5 nM [³H]-LSD (ref. NET638250UC, Perkin Elmer), in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 mM EDTA. At the end of the incubation, the homogenates were then filtered through Whatman GF/C filters and washed five times with ice-cold 25 mM Tris-HCl buffer. Non-specific binding was evaluated in the presence of 100 µM serotonin. Radioactivity associated to proteins was then quantified and expressed as the percentage of inhibition of the drugs under study.

For some of these compounds, affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the GraphPad Prism 6 software and expressed as $K_i \pm SD$.

4.4. Kinetic Study for ChE Inhibition

To try to clarify the mechanism of action of MR35212, MR35213 and MR35215, reciprocal plots of 1/velocity vs. 1/[substrate] were constructed at different concentrations of the substrate acetylthiocholine iodide (0.01–1 mM) by using the spectrometric method by Ellman *et al.*²⁰⁵ Four concentrations of 19 were selected for the studies: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ and 10⁻⁹ M for the kinetic analysis of AChE inhibition. Four concentrations of 20 were selected for the studies: 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ and 10⁻⁸ M for the kinetic analysis of ChE inhibition. The plots were assessed by a weighted least squares analysis that assumed the variance of velocity (*v*) to be a constant percentage of *v* for the entire dataset. Slopes of these reciprocal plots were then plotted against the concentration of **MR35212**, **MR35213** and **MR3215**.

4.5. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

The parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) blood-brain barrier (BBB) experiments were conducted using the Pampa Explorer Kit (Pion Inc.) according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, the donecopride fumarate solution (20 mM in DMSO) was diluted in Prisma HT buffer (pH 7.4; pION) to 100 µM; 200 µL this solution (n = 6) was added to the donor plate (P/N 110,243). Five microliters BBB-1 Lipid (P/N 110,672) was used to coat the membrane filter of the acceptor plate (P/N 110,243). Two hundred microliters Brain Sink Buffer (P/N 110,674) was added to each well of the acceptor plate. The PAMPA sandwich was assembled and allowed to incubate at rt for 4 h without stirring. The sandwich was then separated, and the UV-visible spectra were measured for both the donor and receiver wells with the microplate reader (Tecan Infiniit M200). The -logPe and Pe (PAMPA effective permeability coefficient) were calculated by the PAMPA Explorer software version

3.7 (pION) for studied compounds. Corticosterone ($-\log Pe = 4.76$, $Pe = 17.2 \cdot 10^{-6}$ cm/s) and theophylline ($-\log Pe = 6.44$, $Pe = 0.40 \cdot 10^{-6}$ cm/s) were used as positive and negative references, respectively.

4.6. Determination of cAMP production

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected by electroporation with plasmids encoding HA-tagged 5-HT₄R (100 ng/10⁶ cells) or HA-tagged 5-HT₆R (70 ng/10⁶ cells or 300 ng/10⁶ cells), then seeded in 96-well plates (16,000 cells/well).

5-HT₄R-induced cAMP production: 24 hrs after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₄R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO-20-1724, at 37 °C in 100 µL of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂; 0.1% glucose; 0.1% BSA). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%).

Blockade of the 5-HT₆R-induced cAMP production: 24 hrs after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₆R ligands at 37 °C in 50 µL of HBS. After 7 min, 5-HT (5.10⁻⁷M final concentration) in the presence of RO-20-1724 (0.1 mM final concentration), in 50 µL HBS, was added to the wells. After 10 min at 37 °C, cells were then lysed by addition of 100µl of Triton-X100 (0.1%).

Quantification of cAMP production was performed by HTRF[®] by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

4.7. AChE and BuChE dependent Decarbamylation

The HPLC analyses were performed using an Agilent pump 1290, an autosampler 1290 and a diode array UV detector 1260 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). A reversed phase column C18 (Restek[®] Ultra, 5 µm, 2.1 x 50 mm) has been used for all components. A binary pump was used and the mobile phase was always composed of a mixture of (A) water (0.1% formic acid) and (B) acetonitrile (0.1% formic acid). Solutions of compounds were prepared in a PBS buffer (pH 7.4). AChE from *Electrophorus electricus* or BuChE from equine serum (buffered aqueous solution, ≥ 500 units/mg protein (BCA), Sigma Aldrich) was diluted in PBS buffer pH 7.4, such as to reach 250 unit/mL enzyme activity. Solution was prepared by addition of 250 µL of the abovementioned enzyme stock solution to 5 µL of solution of compounds at 255 µM. The mixture was stirred during 24 h at rt. The mixture was extracted by 300 µL of EtOAc. 250 µL of the organic layer was reduced by nitrogen flow. The crude product was submerged in 50 µL of ACN, then analyzed by HPLC and LC-MS. For HPLC, analyses and gradients were changed according to the product.

Tableau 41. HPLC conditions

Compound	Carbamate	Rivastigmine	MR35213	MR35215	104	Physostigmine
	Phenol	3-[(1S)-1-(dimethylamino)ethyl]phenol	MR35212	MR35214	6-amino coumarine	Eseroline
Injection Volume (µL)		6	6	6	6	6
Flow (mL/min)		0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Retention time (min)	Carbamate	1.517	1.402	1.813	2.280	2.093
	Phenol	2.150	1.178	1.734	0.899	n.d.
Wavelength (nm)		265	330	280	280	247
Gradient	See Tableau 42					
Stop Time (min)		2.5	2.5	3.2	3.2	3.2
Post Time (min)		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tableau 42. Gradient conditions

Method	Rivastigmine			MR35213			MR35215			104			Physostigmine					
Time (min)	0	0.8	1.9	0	2.5	3.0	0	3.0	3.2	0	1.0	3.0	3.2	0	1.0	2.0	2.5	
Solvent	Water	95	90	30	90	30	30	90	30	30	98	98	30	30	95	95	80	30
(%)	ACN	5	10	70	10	70	70	10	70	70	2	2	70	70	5	5	20	70

5. In vivo biological studies

5.1. Animals

Adult male NMRI mice (3 months old, weighing 35–40g) from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used to perform experiments. Mice were housed by ten in standard polycarbonate cages in standard controlled conditions (22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ humidity) with a reversed 12 h light/dark cycle (light on at 7 pm). Food and water were available ad libitum in the home cage. All experiments were conducted (between 9 am and 3 pm) during the active–dark phase of the cycle and were in agreement with the European Directives and French law on animal experimentation (personal authorization n° 14–17 for MB and 14–60 for TF).

5.2. CNS-activity and acute toxicity test

Behavioral and neurological changes induced by graded doses (1, 10, 100 mg/kg) of the tested derivatives were evaluated in mice, in groups of four, by a standardized observation technique at different times (30 min, 3 and 24 h) after intraperitoneal and ministrations.¹⁶³ Major changes of behavioral data (for example, hypo- or hyperactivity, ataxia, tremors, convulsion, etc.) were noted in comparison to the control group. The approximate DL₅₀ of the compounds were also calculated through the quantification of mortality after 24 h. Amphetamine (2 mg/kg) and chlorpromazine (10 mg/kg) were used as the stimulant and depressive references, respectively.

5.3. Locomotor activity

The locomotion of mice was measured using an actimeter (Imetronic®) through infrared detection. Eight individual removable polycarbonate cages (21 cm length, 7 cm wide and 12 cm high), in which

each mouse was placed, were used in the actimeter. Locomotor activity was measured by recording the number of interruptions of beams of the red light over a period of 30 min through a recording system attached to the actimeter. Compound was tested at 1, 3 and 10 mg/kg. Chlorpromazine (3 mg/kg) were used as depressive reference.¹⁶⁷

5.4. Spatial working memory

The anti-amnesic activity of the tested compounds was evaluated by a reversal of deficit on spontaneous alternation behavior in the Y maze test.²¹⁵ Deficits were pharmacologically induced either by scopolamine (SCOP, 0.5 mg/kg) or dizocilpine (MK801, 0.1 mg/kg). The Y maze made of grey plastic consisted of three equally-spaced arms (21-cm long, 7-cm wide with walls 15-cm high). The mouse was placed at the end of one of the arms and allowed to move freely through the maze during a 5 min session, while the sequence of arm entries was recorded by an observer. An arm entry was scored when all four feet crossed into the arm. An alternation was defined as entries into all three arms on a consecutive occasion. The number of possible alternations is thus the total number of arm entries minus two; the percentage of alternation was calculated as (actual alternation/possible alternation) 100. Compound **20** was tested at 1, 3 and 10 mg/kg.

5.5. Pharmacological treatments

Amphetamine (+)- α -Methylphenethylamine hemisulfate, chlorpromazine hydrochloride, MK801 hydrogen maleate and scopolamine hydrobromide were purchased from Sigma (France). All pharmacological compounds were dissolved in NaCl 0.9%, used as the vehicle. Besides, all were administered IP 30 min before tests, except for scopolamine and MK801, which were subcutaneously administered 20 min before spontaneous alternation test.

5.6. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), with Statview[®] software. In case of significance, a SNK (Student-Newman-Keuls) post hoc test was realized. Additionally, for the spontaneous alternation test, the percentage of alternation was compared to a theoretical 50% value (random alternation) by a univariate *t*-test. Differences were considered as statistically significant if the *p* value was strictly under 0.05.

Bibliographie

- (1) Isnard, C.; Fines-Guyon, M.; Toublet, F.-X.; Guerin, F.; Rogowski, C.; Vergnaud, M.; Cattoir, V. In Vivo Emergence of Rifampicin Resistance by RpoB Mutation in *Listeria Monocytogenes* during Therapy of Prosthetic Joint Infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48* (5), 572–574. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.016>.
- (2) Stelzmann, R. A.; Norman Schnitzlein, H.; Reed Murtagh, F. An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über Eine Eigenartige Erkankung Der Hirnrinde." *Clin. Anat.* **1995**, *8* (6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- (3) Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P. The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* **2013**, *9* (1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>.
- (4) Global Health Observatory (GHO) data https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/ (accessed Sep 23, 2019).
- (5) Gaugler, J.; James, B.; Johnson, T.; Scholz, K.; Weuve, J. 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's Dement.* **2019**, *15* (3), 321–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>.
- (6) Démence - Acadpharm <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Démence> (accessed Aug 29, 2019).
- (7) Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G. C.; Wu, Y.-T.; Prina, M. *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*; 2015.
- (8) Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; et al. Global Prevalence of Dementia: A Delphi Consensus Study. *Lancet* **2005**, *366*, 2112–2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0).
- (9) Jourdan, J.-P. Conception, Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Analogues de La Curcumine, Potentiels Agents Pléiotropes d'Intérêt Thérapeutique Dans La Maladie d'Alzheimer, 2015.
- (10) HAS. *Maladie d'Alzheimer et Maladies Apparentées : Diagnostic et Prise En Charge*; 2011.
- (11) Bekris, L. M.; Yu, C.-E.; Bird, T. D.; Tsuang, D. W. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **2010**, *23* (4), 213–227. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>.
- (12) Lott, I. T.; Dierssen, M. Cognitive Deficits and Associated Neurological Complications in Individuals with Down's Syndrome. *Lancet Neurol.* **2010**, *9* (6), 623–633. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70112-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70112-5).
- (13) Moran, J. *Aging and Down Syndrome*; 2017.
- (14) Hebert, L. E. L. E.; Weuve, J.; Scherr, P. A. P. A.; Evans, D. A. D. A. Alzheimer Disease in the United States (2010-2050) Estimated Using the 2010 Census. *Neurology* **2013**, *80* (19), 1778–1783. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5>.
- (15) Farrer, L. A. A.; Cupples, L. A.; Haines, J. L.; Hyman, B.; Kukull, W. A.; Myers, R. H.; Pericak-Vance, M. A.; Risch, N.; van Duijn, C. M. Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. *JAMA* **1997**, *278* (16), 1349. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03550160069041>.
- (16) Mayeux, R.; Sano, M.; Chen, J.; Tatemichi, T.; Stern, Y. Risk of Dementia in First-Degree Relatives of Patients With Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Arch. Neurol.* **1991**, *48* (3), 269–

273. <https://doi.org/10.1001/archneur.1991.00530150037014>.
- (17) Rönnekaa, E.; Zethelius, B.; Lannfelt, L.; Kilander, L. Vascular Risk Factors and Dementia: 40-Year Follow-Up of a Population-Based Cohort. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2011**, *31* (6), 460–466. <https://doi.org/10.1159/000330020>.
- (18) Meng, X.-F.; Yu, J.-T.; Wang, H.-F.; Tan, M.-S.; Wang, C.; Tan, C.-C.; Tan, L. Midlife Vascular Risk Factors and the Risk of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *42* (4), 1295–1310. <https://doi.org/10.3233/JAD-140954>.
- (19) STERN, Y. What Is Cognitive Reserve? Theory and Research Application of the Reserve Concept. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **2002**, *8* (3), 448–460. <https://doi.org/10.1017/S1355617702813248>.
- (20) Fann, J. R.; Ribe, A. R.; Pedersen, H. S.; Fenger-Grøn, M.; Christensen, J.; Benros, M. E.; Vestergaard, M. Long-Term Risk of Dementia among People with Traumatic Brain Injury in Denmark: A Population-Based Observational Cohort Study. *The Lancet Psychiatry* **2018**, *5* (5), 424–431. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30065-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30065-8).
- (21) Turner, P. R.; O'Connor, K.; Tate, W. P.; Abraham, W. C. Roles of Amyloid Precursor Protein and Its Fragments in Regulating Neural Activity, Plasticity and Memory. *Prog. Neurobiol.* **2003**, *70* (1), 1–32. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00089-3).
- (22) Masters, C. L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C. C.; Sperling, R. A.; Cummings, J. L. Alzheimer's Disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>.
- (23) Gay, M.; Evrard, C.; Descamps, F.; Carato, P.; Renault, N.; Coevoet, M.; Eddarkaoui, S.; Baud, C.; Larchanché, P.-E.; Buée, L.; et al. A Phenotypic Approach to the Discovery of Compounds That Promote Non-Amyloidogenic Processing of the Amyloid Precursor Protein: Toward a New Profile of Indirect β -Secretase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 104–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.092>.
- (24) Lee, S. J. C.; Nam, E.; Lee, H. J.; Savelieff, M. G.; Lim, M. H. Towards an Understanding of Amyloid- β Oligomers: Characterization, Toxicity Mechanisms, and Inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (2), 310–323. <https://doi.org/10.1039/c6cs00731g>.
- (25) Willem, M.; Tahirovic, S.; Busche, M. A.; Ovsepijan, S. V.; Chafai, M.; Kootar, S.; Hornburg, D.; Evans, L. D. B.; Moore, S.; Daria, A.; et al. η -Secretase Processing of APP Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus. *Nature* **2015**, *526* (7573), 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature14864>.
- (26) Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R. A. Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Neuron* **1989**, *3* (4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9).
- (27) Ballatore, C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q. Tau-Mediated Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8* (9), 663–672. <https://doi.org/10.1038/nrn2194>.
- (28) Baudier, J.; Cole, R. D. Phosphorylation of Tau Proteins to a State like That in Alzheimer's Brain Is Catalyzed by a Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase and Modulated by Phospholipids. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (36), 17577–17583.
- (29) Daebel, V.; Chinnathambi, S.; Biernat, J.; Schwalbe, M.; Habenstein, B.; Loquet, A.; Akoury, E.; Tepper, K.; Müller, H.; Baldus, M.; et al. β -Sheet Core of Tau Paired Helical Filaments Revealed by Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (34), 13982–13989. <https://doi.org/10.1021/ja305470p>.

- (30) Noble, W.; Olm, V.; Takata, K.; Casey, E.; Mary, O.; Meyerson, J.; Gaynor, K.; LaFrancois, J.; Wang, L.; Kondo, T.; et al. Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation in Vivo. *Neuron* **2003**, *38* (4), 555–565. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00259-9).
- (31) Ward, S. M.; Himmelstein, D. S.; Lancia, J. K.; Binder, L. I. Tau Oligomers and Tau Toxicity in Neurodegenerative Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (4), 667–671. <https://doi.org/10.1042/bst20120134>.
- (32) Lee, V. M.-Y.; Goedert, M.; Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24* (1), 1121–1159. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1121>.
- (33) Hardy, J.; Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science (80-)*. **2002**, *297* (5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.
- (34) Ittner, L. M.; Götz, J. Amyloid- β and Tau — a Toxic Pas de Deux in Alzheimer's Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12* (2), 67–72. <https://doi.org/10.1038/nrn2967>.
- (35) Phiel, C. J.; Wilson, C. A.; Lee, V. M.-Y.; Klein, P. S. GSK-3 α Regulates Production of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptides. *Nature* **2003**, *423* (6938), 435–439. <https://doi.org/10.1038/nature01640>.
- (36) Chen, S.; Ge, X.; Chen, Y.; Lv, N.; Liu, Z.; Yuan, W. Advances with RNA Interference in Alzheimer's Disease Research. *Drug Des. Devel. Ther.* **2013**, *7*, 117–125. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S40229>.
- (37) Faller, P.; Hureau, C. A Bioinorganic View of Alzheimer's Disease: When Misplaced Metal Ions (Re)Direct the Electrons to the Wrong Target. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (50), 15910–15920. <https://doi.org/10.1002/chem.201202697>.
- (38) Biot, C.; Castro, W.; Botté, C. Y.; Navarro, M. The Therapeutic Potential of Metal-Based Antimalarial Agents: Implications for the Mechanism of Action. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (21), 6335–6349. <https://doi.org/10.1039/c2dt12247b>.
- (39) Bonda, D. J.; Lee, H. G.; Blair, J. A.; Zhu, X.; Perry, G.; Smith, M. A. Role of Metal Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease. *Metallomics* **2011**, *3* (3), 267–270. <https://doi.org/10.1039/c0mt00074d>.
- (40) Miller, L. M.; Wang, Q.; Telivala, T. P.; Smith, R. J.; Lanzirotti, A.; Miklossy, J. Synchrotron-Based Infrared and X-Ray Imaging Shows Focalized Accumulation of Cu and Zn Co-Localized with β -Amyloid Deposits in Alzheimer's Disease. *J. Struct. Biol.* **2006**, *155* (1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.004>.
- (41) Duce, J. A.; Tsatsanis, A.; Cater, M. A.; James, S. A.; Robb, E.; Wikke, K.; Leong, S. L.; Perez, K.; Johanssen, T.; Greenough, M. A.; et al. Iron-Export Ferroxidase Activity of β -Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease. *Cell* **2010**, *142* (6), 857–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.014>.
- (42) James, S. A.; Volitakis, I.; Adlard, P. A.; Duce, J. A.; Masters, C. L.; Cherny, R. A.; Bush, A. I. Elevated Labile Cu Is Associated with Oxidative Pathology in Alzheimer Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52* (2), 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.446>.
- (43) Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative Stress and the Amyloid Beta Peptide in Alzheimer's Disease. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.
- (44) Behl, C.; Moosmann, B. Antioxidant Neuroprotection in Alzheimer's Disease as Preventive and

- Therapeutic Approach. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (2), 182–191. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00883-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00883-3).
- (45) Markesbery, W. R.; Carney, J. M. Oxidative Alterations in Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* **2006**, *9* (1), 133–146. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00215.x>.
- (46) Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 2821–2831. <https://doi.org/10.1021/jm400970m>.
- (47) Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66* (2), 137–147. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>.
- (48) Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase — New Roles for an Old Actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2* (4), 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- (49) Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.
- (50) Dallemagne, P. *Les Médicaments Du Système Nerveux Central, Cours de 4ème Année de Pharmacie*; 2014.
- (51) Darvesh, S.; Darvesh, K. V.; McDonald, R. S.; Mataija, D.; Walsh, R.; Mothana, S.; Lockridge, O.; Martin, E. Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (14), 4200–4212. <https://doi.org/10.1021/jm8002075>.
- (52) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron* **1996**, *16* (4), 881–891. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80108-7).
- (53) Sharma, P.; Srivastava, P.; Seth, A.; Tripathi, P. N.; Banerjee, A. G.; Shrivastava, S. K. Comprehensive Review of Mechanisms of Pathogenesis Involved in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Strategies. *Prog. Neurobiol.* **2019**, *174*, 53–89. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.006>.
- (54) Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4* (2), 131–138. <https://doi.org/10.1038/nrn1035>.
- (55) Silver, A. *The Biology of Cholinesterases*; Elsevier: Amsterdam, 1974.
- (56) Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q.-S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; et al. Selective Butyrylcholinesterase Inhibition Elevates Brain Acetylcholine, Augments Learning and Lowers Alzheimer -Amyloid Peptide in Rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (47), 17213–17218. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508575102>.
- (57) Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Pontecorvo, M. J.; Flicker, C. The Cholinergic Hypothesis : A Historical Overview , Current Perspective , and Future Directions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, 332–358.
- (58) Palmer, A. M.; Gershon, S. Is the Neuronal Basis of Alzheimer's Disease Cholinergic or Glutamatergic? *FASEB J.* **1990**, *4* (10), 2745–2752. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.10.2165009>.
- (59) Francis, P. T.; Sims, N. R.; Procter, A. W.; Bowen, D. M. Cortical Pyramidal Neurone Loss May Cause Glutamatergic Hypoactivity and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease:

- Investigative and Therapeutic Perspectives. *J. Neurochem.* **1993**, *60* (5), 1589–1604. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb13381.x>.
- (60) Nitsch, R. M. From Acetylcholine to Amyloid: Neurotransmitters and the Pathology of Alzheimer's Disease. *Neurodegeneration* **1996**, *5* (4), 477–482. <https://doi.org/10.1006/neur.1996.0066>.
- (61) Enz, A.; Floersheim, P. Cholinesterase Inhibitors: An Overview of Their Mechanisms of Action. In *Alzheimer Disease*; Birkhäuser Boston: Boston, MA, 1997; pp 211–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4116-4_31.
- (62) Ramsay, R.; Tipton, K. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1192. <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>.
- (63) Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guénard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L. The Complex of a Bivalent Derivative of Galanthamine with Torpedo Acetylcholinesterase Displays Drastic Deformation of the Active-Site Gorge: Implications for Structure-Based Drug Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (47), 15405–15411. <https://doi.org/10.1021/ja0466154>.
- (64) Fukuto, T. R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245–254. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>.
- (65) Nochi, S.; Asakawa, N.; Sato, T. Kinetic Study on the Inhibition of Acetylcholinesterase by 1-Benzyl-4-[(5,6-Dimethoxy-1-Indanon)-2-Yl]Methylpiperidine Hydrochloride (E2020). *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18* (8), 1145–1147. <https://doi.org/10.1248/bpb.18.1145>.
- (66) Catalán, R. E.; Martínez, A. M.; Aragonés, M. D.; Miguel, B. G.; Hernández, F.; Cruz, E. Tetrahydroaminoacridine Affects the Cholinergic Function of Blood-Brain Barrier. *Life Sci.* **1993**, *53* (14), 1165–1172. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90553-F](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90553-F).
- (67) Gordon, J. J.; Leadbeater, L.; Maidment, M. P. The Protection of Animals against Organophosphate Poisoning by Pretreatment with a Carbamate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1978**, *43* (1), 207–216. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(78\)80045-3](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(78)80045-3).
- (68) Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: A Review. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20* (3), 407–428. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000300003>.
- (69) Shafferman, A.; Velan, B.; Ordentlich, A.; Kronman, C.; Grosfeld, H.; Leitner, M.; Flashner, Y.; Cohen, S.; Barak, D.; Ariel, N. Substrate Inhibition of Acetylcholinesterase: Residues Affecting Signal Transduction from the Surface to the Catalytic Center. *EMBO J.* **1992**, *11* (10), 3561–3568.
- (70) Tsopeles, N. D.; Marin, D. B. Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease. In *Functional Neurobiology of Aging*; Elsevier, 2001; pp 475–486. <https://doi.org/10.1016/B978-012351830-9/50034-2>.
- (71) Hammel, P.; Larrey, D.; Bernuau, J.; Kalafat, M.; Fréneaux, E.; Babany, G.; Degott, C.; Feldmann, G.; Pessayre, D.; Benhamou, J. P. Acute Hepatitis after Tetrahydroaminoacridine Administration for Alzheimer's Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **1990**, *12* (3), 329–331.
- (72) Qizilbash, N.; Birks, J.; López Arrieta, J.; Lewington, S.; Szeto, S. Tacrine for Alzheimer's Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1999**, *272* (24), 1897. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000202>.
- (73) ARICEPT 10MG CPR - Monographie spécialité

- <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=10996&info=CLASS>
(accessed Jul 15, 2019).
- (74) REMINYL 4MG CPR - Monographie spécialité
<http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=13597&info=CLASS>
(accessed Jul 15, 2019).
- (75) Hansen, R. A.; Gartlehner, G.; Webb, A. P.; Morgan, L. C.; Moore, C. G.; Jonas, D. E. Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, and Rivastigmine for the Treatment of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Interv. Aging* **2008**, *3* (2), 211–225.
- (76) Khoury, R.; Rajamanickam, J.; Grossberg, G. T. An Update on the Safety of Current Therapies for Alzheimer's Disease: Focus on Rivastigmine. *Ther. Adv. Drug Saf.* **2018**, *9* (3), 171–178. <https://doi.org/10.1177/2042098617750555>.
- (77) Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 10282–10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>.
- (78) Wilkinson, D. G. The Pharmacology of Donepezil: A New Treatment for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Pharmacother.* **1999**, *1* (1), 121–135. <https://doi.org/10.1517/14656566.1.1.121>.
- (79) Lee, N.-Y.; Kang, Y.-S. The Inhibitory Effect of Rivastigmine and Galantamine on Choline Transport in Brain Capillary Endothelial Cells. *Biomol. Ther.* **2010**, *18* (1), 65–70. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2010.18.1.065>.
- (80) EXELON 1,5MG GELULE - Monographie spécialité
<http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=11413&info=CLASS>
(accessed Jul 15, 2019).
- (81) Birks, J.; Grimley Evans, J.; Iakovidou, V.; Tsolaki, M.; Holt, F. E. Rivastigmine for Alzheimer's Disease. *Cochrane database Syst. Rev.* **2009**, *15* (2), CD001191. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001191.pub2>.
- (82) Chemical Components in the PDB: ACh <https://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/ACH> (accessed Sep 23, 2019).
- (83) PubChem : Rivastigmine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77991> (accessed Sep 23, 2019).
- (84) Bar-On, P.; Millard, C. B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J. L.; Silman, I. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry* **2002**, *41* (11), 3555–3564. <https://doi.org/10.1021/bi020016x>.
- (85) Yu, Q.-S.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Whittaker, N. F.; Brossi, A.; Greig, N. H. Anticholinesterase Activity of Compounds Related to Geneserine Tautomers. N -Oxides and 1,2-Oxazines ||. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (17), 3684–3691. <https://doi.org/10.1021/jm010491d>.
- (86) Luo, W.; Li, Y.-P.; Tan, J.-H.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S. Synthesis and Biological Evaluation of Novel N, N'-Bis-Methylenedioxybenzyl-Alkylenediamines as Bivalent Anti-Alzheimer Disease Ligands. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (5), 706–711. <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.548329>.
- (87) Furukawa-Hibi, Y.; Alkam, T.; Nitta, A.; Matsuyama, A.; Mizoguchi, H.; Suzuki, K.; Moussaoui, S.; Yu, Q. S.; Greig, N. H.; Nagai, T.; et al. Butyrylcholinesterase Inhibitors Ameliorate Cognitive Dysfunction Induced by Amyloid-Beta Peptide in Mice. *Behav. Brain Res.* **2011**, *225* (1), 222–

229. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.035>.
- (88) Kandiah, N.; Pai, M. C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K. W.; Karanam, A. K.; Christopher, S. Rivastigmine: The Advantages of Dual Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Its Role in Subcortical Vascular Dementia and Parkinson's Disease Dementia. *Clin. Interv. Aging* **2017**, *12*, 697–707. <https://doi.org/10.2147/CIA.S129145>.
- (89) Kaur, D.; Sharma, P.; Bharatam, P. V. Amide Resonance in Thio- and Seleno- Carbamates: A Theoretical Study. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *757* (1–3), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.09.019>.
- (90) Dugave, C.; Demange, L. Cis–Trans Isomerization of Organic Molecules and Biomolecules: Implications and Applications †. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (7), 2475–2532. <https://doi.org/10.1021/cr0104375>.
- (91) Moraczewski, A. L.; Banaszynski, L. A.; From, A. M.; White, C. E.; Smith, B. D. Using Hydrogen Bonding to Control Carbamate C–N Rotamer Equilibria. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (21), 7258–7262. <https://doi.org/10.1021/jo980644d>.
- (92) Deetz, M. J.; Forbes, C. C.; Jonas, M.; Malerich, J. P.; Smith, B. D.; Wiest, O. Unusually Low Barrier to Carbamate C–N Rotation. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (11), 3949–3952. <https://doi.org/10.1021/jo025554u>.
- (93) Marcovici-Mizrahi, D.; Gottlieb, H. E.; Marks, V.; Nudelman, A. On the Stabilization of the Syn - Rotamer of Amino Acid Carbamate Derivatives by Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (24), 8402–8406. <https://doi.org/10.1021/jo961446u>.
- (94) Friedman, A.; Kaufer, D.; Shemer, J.; Hendler, I.; Soreq, H.; Tur-Kaspa, I. Pyridostigmine Brain Penetration under Stress Enhances Neuronal Excitability and Induces Early Immediate Transcriptional Response. *Nat. Med.* **1996**, *2* (12), 1382–1385.
- (95) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 2895–2940. <https://doi.org/10.1021/jm501371s>.
- (96) Xiao, Q.; Zhou, H.; Wei, H.; Du, H.; Tan, W.; Zhan, Y.; Pistolozzi, M. A New Method to Characterize the Kinetics of Cholinesterases Inhibited by Carbamates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *144*, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.007>.
- (97) Wilson, I. B.; Harrison, M. A.; Ginsburg, S. Carbamyl Derivatives of Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236* (5), 1498–1500.
- (98) Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. Site-Activated Multifunctional Chelator with Acetylcholinesterase and Neuroprotective–Neurorestorative Moieties for Alzheimer's Therapy. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (14), 4095–4098. <https://doi.org/10.1021/jm900504c>.
- (99) Telpoukhovskaia, M. A.; Patrick, B. O.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Orvig, C. Exploring the Multifunctionality of Thioflavin- and Deferiprone-Based Molecules as Acetylcholinesterase Inhibitors for Potential Application in Alzheimer's Disease. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9* (4), 792. <https://doi.org/10.1039/c3mb25600f>.
- (100) Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. 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. <https://doi.org/10.1021/ja952232h>.
- (101) Dighe, S. N.; De la Mora, E.; Chan, S.; Kantham, S.; McColl, G.; Miles, J. A.; Veliyath, S. K.; Sreenivas, B. Y.; Nassar, Z. D.; Silman, I.; et al. Rivastigmine and Metabolite Analogues with

- Putative Alzheimer's Disease-Modifying Properties in a *Caenorhabditis Elegans* Model. *Commun. Chem.* **2019**, *2* (1), 35. <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0133-4>.
- (102) EBIXA 10MG CPR - Monographie spécialité <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=15101&info=CLASS> (accessed Jul 15, 2019).
- (103) HAS. *Synthèse d'avis de La Commission de La Transparence*; 2017.
- (104) Godyń, J.; Jończyk, J.; Panek, D.; Malawska, B. Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease in Clinical Trials. *Pharmacol. Reports* **2016**, *68* (1), 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.07.006>.
- (105) Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali. A Review on Alzheimer's Disease Pathophysiology and Its Management: An Update. *Pharmacol. Reports* **2015**, *67* (2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>.
- (106) Durães, F.; Pinto, M.; Sousa, E. Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (2), 44. <https://doi.org/10.3390/ph11020044>.
- (107) Wozniak, M. A.; Itzhaki, R. F. Antiviral Agents in Alzheimer's Disease: Hope for the Future? *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2010**, *3* (3), 141–152. <https://doi.org/10.1177/1756285610370069>.
- (108) Mark, R. J.; Wesson Ashford, J.; Goodman, Y.; Mattson, M. P. Anticonvulsants Attenuate Amyloid β -Peptide Neurotoxicity, Ca^{2+} Deregulation, and Cytoskeletal Pathology. *Neurobiol. Aging* **1995**, *16* (2), 187–198. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(94\)00150-2](https://doi.org/10.1016/0197-4580(94)00150-2).
- (109) Wang, J.; Ho, L.; Chen, L.; Zhao, Z.; Zhao, W.; Qian, X.; Humala, N.; Seror, I.; Bartholomew, S.; Rosendorff, C.; et al. Valsartan Lowers Brain β -Amyloid Protein Levels and Improves Spatial Learning in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (11), 3393–3402. <https://doi.org/10.1172/JCI31547>.
- (110) Sheng, M.; Lu, H.; Liu, P.; Li, Y.; Ravi, H.; Peng, S.-L.; Diaz-Arrastia, R.; Devous, M. D.; Womack, K. B. Sildenafil Improves Vascular and Metabolic Function in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *60* (4), 1351–1364. <https://doi.org/10.3233/JAD-161006>.
- (111) Salminen, A.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. Hypoxia/Ischemia Activate Processing of Amyloid Precursor Protein: Impact of Vascular Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* **2017**, *140* (4), 536–549. <https://doi.org/10.1111/jnc.13932>.
- (112) Sheng, M.; Lu, H.; Liu, P.; Li, Y.; Ravi, H.; Peng, S. L.; Diaz-Arrastia, R.; Devous, M. D.; Womack, K. B. Sildenafil Improves Vascular and Metabolic Function in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *60* (4), 1351–1364. <https://doi.org/10.3233/JAD-161006>.
- (113) Cummings, J.; Lee, G.; Mortsdorf, T.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2017. *Alzheimer's Dement. (New York, N. Y.)* **2017**, *3* (3), 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.05.002>.
- (114) Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2018. *Alzheimer's Dement. (New York, N. Y.)* **2018**, *4*, 195–214. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.03.009>.
- (115) Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2019. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2019**, *5* (1), 272–293. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.008>.
- (116) Unsworth, C. D.; Molinoff, P. B. Characterization of a 5-Hydroxytryptamine Receptor in Mouse Neuroblastoma N18TG2 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *269* (1), 246–255.

- (117) Lummis, S. C. R. 5-HT₃ Receptors. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (48), 40239–40245. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406496>.
- (118) Masson, J.; Emerit, M. B.; Hamon, M.; Darmon, M. Serotonergic Signaling: Multiple Effectors and Pleiotropic Effects. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2012**, *1* (6), 685–713. <https://doi.org/10.1002/wmts.50>.
- (119) Leung, C.; Wong, Y. Role of G Protein-Coupled Receptors in the Regulation of Structural Plasticity and Cognitive Function. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1239. <https://doi.org/10.3390/molecules22071239>.
- (120) Lalut, J.; Karila, D.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ Receptors in Alzheimer's Disease Treatment. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (8), 781–795. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0031>.
- (121) Giannoni, P.; Gaven, F.; de Bundel, D.; Baranger, K.; Marchetti-Gauthier, E.; Roman, F. S.; Valjent, E.; Marin, P.; Bockaert, J.; Rivera, S.; et al. Early Administration of RS 67333, a Specific 5-HT₄ Receptor Agonist, Prevents Amyloidogenesis and Behavioral Deficits in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5* (DEC), 96. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00096>.
- (122) Lezoualc'h, F. 5-HT₄ Receptor and Alzheimer's Disease: The Amyloid Connection. *Exp. Neurol.* **2007**, *205* (2), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.02.001>.
- (123) Claeysen, S.; Bockaert, J.; Giannoni, P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (7), 940–943. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5b00135>.
- (124) Bureau, R.; Varin, T.; Lepailleur, A.; Daveu, C.; Lemaitre, S.; Lancelot, J.-C.; Lesnard, A.; Butt-Gueulle, S.; Dauphin, F.; Rault, S. Pharmacophores of 5-HT₄ Receptor Ligands: Experience of CERMN and Implications for Drug Design. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **2008**, *4* (3), 199–208. <https://doi.org/10.2174/157340908785747384>.
- (125) Irving, H. R.; Tochon-Danguy, N.; Chinkwo, K. A.; Li, J. G.; Grabbe, C.; Shapiro, M.; Pouton, C. W.; Coupar, I. M. Investigations into the Binding Affinities of Different Human 5-HT₄ Receptor Splice Variants. *Pharmacology* **2010**, *85* (4), 224–233. <https://doi.org/10.1159/000280418>.
- (126) Eglén, R. M.; Bonhaus, D. W.; Johnson, L. G.; Leung, E.; Clark, R. D. Pharmacological Characterization of Two Novel and Potent 5-HT₄ Receptor Agonists, RS 67333 and RS 67506, in Vitro and in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *115* (8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb16628.x>.
- (127) Tack, J.; Camilleri, M.; Chang, L.; Chey, W. D.; Galligan, J. J.; Lacy, B. E.; Müller-Lissner, S.; Quigley, E. M. M.; Schuurkes, J.; De Maeyer, J. H.; et al. Systematic Review: Cardiovascular Safety Profile of 5-HT₄ Agonists Developed for Gastrointestinal Disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35* (7), 745–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05011.x>.
- (128) Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert Freon, A.; et al. Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), E3825–E3830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111>.
- (129) Rochais, C.; Lecoutey, C.; Gaven, F.; Giannoni, P.; Hamidouche, K.; Hedou, D.; Dubost, E.; Genest, D.; Yahiaoui, S.; Freret, T.; et al. Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J. Med.*

- Chem.* **2015**, *58* (7), 3172–3187. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00115>.
- (130) Ramírez, M. J. 5-HT₆ Receptors and Alzheimer's Disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **2013**, *5* (15), 1–8. <https://doi.org/10.1186/alzrt169>.
- (131) Quiedeville, A.; Boulouard, M.; Hamidouche, K.; Da Silva Costa-Aze, V.; Nee, G.; Rochais, C.; Dallemagne, P.; Fabis, F.; Freret, T.; Bouet, V. Chronic Activation of 5-HT₄ Receptors or Blockade of 5-HT₆ Receptors Improve Memory Performances. *Behav. Brain Res.* **2015**, *293*, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.020>.
- (132) Benhamu, B.; Mart, M.; Va, H.; Pardo, L.; Lo, L. Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists for the Treatment of Cognitive De Fi Cieny in Alzheimer's Disease. *J Med Chem* **2014**, *57*, 7160–7181.
- (133) Fone, K. C. F. An Update on the Role of the 5-Hydroxytryptamine 6 Receptor in Cognitive Function. *Neuropharmacology* **2008**, *55* (6), 1015–1022. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.061>.
- (134) Karila, D.; Freret, T.; Bouet, V.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Therapeutic Potential of 5-HT₆ Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (20), 7901–7912. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00179>.
- (135) Haass, C.; Mandelkow, E. Fyn-Tau-Amyloid: A Toxic Triad. *Cell* **2010**, *142* (3), 356–358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.032>.
- (136) Yun, H.; Rhim, H. The Serotonin-6 Receptor as a Novel Therapeutic Target. *Exp. Neurobiol.* **2011**, *20* (4), 159–168.
- (137) Arnt, J.; Bang-Andersen, B.; Grayson, B.; Bymaster, F. P.; Cohen, M. P.; DeLapp, N. W.; Giethlen, B.; Kreilgaard, M.; McKinzie, D. L.; Neill, J. C.; et al. Lu AE58054, a 5-HT₆ Antagonist, Reverses Cognitive Impairment Induced by Subchronic Phencyclidine in a Novel Object Recognition Test in Rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2010**, *13* (8), 1021–1033. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000659>.
- (138) Schneider, L. S. Idalopirdine for Alzheimer's Disease: Written in the Stars. *Lancet Neurol.* **2014**, *13* (11), 1063–1065. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70232-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70232-7).
- (139) Galimberti, D.; Scarpini, E. Idalopirdine as a Treatment for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2015**, *24* (7), 981–987. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1052402>.
- (140) ARICEPT 5MG CPR - Monographie spécialité http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=10995&info=CLASS#CLASS_bk2 (accessed Sep 2, 2019).
- (141) Efficacy Study Exploring the Effect of Lu AE58054 as Augmentation Therapy in Patients With Schizophrenia <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00810667?term=Lu+AE58054&rank=7> (accessed Sep 2, 2019).
- (142) Garay, R. P.; Bourin, M.; de Paillette, E.; Samalin, L.; Hameg, A.; Llorca, P.-M. Potential Serotonergic Agents for the Treatment of Schizophrenia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2016**, *25* (2), 159–170. <https://doi.org/10.1517/13543784.2016.1121995>.
- (143) Atri, A.; Frölich, L.; Ballard, C.; Tariot, P. N.; Molinuevo, J. L.; Boneva, N.; Windfeld, K.; Raket, L. L.; Cummings, J. L. Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA* **2018**, *319* (2), 130. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.20373>.
- (144) Koshy Cherian, A.; Kucinski, A.; Wu, R.; de Jong, I. E. M.; Sarter, M. Co-Treatment with

- Rivastigmine and Idalopirdine Reduces the Propensity for Falls in a Rat Model of Falls in Parkinson's Disease. *Psychopharmacology (Berl)*. **2019**, 236 (6), 1701–1715. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5150-y>.
- (145) Yahiaoui, S.; Hamidouche, K.; Ballandonne, C.; Davis, A.; de Oliveira Santos, J. S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Partial Agonist and 5-HT₆R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 121, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.048>.
- (146) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (21), 6523–6543. <https://doi.org/10.1021/jm058225d>.
- (147) Simone, K.; Dias, T.; Viegas, C. Multi-Target Directed Drugs : A Modern Approach for Design of New Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, 12, 239–255.
- (148) Carreiras, M.; Mendes, E.; Perry, M.; Francisco, A.; Marco-Contelles, J. The Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease for Developing Potential Therapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, 13 (15), 1745–1770. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990135>.
- (149) Bolognesi, M. L.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. Alzheimer's Disease: New Approaches to Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13 (3), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.619>.
- (150) Savelieff, M. G.; Nam, G.; Kang, J.; Lee, H. J.; Lee, M.; Lim, M. H. Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (2), 1221–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00138>.
- (151) Das, N.; Dhanawat, M.; Dash, B.; Nagarwal, R. C.; Shrivastava, S. K. Codrug: An Efficient Approach for Drug Optimization. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, 41 (5), 571–588. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.014>.
- (152) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- (153) Bolognesi, M. L. Harnessing Polypharmacology with Medicinal Chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10 (3), 273–275. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00039>.
- (154) Zhang, P.; Xu, S.; Zhu, Z.; Xu, J. Multi-Target Design Strategies for the Improved Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 176, 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.020>.
- (155) Prati, F.; De Simone, A.; Bisignano, P.; Armirotti, A.; Summa, M.; Pizzirani, D.; Scarpelli, R.; Perez, D. I.; Andrisano, V.; Perez-Castillo, A.; et al. Multitarget Drug Discovery for Alzheimer's Disease: Triazinones as BACE-1 and GSK-3 β Inhibitors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, 54 (5), 1578–1582. <https://doi.org/10.1002/anie.201410456>.
- (156) Wang, Z.; Wang, Y.; Wang, B.; Li, W.; Huang, L.; Li, X. Design, Synthesis, and Evaluation of Orally Available Clioquinol-Moracin M Hybrids as Multitarget-Directed Ligands for Cognitive Improvement in a Rat Model of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (21), 8616–8637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01222>.
- (157) Viayna, E.; Sola, I.; Bartolini, M.; De Simone, A.; Tapia-Rojas, C.; Serrano, F. G.; Sabaté, R.; Juárez-Jiménez, J.; Pérez, B.; Luque, F. J.; et al. Synthesis and Multitarget Biological Profiling of a Novel

- Family of Rhein Derivatives As Disease-Modifying Anti-Alzheimer Agents. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (6), 2549–2567. <https://doi.org/10.1021/jm401824w>.
- (158) Sivaprakasam, P.; Han, X.; Civiello, R. L.; Jacutin-Porte, S.; Kish, K.; Pokross, M.; Lewis, H. A.; Ahmed, N.; Szapiel, N.; Newitt, J. A.; et al. Discovery of New Acylaminopyridines as GSK-3 Inhibitors by a Structure Guided in-Depth Exploration of Chemical Space around a Pyrrolopyridinone Core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (9), 1856–1863. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2015.03.046>.
- (159) Reis, J.; Cagide, F.; Valencia, M. E.; Teixeira, J.; Bagetta, D.; Pérez, C.; Uriarte, E.; Oliveira, P. J.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; et al. Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease: Discovery of Chromone-Based Monoamine Oxidase/Cholinesterase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 158, 781–800. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.056>.
- (160) Xie, S.-S.; Wang, X.-B.; Li, J.-Y.; Yang, L.; Kong, L.-Y. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine–Coumarin Hybrids as Multifunctional Cholinesterase Inhibitors against Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 64, 540–553. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.051>.
- (161) Simoni, E.; Daniele, S.; Bottegoni, G.; Pizzirani, D.; Trincavelli, M. L.; Goldoni, L.; Tarozzo, G.; Reggiani, A.; Martini, C.; Piomelli, D.; et al. Combining Galantamine and Memantine in Multitargeted, New Chemical Entities Potentially Useful in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (22), 9708–9721. <https://doi.org/10.1021/jm3009458>.
- (162) Huang, W.; Tang, L.; Shi, Y.; Huang, S.; Xu, L.; Sheng, R.; Wu, P.; Li, J.; Zhou, N.; Hu, Y. Searching for the Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease: Discovery of Quinoxaline-Based Hybrid Compounds with AChE, H3R and BACE 1 Inhibitory Activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19 (23), 7158–7167. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.061>.
- (163) Lecoutey, C.; Rochais, C.; Genest, D.; Butt-Gueulle, S.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Dulin, F.; Lepailleur, A.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Dallemagne, P. Synthesis of Dual AChE/5-HT4 Receptor Multi-Target Directed Ligands. *Medchemcomm* **2012**, 3 (5), 627. <https://doi.org/10.1039/c2md20063e>.
- (164) Lalut, J.; Santoni, G.; Karila, D.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Nachon, F.; Silman, I.; Sussman, J.; Weik, M.; Maurice, T.; et al. Novel Multitarget-Directed Ligands Targeting Acetylcholinesterase and $\Sigma 1$ Receptors as Lead Compounds for Treatment of Alzheimer's Disease: Synthesis, Evaluation, and Structural Characterization of Their Complexes with Acetylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 162, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.064>.
- (165) Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; et al. Novel Multi Target-Directed Ligands Targeting 5-HT4 Receptors with in Cellulo Antioxidant Properties as Promising Leads in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 182, 111596. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>.
- (166) Hatat, B.; Yahiaoui, S.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Freret, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. A Novel in Vivo Anti-Amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT4R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT6R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Inter. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, 11, 148. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00148>.
- (167) Freret, T.; Bouet, V.; Quiedeville, A.; Nee, G.; Dallemagne, P.; Rochais, C.; Boulouard, M. Synergistic Effect of Acetylcholinesterase Inhibition (Donepezil) and 5-HT4 Receptor Activation (RS67333) on Object Recognition in Mice. *Behav. Brain Res.* **2012**, 230 (1), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.012>.
- (168) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs:

- Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>.
- (169) Rautio, J. *Prodrugs and Targeted Delivery*, Wiley.; Rautio, J., Ed.; Methods and Principles in Medicinal Chemistry; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2010. <https://doi.org/10.1002/9783527633166>.
- (170) Wu, K.-M. A New Classification of Prodrugs: Regulatory Perspectives. *Pharmaceuticals* **2009**, *2* (3), 77–81. <https://doi.org/10.3390/ph2030077>.
- (171) Leppänen, J.; Huuskonen, J.; Nevalainen, T.; Gynther, J.; Taipale, H.; Järvinen, T. Design and Synthesis of a Novel L-Dopa–Entacapone Codrug. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (6), 1379–1382. <https://doi.org/10.1021/jm010980d>.
- (172) Bodor, N.; Buchwald, P. Soft Drug Design: General Principles and Recent Applications. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20* (1), 58–101. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(200001\)20:1<58::AID-MED3>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(200001)20:1<58::AID-MED3>3.0.CO;2-X).
- (173) Tunek, A.; Svensson, L. A. Bambuterol, a Carbamate Ester Prodrug of Terbutaline, as Inhibitor of Cholinesterases in Human Blood. *Drug Metab. Dispos.* **1988**, *16* (5), 759–764.
- (174) Svensson, L. Å.; Tunek, A. The Design and Bioactivation of Presystemically Stable Prodrugs. *Drug Metab. Rev.* **1988**, *19* (2), 165–194. <https://doi.org/10.3109/03602538809049622>.
- (175) Pistolozzi, M.; Du, H.; Wei, H.; Tan, W. Stereoselective Inhibition of Human Butyrylcholinesterase by the Enantiomers of Bambuterol and Their Intermediates. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, *43* (3), 344–352. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060251>.
- (176) Sestito, S.; Daniele, S.; Pietrobono, D.; Citi, V.; Bellusci, L.; Chiellini, G.; Calderone, V.; Martini, C.; Rapposelli, S. Memantine Prodrug as a New Agent for Alzheimer’s Disease. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 4612. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40925-8>.
- (177) Zhang, X.; Bian, J.-S. Hydrogen Sulfide: A Neuromodulator and Neuroprotectant in the Central Nervous System. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (10), 876–883. <https://doi.org/10.1021/cn500185g>.
- (178) Liu, Y.-Y.; Bian, J.-S. Hydrogen Sulfide Protects Amyloid- β Induced Cell Toxicity in Microglia. *J. Alzheimer’s Dis.* **2011**, *22* (4), 1189–1200. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101002>.
- (179) Bohn, P.; Gourand, F.; Papamicaël, C.; Ibazizène, M.; Dhilly, M.; Gembus, V.; Alix, F.; Tîntas, M.-L.; Marsais, F.; Barré, L.; et al. Dihydroquinoline Carbamate Derivatives as “Bio-Oxidizable” Prodrugs for Brain Delivery of Acetylcholinesterase Inhibitors: [11C] Radiosynthesis and Biological Evaluation. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (5), 737–744. <https://doi.org/10.1021/cn5003539>.
- (180) Azzouz, R.; Peauger, L.; Gembus, V.; Tîntaş, M.-L.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Papamicaël, C.; Levacher, V. Novel Donepezil-like N -Benzylpyridinium Salt Derivatives as AChE Inhibitors and Their Corresponding Dihydropyridine “Bio-Oxidizable” Prodrugs: Synthesis, Biological Evaluation and Structure-Activity Relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 165–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.084>.
- (181) Peauger, L.; Azzouz, R.; Gembus, V.; Tîntaş, M.-L.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Bohn, P.; Papamicaël, C.; Levacher, V. Donepezil-Based Central Acetylcholinesterase Inhibitors by Means of a “Bio-Oxidizable” Prodrug Strategy: Design, Synthesis, and in Vitro Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5909–5926. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00702>.
- (182) Barré, A.; Azzouz, R.; Gembus, V.; Papamicaël, C.; Levacher, V. Design, Synthesis, and In Vitro

- Biological Activities of a Bio-Oxidizable Prodrug to Deliver Both ChEs and DYRK1A Inhibitors for AD Therapy. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1264. <https://doi.org/10.3390/molecules24071264>.
- (183) Alix, F.; Gembus, V.; Coquet, L.; Hubert-Roux, M.; Chan, P.; Truong, L.; Sebban, M.; Coadou, G.; Oulyadi, H.; Papamicaël, C.; et al. Dihydroquinoline Carbamate DQS1-02 as a Prodrug of a Potent Acetylcholinesterase Inhibitor for Alzheimer's Disease Therapy: Multigram-Scale Synthesis, Mechanism Investigations, in Vitro Safety Pharmacology, and Preliminary in Vivo Toxicology Profile. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 18387–18397. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02121>.
- (184) Weinstock, M.; Bejar, C.; Wang, R.-H.; Poltyrev, T.; Gross, A.; Finberg, J. P. M.; Youdim, M. B. H. TV3326, a Novel Neuroprotective Drug with Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibitory Activities for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Adv. Res. Neurodegener.* **2000**, *13* (60), 157–169. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6301-6_10.
- (185) Kalir, A.; Sabbagh, A.; Youdim, M. B. Selective Acetylenic "suicide" and Reversible Inhibitors of Monoamine Oxidase Types A and B. *Br. J. Pharmacol.* **1981**, *73* (1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1981.tb16771.x>.
- (186) Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. H. Ladostigil: A Novel Multimodal Neuroprotective Drug with Cholinesterase and Brain-Selective Monoamine Oxidase Inhibitory Activities for Alzheimer's Disease Treatment. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13* (4), 483–494. <https://doi.org/10.2174/138945012799499794>.
- (187) Hubálek, F.; Binda, C.; Li, M.; Herzig, Y.; Sterling, J.; Youdim, M. B. H.; Mattevi, A.; Edmondson, D. E. Inactivation of Purified Human Recombinant Monoamine Oxidases A and B by Rasagiline and Its Analogues. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1760–1766. <https://doi.org/10.1021/jm0310885>.
- (188) Sterling, J.; Herzig, Y.; Goren, T.; Finkelstein, N.; Lerner, D.; Goldenberg, W.; Miskolczi, I.; Molnar, S.; Rantal, F.; Tamas, T.; et al. Novel Dual Inhibitors of AChE and MAO Derived from Hydroxy Aminoindan and Phenethylamine as Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (24), 5260–5279. <https://doi.org/10.1021/jm020120c>.
- (189) Avraham Pharma - Clinical Data <http://www.avphar.com/ladostigil/clinical-data/> (accessed Jul 23, 2019).
- (190) Schneider, L. S.; Geffen, Y.; Rabinowitz, J.; Thomas, R. G.; Schmidt, R.; Ropele, S.; Weinstock, M. Low-Dose Ladostigil for Mild Cognitive Impairment. *Neurology* **2019**. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008239>.
- (191) Shachar, D. Ben; Kahana, N.; Kampel, V.; Warshawsky, A.; Youdim, M. B. H. Neuroprotection by a Novel Brain Permeable Iron Chelator, VK-28, against 6-Hydroxydopamine Lesion in Rats. *Neuropharmacology* **2004**, *46* (2), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.09.005>.
- (192) Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. Selective Acetylcholinesterase Inhibitor Activated by Acetylcholinesterase Releases an Active Chelator with Neurorescuing and Anti-Amyloid Activities. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1* (11), 737–746. <https://doi.org/10.1021/cn100069c>.
- (193) Biancalana, M.; Koide, S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804* (7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.
- (194) Rodríguez-Rodríguez, C.; Sánchez de Groot, N.; Rimola, A.; Alvarez-Larena, A.; Lloveras, V.; Vidal-Gancedo, J.; Ventura, S.; Vendrell, J.; Sodupe, M.; González-Duarte, P. Design, Selection, and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating

- Properties for Application in Alzheimer's Disease. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (4), 1436–1451. <https://doi.org/10.1021/ja806062g>.
- (195) Jourdan, J.-P.; Since, M.; El Kihel, L.; Lecoutey, C.; Corvaisier, S.; Legay, R.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Cresteil, T.; Malzert-Fréon, A.; Rochais, C.; et al. Novel Benzylidenephénylpyrrolizinones with Pleiotropic Activities Potentially Useful in Alzheimer's Disease Treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *114*, 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.023>.
- (196) Li, Y.; Peng, P.; Tang, L.; Hu, Y.; Hu, Y.; Sheng, R. Design, Synthesis and Evaluation of Rivastigmine and Curcumin Hybrids as Site-Activated Multitarget-Directed Ligands for Alzheimer's Disease Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (17), 4717–4725. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.009>.
- (197) Chen, Z.; Digiacomio, M.; Tu, Y.; Gu, Q.; Wang, S.; Yang, X.; Chu, J.; Chen, Q.; Han, Y.; Chen, J.; et al. Discovery of Novel Rivastigmine-Hydroxycinnamic Acid Hybrids as Multi-Targeted Agents for Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.052>.
- (198) Demerson, C. A.; Humber, L. G.; Philipp, A. H.; Martel, R. R. Etodolic Acid and Related Compounds. Chemistry and Antiinflammatory Actions of Some Potent Di- and Trisubstituted 1, 3, 4, 9-Tetrahydropyrano [3, 4-b] Indole-1-Acetic Acids. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (3), 391–395.
- (199) Elderfield, R. C.; Fischer, B. A. Alstonia Alkaloids. IX. Synthesis of Alstonilol and Analogs by Reductive Ring Closure. *J. Org. Chem.* **1958**, *23* (7), 949–953. <https://doi.org/10.1021/jo01101a003>.
- (200) Guérin, C.; Bellosta, V.; Guillamot, G.; Cossy, J. Mild Nonpimerizing N-Alkylation of Amines by Alcohols without Transition Metals. *Org. Lett.* **2011**, *13* (13), 3534–3537. <https://doi.org/10.1021/ol201351a>.
- (201) Ślusarska, E.; Zwierzak, A. Conversion of Alcohols into Primary Amines, a New Mitsunobu Version of Gabriel-type Synthesis. *Liebigs Ann. der Chemie* **1986**, *1986* (2), 402–405. <https://doi.org/10.1002/jlac.198619860221>.
- (202) Xu, Y.-C.; Schaus, J. M.; Walker, C.; Krushinski, J.; Adham, N.; Zgombick, J. M.; Liang, S. X.; Kohlman, D. T.; Audia, J. E. N-Methyl-5-Tert-Butyltryptamine: A Novel, Highly Potent 5-HT_{1D} Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (3), 526–531. <https://doi.org/10.1021/jm9805945>.
- (203) Muratore, M. E.; Holloway, C. A.; Pilling, A. W.; Storer, R. I.; Trevitt, G.; Dixon, D. J. Enantioselective Bronsted Acid-Catalyzed N-Acyliminium Cyclization Cascades. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (31), 10796–10797. <https://doi.org/10.1021/ja9024885>.
- (204) Martin, D. B. C.; Vanderwal, C. D. Efficient Access to the Core of the Strychnos, Aspidosperma and Iboga Alkaloids. A Short Synthesis of Norfluorocurarine. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (10), 3472–3473. <https://doi.org/10.1021/ja900640v>.
- (205) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7* (2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- (206) Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. Development of a Radioligand Binding Assay for 5-HT₄ Receptors in Guinea-Pig and Rat Brain. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109* (3), 618–624. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13617.x>.
- (207) Chen, D.; Soh, C. K.; Goh, W. H.; Wang, H. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Fused Pyrimidine-Based Hydroxamates for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J. Med. Chem.*

- 2018**, 61 (4), 1552–1575. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01465>.
- (208) Sleight, A. J.; Boess, F. G.; Bös, M.; Levet-Trafit, B.; Riemer, C.; Bourson, A. Characterization of Ro 04-6790 and Ro 63-0563: Potent and Selective Antagonists at Human and Rat 5-HT₆ Receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, 124 (3), 556–562. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701851>.
- (209) Stein, H. H.; Lewis, G. J. Noncompetitive Inhibition of Acetylcholinesterase by Eserine. *Biochem. Pharmacol.* **1969**, 18 (7), 1679–1684. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(69\)90156-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(69)90156-7).
- (210) Kamal, M. A.; Greig, N. H.; Alhomida, A. S.; Al-Jafari, A. A. Kinetics of Human Acetylcholinesterase Inhibition by the Novel Experimental Alzheimer Therapeutic Agent, Tolserine. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 60 (4), 561–570. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00330-0).
- (211) Zheng, H.; Fridkin, M.; Youdim, M. B. H. Site-Activated Chelators Derived from Anti-Parkinson Drug Rasagiline as a Potential Safer and More Effective Approach to the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* **2010**, 35 (12), 2117–2123. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0293-1>.
- (212) Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. Site-Activated Chelators Targeting Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidase for Alzheimer's Therapy. *ACS Chem. Biol.* **2010**, 5 (6), 603–610. <https://doi.org/10.1021/cb900264w>.
- (213) Meden, A.; Knez, D.; Jukič, M.; Brazzolotto, X.; Gršič, M.; Pišlar, A.; Zahirović, A.; Kos, J.; Nachon, F.; Svete, J.; et al. Tryptophan-Derived Butyrylcholinesterase Inhibitors as Promising Leads against Alzheimer's Disease. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (26), 3765–3768. <https://doi.org/10.1039/C9CC01330J>.
- (214) Lecoutey, C.; Rochais, C.; Genest, D.; Butt-Gueulle, S.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Dulin, F.; Lepailleur, A.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Dallemagne, P. Synthesis of Dual AChE/5-HT₄ Receptor Multi-Target Directed Ligands. *Medchemcomm* **2012**, 3 (5), 627. <https://doi.org/10.1039/c2md20063e>.
- (215) Hooper, N.; Fraser, C.; Stone, T. W. Effects of Purine Analogues on Spontaneous Alternation in Mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **1996**, 123 (3), 250–257. <https://doi.org/10.1007/BF02246579>.
- (216) Babin, V. Conception de Nouveaux Agents Iodés Pour l'imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT₄, 2018.
- (217) Hazari, P. P.; Pandey, A.; Chaturvedi, S.; Mishra, A. K. New Trends and Current Status of Positron-Emission Tomography and Single-Photon-Emission Computerized Tomography Radioligands for Neuronal Serotonin Receptors and Serotonin Transporter. *Bioconj. Chem.* **2017**, 28 (11), 2647–2672. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00243>.
- (218) Sgambato-Faure, V.; Billard, T.; Météreau, E.; Duperrier, S.; Fieux, S.; Costes, N.; Tremblay, L.; Zimmer, L. Characterization and Reliability of [18F]2FNQ1P in Cynomolgus Monkeys as a PET Radiotracer for Serotonin 5-HT₆ Receptors. *Front. Pharmacol.* **2017**, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00471>.
- (219) Colomb, J.; Becker, G.; Fieux, S.; Zimmer, L.; Billard, T. Syntheses, Radiolabelings, and in Vitro Evaluations of Fluorinated PET Radioligands of 5-HT₆ Serotonergic Receptors. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (9), 3884–3890. <https://doi.org/10.1021/jm500372e>.
- (220) Laduron, F.; Tamborowski, V.; Moens, L.; Horváth, A.; De Smaele, D.; Leurs, S. Efficient and Scalable Method for the Selective Alkylation and Acylation of Secondary Amines in the Presence of Primary Amines. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, 9 (1), 102–104.

- <https://doi.org/10.1021/op049812w>.
- (221) Sutton, J. C.; Bolton, S. A.; Davis, M. E.; Hartl, K. S.; Jacobson, B.; Mathur, A.; Ogletree, M. L.; Slusarchyk, W. A.; Zahler, R.; Seiler, S. M.; et al. Solid-Phase Synthesis and SAR of 4-Carboxy-2-Azetidinone Mechanism-Based Tryptase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (9), 2233–2239. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.02.012>.
- (222) Yang, W.; Wang, Y.; Roberge, J. Y.; Ma, Z.; Liu, Y.; Michael Lawrence, R.; Rotella, D. P.; Seethala, R.; Feyen, J. H. M.; Dickson, J. K. Discovery and Structure–Activity Relationships of 2-Benzylpyrrolidine-Substituted Aryloxypropanols as Calcium-Sensing Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (4), 1225–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.11.071>.
- (223) Kaspi, J.; Lerman, O.; Arad, O.; Alnabari, M.; Sery, Y. Process for the Preparation of Donepezil EP 1 386 607 B1, 2006.
- (224) Bandgar, B. P.; Sadavarte, V. S.; Uppalla, L. S. An Expedient and Highly Selective Iodination of Alcohols Using a KI/BF₃.Et₂O System. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (5), 951–953. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01953-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01953-5).
- (225) Robaire, B.; Kato, G. Effects and of Edrophonium, Eserine, Decamethonium, d-Tubocurarine, and Gallamine on the Kinetics of Membrane-Bound and Solubilized Eel Acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11* (6), 722–734.
- (226) Bacalhau, P.; San Juan, A. A.; Goth, A.; Caldeira, A. T.; Martins, R.; Burke, A. J. Insights into (S)-Rivastigmine Inhibition of Butyrylcholinesterase (BuChE): Molecular Docking and Saturation Transfer Difference NMR (STD-NMR). *Bioorg. Chem.* **2016**, *67*, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.06.002>.
- (227) Toublert, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Hatat, B.; Davis, A.; Since, M.; Corvaisier, S.; Freret, T.; Sopkova de Oliveira Santos, J.; Claeysen, S.; et al. Inhibiting Acetylcholinesterase to Activate Pleiotropic Prodrugs with Therapeutic Interest in Alzheimer’s Disease. *Molecules* **2019**, *24* (15), 2786. <https://doi.org/10.3390/molecules24152786>.
- (228) Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. Self-Immolative Dendrimers. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (37), 4494–4499. <https://doi.org/10.1002/anie.200351962>.
- (229) Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J. C.; Gesson, J. P. Design of Selectively Activated Anticancer Prodrugs: Elimination and Cyclization Strategies. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2002**, *2* (2), 155–185. <https://doi.org/10.2174/1568011023354173>.
- (230) Carl, P. L.; Chakravarty, P. K.; Katzenellenbogen, J. A. A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design. *J. Med. Chem.* **1981**, *24* (5), 479–480. <https://doi.org/10.1021/jm00137a001>.
- (231) Tranoy-Opalinski, I.; Fernandes, A.; Thomas, M.; Gesson, J.-P.; Papot, S. Design of Self-Immolative Linkers for Tumour-Activated Prodrug Therapy. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2008**, *8* (6), 618–637. <https://doi.org/10.2174/1871520610808060618>.
- (232) Park, J.; Kim, Y. An Improved Fluorogenic Substrate for the Detection of Alkaline Phosphatase Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (8), 2332–2335. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.063>.
- (233) Damen, E. W. P.; Nevalainen, T. J.; van den Bergh, T. J. M.; de Groot, F. M. H.; Scheeren, H. W. Synthesis of Novel Paclitaxel Prodrugs Designed for Bioreductive Activation in Hypoxic Tumour Tissue. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10* (1), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00235-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00235-8).

- (234) Hutchins, J. E. C.; Fife, T. H. Fast Intramolecular Nucleophilic Attack by Phenoxide Ion on Carbamate Ester Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (7), 2282–2286. <https://doi.org/10.1021/ja00788a030>.
- (235) Bouvier, E.; Thiroit, S.; Schmidt, F.; Monneret, C. A New Paclitaxel Prodrug for Use in ADEPT Strategy. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (19), 3343–3352. <https://doi.org/10.1002/anie.200500842>.
- (236) Gopin, A.; Pessah, N.; Shamis, M.; Rader, C.; Shabat, D. A Chemical Adaptor System Designed to Link a Tumor-Targeting Device with a Prodrug and an Enzymatic Trigger. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (3), 327–332. <https://doi.org/10.1002/anie.200390108>.
- (237) Amir, R. J.; Popkov, M.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F.; Shabat, D. Prodrug Activation Gated by a Molecular “OR” Logic Trigger. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (28), 4378–4381. <https://doi.org/10.1002/anie.200500842>.
- (238) de Groot, F. M. H.; Albrecht, C.; Koekkoek, R.; Beusker, P. H.; Scheeren, H. W. “Cascade-Release Dendrimers” Liberate All End Groups upon a Single Triggering Event in the Dendritic Core. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (37), 4490–4494. <https://doi.org/10.1002/anie.200351942>.
- (239) Blencowe, C. A.; Russell, A. T.; Greco, F.; Hayes, W.; Thornthwaite, D. W. Self-Immolative Linkers in Polymeric Delivery Systems. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (4), 773–790. <https://doi.org/10.1039/C0PY00324G>.
- (240) Bolton, J. L.; Dunlap, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30* (1), 13–37. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00256>.
- (241) Bolton, J. L.; Dunlap, T. L.; Dietz, B. M. Formation and Biological Targets of Botanical O-Quinones. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *120* (April), 700–707. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.050>.
- (242) Azoulay, M.; Chalard, F.; Gesson, J.-P.; Florent, J.-C.; Monneret, C. 2-Nitro and 4-Nitro-Quinone-Methides Are Not Irreversible Inhibitors of Bovine β -Glucuronidase. *Carbohydr. Res.* **2001**, *332* (2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00083-0).
- (243) Wang, P.; Song, Y.; Zhang, L.; He, H.; Zhou, X. Quinone Methide Derivatives: Important Intermediates to DNA Alkylating and DNA Cross-Linking Actions. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (24), 2893–2913. <https://doi.org/10.2174/092986705774454724>.
- (244) Bolton, J. Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18* (1), 61–69. <https://doi.org/10.2174/138527281801140121123046>.
- (245) Yan, J.; Lee, S.; Zhang, A.; Yoon, J. Self-Immolative Colorimetric, Fluorescent and Chemiluminescent Chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (18), 6900–6916. <https://doi.org/10.1039/C7CS00841D>.
- (246) Acton, A. L.; Leroux, F.; Feula, A.; Melia, K.; Sambrook, M. R.; Hayes, W.; Russell, A. T. Self-Immolative Systems for the Disclosure of Reactive Electrophilic Alkylating Agents. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (36), 5219–5222. <https://doi.org/10.1039/c8cc09728c>.
- (247) Davies, S.; Oliveira, B. L.; Bernardes, G. J. L. Development of a Self-Immolative Linker for Tetrazine-Triggered Release of Alcohols in Cells. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (23), 5725–5730. <https://doi.org/10.1039/c9ob01167f>.
- (248) Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Bloomfield, A.; Dorton, R.; Nelson, M.; Vetzal, M.; Kleindl, P.; Hahn,

- S.; Wang, K.; Vlahov, I. R. Prostate-Specific Membrane Antigen-Specific Antitumor Activity of a Self-Immolative Tubulysin Conjugate. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (6), 1805–1813. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00335>.
- (249) Kock, A.; Zuwala, K.; Smith, A. A. A.; Ruiz-Sanchis, P.; Wohl, B. M.; Tolstrup, M.; Zelikin, A. N. Disulfide Reshuffling Triggers the Release of a Thiol-Free Anti-HIV Agent to Make up Fast-Acting, Potent Macromolecular Prodrugs. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (93), 14498–14500. <https://doi.org/10.1039/C4CC04280H>.
- (250) Lin, V. S.; Chen, W.; Xian, M.; Chang, C. J. Chemical Probes for Molecular Imaging and Detection of Hydrogen Sulfide and Reactive Sulfur Species in Biological Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4596–4618. <https://doi.org/10.1039/C4CS00298A>.
- (251) Seven, O.; Sozmen, F.; Simsek Turan, I. Self Immolative Dioxetane Based Chemiluminescent Probe for H₂O₂ Detection. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *239*, 1318–1324. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.120>.
- (252) Wang, X.; Li, P.; Ding, Q.; Wu, C.; Zhang, W.; Tang, B. Observation of Acetylcholinesterase in Stress-Induced Depression Phenotypes by Two-Photon Fluorescence Imaging in the Mouse Brain. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (5), 2061–2068. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11414>.
- (253) Huang, M.; Xie, S.-S.; Jiang, N.; Lan, J.-S.; Kong, L.-Y.; Wang, X.-B. Multifunctional Coumarin Derivatives: Monoamine Oxidase B (MAO-B) Inhibition, Anti- β -Amyloid (A β) Aggregation and Metal Chelation Properties against Alzheimer's Disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (3), 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.034>.
- (254) Hakamata, W.; Tamura, S.; Hirano, T.; Nishio, T. Multicolor Imaging of Endoplasmic Reticulum-Located Esterase as a Prodrug Activation Enzyme. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (4), 321–325. <https://doi.org/10.1021/ml400398t>.
- (255) Deng, X.; Guan, Y.-Q.; Huo, N.-N.; Wang, Y.-J.; Lv, H.; Zhang, X.-M. An Efficient and Modular Route to C³*-TunePhos-Type Ligands. *Synthesis (Stuttg.)* **2017**, *49* (16), 3726–3730. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588421>.
- (256) Mamiya, F.; Ousaka, N.; Yashima, E. Remote Control of the Planar Chirality in Peptide-Bound Metallomacrocycles and Dynamic-to-Static Planar Chirality Control Triggered by Solvent-Induced 3 10 \rightarrow α -Helix Transitions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (48), 14442–14446. <https://doi.org/10.1002/anie.201507918>.
- (257) Yu, W.-Y.; Sit, W. N.; Lai, K.-M.; Zhou, Z.; Chan, A. S. C. Palladium-Catalyzed Oxidative Ethoxycarbonylation of Aromatic C–H Bond with Diethyl Azodicarboxylate. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (11), 3304–3306. <https://doi.org/10.1021/ja710555g>.
- (258) Nguyen, T. H.; Chau, N. T. T.; Castanet, A. S.; Nguyen, K. P. P.; Mortier, J. First General, Direct, and Regioselective Synthesis of Substituted Methoxybenzoic Acids by Ortho Metalation. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (9), 3419–3429. <https://doi.org/10.1021/jo070082a>.
- (259) Roschangar, F.; Brown, J. C.; Cooley, B. E.; Sharp, M. J.; Matsuoka, R. T. Use of Lithium N,O-Dimethylhydroxylamide as an Efficient in Situ Protecting Agent for Aromatic Aldehydes. *Tetrahedron* **2002**, *58* (9), 1657–1666. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00073-X).
- (260) Li, H.; Cai, G.-X.; Shi, Z.-J. LiCl-Promoted Pd(II)-Catalyzed Ortho Carbonylation of N,N-Dimethylbenzylamines. *Dalt. Trans.* **2010**, *39* (43), 10442–10446. <https://doi.org/10.1039/c0dt00451k>.
- (261) Roeschlaub, C. A.; Sammes, P. G. Use of the Wadsworth–Emmons Reaction for Preparing Hindered Vinyl Ethers and Related 1,2-Dioxetanes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, *58* (14),

- 2243–2248. <https://doi.org/10.1039/b002101f>.
- (262) Gattermann, L.; Berchemann, W. Synthese Aromatischer Oxyaldehyde. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1898**, *31* (2), 1765–1769. <https://doi.org/10.1002/cber.18980310281>.
- (263) Gattermann, L.; Koch, J. A. Eine Synthese Aromatischer Aldehyde. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1897**, *30* (2), 1622–1624. <https://doi.org/10.1002/cber.18970300288>.
- (264) Vilsmeier, A.; Haack, A. Über Die Einwirkung von Halogenphosphor Auf Alkyl-Formanilide. Eine Neue Methode Zur Darstellung Sekundärer Und Tertiärer p-Alkylamino-Benzaldehyde. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1927**, *60* (1), 119–122. <https://doi.org/10.1002/cber.19270600118>.
- (265) Duff, J. C.; Bills, E. J. 273. Reactions between Hexamethylenetetramine and Phenolic Compounds. Part I. A New Method for the Preparation of 3- and 5-Aldehydosalicylic Acids. *J. Chem. Soc.* **1932**, 1987–1988. <https://doi.org/10.1039/jr9320001987>.
- (266) Duff, J. C.; Bills, E. J. 282. Reactions between Hexamethylenetetramine and Phenolic Compounds. Part II. Formation of Phenolic Aldehydes. Distinctive Behaviour of p-Nitrophenol. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1305–1308. <https://doi.org/10.1039/jr9340001305>.
- (267) Reimer, K.; Tiemann, F. Ueber Die Einwirkung von Chloroform Auf Alkalische Phenolate. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1876**, *9* (1), 824–828. <https://doi.org/10.1002/cber.187600901247>.
- (268) A. Snieckus, V. Heterocycles via Ortho-Lithiated Benzamides. *Heterocycles* **1980**, *14* (10), 1649–1676. <https://doi.org/10.3987/R-1980-10-1649>.
- (269) Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, 1st ed.; Academic Press, Ed.; 2005.
- (270) Ramachandran, P. V.; Kulkarni, A. S.; Zhao, Y.; Mei, J. Amine–Boranes Bearing Borane-Incompatible Functionalities: Application to Selective Amine Protection and Surface Functionalization. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (80), 11885–11888. <https://doi.org/10.1039/C6CC06031E>.
- (271) Levesque, P.; Fournier, P.-A. Synthesis of Substituted Indole from 2-Aminobenzaldehyde through [1,2]-Aryl Shift. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (20), 7033–7036. <https://doi.org/10.1021/jo1016713>.
- (272) Cailly, T.; Fabis, F.; Lemaître, S.; Bouillon, A.; Rault, S. Synthesis of Ortho-Substituted Cyanopyridines through Lithio Intermediate Trapping. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (1), 135–137. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.11.021>.
- (273) Krizan, T. D.; Martin, J. C. Directed Ortho Lithiation of Isophthalonitrile. New Methodology for the Synthesis of 1,2,3-Trisubstituted Benzenes. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (13), 2681–2682. <https://doi.org/10.1021/jo00134a038>.
- (274) Du, B.; Jiang, X.; Sun, P. Palladium-Catalyzed Highly Selective Ortho-Halogenation (I, Br, Cl) of Arylnitriles via Sp² C–H Bond Activation Using Cyano as Directing Group. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (6), 2786–2791. <https://doi.org/10.1021/jo302765g>.
- (275) Gensch, T.; Hopkinson, M. N.; Glorius, F.; Wencel-Delord, J. Mild Metal-Catalyzed C–H Activation: Examples and Concepts. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (10), 2900–2936. <https://doi.org/10.1039/C6CS00075D>.
- (276) Petrone, D. A.; Ye, J.; Lautens, M. Modern Transition-Metal-Catalyzed Carbon–Halogen Bond Formation. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (14), 8003–8104.

- <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00089>.
- (277) Dubost, E.; Babin, V.; Benoist, F.; Hébert, A.; Barbey, P.; Chollet, C.; Bouillon, J.-P.; Manrique, A.; Pieters, G.; Fabis, F.; et al. Palladium-Mediated Site-Selective C–H Radio-Iodination. *Org. Lett.* **2018**, *20* (19), 6302–6305. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02819>.
- (278) Ackermann, L. Carboxylate-Assisted Transition-Metal-Catalyzed C–H Bond Functionalizations: Mechanism and Scope. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 1315–1345. <https://doi.org/10.1021/cr100412j>.
- (279) Zhang, L.; Liu, C.; Duan, Z.; Mathey, F. A Straightforward Synthesis of 1,2-Azaphosphindoles. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (18), 2504–2509. <https://doi.org/10.1002/ejic.201700209>.
- (280) Knochel, P.; Dohle, W.; Gommermann, N.; Kneisel, F. F.; Kopp, F.; Korn, T.; Sapountzis, I.; Vu, V. A. Highly Functionalized Organomagnesium Reagents Prepared through Halogen-Metal Exchange. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (36), 4302–4320. <https://doi.org/10.1002/anie.200300579>.
- (281) Zimmerman, S. S.; Khatri, A.; Garnier-Amblard, E. C.; Mullasseril, P.; Kurtkaya, N. L.; Gyoneva, S.; Hansen, K. B.; Traynelis, S. F.; Liotta, D. C. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship of a Novel Series of GluN2C-Selective Potentiators. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2334–2356. <https://doi.org/10.1021/jm401695d>.
- (282) Krasovskiy, A.; Knochel, P. A LiCl-Mediated Br/Mg Exchange Reaction for the Preparation of Functionalized Aryl- and Heteroarylmagnesium Compounds from Organic Bromides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43* (25), 3333–3336. <https://doi.org/10.1002/anie.200454084>.
- (283) Maji, M. S.; Murarka, S.; Studer, A. Transition-Metal-Free Sonogashira-Type Coupling of Ortho-Substituted Aryl and Alkynyl Grignard Reagents by Using 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine- N -Oxyl Radical as an Oxidant. *Org. Lett.* **2010**, *12* (17), 3878–3881. <https://doi.org/10.1021/ol1015702>.
- (284) Sun, G.; Lv, X.; Zhang, Y.; Lei, M.; Hu, L. Palladium-Catalyzed Formylation of Aryl Iodides with HCOOH as CO Source. *Org. Lett.* **2017**, *19* (16), 4235–4238. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b01882>.
- (285) Kumagai, T.; Anki, T.; Ebi, T.; Konishi, A.; Matsumoto, K.; Kurata, H.; Kubo, T.; Katsumoto, K.; Kitamura, C.; Kawase, T. An Effective Synthesis of N,N-Dimethylamides from Carboxylic Acids and a New Route from N,N-Dimethylamides to 1,2-Diaryl-1,2-Diketones. *Tetrahedron* **2010**, *66* (46), 8968–8973. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.037>.
- (286) Orito, K.; Horibata, A.; Nakamura, T.; Ushito, H.; Nagasaki, H.; Yuguchi, M.; Yamashita, S.; Tokuda, M. Preparation of Benzolactams by Pd(OAc)₂-Catalyzed Direct Aromatic Carbonylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (44), 14342–14343. <https://doi.org/10.1021/ja045342+>.
- (287) Wang, S.; Yang, Z.; Liu, J.; Xie, K.; Wang, A.; Chen, X.; Tan, Z. Efficient Synthesis of Anthranilic Esters via Pd-Catalyzed Dehydrogenative/Decarbonylative Coupling of Anilides and Glyoxylates. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (79), 9924. <https://doi.org/10.1039/c2cc34473d>.
- (288) Kochi, T.; Urano, S.; Seki, H.; Mizushima, E.; Sato, M.; Kakiuchi, F. Ruthenium-Catalyzed Amino- and Alkoxy-carbonylations with Carbamoyl Chlorides and Alkyl Chloroformates via Aromatic C–H Bond Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (8), 2792–2793. <https://doi.org/10.1021/ja8097492>.
- (289) Bedford, R. B.; Haddow, M. F.; Mitchell, C. J.; Webster, R. L. Mild C–H Halogenation of Anilides and the Isolation of an Unusual Palladium(I)-Palladium(II) Species. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50* (24), 5524–5527. <https://doi.org/10.1002/anie.201101606>.

- (290) Huang, Y.; Li, G.; Huang, J.; You, J. Palladium-Catalyzed Direct Ortho-C–H Ethoxycarboxylation of Anilides at Room Temperature. *Org. Chem. Front.* **2014**, *1* (4), 347. <https://doi.org/10.1039/c3qo00069a>.
- (291) Hoyer, T. R.; Humpal, P. E.; Moon, B. Total Synthesis of (–)-Cylindrocyclophane A via a Double Horner-Emmons Macrocyclic Dimerization Event. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (20), 4982–4983. <https://doi.org/10.1021/ja000429q>.
- (292) Xu, J.; Jain, N.; Sui, Z. Halogen–Magnesium Exchange of m- and p-Iodo or Bromo-Arenes Bearing Ortho-Directing Groups through Ate Complexes. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (34), 6399–6402. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.07.005>.
- (293) Moher, E. D.; Grieco, P. A.; Collins, J. L. (R)-(+)- and (S)-(-)-5-Ethyl-5-Methyl-1,3-Dioxolane-2,4-Dione Reagents for the Direct Preparation of α -Hydroxy- α -Methylbutyrate Esters: Assignment of the Absolute Configuration of the α -Acetoxy- α -Methylbutyrate Ester Side Chain of Quassamarin via Total Sy. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (15), 3789–3790. <https://doi.org/10.1021/jo00067a004>.
- (294) Haydon, D. J.; Bennett, J. M.; Brown, D.; Collins, I.; Galbraith, G.; Lancett, P.; Macdonald, R.; Stokes, N. R.; Chauhan, P. K.; Sutariya, J. K.; et al. Creating an Antibacterial with in Vivo Efficacy: Synthesis and Characterization of Potent Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ with Improved Pharmaceutical Properties. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (10), 3927–3936. <https://doi.org/10.1021/jm9016366>.
- (295) Chakraborti, A. K.; Sharma, L.; Nayak, M. K. Demand-Based Thiolate Anion Generation under Virtually Neutral Conditions: Influence of Steric and Electronic Factors on Chemo- and Regioselective Cleavage of Aryl Alkyl Ethers †. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (18), 6406–6414. <https://doi.org/10.1021/jo0256540>.
- (296) Gavande, N. S.; Kundu, S.; Badgujar, N. S.; Kaur, G.; Chakraborti, A. K. Ph₂S₂–CaH₂ in N-Methyl-2-Pyrrolidone as an Efficient Protocol for Chemoselective Cleavage of Aryl Alkyl Ethers. *Tetrahedron* **2006**, *62* (17), 4201–4204. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.02.013>.
- (297) Mcgeehan, G.; Simpson, R. D.; Zeng, W.; Baldwin, J. J.; Claremon, D. A.; Dillard, L. W.; Ishchenko, A. V.; Yuan, J.; Xu, Z.; Cacatian, S.; et al. 1-Acylamino-2-Hydroxy-3-Amino- ω -Arylalkanes as Renin Inhibitors and Their Preparation, Pharmaceutical Compositions and Their Use for Treatment of Hypertension. WO 2006083924 A1, 2006.
- (298) Lewis, H. L.; Brown, T. L. Association of Alkylolithium Compounds in Hydrocarbon Media. Alkylolithium-Base Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (15), 4664–4670. <https://doi.org/10.1021/ja00718a032>.
- (299) Sheldrick, G. M. Phase Annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **1990**, *46* (6), 467–473. <https://doi.org/10.1107/S0108767390000277>.
- (300) Sheldrick, G. M. A Short History of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64* (1), 112–122. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
- (301) Fieser, L. F.; Fieser, M.; Ho, T. *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*; Wiley, 2016. <https://doi.org/10.1002/9780471264194>.
- (302) Huang, K.; Chen, H.; Lin, G. An Efficient Method for the Preparation of Nitriles via the Dehydration of Aldoximes with Phthalic Anhydride. *J. Chinese Chem. Soc.* **2004**, *51* (3), 619–627.
- (303) Domínguez, J. L.; Fernández-Nieto, F.; Castro, M.; Catto, M.; Paleo, M. R.; Porto, S.; Sardina, F. J.; Brea, J. M.; Carotti, A.; Villaverde, M. C.; et al. Computer-Aided Structure-Based Design of

- Multitarget Leads for Alzheimer's Disease. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (1), 135–148. <https://doi.org/10.1021/ci500555g>.
- (304) Patel, B. A.; Krishnan, R.; Khadtare, N.; Gurukumar, K. R.; Basu, A.; Arora, P.; Bhatt, A.; Patel, M. R.; Dana, D.; Kumar, S.; et al. Design and Synthesis of L- and d-Phenylalanine Derived Rhodanines with Novel C5-Arylidenes as Inhibitors of HCV NS5B Polymerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (11), 3262–3271. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.041>.
- (305) Schäfer, D.; Weiß, P.; Ermert, J.; Castillo Meleán, J.; Zarrad, F.; Neumaier, B. Preparation of No-Carrier-Added 6-[¹⁸F]Fluoro- L -Tryptophan via Cu-Mediated Radiofluorination. *European J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (27), 4621–4628. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201600705>.
- (306) Brogan, J. T.; Stoops, S. L.; Crews, B. C.; Marnett, L. J.; Lindsley, C. W. Total Synthesis of (+)-7-Bromotryptargine and Unnatural Analogues: Biological Evaluation Uncovers Activity at CNS Targets of Therapeutic Relevance. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2* (11), 633–639. <https://doi.org/10.1021/cn200075n>.
- (307) Vallone, A.; D'Alessandro, S.; Brogi, S.; Brindisi, M.; Chemi, G.; Alfano, G.; Lamponi, S.; Lee, S. G.; Jez, J. M.; Koolen, K. J. M.; et al. Antimalarial Agents against Both Sexual and Asexual Parasites Stages: Structure-Activity Relationships and Biological Studies of the Malaria Box Compound 1-[5-(4-Bromo-2-Chlorophenyl)Furan-2-Yl]-N-[(Piperidin-4-Yl)Methyl]Methanamine (MMV019918) and Analog. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 698–718. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.024>.
- (308) Boyer, N.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G.; Jubault, P.; Quirion, J. C. Synthesis of α,α -Difluoro- β -Amino Esters or Gem-Difluoro- β -Lactams as Potential Metalloprotease Inhibitors. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 25, 4277–4295. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200800363>.
- (309) Saitton, S.; Del Tredici, A. L.; Saxin, M.; Stenström, T.; Kihlberg, J.; Luthman, K. Synthesis and Evaluation of Novel Pyridine Based PLG Tripeptidomimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (9), 1647–1654. <https://doi.org/10.1039/b718058f>.
- (310) Villalobos, A.; Blake, J. F.; Biggers, C. K.; Butler, T. W.; Chapin, D. S.; Chen, Y. L.; Ives, J. L.; Jones, S. B.; Liston, D. R.; Nagel, A. A. Novel Benzisoxazole Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2721–2734. <https://doi.org/10.1021/jm00043a012>.
- (311) Joncour, A.; Liu, J.-M.; Décor, A.; Thoret, S.; Wdzieczak-Bakala, J.; Bignon, J.; Baudoin, O. Synthesis of Anti-Microtubule Biaryls and Preliminary Evaluation as Vascular-Disrupting Agents. *ChemMedChem* **2008**, *3* (11), 1731–1739. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800181>.
- (312) Aggarwal, R.; Birkbeck, A. A.; Giles, R. G. F.; Green, I. R.; Gruchlik, Y.; Oosthuizen, F. J. Regioselectivity in the Syntheses of Enantiopure 2-Benzopyrans through Intramolecular Cyclization of Tethered Lactaldehydes. Conformations of the Products. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56* (5), 489. <https://doi.org/10.1071/CH03027>.
- (313) Nagai, T.; Sakurai, S.; Natori, N.; Hataoka, M.; Kinoshita, T.; Inoue, H.; Hanaya, K.; Shoji, M.; Sugai, T. Synthesis of Enantiomerically Enriched Drug Precursors and an Insect Pheromone via Reduction of Ketones Using Commercially Available Carbonyl Reductase Screening Kit "Chiralscreen® OH." *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (7), 1304–1313. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.067>.
- (314) Hua, Y.-G.; Han, L.-P.; Yang, Q.-Q.; Wang, M.-J.; Zhang, E.; Liu, H.-M. A Practical and Efficient Stereoselective Synthesis of (S)-Rivastigmine and (R)-Rivastigmine. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (5), 1385–1387. <https://doi.org/10.1002/slct.201703032>.

-
- (315) Liu, Hongmin; Zhang, En; Zhang, Baoyin; Lv, Aiqiao; Li, Cong; Fang, Y. Process for Preparing Rivastigmine Racemic Mixture as an Agent for the Treatment of Alzheimer Disease. CN 102617403, 2012.
- (316) Herzig, Y.; Lerman, L.; Goldenberg, W.; Lerner, D.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A. Hydroxy-1-Aminoindans and Derivatives: Preparation, Stability, and Reactivity. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (11), 4130–4140. <https://doi.org/10.1021/jo052621m>.
- (317) Pearce, V.; Nawaz, Z.; Xiao, W.; Wiedenfeld, D.; Boyle, N.; Smith, D. 4-Ethoxymethylphenol: A Novel Phytoestrogen That Acts as an Agonist for Human Estrogen Receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *84* (4), 431–439. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00064-5).
- (318) Wübbolt, S.; Oestreich, M. Exhaustive Chemoselective Reduction of Nitriles by Catalytic Hydrosilylation Involving Cooperative Si–H Bond Activation. *Synlett* **2017**, *28* (18), 2411–2414. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588441>.
- (319) Zhan, W.; Tong, M.; Ji, L.; Zhang, H.; Ge, Z.; Wang, X.; Li, R. Continuous-Flow Synthesis of Nitriles from Aldehydes via Schmidt Reaction. *Chinese Chem. Lett.* **2019**, *30* (5), 973–976. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.01.006>.
- (320) Vallée, C.; Chauvin, Y.; Basset, J.-M. M.; Santini, C. C.; Galland, J.-C. C. Design of Ionic Phosphites for Catalytic Hydrocyanation Reaction of 3-Pentenenitrile in Ionic Liquids. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (14), 1835–1847. <https://doi.org/10.1002/adsc.200505086>.
- (321) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245* (1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(95\)80037-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(95)80037-9).
- (322) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.

Conception, synthèse et évaluation biologique de prodrogues pléiotropes d'intérêt dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative multifactorielle encore mal comprise. Les médicaments actuellement utilisés contre la MA, principalement des inhibiteurs de cholinestérases (iChE), sont considérés comme ayant un service médical rendu insuffisant et sont responsables d'effets secondaires délétères. Les ChE suscitent toutefois un regain d'intérêt grâce à la découverte du rôle de chaperon joué dans la pathogenèse de la MA. Ces enzymes pourraient également servir de protéine d'activation pour les promédicaments pléiotropes. En effet, l'inhibition des ChE centrales par des molécules possédant un groupement carbamate, conçus pour passer la barrière hématoencéphalique, et capables de se lier de manière covalente à l'enzyme permettrait de libérer des métabolites actifs dans le cerveau. Ceci pourrait constituer une approche plus efficace sur le plan clinique, qui en permettrait de diminuer les effets secondaires périphériques.

Cette thèse a permis d'ouvrir de nouvelles voies de synthèse et a conduit à des études *in vitro* et *in vivo* de promédicaments pléiotropes ciblant à la fois l'AChE ou la BuChE et une autre cible thérapeutique telle que les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄ et / ou 5-HT₆, mais aussi l'étude de composés innovants : les ligands autoimmolables pléiotropes.

Cette polyactivité pourrait apporter aux patients atteints de MA de réels bénéfices thérapeutiques à la fois symptomatiques et curatifs, ainsi qu'une relative innocuité.

Mots clés : *Maladie d'Alzheimer – Cholinestérase – Ligands multicibles – Prodrogue – Ligand autoimmolable*

Conception, synthesis and biological evaluation of pleiotropic prodrugs in Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative disease which is still poorly understood. The drugs currently used against AD, mainly cholinesterase inhibitors (ChEI), are considered clinically insufficient and are responsible for deleterious side effects. ChE are, however, currently receiving renewed interest through the discovery of a chaperone role played in the pathogenesis of AD. But ChE could also serve as an activating protein for pleiotropic prodrugs. Indeed, inhibiting central ChE with brain-penetrating designed carbamates which are able to covalently bind to the enzyme and to concomitantly liberate active metabolites in the brain could constitute a clinically more efficient approach which, additionally, is less likely to cause peripheral side effects.

This thesis has opened up new synthetic pathways, coupled with *in vitro* and *in vivo* studies of pleiotropic prodrugs targeting both AChE and BuChE with another therapeutic target such as 5-HT₄ and / or 5-HT₆ serotonergic receptors. But also the study new compounds very interesting and never yet describes: pleiotropic self-immolative linkers.

This plural activity could bring to AD patients effective, relatively safe, symptomatic and disease-modifying therapeutic benefits.

Keywords: *Alzheimer's disease – Cholinesterase – Multitarget Directed Ligands – Prodrug – Self Immolative Linker*