# UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – LILLE 2 DROIT ET SANTE ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE DE LILLE

## THESE

En vue de l'obtention du grade de

# DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue à huis clos le 22 septembre 2014

par

# **Davy BAUDELET**

Développement de ligands des récepteurs purinergiques P2X7

et évaluation de leurs activités anticancéreuses et anti-inflammatoires

### Membres du jury

<i>Directrice de thèse :</i>	Dr Emmanuelle LIPKA	Maître de Conférences des Universités, Université de Lille 2
Responsable scientifique (HEI) :	Pr Benoît RIGO	Professeur, Université Catholique de Lille, HEI
Rapporteurs :	Dr Jean-Jacques BOURGUIGNON	Directeur de Recherches CNRS, Université de Strasbourg
	Dr Stéphane GERARD	Maître de Conférences des Universités, Université de REIMS
Examinateurs :	Pr Régis MILLET	Professeur des Universités, Université de Lille 2
	Pr Philippe CHAVATTE	Professeur des Universités, Université de Lille 2
	Dr Sahil ADRIOUCH	Maître de Conférences des Universités, Université de Rouen
	Dr Stéphane VISPE	Docteur - Chercheur, Pierre Fabre

« La vie est une pièce de théâtre : ce qui compte ce n'est pas qu'elle dure longtemps mais qu'elle soit bien jouée. »

Sénèque

# Je dédie cette thèse...

A mes parents, tous deux exemples de courage.

Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté, pour l'éducation que vous m'avez donnée, pour les valeurs que vous avez su me faire partager, pour avoir su m'amener si loin, et pour l'amour que vous m'avez transmis chaque jour. Vos encouragements et votre confiance en moi ont été ma motivation quotidienne. Je vous adresse mille mercis.

A mon frère, mon ami, mon modèle.

Je te remercie, toi le grand frère qui m'a fait découvrir une grande partie de ce que je connais, et qui continue chaque jour à me guider. Tu as su éveiller ma curiosité, et me montrer les chemins qui rendent la vie sympathique. J'ai beaucoup appris, et je continue chaque jour à apprendre à tes côtés. Un immense merci pour tout ce que tu m'apportes. Au bonheur de toutes ces choses que l'on partage.

J'en profite également pour remercier Vanessa, qui partage ta vie depuis quelques années déjà (et un peu la mienne par la même occasion). Merci pour ta gentillesse Vanessa, et surtout pour l'épanouissement que tu apportes à mon frère.

A mes grands-parents qui ont participé à mon éducation, et qui m'ont transmis la valeur du travail au travers de leur culture ouvrière.

Il suffit parfois d'observer pour comprendre ; c'est avec beaucoup d'amour que je vous regarde.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Pharmacochimie de l'école HEI Lille ainsi que dans les locaux de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, et dans le Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille 2, sous la direction du Dr Emmanuelle LIPKA, et le co-encadrement du Pr Benoît RIGO et du Pr Régis MILLET. Ce projet a été financé par l'école HEI et la Fondation Norbert Ségard.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs remerciements :

- A ma Directrice de thèse : Madame le Dr Emmanuelle LIPKA. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée en acceptant d'encadrer ce projet de thèse, pour votre disponibilité, pour votre gentillesse, pour la transmission de vos connaissances, pour votre investissement dans ce projet, pour votre aide sur tous les aspects que comporte un parcours en thèse, et pour votre soutien dans la préparation de l'après-thèse. J'ai conscience de la chance de vous avoir eue comme Directrice de thèse, et j'espère pouvoir encore travailler longtemps avec vous. Pour votre accompagnement, toujours bienveillant, tout au long de ces trois années de thèse, je vous dis un très grand merci.
- A mon encadrant de thèse au sein de l'école HEI : Monsieur le Pr Benoît RIGO. Grâce à la confiance que vous m'avez accordée, j'ai eu la chance de travailler à vos côtés. Votre passion pour ce travail et pour la transmission de vos connaissances est une chance pour toutes les personnes qui passent dans votre laboratoire. J'ai aimé vos cours de chimie improvisés (il est toujours utile d'avoir des tableaux dans un laboratoire), les discussions diverses que nous avons partagées, ainsi que les moments passés en congrès. Vous êtes à vous seul une encyclopédie de chimie à laquelle j'ai eu la chance d'avoir accès chaque jour pendant ces trois années ; vous m'avez énormément appris. Pour cela, merci.
- A mes rapporteurs : Monsieur le Dr Jean-Jacques BOURGUIGNON et Monsieur le Dr Stéphane GERARD. Je suis très sensible à l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Soyez assurés de toute ma gratitude.

- A mes examinateurs :
  - Monsieur le Pr Régis MILLET, je touche du bout des doigts la fin de ces années d'études, et le temps est venu de vous exprimer mes plus sincères remerciements pour l'ensemble des choses que vous m'avez apportées. Dès mon arrivée en Master, vous m'avez accordé une grande confiance en m'impliquant dans vos projets de recherche. Vous m'avez ensuite accompagné dans ma formation et avez fait en sorte que j'obtienne une bourse de thèse. Vous avez également su m'aider à faire grandir ce projet, et vous avez toujours été présent quand j'en avais besoin. Je mesure la chance que j'ai eue de vous rencontrer à mon arrivée sur Lille, sans vous je ne serais peut-être pas à quelques heures de mettre un point final à ce manuscrit de thèse. Pour tout cela, je vous remercie, et je vous en serai toujours reconnaissant. En espérant pouvoir travailler encore à vos côtés.
  - Monsieur le Pr Philippe CHAVATTE. Je souhaite, dans un premier temps, vous remercier pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux au sein de votre laboratoire. Vous m'avez toujours accueilli comme une personne faisant partie de l'Institut, et avez fait en sorte que ce projet collaboratif soit possible. Je vous remercie également pour votre disponibilité, vos conseils avisés, et les discussions agréables que nous avons partagées. Je finirai en vous remerciant pour l'immense aide que vous m'avez donnée dans la préparation de l'après-thèse. Je vous suis extrêmement reconnaissant de la confiance que vous m'avez témoignée en m'offrant l'opportunité d'une expérience de recherche à l'étranger, dans une université aussi prestigieuse. Soyez assuré de toute ma gratitude.
  - Monsieur le Dr Sahil ADRIOUCH. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse. C'est un honneur pour moi de pouvoir bénéficier de l'avis du spécialiste que vous êtes. Je vous remercie également pour la précieuse aide que vous nous avez apportée en nous fournissant les lignées cellulaires indispensables pour l'évaluation pharmacologique de nos composés.
  - Monsieur le Dr Stéphane VISPE. Je souhaite vous remercier d'avoir accepté de venir évaluer mes travaux de thèse. C'est une chance de pouvoir bénéficier de l'avis d'un professionnel comme vous.

- Aux personnes ayant contribué à ces travaux, et celles qui ont fait de cette thèse une belle aventure :
  - Madame le Pr Patricia MELNYK et Monsieur le Pr Jean-Paul BONTE, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe de recherche.
  - Monsieur le Dr Philippe GAUTRET, merci pour votre accompagnement durant ces trois années de thèse, pour la rigueur que vous m'avez apportée, pour le sens du détail, pour les nombreuses corrections effectuées sur les différents rapports que j'ai pu rédiger, pour les discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir, et pour m'avoir fait garder la forme en pratiquant la course à pieds. Vous avez rendu ces trois années agréables, et cela a été une chance de pouvoir travailler aux côtés d'une personne si cultivée et si pédagogue. En espérant pouvoir à nouveau apprendre à vos côtés.
  - Madame le Dr Alina GHINET, je te remercie pour les nombreux échanges que nous avons eus, pour m'avoir formé aux différentes tâches au sein de ce laboratoire, ainsi que pour m'avoir fait découvrir la Roumanie et la musique classique. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble.
  - Monsieur le Dr Xavier DEZITTER, je souhaite t'exprimer à quel point il a été agréable de travailler à tes côtés. Grâce à toi, il a très rapidement été possible de réaliser l'évaluation biologique de nos composés, alors que ce projet de recherche est tout nouveau ici. Nos échanges ont été constructifs, et m'ont permis de mieux comprendre l'ensemble des aspects de ce projet. Je te remercie également pour ta gentillesse, tes blagues, et pour les corrections que tu as apportées à ce manuscrit. Je te dis à bientôt.
  - Monsieur le Dr Amaury FARCE, j'ai tout d'abord eu la chance de suivre tes cours de modélisation moléculaire durant mon Master puis, j'ai eu l'opportunité de travailler avec toi. Je souhaite donc te remercier pour ta disponibilité pour répondre à mes questions de chimiste, ainsi que pour ta précieuse contribution à ce projet. Merci pour tes belles images.

- Monsieur le Dr Christophe FURMAN, je vous remercie pour l'ensemble de vos conseils depuis mon arrivée au sein de l'Institut, pour le temps que vous avez toujours su m'accorder, et pour m'avoir toujours poussé à aller plus loin.
- Monsieur le Pr Claude VACCHER, je souhaite vous remercier pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, ainsi que pour votre participation aux différentes publications.
- Monsieur le Pr Pierre DESREUMAUX, je vous remercie d'avoir accepté de collaborer à ce projet. Votre expertise et vos compétences nous permettent toujours d'aller plus loin.
- A mon ami le Dr Aurélien TOURTEAU, je te remercie pour l'ensemble de notre œuvre ! Tu as été une belle rencontre à mon arrivée dans le fameux labo 1, nous avons partagé beaucoup de choses, de nos premiers pas dans le monde de la recherche jusqu'à la fin de notre Doctorat, en passant même par les révisions du MDD et quelques escapades bruxelloises. Amateur de bons vins, de bonnes bières, et fan de Claudy FOCAN, ou de Monsieur FOCAN plus exactement, je te remercie pour ton amitié sincère, ton soutien permanent, ainsi que pour la relecture de quelques chapitres de ce manuscrit. J'en profite également pour remercier ta femme, qui m'a fait cadeau de son amitié, et qui m'a également souvent offert son hospitalité ! Vous êtes deux belles personnes, et je vous en remercie. Je vous souhaite le meilleur et vous dis à bientôt.
- A mon amie le Dr Séverine RAVEZ, toujours présente pour ses collègues et amis, et notamment pour moi. Tu as su te rendre disponible pour moi tout au long de notre parcours pour me soutenir, pour m'aider dans toutes ces tâches pénibles que l'on doit accomplir lorsque l'on est doctorant, mais pour lesquelles tu as toujours une longueur d'avance. Tu es un exemple de gentillesse et de générosité, et je t'en remercie. Ne change rien, si ce n'est que tu devrais te faire beaucoup plus confiance ! Parole de Jeff ! J'en profite également pour remercier Chris qui possède les mêmes qualités que toi, et avec qui il a été agréable de passer du temps ici ou ailleurs, même lorsque l'on est resté bloqués dans un ascenseur. On se retrouve bientôt à Bruxelles.
- Au futur Docteur et ami Lucas LEMAIRE, « remplaçant » de grande qualité du Dr TOURTEAU dans le labo 1. Je te remercie pour tous ces moments passés, bien souvent en présence des 4 précédents. Merci pour ta disponibilité, et pour avoir souvent servi de standardiste au Dr RAVEZ.

- Madame Frédérique KLUPSH, l'encyclopédie de chimie de l'ICPAL. Je suis heureux d'avoir fait ta connaissance, d'avoir pu bénéficier de tes conseils, de tes encouragements, et de ta gentillesse. C'est une chance pour tous les petits chimistes comme moi qui passent par l'ICP de pouvoir travailler avec une personne comme toi. Merci.
- Madame le Dr Natascha LELEU-CHAVAIN, cela a été un plaisir de travailler avec toi, et j'espère que ce sera à nouveau possible un jour. J'ai apprécié ta disponibilité, ta gentillesse, ainsi que ta rigueur scientifique et tes conseils avisés qui m'ont beaucoup aidé.
- Madame Amélie BARCZYK, je te remercie de ne pas avoir chassé un petit étranger comme moi des locaux de l'ICPAL. Merci également d'avoir pris le temps de répondre à mes questions de bio, et pour l'aide apportée lors des différents projets. J'allais oublier de te remercier d'avoir pris le temps de prendre quelques raclées à la belote durant les pauses déjeuner. En espérant te revoir bientôt chez Mich, ou ailleurs !
- Madame Perrine SIX, je te remercie pour ton aide de mon arrivée en M1 jusqu'à la fin de cette thèse, même si je trouve que tes tarifs sont très élevés. Je te remercie également d'avoir été le binôme d'Amélie à la belote ! A bientôt !
- Monsieur le Dr Nicolas RENAULT, je te remercie pour les échanges très instructifs que nous avons pu avoir. Il a été très agréable de travailler avec toi. Je te remercie également pour les moments plus récréatifs qui étaient tout aussi sympathiques. A bientôt sur un terrain de foot, ou dans le bar d'en face.
- Madame le Dr Pauline GILLERON, j'ai été content de partager le labo 1 avec toi, et j'espère ne pas t'avoir trop fatiguée avec Aurélien.
- Monsieur le futur Dr Xavier LAURENT, camarade de MDD et de l'aventure doctorale, cela a été un plaisir d'échanger avec toi, au labo comme à l'extérieur.

- Madame le Dr Isabelle MALLARD, tu as été ma première encadrante dans un laboratoire de recherche, et je souhaite te remercier d'avoir été la meilleure des encadrantes. Tu m'as fait découvrir la recherche, tu m'as formé, tu m'as fait confiance, et tu m'as donné envie de poursuivre dans cette voie en commençant par réaliser une thèse. J'espère avoir un jour la chance de travailler à nouveau avec toi. Merci.
- Madame le Dr Delphine Le Broc, je souhaite tout d'abord te remercier pour avoir réalisé les tests de cytotoxicité sur mes composés, ainsi que pour ta disponibilité à mon égard. Je te souhaite une belle aventure dans ta nouvelle vie.
- Monsieur le Dr Pascal CARATO, vous avez été mon premier responsable de stage à la Faculté de Pharmacie, et je souhaite vous remercier pour ce que vous m'avez apporté ; pour m'avoir appris que la vraie chimie ça se fait au moins avec quelques grammes, pour m'avoir fait confiance lors des différents projets, pour m'avoir donné les petites ficelles, et pour votre soutien durant cette thèse.
- Madame le Dr Laurence GOOSSENS, je tiens à vous remercier pour votre accueil à l'ICPAL, votre aide, vos conseils, et votre soutien durant ces années. Je vous remercie également d'avoir participé à ma formation au Drug Design.
- Monsieur le Pr Patrick DEPREUX, je vous remercie pour votre accueil au sein de l'ICPAL, ainsi que pour vos cours de chimie organique que j'ai beaucoup appréciés.
- Monsieur Dominique HUGES, votre disponibilité pour tous vos étudiants ou anciens étudiants est remarquable et je vous en remercie. Vous m'avez consacré beaucoup de votre temps libre pour m'aider à préparer l'après-thèse, pour essayer de me faire dire quelques mots d'anglais, et pour cela je vous tire mon chapeau. C'est une richesse de rencontrer des personnes comme vous.
- Madame Frédérique CREPEL, comment dire... Ton humour et ta passion pour le carnaval ne pouvaient que me plaire ! Merci pour tous ces fous rires, ces discussions très profondes, mais aussi pour ta disponibilité.

- Je souhaite également remercier mes collègues roumaines, Liliana, Gina, Cristina, Iuliana, qui ont passé plusieurs mois à HEI et avec qui il a été très agréable de travailler. Merci pour les leçons de roumain, pour l'initiation à la gastronomie roumaine, et également pour m'avoir fait découvrir cette belle ville de Iasi. A bientôt.
- Mes remerciements vont également à mes stagiaires, Germain, Charlène, et Ulku, qui ont contribué à ces travaux en réalisant leurs premiers pas dans le monde de la recherche.
- Je remercie également mes élèves HEI face à qui j'ai fait mes premiers pas dans l'enseignement supérieur. Ce fut une belle expérience.
- A tous mes amis boulonnais :
  - Rémi, mon ami, tu as joué un rôle très important du début à la fin de cette thèse, et je ne peux que t'en remercier. Merci pour ton soutien indéfectible, pour nos discussions qui m'ont enrichi, pour les merveilles cinématographiques que tu m'as faites découvrir, et pour tous les moments partagés. On se voit bientôt à Vancouver. En te remerciant, je suis également obligé d'avoir une pensée pour notre ami Simon, amoureux du short de Lens, de la casquette de Nico ROSBERG, du Turf, et du top 50. Merci pour les moments de détente.
  - A mon ami Flo, boulonnais, dunkerquois... Mais surtout citoyen du monde ! Présent depuis l'époque du lycée et du baby foot jusqu'à maintenant, et sans aucun doute pour tout ce qui reste à venir. Tantôt compagnon de voyage, tantôt binôme de fin de semaine, je te remercie mon ami pour ton amitié sincère, pour ces discussions enrichissantes ou parfois complétement délirantes, pour tous ces fous rires... Bref, pour tout ce que l'on partage.
  - A mes amis, Loïc et Alex, présents depuis l'époque du lycée jusqu'à la fin de cette thèse, et pour longtemps encore. Merci pour votre soutien, pour les moments de vie, pour votre humour, pour les lasagnes, et pour votre amitié. Pour toujours...

- Romain mon ami, réjouis toi, tu as pour amis tous les jeunes de la Terre, les vrais, ceux qui ne deviendront jamais vieux ! Merci pour ta présence depuis toutes ces années, tu as toujours su me pousser à continuer, même dans les moments de doutes. Pour ton humour, tes valeurs, ton amitié sincère, nos fous rires, nos escapades, nos concerts improvisés... Pour tout, merci mon ami. Vive la chanson et vive le sport.
- A Tiju et Manue, mes amis et voisins de la côte ! Merci pour votre présence quotidienne, votre aide (notamment pour la préparation de cette thèse), votre soutien, votre accueil, nos fous rires, les ballades en super 5... A toutes ces années et pour longtemps encore ! Je n'oublie pas ma petite Juliette (toujours contente de voir tonton), et ma filleule Fidji.
- Enfin, un merci collectif à tous mes amis, Jay, Céline, Chaton, BB, Goubi, Dam, Caro, Sylvain, Gaut, Zitoune, Bébert, Nath, Milo, Cécile, Kev (patafouin), Geoffrey, Marech, Delatt, Ruly, Olive, Vevel, Audrey, Maud... J'espère n'oublier personne. Merci pour ces week-ends fous, merci pour votre présence, pour votre amitié, pour les folles virées, pour les moments de vie, pour tout ce qu'on partage et tout ce que l'on partagera encore, un grand merci. Un petit mot également de la part du tonton pour vos enfants, à Erwan, à Cléa, à Emma et à Léa.
- Pour terminer je souhaite également remercier toute ma famille pour toutes ces années de soutien et de partage.

# NOTE DE CONFIDENTIALITE

Le présent manuscrit est classé confidentiel. La soutenance se déroulera à huis clos. Les manuscrits seront rendus aux responsables du projet à la suite de la soutenance.

# **LISTE DES ABBREVIATIONS**

5-ASA	Acide 5-aminosalicylique
Å	Ångström
A.A.	Acide Aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
AEM	Agence Européenne du médicament
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
APCI⁺	Ionisation Chimique Positive à Pression Atmosphérique
APP	Amyloïd Protein Precursor
APTS	Acide Paratoluènesulfonique
Ar	Aromatique
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triposphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
br s	broad singlet
Bz	Benzyle
CB <sub>2</sub>	Récepteur aux cannabinoïdes de type 2
CI <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice à 50%
COX	Cyclooxygénase
CPS	Chromatographie en Phase Supercritique
d	Doublet
dd	Doublet of doublets
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
dex	Dextrogyre
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMEDA	N,N'-diméthyléthylènediamine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMS	Diméthylsulfoxide
DSS	Dextran Sodium Sulfate
DTM	Domaine Transmembranaire

EC <sub>50</sub>	Half maximal effective concentration
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
Et₃N	Triéthylamine
EtOAc	Ethyl Acetate
FDA	Food and Drug Administration
<i>h</i> -P2X₂R	Human P2X <sub>7</sub> Receptor
HMDS	Hexaméthyldisilazane
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBD	Inflammatory Bowel Diseases
IFN-γ	Interféron-gamma
IL	Interleukine
IP	lodure de Propidium
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
К.О.	Knockout
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse
lev	Lévogyre
LPS	Lipopolysaccharide
m	Multiplet
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase
Me₃SiCl	Chlorotriméthylsilane
MICI	Maladies inflammatoires Chroniques des Intestins
MM	Masse Molaire
MMP	Matrix Metallopeptidase
NCI	National Cancer Institute
NMP	N-Méthylpyrrolidone
mp	Melting point
NO	Nitric Oxide
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2
P2XR	Récepteur P2X
P2X <sub>7</sub> R	Récepteur P2X <sub>7</sub>
Pd/C	Palladium sur charbon
PGA	Acide Pyroglutamique
PGM	Pyroglutamate de Méthyle
Phe	Phényle

PI4K	Phosphatidylinositol-4-kinase
РКС	Protéine Kinase de type C
PLA2	Phospholipase de type A2
PLC	Phospholipase de type C
ppm	Parties par million
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
<i>r</i> -P2X <sub>7</sub> R	Rat P2X <sub>7</sub> Receptor
RCH	Rectocolite Hémorragique
RCPG	Récepteur Couplé à une Protéine G
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RPS	Résonance Plasmonique de Surface
RSA	Relations Structure-Activité
r.t.	Room temperature
S	Singlet
SNC	Système Nerveux Central
sym m	Symmetrical multiplet
SVF	Sérum de Veau Fœtal
t	Triplet
T.A.	Température Ambiante
ТВАВ	Bromure de Tétrabutylammonium
Temp.	Température
TGF-β	Transforming Growth Factor-bêta
THF	Tétrahydrofurane
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
tr	Temps de rétention
UDP	Uridine Diphosphate
UTP	Uridine Triphosphate
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# **SOMMAIRE**

|--|

# **Chapitre I : GENERALITES**

I- Historique	3
II- Les récepteurs purinergiques	5
II-1- Les récepteurs P1	5
II-2- Les récepteurs P2	8
II-2-1- Les récepteurs P2Y	8
II-2-2- Les récepteurs P2X 1	1
III- Les récepteurs P2X7 1	.8
III-1- Gène, séquence, structure, et propriétés1	8
III-1-1- Topologie1	8
III-1-2- Pharmacologie	24
III-1-3- Formation du pore membranaire2	28
III-1-4- Polymorphismes, isoformes, et distribution des P2X <sub>7</sub> R	80
III-2- Implication de P2X <sub>7</sub> R dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires	31
III-2-1- Production et implication des IL-1 et autres cytokines pro-inflammatoires dans le	es
processus inflammatoires	32
III-2-2- ATP : signal de danger	34
III-2-3- Implication de P2X <sub>7</sub> R dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et potenti	el
thérapeutique	35
III-2-4- Voies de signalisation mises en place pour la sécrétion d'IL-16 suite à l'activation a	le
P2X <sub>7</sub> R	37
IV- Potentiel anticancéreux de P2X <sub>7</sub> R 3	9
V- Potentiel analgésique de P2X <sub>7</sub> R 4	1
VI- Généralités sur les MICI 4	2
VI-1- Epidémiologie, étiologie et aspects lésionnels des MICI	12
VI-2- Symptômes et complications associés aux MICI4	!4
VI-3- Prise en charge des MICI et traitements 4	!5
VII- Les antagonistes P2X <sub>7</sub> R décrits dans la littérature 4	8
VII-1- Les dérivés synthétiques de l'ATP 4	19
VII-2- Les dérivés de la tyrosine5	51
VII-3- Les adamantanamides	53
VII-4- Les arylhydrazides	55
VII-5- Les tétrazoles	6
VII-6- Les pyrazoloacétamides5	57
VII-7- Les dérivés pyroglutamides5	58
VII-8- Les 3,5-dichloropyridines	50
VII-9- Les dérivés pipéraziniques6	51
VII-10- Les dérivés carboranes	54
VIII- Les antagonistes P2X <sub>7</sub> R en essais cliniques 6	<b>i</b> 5
IX- Conclusion de la partie introductive 6	57

### **Chapitre II : CONCEPTION**

I- Identification d'un « pharmacophore » à partir des données de la littérature	69
II- Travaux antérieurs	70
III- Projet de recherche	73
III-1- Conception de la série 1	76
III-2- Conception de la série 2	77
III-3- Conception de la série 3	79
III-4- Conception de la série 4	80
III-5- Conception de la série 5	82
III-6- Conception de la série 6	83
III-7- Conception de la série 7	84

# Chapitre III : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 1

I- Synthèse des composés de la série 1	87
II- Description des voies de synthèse	88
II-1- Description de la voie de synthèse 1	89
II-1-1- Synthèse du pyroglutamate de méthyle <b>49</b>	89
II-1-2- Synthèse des pyroglutamides N-benzylés <b>53</b> - <b>66</b> par aminolyse	des esters
pyroglutamiques N-benzylés <b>50</b> à <b>52</b>	89
II-2- Description de la voie de synthèse 2	
II-2-1- Synthèse des pyroglutamides N-benzylés <b>69</b> et <b>70</b> à partir de l'acide <b>67</b>	
II-2-2- Synthèse des pyroglutamides N-benzylés <b>71</b> à <b>73</b> à partir des acides <b>67</b> et <b>68</b>	
II-3- Description de la voie de synthèse 3 : obtention des pyroglutamides benzhydrylés	<b>76</b> et <b>77</b> par
aminolyse des esters <b>74</b> et <b>75</b>	
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 1	95

### Chapitre IV : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 2

I- Synthèse des N-aryle-pyroglutamides de la série 2	113
II- Description des voies de synthèse	114
II-1- Description de la voie de synthèse 1	114
II-1-1- N-arylation du PGM : synthèse des composés <b>80</b> à <b>93</b>	114
II-1-2- Synthèse des composés finaux <b>94</b> à <b>108</b> par réaction d'aminolyse des	esters
pyroglutamiques N-arylés <b>80</b> à <b>93</b>	117
II-2- Description de la voie de synthèse 2	120
II-2-1- Aminolyse du PGM : synthèse des composés <b>109</b> à <b>112</b>	121
II-2-2- Synthèse de l'amide <b>114</b> : forme racémique du composé <b>21</b> de la littérature	122
II-2-3- Synthèse des composés <b>102, 104</b> , et <b>115</b> - <b>116</b> par arylation des amides pyroglute	imiques
	122
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 2	124

## Chapitre V : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 3

I- Synthèse de la sous-série des amines	.153
I-1- Description de la voie de synthèse 1	154
I-1-1- N-benzylation de la 5-méthoxypyrrolidone : synthèse des composés <b>118</b> à <b>121</b>	154

I-1-2- Synthèse des 5-aminopyrrolidones 122 à 125 par réaction électrophile sur les 5-
méthoxypyrrolidones N-benzylés155
I-2- Description de la voie de synthèse 2156
I-2-1- Synthèse des composés 126 et 127 par substitution nucléophile du groupe méthoxy de la 5-
méthoxypyrrolidone
I-2-2- N-benzylation de la 5-aminopyrrolidone 126 : synthèse des N-benzyl-5-amino-
arylpyrrolidones <b>122</b> - <b>123</b> et <b>128</b> - <b>129</b>
I-2-3- N-arylation des 5-(arylamino)-pyrrolidones <b>126</b> et <b>127</b> : synthèse des composés <b>130</b> et <b>131</b>
II- Synthèse de la sous-série des rétro-amides160
II-1- Description de la voie de synthèse 1161
II-1-1- Synthèse des 5-amidopyrrolidones N-benzylées <b>136</b> et <b>142</b> via un sel d'acyliminium 161
II-2- Description de la voie de synthèse 2162
II-2-1- N-Arylation de la 5-méthoxypyrrolidone : synthèse des 5-méthoxypyrrolidones N-arylées
<b>143</b> à <b>145</b>
II-2-2- Synthèse des 5-amidopyrrolidones N-arylés <b>146</b> à <b>151</b> via un sel d'acyliminium
II-3- Description de la voie de synthèse 3
II-3-1- Synthèse du 3,4,5-trimethoxy-N-(5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide <b>152</b> par substitution
électrophile
II-3-2- Synthèse du 3,4,5-trimethoxy-N-(5-oxo-1-phenylpyrrolidin-2-yl)benzamide <b>153</b> par N-
arylation du 3,4,5-trimethoxy-N-(5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide <b>152</b>
III- Synthèse du 2,4-dichloro-N-(1-methyl-5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide 157166
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 3

# Chapitre VI : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 4

I- Synthèse des composés de la série 4	195
II- Description des voies de synthèse	196
II-1- Description de la voie de synthèse 1	196
II-1-1- Synthèse des N-arylcarbamoyl pyroglutamates de méthyle <b>158</b> à <b>161</b> par s	ubstitution
nucléophile	196
II-1-2- Synthèse des N-arylcarbamoyl pyroglutamides <b>162, 165</b> , et <b>168</b> par aminolyse	des esters
pyroglutamiques N-arylcarbamoyles	197
II-2- Description de la voie de synthèse 2	201
II-2-1- Synthèse des pyroglutamides <b>172</b> et <b>173</b> par aminolyse de la fonction ester du P	GM <b>49</b>
	201
II-2-2- Synthèse des N-carbamoyl-5-pyroglutamides <b>168</b> et <b>174</b> à <b>186</b>	202
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 4	204

# Chapitre VII : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 5

I- Synthèse des composés de la série 5	225
II- Description des voies de synthèse	226
II-1- Description de la voie de synthèse 1	226
II-1-1- Synthèse de l'iminoéther <b>187</b> par éthérification du carbonyle cyclique du PGM <b>49</b>	227
II-1-2- Synthèse de l'amidrazone <b>188</b> par condensation du carbazate de méthyle sur l'iminoét	ther
187	227

II-1-3- Synthèse du bicycle <b>189</b> par cyclisation de l'amidrazone <b>188</b>	228
II-2- Description de la voie de synthèse 2	229
II-2-1- Synthèse des hydrazines aromatiques <b>190</b> et <b>191</b>	229
II-2-2- Synthèse des amidrazones 194 à 197 par condensation des hydrazines	aromatiques sur
l'iminoéther <b>187</b>	230
II-2-3- Aminolyse de la fonction ester des dérivés amidrazones 195 et 196	<b>5</b> : synthèse des
composés <b>198</b> et <b>199</b>	231
II-2-4- Cyclisation de l'amidrazone <b>196</b> : synthèse du composé <b>200</b>	232
II-3- Description de la voie de synthèse 3	233
II-3-1- Réaction du pyroglutamide <b>109</b> avec le sulfate de diméthyle: synthèse du	composé <b>202</b>
	233
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 5	235

# Chapitre VIII : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 6

I- Synthèse des composés de la série 6	240
II- Description des voies de synthèse	241
II-1- Description de la voie de synthèse 1	241
II-1-1- Synthèse du dithiocarbazate de méthyle <b>203</b>	241
II-1-2- Addition nucléophile du dithiocarbazate de méthyle <b>203</b> sur l'iminoéther <b>187</b> : sy	nthèse du
composé <b>204</b>	242
II-2- Description de la voie de synthèse 2	242
II-2-1- Synthèse des semicarbazides aromatiques <b>205</b> à <b>207</b> à partir des anilines corresp	ondantes
	243
II-2-2- Condensation des thiosemicarbazides sur l'iminoéther	244
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 6	246

# Chapitre IX : STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 7

I- Synthèse des composés de la série 7	249
II- Synthèse des composés de la sous-série A	251
II-1- Réarrangement des pyroglutamates en hydantoïnes : synthèse du composé <b>209</b>	251
II-2- Description de la voie de synthèse 1 pour les composés de la sous-série A	253
II-3- Description de la voie de synthèse 2 pour les composés de la sous-série A	255
II-3-1- Clivage de la fonction ester du composé <b>209</b>	255
II-3-2- Synthèse de l'amide <b>210</b> par couplage peptidique	256
II-4- Description de la voie de synthèse 3 pour les composés de la sous-série A	256
II-4-1- N-méthylation de l'hydantoïne <b>209</b>	257
II-4-2- Amidification de la fonction ester du composé <b>214</b>	257
III- Synthèse des composés de la sous-série B	258
III-1- Synthèse du composé 216 par réaction de la N-méthylbenzylamine sur le bromomalonate	e de
diéthyle	259
III-2- Hydrogénation catalytique du composé <b>216</b>	259
III-3- Cyclisation du malonate <b>217</b> par réaction avec l'isocyanate d'isopropyle	260
EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 7	261

# **Chapitre X : SEPARATION DES ENANTIOMERES**

I- Objectif de la séparation chiral	265
-------------------------------------	-----

# Chapitre XI : EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES

I- Protocoles expérimentaux des tests biologiques réalisés	281
I-1- Culture cellulaire	281
I-2- Mesure de l'activité des composés sur le P2X <sub>7</sub> R	281
I-2-1- Evaluation de l'activité antagoniste P2X <sub>7</sub> R par spectrofluorimétrie	282
I-2-2- Evaluation de l'activité antagoniste P2X <sub>7</sub> R par cytométrie en flux	283
I-3- Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire	286
I-3-1- Evaluation de la cytotoxicité sur cellules saines	286
I-3-2- Evaluation de la cytotoxicité sur un panel de 60 lignées cancéreuses	287
I-4- Evaluation in vitro et in vivo de l'activité anti-inflammatoire	288
II- Résultats et discussion	288
II-1- Activités des molécules sur le P2X <sub>7</sub> R humain	288
II-1-1- Evaluation de l'activité des molécules synthétisées	288
II-1-2- Screening d'une série de benzothiazolones	310
II-2- Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire	311
II-2-1- Evaluation sur cellules saines	311
II-2-2- Evaluation sur les 60 lignées cancéreuses du NCI	316
II-3- Evaluation in vitro et in vivo de l'activité anti-inflammatoire	316

### **CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

I- Bilan des travaux réalisés durant ce projet de thèse et conclusions	317
I-1- Conception et synthèse des composés	
I-2- Evaluations pharmacologiques et résultats obtenus	
II- Perspectives envisagées pour la suite de l'étude	321
II-1- Conception et synthèse de nouveaux composés	
II-2- Evaluations pharmacologiques	322
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	323

# **AVANT-PROPOS**

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire de Pharmacochimie de l'école HEI ainsi qu'au sein de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol pour la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique des nouvelles molécules. La partie analytique du projet a été effectuée dans le Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Lille 2. Ces travaux ont été dirigés par le Dr Emmanuelle LIPKA, le Pr Benoît Rigo, le Dr Philippe Gautret, et le Pr Régis Millet.

# Ce projet a pour but, la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de nouveaux ligands des récepteurs purinergiques P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R) susceptibles d'être utilisés dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), et également certains types de cancers.

Les MICI sont encore à ce jour des pathologies mal connues, et les traitements existants ne permettent qu'une amélioration de l'état de santé du patient. A l'heure actuelle, les MICI (qui englobent la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn) touchent 2,5 millions de personnes à travers le monde. Dans ces maladies, la réponse inflammatoire - normalement protectrice - est inadaptée et devient alors agressive. Les avancées dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant le développement de nouvelles stratégies dans le traitement de ces maladies inflammatoires.

De récentes études ont mis en évidence la régulation de l'inflammation *via* l'inhibition d'un récepteur purinergique : le récepteur P2X<sub>7</sub>. En effet, en inhibant l'activité de ce récepteur, les ligands antagonistes induisent un effet immunomodulateur en réduisant significativement la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'implication de cette protéine dans la maladie cancéreuse - qui est l'une des premières causes de décès dans les pays développés - a également fait l'objet d'études biologiques dont les résultats montrent un rôle potentiel du récepteur dans cette pathologie.

Cependant, selon le type cellulaire et le tissu mis en cause, le rôle du récepteur peut être différent. En effet, certaines études ont montré que l'inhibition de P2X<sub>7</sub>R avait un effet bénéfique en termes d'inhibition de la croissance et de la prolifération cellulaire, alors que dans d'autres cas, c'est l'activation du récepteur qui semble être favorable. Nous détaillerons donc plus précisément cet aspect dans la partie introductive du mémoire afin d'éclaircir ce point.

1

Nous avons donc souhaité développer de nouveaux ligands potentiellement antagonistes sélectifs de P2X<sub>7</sub>R, afin d'étudier leurs propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses.

Nous présenterons ainsi, dans un premier temps, quelques généralités sur la famille des récepteurs purinergiques et plus précisément le P2X<sub>7</sub>R, ainsi que son implication potentielle dans différentes pathologies (notamment dans l'inflammation et la maladie cancéreuse). Puis, nous détaillerons la conception ainsi que la synthèse de nos nouvelles molécules. L'intérêt de la séparation des énantiomères de mélanges racémiques obtenus sera présenté, et les résultats observés lors des différents tests biologiques seront discutés. Pour terminer, un bilan de ces trois années de travail sera effectué, avant de présenter des conclusions et les perspectives envisagées pour la suite de cette étude.

CHAPITRE I : GENERALITES

#### I- Historique

Bien que très étudiés seulement depuis le début des années 90 (suite à la caractérisation du génome humain), les récepteurs purinergiques possèdent une longue histoire qui s'est écrite au fil des découvertes durant le siècle dernier. Le début de cette histoire est marqué par la découverte de Lohmann, en 1929, de l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie dans les tissus musculaires.<sup>1</sup> Cette même année, Drury et Szent-Györgyi mirent en évidence les effets de l'ATP et de ses dérivés sur le cœur.<sup>2</sup> C'est suite à cette découverte qu'est née l'idée - très attrayante pour l'ensemble de la communauté scientifique - d'un rôle extracellulaire pour l'ATP et ses dérivés. En 1935, Katashi Makino proposa une structure pour l'ATP, structure confirmée 10 ans plus tard par Basil Lythgoe.<sup>3</sup> En 1959, les études de Pamela Holton montrèrent que de l'ATP pouvait être libérée par des fibres sensitives afférentes, en quantité suffisante pour entraîner une vasodilatation de l'artère de l'oreille de lapin.<sup>4</sup> Sur la base d'un rôle potentiel pour l'ATP au niveau extracellulaire, Burnstock mit en évidence en 1962 que des cellules musculaires étaient excitées suite à la libération par les neurones d'un neurotransmetteur non adrénergique et non cholinergique.<sup>5,6</sup> Après dix années de recherches, il proposa l'existence de « nerfs purinergiques » capables de libérer de l'ATP comme neurotransmetteur.<sup>7</sup> Cependant, pour qu'une molécule puisse agir comme neurotransmetteur, celleci doit obligatoirement activer un récepteur à la surface des cellules sur lesquelles elle exerce son ou ses effets. En tenant compte de ce paramètre, et en se basant sur les effets pharmacologiques de l'ATP et de ses dérivés (notamment les études de Gillespie<sup>8</sup>), Burnstock proposa en 1978 l'existence de récepteurs purinergiques, avec d'une part les récepteurs P2 activés par l'ATP, et d'autre part les récepteurs P1 sensibles à l'adénosine.<sup>9</sup> Suite à l'observation que l'ATP pouvait entraîner des effets cellulaires différents en activant des récepteurs P2,<sup>10</sup> Burnstock et son collaborateur Kennedy proposèrent alors l'existence de deux sous-familles de récepteurs P2 en 1985,<sup>11</sup> qui seront nommés P2X et P2Y en 1994.<sup>12</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Khakh, B. S. et al. *Sci. Am.* **2009**, *301*, 84.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Drury, A. N. et al. *J. Physiol.* **1929**, *68*, 213.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Lythgoe, B. et al. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1947**, *1*, 15. <sup>4</sup> Holton, P. *J. Physiol. (London)* **1959**, *145*, 494.

 <sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Burnstock, G. et al. J. Physiol. **1962**, 160, 446.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Burnstock, G. et al. *J. Physiol.* **1962**, *160*, 461.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Burnstock, G. *Pharmacol. Rev.* **1972**, *24*, 509.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Gillespie, J. H. *J. Physiol.* **1934**, *80*, 345.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Burnstock, G. In *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach.* Straub, R. W.; Bolis, L. eds.; Raven Press, New York. **1978**. pp. 107-118.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Brown, C. M. et al. *Br. J. Pharmacol.* **1981**, *73*, 617.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Kennedy, C. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *111*, 49.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Abbracchio M. P. et al. *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445.

#### GENERALITES

Au début des années 90, suite au clonage et à la caractérisation des récepteurs aux purines et pyrimidines, l'idée de signalisation purinergique fut acceptée. 4 récepteurs P1 furent identifiés et nommés : A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, et A<sub>3</sub>.<sup>13</sup> En 1993, le premier récepteur à ATP fut cloné et nommé P2Y<sub>1</sub>.<sup>14</sup> Sept autres sous-types P2Y seront ensuite clonés, suivis par sept sous-types P2X.<sup>15</sup> Suite au clonage de ces récepteurs, de nombreuses études (passées en revue par Ralevic et Burnstock en 1998<sup>16</sup>) ont été menées afin de comprendre la pharmacologie de ces récepteurs. L'ensemble de ces études a permis de confirmer la classification des récepteurs proposée par Burnstock en 1978.<sup>9</sup> Cette classification est basée sur la structure moléculaire, la pharmacologie, et la sensibilité des différents récepteurs pour l'ATP et ses métabolites, ainsi que pour les dérivés synthétiques des nucléosides et nucléotides.<sup>16</sup>

A ce jour, 19 récepteurs purinergiques ont été identifiés et clonés chez l'Homme. Les quatre récepteurs P1 appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (DTM) couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont également désignés comme récepteurs à l'adénosine, qui est leur ligand endogène, et sont distribués de façon ubiquitaire.<sup>17</sup> Les récepteurs P2Y sont également des RCPG exprimés de façon ubiquitaire, et activés par les différents nucléotides.<sup>16</sup> Enfin, les 7 sous-types P2X identifiés chez l'Homme, et nommés P2X<sub>1</sub> à P2X<sub>7</sub>, sont des récepteurs canaux dont le ligand endogène est l'ATP. Ils sont exprimés dans l'ensemble de l'organisme, mais à des concentrations plus importantes au niveau des cellules du système immunitaire, notamment pour le sous-type P2X<sub>7</sub>.<sup>18,19</sup> Ce récepteur P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R) présente de nombreuses particularités par rapport aux autres sous-types de cette famille. Il en diffère en particulier par sa structure,<sup>20</sup> mais aussi par sa sensibilité à l'ATP, puisque des concentrations de l'ordre de la centaine de micromolaires sont nécessaires à son activation.<sup>16</sup> En effet, il a été montré que ce récepteur présentait un comportement différent selon qu'il est activé de façon brève ou de façon prolongée.<sup>21</sup> Lors d'une brève stimulation, ce récepteur fonctionne comme un canal ionique permettant un efflux potassique simultanément à un influx calcique et sodique. Ce sont ces échanges d'ions à travers la membrane - provoquant des variations de potentiels - qui conduisent à l'activation des différentes voies de transduction. Cependant, lors de stimulations répétées, on observe la formation d'un large pore membranaire à la place du canal cationique, laissant l'accès possible au cytoplasme à des molécules pouvant atteindre 900 Da ; ce qui entraîne généralement l'apoptose de ces cellules.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Daly, J. W. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. **1985**, 19, 29.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Webb, T. E. et al. *FEBS Lett.* **1993**, *324*, 219.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Burnstock, G. Br. J. Pharmacol. **2012**, *167*, 238.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Ralevic, V. et al. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Palmer, T. M. et al. *Neuropharmacol.* **1995**, *34*, 683.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> North, R. A. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 1013.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Valera, S. et al. *Nature* **1994**, *371*, 516.

 <sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Jiang, L. H. et al. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 1.
<sup>21</sup> Di Virgilio, F. *Immunol. Today* **1995**, *16*, 524.

#### GENERALITES

Suite à ces observations, les récepteurs purinergiques, et particulièrement P2X<sub>7</sub>R, ont été très étudiés dans le but de mieux comprendre leurs rôles physiologiques et d'étudier leurs implications potentielles dans certaines pathologies. Ces nombreuses études, réalisées pour la plupart ces 10 dernières années, ont mis en évidence l'implication de P2X<sub>7</sub>R dans de nombreuses pathologies telles que les différents types de douleur, le cancer, l'ischémie, des maladies neurodégénératives (impliquant Parkinson et Alzheimer), et l'inflammation.<sup>22</sup> En particulier, il a été montré que P2X<sub>7</sub>R joue un rôle majeur dans les phénomènes de libération de cytokines pro-inflammatoires telle l'IL-1β.<sup>23</sup> D'autre part, l'ATP est sécrétée en grande quantité lors de phénomènes inflammatoires, apparaissant ainsi comme un signal de danger.<sup>24</sup> Différents modèles animaux d'inflammation, tels que des modèles de colites induites, ont permis de valider le concept que l'inhibition de P2X<sub>7</sub>R était bénéfique pour la réduction de l'inflammation.<sup>23</sup> Ces dix dernières années, le développement de ligands potentiellement antagonistes sélectifs des P2X<sub>7</sub>R a été mené par différents groupes académiques et industriels, et un nombre croissant d'articles, revues, et également brevets concernant ces composés a été publié.

### II- Les récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont des protéines membranaires sensibles aux nucléotides et nucléosides de structures puriques et pyrimidiques. Comme décrit dans le paragraphe précédent, une classification de cette large famille de récepteurs, basée sur la structure moléculaire et la sélectivité vis-à-vis des différents ligands endogènes, a été mise en place et a permis de définir deux grands groupes avec, d'une part, les récepteurs P1, RCPG sélectifs de l'adénosine et, d'autre part, les récepteurs P2 subdivisés en deux sous-familles, les P2X ionotropes, et les P2Y métabotropes.

### II-1- Les récepteurs P1

Les récepteurs P1, ou récepteurs à adénosine, regroupent 4 sous-types identifiés à ce jour : les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>.<sup>13</sup> Depuis leur découverte, ces 4 isoformes de la famille P1 ont été clonées à partir de plusieurs espèces (humain, rat, lapin, chien, bovin...).<sup>16</sup> Cela a permis de mettre en évidence certaines différences entre ces sous-types, notamment au niveau de l'homologie de séquence au sein d'une même espèce. En effet, une conservation relativement faible des acides aminés a été constatée. Avec, par exemple, une homologie de séquences de seulement 45% entre les

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Guile, S. D. et al. J. Med. Chem. 2009, 52, 3123.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Ferrari, D. et al. J. Immunol. **2006**, 176, 3877.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Stagg, J. et al. *Oncogene* **2010**, *29*, 5346.

#### GENERALITES

récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2B</sub> de rat,<sup>25</sup> ou encore, pour le récepteur A<sub>3</sub>, une homologie respective de 50%, 43% et 40% avec les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> humains.<sup>26</sup> Cependant, ces récepteurs présentent des similitudes au niveau de leur structure moléculaire et des mécanismes de fonctionnement. En effet, tous appartiennent à la grande famille des RCPG, et présentent une structure à sept DTM hydrophobes en hélices  $\alpha$ , chacun constitué de 21 à 28 A.A., ainsi qu'une extrémité *N*-terminale extracellulaire présentant des sites de glycosylation, et un domaine *C*-terminal cytoplasmique permettant l'interaction avec la protéine G appropriée. Le site de liaison des ligands se situe dans la moitié supérieure de la cavité formée par les sept DTM.<sup>16</sup>



Figure 1 : Structure générale des récepteurs P1.<sup>27</sup>

Ces récepteurs présentent une distribution tissulaire hétérogène au sein de l'organisme, ainsi que des mécanismes de transduction propres à chacun. Cette dernière propriété est due au soustype de protéine G activé par chaque isoforme, et les réponses pharmacologiques engendrées lors de l'activation, ou de l'inhibition, de ces récepteurs sont donc différentes.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> Stehle, J. H. et al. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 384.

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> Linden J. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1994**, *15*, 298.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> Fields, R. D. et al. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 423.
**Récepteurs**  $A_1$ : le récepteur  $A_1$  est couplé à une protéine  $G_{i/o}$ , et distribué de manière ubiquitaire, avec une forte expression au niveau du cerveau. L'activation de ce récepteur entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase, causant ainsi une diminution de la concentration en AMP cyclique (AMPc). Cela entraîne un défaut de phosphorylation des différentes protéines kinases AMPc-dépendantes.<sup>28</sup>

**Récepteurs A<sub>2A</sub>** : le récepteur A<sub>2A</sub> active une protéine G<sub>s</sub>.<sup>17</sup> II est principalement exprimé au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, ainsi que dans les cellules du système immunitaire. Son activation par l'adénosine, ou d'autres agonistes, stimule l'adénylate cyclase et induit la mobilisation de l'AMPc au niveau intracellulaire, qui conduit à l'activation de différentes protéines kinases. Il a également été constaté que l'activation de ce récepteur facilitait la transmission synaptique en augmentant la libération des neurotransmetteurs.<sup>27</sup> Ce récepteur est notamment étudié pour son implication dans diverses pathologies neurodégénératives.<sup>29,30</sup>

**Récepteurs A<sub>2B</sub>** : le récepteur A<sub>2B</sub> est couplé à une protéine  $G_{q}$ ,<sup>31</sup> et est exprimé dans l'ensemble des tissus de l'organisme, mais avec une faible concentration. De plus, des quantités importantes d'adénosine sont nécessaires à son activation. L'activation de ce récepteur par l'adénosine entraîne principalement l'activation de la phospholipase de type C (PLC), qui conduit à la mobilisation d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de calcium intracellulaire. Ce récepteur semble jouer un rôle important dans la dilatation des vaisseaux.<sup>16</sup>

**Récepteurs A<sub>3</sub> :** le récepteur A<sub>3</sub> est couplé à une protéine G<sub>i</sub>,<sup>32</sup> et est exprimé dans l'ensemble des tissus de l'organisme. L'activation de ce récepteur par l'adénosine entraîne principalement l'inhibition de l'adénylate cyclase, provoquant un défaut de phosphorylation de certaines protéines kinases AMPc-dépendantes. Cependant, les rôles physiologiques de ce sous-type ne sont pas encore bien connus.

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Freissmuth, M. et al. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17778.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Piersanti, G. et al. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5456.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> Canas, P. M. et al. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 14741.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Feoktistov, I. et al. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 1979.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Palmer, T. M. et al. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29607.

# II-2- Les récepteurs P2

Les récepteurs P2 sont les récepteurs sensibles aux nucléotides, et notamment à l'ATP. En 1994, Abbracchio et Burnstock ont proposé de classer les récepteurs P2 en deux grandes familles : les récepteurs ionotropes P2X, formant un canal cationique non spécifique, et les récepteurs métabotropes P2Y, qui sont couplés aux protéines G.<sup>12</sup>

# II-2-1- Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y appartiennent à la superfamille des RCPG. Ce sont des protéines constituées de 328 à 377 A.A., formant 7 DTM reliés par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. A ce jour, 8 isoformes ont été identifiées et clonées : les récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub>.<sup>33</sup> Les nombres manquants représentent des récepteurs clonés chez d'autres espèces que les mammifères, ou des récepteurs possédant une séquence proche de celle des récepteurs P2Y mais pour lesquels aucune réponse fonctionnelle aux nucléotides n'est connue.<sup>34</sup> Ces récepteurs sont sensibles aux nucléotides, et sont activés par les purines (ATP, ADP) et les pyrimidines (UTP, UDP). Au sein de l'organisme, ces récepteurs sont présents de façon ubiquitaire, mais les réponses pharmacologiques suite à leur activation sont très variées, et dépendent du type cellulaire rencontré et de la protéine G mise en jeu.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Abbracchio, M. P. et al. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 52.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Abbracchio, M. P. et al. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281.



Figure 2 : Structure générale des récepteurs P2Y.<sup>27</sup>

Les récepteurs P2Y sont couplés à différentes protéines G. Un récepteur P2Y particulier peut être couplé à différentes protéines G et activer différentes voies de signalisation intracellulaire. En fonction du ligand, l'une ou l'autre de ces voies de signalisation peut être activée. Les récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> et P2Y<sub>6</sub> sont couplés à l'activation d'une phospholipase de type C (PLC) *via* G<sub>q/11</sub>.<sup>34</sup> Leur activation entraîne la formation d'IP<sub>3</sub> et la mobilisation du calcium intracellulaire. Le récepteur P2Y<sub>4</sub> est également couplé à G<sub>i/0</sub>. L'activation du récepteur P2Y<sub>11</sub> par l'ATP conduit à une augmentation d'AMPc et d'IP<sub>3</sub>, alors que l'activation par l'UTP entraîne une mobilisation du calcium intracellulaire sans augmentation d'IP<sub>3</sub> et d'AMPc. Les récepteurs P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub> sont surtout couplés à Gi.<sup>34</sup> D'un point de vue structural, deux sous-groupes de récepteurs P2Y peuvent être identifiés. Le premier sous-groupe comprend les récepteurs P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>14</sub> possédant des séquences assez proches.<sup>33</sup>

**Récepteurs P2Y<sub>1</sub>**: le récepteur P2Y<sub>1</sub> est le premier récepteur P2 à avoir été cloné, à partir du cerveau de poussin.<sup>14</sup> Parmi les composés capables d'activer ce sous-type, on retrouve l'ATP et l'ADP, mais l'agoniste le puissant connu à ce jour est le 2-MeSATP (dérivé synthétique de l'ATP). La chloropurine MRS 2279 est, quant à elle, l'antagoniste le plus puissant qui a été reporté.<sup>35</sup> L'activation du récepteur résulte en l'activation de la PLC *via* une protéine G<sub>q</sub>, ou en l'inhibition de l'adénylate cyclase *via* une protéine G<sub>i</sub>.<sup>36</sup> Ce récepteur possède une fonction importante au niveau de l'adhésion des plaquettes et de l'hémostasie du fait de sa large distribution au niveau des plaquettes et des cellules endothéliales.

**Récepteurs P2Y<sub>2</sub> :** le récepteur P2Y<sub>2</sub> a été cloné pour la première fois à partir de neuroblastomes de souris.<sup>37</sup> Les deux nucléotides les plus actifs sur ce sous-type sont l'ATP et l'UTP qui lui permettent, suite à son activation, d'interagir avec une protéine  $G_q$ .<sup>34</sup> Ce récepteur est bloqué par la suramine. Il est exprimé dans différents tissus, dont le cœur et le cerveau. Son activation augmente la synthèse et/ou la libération d'acide arachidonique, de prostaglandines et d'oxyde nitrique.<sup>38</sup>

**Récepteurs P2Y<sub>4</sub> :** le récepteur P2Y<sub>4</sub> a été cloné à partir de cellules de placenta humain.<sup>39</sup> Il présente une grande sélectivité pour l'UTP par rapport à l'ATP, qui sont les deux agonistes les plus puissants de cette isoforme. Actuellement, aucun antagoniste sélectif de ce récepteur n'a été décrit. Il présente une expression assez limitée au sein de l'organisme, puisqu'il n'est retrouvé qu'au niveau du placenta, du pancréas et en faible quantité dans les poumons.<sup>34</sup>

**Récepteurs P2Y<sub>6</sub> :** le récepteur P2Y<sub>6</sub> a d'abord été isolé à partir de cellules de muscle lisse de rat,<sup>40</sup> puis de placenta humain.<sup>41</sup> Ce récepteur est sélectif de l'UDP et présente une grande sensibilité pour celui-ci. Aucun antagoniste sélectif de ce sous-type n'a encore été décrit. P2Y<sub>6</sub> est lié à une protéine  $G_q$  qui stimule la PLC avec la formation d'IP<sub>3</sub> et la production d'interleukines 8 (IL-8).<sup>34</sup> Ce récepteur est largement distribué, et on le retrouve notamment au niveau du placenta, du cœur, des poumons, des intestins, et des voies respiratoires.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Chhatriwala, M. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 1038.

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> Jacobson, K. A. et al. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4057.

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> Lustig, K. D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5113.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> Xu, J. et al. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids **2003**, 69, 437.

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> Communi, D. et al. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30849.

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> Chang, K. et al. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26152.

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> Communi, D. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 222, 303.

**Récepteurs P2Y<sub>11</sub>**: le récepteur P2Y<sub>11</sub> a été cloné pour la première fois à partir de cellules de placenta humain.<sup>42</sup> Ce récepteur est uniquement sensible aux nucléotides puriques, avec dans l'ordre de sensibilité : ATP > 2-MeSATP >> ADP. Il est unique parmi tous les récepteurs P2Y, car c'est le seul dont le gène contient un intron. Il est à la fois couplé à la PLC et à l'adénylate cyclase de manière positive.<sup>34</sup>

**Récepteurs P2Y<sub>12</sub> :** ce récepteur, d'abord cloné chez le rat,<sup>43</sup> possède comme agoniste naturel l'ADP. Cette isoforme est principalement retrouvée au niveau des plaquettes, et joue un rôle dans leur agrégation.<sup>34</sup> En effet, l'activation de ce récepteur stimule l'adhésion des plaquettes au niveau des tissus lésés, favorisant ainsi la coagulation. Il est notamment la cible du clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>), un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, utilisé pour la prévention des accidents athérothrombotiques.<sup>43</sup> Ce récepteur est couplé négativement à l'adénylate cyclase.

**Récepteurs P2Y<sub>13</sub> :** les récepteurs P2Y<sub>13</sub> ont d'abord été clonés chez l'Homme,<sup>44</sup> et présentent de nombreuses similitudes avec le sous-type P2Y<sub>12</sub>, notamment au niveau de l'homologie de séquence. Leurs agonistes naturels sont l'ADP et le 2-MeSADP.<sup>36</sup> Le récepteur P2Y<sub>13</sub> est exprimé dans différents organes humains, surtout dans la rate et le cerveau.<sup>34</sup>

**Récepteurs P2Y<sub>14</sub> :** le récepteur P2Y<sub>14</sub>, anciennement appelé récepteur à l'UDP-glucose, a été cloné pour la première fois à partir de cellules myéloïdes humaines.<sup>45</sup> Il est identique à 47 % aux récepteurs P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>13</sub>. Il est activé par l'UDP-glucose, l'UDP-galactose, l'acide UDP-glucuronique et l'UDP-N-acétylglucosamine.<sup>46</sup> A ce jour, aucun antagoniste sélectif n'est disponible. L'ARNm de ce récepteur est largement distribué dans le corps humain.

# II-2-2- Les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropes, ou récepteurs contrôlant des canaux ioniques, qui sont activés par l'ATP (principal ligand endogène de cette sous-famille). Ils forment alors un canal ionique sélectif et perméable aux cations K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>.<sup>18</sup> A ce jour, 7 isoformes (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>) de 288 à 595 A.A. ont été identifiées et clonées, dont la première (P2X<sub>1</sub>) clonée en 1994.<sup>19,47,48</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> Communi, D. et al. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 1199.

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Hollopeter, G. et al. *Nature* **2001**, *409*, 202.

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> Communi, D. et al. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41479.

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> Nomura, N. et al. *DNA Res.* **1994**, *1*, 251.

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> Chambers, J. K. et al. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10767.

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Brake, A. J. et al. *Nature* **1994**, *371*, 519.

# Structure :

Depuis l'identification du récepteur P2X<sub>1</sub>, six autres gènes codant pour l'expression des sousunités existantes ont été identifiés sur des chromosomes différents.<sup>16</sup> Les membres de cette famille de récepteurs présentent des sous-unités dont la structure est conservée avec une faible homologie de séquence allant de 26 à 49%.<sup>18</sup> Chaque sous-unité est composée de deux domaines hydrophobes transmembranaires, reliés par une large boucle extracellulaire contenant 10 cystéines conservées capables de former des ponts disulfures. Les extrémités *N*- et *C*-terminales sont localisées dans le cytoplasme, et présentent des sites d'interactions protéine-protéine, ou protéine-lipide, permettant l'activation de certaines voies de transduction. Le premier segment transmembranaire est impliqué dans l'ouverture du canal ionique, alors que le second intervient dans la formation du pore membranaire non sélectif, formé sous certaines conditions et seulement par quelques-uns des soustypes. La boucle extracellulaire sert quant à elle de site de fixation à l'ATP.<sup>18, 49, 50, 51, 52</sup>



Figure 3 : Structure générale d'une sous-unité P2X.<sup>51</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> Valera, S. et al. *Receptors Channels* **1995**, *3*, 283.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> Baroja-Mazo, A. et al. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 79.

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> Egan, T. M. et al. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 501.

<sup>&</sup>lt;sup>51</sup> Roberts, J. A. et al. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 486.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> Kawate, T. et al. *Nature* **2009**, *460*, 592.

Cependant, aucun sous-type P2X n'est capable de fonctionner en monomère. Tous les récepteurs P2X fonctionnels résultent de l'association de trois de ces sous-unités, pour former un récepteur trimérique fonctionnel. Dans certains cas (plus rares), la formation d'hexamères est également possible.<sup>18</sup> Il peut donc y avoir formation d'homotrimères (par association de 3 sousunités identiques), ou d'hétérotrimères donnant lieu à la formation de récepteurs présentant différentes sous-unités. Les hétérotrimères les plus rencontrés, et les plus importants au niveau physiologique sont les récepteurs P2X<sub>1/2</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>1/4</sub>, et P2X<sub>1/5</sub>.<sup>49</sup> Chaque récepteur de cette sousclasse est donc formé par l'assemblage de 3 sous-unités constituant le récepteur canal ionique situé au centre de la protéine membranaire. Cependant, il semble que le récepteur P2X<sub>6</sub> ne soit fonctionnel que lors d'associations hétéromériques, notamment avec les sous-unités P2X<sub>2</sub> et P2X<sub>4</sub>, <sup>53,54,55</sup> et que le récepteur P2X<sub>7</sub> soit le seul à fonctionner (quasiment uniquement) en homotrimère.<sup>49</sup>



Figure 4 : Structure générale d'un récepteur P2X.

# Distribution :

Les récepteurs P2X sont exprimés dans l'ensemble de l'organisme. Cependant, chaque soustype présente une distribution particulière et est exprimé en plus ou moins grande concentration dans certains tissus.<sup>18</sup> Les récepteurs P2X<sub>7</sub>, par exemple, seront principalement retrouvés au niveau des cellules du système immunitaire.<sup>56</sup> L'expression de chacun sera précisée dans les sections relatives à chaque récepteur.

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> King, B. F. et al. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 4871.

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> Lê, K. T. et al. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 7152.

<sup>&</sup>lt;sup>55</sup> Soto, F. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *223*, 456.

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> Le Feuvre, R. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 447, 261.

## Pharmacologie :

L'agoniste naturel des récepteurs P2X est essentiellement l'ATP. De plus, il semblerait que la fixation de trois molécules de cet agoniste soit nécessaire à l'activation d'un récepteur.<sup>57,58,59,60</sup> Les différents sous-types P2X diffèrent par rapport à leur sensibilité à l'ATP. Des concentrations d'ATP de l'ordre du millimolaire sont nécessaires pour activer P2X<sub>7</sub>, tandis que les autres sous-types ont des  $EC_{50}$  de 0,1 à 10 µM pour l'ATP.<sup>51</sup> L' $\alpha$ , $\beta$ -meATP est un analogue de l'ATP permettant la discrimination entre plusieurs sous-types de récepteurs P2X : seuls les récepteurs P2X<sub>1</sub> et P2X<sub>3</sub> sont activés par des faibles concentrations de cet agoniste.<sup>51</sup> L'activité des récepteurs P2X peut être régulée par certains ions, notamment Zn<sup>2+</sup>, ou par le pH. Différents antagonistes des récepteurs P2X ont été décrits, avec des spécificités variables par rapport aux sept sous-types. Nous présenterons plus en détail le développement des antagonistes P2X<sub>7</sub> dans une partie consacrée à ce sujet. Des différences entre espèces ont été rapportées en ce qui concerne la sensibilité des récepteurs P2X aux différents agonistes et antagonistes.<sup>61</sup>

L'activation des récepteurs par l'ATP entraîne des réponses rapides *via* l'ouverture du canal ionique dont résulte un efflux potassique simultanément à un influx calcique et sodique. Ces courants ioniques provoquent une dépolarisation membranaire qui entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Cette mobilisation de calcium intracellulaire provoque l'activation de diverses voies de signalisation suite à l'activation de protéines kinases calcium-dépendantes, dont certaines MAP-kinases.<sup>36</sup> Les réponses sont fonction du sous-type mis en jeu, ainsi que du type cellulaire dans lequel le récepteur est exprimé. Cependant, lors d'activations prolongées (concentrations importantes en ATP au niveau extracellulaire) certains récepteurs, dont P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>7</sub>, présentent un comportement différent. Un changement de conformation aboutissant à la formation d'un pore non sélectif permettant le passage de molécules pouvant atteindre 900 Da est observé.<sup>62,63,64</sup> Ce phénomène conduit généralement la cellule vers un processus de mort par apoptose.<sup>49</sup> L'activation des récepteurs P2X<sub>1</sub> et P2X<sub>3</sub> sont rapidement désensibilisés (< 1 seconde), tandis que les récepteurs P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> et P2X<sub>6</sub> sont désensibilisés plus lentement. Le récepteur P2X<sub>7</sub> est peu ou pas désensibilisé.<sup>49,18</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> Bean, B. P. et al. J. Neurosci. **1990**, 10, 11.

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> Evans, R. J. Eur. Biophys. J. **2009**, 38, 319.

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> Jiang, L. H. et al. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 8903.

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> Vial, C. et al. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 487.

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> Donnelly-Roberts, D. L. et al. Br. J. Pharmacol. 2007, 151, 571.

<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> Nicke, A. et al. *J. Neurochem.* **2005**, *92*, 925.

<sup>63</sup> Khakh, B. S. et al. Nat. Neurosci. 1999, 2, 322.

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> Surprenant, A. et al. *Science* **1996**, *272*, 735.

#### Les sous-types P2X :

Dans cette partie, seuls les homomultimères seront présentés. Une section sera dédiée à la présentation du récepteur P2X<sub>7</sub>.

**Récepteurs P2X<sub>1</sub>**: le récepteur P2X<sub>1</sub> a été cloné pour la première fois en 1994 à partir du canal déférent de rat.<sup>19</sup> C'est une protéine de 399 A.A. activée par l'ATP, mais qui présente une sensibilité plus importante pour le 2-MeSATP. Sa désensibilisation rapide ne permet pas la formation du pore non sélectif. Ce récepteur est fortement exprimé au niveau de la vessie, des muscles lisses, des artères et artérioles, et en plus faibles concentrations au niveau des poumons et de la rate.<sup>19,65</sup> Cette protéine intervient dans la contraction des muscles lisses et l'agrégation des plaquettes.<sup>16</sup>

**Récepteurs P2X<sub>2</sub>**: le récepteur P2X<sub>2</sub> cloné pour la première à partir de cellules PC12 du phéochromocytome de rat,<sup>47</sup> présente une homologie de 41% avec le récepteur P2X<sub>1</sub>.<sup>16</sup> Il possède une sensibilité comparable pour l'ATP et le 2-MeSATP.<sup>66</sup> Sa lente désensibilisation entraîne la formation du pore membranaire non sélectif lors de stimulations prolongées, menant souvent les cellules à l'apoptose. Ce récepteur est également régulé par les protons,<sup>67</sup> ainsi que par les concentrations extracellulaires en calcium et zinc qui,<sup>47</sup> lorsqu'elles sont importantes, inhibent la protéine. Cette protéine de 472 A.A. est exprimée dans divers tissus, et notamment dans le cerveau, la vessie, les ganglions cervicaux, les intestins et le canal déférent.<sup>68</sup>

**Récepteurs P2X<sub>3</sub> :** d'abord cloné à partir de la racine postérieure ganglionnaire de rat,<sup>69</sup> le récepteur P2X<sub>3</sub> présente une plus grande sensibilité pour le BzATP et le 2-MeSATP que pour l'ATP.<sup>70</sup> Son activation est suivie d'une désensibilisation rapide ne lui permettant pas de former un pore membranaire.<sup>51</sup> Cette protéine de 397 A.A. présente une distribution assez restreinte ; elle est essentiellement exprimée au niveau des neurones sensitifs et est impliquée dans certains types de douleurs.<sup>71</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup> Di Virgilio, F. et al. *Curr. Drug. Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **2005**, *5*, 85.

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup> Evans, R. J. et al. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 178.

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> King, B. F. et al. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 1371.

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> Gever, J. R. et al. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 513.

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> Chen, C. C. et al. *Nature* **1995**, *377*, 428.

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Garcia-Guzman, M. et al. Brain Res. Mol. Brain Res. **1997**, 47, 59.

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> Wirkner, K. et al. *Mol. Neurobiol.* **2007**, *36*, 165.

**Récepteurs P2X<sub>4</sub> :** cloné pour la première fois à partir d'hippocampes de rats en 1995,<sup>72</sup> le récepteur P2X<sub>4</sub>, constitué de 288 A.A., a ensuite été cloné à partir de cerveaux humains en 1997,<sup>73</sup> et cristallisé en 2009,<sup>52</sup> puis en 2012.<sup>74</sup> Le gène codant pour la sous-unité P2X<sub>4</sub> est localisé sur le même chromosome que celui de la sous-unité P2X<sub>7</sub>. La sous-unité P2X<sub>4</sub> est composée de 288 A.A.. Parmi toutes les sous-unités de récepteurs P2X, c'est celle qui possède la séquence en acides aminés la plus proche de celle de la sous-unité P2X<sub>7</sub> (environ 49 % d'identité).<sup>18</sup>



**Figure 5 : Représentation de la sous-unité P2X**<sub>4</sub>.<sup>52</sup> La sous unité P2X<sub>4</sub> a une forme de dauphin. Les hélices  $\alpha$  (TM1 – 2 et  $\alpha$ 2 – 5), les feuillets  $\beta$  ( $\beta$ 1 – 14), les ponts disulfures (SS1 – 5), et les parties glycosylées (g2 et g4) sont indiqués.

Comme tous les sous-types de ce groupe, ce récepteur est activé par l'ATP, mais présente une sensibilité plus importante pour le 2-MeSATP. Lors d'une brève activation, il agit en tant que canal cationique. Cependant, sa lente désensibilisation permet la formation du pore canal non sélectif lorsqu'il est activé de façon prolongée. Ce récepteur peut également être modulé par les cations divalents lorsque leur concentration extracellulaire est importante.<sup>73</sup> Cette protéine est largement distribuée dans l'organisme avec des taux d'expression relativement importants, mais son rôle physiologique reste mal connu.

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> Bo, X. et al. *FEBS Lett.* **1995**, *375*, 129.

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> Garcia-Guzman, M. et al. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 109.

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> Hattori, M. et al. *Nature* **2012**, *485*, 207.



*Figure 6 : Représentation du récepteur P2X*<sup>4</sup> *homotrimérique*.<sup>52</sup> Chaque sous-unité est représentée par une couleur différente. Les barres grises représentent les extrémités intérieure et extérieure de la membrane plasmique. A gauche, la forme fermée du récepteur, à droite la forme ouverte liée aux molécules d'ATP.

**Récepteurs P2X<sub>5</sub> :** le récepteur P2X<sub>5</sub>, composé de 417 A.A., a d'abord été cloné à partir des ganglions cœliaques de rat.<sup>75</sup> II est activé par l'ATP, le 2-MeSATP et l'ADP ; ce récepteur ne répond pas à l' $\alpha$ , $\beta$ -meATP.<sup>75</sup> Le PPADS et la suramine sont des antagonistes du récepteur P2X<sub>5</sub>.<sup>76,77</sup> Ce récepteur est essentiellement exprimé au niveau des muscles squelettiques.<sup>78</sup>

**Récepteurs P2X<sub>6</sub>** : cette protéine de 379 A.A. a été clonée à partir de ganglions cervicaux supérieurs de rat en 1996.<sup>75</sup> Aucun courant n'est induit par l'ATP quand les récepteurs P2X<sub>6</sub> sont exprimés sous forme d'homotrimères dans des oocytes ou des cellules HEK293.<sup>75,79</sup> Au contraire, de rapides courants ioniques sont observés suite à l'activation du récepteur par l'ATP, lorsqu'il est exprimé sous forme d'hétérotrimère. P2X<sub>6</sub> est exprimé dans divers tissus, et principalement au niveau du système nerveux central.<sup>18</sup> Cependant, aucun rôle physiologique n'est reporté pour ce récepteur exprimé sous forme d'homotrimère.

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> Collo, G. et al. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 2495.

<sup>&</sup>lt;sup>76</sup> Bo, X. et al. J. Biol. Chem. **2000**, 275, 14401.

<sup>&</sup>lt;sup>77</sup> Garcia-Guzman, M. et al. *FEBS Lett.* **1996**, *388*, 123.

<sup>&</sup>lt;sup>78</sup> Meyer, M. P. et al. *Dev. Dyn.* **1999**, *216*, 442.

<sup>&</sup>lt;sup>79</sup> Khakh, B. S. et al. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7289.

# III- Les récepteurs P2X<sub>7</sub>

# III-1- Gène, séquence, structure, et propriétés

III-1-1- Topologie

Initialement dénommé P2Z, le récepteur P2X<sub>7</sub> (récepteur ionotrope de la sous-classe P2X) a été décrit à la surface des mastocytes dès 1980.<sup>80</sup> Il a été cloné pour la première fois à partir de cerveaux de rats en 1996,<sup>64</sup> puis à partir de monocytes humains en 1997.<sup>81</sup>

Le gène codant pour la sous-unité P2X<sub>7</sub> contient 13 exons et, chez l'Homme, il est localisé au niveau du chromosome 12,<sup>82,83</sup> sur lequel est également situé le gène codant pour la sous-unité P2X<sub>4</sub>. Cette protéine de 595 A.A. présente une topologie typique des sous-types P2X, puisqu'elle est constituée de deux DTM reliés par une large boucle extracellulaire, et des domaines *N*- et *C*-terminaux intracellulaires. L'association de trois de ces sous-unités protéiques est nécessaire pour qu'un canal puisse se former et que le récepteur soit fonctionnel.<sup>84</sup> Ainsi, les récepteurs P2X, et notamment les récepteurs P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R), fonctionnent sous forme de trimères. Ce phénomène d'association a été mis en évidence, et il est clair à l'heure actuelle, que des sous-unités différentes peuvent s'associer pour former des récepteurs hétérotrimériques fonctionnels, comme les récepteur P2X<sub>2/3</sub>, ou encore P2X<sub>4/6</sub> avec des stœchiométries variables.<sup>54,85</sup> Le récepteur P2X<sub>6</sub> n'est, quant à lui, pas fonctionnel en tant qu'homotrimère. Cette sous-unité n'est donc retrouvée fonctionnelle que dans des hétérotrimères. Il a longtemps été supposé que le récepteur P2X<sub>7</sub> ne formait pas d'hétérotrimère. Cependant, la formation de complexes fonctionnels avec la sous-unité P2X<sub>4</sub> est souvent corrélée à celle de P2X<sub>7</sub><sup>86</sup>).<sup>87</sup>

La structure trimérique des P2XR a été confirmée il y a quelques années lorsque Kawate (2009),<sup>52</sup> puis Hattori et Gouaux (2012),<sup>74</sup> ont résolu la structure cristallographique d'une forme tronquée du récepteur P2X<sub>4</sub> du poisson zèbre. Cela a représenté une avancée majeure dans la connaissance des récepteurs P2X notamment en termes de structure. En effet, la cristallisation de P2X<sub>4</sub>R, en forme ouverte ou fermée, a permis de réaliser des études de modélisation moléculaire, et

<sup>&</sup>lt;sup>80</sup> Cockcroft, S. et al. *Biochem. J.* **1980**, *188*, 789.

<sup>&</sup>lt;sup>81</sup> Rassendren, F. et al. J. Biol. Chem. **1997**, 272, 5482.

<sup>&</sup>lt;sup>82</sup> Fuller, S. J. et al. *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 257.

<sup>&</sup>lt;sup>83</sup> Buell, G. N. et al. *Receptors Channels* **1998**, *5*, 347.

<sup>&</sup>lt;sup>84</sup> Burnstock, G. et al. Adv. Pharmacol. **2011**, 61, 333.

<sup>&</sup>lt;sup>85</sup> Lewis, C. et al. *Nature* **1995**, *377*, 432.

<sup>&</sup>lt;sup>86</sup> Craigie, E. et al. *Front. Physiol.* **2013**, *4* : 216.

<sup>&</sup>lt;sup>87</sup> Guo, C. et al. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 1447.

de construire des modèles des différents sous-types de récepteurs P2X, et notamment P2X<sub>7</sub>, par homologie de séquence.<sup>20,88</sup>

De nombreuses études de mutagénèse dirigée ont également permis d'identifier les sites de liaisons, et de mieux comprendre le rôle de chacune des parties du récepteur.<sup>89,90</sup>



Figure 7: Modèle de P2X<sub>7</sub>R humain.<sup>20</sup> Modèle de P2X<sub>7</sub>R trimérique humain à l'état fermé (A) et en forme ouverte lié à l'ATP (B), basé sur les structures P2X<sub>4</sub>.1R du poisson zèbre (4DW0 et 4DW1, respectivement). Chaque sous-unité est montrée dans une couleur différente. Trois molécules d'ATP sont liées à l'interface des sous-unités. Le cercle en pointillés blancs (en haut à droite) schématise l'ouverture du canal permettant le passage des ions à travers la membrane.

 <sup>&</sup>lt;sup>88</sup> Alves, L. A. et al. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 4531.
<sup>89</sup> Cao, L. et al. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12916.

<sup>&</sup>lt;sup>90</sup> Jiang, R. et al. *EMBO J.* **2012**, *31*, 2134.

Les domaines *N*- et *C*-terminaux sont intracellulaires. L'extrémité *N*-terminale ne comporte que 20 à 30 A.A. pour les sous-unités P2X ; 25 dans le cas de P2X<sub>7</sub>R. Dans cette courte séquence, des sites consensus de phosphorylation par la PKC ont été identifiés et se montrent importants pour la régulation des flux ioniques et la désensibilisation.<sup>91</sup> La longueur de la chaîne *C*-terminale est très variable selon les sous-types. En effet, on dénombre 28 A.A. pour l'extrémité *C*-terminale de la sous-unité P2X<sub>6</sub>, contre 240 pour P2X<sub>7</sub>.<sup>84</sup> Ces différences de longueur et/ou de séquence du domaine *C*-terminal entraînent des changements dans la cinétique des courants ioniques, ainsi que des différences dans la vitesse de désensibilisation entre les sous-unités.<sup>92</sup> Les réponses spécifiques à l'activation de chaque sous-type peuvent, en partie, être expliquées par cette différence structurale.<sup>84</sup> II est également à noter que 10 isoformes de P2X<sub>7</sub>R ont été identifiées,<sup>93</sup> et que l'isoforme P2X<sub>7</sub>a de 595 A.A. représente la forme canonique du récepteur.

Chacune des 3 sous-unités possède deux domaines transmembranaires (DTM) d'environ 28 A.A..<sup>19,47,94</sup> Dans le cas particulier de P2X<sub>7</sub>R, chaque DTM est constitué de 21 A.A.<sup>95</sup> Ces deux domaines en hélice  $\alpha$  sont situés au niveau central du canal ionique et participent au changement de conformation de la protéine lors de l'activation du récepteur. Le DTM1 intervient principalement dans la régulation du flux ionique.<sup>96</sup> Le DTM2 est, lui, également important pour la formation du pore membranaire, l'assemblage des sous-unités, le degré de désensibilisation,<sup>97</sup> le flux ionique,<sup>98</sup> ainsi que pour l'expression du récepteur à la surface membranaire.<sup>96</sup> Les sous-unités sont reliées entre elles par l'intermédiaire des DTM, et il semble que le site de liaison de l'ATP soit situé au niveau de la partie supérieure des DTM.<sup>58</sup> Une molécule d'ATP se fixerait à l'interface de deux sous-unités, sur le DTM1 de l'une et le DTM2 de l'autre. En effet, les modèles construits par homologie suite à la résolution de la structure de P2X<sub>4</sub>R ont permis d'avoir une idée plus précise des acides aminés de P2X<sub>7</sub>R impliqués dans la reconnaissance de l'ATP.<sup>20</sup> Au niveau de ce site de liaison, les deux DTM forment un environnement électropositif qui favorise l'approche des molécules d'ATP.<sup>99</sup> Ce site électropositif est formé par quatre résidus qui peuvent interagir avec les atomes d'oxygène des groupements phosphates, dont les groupes  $\beta$ - et  $\gamma$ - sont partiellement exposés. La lysine 64 (de la sous-unité B ; *cf* Figure 8), et en particulier le groupe  $NH_3^+$  de la chaîne latérale, est située à proximité du centre du groupement triphosphate et forme des liaisons hydrogènes avec les trois phosphates.

<sup>&</sup>lt;sup>91</sup> Vial, C. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *350*, 244.

<sup>92</sup> Khakh, B. S. Nat. Rev. Neurosci. 2001, 2, 165.

<sup>&</sup>lt;sup>93</sup> Pelegrin, P. et al. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. **2008**, 12, 377.

<sup>&</sup>lt;sup>94</sup> North, R. A. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1996**, *8*, 474.

<sup>&</sup>lt;sup>95</sup> Cheewatrakoolpong, B. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 17.

<sup>&</sup>lt;sup>96</sup> Chengqun, S. et al. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e61886.

<sup>&</sup>lt;sup>97</sup> Evans, R. J. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 961.

<sup>&</sup>lt;sup>98</sup> Nakazawa, K. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *347*, 141.

<sup>&</sup>lt;sup>99</sup> North, R. A. et al. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *83*, 759.

Les chaînes latérales des lysines 66 et 193 (également portées par la sous-unité B) interagissent respectivement avec les groupes phosphates  $\gamma$ - et  $\alpha$ -. La chaîne latérale de l'asparagine 292, et de la lysine 311, ainsi que l'arginine 294 et la lysine 311 (de la sous-unité A) forment respectivement des liaisons hydrogènes avec les groupes  $\beta$ - et y- phosphates. L'adénine forme des liaisons hydrogènes avec la chaîne latérale de la thréonine 189, et le carbonyle de la chaîne principale de la lysine 66 et de la thréonine 189 de la sous-unité B. L'adénine intervient également dans des interactions hydrophobes avec la leucine 191 et l'isoleucine 228 de la même sous-unité.<sup>20</sup> Il a récemment été montré que la leucine 186 de P2X<sub>2</sub>R du rat (équivalente à la leucine 191 de P2X<sub>7</sub>R) joue un rôle essentiel dans la reconnaissance du groupe adénine.<sup>100</sup> En effet, la mutation de la leucine 191 pour une proline entraîne une perte de fonction pour P2X<sub>7</sub>R humain.<sup>101</sup> Il est à noter que le résidu leucine 217 de P2X<sub>4</sub>R du poisson zèbre qui interagit avec le cycle ribose n'est pas retrouvé dans les P2X<sub>7</sub>Rs de mammifère.<sup>74</sup> L'absence de ce résidu au niveau du site de liaison de l'ATP pourrait, en partie, expliquer la faible sensibilité du récepteur pour son ligand ainsi que son affinité plus importante pour le BzATP (Benzoyle ATP) qui est un agoniste synthétique du récepteur (les différents ligands seront présentés plus en détails dans la suite de ce manuscrit). Dans cette zone, un résidu hydrophobe, l'isoleucine 214, est retrouvé dans la séquence de P2X<sub>7</sub>R, mais la façon dont ce résidu pourrait participer à une interaction avec le groupe ribose demeure une interrogation. De plus, des études dose-réponse ont montré que 3 molécules d'ATP étaient nécessaires pour l'activation du récepteur.<sup>57,58,59,60</sup> Ainsi, chaque molécule d'ATP se fixerait à l'intersection de deux sous-unités. Cependant, il a été montré que, dans certains cas, la fixation de deux molécules d'ATP sur le récepteur était suffisante à son activation.<sup>102,103</sup> La séquence en acides aminés au niveau de ce site de liaison étant très conservée entre les différentes sous-unités P2X, les différentes réponses pharmacologiques propres à chaque sous-type de récepteurs seraient dues à d'autres mutations.

<sup>&</sup>lt;sup>100</sup> Jiang, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 9066.

<sup>&</sup>lt;sup>101</sup> Roger, S. et al. *J. Psychiatr. Res.* **2010**, *44*, 347.

<sup>&</sup>lt;sup>102</sup> Wilkinson, W. et al. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1159.

<sup>&</sup>lt;sup>103</sup> Stelmashenko, O. et al. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 760.



*Figure 8 : Site de liaison de l'ATP entre deux sous-unités de P2X<sub>7</sub>R d'humain.<sup>20</sup>* Le site de liaison de l'ATP entre deux sous-unités de P2X<sub>7</sub>R d'humain à l'état ouvert implique 9 résidus de deux sous-unités adjacentes. 4 résidus hydrophiles de la sous-unité B (Lys64, Lys66, Thr187, et Lys197), et 2 résidus hydrophobes (Leu191 et lle228) représentés en magenta sont impliqués dans l'interaction avec l'ATP. La sous-unité A apporte 3 autres résidus hydrophiles complémentaires (Gln292, Arg294, et Lys311) représentés en cyan. Le cercle montre le site de liaison de l'ATP.

Ces deux DTM sont reliés par une large boucle extracellulaire qui constitue la partie la plus encombrante de la sous-unité (280 à 300 A.A.). Dans le cas de P2X<sub>7</sub>R, elle est constituée de 288 A.A..<sup>104</sup> Cette boucle contient 10 cystéines bien conservées dans tous les P2XR de mammifères.<sup>105,106,107</sup> Ces cystéines forment les ponts disulfures qui stabilisent la structure tertiaire de la protéine. De la partie *N*- à la partie *C*-terminale, les ponts disulfures sont observés entre les cystéines suivantes : Cys119-Cys168, Cys129-Cys152, Cys135-Cys162, Cys216-Cys226, et Cys260-Cys269.<sup>105,106</sup> Des sites de *N*-glycosylation sont également présents et sont importants pour le ciblage du récepteur au niveau de la membrane, ainsi que pour les sites de liaison des agonistes et antagonistes.

<sup>&</sup>lt;sup>104</sup> Mehta, N. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 54.

<sup>&</sup>lt;sup>105</sup> Ennion, S. et al. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 303.

<sup>&</sup>lt;sup>106</sup> Clyne, J. D. et al. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 3873.

<sup>&</sup>lt;sup>107</sup> Schwarz, N. et al. *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 139.

D'autre part, le récepteur P2X<sub>7</sub> humain, formé de 595 A.A., est glycosylé au niveau de cinq résidus de la boucle extracellulaire.<sup>108</sup> Cette modification post-traductionnelle est importante pour le fonctionnement du récepteur. Lenertz et ses collaborateurs ont montré qu'une mutation au niveau de ces sites de *N*-glycosylation diminue la phosphorylation d'ERK1/2 en réponse au BzATP (agoniste synthétique de P2X<sub>7</sub>).<sup>108</sup> L'extrémité *C*-terminale du récepteur P2X<sub>7</sub> est beaucoup plus longue que celle des autres récepteurs P2X.<sup>18</sup> Elle contient plusieurs sites d'interactions protéine-protéine ou protéine-lipide, dont un site potentiel pour la liaison des lipopolysaccharides (LPS), et un site de liaison à la calmoduline.<sup>109</sup> Elle intervient dans la régulation du fonctionnement du canal.<sup>112</sup> Kim et ses collaborateurs ont montré que les récepteurs P2X<sub>7</sub> peuvent former un complexe de signalisation avec de multiples protéines, comme des protéines du cytosquelette, des protéines de choc thermique, ou encore la phosphatidylinositol-4-kinase (PI4K) ou le récepteur à activité tyrosine phosphatase.<sup>113</sup> Le même groupe a démontré que le récepteur P2X<sub>7</sub> est phosphorylé au niveau de la tyrosine en position 343 (DTM2) en condition basale. Suite à l'activation du récepteur, cette tyrosine est déphosphorylée.<sup>113</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>108</sup> Lenertz, L. Y. et al. *Biochemistry* **2010**, *49*, 4611.

<sup>&</sup>lt;sup>109</sup> Roger, S. et al. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 6393.

<sup>&</sup>lt;sup>110</sup> Denlinger, L. C. et al. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 1304.

<sup>&</sup>lt;sup>111</sup> Smart, M. L. et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8853.

<sup>&</sup>lt;sup>112</sup> Becker, D. et al. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25725.

<sup>&</sup>lt;sup>113</sup> Kim, M. et al. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6347.



*Figure 9 : Représentation schématique d'une sous-unité P2X*, <sup>104</sup> (A) Domaine de la sous-unité P2X<sub>7</sub> composée de 595 A.A. et représenté avec un code couleur (chaîne *N*-terminale : 1 - 25; DTM1 : 26 - 46; boucle extracellulaire : 47 - 334; DTM2 : 335 - 355; chaîne *C*-terminale : 356 - 595). (B) Topologie de la sous-unité, représentation des ponts disulfures, marquage des A.A. importants pour l'activation par l'ATP (Lys64, Lys66, Lys311, et Phe188). TNFR1 : Tumor Necrosis Factor 1 ; LPS : lipopolysaccharide.

# III-1-2- Pharmacologie

Comme pour les autres P2XR, trois molécules d'ATP sont nécessaires à l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub>.<sup>57,58,59,60</sup> Cependant, ce récepteur est caractérisé par sa faible sensibilité pour l'ATP qui est son seul ligand endogène (connu à ce jour). Alors que des concentrations en ATP inférieures à 100 µM sont suffisantes pour activer les différents sous-types P2XR, P2X<sub>7</sub>R requiert des concentrations de l'ordre du millimolaire.<sup>114</sup> Cette faible sensibilité peut probablement s'expliquer par l'absence dans la séquence P2X<sub>7</sub> des résidus tels que la Leucine 211 du récepteur P2X<sub>2</sub>, ou la Leucine 217 de P2X<sub>4</sub> du poisson zèbre qui interviennent dans des interactions hydrophobes avec l'ATP ;<sup>99</sup> ces résidus sont conservés dans les autres sous-types de récepteur P2X.

<sup>&</sup>lt;sup>114</sup> Arulkumaran, N. et al. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2011**, *20*, 897.

L'ATP est le ligand des récepteurs purinergiques P2X, et est également le substrat d'enzymes telles que les ectonucléotidases CD39 et CD73.<sup>115,116,117</sup> En effet, une fois libérée dans le milieu extracellulaire, l'ATP est dégradée en ses divers métabolites qui, à leur tour, peuvent agir sur les différentes familles de récepteurs purinergiques. En conditions physiologiques, ce nucléotide est présent à de faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire) dans le milieu extracellulaire, contre des concentrations de l'ordre du millimolaire au niveau cytoplasmique.<sup>118</sup> Pour que P2X<sub>7</sub>R soit activé, il faut donc qu'il y ait une libération d'ATP par la cellule en concentration suffisante. Cette libération se produit *via* différents mécanismes :<sup>119,120</sup> la lyse cellulaire, les protéines transmembranaires telles que les pannexines et connexines, la libération *via* l'activation des cellules par divers stimuli.



*Figure 10 : Activation des récepteurs purinergiques par l'ATP et ses métabolites.*<sup>49</sup> L'ATP est le ligand des récepteurs P2. Il est également le substrat des ectonucléotidases qui le dégradent très rapidement une fois dans le milieu extracellulaire. Ses métabolites vont pouvoir, à leur tour, activer les récepteurs P2Y, puis les récepteurs P1 lors de la formation d'adénosine.

<sup>&</sup>lt;sup>115</sup> Schwarz, N. et al. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e41269.

<sup>&</sup>lt;sup>116</sup> North, R. A. et al. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 479.

<sup>&</sup>lt;sup>117</sup> Deaglio, S. et al. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1257.

<sup>&</sup>lt;sup>118</sup> Bours, M. J. et al. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 358.

<sup>&</sup>lt;sup>119</sup> Dubyak, G. R. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 1697.

<sup>&</sup>lt;sup>120</sup> D'Hondt, C. et al. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 305.

Il a été montré que l'ATP est libérée rapidement et en grande quantité au niveau local des sites d'inflammation dans l'environnement des cellules cancéreuses, et lors d'attaques microbiennes, ou de traumatismes, conséquence directe de la lyse cellulaire.<sup>114,115,119</sup> Cette augmentation de concentration est également corrélée à celle de l'expression de P2X<sub>7</sub>R dans les mêmes conditions.<sup>119</sup> De plus, un rétrocontrôle positif s'opère au niveau de la libération d'ATP par différents pores membranaires (comme les pannexines ou connexines) lorsque celle-ci est en quantité importante dans le milieu extracellulaire. En effet, l'activation des récepteurs P2 par l'ATP permet de stimuler la libération d'ATP par ces pores membranaires comme illustré dans la Figure 11.<sup>49</sup> L'ATP est donc reconnue comme un signal de danger qui permet une communication intra- et intercellulaire, ainsi que la mise en place de défenses immunitaires, notamment en réponse aux diverses agressions de l'organisme.<sup>121</sup>



*Figure 11 : Stimulation de la libération d'ATP par l'ATP.*<sup>49</sup> La stimulation des « Hemichannels » pour la libération d'ATP est bien établie. L'ATP libérée dans le milieu extracellulaire joue le rôle d'agoniste au niveau des récepteurs P2. Suite à la stimulation de ces récepteurs, des signaux intracellulaires vont être engendrés, et vont à nouveau stimuler ces pores membranaires qui libèrent à nouveau de l'ATP. Les P2X<sub>7</sub>R ouvrent probablement ces pores *via* une interaction avec leur chaîne *C*-terminale, alors que les P2Y utilisent l'inositol triphosphate pour stimuler ces canaux.

<sup>&</sup>lt;sup>121</sup> Gorini, S. et al. *Am. J. Blood Res.* **2013**, *3*, 14.

Lors de l'activation de P2X<sub>7</sub>R par l'ATP, un changement de conformation de la protéine est observé et permet la migration de cations à travers la membrane plasmique, avec d'une part un efflux potassique, et d'autre part un influx calcique et sodique.<sup>49</sup> Ces migrations d'ions provoquent une dépolarisation membranaire, stimulant ainsi différents phénomènes physiologiques et pathologiques tels que l'activation des phospholipases A2 et D, l'activation de métalloprotéases, la production de radicaux libres, l'activation de caspases, la maturation et la libération de cytokines pro-inflammatoires, l'induction de l'apoptose, la mort de pathogènes, la régulation du cycle cellulaire, ainsi que la maturation des cellules T.<sup>109,122,123,124,125,126</sup> D'autre part, ce changement de conformation permet également l'interaction de la chaine *C*-terminale avec d'autres protéines et lipides du cytoplasme, et ainsi active différents phénomènes cités précédemment. Des changements de structure de la cellule sont également observés.<sup>49,109,127,128</sup>

Cependant, et malgré toutes ces conséquences possibles lors de l'activation du récepteur, la caractéristique majeure de P2X<sub>7</sub>R est son implication (contrairement aux autres P2X)<sup>114</sup> dans les phénomènes majeurs de maturation et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et notamment l'IL-1β.<sup>114,119,129</sup> En effet, lors de l'activation de P2X<sub>7</sub>R, l'efflux potassique provoque la formation de radicaux libres, *via* l'activation de la NADPH oxydase, qui vont favoriser l'assemblage et l'activation de l'inflammasome. Ce complexe multiprotéique permet d'obtenir la forme active de la caspase-1, qui à son tour conduit à la forme mature de l'IL-1β, ainsi qu'à sa libération.<sup>119</sup> L'implication de P2X<sub>7</sub>R dans les phénomènes inflammatoires est également marquée par la libération d'autres cytokines telles que l'IL-18, l'IL-6, et le TNF- $\alpha$ .<sup>114,119</sup> Ce récepteur intervient donc dans le contrôle des différents membres de la famille IL-1,<sup>23,130</sup> et il est bien connu que ces cytokines sont largement impliquées dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques. Cet aspect sera plus largement détaillé dans la partie suivante.

<sup>&</sup>lt;sup>122</sup> Gu, B. et al. *Blood* **1998**, *92*, 946.

<sup>&</sup>lt;sup>123</sup> Gu, B. J. et al. *Blood* **2006**, *107*, 4946.

<sup>&</sup>lt;sup>124</sup> Andrei, C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101*, 9745.

<sup>&</sup>lt;sup>125</sup> MacKenzie, A. et al. *Immunity* **2001**, *15*, 825.

<sup>&</sup>lt;sup>126</sup> Costa-Junior, H. M. et al. *Purinergic Signal.* **2011**, *7*, 7.

<sup>&</sup>lt;sup>127</sup> Gan, B. S. et al. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, C1158.

<sup>&</sup>lt;sup>128</sup> Virginio, C. et al. *J. Physiol.* **1999**, *519*, 335.

<sup>&</sup>lt;sup>129</sup> Lister, M. F. et al. *J. Inflamm.* **2007**, *4*, 5.

<sup>&</sup>lt;sup>130</sup> Lemaire, I. et al. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 7257.

Concernant l'activation de P2X<sub>7</sub>R, de récentes études laissent penser que l'ATP ne serait pas le seul ligand endogène du récepteur. En effet, il a été rapporté que le peptide antimicrobien LL-37 pourrait être un agoniste potentiel.<sup>114</sup> En effet, en présence de LL-37, P2X<sub>7</sub>R requiert des concentrations en ATP 4000 fois moins importantes pour la libération d'IL-1β.<sup>131</sup> De plus, lorsque du LL-37 est ajouté à des monocytes prétraités par du LPS, une activation de la caspase-1 est observée, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-1β *via* l'activation de P2X<sub>7</sub>R, et cela de façon dose-dépendante.<sup>131</sup> Cette activation entraîne également une libération transitoire d'ATP à une concentration d'environ 150 nM, avec un pic entre 5 et 10 minutes.<sup>131</sup> La libération d'IL-1β par activation des monocytes par le LL-37 est indépendante de l'ATP extracellulaire. En effet, l'ajout d'apyrase dans le milieu (pour dégrader rapidement l'ATP) n'altère pas de manière significative la quantité d'IL-1β sécrétée ; de même que l'ajout d'ATP dans le milieu extracellulaire n'augmente pas les quantités libérées.<sup>131</sup>

# III-1-3- Formation du pore membranaire

Il est également à noter que P2X<sub>7</sub>R possède la particularité de former un pore membranaire (comme P2X<sub>2</sub> et P2X<sub>4</sub>) lors d'activations prolongées ou répétées.<sup>62,63,64</sup> Cette propriété très particulière a été la plus étudiée du récepteur.<sup>49,96,132,133</sup> En effet, après plusieurs secondes d'activation par l'ATP, un large pore membranaire se forme, permettant le passage dans le cytoplasme de molécules pouvant atteindre jusqu'à 900 Da.<sup>64,99</sup>

La formation du pore dirige généralement la cellule vers un processus de mort par apoptose, conférant ainsi à ce récepteur une activité cytolytique.<sup>62,134</sup> Cependant, il a également été montré que ce récepteur pouvait être impliqué dans la croissance cellulaire et la prolifération.<sup>135,136,137,138</sup> Plusieurs mécanismes conduisant à la formation de ce pore ont été proposés, mais ce phénomène reste peu clair à l'heure actuelle. Selon l'une des hypothèses, la pannexine-1, qui est une protéine membranaire dont l'expression est corrélée à celle de P2X<sub>7</sub>R, pourrait jouer un rôle : l'activation de cette protéine, à la suite d'une interaction avec la chaîne *C*-terminale du récepteur, et son association avec celui-ci, conduiraient à la formation du pore.<sup>139,140</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>131</sup> Elssner, A. et al. J. Immunol. **2004**, 172, 4987.

<sup>&</sup>lt;sup>132</sup> Ferrari, D. et al. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 445.

<sup>&</sup>lt;sup>133</sup> Volonté, C. et al. CNS Neurol. Disord. Drug. Targets **2012**, 11, 705.

<sup>&</sup>lt;sup>134</sup> Steinberg, T. H. et al. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3118.

<sup>&</sup>lt;sup>135</sup> Jantaratnotai, N. et al. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 442.

<sup>&</sup>lt;sup>136</sup> Sun, S. H. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 351.

<sup>&</sup>lt;sup>137</sup> Jelassi, B. et al. *Oncogene* **2011**, *30*, 2108.

<sup>&</sup>lt;sup>138</sup> Ryu, J. K. et al. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70*, 13.

<sup>&</sup>lt;sup>139</sup> Pelegrin, P. et al. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5071.

<sup>&</sup>lt;sup>140</sup> Locovei, S. et al. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 483.

En effet, il a été montré dans des cellules HEK293 transfectées pour P2X<sub>7</sub>R humain, et dans la lignée humaine de macrophages THP-1, que la formation du pore membranaire était sensible à la carbénoxolone qui est un bloqueur des protéines de type pannexines et connexines, et plus spécifiquement de la pannexine-1.<sup>140</sup> Les mêmes constatations ont été faites en utilisant d'autres bloqueurs de la pannexine-1 tels que la méfloquine ou le probénécide, mais non pour les inhibiteurs classiques des connexines tels que l'heptanol ou le lanthanum.<sup>139,140,141,142,143</sup> Cependant, même si ces études semblent montrer un rôle essentiel de la pannexine-1 dans la formation du pore, elles ne permettent pas de l'affirmer avec certitude puisque ces composés ne sont pas des inhibiteurs spécifiques de la pannexine-1 et peuvent bloquer d'autres protéines. De plus, d'autres études ont montré que la formation du pore membranaire par P2X<sub>7</sub>R était insensible à la carbénoxolone ;<sup>144</sup> ce qui pourrait indiquer que celle-ci ne bloque que la première phase rapide d'entrée de molécules fluorescentes par le pore membranaire, sans être efficace durant la phase d'accumulation suite à l'activation prolongée du récepteur. L'implication de la pannexine-1 dans la formation du pore associée à l'activation de P2X<sub>7</sub>R est également soutenue par les études réalisées sur les lignées HEK293-P2X<sub>7</sub>, THP-1, 1321 N1, et J774 dans lesquelles l'expression de la pannexine-1 a été diminuée par siRNA, puisque celles-ci montrent une diminution de la formation du pore.<sup>140,141,142</sup>

Cependant, d'autres études notamment réalisées sur des macrophages murins invalidés pour la pannexine-1 ne montrent aucune altération de la formation du pore après activation de P2X<sub>7</sub>R, mais une implication de cette pannexine dans la libération d'ATP.<sup>145,146</sup> Ces études supportent l'idée que la pannexine-1 ne représente pas le principal partenaire de P2X<sub>7</sub>R dans le mécanisme de formation du pore. En effet, les macrophages provenant de souris invalidées pour la pannexine-1 montrent une compensation importante de la formation du pore membranaire par l'activation de P2X<sub>7</sub>R insensible à la carbenoxolone, provenant certainement d'un autre mécanisme non identifié pour l'instant.<sup>49</sup>

La chaîne *C*-terminale du récepteur semble cependant intervenir dans le mécanisme de formation du pore membranaire, car il a été démontré que la délétion des 177 derniers A.A. entraîne l'absence de formation du pore membranaire.<sup>147</sup> D'autre part, l'importance du deuxième domaine transmembranaire (DTM2) dans la formation de ce pore a été mise en évidence après expression des P2X<sub>7</sub>R mutés dans des cellules HEK293.<sup>96</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>141</sup> Iglesias, R. et al. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. **2008**, 295, 752.

<sup>&</sup>lt;sup>142</sup> Ma, W. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 409.

<sup>&</sup>lt;sup>143</sup> Silverman, W. et al. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2008**, 295, C761.

<sup>&</sup>lt;sup>144</sup> Schachter, J. et al. *J. Cell. Sci.* **2008**, *121*, 3261.

<sup>&</sup>lt;sup>145</sup> Qu, Y. et al. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 6553.

<sup>&</sup>lt;sup>146</sup> Lemaire, I. et al. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 3878.

<sup>&</sup>lt;sup>147</sup> Gunosewoyo, H. et al. *Cur. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1505.

Une autre hypothèse de mécanisme provient d'une étude montrant que, lors de son activation, P2X<sub>7</sub>R est capable de recruter des sous-unités supplémentaires, formant ainsi des hexamères ;<sup>132,148</sup> après recrutement des sous-unités, et formation de l'héxamère, le canal serait capable de se dilater, passant d'un diamètre de 8 à 40 Å.<sup>149</sup>

En addition à toutes ces études menant à des hypothèses contradictoires, il apparaît que différentes phases et différents mécanismes interviendraient dans la formation de ce pore. En effet, deux équipes indépendantes ont montré que la formation du pore ne se faisait pas par une seule voie, et que deux sélectivités différentes étaient observées entre les fluorophores cationiques et anioniques, avec la participation de la pannexine-1 uniquement dans la phase rapide d'ouverture.<sup>144,150</sup>

A ce jour, le mécanisme de formation du pore reste toujours à déterminer. Des études restent nécessaires pour élucider ce mécanisme, car l'ensemble des études montre que des mécanismes très complexes participent à la formation du pore, qui est aussi dépendant du type cellulaire, ou de l'activation de différentes voies de signalisation.<sup>151</sup>

# III-1-4- Polymorphismes, isoformes, et distribution des P2X<sub>7</sub>R

De nombreux polymorphismes concernant un seul nucléotide ont été mis en évidence parmi les P2X<sub>7</sub>R.<sup>82</sup> Parmi ces SNP (Single Nucleotide Polymorphism), certains semblent modifier la sensibilité à l'ATP des différents variants, et ont été associés à diverses affections, comme la leucémie lymphocytaire chronique,<sup>152</sup> le risque de fracture osseuse,<sup>153</sup> ainsi que des fonctions immunitaires diminuées.<sup>154</sup> En plus des différents polymorphismes identifiés, 10 isoformes de P2X<sub>7</sub>R humain ont été caractérisées.<sup>95,155,156</sup> L'ADNc de P2X<sub>7</sub>R complet, formé de 13 exons, correspond à la variante P2X<sub>7</sub>(a) (GenBank NM\_011027).

<sup>&</sup>lt;sup>148</sup> Tatham, P. E. et al. *J. Gen. Physiol.* **1990**, *95*, 459.

<sup>&</sup>lt;sup>149</sup> Zemkova, H. et al. *Physiol. Res.* **2008**, *57*, S23.

<sup>&</sup>lt;sup>150</sup> Cankurtaran-Sayar, S. et al. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 1323.

<sup>&</sup>lt;sup>151</sup> Pelegrin, P. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 908.

<sup>&</sup>lt;sup>152</sup> Cabrini, G. et al. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 82.

<sup>&</sup>lt;sup>153</sup> Ohlendorff, S. D. et al. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, *17*, 555.

<sup>&</sup>lt;sup>154</sup> Shemon, A. N. et al. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2079.

<sup>&</sup>lt;sup>155</sup> Feng, Y. H. et al. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17228.

<sup>&</sup>lt;sup>156</sup> Nicke, A. et al. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25813.

Les P2X<sub>7</sub>R sont exprimés dans l'ensemble de l'organisme à des niveaux variables. Ils sont surtout exprimés au niveau des cellules d'origine hématopoïétique qui incluent : les mastocytes, les monocytes (dont la lignée THP-1), les macrophages, les lymphocytes, les fibroblastes, les granulocytes, et les érythrocytes. Mais également au niveau des neurones, des cellules gliales du cerveau et des astrocytes. Et à des niveaux plus faibles dans les cellules osseuses, les cellules épithéliales et endothéliales (pour un détail complet de la distribution de ces récepteurs, voir Burnstock et Knight 2004).<sup>157</sup>

C'est donc cette distribution particulière au niveau des cellules du système immunitaire, alliée à son implication prononcée dans les phénomènes inflammatoires, qui font de ce récepteur une cible très étudiée pour le développement de nouvelles stratégies anti-inflammatoires depuis une dizaine d'années.

## III-2- Implication de P2X<sub>7</sub>R dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

Les processus inflammatoires sont, en règle générale, induits par la stimulation des cellules du système immunitaire par différents agents tels que des bactéries, ou suite à des traumatismes physiques. Cela entraîne une réponse physiologique par ces cellules, conduisant à la sécrétion de cytokines qui jouent un rôle essentiel dans le développement et le maintien de cette réaction inflammatoire en réponse à l'agression de l'organisme. Ces processus inflammatoires sont composés de 3 phases : l'initiation, la propagation, et la résolution. Dans des conditions pathologiques, la réponse de l'organisme est trop importante, et un traitement est alors nécessaire pour stopper cette réponse amplifiée et non contrôlée, en évitant l'initiation, en stoppant la propagation, ou en favorisant la résolution.

Il existe un très grand nombre de pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, ou les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) qui touchent plusieurs millions de personnes à travers le monde, et pour lesquelles il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitements réellement efficaces. L'inflammation intervient également dans plusieurs pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, ou la maladie de Parkinson, et également dans les phénomènes de douleurs inflammatoires comme celles observées pour le syndrome du côlon irritable. Le fait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui soient plus efficaces que les traitements existants représente donc un enjeu de santé publique, mais également un

<sup>&</sup>lt;sup>157</sup> Burnstock, G. et al. Int. Rev. Cytol. **2004**, 240, 31.

challenge financier pour les firmes pharmaceutiques car ces marchés représentent potentiellement plusieurs milliards de dollars par an.

# III-2-1- Production et implication des IL-1 et autres cytokines proinflammatoires dans les processus inflammatoires

Lors des phénomènes inflammatoires, différentes molécules sont produites par l'organisme et jouent un rôle majeur dans le maintien de l'inflammation. Parmi celles-ci, on trouve au premier plan les cytokines pro-inflammatoires, notamment la famille des IL-1 (impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques), sécrétées par les cellules du système immunitaire suite à différents stimuli. La famille des IL-1 regroupe différents acteurs majeurs, et particulièrement les isoformes IL-1 $\alpha$ , et IL-1 $\beta$  qui agissent sur le récepteur IL-1R1.<sup>158,159</sup> Ces cytokines sont présentes sous deux formes différentes dans l'organisme : une forme primaire représentée par les pro-IL-1, et les IL-1 qui sont une forme mature ou activée.<sup>114</sup> Cependant, certaines différences existent entre ces deux cytokines. IL-1 $\alpha$  est constitutive, alors que IL-1 $\beta$  est inductible.<sup>114</sup> En effet, un premier stimulus est nécessaire pour la production de pro-IL-1ß au niveau intracellulaire. Cette production est notamment médiée par le LPS qui active le récepteur TLR4. Cela conduit à l'activation de voies de signalisation telles que les MAPK ou la voie NF- $\kappa$ B, permettant la synthèse *de novo* de pro-IL-1 $\beta$  et son accumulation au niveau intracellulaire.<sup>160</sup> Cependant, un deuxième stimulus est nécessaire pour que celle-ci soit sécrétée au niveau extracellulaire, et puisse exercer ses effets.<sup>23</sup> Il est également à noter que, pour être biologiquement active, la pro-IL-1β de 31 KDa doit être clivée en sa forme tronquée de 17 KDa.<sup>23</sup> Cette bioactivation peut être réalisée de différentes manières dans le cytoplasme de la cellule, par la voie de la caspase-1,<sup>160</sup> ou par des protéases à sérine comme la protéase-3, ou encore par des métalloprotéases comme MMP-2 et MMP-9.<sup>114</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>158</sup> Dinarello, C. A. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2002**, *20*, S1.

<sup>&</sup>lt;sup>159</sup> Bevilacqua, M. P. et al. *Science* **1989**, *243*, 1160.

<sup>&</sup>lt;sup>160</sup> Perregaux, D. et al. J. Biol. Chem. **1994**, 269, 15195.

La cytokine IL-1 $\alpha$  est quant à elle biologiquement active, qu'elle soit clivée ou non. Ces deux cytokines présentent une faible homologie de séquence (20 à 30%), mais de grandes similitudes au niveau de leur structure 3D ; ce qui explique qu'elles exercent les mêmes effets sur le récepteur IL-1R1.<sup>23</sup> En effet, une fois sécrétées dans le milieu extracellulaire, comme lors de phénomènes inflammatoires, ces cytokines entraînent divers effets cellulaires via l'activation du récepteur IL-1R1. Celle-ci conduit à la mise en place de différentes voies de signalisation qui amplifient la réponse inflammatoire par synthèse de novo des médiateurs de l'inflammation.<sup>23,114,129,161</sup> L'activation des cellules du système immunitaire par les cytokines IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  entraîne l'expression de la cyclooxygénase de type 2 inductible (COX-2),<sup>129</sup> d'IL-6,<sup>114</sup> et de TNF- $\alpha$ .<sup>129</sup> L'accumulation des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes), ainsi que l'augmentation de la production de NO via l'augmentation de la NO synthase inductible.<sup>133,162,163</sup> Ce sont ces effets qui maintiennent et propagent le phénomène inflammatoire. De plus, d'autres cytokines proinflammatoires additionnent leurs actions à celles engendrées par les IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ . L'une des principales cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans ce type de phénomènes et qui exerce les mêmes effets, est l'IL-18. Cette dernière suit le même processus de synthèse qu'IL-1β et engendre les mêmes effets.<sup>164,165</sup> En parallèle, l'organisme sécrète d'autres cytokines anti-inflammatoires dans le but de minimiser cette réponse. Notamment l'IL-1Ra, l'antagoniste endogène du récepteur IL-1R1, est sécrété lors des mêmes stimuli qui conduisent à la synthèse des cytokines pro-inflammatoires.<sup>166</sup> De même, l'activation du récepteur IL-1RII a pour conséquence la diminution des réponses cellulaires engendrées par IL-1R1.<sup>23</sup> Il est désormais bien admis, suite aux nombreuses études réalisées in vitro et in vivo, que ces cytokines sont des acteurs majeurs dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que les MICI, l'arthrite rhumatoïde,<sup>167</sup> les scléroses multiples<sup>168</sup> et l'asthme.<sup>169</sup> IL-1β joue un rôle important dans l'initiation et la propagation de l'inflammation.<sup>170</sup> Il a notamment été montré in vivo que, dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques, les niveaux d'expression de cette cytokine étaient très fortement augmentés.<sup>23</sup> De même, une nette augmentation de l'ARN<sub>m</sub> d'IL-1ß est observée chez des patients souffrants du syndrome du côlon irritable en comparaison à des sujets sains.<sup>171</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>161</sup> Alves, L. A. et al. *Molecules* **2013**, *18*, 10953.

<sup>&</sup>lt;sup>162</sup> Dinarello, C. A. Annu. Rev. Immunol. **2009**, 27, 519.

<sup>&</sup>lt;sup>163</sup> Parvathenani, L. K. et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13309.

<sup>&</sup>lt;sup>164</sup> Ghayur, T. et al. *Nature* **1997**, *386*, 619.

<sup>&</sup>lt;sup>165</sup> Gu, Y. et al. *Science* **1997**, *275*, 206.

<sup>&</sup>lt;sup>166</sup> Dinarello, C. A. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 732.

<sup>&</sup>lt;sup>167</sup> Goldblatt, F. et al. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *140*, 195.

<sup>&</sup>lt;sup>168</sup> Moynagh, P. N. *J. Anat.* **2005**, *207*, 265.

<sup>&</sup>lt;sup>169</sup> Shore, S. A. et al. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 859.

<sup>&</sup>lt;sup>170</sup> Braddock, M. et al. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 330.

<sup>&</sup>lt;sup>171</sup> Gwee, K. A. et al. *Gut.* **2003**, *52*, 523.

Cette même constatation a été mise en évidence par l'équipe de Keating sur des modèles de souris de ce syndrome chez lesquelles l'expression d'IL-1β est trois fois plus importante lors du phénomène inflammatoire par rapport à des souris saines.<sup>172</sup> On constate également une susceptibilité accrue au développement de maladies inflammatoires (comme l'arthrite rhumatoïde) chez des souris K.O IL-1Ra.<sup>173,174</sup> Et il a été aussi montré qu'IL-1β augmente la production de l'Amyloïd Protein Precursor (APP) dont découle la production des plaques Aβ, principale caractéristique de la maladie d'Alzheimer avec la pathologie Tau.<sup>175</sup> Ces cytokines apparaissent donc comme des signaux de danger inductibles.

# III-2-2- ATP : signal de danger

Ces dernières années, une attention particulière s'est portée sur l'ATP pour un rôle probable dans les processus inflammatoires. En effet, cette molécule présente toutes les caractéristiques d'un signal de danger inductible : un fort ratio [ATP]<sub>intracellulaire</sub> / [ATP]<sub>extracellulaire</sub>, un caractère hydrophile, l'expression ubiquitaire d'un système de dégradation (notamment les ectonucléotidases), et la présence de récepteurs membranaires spécifiques présentant des affinités différentes.<sup>176,177</sup> De plus, il a été montré que l'ATP est sécrétée localement au niveau des foyers infectieux et inflammatoires.<sup>178,179</sup> Cette libération d'ATP provoque, pour initier la réponse immunitaire, la mobilisation des cellules présentatrices d'antigènes grâce à l'activation de récepteurs membranaires.<sup>180</sup> II a, par ailleurs, été montré que l'expression de l'ARN<sub>m</sub> de CD39 (enzyme de dégradation de l'ATP) était augmentée chez des sujets atteints d'inflammations intestinales par rapport aux sujets sains, et qu'un polymorphisme du gène codant pour CD39 entraînait une susceptibilité accrue de développer la maladie de Crohn.<sup>181</sup> De la même manière, dans des modèles de colite induite au DSS chez la souris, les souris K.O CD39 présentent une inflammation plus sévère en comparaison aux souris sauvages.<sup>182</sup> En contraste, une exposition chronique à de faibles concentrations d'ATP active les cellules dendritiques et les macrophages qui sécrètent alors des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et IL-1Ra; ce qui supprime l'inflammation et favorise le développement d'une réponse Th2.<sup>180</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>172</sup> Keating, C. et al. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 1467.

<sup>&</sup>lt;sup>173</sup> Nicklin, M. J. et al. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 303.

<sup>&</sup>lt;sup>174</sup> Horai, R. et al. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 313.

<sup>&</sup>lt;sup>175</sup> Walker, D. G. et al. *J. Neurosci. Res.* **1995**, *40*, 478.

<sup>&</sup>lt;sup>176</sup> Thornberry, N. A. et al. *Nature* **1992**, *356*, 768.

<sup>&</sup>lt;sup>177</sup> Gauer, S. et al. *Kidney Int.* **2007**, *72*, 1081.

<sup>&</sup>lt;sup>178</sup> Dinarello, C. A. *Immunity* **2004**, *20*, 243.

<sup>&</sup>lt;sup>179</sup> Gallucci, S. et al. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 114.

<sup>&</sup>lt;sup>180</sup> la Sala, A. et al. *J. Leukoc. Biol.* **2003**, *73*, 339.

 <sup>&</sup>lt;sup>181</sup> Roberts, J. A. et al. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 659.
<sup>182</sup> Friedman, D. J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16788.

*<sup>10. 501. 054</sup> 2005, 100, 107* 

# III-2-3- Implication de P2X<sub>7</sub>R dans la sécrétion de cytokines proinflammatoires et potentiel thérapeutique

De nombreuses études ont été menées ces dernières années sur P2X<sub>7</sub>R parce que l'ATP est son agoniste endogène et parce qu'il est connu pour être impliqué dans les phénomènes de libération des cytokines pro-inflammatoires. Le but de ces études était de mieux comprendre son implication dans les phénomènes inflammatoires. La mise en place de modèles in vitro et in vivo a permis d'étudier son implication dans de nombreuses pathologies. Il a tout d'abord été constaté que ce récepteur était surexprimé lors des phénomènes inflammatoires, <sup>129,172</sup> notamment dans les cas de MICI pour lesquelles l'expression de l'ARNm de P2X<sub>7</sub>R était supérieure chez les sujets malades par rapport aux sujets sains.<sup>183</sup> Il a également été montré *in vitro*,<sup>184</sup> puis *in vivo*,<sup>185,186</sup> que la libération d'IL-1ß était dépendante de P2X<sub>7</sub>R ;<sup>185,187</sup> il en est de même pour IL-18.<sup>23</sup> Lors d'une étude réalisée par Keating et ses collaborateurs, il a aussi été observé dans un modèle du syndrome du côlon irritable que les souris K.O. P2X<sub>7</sub>R ne présentaient pas d'augmentation du niveau d'IL-1β en comparaison aux souris sauvages, et donc pas d'hypersensibilité viscérale post-inflammatoire.<sup>172</sup> En 1997, Ferrari et ses collaborateurs ont montré que l'activation de P2X7R par l'ATP entraîne la production d'IL-1β dans des cultures de cellules microgliales,<sup>188</sup> alors que cette sécrétion n'a pas lieu lorsque les cellules microgliales activées par du LPS, puis de l'ATP, sont issues de souris K.O. P2X<sub>7</sub>R.<sup>189</sup> Cela confirme le rôle de P2X<sub>7</sub>R dans la production d'IL-1 $\beta$  au niveau du SNC. D'autres publications ont rapporté que l'expression de P2X<sub>7</sub>R est augmentée au niveau des plaques β-amyloïdes dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer.<sup>163</sup> De plus, il a été observé que la libération d'IL-1β viα l'activation de P2X<sub>7</sub>R exprimé dans les macrophages et les cellules gliales, entraîne une augmentation de la quantité des plaques séniles.<sup>147</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>183</sup> Cesaro, A. et al. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **2010**, 299, G32.

<sup>&</sup>lt;sup>184</sup> Sanz, J. M. et al. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 4893.

<sup>&</sup>lt;sup>185</sup> Solle, M. et al. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 125.

<sup>&</sup>lt;sup>186</sup> Labasi, J. M. et al. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 6436.

<sup>&</sup>lt;sup>187</sup> Ferrari, D. et al. *J. Immunol.* **1996**, *156*, 1531.

<sup>&</sup>lt;sup>188</sup> Ferrari, D. et al. J. Exp. Med. **1997**, 185, 579.

<sup>&</sup>lt;sup>189</sup> Brough, D. et al. *Mol. Cell. Neurosci.* **2002**, *19*, 272.

Dans la maladie de Parkinson, des constatations similaires ont été faites aux travers de différentes études. En effet, il a été montré que P2X<sub>7</sub>R est surexprimé au niveau de la substance noire des patients atteints par cette pathologie.<sup>190</sup> De plus, cette surexpression est corrélée à une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 et TNF- $\alpha$ .<sup>191</sup> Il a également été observé, dans des modèles de rats de la maladie de Parkinson, que l'expression de P2X<sub>7</sub>R est augmentée dans la microglie et les astrocytes, et qu'en inhibant l'activité de ce récepteur par utilisation d'un antagoniste, on obtient une protection significative des neurones dopaminergiques striés, mais sans stopper la perte neuronale.<sup>192</sup>

L'ensemble de ces études met donc en évidence une implication de P2X<sub>7</sub>R dans plusieurs maladies neurodégénératives, et donne de bons espoirs quant aux bénéfices potentiels de l'utilisation d'antagonistes de ce récepteur dans ce type de pathologies. Une étude similaire a été réalisée par Labasi et ses collaborateurs sur des macrophages péritonéaux conduisant à des résultats identiques.<sup>186</sup> La même équipe a également montré que, dans un modèle animal d'arthrite rhumatoïde chez la souris, les souris K.O. P2X<sub>7</sub>R présentent une sévérité moindre de la pathologie.<sup>186</sup> Dans l'arthrite rhumatoïde, l'ATP est retrouvée dans le liquide synovial où beaucoup de cellules exprimant P2X<sub>7</sub>R sont présentes,<sup>193,194</sup> et il a été montré que les fibroblastes étaient impliqués dans la sécrétion d'IL-6,<sup>195</sup> et que, dans ce cas, les antagonistes P2X<sub>7</sub>R montraient *in vivo* un rôle antiinflammatoire et antipyrétique.<sup>196</sup> Toujours dans un modèle animal d'arthrite rhumatoïde, cette classe de composés a également conduit à une limitation de la destruction articulaire et est associée à une douleur moindre.<sup>197</sup> Le blocage de P2X<sub>7</sub>R par ces antagonistes permet donc d'éviter l'effet inflammatoire des nucléotides libérés en grande quantité au niveau des articulations dans cette pathologie.<sup>194,198</sup> Les effets répertoriés pour l'ATP sur P2X<sub>7</sub>R l'ont également été pour le peptide antimicrobien LL-37 qui, lui aussi, entraîne la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18.<sup>199</sup> L'implication de P2X<sub>7</sub>R dans la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 a également été démontrée en utilisant la lignée de macrophages THP-1.<sup>129</sup> L'utilisation d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R s'est également révélée efficace pour la réduction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans un modèle animal de MICI.<sup>172,200</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>190</sup> Lawson, L. J. et al. *Neuroscience* **1990**, *39*, 151.

<sup>&</sup>lt;sup>191</sup> Mogi, M. et al. *Neurosci. Lett.* **1996**, *211*, 13.

<sup>&</sup>lt;sup>192</sup> Marcellino, D. et al. *J. Neural Transm.* **2010**, *117*, 681.

<sup>&</sup>lt;sup>193</sup> Tran, C. N. et al. *Pathophysiology* **2005**, *12*, 183.

 <sup>&</sup>lt;sup>194</sup> Ryan, L. M. et al. *J. Rheumatol.* **1991**, *18*, 716.
<sup>195</sup> Solini, A. et al. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 297.

<sup>&</sup>lt;sup>196</sup> Gourine, A. V. et al. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 139.

<sup>&</sup>lt;sup>197</sup> Dell'Antonio, G. et al. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 3378.

<sup>&</sup>lt;sup>198</sup> Feldmann, M. et al. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 397.

<sup>&</sup>lt;sup>199</sup> Jo, S. K. et al. *Nephron.* **2002**, *91*, 406.

<sup>&</sup>lt;sup>200</sup> Shum, P. et al. WO 2005014555, **2005**.

# III-2-4- Voies de signalisation mises en place pour la sécrétion d'IL-18 suite à l'activation de P2X<sub>7</sub>R

Suite à ces publications rapportant l'implication de P2X<sub>7</sub>R dans les phénomènes de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans des conditions d'inflammation, de nombreuses études ont été menées dans le but de comprendre le mécanisme de sécrétion impliquant ce récepteur.

Nous avons déjà décrit que P2X<sub>7</sub>R présente une faible sensibilité pour l'ATP (qui est son seul ligand endogène). En effet, des concentrations de l'ordre du millimolaire sont nécessaires à l'activation de ce récepteur<sup>16</sup> et, dans des conditions physiologiques, les concentrations extracellulaires en ATP sont de l'ordre du nanomolaire.<sup>118</sup> Cependant, il a aussi été montré que, lors de phénomènes inflammatoires, de l'ATP était libérée au niveau extracellulaire en quantités suffisantes pour activer P2X<sub>7</sub>R.<sup>178,179</sup>

La stimulation de P2X<sub>7</sub>R entraîne l'activation de l'inflammasome qui va permettre d'obtenir la caspase-1 sous sa forme active.<sup>201</sup> C'est cette enzyme qui est responsable de la maturation des IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , et IL-18 au niveau intracellulaire.<sup>23</sup>

L'activation de P2X<sub>7</sub>R par l'ATP entraîne un changement de conformation de la protéine, donnant lieu à l'ouverture du canal ionique. Une fois le canal activé, il se produit un efflux potassique simultanément à un influx calcique et sodique. L'efflux potassique entraîne la production de ROS suite à l'activation de la NADPH oxydase.<sup>163</sup> En plus de l'activation du facteur de transcription NF-κB, de certaines MAPKs, de ERK 1/ERK 2, de p38, de JNK 1/JNK 2,<sup>202</sup> les ROS favorisent la formation et l'activation de l'inflammasome qui est un complexe multiprotéique formé par l'assemblage des protéines NLRP3, ASC, et de la pro-caspase-1.<sup>114</sup> L'activation de ce complexe permet la maturation de la pro-caspase-1 en caspase-1 active. L'activation de cette protéine conduit au clivage de la pro-IL-1β en sa forme active IL-1β qui est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire.<sup>203</sup> II a été montré que l'efflux potassique engendré par l'ouverture du canal ionique de P2X<sub>7</sub>R était indispensable à la formation de l'inflammasome (étape indispensable à la maturation des pro-IL),<sup>124,160,184,204</sup> de même qu'à la formation réversible du pore membranaire (propriété spécifique de P2X<sub>7</sub>R),<sup>205</sup> et que l'influx calcique était indispensable pour l'étape de sécrétion.<sup>23,125</sup> Une fois secrétée, ces cytokines activent le récepteur IL-1R1 donnant lieu à l'expression de la COX-2 et de la PLA2.

<sup>&</sup>lt;sup>201</sup> Mariathasan, S. et al. *Nature* **2006**, *440*, 228.

<sup>&</sup>lt;sup>202</sup> Pfeiffer, Z. A. et al. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *75*, 1173.

<sup>&</sup>lt;sup>203</sup> Allam, R. et al. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 2714.

<sup>&</sup>lt;sup>204</sup> Ferrari, D. et al. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 1451.

<sup>&</sup>lt;sup>205</sup> Sluyter, R. et al. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3399.

Une stimulation subséquente de P2X<sub>7</sub>R active à leur tour ces deux protéines ; ce qui entraîne la production des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes. Cela correspond à la mise en place de la réponse inflammatoire normale. Cependant, dans des conditions d'activation répétée du récepteur, la réponse inflammatoire est exagérée et devient agressive plutôt que protectrice.



Figure 12 : Schéma de production et de libération des IL-16 après activation des toll-like receptors (TLR) et de P2X<sub>7</sub>R. (1) activation des TLR par le LPS ; (2) activation de facteurs de transcription ; (3) synthèse *de novo* de NALP3, ASC, pro-caspase-1, et pro-IL-1 $\beta$ ; (4) activation de la NADPH oxydase suite à l'efflux potassique provoqué par l'activation de P2X<sub>7</sub>R par l'ATP ; (5) production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la NADPH oxydase ; (6-7) formation et activation de l'inflammasome par les ROS ; (8) formation de lysosomes sécrétoires ; (9) libération d'IL-1 $\beta$  dans le milieu extracellulaire.

Au vu de ces différentes études, il apparaît logique que l'inhibition de P2X<sub>7</sub>R puisse entraîner une action anti-inflammatoire par diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Sur ces bases, plusieurs séries chimiques décrites dans la littérature ont été développées, et certaines molécules sont en phase de développement clinique principalement pour le traitement de pathologies inflammatoires décrites précédemment. Cet aspect sera développé dans les sections suivantes. De notre côté, nous avons souhaité nous focaliser sur le potentiel anti-inflammatoire de ces composés dans le cadre des MICI. De plus, l'une des complications associées à ces pathologies est l'augmentation du risque de développer un cancer colorectal comparativement à des sujets sains. Bien que le rôle de P2X<sub>7</sub>R reste encore ambigu dans la maladie cancéreuse, certaines études montrent une implication de ce récepteur dans la survie cellulaire, la prolifération, et le développement de métastases, et ce malgré son activité cytolytique. Nous développerons donc dans la suite de ce chapitre ce que sont les MICI, et nous présenterons le potentiel anticancéreux de P2X<sub>7</sub>R. Un paragraphe sera également consacré au potentiel analgésique de P2X<sub>7</sub>R, puisqu'il s'agit également d'un des symptômes associés aux MICI.

# IV- Potentiel anticancéreux de P2X<sub>7</sub>R

En plus de ses propriétés anti-inflammatoires, il semblerait que P2X<sub>7</sub>R soit également une cible potentielle dans la maladie cancéreuse.<sup>206</sup> Le premier lien entre l'inflammation et le cancer a été décrit par Rudolf Virchow en 1863 (voir référence 207 et références citées dans l'article),<sup>207</sup> et il a été montré que la probabilité de développer un cancer était augmentée au niveau d'un site d'inflammation.<sup>208</sup> D'autre part, il a été mis en évidence qu'un polymorphisme conduisant à l'augmentation de la production d'IL-1β favorise le développement d'un cancer gastrique,<sup>209,210</sup> et il est largement admis que P2X<sub>7</sub>R intervient de façon majeure dans la sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire. De nombreuses études ont montré de très forts niveaux d'expression des P2X<sub>7</sub>R dans différentes tumeurs (sein, prostate, thyroïde, col de l'utérus...) et non dans les tissus sains correspondants ; ces P2X<sub>7</sub>R sont exprimés et fonctionnels dans de nombreuses lignées cancéreuses humaines et en particulier dans des cellules présentant un très fort potentiel métastatique.<sup>211,212,213,214,215</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>206</sup> Jelassi, B. et al. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 1487.

<sup>&</sup>lt;sup>207</sup> Pearce, J. M. *J. Neurol.* **2002**, *249*, 1749.

<sup>&</sup>lt;sup>208</sup> Marx, J. Science **2004**, 306, 966.

<sup>&</sup>lt;sup>209</sup> El Omar, E. M. et al. *Nature* **2000**, *404*, 398.

<sup>&</sup>lt;sup>210</sup> El Omar, E. M. et al. *Nature* **2001**, *412*, 99.

<sup>&</sup>lt;sup>211</sup> Adinolfi, E. et al. *Blood* **2002**, *99*, 706.

<sup>&</sup>lt;sup>212</sup> Slater, M. et al. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *83*, 1.

<sup>&</sup>lt;sup>213</sup> Li, X. et al. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2006**, *15*, 1906.

Cela donne à penser que l'utilisation d'antagonistes de ce récepteur au niveau des sites tumoraux pourrait minimiser la sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires qui, dans certains cas, et notamment sous l'augmentation de l'expression du VEGF, vont avoir un comportement proangiogénique.<sup>23,216</sup> En effet, différentes études ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de P2X<sub>7</sub>R entraînait une diminution de la prolifération cellulaire,<sup>217</sup> et dans certains cas une réduction du volume de la tumeur. Par exemple, le Dr Ryu a observé une réduction de 52% du volume de tumeurs gliales C6 du cerveau grâce à l'injection d'un antagoniste de P2X<sub>7</sub>R.<sup>138</sup> Malgré les propriétés proapoptotiques de P2X<sub>7</sub>R, d'autres études ont cependant mis en évidence l'implication de ce récepteur dans la prolifération cellulaire; notamment les travaux d'Adinolfi sur les cellules HEK-293 transfectées pour P2X<sub>7</sub>R ont démontré que 1) l'activation basale du récepteur entraînait une croissance cellulaire, 2) ces cellules présentaient des concentrations en ATP intracellulaires et des concentrations en Ca<sup>2+</sup> mitochondriales plus importantes que pour la lignée sauvage, et 3) ces cellules étaient capables de croître en l'absence de sérum.<sup>218</sup> II est à noter que ces propriétés sont dépendantes de la capacité du récepteur à former le pore membranaire. La stimulation des P2X<sub>7</sub>R dans les cellules MDA-MB-435s entraîne une modification de la morphologie cellulaire et est responsable d'une très forte augmentation de la migration et de l'invasivité cellulaire.<sup>137</sup> II a également été constaté que de l'ATP était sécrétée par les cellules tumorales à des concentrations relativement importantes dans l'environnement tumoral comparativement à un tissu sain. Cette augmentation de concentration entraînerait une suractivation des P2X<sub>7</sub>R, menant ainsi à un effet anti-apoptotique favorisant la croissance et la prolifération cellulaire.<sup>137</sup> De plus, l'activation de P2X<sub>7</sub>R entraîne la stimulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dont certaines sont connues pour être pro-tumorales. Ces différentes voies sont, entre autres, la voie p44/42 ERK-kinase, p38 MAP-kinase, c-Jun N-terminale kinase, mTor/S6 kinase, ainsi que la voie NF-κB.<sup>202,219</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>214</sup> Solini, A. et al. *Endocrinology*. **2008**, *149*, 389.

<sup>&</sup>lt;sup>215</sup> Slater, M. et al. *Histopathology*. **2004**, *44*, 206.

<sup>&</sup>lt;sup>216</sup> Adinolfi, E. et al. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2957.

<sup>&</sup>lt;sup>217</sup> Baricordi, O. R. et al. *Blood* **1996**, *87*, 682.

 <sup>&</sup>lt;sup>218</sup> Adinolfi, E. et al. *Mol. Biol. Cell.* **2005**, *16*, 5054.
<sup>219</sup> Chen, S. et al. *Crit. Care Med.* **2013**, *41*, 466.

Cependant, peu d'études ont été réalisées sur l'implication de ce récepteur dans la maladie cancéreuse et, à l'heure actuelle, celle-ci est encore très discutée puisque d'autres études avaient montré que l'utilisation d'agonistes pouvait entraîner une activité anticancéreuse par mise à profit des propriétés pro-apoptotiques par la formation du pore.<sup>220,221,222</sup> II semblerait donc que, selon le tissu et le type cellulaire en cause, ce récepteur ait une implication différente dans ce type de pathologie. Cela peut également être expliqué par les différents variants du récepteur rencontrés. En effet, leur activité peut être différente, et les nombreux polymorphismes associés aux P2X<sub>7</sub>R, dont certains ne sont pas fonctionnels ou au contraire favorisent certaines pathologies. A l'heure actuelle, le rôle de ce récepteur dans le cancer reste ambigu, même si les études les plus récentes tendent à affirmer que l'utilisation d'antagonistes des P2X<sub>7</sub>R pourrait être une nouvelle piste de stratégie thérapeutique.

Des études restent donc nécessaires pour mieux comprendre le rôle de P2X<sub>7</sub>R dans cette pathologie, même si le lien avec l'inflammation est irréfutable.

# V- Potentiel analgésique de P2X<sub>7</sub>R

L'implication de P2X<sub>7</sub>R dans la douleur a été mise en évidence suite à une étude sur des souris P2X<sub>7</sub>-déficientes. En effet, ces souris manifestent une hypersensibilité thermique et mécanique réduite après ligature partielle du nerf sciatique.<sup>223</sup> Récemment, il a été montré que l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique sont complètement supprimées suite à l'invalidation du gène codant pour le sous-type P2X<sub>7</sub> dans des modèles animaux de douleurs chroniques inflammatoires et neuropathiques, sans que la nociception aiguë soit perturbée.<sup>223</sup> La perte de P2X<sub>7</sub>R fonctionnel entraînerait l'absence de l'effet stimulateur de l'ATP sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages.<sup>224</sup>

Il a également été montré que, chez les souris et les sujets humains souffrant de douleurs neuropathiques, l'expression de P2X<sub>7</sub>R est augmentée dans les cellules satellites des ganglions rachidiens. De plus, l'activation de P2X<sub>7</sub>R entraîne le relargage d'IL-1β, et ces cytokines libérées par les microglies spinales contribueraient significativement au mécanisme neuronal dans les douleurs chroniques.<sup>225</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>220</sup> Wang, W. et al. *Cell. Physiol. Biochem.* **2011**, *28*, 199.

<sup>&</sup>lt;sup>221</sup> Bian, S. et al. *PLoS One* **2013**, *8*, e60184.

<sup>&</sup>lt;sup>222</sup> Agteresch, H. J. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 321.

<sup>&</sup>lt;sup>223</sup> Chessell, I. P. et al. *Pain.* **2005**, *114*, 386.

<sup>&</sup>lt;sup>224</sup> Chen, Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16773.

<sup>&</sup>lt;sup>225</sup> Clark, A. K. et al. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 573.

Toutes ces études suggèrent que les P2X<sub>7</sub>R exprimés par les cellules satellites et les cellules du système immunitaire pourraient jouer un rôle important dans le développement des douleurs chroniques inflammatoires ou neuropathiques, et semblent une cible intéressante pour le traitement de ces maladies.

En effet, plusieurs groupes de recherche ont développé de nouveaux inhibiteurs sélectifs de P2X<sub>7</sub>R et ont examiné leur effet sur des modèles de douleurs neuropathiques. Une administration systémique (voie intrapéritonéale) des composés **A-740003** et **A-438079**, antagonistes de P2X<sub>7</sub>R, réduit l'allodynie tactile dans 3 modèles différents de douleur neuropathique chez le rat.<sup>226</sup> De plus, de récentes études sur des antagonistes sélectifs P2X<sub>7</sub>R appuient également le rôle important de ce récepteur dans la douleur chronique liée aux maladies inflammatoires.<sup>186,223</sup>

# VI- Généralités sur les MICI

Maladies à caractère chronique liées à l'inflammation de l'intestin et dont l'origine est inconnue, les MICI évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission et englobent principalement deux pathologies :

- la maladie de Crohn, qui affecte l'ensemble du tube digestif (de la bouche à l'anus)

- et la rectocolite hémorragique (RCH), dont les lésions restent localisées au niveau du rectum et du côlon.

# VI-1- Epidémiologie, étiologie et aspects lésionnels des MICI

Ces maladies sont caractérisées par une inflammation de la paroi du tube digestif liée à une hyperactivité du système immunitaire, source de lésions destructrices (ulcérations). L'EFCCA (European Federation of Crohn's and ulcerative Colitis Associations), dans son étude clinique IMPACT effectuée de novembre 2010 à août 2011, a estimé à plus de 2,2 millions le nombre de personnes affectées par les MICI en Europe. En France, 5000 à 6000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Si aujourd'hui ce chiffre demeure stable, ce n'était pas le cas il y a une trentaine d'années puisqu'on estime qu'entre 1945 et 1980 l'incidence de ces maladies a été multipliée par 10 dans les pays industrialisés.

<sup>&</sup>lt;sup>226</sup> Honore, P. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. **2006**, 319, 1376.
On constate une disparité des cas de MICI dans le monde, où les pays du Nord sont nettement plus touchés que les pays du Sud.<sup>227</sup> Par ailleurs, l'augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en développement semble parallèle à une occidentalisation du mode de vie.<sup>228,229</sup> S'il est difficile d'expliquer ce phénomène, les chercheurs émettent cependant l'hypothèse que certains facteurs environnementaux comme la pollution, l'alimentation,<sup>230</sup> le mode de vie ou encore le stress plus présents dans les pays développés ou en cours de développement, favoriseraient l'apparition de ces maladies.

La maladie de Crohn et la RCH apparaissent généralement à l'adolescence, suggérant l'impact de facteurs hormonaux, et dans un quart des cas, l'ensemble des symptômes apparaît avant l'âge de 30 ans.<sup>230</sup>

Toujours d'après l'étude IMPACT de l'EFCCA, parmi les hommes souffrant de MICI, 85% sont atteints de la maladie de Crohn et 12% de la rectocolite hémorragique. Alors que parmi les femmes atteintes de MICI, 73% souffrent de la maladie de Crohn et 23% de la rectocolite hémorragique.

Bien que les causes de ces maladies demeurent encore inconnues à ce jour, il apparaît que ces pathologies multifactorielles impliquent des facteurs environnementaux (tels que ceux cités précédemment) sur un terrain génétiquement prédisposé. En effet, une étude réalisée sur une population représentative de jumeaux homo- et hétérozygotes a permis de mettre en évidence que, pour la maladie de Crohn, le taux de concordance chez les homozygotes (58,3 %) était significativement supérieur à celui observé chez les hétérozygotes (6,3 %). Cette découverte a donc naturellement incité les scientifiques à rechercher les gènes susceptibles d'influencer le développement des MICI. Sur ces bases, trois équipes européennes et américaines ont mis en évidence, en 2001, le premier gène de susceptibilité pour la maladie de Crohn : il s'agit du gène NOD2/CARD15.<sup>231,232</sup> Plus récemment, deux autres gènes de susceptibilité ont été identifiés sur les chromosomes 5 et 10 et ont été nommés respectivement OCTN et DLG5.<sup>233,234</sup> Il semblerait ainsi que les MICI fassent partie des pathologies oligogéniques (maladies génétiques héréditaires).

<sup>&</sup>lt;sup>227</sup> Yoshida, Y. et al. *Med. Clin. North Am.* **1990**, *74*, 67.

<sup>&</sup>lt;sup>228</sup> Shoda, R. et al. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 741.

<sup>&</sup>lt;sup>229</sup> Thia, K. T. et al. *Am. J. Gastroenterol.* **2008**, *103*, 3167.

<sup>&</sup>lt;sup>230</sup> Wada, S. et al. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8807.

<sup>&</sup>lt;sup>231</sup> Hugot, J. P. et al. *Nature* **2001**, *411*, 599.

<sup>&</sup>lt;sup>232</sup> Ogura, Y. et al. *Nature* **2001**, *411*, 603.

<sup>&</sup>lt;sup>233</sup> Waller S. et al. *Gut.* **2006**, *55*, 809.

<sup>&</sup>lt;sup>234</sup> Stoll, M. et al. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 476.

Malgré de nombreuses similitudes épidémiologiques et étiologiques entre la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, ces pathologies diffèrent par la localisation et la profondeur des lésions. En effet, alors que la maladie de Crohn affecte l'ensemble du tube digestif de façon discontinue,<sup>235,236</sup> la rectocolite hémorragique atteint uniquement de manière continue le côlon et le rectum. Au niveau macroscopique, la maladie de Crohn affecte le tube digestif de manière asymétrique : les bords mésentériques de l'intestin sont plus touchés que pour la RCH où les lésions sont homogènes, avec une certaine diversité lésionnelle. Enfin, au niveau microscopique, on remarque des infiltrations lymphoplasmocytaires avec conservation de la mucosécrétion chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Alors qu'en cas de RCH, on observe des infiltrations de polynucléaires sous forme de cryptites accompagnées d'une diminution de la mucosécrétion.

Ainsi, les MICI sont caractérisées par une dysrégulation du système immunitaire muqueux que l'on peut explorer par l'étude des cytokines. Dans les modèles expérimentaux de colite et chez les patients atteints d'une MICI, cette approche a permis de mettre en évidence le rôle prédominant des cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ )<sup>237</sup> et immunorégulatrices (e.g. IFN- $\gamma$  et IL-4). Ce dernier groupe de cytokines, dont deux entités (type 1 (e.g. IFN- $\gamma$ ) et type 2 (IL-4)) ont été décrites par Mosmann et ses collaborateurs, est associé à des lésions d'âges différents.<sup>238</sup> L'analyse des lésions dites aiguës montrait un profil d'expression de cytokines de type 2, alors que celle des lésions dites chroniques mettait en évidence un profil de type 1. Ces études immunologiques sont à l'origine d'une meilleure compréhension de la physiopathologie des MICI.

# VI-2- Symptômes et complications associés aux MICI

La maladie de Crohn et la RCH sont souvent à l'origine de symptômes gênants altérant la qualité de vie des patients. Plusieurs symptômes sont communs à ces deux maladies : les plus fréquents sont des douleurs coliques, des diarrhées parfois sanglantes, et de la fièvre.<sup>230</sup> D'autres symptômes sont particuliers à la maladie de Crohn ou à la RCH. Ainsi les patients souffrant de la maladie de Crohn peuvent présenter un amaigrissement et une atteinte systémique des articulations, de l'œil, de la peau ou du foie. Puis des complications comme des fistules (ano-périnéales, recto-vaginales ou encore entéro-entérales), des abcès, une perforation en péritoine

<sup>&</sup>lt;sup>235</sup> Xavier, R. J. et al. *Nature* **2007**, *448*, 427.

<sup>&</sup>lt;sup>236</sup> Podolsky, D. K. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 417.

<sup>&</sup>lt;sup>237</sup> Neurath, M. F. et al. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 1743.

<sup>&</sup>lt;sup>238</sup> Mosmann, T. R. et al. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 2348.

libre, une sténose iléale, un délabrement sphinctérien anal, une dénutrition ainsi qu'un risque d'évolution vers un cancer du grêle ou du côlon.

En revanche, les patients souffrant de la RCH présentent souvent un syndrome rectal avec de faux besoins et émissions de glaires sanglantes, ainsi que de la tachycardie. Les complications associées à la RCH sont la colectasie, la perforation et l'hémorragie. En ce qui concerne le risque relatif de cancérisation, il est plus important que pour les patients atteints de la maladie de Crohn, mais dépend de l'ancienneté ainsi que de l'étendue de la maladie.

Les symptômes et les complications associés aux MICI sont donc très invalidants et nécessitent une prise en charge rapide de la maladie.

## VI-3- Prise en charge des MICI et traitements

Les MICI résultent d'une réponse immunitaire inadaptée à l'encontre des bactéries de la flore intestinale, qui, chez le sujet sain sont considérées comme du soi. Ainsi, la réponse immunitaire intestinale est perpétuée par le maintien de l'activation des lymphocytes T et le dérèglement du ratio cytokines pro-inflammatoires sur cytokines anti-inflammatoires. L'abondance de cytokines pro-inflammatoires sécrétées en cas de MICI telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  active à long terme la fibrogénèse, la production de collagène et les métalloprotéases tissulaires ; ce qui conduit inéluctablement à des remaniements de la muqueuse. Par conséquent, la majorité des traitements envisagés en cas de maladie de Crohn et de RCH vise à rétablir l'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. De plus, les MICI étant des maladies évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémissions, les traitements doivent non seulement prendre en charge l'épisode de poussées, mais également prévenir la récidive.



Figure 13 : Représentation du déséquilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires.

A l'heure actuelle, différents traitements sont disponibles pour ces maladies. Ceux-ci sont prescrits aux patients en fonction de la pathologie rencontrée, de la sévérité de celle-ci, ainsi que de l'effet recherché et de la résistance chez certains patients pour différents traitements.

Deux types de traitements sont à distinguer :

- le traitement des poussées destiné à écourter leur durée et à limiter les symptômes,
- le traitement de prévention des poussées en phase de rémission.



Figure 14 : Principales stratégies thérapeutiques dans les MICI.

Quatre familles de médicaments, ainsi que le recours à la chirurgie en fonction des deux phases de la maladie, peuvent être prescrits :

- Les 5-aminosalicylés (5-ASA) représentent 85% des traitements prescrits en raison de la bonne tolérance (en particulier face à la rectocolite hémorragique) et du peu d'effets indésirables de ces médicaments. Ils diminuent les symptômes de la maladie bénigne et un traitement continu diminue les taux de rechute chez les patients en rémission.

- Les corticoïdes, prescrits en deuxième intention en cas d'inefficacité ou de poussées graves de la maladie. Plus efficaces, ils présentent néanmoins un certain nombre d'effets secondaires, ce qui empêche leur utilisation dans les traitements de longue durée.

Les patients qui ne répondent pas aux stéroïdes ou à l'acide 5-aminosalicylique peuvent bénéficier d'immunosuppresseurs :

- Les immunosuppresseurs (principalement l'azathioprine (Imurel<sup>®</sup>) et le méthotrexate) qui peuvent être au cœur d'un traitement d'entretien.

- Les biothérapies ciblées sur les TNF- $\alpha$  de type infliximab (Rémicade<sup>®</sup>) concerneraient approximativement 10 % des patients. En cas d'échec thérapeutique avec les corticoïdes et les immunosuppresseurs, les biothérapies offrent aujourd'hui la possibilité de soulager près de la moitié des patients pour qui on ne disposait jusqu'alors d'aucun traitement. Enfin, face à des formes sévères comportant des risques de lésions perforantes (fistulantes) ou de sténoses, le recours aux biothérapies peut être plus rapide.

- La chirurgie : 90 % des patients atteints de maladie de Crohn sont opérés au moins une fois pour enlever la partie la plus atteinte du tube digestif, avec un taux de récidive endoscopique de 80% un an après la chirurgie. La chirurgie est réservée aux formes réfractaires aux traitements médicamenteux, aux sténoses et aux complications de la maladie, type péritonite et cancer. Face à la maladie de Crohn, la chirurgie est donc limitée aux atteintes les plus sévères. Face à la rectocolite hémorragique, la chirurgie est réservée à des formes suraiguës comportant des évolutions chroniques mal contrôlées. Elle peut être néanmoins un traitement curatif qui peut aller jusqu'à l'ablation du côlon (ou colectomie).

Devant le caractère invalidant de ces maladies, et l'absence de traitements curatifs, le développement d'une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de ces maladies apparaît évident, et P2X<sub>7</sub>R comme cible biologique de ces pathologies semble être une cible de choix. En effet, l'implication de ce récepteur dans les phénomènes majeurs de sécrétion de cytokines proinflammatoires (notamment les IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) constitue un premier argument solide. De plus, la preuve du concept concernant l'efficacité d'antagonistes de ce récepteur apportée par les études *in vivo* réalisées sur les modèles animaux de colites induites montre le bénéfice apporté par ces composés dans le traitement de ces pathologies. En plus de leur activité anti-inflammatoire, les

antagonistes P2X<sub>7</sub>R ont également montré une action analgésique dans différents modèles de douleur (l'un des principaux symptômes rencontrés dans les MICI) ; allier ces deux activités pharmacologiques dans le traitement de ces pathologies apporterait un grand bénéfice pour la qualité de vie du patient, et constituerait une stratégie originale puisqu'aucun des traitements actuels n'allie ces deux activités. Un dernier point important pour l'utilisation de ces composés dans le traitement des MICI concerne leur activité anticancéreuse potentielle. En effet, l'une des complications observées chez les sujets atteints de MICI concerne l'augmentation du risque de développer un cancer colorectal. L'utilisation de cette classe de composés pourrait donc permettre de traiter préventivement ce type de cancers, même si ce rôle reste à définir.

Toutes les études citées précédemment ont permis de montrer que P2X<sub>7</sub>R a un grand potentiel thérapeutique avec beaucoup d'avenir, puisqu'à l'heure actuelle aucun antagoniste de ce récepteur n'est commercialisé en tant que médicament. Tout cela a donc engendré, ces dernières années, le développement d'un nombre important de séries chimiques visant à bloquer ce récepteur. Dans la partie suivante, nous présenterons les principales et les plus récentes séries chimiques d'antagonistes de P2X<sub>7</sub>R décrites dans la littérature ; nous avons choisi ces familles pour établir les premières relations structure-activité (RSA) conduisant à la conception de nos produits. La majorité de ces composés de la littérature sont issus de campagnes de criblage à haut débit et présentent une grande diversité structurale. Cette partie ne dresse donc pas une liste exhaustive des composés décrits jusqu'à maintenant.

# VII- Les antagonistes P2X<sub>7</sub>R décrits dans la littérature

Dans cette partie, nous présenterons les principales et les plus récentes séries chimiques d'antagonistes de P2X<sub>7</sub>R décrites dans la littérature. Les familles choisies sont celles sur lesquelles nous nous sommes basés pour établir les premières RSA, et concevoir nos composés. La majorité de ces molécules étant issues de campagnes de criblages à haut débit ; P2X<sub>7</sub>R n'ayant pas été cristallisé, il est difficile d'utiliser une approche « structure - based » par modélisation moléculaire. Cette partie ne dresse donc pas une liste exhaustive des composés développés et décrits dans la littérature. De plus, une forte diversité structurale est observée entre les différentes séries ; cela pouvant indiquer la possibilité de différents sites de liaison sur le récepteur.

# VII-1- Les dérivés synthétiques de l'ATP

L'étude des récepteurs P2 a nécessité le développement de ligands plus puissants et plus sélectifs que l'ATP. En effet, du fait que l'ATP (**1**) se lie à l'ensemble des récepteurs P2 et que beaucoup de cellules co-expriment plusieurs sous-types de récepteurs purinergiques,<sup>18</sup> il s'est avéré nécessaire d'obtenir des ligands plus sélectifs des différents sous-types dans le but de classer ces récepteurs. De la même manière, la compréhension de la pharmacologie de ces récepteurs a rendu indispensable la synthèse de ligands plus puissants ; les concentrations en ATP nécessaires à leur activation étant élevées (en particulier pour P2X<sub>7</sub>R). Les premiers agonistes et antagonistes synthétiques à avoir été développés sont des dérivés du ligand endogène lui-même.

Parmi ces derniers, on trouve principalement le benzoylbenzoylATP (BZATP 2),<sup>239</sup> le 2meSATP (3),<sup>240</sup> l' $\alpha$ , $\beta$ -meATP (4), et l'ATP oxydée (oATP 5).<sup>36</sup> Le BZATP et le 2-meSATP sont des agonistes synthétiques des récepteurs P2X plus puissants que l'ATP.<sup>16</sup> Le BZATP, agoniste synthétique le plus puissant de P2X<sub>7</sub>R à ce jour, sert d'outil pharmacologique dans les programmes de screening pour l'identification d'antagonistes de P2X<sub>7</sub>R.<sup>16</sup> L' $\alpha$ , $\beta$ -meATP est également un agoniste des récepteurs P2X ayant servi à la discrimination des différents sous-types. En effet, seuls les récepteurs P2X<sub>1</sub> et P2X<sub>3</sub> sont activés par de faibles concentrations de ce ligand. L'oATP est quant à lui un antagoniste des récepteurs P2X ayant servi à la compréhension de la pharmacologie des récepteurs, et peut également être utilisé comme outil pharmacologique dans le traitement des lésions neuronales secondaires par inhibition de P2X<sub>7</sub>R, et ce malgré sa faible spécificité. En effet, l'administration de ce composé à des rats ayant subit des lésions de la moelle épinière montre une réduction significative de la mort des neurones moteurs, et facilite le retour des fonctions motrices.<sup>241</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>239</sup> Guillory, R. J. et al. *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 259.

<sup>&</sup>lt;sup>240</sup> Maguire, M. H. et al. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 415.

<sup>&</sup>lt;sup>241</sup> Wang, X. et al. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 821.



Figure 15 : Structures de l'ATP et de dérivés synthétiques.

Le développement de ces ligands synthétiques a donc rendu possible la classification de ces récepteurs, et a permis de mieux comprendre leur pharmacologie. Cependant, le manque de sélectivité de ces molécules, leurs activités moyennes, ainsi que leur métabolisation rapide par les enzymes de dégradation des nucléotides (notamment les ectonucléotidases) ont marqué l'importance du développement de ligands plus puissants, et plus sélectifs, pour la réalisation d'études plus complètes, notamment des études *in vivo*.

Cela a suscité l'intérêt de la communauté scientifique, particulièrement pour P2X<sub>7</sub>R après la mise en évidence de son l'implication dans différentes pathologies, et notamment dans l'inflammation chronique,<sup>183-187</sup> la douleur,<sup>223-226</sup> les maladies neurodégénératives,<sup>163, 190, 191, 192</sup> et le cancer.<sup>211-222</sup> L'apport de ces connaissances a suscité un intérêt croissant des groupes de recherche académiques et industriels pour le développement de séries chimiques potentiellement antagonistes de P2X<sub>7</sub>R. En effet, depuis l'apparition des premiers brevets en 1999,<sup>242,243,244</sup> un nombre croissant de publications portant sur l'identification et le développement de composés antagonistes des P2X<sub>7</sub>R est apparu. En effet, entre 2001 et 2011, 220 brevets relatifs à la modulation de l'inflammation par modulation de P2X<sub>7</sub>R ont été déposés.<sup>245</sup> Ainsi, le développement de tels composés a permis d'aboutir à des molécules très actives se liant de manière spécifique aux P2X<sub>7</sub>R. Cela a donc permis

<sup>&</sup>lt;sup>242</sup> Baxter, A. et al. WO 9929660, **1999**.

<sup>&</sup>lt;sup>243</sup> Baxter, A. et al. WO 9929661, **1999**.

<sup>&</sup>lt;sup>244</sup> Baxter, A. et al. WO 9929686, **1999**.

<sup>&</sup>lt;sup>245</sup> Friedle, S. A. et al. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2010**, *5*, 35.

implication, ainsi que les mécanismes mis en jeu dans différentes pathologies. Les nombreuses séries chimiques développées ont également permis d'établir des Relations Structure-Activité (RSA) au sein, et entre les séries, facilitant ainsi le développement de tels composés.

# VII-2- Les dérivés de la tyrosine

L'un des premiers et des plus puissants antagonistes P2X<sub>7</sub>R ayant une structure complétement différente de l'ATP à avoir été développé est le composé KN-62 **6** (1-(*N*,*O*-bis-(1,5-isoquinolinesulfonyl)-*N*-méthyl-1-tyrosyl)-4-phénylpipérazine). Ce composé est resté pendant plusieurs années l'antagoniste de P2X<sub>7</sub>R humain le plus puissant, avec une concentration inhibitrice à 50% (Cl<sub>50</sub>) de 13 nM.<sup>246</sup> Plusieurs pharmacomodulations ont été réalisées afin d'améliorer l'activité des composés dans cette série. Cependant, au vu de leur masse moléculaire trop élevée, leur trop importante lipophilie ainsi que la présence de groupements sulfonates labiles, aucun dérivé du chef de file KN-62 ne s'est révélé approprié à un usage thérapeutique. Il est à noter que ce composé avait d'abord été développé et décrit en tant qu'inhibiteur du complexe Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline.<sup>247</sup> De fait, son manque de sélectivité ainsi que ses propriétés physico-chimiques n'ont pas permis son développement en tant qu'antagoniste P2X<sub>7</sub>R. Ce composé a uniquement été utilisé en tant qu'outil pharmacologique dans des tests d'identification de composés actifs sur P2X<sub>7</sub>R.<sup>247</sup>

C'est le potentiel thérapeutique de cette cible, ainsi que le manque de ligands spécifiques, qui ont fait apparaître, ces dix dernières années, un nombre croissant de composés avec une grande diversité de structures chimiques. Différentes revues publiées ces cinq dernières années témoignent de l'intérêt de différents groupes pharmaceutiques et académiques pour le développement de tels composés.<sup>22,104</sup>



*h*-P2X<sub>7</sub>R Cl<sub>50</sub> = 13 nM

Figure 16 : Structure et activité du composé 6.

<sup>&</sup>lt;sup>246</sup> Gargett, C. E. et al. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 1483.

<sup>&</sup>lt;sup>247</sup> Tokumitsu, H. et al. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4315.

Actuellement, le principal problème rencontré avec les antagonistes P2X<sub>7</sub>R développés réside dans leur différence d'activité entre le récepteur humain et celui de rat. Cela étant dû à une homologie qui n'est que de 80% entre les deux espèces.<sup>18</sup> En effet, le site de liaison pour l'ATP est, lui, très bien conservé entre les espèces, et les antagonistes compétitifs de l'ATP semblent donner des résultats similaires dans les deux espèces.<sup>49</sup> Cependant, beaucoup de composés ne sont pas compétitifs de l'ATP, et se lient donc à d'autres sites du récepteur, probablement moins bien conservés. Cela entraîne parfois d'importantes différences d'activité, rendant difficiles les études pré-cliniques, pourtant indispensables au développement d'un médicament. Il y a également peu de ces composés qui passent la barrière hémato-encéphalique (BHE).<sup>248</sup> Il a pourtant été montré que ce récepteur était impliqué de façon majeure dans les phénomènes neuro-inflammatoires, et que son inhibition était bénéfique dans de nombreuses pathologies neurodégénératives dans lesquelles l'inflammation est l'une des causes de la mort neuronale.<sup>248</sup> Le challenge actuel est donc de pallier ces manques, en développant des antagonistes qui présentent de bonnes activités chez les différentes espèces, et qui soient capables de passer la BHE. Cela dans le but d'étudier, et d'exploiter au mieux l'implication de ce récepteur dans différentes pathologies, et notamment dans l'inflammation chronique. De nombreuses études sur la douleur ayant déjà été réalisées.

<sup>&</sup>lt;sup>248</sup> Hopper, A. T. et al. Annu. Rep. Med. Chem. **2012**, 47, 37.

## VII-3- Les adamantanamides

En 2003, suite à une campagne de criblage à haut débit, les laboratoires AstraZeneca ont mis en évidence un dérivé adamantanamide **7** présentant une  $CI_{50}$  de 126 nM vis-à-vis de P2X<sub>7</sub>R (Figure 17).<sup>249</sup>



Figure 17 : Structure et activité du composé 7.

Malgré son activité, ce composé présente une masse moléculaire élevée (MM = 540 g/mol) ainsi qu'une forte lipophilie (cLogP = 6,2). La suppression d'un groupe amide a conduit au composé monoamide **8** avec une masse moléculaire plus faible, une lipophilie légèrement amoindrie (MM = 338 g/mol, cLogP = 5,2) et une activité comparable (Cl<sub>50</sub> = 398 nM) (Figure 18). Une série d'analogues a été synthétisée et l'étude des RSA a révélé que le groupement 2-chlorophényle est favorable à l'activité (Cl<sub>50</sub> = 7,9 nM pour le composé **9** et Cl<sub>50</sub> = 1,6 nM pour le composé **10**) (Figure 18). Ce résultat suggère que la substitution en ortho provoque une modification dans l'orientation du groupe benzamide nécessaire à l'activité. L'étude du connecteur central a montré que la *N*-méthylation, la réduction du carbonyle, ou la suppression du groupement méthylène conduisent à une baisse d'activité, alors que l'allongement de la chaîne fixée à la fonction amide ou la formation du rétroamide donnent des activités similaires.



Figure 18 : Structures et activités des antagonistes P2X<sub>7</sub>8, 9 et 10.

<sup>&</sup>lt;sup>249</sup> Baxter, A. et al. *Bioorg Med Chem Lett.* **2003**, *13*, 4047.

Le groupe AstraZeneca s'est alors penché sur la conception d'antagonistes de P2X<sub>7</sub>R à partir de la série adamantanamide (Figure 19). Les composés de cette série étant trop lipophiles, métaboliquement instables et peu solubles dans l'eau. Plusieurs stratégies ont donc été envisagées pour diminuer la lipophilie des composés telles que l'incorporation de chaînes latérales hydrophiles et ionisables ou encore le remplacement du cycle phényle par des analogues hétérocycliques ou le remplacement de l'adamantane par des groupements moins liphophiles.



Figure 19 : Pharmacomodulations effectuées autour de la série adamantanamide.

L'incorporation de chaînes latérales hydrophiles et ionisables sur le groupement phényle a été explorée par AstraZeneca, qui a récemment développé une série d'adamantanamides dans laquelle le 2-chlorophényle est substitué en position 5 par une chaîne basique. Le composé **11** montre une inhibition totale de la libération d'IL-1 $\beta$  sur la lignée de monocytes THP-1 (Figure 20).<sup>250</sup>



Figure 20 : Structure et activité du composé 11.

<sup>&</sup>lt;sup>250</sup> Furber, M. et al. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5882.

Le remplacement du groupement phényle par divers hétérocycles tels qu'une pyridine, une quinoléine ou un indole maintient l'activité. Il est important de remarquer que dans la série rétroamide substituée par des quinoléines, le groupement en position ortho n'est pas essentiel pour l'activité.

Le groupe AstraZeneca a également développé une série en remplaçant le groupement adamantane. Ce groupement lipophile a été remplacé par un cyclohexane et le groupement phényle fût ensuite remplacé par un groupement de type quinoléine donnant le dérivé **12** qui présente une forte activité (Figure 21).<sup>251</sup>



Figure 21 : Structure et activité du composé 12.

# VII-4- Les arylhydrazides

Un criblage à haut débit réalisé par la firme Abbott a mis en évidence une nouvelle classe d'antagonistes du récepteur P2X<sub>7</sub>, les arylhydrazides. Ils diffèrent de la série précédente par une fonction hydrazide plutôt que amide.<sup>252</sup> Le composé **13** (Figure 22) a montré une activité intéressante dans des modèles animaux de douleurs neuropathiques et d'inflammation. De plus, ce composé ne semble pas interagir avec les autres récepteurs P2, tels que P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2Y<sub>2</sub>, à une concentration de 10  $\mu$ M ; ce qui permet d'assurer une meilleure sélectivité vis-à-vis de notre récepteur.



Figure 22 : Structure et activité du composé 13.

<sup>&</sup>lt;sup>251</sup> Evans, R. et al. WO 2004106305, **2004**.

<sup>&</sup>lt;sup>252</sup> Nelson, D. W. et al. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3030.

# VII-5- Les tétrazoles

En 2006, Abbott a développé une série de tétrazoles dans laquelle plusieurs composés ont été identifiés en tant qu'antagonistes de P2X<sub>7</sub>R suite à un criblage à haut-débit. Ces composés comportent un cycle aromatique en position 1 du noyau tétrazole, substitué par deux atomes de chlore ou un atome de chlore et un groupement trifluorométhyle, et un deuxième groupement variant en position 5 du noyau tétrazole. Les composés montrent une bonne activité dans la gamme du nanomolaire (notamment le composé **14**, chef de file de la série, avec une Cl<sub>50</sub> de 12,6 nM) (Figure 23).<sup>253</sup>



Figure 23 : Structure et activité du composé 14.

Plusieurs pharmacomodulations ont été effectuées dans cette série, notamment le remplacement du tétrazole par un triazole.<sup>254</sup> Cependant, les tests d'activité ont montré que le tétrazole donnait lieu aux meilleurs résultats. La conclusion est la même lorsque celui-ci est remplacé par un pyrazole ou un imidazole.<sup>104</sup> En effet, il a été observé que la densité électronique de l'hétérocycle central jouait un rôle par rapport à l'activité de la molécule vis-à-vis de P2X<sub>7</sub>R.



Figure 24 : Structures et activités des composés 15 à 18.

Les meilleurs composés de cette série sont donc les tétrazoles qui ont largement été développés. Le composé **14** - chef de file de la série - a montré une action anti-inflammatoire *in vitro* par réduction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  sur la lignée de monocytes THP-1, et également des résultats très encourageants sur des modèles animaux de douleur neuropathique.<sup>253</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>253</sup> Nelson, D. W. et al. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3659.

<sup>&</sup>lt;sup>254</sup> Florjancic, A. S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2089.

## VII-6- Les pyrazoloacétamides

Cette famille de composés a été développée en 2010 par les laboratoires GlaxoSmithKline.<sup>255,256,257</sup> L'imidazole **19** identifié en tant que hit (Figure 25) est issu d'un criblage à haut débit. Il présente une Cl<sub>50</sub> de 39,8 nM vis-à-vis de P2X<sub>7</sub>R humain.



*h*-P2X<sub>7</sub>R Cl<sub>50</sub> = 40 nM

Figure 25 : Structure et activité du composé 19.

Ce composé présente une bonne activité antagoniste de P2X<sub>7</sub>R humain. Cependant, afin d'améliorer l'activité, différentes pharmacomodulations ont été menées. Dans un premier temps, le groupe benzyle porté par l'azote de la fonction amide a été modifié en le remplaçant par différents cycles (aromatiques ou aliphatiques), et cela a permis de montrer qu'un cycle aromatique de type benzyle donnait lieu aux meilleurs résultats. La fonction amide a également été modifiée. La méthylation de l'atome d'azote mène à une baisse d'activité, de même que le rétroamide donne de moins bons résultats. Cependant, une urée est tolérée, mais l'amide reste le groupement donnant lieu aux activités les plus intéressantes. La dernière partie des modulations a consisté à remplacer le pyrazole par d'autres hétérocycles azotés (comme des imidazoles). Cela a permis d'identifier le composé **20** (Figure 26) qui est également un pyrazole avec une activité antagoniste de P2X<sub>7</sub>R humain améliorée.



*h*-P2X<sub>7</sub>R Cl<sub>50</sub> = 8 nM

Figure 26 : Structure et activité du composé 20.

<sup>&</sup>lt;sup>255</sup> Beswick, P. J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4653.

<sup>&</sup>lt;sup>256</sup> Gleave, R. J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4951.

<sup>&</sup>lt;sup>257</sup> Chambers, L. J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3161.

Ce composé a fait l'objet d'études sur des modèles murins de douleurs inflammatoires et s'est révélé être un anti-hyperalgésique potentiel. De plus, le composé **20** présente de bonnes caractéristiques comme : une absorption par voie orale de 100%, une faible métabolisation, et un temps de demie vie de clairance de 1,7 heure.

### VII-7- Les dérivés pyroglutamides

Sur la base de la série précédente, les laboratoires GlaxoSmithKline ont également développé des dérivés de l'acide pyroglutamique.<sup>258,259</sup> Parmi ces composés, la molécule GSK1370319A (**21**) se distingue par sa bonne pénétration au niveau du Système Nerveux Central (SNC), et avec une Cl<sub>50</sub> de 32 nM. Cette molécule a fait l'objet d'une étude sur des cellules gliales et neuronales du cerveau, et il a été montré que celle-ci inhibait spécifiquement la libération d'IL-1β en empêchant la formation de l'inflammasome (étape nécessaire et indispensable pour la maturation de la pro-IL-1β en IL-1β mature produite par la caspase-1). De plus, cette molécule permet de diminuer la mort cellulaire, et donc neuronale, causée par la libération d'IL-1β suite à l'activation de P2X<sub>2</sub>R.<sup>260</sup> Ces phénomènes étant spécifiques à l'inhibition de P2X<sub>2</sub>R, il a été proposé que l'inhibition de ce récepteur permettrait de prévenir la séquence d'événements qui conduit à la neurodégénérescence. Ainsi, les antagonistes P2X<sub>2</sub>R peuvent jouer un rôle dans la modulation de la progression des maladies du SNC dans lesquelles des événements neuro-inflammatoires sont impliqués.



Figure 27 : Structure et activité du composé 21.

Cependant, du fait que ces dérivés pyroglutamiques subissent une métabolisation en  $\alpha$  du carbonyle, différents analogues ont été synthétisés pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques de cette famille, en tentant de bloquer ce site de métabolisation.<sup>259</sup> Le composé **22** avec les deux méthyles en  $\alpha$  du carbonyle montre une activité similaire au composé **21**.

<sup>&</sup>lt;sup>258</sup> Abdi, M. H. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5080.

<sup>&</sup>lt;sup>259</sup> Abberley, L. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6370.

<sup>&</sup>lt;sup>260</sup> Murphy, N. et al. *Brain Pathology* **2012**, *22*, 295.

Le remplacement du carbone par un oxygène dans le composé **23** fait également baisser légèrement l'activité, alors que le composé **24** montre lui une augmentation de l'activité tout en conservant les propriétés favorables (comme la bonne pénétration au niveau du SNC), et en bloquant le site de métabolisation. Lors des différentes pharmacomodulations réalisées, il a également été remarqué que le groupement 2-chloro-3-trifluorométhylbenzyle porté par la fonction amide permettait d'obtenir de bons résultats en termes d'activité.



Figure 28 : Structures et activités des composés 22 à 24.

Ainsi, sur la base du composé **24**, des dérivés imidazolidinones ont été développés, avec notamment les composés **25** et **26** qui présentent de bonnes activités *in vitro*.<sup>259</sup> Contrairement au composé **26**, le composé **25** présente une faible clairance *in vivo* ainsi qu'une biodisponibilité de 100% par voie orale. Ces composés étant également actifs sur P2X<sub>7</sub>R de rat, des études *in vivo* ont été réalisées sur des modèles de douleur. Lors de ces études, le composé **25** s'est montré beaucoup plus efficace ; cela pouvant être expliqué par les bonnes propriétés pharmacocinétiques de cette molécule. Ces études ont également permis de montrer que P2X<sub>7</sub>R au niveau central joue certainement un rôle dans les mécanismes de la douleur, puisque le composé **26** qui présente une moins bonne pénétration du SNC a montré une moins bonne efficacité lors des études sur les modèles de douleur.



Figure 29 : Structures et activités des composés 25 et 26.

### VII-8- Les 3,5-dichloropyridines

En 2012, une équipe de recherche coréenne a publié une série d'antagonistes de  $P2X_7R$  développée autour d'un motif 3,5-dichloropyridine.<sup>261</sup> Celle-ci est issue de l'identification du hit **27** par criblage à haut débit de leur chimiothèque. En effet, lors du criblage, le composé **27** a montré une activité antagoniste modorée vis-à-vis de  $P2X_7R$  dans le test d'inhibition de la formation du pore membranaire, avec une  $Cl_{50}$  de 650 nM.



*h*-P2X<sub>7</sub>R IC<sub>50</sub> = 650 nM

Figure 30 : Structure et activité de la molécule 27.

A partir de cette molécule, des pharmacomodulations ont été réalisées dans le but d'aboutir à des composés plus actifs. Différentes modulations ont été réalisées sur le motif 3,5dichloropyridine en le remplaçant par différents groupements aromatiques ou en changeant la position ou la nature des substituants greffés sur la pyridine. Ces variations ont permis de montrer que le motif 3,5-dichloropyridine était indispensable à l'activité antagoniste de P2X<sub>7</sub>R, avec une importance pour la position des atomes de chlore. Le linker hydrazide a également été modifié par, notamment, méthylation de l'azote en alpha du carbonyle, réduction du carbonyle, ou remplacement par un amide. Toutes les modulations réalisées sur cette fonction ont donné lieu à des composés inactifs montrant, là encore, le rôle primordial de la fonction hydrazide pour l'activité antagoniste de P2X<sub>7</sub>R au sein de cette famille de composés. La longueur de la chaîne entre l'hydrazide et le groupement lipophile à l'autre extrémité de la molécule a également été étudiée, et les meilleures activités sont celles des composés pour lesquels le groupement lipophile est directement lié au carbonyle de la fonction hydrazide. Pour finir, le groupement phényle du composé 27 a été remplacé par différents cycles aromatiques ou aliphatiques substitués ou non. L'ensemble de ces pharmacomodulations a donc permis d'aboutir aux composés 28 et 29, qui présentent des activités respectives de 4,9 et de 13,0 nM dans le test d'inhibition de la formation du pore membranaire induite par une exposition prolongée à l'ATP.

<sup>&</sup>lt;sup>261</sup> Lee, W. G. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3687.

De plus, ces composés ont également montré de bons résultats lors du test d'inhibition de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  sur la lignée de monocytes THP-1 induite par la stimulation au LPS et IFN-gamma, avec là encore des Cl<sub>50</sub> respectives de 1,3 et 9,2 nM. La sélectivité de la molécule **29** a également été étudiée à une concentration de 10  $\mu$ M vis-à-vis des récepteurs P2X<sub>1</sub> et P2X<sub>3</sub>, et il s'est avéré que celle-ci est sélective de P2X<sub>7</sub>R. Le composé **29** a également montré une inhibition de l'expression de iNOS et COX-2, ainsi que de la production de NO dans les cellules THP-1 à une concentration de 1  $\mu$ M. Cela montre la capacité du dérivé **29** à inhiber la synthèse *de novo* de protéines inflammatoires. L'ensemble des résultats obtenus dans cette série laisse donc envisager un développement possible de ces 3,5-dichloropyridines pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.



Figure 31 : Structures et activités des composés 28 et 29.

# VII-9- Les dérivés pipéraziniques

Les laboratoires Janssen ont publié en 2013 deux nouveaux antagonistes des P2X<sub>7</sub>R ayant une bonne pénétration au niveau du SNC, et qui sont actifs sur les P2X<sub>7</sub>R d'humain, de rat, et de souris ; cela permettant de réaliser des études précliniques.<sup>262</sup> Cette étude a été menée dans le but d'obtenir des antagonistes de P2X<sub>7</sub>R affins et puissants, avec une bonne pénétration au niveau central pour les tester dans le traitement des désordres du SNC incluant : la dépression, les troubles de l'humeur, et les phénomènes neuro-inflammatoires. Une fois encore, ces composés ont été développés suite à l'identification d'un hit **30** par criblage à haut débit d'une chimiothèque de composés. Un effort de pharmacomodulation a été réalisé et a permis d'aboutir à deux composés présentant de bonnes activités antagonistes vis-à-vis de P2X<sub>7</sub>R, les molécules **31** et **32**. Suite à l'identification de ces deux leads, des études ont été réalisées dans le but de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ces composés ; cela en vue de sélectionner une molécule pour un développement préclinique.

<sup>&</sup>lt;sup>262</sup> Letavic, M. A. et al. ACS Med. Chem. Lett. **2013**, 4, 419.

Ces deux composés présentent de bons paramètres pharmacocinétiques, avec une bonne solubilité, un taux de liaison aux protéines plasmatiques acceptable, et une bonne perméabilité, mais présentent tous deux un fort métabolisme par les microsomes hépatiques de rat et d'humain, indiquant que ces composés ne peuvent pas être utilisés par voie orale. La voie sous-cutanée est donc l'alternative pour l'étude de ces composés chez l'animal. Par cette voie d'administration, il a été montré que ces deux molécules présentent un fort taux d'occupation des P2X<sub>7</sub>R au niveau du SNC ; cela étant un point positif pour l'étude du potentiel thérapeutique de ces composés dans le traitement des désordres du SNC. Une étude de la sélectivité des composés vis-à-vis de P2X<sub>7</sub>R a également été réalisée sur un panel de 50 récepteurs (canaux ioniques et transporteurs membranaires) à une concentration de 1 µM, et le composé **31** a montré une bien meilleure sélectivité que le composé **32**. Le composé **31** a donc été sélectionné pour un développement préclinique, et a montré des résultats prometteurs sur un modèle animal de neuro-inflammation, avec de bonnes propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Il est prévu que ce composé soit également évalué sur différents modèles animaux de dépressions et de troubles de l'humeur.



Figure 32 : Structures et activités des composés 30 à 32.

Ces nouveaux composés permettent donc une avancée importante pour l'étude du potentiel thérapeutique de P2X<sub>7</sub>R au niveau du SNC. En effet, le fait d'avoir des antagonistes puissants, sélectifs de P2X<sub>7</sub>R, et avec une bonne pénétration au niveau du SNC, permet de disposer d'outils pharmacologiques qui étaient manquants ces dernières années. En effet, l'un des premiers antagonistes P2X<sub>7</sub>R présentant une bonne activité, une spécificité P2X<sub>7</sub>R, et un bon passage de la BHE est le composé **33** issu de la série des cyanoguanidines développée par les laboratoires Abbott.<sup>263</sup> Ce composé a également été tritié pour donner l'analogue **34**, qui pourrait servir de radioligand pour la mise en place d'un test de binding sur P2X<sub>7</sub>R.<sup>263</sup> A l'heure actuelle, les composés sont caractérisés par

<sup>&</sup>lt;sup>263</sup> Donnelly-Roberts, D. L. et al. *Neuropharmacology* **2008**, *56*, 223.

des tests d'activité (parfois même indirects) ; ce qui peut rendre parfois difficile la comparaison entre deux molécules issues de séries différentes.

La mise en place d'un test d'affinité permettrait, d'une part, de comparer les molécules entre elles, mais également d'obtenir des informations sur les sites de liaison de ces composés, puisqu'à l'heure actuelle il est difficile de savoir où se lient ces molécules sur le récepteur, et si toutes se lient au même endroit.



Figure 33 : Structures et activités des composés 33 et 34.

L'un des problèmes soulevé dans l'article revue publié par Hopper et ses collaborateurs en 2012 (dans le 47<sup>ème</sup> volume d'Annual Reports in Medicinal Chemistry) était le manque de composés antagonistes de P2X<sub>7</sub>R puissants, sélectifs, actifs sur les récepteurs des différentes espèces, et passant la BHE.<sup>248</sup> Ces nouvelles molécules répondent à ces critères. Cela va permettre d'étudier plus en profondeur le potentiel thérapeutique de P2X<sub>7</sub>R dans le traitement des désordres du SNC, et notamment dans le traitement de la neuro-inflammation, puisqu'il est avéré que ce canal est une cible intéressante pour le développement de nouveaux traitements à ce niveau. L'apparition de ces composés actifs sur les récepteurs de rat et d'humain permettra donc de réaliser des études précliniques indispensables pour la validation des cibles, et le passage au développement clinique. De plus, la possibilité de développer des tests de binding grâce au radioligand disponible permettrait d'apporter de nouvelles connaissances sur la liaison des molécules au récepteur.

## VII-10- Les dérivés carboranes

En 2014, un laboratoire australien a publié les premiers dérivés carboranes présentant une activité antagoniste de P2X<sub>7</sub>R et actifs sur des modèles murins de dépression.<sup>264</sup> Leur étude est basée sur la série adamantanamide développée par AstraZeneca avec, notamment, le composé **10**.<sup>249</sup> Leur étude a donc consisté à remplacer le groupement adamantane par différents cycles condensés de tailles variables. Pour déterminer l'activité de leurs molécules, les auteurs ont utilisé le test d'inhibition de la formation du pore membranaire. Ce test a été réalisé sur la lignée de monocytes THP-1, en utilisant le BZATP comme agoniste de P2X<sub>7</sub>R et le YO-PRO-1 comme agent fluorescent. Les résultats obtenus ont montré une corrélation entre la taille du cycle aliphatique et la puissance des composés. En effet, dans cette série, plus le cycle aliphatique est encombrant, plus le composé inhibe l'activité de P2X<sub>7</sub>R. Cela peut donc laisser penser que P2X<sub>7</sub>R présente une large poche hydrophobe au niveau du site de liaison de ces composés, et que l'interaction avec cette poche est fondamentale pour l'inhibition de l'activité de ce récepteur. Cela explique également la plus faible activité du composé **38** en comparaison au composé **37**. En effet, le fait d'avoir une charge négative au niveau du polycycle aliphatique diminue considérablement la lipophilie du composé et donc son activité.



Figure 34 : Structures et activités des composés 10 et 35 à 38.

<sup>&</sup>lt;sup>264</sup> Wilkinson, S. M. et al. ACS Chem. Neurosci. 2014, 5, 335.

Suite à l'évaluation du caractère antagoniste de ces molécules, celles-ci ont été testées sur des modèles murins de dépression. En effet, il a récemment été montré que les souris P2X<sub>7</sub>Rdéficientes présentaient une susceptibilité moindre à la dépression en comparaison à des souris sauvages.<sup>265</sup> Cette étude laisse donc envisager une utilisation possible des antagonistes P2X<sub>7</sub>R dans le traitement des désordres du SNC comme la dépression. Lors de l'évaluation de ces molécules sur ces modèles de souris, des résultats intéressants ont été observés. En effet, de façon surprenante, les molécules les plus actives lors des tests de fonctionnalité (composés 10, 36 et 37) n'ont pas révélé une efficacité significative dans ce modèle de dépression. Au contraire, les molécules 35 et 38 qui présentaient les CI<sub>50</sub> les plus faibles lors des tests d'activité, se sont révélées être les plus efficaces dans ce modèle, avec des propriétés antidépressives intéressantes. Le manque d'activité des composés 10, 36 et 37 observé dans cette étude peut probablement être expliqué par un faible passage de la BHE pour ces molécules ou une activité plus faible sur le récepteur de souris. En effet, ces trois molécules présentent une lipophilie très importante ; ce qui peut diminuer leur pénétration au niveau du SNC, et les rendre plus susceptibles à une métabolisation rapide. Cette étude relate le développement des premiers dérivés carboranes à présenter une modification du fonctionnement du SNC; ce qui ouvre un nouveau champ pour le développement de molécules pour le traitement des désordres du SNC avec un groupement carborane dans leur structure.

### VIII- Les antagonistes P2X<sub>7</sub>R en essais cliniques

Bien qu'à l'heure actuelle aucun antagoniste de P2X<sub>7</sub>R ne soit commercialisé en tant que médicament, certains leads des différentes séries chimiques développées par des grands groupes pharmaceutiques ont été amenés jusqu'aux essais cliniques, et ce principalement pour des pathologies inflammatoires. En effet, la molécule AZD9056 (série adamantanamide, structure non dévoilée à ce jour) développée par la firme AstraZeneca a fait l'objet d'une étude clinique pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde. Cependant, l'absence d'efficacité clinique de la molécule sur une cohorte de 383 sujets a amené à stopper son développement en Phase IIb.<sup>266</sup> Ce composé fait également l'objet d'études cliniques pour le traitement de l'ostéoarthrite, la bronchopneumopathie chronique obstructive, ainsi que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.<sup>22</sup> Il est à noter que AstraZeneca est la première firme à avoir entrepris des essais cliniques pour un composé antagoniste des P2X<sub>7</sub>R. Pfizer a également développé différentes séries chimiques ayant abouti à leur

<sup>&</sup>lt;sup>265</sup> Boucher, A. A. et al. *Neuroscience* **2011**, *189*, 170.

<sup>&</sup>lt;sup>266</sup> Keystone, E. C. et al. Ann. Rheum. Dis. **2012**, 71, 1630.

composé lead, le CE-224535 (**39**).<sup>267</sup> Ce composé est un antagoniste puissant des P2X<sub>7</sub>R qui inhibe la libération d'IL-1β induite par le LPS et l'ATP, avec une Cl<sub>50</sub> de 1,0 nM. II a également fait l'objet d'essais cliniques pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, mais aucune efficacité significative n'a été montrée. Cela a donc conduit à l'arrêt de son développement pour cette pathologie en Phase II. Cependant, les propriétés pharmacocinétiques excellentes de ce composé, ainsi que sa tolérance prouvée lors des essais cliniques en font un candidat potentiel pour le traitement de la douleur, ou des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.<sup>267</sup> La société Evotec a annoncé en 2010 le succès de la Phase I pour son composé EVT401 en vue d'un développement pour le traitement de pathologies inflammatoires (notamment l'arthrite rhumatoïde), mais aucune structure n'a été dévoilée pour le moment. Ce composé a montré une bonne tolérance ainsi que des propriétés pharmacocinétiques, que ce composé inhibait la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-1β induite par le LPS et l'ATP [Evotec P2X<sub>7</sub> Antagonist Program. http://www.evotec.com/article/en/Press-releases/Evotec-grants-exclusive-rights-on-EVT-401-in-China-to-Conba-Pharmaceutical/2274].

GlaxoSmithKline également développé La firme а plusieurs séries chimiques.<sup>255,256,257,258,259,268,269,270</sup> Parmi ces composés, des leads ont été identifiés, dont le composé GSK1482160 (40) qui s'est révélé être un modulateur allostérique de P2X<sub>7</sub>R.<sup>271</sup> Ce composé a fait l'objet d'une étude clinique de Phase I, durant laquelle la tolérance a été montrée, les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques établis, et des mesures ex vivo de la production d'IL-1β ont été effectuées. En résumé, ce composé diminue l'efficacité de l'ATP pour P2X<sub>7</sub>R sans affecter son affinité, ce qui entraîne une diminution de la production d'IL-1β. Suite à cette étude, la firme a décidé de poursuivre le développement de ce composé pour le traitement des douleurs inflammatoires chroniques.



Figure 35 : Structures et activités des composés 39 et 40.

<sup>&</sup>lt;sup>267</sup> Duplantier, A. J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3708.

<sup>&</sup>lt;sup>268</sup> Chambers, L. J. et al. WO 2008003697, **2008**.

<sup>&</sup>lt;sup>269</sup> Beswick, P. J. et al. WO 2007141267, **2007**.

<sup>&</sup>lt;sup>270</sup> Beswick, P. J. et al. WO 2007141269, **2007**.

<sup>&</sup>lt;sup>271</sup> Ali, Z. et al. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *75*, 197.

### IX- Conclusion de la partie introductive

Depuis le clonage de P2X<sub>7</sub>R à la fin des années 90, de nombreuses études ont été menées dans le but de comprendre la pharmacologie de ce récepteur, sa distribution, son rôle physiologique, et son implication potentielle dans différentes pathologies. L'ensemble de ces études a permis de montrer que ce récepteur était le plus différencié au sein de la famille P2XR, tant en termes de structure, qu'au niveau des propriétés pharmacologiques. Ce sont ces propriétés particulières ainsi que sa distribution, principalement au niveau des cellules du système immunitaire, qui en ont fait l'un des récepteurs purinergiques les plus étudiés ces dernières années. Bien que son rôle physiologique ne soit pas encore bien connu, la multiplication des études *in vitro* a permis de valider l'implication de ce récepteur dans les phénomènes majeurs de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires avec, notamment, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18, l'IL-6, et le TNF- $\alpha$ .

Le développement de souris K.O.  $P2X_7R$  a également permis de démontrer l'implication de ce récepteur dans plusieurs pathologies inflammatoires telles que les MICI et l'arthrite rhumatoïde. Elle a aussi été étudiée dans le cas des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer dans laquelle la neuro-inflammation est une des causes des dommages neuronaux. L'ensemble de ces travaux a fait émerger, au début des années 2000, P2X<sub>7</sub>R comme nouvelle cible potentielle et prometteuse dans le traitement de l'inflammation, tant au niveau central que périphérique. De nombreuses séries chimiques, antagonistes de P2X<sub>7</sub>R, ont été développées, tant par l'industrie pharmaceutique que par des groupes de recherche académiques. Le développement de composés, de plus en plus sélectifs et puissants, a permis de définir de plus en plus précisément le potentiel thérapeutique de cette classe chimique. L'arrivée récente en phase de développement clinique des molécules développées par Pfizer, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, et Evotec a permis de montrer la tolérance de ces composés chez l'Homme. Cependant, l'échec des molécules de Pfizer, et AstraZeneca dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde pose questions. L'une des difficultés rencontrées est la faible homologie de séquence entre le récepteur de rat et celui d'humain. Certaines séries sont très actives sur le récepteur humain, et beaucoup moins sur le récepteur de rat, ce qui rend les études précliniques difficilement transposables, voire impossibles dans certains cas. De plus, dans certaines pathologies, comme dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, des polymorphismes de P2X<sub>7</sub>R sont observés. Cela peut expliquer, en partie, le manque d'efficacité des antagonistes P2X<sub>7</sub>R chez les sujets malades. Il est donc nécessaire, dans les années à venir, de réaliser des études sur les variants de P2X<sub>7</sub>R potentiellement exprimés dans les pathologies ciblées. Il est également nécessaire de parvenir au développement d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R présentant des activités

similaires inter-espèces. Des études seront également à mener, dans le but de définir dans quelles pathologies précises les antagonistes P2X<sub>7</sub>R peuvent être utilisés à bon escient. Les durées des traitements ainsi que les posologies seront également à déterminer. Malgré ces interrogations, les études *in vitro* et *in vivo* menées ces quinze dernières années sont très encourageantes, et permettent d'envisager le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques par utilisation des antagonistes P2X<sub>7</sub>R dans le traitement de l'inflammation. De plus, l'apparition très récente d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R sélectifs, puissants, et passant la barrière hémato-encéphalique va permettre d'étudier de manière approfondie le potentiel de cette cible pour le traitement des phénomènes neuro-inflammatoires. La recherche de candidats médicaments ciblant le P2X<sub>7</sub>R pour le développement de nouveaux traitements anti-inflammatoires plus efficaces que les traitements actuels a encore de beaux jours devant elle.

Dans cette démarche, notre but est de développer (sur la base des données de la littérature) de nouveaux ligands de P2X<sub>7</sub>R pour une utilisation potentielle dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, et plus spécifiquement dans le cas des MICI. Notre intérêt se porte également sur les propriétés anticancéreuses de cette cible ; c'est pourquoi nous avons souhaité évaluer le potentiel anticancéreux de nos composés lors de ce programme de recherche. Bien que cette propriété ne soit pas encore bien comprise, l'absence de composés ciblant P2X<sub>7</sub>R tout en présentant une activité anticancéreuse laisse un large champ d'exploitation.

CHAPITRE II : CONCEPTION

#### CONCEPTION

L'objectif de nos travaux a consisté en la conception et la synthèse de nouveaux ligands, potentiellement antagonistes sélectifs, des récepteurs purinergiques P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R). Dans le chapitre précédent, nous avons discuté de l'implication de cette protéine transmembranaire dans différentes pathologies telles que l'inflammation, le cancer, la douleur, et certaines maladies neurodégénératives. En effet, les études menées ces dix dernières années sur le système purinergique, et plus particulièrement sur le P2X<sub>7</sub>R, ont permis de montrer (*in vitro* et *in vivo*) un fort potentiel thérapeutique pour cette cible ; le développement d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R en essais cliniques en témoigne.

# I- Identification d'un « pharmacophore » à partir des données de la littérature

Le développement d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R est rendu difficile par plusieurs aspects. Tout d'abord, la localisation transmembranaire du récepteur a, jusqu'à maintenant, rendu impossible sa cristallisation. Les informations sur la structure tridimensionnelle du récepteur sont donc uniquement basées sur des modèles issus de la modélisation moléculaire,<sup>20</sup> bâtis par homologie de séquence à partir de la structure cristallographique du récepteur P2X<sub>4</sub> récemment résolue.<sup>52,74</sup> De plus, seuls peu d'antagonistes du P2X<sub>7</sub>R décrits dans la littérature sont compétitifs de l'ATP. La majorité des composés se lient à d'autres sites du récepteur, et au vu de la diversité structurale entre les différentes familles, il a même été envisagé que ces composés puissent se lier à différents sites.<sup>49</sup> L'absence de connaissance du site de liaison des antagonistes rend donc impossible la conception de composés par une approche « structure-based » et l'utilisation du docking. Les séries décrites sont issues, pour la majorité, de criblages à haut-débit et sont développées par de grandes firmes pharmaceutiques, ainsi que par quelques équipes de recherche académiques.

Nous nous sommes appuyés sur une approche « ligand-based » pour la conception de nouvelles molécules visant à bloquer l'activité de ce récepteur. En effet, malgré une grande diversité structurale entre les différentes familles d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R décrites (*cf* chapitre précédent), il semble que certains éléments structuraux soient indispensables pour obtenir des antagonistes P2X<sub>7</sub>R. L'étude de différentes structures nous a permis d'identifier des éléments récurrents (Figure 36), et ainsi d'en déduire un « pharmacophore ».



Figure 36 : Structures d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R ayant permis l'identification des éléments pharmacophoriques.<sup>246,252,272</sup>

Ainsi, nous avons pu remarquer qu'un hétérocycle azoté (zone rouge) relié à un groupement lipophile (zone verte) par un connecteur central de type azoté (éventuellement partie prenante d'un cycle (zone bleue)) apparaît comme important pour obtenir des antagonistes P2X<sub>7</sub>R.

# II- Travaux antérieurs

Ce projet de recherche a été initié il y a 4 ans à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL) par le Pr R. Millet. Il s'appuie sur les données de la littérature précédemment exposées, ainsi que sur une analogie structurale entre certains des composés agonistes des récepteurs CB<sub>2</sub> (développés à l'ICPAL) et les antagonistes P2X<sub>7</sub>R décrits dans la littérature. En effet, suite à l'identification des éléments pharmacophoriques au sein des familles chimiques décrites, un criblage visant à identifier des antagonistes P2X<sub>7</sub>R a été réalisé sur les composés de la série des 2,5dihydropyrazolo-[4,3-c]-quinoléin-3-ones (développée à l'ICPAL en tant qu'agonistes CB<sub>2</sub>). Au sein de cette série, le composé **ALICB459** (Figure 37), dont les principaux éléments structuraux sont semblables à ceux de l'hydrazide **13**,<sup>252</sup> a été identifié comme hit lors du test d'activité réalisé sur le P2X<sub>7</sub>R avec une Cl<sub>50</sub> dans la gamme du micromolaire dans le test d'inhibition de la formation du pore membranaire. C'est l'identification de ce hit qui a orienté, par analogie avec le composé **13**, le développement de la série des pyrazol-5-ones (Figure 37) reprenant la même géométrie pour le linker central et permettant la synthèse de composés originaux à partir d'une structure « minimale » plus facilement modulable.

<sup>&</sup>lt;sup>272</sup> Betschmann, P. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 3848.

CONCEPTION



*Figure 37 : Identification du hit ALICB459 et conception de la série des pyrazol-5-ones.* 

Dans cette série, divers groupements lipophiles (cycles aromatiques ou aliphatiques) ont été introduits sur l'azote *N*-1 et le carbone *C*-3 (Figure 38). Les substituants ont été choisis en tenant compte des résultats pharmacologiques issus des séries arylhydrazide<sup>252</sup> (développée par les laboratoires Abbott) et adamantanamide (développée par AstraZeneca).<sup>249</sup> De plus, l'hétérocycle central permet de conserver une orientation dans l'espace similaire à celle retrouvée dans ces séries.



Figure 38 : Pharmacomodulations réalisées dans la série des pyrazol-5-ones.

De nombreux groupements ont été introduits en positions 1 et 3 au sein de cette série, afin d'établir un maximum de relations structure-activité (RSA). Au total, trente composés ont été synthétisés et évalués quant à leur activité vis-à-vis du P2X<sub>7</sub>R. Lors du screening de cette famille chimique, deux nouveaux hits ont été identifiés. En effet, les composés **ALIPX29** et **ALIPX49** (Figure 39) présentent tous deux une activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R modérée, avec des Cl<sub>50</sub> respectives de 3,82 et 3,75 µM dans le test d'inhibition de la formation du pore membranaire.



Figure 39 : Structures et activités des hits identifiés dans la série des pyrazol-5-ones.

Les résultats obtenus dans cette série sont en accord avec les données issues de la littérature. En effet, dans les structures de ces deux composés, on retrouve la présence de deux groupements lipophiles (relativement encombrants) reliés par un tenseur central de type hydrazide rigidifié. Le composé **ALIPX29** permet également de montrer que l'hétérocycle azoté en position 1 (la quinoléine dans le cas du composé **ALIPX49**) peut être remplacé par un phényle (2,5-diméthylphényle dans le cas du composé **ALIPX29**). Concernant la substitution du carbone *C*-3, un cycle aliphatique volumineux semble favorable pour obtenir une activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R. Cependant, les RSA sont parfois propres à une série et ne peuvent pas être généralisées. En effet, des dérivés aromatiques halogénés sont parfois retrouvés dans cette position et donnent lieu à de bonnes activités.

# III- Projet de recherche

Les travaux réalisés pendant cette thèse s'appuient sur l'ensemble des données de la littérature et des travaux antérieurs réalisés dans notre groupe de recherche. Ils ont consisté à développer un maximum de composés autour d'un motif pyrrolidin-2-one commun à 4 des séries envisagées, et servant de produit de départ pour les 3 autres. Celui-ci pouvant à la fois jouer le rôle de tenseur central et/ou d'hétérocycle azoté. Le but étant d'étoffer au maximum les RSA au sein des séries développées autour de ce motif. Cela permettra d'une part, de juger de la pertinence de ce motif, mais également de définir l'orientation optimale des différents groupements pour aboutir à des composés actifs et sélectifs. En effet, ce motif semble présenter plusieurs avantages pour le développement d'antagonistes potentiels P2X<sub>7</sub>R. Tout d'abord, il reprend presque la même géométrie que le motif pyrazol-5-one de la série développée à l'ICPAL, et nous permet ainsi de nous appuyer sur les résultats préliminaires issus de cette série, tout en modifiant l'orientation des différents groupements.

#### CONCEPTION

De plus, parmi les séries les plus récemment décrites dans la littérature, et présentant des activités dans la gamme du nanomolaire, on retrouve : des dérivés de l'acide pyroglutamique, des pyrazoles, des imidazoles, des imidazolidin-2-ones, des triazoles, ainsi que des tétrazoles (cf chapitre précédent et Figure 40).<sup>253-259</sup> Dans toutes ces séries, un hétérocycle azoté à cing chaînons, lié ou non à une fonction de type amide, joue le rôle de tenseur central portant des groupes lipophiles orientés de différentes façons dans l'espace. Nous remarquons également la présence de deux motifs aromatiques substitués par des halogènes pour la majorité de ces molécules ; l'aromatique sur la partie droite de la molécule étant toujours substitué en 2,3- ou en 2,4- par des halogènes et porté par une fonction amide le plus souvent. La présence d'un tel groupement dans cette position semble primordiale pour aboutir à des composés actifs. De petits groupes alkyles peuvent également être portés par l'azote du tenseur central et jouer le rôle de groupement lipophile. Ces éléments soulignent une fois de plus le fait que l'hétérocycle azoté peut être remplacé par des groupes lipophiles de taille et de nature différentes, laissant ainsi envisager des modes de liaison différents des molécules sur le récepteur, avec des orientations spatiales variées. En termes d'orientation spatiale, nous remarquons également la présence d'un carbone asymétrique pour plusieurs de ces molécules. Concernant les dérivés pyroglutamiques, la configuration absolue de ce carbone semble jouer un rôle, avec des molécules souvent plus actives en série S.<sup>258</sup>



Figure 40 : Structures d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R présentant un hétérocycle azoté à 5 chaînons.<sup>253-259</sup>

#### CONCEPTION

Le choix de ce motif (pyrrolidin-2-one) repose également sur l'expertise de la chimie des dérivés de l'acide pyroglutamique du Pr B. Rigo et du Dr P. Gautret au Laboratoire de Pharmacochimie de l'école HEI. En effet, cette substance de départ, d'origine naturelle, nous permet d'obtenir les différentes séries envisagées. De plus, elle nous permet d'aboutir à des structures « minimales » aisément modulables pour l'obtention de produits actifs. De nombreuses synthèses ont été développées à HEI autour de cette structure, et cela nous permet d'envisager de nombreuses modulations sur les différentes positions de ce motif en vue d'établir un grand nombre de RSA.

Dans le but d'avoir une conception plus rationnelle de nos composés, une étude de modélisation moléculaire (étude QSAR) a été réalisée à partir des composés de la Figure 40. La superposition de ces structures a permis de définir des zones d'interactions potentielles avec le récepteur, et de déterminer leur nature. Ces données nous ont permis de définir un « pharmacophore » virtuel d'antagoniste P2X<sub>7</sub>R (Figure 41) à partir duquel nous avons pu déterminer le score des différentes séries envisagées sur la base des zones d'interactions potentielles identifiées. Cette évaluation préalable a orienté nos décisions quant au développement des séries envisagées. En l'occurrence, l'ensemble des séries envisagées qui ont été évaluées sur ce modèle ont montré un score suffisamment élevé pour poursuivre leur développement.



Figure 41 : (a) superposition des antagonistes P2X<sub>7</sub>R décrits dans la littérature ; (b) pharmacophore défini à partir de l'étude QSAR (zones bleues : interactions hydrophobes ; zones vertes : liaisons hydrogènes potentielles).

### III-1- Conception de la série 1

Cette première série (Figure 42) s'inspire des composés de la littérature bâtis autour d'un cycle à cinq sommets (Figure 40).<sup>253-259</sup> En effet, parmi les pyroglutamides, peu de composés présentent un groupement volumineux sur l'atome d'azote cyclique.<sup>258,259</sup> La littérature décrit principalement de bonnes activités pour des groupements lipophiles de petite taille en cette position. Or, dans les autres séries, la présence de groupements aromatiques dans cette position permet d'aboutir à des antagonistes puissants. Nous avons donc souhaité développer une série de composés portant des groupements de type benzyle ou benzhydryle (substitués ou non par des halogènes) sur l'azote cyclique. Cela nous permettra de vérifier si le fait de mettre un groupement de ce type dans cette zone permet d'obtenir des interactions hydrophobes supplémentaires avec le récepteur. En effet, la majorité des composés de cette classe présentent une forte lipophilie qui laisse envisager un site actif hydrophobe et volumineux au vu de la taille de certains antagonistes. Au niveau de la fonction amide, nous conserverons un groupement phényle substitué en positions 2 et 4 par des chlores pour la majorité des composés, puisque ce motif apparaît important pour l'activité des molécules. Seules quelques modifications pour ce groupement seront effectuées en changeant la position des substituants, leur nombre, ou leur nature. Au niveau de la fonction amide en position 5 de la pyrrolidone, quelques modifications de la longueur de chaîne seront effectuées dans le but de déterminer la longueur optimale. La méthylation de l'atome d'azote de la fonction amide a également été envisagée. Ainsi, nous pourrons juger de l'importance d'un donneur de liaison hydrogène dans cette zone. Les composés seront synthétisés sous forme de mélanges racémiques. Cela nous permettra d'évaluer l'activité du mélange dans un premier temps, et de tester séparément les énantiomères des mélanges actifs ensuite, afin d'évaluer l'importance de la stéréochimie dans cette série. Ainsi, les résultats qui seront obtenus dans cette série nous servirons de base pour le développement des autres familles envisagées.


Figure 42 : Modulations envisagées dans la série 1.

### III-2- Conception de la série 2

Dans un deuxième temps, nous avons envisagé de synthétiser une série analogue à la première en remplaçant les groupements benzyles et benzhydryles par divers cycles aromatiques directement liés à l'atome d'azote lactamique. En comparaison avec le composé 46 de la littérature (Figure 40),<sup>258</sup> nous avons choisi d'introduire une diversité de groupements phényles différemment substitués, notamment par des halogènes. Cela nous permettra de vérifier si l'introduction de substituants à ce niveau permet de gagner en activité comme dans le cas du dérivé imidazole 42 (Figure 40) ou du composé ALIPX29 (Figure 39). Nous envisageons également d'introduire des hétérocycles azotés (pyridine, quinoléine) afin d'observer si la présence d'un tel groupement est bénéfique dans cette série. Ces groupements sont fréquemment retrouvés dans d'autres familles de molécules et permettent d'aboutir à des activités intéressantes. En plus de ces modifications, nous introduirons les mêmes motifs que ceux retrouvés dans la série 1. Cela nous permettra de comparer les résultats des deux séries et d'obtenir des informations quant à l'encombrement stérique et à la position la plus favorable pour ce groupement aromatique. Nous synthétiserons également le composé **21** de la littérature (Figure 27) portant un méthyle sur l'azote pyroglutamique.<sup>260</sup> Celui-ci nous servira de référence interne lors de nos tests biologiques, et également de point de comparaison avec la littérature.

### CONCEPTION

Au niveau de la fonction amide, nous réaliserons les mêmes modulations de longueur de chaîne que précédemment, toujours dans un but d'avoir une comparaison cohérente entre les résultats des deux séries, et également pour obtenir des informations sur le positionnement optimal de cette partie de la molécule pour son interaction avec le récepteur. Concernant le groupement lipophile porté par la fonction amide, un groupement 2,4-dichlorophényle sera présent sur la majorité des composés. Seules quelques molécules porteront un cycle aliphatique en comparaison avec la série des pyrazol-5-ones. En effet, certaines molécules comme les adamantanamides montrent de bonnes activités avec des cycles aliphatiques volumineux.<sup>249</sup> Tous les composés seront synthétisés sous forme de mélanges racémiques.



Figure 43 : Modulations envisagées dans la série 2.

### III-3- Conception de la série 3

La conception de cette troisième série (Figure 44) vise à étudier l'importance de la fonction amide, retrouvée classiquement dans les séries développées autour d'un hétérocycle azoté à cinq sommets (Figure 40), quant à l'activité vis-à-vis du récepteur. En effet, beaucoup d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R présentent une fonction amide dans leur structure. Cependant, dans le cas des triazoles et tétrazoles (Figure 24),<sup>253,254</sup> ainsi que pour les pyrazol-5-ones (Figure 39), nous constatons que même en l'absence de cette fonction amide il est possible d'aboutir à des composés actifs. Nous avons donc envisagé de remplacer cette fonction amide, par un « rétro-amide », un hydrazide, ou une amine. Cela nous permettra d'établir de nouvelles RSA concernant ce motif au sein de nos séries. En effet, la comparaison de ces trois types de « linker » pourrait nous apporter des informations quant au rôle de cette fonction dans les interactions avec le récepteur (positionnement des accepteurs et donneurs de liaisons hydrogènes), ainsi que sur l'orientation spatiale des groupements aromatiques ou aliphatiques portés par celle-ci. Dans le but de pouvoir comparer les trois premières séries entre elles, la série 3 sera complémentaire aux deux premières ; à savoir que les motifs introduits au niveau de l'azote du lactame seront les mêmes que précédemment (méthyle, phényles, benzyles), de même pour le groupement lipophile porté par la fonction amide (phényles différemment substitués), avec des longueurs de chaîne variables entre ce groupement et la pyrrolidone. De cette façon, nous serons en mesure de juger de l'importance de cette fonction, pour l'orientation optimale des différents groupements, et nous pourrons également savoir si, en l'absence d'un tel motif, la pyrrolidin-2-one est capable de jouer le rôle de linker central. Dans cette série, les voies de synthèse envisagées seront également racémisantes.

CONCEPTION



Figure 44 : Modulations envisagées dans la série 3.

### III-4- Conception de la série 4

La série 4 (Figure 45) a été conçue dans le but d'étudier l'impact d'une orientation privilégiée pour le groupe R1. En effet, le motif « urée » laisse supposer la possibilité de formation d'un pseudocycle à 6 sommets via une liaison hydrogène intramoléculaire formée entre l'hydrogène porté par l'atome d'azote de la fonction urée et le carbonyle de la pyrrolidin-2-one. De cette façon, nous espérons engendrer une orientation plus figée pour le groupement R1. En effet, il s'agit d'une méthode couramment utilisée permettant de minimiser l'énergie en bloquant la molécule dans sa conformation la plus stable. De cette façon, la diminution du nombre de conformations peut apporter une sélectivité vis-à-vis de la cible et influer sur l'activité de la molécule. Le développement de cette série nous permettra d'enrichir les RSA au niveau de cette partie de la molécule. D'une part, nous pourrons obtenir de nouvelles informations quant à l'orientation optimale du groupement R1. D'autre part, l'incorporation de cette fonction urée dans cette zone nous indiquera si la présence d'un donneur et d'un accepteur de liaisons hydrogènes permet des interactions supplémentaires avec le récepteur. De plus, ce motif urée pourrait engendrer un mode de liaison différent de ces molécules au niveau du récepteur. En effet, cette fonction mime le motif amide porté en position 5 de la pyrrolidin-2-one, et les groupements portés par ces deux fonctions sont de nature identique. Dans le but de pouvoir comparer les séries entre elles, nous limiterons le nombre de paramètres

### CONCEPTION

modifiés. En effet, la fonction amide sera conservée en tant que linker central puisqu'il s'agit du motif le plus couramment retrouvé dans les différentes séries et donnant lieu à de bonnes activités. Cela pouvant certainement être expliqué par la formation de liaisons hydrogènes avec le récepteur, ainsi que par une orientation optimale du groupement R2 au niveau du site de liaison. De la même façon que pour la fonction amide, les groupements R1 et R2 introduits seront ceux qui sont classiquement rencontrés, et déjà introduits dans nos séries précédentes. Pour la synthèse de ces composés, l'acide DL-pyroglutamique sera utilisé comme produit de départ afin d'obtenir ces composés sous forme de mélanges racémiques.



Figure 45 : Modulations envisagées dans la série 4.

### III-5- Conception de la série 5

La conception de la série 5 (Figure 46) repose sur les mêmes arguments que pour la série 4. En effet, la formation d'un bicycle de type 2,5,6,7-tetrahydro-3*H*-pyrrolo[2,1-c][1,2,4]triazol-3-one permettrait une rigidification de la structure, avec une orientation figée dans l'espace pour le motif R1, et légèrement différente de celle potentiellement obtenue dans la série 4. De plus, par analogie avec la série des triazoles et tétrazoles (Figure 24),<sup>253,254</sup> des interactions potentielles avec le site de liaison pourraient être apportées par les atomes d'azote du cycle triazole. De même, le groupement carbonyle porté par ce cycle (dans une position similaire à celle retrouvée dans la série 4) pourrait intervenir dans une liaison hydrogène avec le récepteur.

Un avantage supplémentaire de ce motif concerne les atomes d'azote du cycle qui permettent de diminuer la lipophilie. Cela pourrait être bénéfique pour les propriétés pharmacocinétiques des molécules dans l'optique d'un développement de cette série chez le vivant. Il est également important de noter que cette famille hétérocyclique à 2 cycles est totalement originale. Concernant les groupements R1 et R2 envisagés, nous nous sommes basés sur ceux donnant lieu aux meilleures activités dans la série des triazoles et tétrazoles.<sup>253,254</sup> Ceux-là étant similaires à ceux déjà envisagés dans les autres séries. De cette façon, la comparaison des RSA sera possible entre nos différentes séries. Au niveau du linker central, nous conserverons la fonction amide classiquement retrouvée pour le développement des premiers composés. Des modulations seront envisageables suite aux premiers résultats biologiques. L'acide DL-pyroglutamique sera employé comme matériel de départ dans le but d'obtenir les composés sous forme de mélanges racémiques.



Figure 46 : Modulations envisagées dans la série 5.

### III-6- Conception de la série 6

La conception de la série 6 (Figure 47) résulte d'une modification du bicycle 2,5,6,7tetrahydro-3*H*-pyrrolo[2,1-c][1,2,4]triazol-3-one de la série 5, en 6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[2,1c][1,2,4]triazol-3-ylamine. De cette façon, nous pourrions accéder à une nouvelle orientation dans l'espace du groupe R1, et ainsi définir une zone d'interaction optimale de ce motif avec le récepteur en comparant les différentes séries. En effet, au regard des différents antagonistes P2X<sub>7</sub>R décrits, diverses positions sont possibles pour ce groupe, et peu de modifications ont été réalisées à ce niveau dans les familles de dérivés pyroglutamiques décrites dans la littérature.<sup>258,259</sup> L'obtention de ces composés nous permettrait d'enrichir les connaissances concernant cette région de l'espace pour les interactions ligand - récepteur. De plus, cette modification de cycle permet d'avoir un donneur de liaison hydrogène supplémentaire porté par le triazole (groupe NH) à la place du carbonyle, accepteur de liaison hydrogène, retrouvé dans la série 5, tout en conservant les azotes cycliques pouvant donner lieu à d'autres interactions. Cette comparaison entre les deux séries serait intéressante pour la connaissance du site de liaison de nos molécules. De la même manière que pour la série 5, les groupes R1 et R2 envisagés sont ceux retrouvés dans la série des triazoles, et la fonction amide ne sera modifiée que sur la base des résultats biologiques. Dans cette série, les structures et la chimie sont originales, ce qui permet d'envisager une brevetabilité potentielle. La synthèse sera réalisée de façon à obtenir des mélanges racémiques pour chaque composé.



Figure 47 : Modulations envisagées dans la série 6.

### III-7- Conception de la série 7

La série 7 (Figure 49) a été conçue suite à l'observation de la formation de produits secondaires (Figure 48) de réaction lors de la synthèse des composés de la série 4 (*cf* Figure 45). En effet, après avoir isolé ces sous-produits, leur caractérisation nous a permis d'identifier la formation de dérivés de type hydantoïne par réarrangement du cycle pyroglutamique. Ce type de réarrangement a déjà été décrit dans la littérature, mais il est peu documenté et a été observé dans d'autres conditions réactionnelles que les nôtres.<sup>273</sup> Lors de l'analyse de ces structures, nous avons remarqué que celles-ci possèdent potentiellement les éléments structuraux nécessaires pour aboutir à des antagonistes P2X<sub>7</sub>R. De plus, l'orientation dans l'espace des groupements est similaire à celle des composés précédemment décrits. En effet, en étudiant les antagonistes P2X<sub>7</sub>R rapportés dans la littérature, nous avons constaté que plusieurs composés présentent une structure semblable à celle de nos sous-produits (*cf* composé **19** Figure 25, composé **24** Figure 28, composés **25** et **26** Figure 29, et composés **42** et **43** Figure 40).<sup>258,259</sup> De plus, ce type de structure est aisément modulable pour y greffer des groupements de différentes natures pour le développement de RSA.



Figure 48 : Structure générale des sous-produits identifiés lors de la synthèse des composés de la série 4.

Nous avons décidé de développer quelques composés dans cette série, dans le but d'établir les premières RSA et de poursuivre les pharmacomodulations en fonction des résultats biologiques. Pour ce faire, nous souhaitons faire varier quelques paramètres au niveau des éléments structuraux identifiés comme étant importants pour l'activité de nos composés. En position R1, nous comparerons l'influence d'un groupement phényle à celle d'un groupe isopropyle. De cette façon, nous saurons quel type de groupement (aryle ou alkyle) est le plus favorable dans cette position. Cela nous permettra également d'obtenir des informations sur l'encombrement stérique dans cette zone. Concernant le groupe R2, nous conserverons un motif 2,4-dichlorophényle pour les premiers composés. Au niveau de la fonction amide, nous ferons varier la taille de la chaîne afin d'en déduire la longueur optimale pour l'espacement des éléments pharmacophoriques.

<sup>&</sup>lt;sup>273</sup> Dieltiens, N. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *11*, 2649.

Quant au groupement R3 porté par l'azote cyclique, nous comparerons l'influence d'un méthyle (fréquemment rencontré en cette position dans les structures analogues) par rapport à un hydrogène. Cela, de façon à voir si cet hydrogène intervient dans une interaction avec le récepteur. Il est à noter, qu'à l'heure actuelle, aucun antagoniste P2X<sub>7</sub>R présentant un cycle de type hydantoïne dans sa structure n'a été décrit. Ces composés sont originaux, et de nouvelles interactions pourraient être obtenues grâce au carbonyle en  $\alpha$  du groupe R1, qui est absent dans les composés analogues de la littérature.



Figure 49 : Modulations envisagées dans la série 7.

Au total, sept séries chimiques ont été envisagées correspondant à des pharmacomodulations à différents niveaux. Concernant les 4 premières séries, elles possèdent toutes un hétérocycle commun à 5 sommets (la pyrrolidin-2-one), et les modulations qui seront réalisées sont les suivantes :

- Au niveau du substituant R1, des groupes de taille et de nature différentes seront greffés par différents spacer, ce qui permettra d'étudier l'importance de l'orientation de ce groupement dans l'espace.
- Au niveau du linker central (généralement de type amide), celui-ci sera conservé dans les premières séries, puis remplacé par une amine, un « rétro-amide », ou un hydrazide de façon à comparer l'impact de chaque fonction. Dans chaque cas, la longueur de la chaîne sera étudiée afin de déterminer la position optimale du groupement R2.
- Concernant ce groupement R2, un motif 2,4-dichlorophényle sera introduit pour la majorité des composés. Seuls quelques changements seront effectués de façon à voir s'il est possible d'obtenir de meilleures interactions à ce niveau.

Concernant les 3 dernières séries, les modulations envisagées se situent principalement au niveau du tenseur central :

- Chaque série présente un hétérocycle central différent. Cela nous permettra d'évaluer le rôle de chacun de ces motifs, et donc la pertinence de leur utilisation pour le développement de tels composés.
- Au niveau du linker central, la fonction amide sera conservée jusqu'aux premiers résultats biologiques, en fonction desquels, des pharmacomodulations pourront être envisagées. Seules quelques modifications de la longueur de la chaîne seront effectuées.
- Concernant les substituants R1 et R2, les groupes classiquement rencontrés dans la littérature seront introduits dans un premier temps. De la même manière que précédemment, des pharmacomodulations seront envisagées en fonction des premières évaluations pharmacologiques.

Ainsi, l'ensemble des pharmacomodulations qui seront réalisées nous permettrons d'établir un grand nombre de RSA à tous les niveaux du pharmacophore. Cette vue d'ensemble autour de ce motif central nous orientera dans la conception des futures séries. Il est à noter que l'évaluation pharmacologique de chaque série nous servira à orienter au mieux les pharmacomodulations dans les séries suivantes. CHAPITRE III :

## **STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 1**

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre précédent concernant la conception de nos différentes séries, sept familles chimiques ont été envisagées pour le développement d'antagonistes potentiels P2X<sub>7</sub>R. Dans ce chapitre, nous présenterons la stratégie de synthèse mise en place et appliquée pour le développement de la série 1 qui compte 20 composés finaux. Dans un premier temps, nous présenterons le schéma de synthèse global de cette série avec les différentes voies de synthèse envisagées. Puis, chacune de ces voies sera détaillée étape par étape, et les avantages et inconvénients de chacune seront discutés.

### I- Synthèse des composés de la série 1

Trois voies de synthèse ont été utilisées pour aboutir aux composés finaux envisagés. La première compte trois étapes et utilise l'acide pyroglutamique **48** comme réactif de départ. A partir de ce composé, une première étape consiste en une estérification pour aboutir au pyroglutamate de méthyle **49** (PGM). Cet intermédiaire est ensuite couplé à un groupement benzyle au niveau de l'azote lactamique par une réaction de substitution nucléophile. La dernière étape est une réaction d'aminolyse qui permet d'obtenir les produits cibles (Schéma 1).

Voie de synthèse 1



**Schéma 1.** Réactifs et conditions : (i) acide méthanesulfonique, tamis moléculaire 3Å, MeOH/CHCl<sub>3</sub>, reflux, 5 jours, 98% ; (ii) ArCH<sub>2</sub>Cl, NaH, THF, 0°C – T.A., 5 heures, 60 – 65% ; (iii) RNHR', acide *p*-toluène sulfonique monohydrate (APTS, H<sub>2</sub>O), CH<sub>3</sub>CN (1 mL/3 mmol), reflux, 20 – 120 heures, 44 – 96%.

La 2<sup>ème</sup> voie de synthèse a consisté en l'utilisation des acides pyroglutamiques *N*-benzylés disponibles au laboratoire. Ces composés sont directement obtenus par amination réductrice de l'acide glutamique, avec de très bons rendements. A partir de ces acides, deux méthodes de synthèse ont été étudiées. La première utilise des conditions de couplage de type peptidique par formation d'un ester activé en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). La seconde passe par la formation *in situ* d'un chlorure d'acide que l'on fait réagir avec l'amine appropriée (Schéma 2).

Voie de synthèse 2



*Schéma 2. Réactifs et conditions :* (*i*) RNH<sub>2</sub>, DCC, CH<sub>3</sub>CN (1 mL/2 mmol), T.A., 2 heures ; EtOAc/MeOH/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, T.A., 1 nuit, 28 – 38% ; ou (*ii*) (ClCO)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (10/1 v/v), T.A., 3 heures ; DIEA, RNH<sub>2</sub>, T.A., 1 nuit, 21 – 55%.

Une dernière voie de synthèse permet d'aboutir aux composés finaux comportant un motif benzhydryle au niveau de l'azote lactamique. Pour l'obtention de ces composés, une seule étape a été réalisée lors de nos travaux à partir des dérivés benzhydrylés déjà disponibles au laboratoire. Ces composés ont été obtenus par réaction entre le PGM silylé et les benzhydroles silylés correspondants.<sup>274</sup> Une fois cette étape réalisée une simple réaction d'aminolyse, dans les mêmes conditions que lors de la première voie de synthèse, permet d'obtenir les produits finaux souhaités (Schéma 3).

Voie de synthèse 3



Schéma 3. Réactifs et conditions : (i) RNH<sub>2</sub>, APTS, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN ou NMP (1 mL/3 mmol), reflux, 72 – 96 heures, 10 – 11%.

### II- Description des voies de synthèse

Dans cette partie, nous présenterons en détails les étapes de synthèse de chaque voie étudiée. Une discussion sera également faite concernant les avantages et inconvénients de chaque voie.

<sup>&</sup>lt;sup>274</sup> Bourry, A. et al. J. Heterocyclic Chem. **2002**, 39, 119.

### II-1- Description de la voie de synthèse 1

La synthèse des esters pyroglutamiques *N*-benzylés **50** à **52** utilisés lors de la dernière étape de cette voie d'accès aux composés souhaités ne sera pas présentée dans ce chapitre. Ces molécules ont été obtenues dans des conditions classiques décrites dans la littérature.<sup>275</sup>

### II-1-1- Synthèse du pyroglutamate de méthyle 49

Cette synthèse consiste en l'estérification de l'acide pyroglutamique **48**. Celle-ci est réalisée dans un mélange de méthanol et de chloroforme à reflux qui, en présence d'une quantité catalytique d'acide méthanesulfonique, conduit à l'azéotrope ternaire eau/méthanol/chloroforme au cours de la réaction et permet, par l'intermédiaire d'un soxhlet remplis de tamis moléculaire 3Å, d'éliminer l'eau formée.<sup>276</sup>



*Schéma 4. Réactifs et conditions :* (*i*) acide méthanesulfonique, tamis moléculaire 3Å, MeOH/CHCl<sub>3</sub>, reflux, 5 jours, 98%.

Cette réaction est aisément réalisée sur plusieurs kilos d'acide pyroglutamique (5 Kg) avec des rendements quasiment quantitatifs.

II-1-2- Synthèse des pyroglutamides N-benzylés 53 – 66 par aminolyse des esters pyroglutamiques N-benzylés 50 à 52

La synthèse des composés **53** – **66** consiste en une réaction d'aminolyse entre un ester méthylique (**50**, **51**, ou **52**) et l'amine désirée, introduite en excès, dans un milieu réactionnel très concentré en solution dans l'acétonitrile. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux en présence d'une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique (APTS,  $H_2O$ ) qui permet d'activer la réaction.

<sup>&</sup>lt;sup>275</sup> Mavromoustakos, T. et al. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 4353.

<sup>&</sup>lt;sup>276</sup> Cauliez, P. et al. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 1143.



*Schéma 5. Réactifs et conditions : (iii)* RNHR', APTS.H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN (1 mL/3 mmol), Reflux, 20 – 120 heures, 44 - 96%.

Ligne	N° produit <sup>(Litt.)</sup>	N° substrat	Ar	R	R'	Durée (h)	Rdt (%)
1	53	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	48	71
2	54	50	Ph	2-Cl-Bz	Н	48	82
3	55	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2-Cl-Bz	Н	48	66
4	56	50	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	48	60
5	57 <sup>(277)</sup>	50	Ph	Bz	Н	48	58
6	58	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Bz	Н	48	52
7	59	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	furan-2ylMe	Н	48	60
8	60	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Н	48	0
9	61	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-OMe <sub>2</sub> -Bz	Н	20	74
10	62	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2-OMe-Bz	Н	48	78
11	63	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Phénéthyle	e H 24		54
12	64	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Bz	Bz Me 120		67
13	65	51	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Me-pyridin-3yle	Н	72	96
14	66	52	4-NO <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	48	44

<sup>&</sup>lt;sup>277</sup> Zhao, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1647.

Cette méthode a été employée pour la synthèse de 14 des composés finaux envisagés. Seul le composé **60** (Tableau 1, ligne 8) n'a pas été obtenu dans ces conditions. En effet, il s'agit du seul exemple faisant intervenir une amine aromatique, la 2,4-dichloroaniline, moins réactive que les différentes benzylamines mises en réaction pour la synthèse des autres produits. Des conditions réactionnelles différentes sont donc nécessaires pour obtenir ce type de dérivés. Pour tous les autres composés, les rendements obtenus sont moyens voire très bons (44 – 96%). Cette voie de synthèse présente l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation d'agents de couplage parfois coûteux, et permet également l'obtention des composés avec des purifications aisées.

### II-2- Description de la voie de synthèse 2

L'activation de la fonction acide carboxylique sous forme d'ester activé ou de chlorure d'acide a aussi été étudiée dans le but de comparer les rendements avec ceux obtenus dans la méthode précédente.

### II-2-1- Synthèse des pyroglutamides N-benzylés 69 et 70 à partir de l'acide 67

Cette étape consiste à faire réagir une amine (aromatique ou aliphatique) avec l'acide carboxylique **67**. Pour la synthèse des composés **69** et **70**, l'agent de couplage utilisé est la dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Cet agent de couplage permet la formation d'un ester activé, plus réactif qu'un ester classique ou que l'acide carboxylique mis en réaction (Schéma 6). Dans les deux exemples traités, les réactions sont réalisées à température ambiante dans l'acétonitrile (Schéma 7) ; des conditions classiques retrouvées dans la littérature.<sup>278</sup>



Schéma 6. Mécanisme proposé de la réaction de couplage utilisant la DCC comme agent de couplage.

<sup>&</sup>lt;sup>278</sup> Snider, B. B. et al. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 793.



Schéma 7. Réactifs et conditions : (i)  $RNH_2$ , DCC,  $CH_3CN$  (1 mL/2 mmol), T.A., 2 heures ; (ii) EtOAc/MeOH/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, T.A., 1 nuit, 28 – 38%.

Tableau 2. Rendements obtenus pour les produits 69 et 70.

Ligne	N° produit	R	Rdt (%)
1	69	2-Cl-Bz	28
2	70	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	38

Les faibles rendements obtenus pour les composés **69** et **70** montrent la faible réactivité du dérivé d'acide pyroglutamique *N*-benzylé **67**, difficilement activé par la DCC. Cela nous a donc amené à étudier d'autres conditions réactionnelles.

### II-2-2- Synthèse des pyroglutamides N-benzylés 71 à 73 à partir des acides 67 et 68

Au vu de la faible réactivité de l'acide carboxylique **67**, nous avons étudié une autre méthode de synthèse des amides (Schéma 8). En effet, lorsque cela est possible, il est classique d'utiliser les chlorures d'acides comme espèces plus réactives dans les réactions d'amidification. Les composés **71** à **73** ont donc été obtenus à température ambiante dans le dichlorométhane (DCM), par réaction entre les différentes amines et les chlorures d'acides des dérivés **67** et **68** formés *in situ* en présence de chlorure d'oxalyle, et d'une quantité catalytique de diméthylformamide (DMF).<sup>277</sup>)



*Schéma 8. Réactifs et conditions :* (*i*) (CICO)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (10/1 *v/v*), T.A., 3 heures ; (*ii*) DIEA, RNH<sub>2</sub>, T.A., 1 nuit, 21 – 55%.

Ligne	N° produit	N° substrat	Ar	R	Rdt (%)
1	71	67	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	31
2	72	68	4-Cl-Ph	2-Cl-Bz	21
3	73	68	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	55

Tableau 3. Rendements obtenus pour les produits 71 à 73.

Les faibles rendements obtenus lors de ces réactions peuvent être expliqués par plusieurs facteurs. Tout d'abord, un défaut d'activation des acides **67** et **68** en chlorures d'acides dû au lot de chlorure d'oxalyle utilisé pour ces essais, ainsi qu'une probable instabilité des chlorures d'acides formés. D'autre part, les recristallisations effectuées dans l'acétonitrile ont certainement entraîné des pertes de produit non négligeables.

Après avoir comparé ces trois voies d'accès aux composés finaux *N*-benzylés envisagés, nous avons pu constater que les conditions réactionnelles permettant d'aboutir aux meilleurs rendements sont celles utilisées pour la voie 1. En effet, cette voie présente plusieurs avantages :

- Réaction réalisée sans agent de couplage (parfois coûteux)
- Réduction du nombre d'étape (il n'est pas nécessaire de saponifier l'ester)
- Purifications aisées

Suite à cette étude, et après avoir trouvé les conditions optimales d'amidification pour ce type de dérivés, nous avons choisi d'appliquer les conditions opératoires de la voie 1 à la synthèse des dérivés benzhydrylés (voie 3).

# II-3- Description de la voie de synthèse 3 : obtention des pyroglutamides benzhydrylés 76 et 77 par aminolyse des esters 74 et 75

Pour la synthèse de ces composés, des conditions réactionnelles identiques à celles de la voie 1 ont été appliquées à partir des dérivés **74** et **75** portant des groupements benzhydryles sur l'azote lactamique.



Schéma 9. Réactifs et conditions : (i) RNH<sub>2</sub>, APTS.H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN ou NMP (1 mL/3 mmol), reflux, 72 – 96 heures, 10 – 11%.

Tableau 4. Rendements obtenus pour les produits 76 et 77.

Ligne	N° produit	N° substrat	Ar	R	Solvant	Temp. °C	Durée (h)	Rdt (%)
1	76	74	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	$CH_3CN$	Reflux	96	11
2	77	75	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	NMP	150	72	10

Lors de la synthèse du composé **76** (Tableau 4, ligne 1), obtenu avec un rendement de seulement 11%, nous avons constaté une très faible réactivité de la fonction ester en comparaison avec celle des dérivés *N*-benzylés (Tableau 1). En effet, selon le groupement présent sur l'atome d'azote cyclique nous constatons un changement de réactivité de l'ester. Dans le but d'augmenter ces rendements, nous avons remplacé l'acétonitrile par la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) pour la synthèse du composé **77**; en utilisant un solvant dont le point d'ébullition est élevé nous pensions favoriser cette réaction. Cependant, un rendement similaire de 10% a été obtenu (Tableau 4, ligne 2). Il serait donc nécessaire de réaliser une étude similaire à celle menée pour les dérivés *N*-benzylés pour la synthèse de ces composés. En effet, l'utilisation de conditions de couplage de type peptidique ou la formation d'un chlorure d'acide pourrait, dans le cas présent, permettre une amélioration des rendements.

**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 1** 

### General chemistry

Starting materials are commercially available and were used without further purification. Melting points were measured on a MPA 100 OptiMelt<sup>®</sup> apparatus and are uncorrected. NMR spectra were acquired at 400 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 100 MHz for <sup>13</sup>C NMR on a Varian 400 MHz Premium Shielded<sup>®</sup> spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm relative to CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm; 77.1 ppm) or DMSO- $d_6$  (2.50 ppm; 39.52 ppm). Splitting patterns are designed as: s, singlet; br s, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; m, multiplet and sym m, symmetrical multiplet. Coupling constants *J* are reported in hertz (Hz). Thin layer chromatographies were performed on Macherey Nagel silica gel plates with a fluorescent indicator and were visualized with UV-lamp at 254 nm and 366 nm. Column chromatographies were performed using a Combi*Flash* Rf Companion (Teledyne-Isco System) and Redi*Sep* packed columns. IR spectra were recorded on a Varian 640-IR FT-IR Spectrometer. All compounds were analyzed by LC-MS on a HPLC combined with a Surveyor MSQ (Thermo Electron) equipped with an APCI-source. Elemental analyses (C, H, N) of new compounds were determined by "Pôle Chimie Moléculaire", Faculté de Sciences Mirande, Université de Bourgogne, Dijon, France.

### Experimental procedure for the synthesis of methyl pyroglutamate 49:



Reagents and conditions: (i) methanesulfonic acid, molecular sieves 3Å, MeOH/CHCl<sub>3</sub>, reflux, 5 days, 98%.

To a solution of pyroglutamic acid **48** (2150 g, 16.65 mol) in methanol (2.0 L) and chloroform (2.0 L), connected to a Soxhlet apparatus charged with 3Å molecular sieves (2.0 L), was added methanesulfonic acid (80 g, 0.83 mol). The mixture was then refluxed for 5 days with a mechanical agitation. The solution was evaporated under reduced pressure, to generate product **49** as a yellow oil sufficiently pure for the next step in 98% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>276</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.08-2.50 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.77 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.62 (br s, 1H, NH).

### General procedure for the synthesis of compounds 53 to 66 and 76 - 77:



*Reagents and conditions:* (*i*) R2NHR3, *p*-toluenesulfonic acid monohydrate,  $N_2$  atmosphere, CH<sub>3</sub>CN (1 mL/3 mmol), reflux, 20 – 120 hours, 10 – 96%.

A stirred mixture of a methyl pyroglutamate derivative (1.0 equiv), the appropriate amine (1.5 equiv), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (PTSA, H<sub>2</sub>O) (0.1 equiv) was refluxed in acetonitrile under nitrogen atmosphere for various periods (20 to 120 hours). Upon cooling to room temperature, the solution was diluted in dichloromethane (30 mL), and washed successively with 1M HCl (20 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (20 mL), and then water (20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was then purified by flash chromatography on silica pre-packed column, eluting DCM/MeOH in various proportions, or recrystallized from the appropriate solvent to give a pure product.

1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (53).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (2.00 g, 6.60 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.75 g, 9.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.66 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **53** as a yellowish powder in 71% yield; mp (DCM/MeOH) 93 – 96°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.21-2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.16 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.41 (dd, *J* = 14.8, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.47 (dd, *J* = 14.8, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.87 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.32 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.14 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H, ArH), 7.22 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.28 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 42.8 (CH<sub>2</sub>), 60.8 (CH), 127.4 (CH), 127.6 (CH), 129.4 (2CH), 131.4 (CH), 131.5 (CH), 131.9 (C), 133.6 (C), 134.3 (C), 134.4 (2C), 134.5 (C), 171.0 (C), 175.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 447.0 (MH<sup>+</sup>), tr 3.96 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 51.15; H, 3.61; N, 6.28. Found: C, 51.05; H, 3.54; N, 6.64%.

### 1-Benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide (54).



The general procedure was followed using 1-benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **50** (1.50 g, 6.40 mmol), 2-chlorobenzylamine (1.37 g, 9.60 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.12 g, 0.64 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **54** as a yellow oil in 82% yield;  $R_f$  (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.15-2.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, NCH<sub>2</sub>), 4.36 (dd, *J* = 14.7, 6.1 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.54 (dd, *J* = 14.7, 6.1 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 5.00 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.43 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.09 (m, 2H, ArH), 7.25 (m, 5H, ArH), 7.35 (m, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>), 60.6 (CH), 127.2 (CH), 127.9 (CH), 128.4 (2CH), 128.8 (2CH), 129.4 (CH), 129.7 (CH), 130.7 (CH), 133.7 (C), 135.0 (C), 135.7 (C), 171.0 (C), 175.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 343.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.35 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 66.57; H, 5.59; N, 8.17. Found: C, 66.72; H, 5.82; N, 7.88%.

### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide (55).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (3.00 g, 9.90 mmol), 2-chlorobenzylamine (2.11 g, 14.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.19 g, 0.99 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **55** as a white powder in 66% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 94 – 97°C, R<sub>*f*</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.21-2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.14 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.44 (dd, *J* = 14.7, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.52 (dd, *J* = 14.7, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.90 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.35 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.11 (m, 2H, Ar*H*), 7.27 (m, 3H, Ar*H*), 7.36 (m, 2H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 41.8 (CH<sub>2</sub>), 41.8 (CH<sub>2</sub>), 60.9 (CH), 127.2 (CH), 127.6 (CH), 129.4 (CH), 129.7 (CH), 130.8 (CH), 131.6 (CH), 132.0 (CH), 133.7 (C), 134.5 (C), 134.8 (C), 133.1 (C), 134.0 (C), 170.8 (C), 175.9 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 412.7 (MH<sup>+</sup>), tr 3.73 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.43; H, 4.16; N, 6.80. Found: C, 55.11; H, 4.45; N, 7.18%.

1-Benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (56).



The general procedure was followed using 1-benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **50** (2.50 g, 10.70 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (2.83 g, 16.00 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.20 g, 1.07 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **56** as a white powder in 60% yield; mp (DCM/MeOH) 135 – 136°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.19-2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.85 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.36 (dd, *J* = 14.8, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.48 (dd, *J* = 14.8, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.97 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.11 (m, 2H, ArH), 7.26 (m, 5H, ArH), 7.40 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>), 60.6 (CH), 127.2 (CH), 127.9 (CH), 128.4 (2CH), 128.8 (2CH), 129.4 (CH), 129.7 (CH), 130.7 (C), 133.7 (C), 135.0 (C), 135.7 (C), 171.0 (C), 175.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 378.0 (MH<sup>+</sup>), tr 3.61 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 60.49; H, 4.81; N, 7.43. Found: C, 60.10; H, 4.71; N, 7.69%.

### 1-Benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid benzylamide (57).



The general procedure was followed using 1-benzyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **50** (3.00 g, 12.90 mmol), benzylamine (2.07 g, 19.30 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.25 g, 1.29 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **57** as a white powder in 58% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>277</sup>

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 2.04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.18-2.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.86 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.31 (dd, *J* = 14.4, 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.45 (dd, *J* = 14.4, 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.99 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.21 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.13 (m, 2H, ArH), 7.22 (m, 2H, ArH), 7.30 (m, 6H, ArH).

1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid benzylamide (58).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (2.00 g, 6.60 mmol), benzylamine (1.06 g, 9.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.66 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **58** as a white powder in 52% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 133 – 135°C, R<sub>*f*</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.23-2.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.20 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.37 (dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.44 (dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.99 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.00 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.22 (m, 2H, ArH), 7.23 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 2H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.33 (m, 3H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 41.8 (CH<sub>2</sub>), 42.8 (CH<sub>2</sub>), 60.9 (CH), 127.2 (CH), 127.6 (CH), 129.4 (2CH), 129.7 (CH), 130.8 (CH), 131.6 (CH), 132.0 (CH), 133.7 (C), 134.4 (C), 134.5 (C), 134.8 (C), 170.8 (C), 175.9 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 378.3 (MH<sup>+</sup>), tr 3.56 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 60.49; H, 4.81; N, 7.43. Found: C, 60.14; H, 4.76; N, 7.79%.

1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (furan-2-ylmethyl)amide (59).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (3.00 g, 9.90 mmol), *C*-furan-2-ylmethylamine (1.45 g, 14.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.19 g, 0.99 mmol) in acetonitrile (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **59** as a black powder in 60% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 138 – 140°C, R<sub>*f*</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.24-2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.16 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.37 (dd, *J* = 13.5, 3.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.44 (dd, *J* = 13.5, 3.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.93 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.22 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CHCH), 6.32 (m, 2H, CHCH, CONHCH<sub>2</sub>), 7.17 (m, 2H, CHCH, ArH), 7.34 (m, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub>), 60.7 (CH), 107.8 (CH), 110.5 (CH), 127.5 (CH), 129.4 (CH), 131.5 (CH), 131.9 (CH), 134.4 (C), 134.5 (C), 142.3 (C), 150.7 (C), 170.8 (C), 175.9 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 368.2 (MH<sup>+</sup>), tr 3.36 min. Anal. calcd for C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 55.60; H, 4.39; N, 7.63. Found: C, 55.60; H, 4.46; N, 8.17%.

### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dimethoxybenzylamide (61).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (1.50 g, 4.96 mmol), 2,4-dimethoxybenzylamine (1.25 g, 7.45 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.09 g, 0.50 mmol) in acetonitrile (2 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **61** as a white powder in 74% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 194 – 196°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.5.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.19-2.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.30 (dd, *J* = 13.5, 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.36 (dd, *J* = 13.5, 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.92 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.10 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.45 (m, 2H, ArH), 7.10 (m, 2H, ArH), 7.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.6 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub>), 55.4 (CH<sub>3</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>), 61.0 (CH), 98.7 (CH), 104.0 (CH), 117.9 (CH), 127.5 (CH), 129.3 (CH), 130.8 (CH), 131.6 (C), 132.0 (C), 134.3 (C), 134.5 (C), 158.5 (C), 160.8 (C), 170.2 (C), 175.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 438.4 (MH<sup>+</sup>), tr 3.61 min. Anal. calcd for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 57.68; H, 5.07; N, 6.41. Found: C, 57.51; H, 5.21; N, 6.26%.

### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-methoxybenzylamide (62).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (2.00 g, 6.60 mmol), 2-methoxybenzylamine (1.36 g, 9.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.66 mmol) in acetonitrile (2 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **62** as a white powder in 78% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 143 – 146°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.20-2.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.58 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.37 (dd, *J* = 13.9, 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.44 (dd, *J* = 13.9, 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.93 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.37 (dd, *J* = 13.9, 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.93 (m, 2H, ArH), 7.08 (m, 1H, ArH), 7.28 (m, 4H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.6 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub>), 55.3 (CH<sub>3</sub>), 61.0 (CH), 110.4 (CH), 120.8 (CH), 125.4 (CH), 127.5 (CH), 129.3 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 131.6 (C), 131.9 (C), 134.3 (C), 134.5 (C),157.5 (C), 170.4 (C), 175.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 408.3 (MH<sup>+</sup>), tr 3.63 min. Anal. calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>20</sub>G; C, 58.98; H, 4.95; N, 6.88. Found: C, 58.80; H, 4.99; N, 6.56%.

### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid phenethylamide (63).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (2.00 g, 6.60 mmol), phenethylamine (1.20 g, 9.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.66 mmol) in acetonitrile (2 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **63** as a yellow powder in 54% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 149 – 151°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.18-2.50 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.81 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.53 (td, *J* = 6.8, 5.5 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.06 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.88 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 5.86 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.16 (m, 4H, ArH), 7.23-7.35 (m, 4H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 42.7 (CH<sub>2</sub>), 60.8 (CH), 126.7 (CH), 127.6 (CH), 128.7 (2CH), 128.8 (2CH), 129.4 (CH), 131.4 (CH), 132.0 (C), 134.4 (C), 134.5 (C), 138.3 (C), 170.9 (C), 175.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 392.3 (MH<sup>+</sup>), tr 3.66 min. Anal. calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 61.39; H, 5.15; N, 7.16. Found: C, 61.25; H, 5.41; N, 7.03%.

### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid benzylmethylamide (64).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (1.50 g, 4.96 mmol), *N*-methylbenzylamine (2.10 g, 17.40 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.33 g, 1.74 mmol) in acetonitrile (2 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 120 h. The residue was recrystallized from acetonitrile to give pure product **64** as a white powder in 67% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 131 – 134°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.4/0.6) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.97-2.07 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.19-2.32 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.41 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.86 (dd, *J* = 9.6, 3.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.89 (s, 2H, NCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4.16 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 5.00 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 7.19 (m, 2H, ArH), 7.31-7.41 (m, 6H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 24.0 (CH<sub>2</sub>), 30.1 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>3</sub>), 42.8 (CH<sub>2</sub>), 52.5 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH), 127.5 (CH), 129.1 (2CH), 129.3 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (2CH), 130.7 (CH), 131.8 (C), 133.2 (C), 133.9 (C), 134.3 (C), 176.1 (C), 177.6 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 391.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.70 min. Anal. calcd for  $C_{20}H_{20}Cl_2N_2O_2$ : C, 61.39; H, 5.15; N, 7.16. Found: C, 61.06; H, 5.42; N, 6.83%.

### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (pyridin-3-ylmethyl)amide (65).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **51** (1.50 g, 4.96 mmol), *C*-pyridin-3-yl-methylamine (0.75 g, 6.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.14 g, 0.74 mmol) in acetonitrile (2 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 72 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (98.5/1.5) to generate pure product **65** as a yellow oil in 96% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.23-2.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.13 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.42 (dd, *J* = 5.9, 1.6 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.88 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 7.13 (m, 2H, ArH), 7.17 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.26 (m, 1H, ArH), 7.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 8.48 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 42.8 (CH<sub>2</sub>), 60.8 (CH), 127.7 (CH), 129.5 (2CH), 131.4 (2CH), 131.8 (CH), 134.4 (CH), 134.5 (C), 135.9 (C), 148.9 (C), 149.2 (C), 171.2 (C), 175.9 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 378.1 (MH<sup>+</sup>), tr 2.68 min. Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 57.16; H, 4.53; N, 11.11. Found: C, 57.44; H, 4.78; N, 11.13%.

1-(4-Nitrobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (66).



The general procedure was followed using 1-(4-nitrobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **52** (1.50 g, 5.40 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.42 g, 8.10 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.10 g, 0.54 mmol) in acetonitrile (2 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **66** as a white powder in 44% yield; mp (DCM/MeOH) 191 – 193°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.9/0.1) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.07 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.32 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.44 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.61 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.83 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.98 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.43 (dd, *J* = 14.4, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 5.03 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.30 (m, 3H, ArH), 7.41 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.11 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.3.7 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 41.5 (CH<sub>2</sub>), 45.3 (CH<sub>2</sub>), 60.9 (CH), 124.1 (2CH), 127.7 (CH), 129.1 (2CH), 129.7 (CH), 131.9 (CH), 133.5 (C), 134.5 (C), 135.0 (C), 143.4 (C), 147.7 (C), 170.6 (C), 175.9 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 422.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.64 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 54.04; H, 4.06; N, 9.95. Found: C, 54.32; H, 4.32; N, 9.74%.

1-Benzhydryl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (76).



The general procedure was followed using 1-benzhydryl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **74** (1.00 g, 3.20 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.71 g, 9.70 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.06 g, 0.32 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 96 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting *n*-heptane/EtOAc (50/50 to 40/60) to generate pure product **76** as a white powder in 11% yield; R<sub>*f*</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.98-2.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.74 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (dd, *J* = 14.4, 5.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.08 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 5.62 (br s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.52 (s, 1H, NCH), 7.04 (m, 3H, ArH), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.19-7.35 (m, 9H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.8 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>), 60.1 (CH), 60.4 (CH), 127.3 (2CH), 127.4 (CH), 127.6 (CH), 128.3 (CH), 128.7 (2CH), 128.8 (2CH), 129.5 (CH), 130.1 (2CH), 131.5 (CH), 133.6 (C), 134.3 (C), 134.4 (C), 138.1 (C), 138.7 (C), 171.7 (C), 176.2 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 453.1 (MH<sup>+</sup>), tr 4.39 min. Anal. calcd for C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 66.23; H, 4.89; N, 6.18. Found: C, 66.52; H, 4.92; N, 5.78%.

### 1-[Bis-(4-chlorophenyl)methyl]-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (77).



The general procedure was followed using 1-[bis-(4-chlorophenyl)methyl]-5-oxopyrrolidine-2carboxylic acid methyl ester **75** (2.00 g, 5.30 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.40 g, 7.90 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.10 g, 0.53 mmol) in *N*-methyl-pyrrolidone (4 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 150°C for 72 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (100/0 to 98/2) to generate pure product **77** as a brown powder in 10% yield;  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.71 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.95 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.04 (dd, *J* = 14.8, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.12 (dd, *J* = 14.8, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 5.45 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.35 (s, 1H, NCH), 6.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.20 (m, 3H, ArH), 7.27 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 2H, ArH), 7.37 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.5 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 59.2 (CH), 60.4 (CH), 127.6 (CH), 128.8 (3CH), 128.9 (3CH), 129.5 (CH), 131.1 (2CH), 131.6 (CH), 133.1 (C), 133.7 (C), 134.3 (C), 134.4 (C), 134.6 (C), 136.2 (C), 136.9 (C), 170.6 (C), 175.9 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 523.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.95 min. Anal. calcd for C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 57.50; H, 3.86; N, 5.36. Found: C, 57.28; H, 3.86; N, 5.72%.

General procedure for the synthesis of compounds 69 and 70:



*Reagents and conditions:* (*i*) RNH<sub>2</sub>, DCC, CH<sub>3</sub>CN (1 mL/2 mmol), r.t., 2 hours; (*ii*) EtOAc/MeOH/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, r.t., 1 night, 28 – 38%.

A mixture of 1-(2-chloro-benzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid **67** (1.0 equiv), the appropriate amine (1.0 equiv), and dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1.1 equiv), in acetonitrile (4 mL) was stirred at room temperature for 2 hours. The solution was filtered to remove dicyclohexylurea, and the filtrate was evaporated to dryness. Methanol (2 mL), ethyl acetate (2 mL), and saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aqueous solution (1 mL) were added, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was diluted in dichloromethane (30 mL), and then washed successively by 1M HCl (20 mL), 10% aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), and water (20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was then purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH.

1-(2-Chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide (69).



The general procedure was followed using 1-(2-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid **67** (2.00 g, 7.90 mmol), 2-chlorobenzylamine (1.12 g, 7.90 mmol), and DCC (1.80 g, 8.70 mmol) in acetonitrile (4 mL). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **69** as a yellow oil in 28% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.17-2.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.13 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.43 (dd, *J* = 14.8, 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.50 (dd, *J* = 14.8, 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.94 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.78 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.14 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H, ArH), 7.20 (m, 3H, ArH), 7.32 (m, 3H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 41.4 (CH<sub>2</sub>), 43.1 (CH<sub>2</sub>), 60.4 (CH), 127.0 (CH), 127.1 (CH), 128.9 (CH), 129.1 (CH), 129.5 (CH), 129.6 (CH), 129.9 (CH), 130.2 (CH), 133.2 (C), 133.4 (C), 133.7 (C), 135.2 (C), 171.2 (C), 175.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 378.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.47 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 60.49; H, 4.81; N, 7.43. Found: C, 60.50; H, 4.79; N, 7.79%.

### 1-(2-Chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (2,4-dichlorophenyl)amide (70).



The general procedure was followed using 1-(2-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid **67** (2.00 g, 7.90 mmol), 2,4-dichloroaniline (1.28 g, 7.90 mmol), and DCC (1.80 g, 8.70 mmol) in acetonitrile (4 mL). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **70** as a white powder in 38% yield; mp (DCM/MeOH) 141 – 144°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.33-2.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.66 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.07 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.37 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 5.06 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 7.22 (m, 3H, ArH), 7.33 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.78 (s, 1H, CONH), 8.19 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH).
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 23.8 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 61.5 (CH), 123.0 (CH), 124.2 (C), 127.4 (CH), 127.9 (CH), 128.9 (CH), 129.5 (CH), 129.7 (CH), 130.1 (C), 131.1 (CH), 132.4 (C), 133.1 (C), 134.0 (C), 169.6 (C), 175.6 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 398.7 (MH<sup>+</sup>), tr 3.78 min. Anal. calcd for  $C_{18}H_{15}Cl_3N_2O_2$ : C, 54.36; H, 3.80; N, 7.04. Found: C, 54.86; H, 4.11; N, 6.86%.

# General procedure for the synthesis of compounds 71 to 73:



*Reagents and conditions:* (*i*) (CICO)<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> atmosphere,  $CH_2CI_2/DMF$  (10/1 v/v), r.t., 3 hours; (*ii*) DIEA, RNH<sub>2</sub>, r.t., 1 night, 21 – 55%.

A mixture of oxalyl chloride (1.3 equiv), pyroglutamic acid derivative (1.0 equiv), and a catalytic amount of DMF in dichloromethane (3 mL), was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 3 hours. Diisopropylamine (DIEA) (3.0 equiv) and the appropriate amine (1.2 equiv) were then added, and the mixture was stirred overnight. The solution was diluted in dichloromethane, and washed successively with 1M HCl (20 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> solution (20 mL), and then water (20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was then recrystallized from acetonitrile to give a pure product.

1-(2-Chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (71).



The general procedure was followed using 1-(2-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid **67** (1.00 g, 3.90 mmol), and oxalyl chloride (0.64 g, 5.10 mmol) in dichloromethane/DMF (3 mL/0.3 mL). After 3 hours of stirring at room temperature, 2,4-dichlorobenzylamine (0.82 g, 4.68 mmol), and DIEA (1.51 g, 12.00 mmol) were added and the stirring was prolonged overnight. The residue was recrystallized from acetonitrile to generate pure product **71** as a white powder in 31% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 157 – 159°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.23-2.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH), 2.58 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.22 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.41 (dd, *J* = 13.3, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.47 (dd, *J* = 13.3, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.97 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.25 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.17-7.24 (m, 4H, ArH), 7.31 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 60.8 (CH), 127.3 (CH), 127.5 (CH), 129.4 (CH), 129.5 (CH), 129.7 (CH), 130.6 (CH), 131.5 (CH), 133.2 (C), 133.9 (C), 134.3 (C), 134.4 (C), 171.2 (C), 175.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 412.7 (MH<sup>+</sup>), tr 3.70 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.43; H, 4.16; N, 6.80. Found: C, 55.32; H, 4.23; N, 7.14%.

1-(4-Chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide (72).



The general procedure was followed using 1-(4-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid **68** (2.00 g, 7.90 mmol), and oxalyl chloride (1.50 g, 11.90 mmol) in dichloromethane/DMF (3 mL/0.3 mL). After 3 hours of stirring at room temperature, 2-chlorobenzylamine (1.57 g, 11.00 mmol), and DIEA (3.06 g, 23.70 mmol) were added and the stirring was prolonged overnight. The residue was recrystallized from acetonitrile to generate pure product **72** as a white powder in 21% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 86 – 89°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.17-2.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.42 (dd, *J* = 14.4, 6.1 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.55 (dd, *J* = 14.4, 6.1 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.94 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.05 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.28 (m, 2H, ArH), 7.34 (m, 1H, ArH), 7.41 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 41.8 (CH<sub>2</sub>), 45.0 (CH<sub>2</sub>), 60.6 (CH), 127.3 (CH), 129.0 (2CH), 129.5 (CH), 129.7 (CH), 129.8 (2CH), 130.8 (CH), 133.7 (C), 133.8 (C), 134.2 (C), 134.8 (C), 170.7 (C), 175.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 378.0 (MH<sup>+</sup>), tr 3.58 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 60.49; H, 4.81; N, 7.43. Found: C, 60.17; H, 4.86; N, 7.50%.

1-(4-Chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (73).



The general procedure was followed using 1-(4-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid **68** (2.00 g, 7.90 mmol), and oxalyl chloride (1.50 g, 11.90 mmol) in dichloromethane/DMF (3 mL/0.3 mL). After 3 hours of stirring at room temperature, 2,4-dichlorobenzylamine (1.94 g, 11.00 mmol), and DIEA (3.06 g, 23.70 mmol) were added and the stirring was prolonged overnight. The residue was recrystallized from acetonitrile to generate pure product **73** as a white powder in 55% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 146 – 147°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.23-2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH), 2.55 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.83 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 4.38 (dd, *J* = 14.7, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.48 (dd, *J* = 14.7, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.91 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 6.25 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.26 (m, 2H, ArH), 7.41 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 45.1 (CH<sub>2</sub>), 60.6 (CH), 127.5 (CH), 129.0 (2CH), 129.5 (CH), 129.7 (2CH), 131.5 (CH), 133.6 (C), 133.9 (C), 134.2 (C), 134.3 (C), 134.5 (C), 170.9 (C), 175.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 412.7 (MH<sup>+</sup>), tr 3.81 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.43; H, 4.16; N, 6.80. Found: C, 55.33; H, 3.73; N, 7.30%.

CHAPITRE IV :

# **STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 2**

Comme pour la série 1 (pyroglutamides *N*-benzylés ou *N*-benzhydrylés) présentée dans le chapitre précédent, deux voies de synthèse ont été étudiées pour le développement de la série 2 (pyroglutamides *N*-arylés) ; cela dans le but d'optimiser les rendements globaux pour l'obtention des composés finaux envisagés. Nous présenterons dans un premier temps, le schéma global des deux voies de synthèse étudiées. Puis, chaque voie sera présentée séparément et détaillée étape par étape. Nous discuterons des avantages et inconvénients de chacune, de façon à argumenter les choix effectués lors du développement de cette série qui compte 17 molécules finales.

# I- Synthèse des N-aryle-pyroglutamides de la série 2

La stratégie de synthèse utilisée est illustrée dans le Schéma 10, et utilise le PGM dont la synthèse a été décrite au chapitre précédent. Dans une première voie de synthèse (voie 1), une *N*-arylation du PGM est suivie d'une réaction d'aminolyse de la fonction ester. La voie 2 suit l'ordre inverse.



Schéma 10. Voies de synthèse développées pour l'obtention des composés de la série 2.

# II- Description des voies de synthèse

Dans cette partie, nous présenterons en détails les étapes de synthèse de chaque voie étudiée. La synthèse du PGM **49** ayant déjà été présentée dans le chapitre précédent,<sup>276</sup> celle-ci ne sera pas détaillée dans ce chapitre.

# II-1- Description de la voie de synthèse 1

Cette voie de synthèse fait d'abord intervenir une réaction de *N*-arylation sur le PGM, avant de faire réagir une amine sur la fonction ester du pyroglutamate *N*-arylé.



Schéma 11. Etapes de synthèse de la voie 1.

# II-1-1- N-arylation du PGM : synthèse des composés 80 à 93

Les couplages de type Buchwald permettent de procéder à la *N*-arylation des amides et des lactames ;<sup>279</sup> dans notre cas, ces réactions ont été réalisées sur le PGM. Cette réaction consiste à faire réagir un halogénure d'aryle et un dérivé azoté, en présence d'une base et d'un catalyseur au palladium. Ces conditions réactionnelles pour la formation de liaisons *N*-*C* ont été largement étudiées, ce qui a notamment permis de remplacer les catalyseurs palladiés (coûteux et toxiques) par des catalyseurs au cuivre.<sup>280,281</sup> A partir des données de la littérature, une étude a été conduite au laboratoire dans le but d'optimiser les conditions de *N*-arylation sur le PGM.<sup>282</sup>

Cette étude a permis de montrer que l'utilisation de la *N,N'*-diméthyléthylènediamine (DMEDA) en tant que ligand, en présence d'iodure de cuivre (I) comme catalyseur, de carbonate de césium en tant que base en solution dans le dioxane, donnait lieu aux meilleurs résultats.<sup>282</sup> Ces

<sup>&</sup>lt;sup>279</sup> Guram, A. S. et al. Angew. Chem. Int. Ed. **1995**, 34, 1348.

<sup>&</sup>lt;sup>280</sup> Surry, D. S. et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2008**, 47, 6338.

<sup>&</sup>lt;sup>281</sup> Haldon, E. et al. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 8298.

<sup>&</sup>lt;sup>282</sup> Ghinet, A. et al. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 215.

conditions ont donc été appliquées pour la synthèse des composés **80** à **93** en utilisant divers aromatiques bromés ou iodés.



*Schéma 12. Réactifs et conditions :* (*i*) Ar-X, CuI, *N*,*N'*-DMEDA,  $Cs_2CO_3$ , dioxane, 60°C à 100°C, 4 – 112 h, 0 – 90%.

Ligne (littérature)	N° produit	Ar-X	Temp. °C	Durée (h)	Conversion <sup>a</sup> (Rdt) <sup>b</sup> %
1 <sup>(282)</sup>	80		60	4	>95 (90)
2 <sup>(283)</sup>	81	CI - Br	60	24	>95 (60)
3 <sup>(282)</sup>	82	NC - Br	60	12	>95 (70)
4 <sup>(282)</sup>	83	O-Br	60	12	>95 (85)
5	84	HO – Br	60	112	N.D. (25)
6	85	CI CI	60	4	>95 (65)
7	86	O-Br	100	40	65 (50)
8 <sup>c</sup>	87	Cl - Cl - Br	60	50	60 (45)
9 <sup>(282)</sup>	88	CF <sub>3</sub> Br	60	5	>95 (90)
10 <sup>d</sup>	89	CI Br	60	30	50 (30)
11 <sup>e(284)</sup>	90	N Br	100	5	>95 (75)
12	91	S I	60	24	85 (65)
13	92	Br	60	24	>95 (80)
14	93	Br	100	48	0

 Tableau 5. Rendements obtenus pour les produits 80 à 93.

<sup>a</sup> La conversion de la réaction est déterminée par RMN <sup>1</sup>H ; <sup>b</sup> Les rendements sont donnés en pourcentage de produit pur isolé ; <sup>c</sup> Lors de cette synthèse le composé **78** a également été isolé avec un rendement de 3% ; <sup>d</sup> Lors de cette synthèse le composé **79** a également été isolé avec 2,5 équivalents de carbonate de césium.

 <sup>&</sup>lt;sup>283</sup> Phillips, D. P. et al. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7293.
 <sup>284</sup> Mitra, A. W. et al. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6580.

En appliquant les conditions optimisées pour l'arylation du PGM, tous les composés envisagés ont été obtenus avec des rendements moyens à excellents variant de 25 à 90%, à l'exception du composé 93 (Tableau 5, ligne 14) qui n'a pas pu être obtenu. L'interprétation des résultats présentés dans ce tableau nous a permis de tirer plusieurs conclusions pour cette réaction. Tout d'abord, il semble que l'encombrement stérique ait une influence importante tant au niveau de la cinétique de la réaction, qu'au niveau de son avancement. En effet, dans le cas du bromure de mésitylène comportant deux groupes méthyles en position ortho (composé 93) (Tableau 5, ligne 14), aucune réaction n'est observée ; avec les composés 86, 87, et 89 (Tableau 5, lignes 7, 8, et 10), la conversion n'est pas totale et la cinétique est beaucoup plus lente que dans les autres cas. Il semble également que cette réaction soit plus favorable lorsque les substituants portés par le groupe aryle sont des donneurs d'électrons. En effet, si on compare les temps de réaction pour les composés 81 et 83 (Tableau 5, lignes 2 et 4), on remarque que la réaction est plus rapide lorsque le substituant en para est un méthoxy (cas du composé 83) en comparaison au chlore du composé 81. Une autre constatation intéressante est l'identification des composés 78 et 79 obtenus lors de la synthèse des composés 87 et 89 (Tableau 5, lignes 8 et 10), et qui résultent de l'arylation du ligand utilisé. Ce phénomène, déjà rencontré,<sup>284</sup> peut être expliqué par la cinétique lente observée lors de ces réactions. Un autre problème se situe au niveau du traitement de ces milieux réactionnels. Le fait de réaliser des lavages de la phase organique par une solution aqueuse peut entraîner, dans certains cas, l'hydrolyse de la fonction ester du fait de la présence de carbonate de césium. Cela explique certaines différences entre le rendement déterminé par RMN, et le rendement en produit pur isolé.

# II-1-2- Synthèse des composés finaux 94 à 108 par réaction d'aminolyse des esters pyroglutamiques N-arylés 80 à 93

Cette étape consiste en une réaction d'aminolyse réalisée sur les esters pyroglutamiques *N*arylés **80** à **93**. Par rapport au même type de réaction réalisée sur les esters pyroglutamiques *N*benzylés **50** à **52**, nous avons remarqué une plus faible réactivité de la fonction ester. Cela souligne le fait que la réactivité de cette fonction varie avec la nature des groupes présents sur l'azote lactamique. Nous avons donc étudié différentes conditions dans le but d'améliorer les rendements pour la synthèse de ces produits ; elles sont indiquées dans le Schéma 13 ci-dessous.



**Schéma 13.** Réactifs et conditions : (i) : (a) RNH<sub>2</sub>, APTS.H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 80°C, 48 – 170 h, 0 – 79%; ou (b) RNH<sub>2</sub>, HCl (37%), 110°C, 190 h, 23%; ou (c) RNH<sub>2</sub>, APTS.H<sub>2</sub>O, toluène, reflux, 160 h, 10%; ou (d) RNH<sub>2</sub>, ZrCl<sub>4</sub>, toluène, reflux, 50 – 160 h, 72 – 80%.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	R	Catalyseur / solvant	Temp. °C	Durée (h)	Rdt (%)
1	83	94	4-MeO-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	90	20
2	80	95	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	110	60
3	88	96	3-CF <sub>3</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	110	21
4	87	97	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH <sub>3</sub> CN	80	100	35
5	80	98	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Phénéthyl	APTS / CH₃CN	80	120	79
6	80	99	Ph	Méthylcyclohexyl	APTS / CH₃CN	80	120	13
7	81	100	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	48	39
8	82	101	4-CN-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	170	16
9	85	102	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	150	0
10	91	103	Thiophèn- 2-yl	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	APTS / CH₃CN	80	150	0
11	85	104	3,5-Cl₂-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	APTS / CH₃CN	80	150	0
12	91	103	Thiophène- 2-yl	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	HCI / sans solvant	110	190	23

# Tableau 6. Rendements obtenus pour les produits 94 à 108.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	R	Catalyseur / solvant	Temp. °C	Durée (h)	Rdt (%)
13	80	105	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	APTS / Toluène	110	160	10
14	90	106	4-Pyridyl	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	ZrCl₄ / Toluène	110	50	75
15	92	107	Quinoléin- 5-yl	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	ZrCl₄ / Toluène	110	100	72
16	89	108	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	ZrCl₄ / Toluène	110	160	80

La méthode « a » utilisant l'APTS comme catalyseur et l'acétonitrile pour solvant (Tableau 6, lignes 1 à 11) a permis d'obtenir les amides **94** à **101**. Cependant, les rendements observés sont moyens dans l'ensemble (13 à 79%), voire nuls pour les composés **102** à **104** (Tableau 6, lignes 9 à 11). De plus, la cinétique de ces réactions est très lente, puisqu'on observe des durées comprises entre 90 et 170 heures. Une optimisation de cette réaction a donc été nécessaire, et trois autres méthodes ont été étudiées dans le but de trouver un couple catalyseur /solvant efficace.

La méthode « b » qui utilise l'HCl comme catalyseur n'a été employée que pour la synthèse du composé **103** (Tableau 6, ligne 12) dont la tentative de préparation par la méthode « a » (Tableau 6, ligne 10) s'était soldée par un échec. En effet, le rendement de 23% obtenu dans ces conditions s'avère une méthode plus efficace que la première. Cependant, celui-ci reste faible, et la lente cinétique de réaction (190 heures) montre que ces conditions peuvent être améliorées.

La méthode « c », dans laquelle le catalyseur utilisé est l'APTS et le solvant est le toluène, n'a été appliquée qu'une fois également. Elle a permis la synthèse du composé **105** (Tableau 6, ligne 13) avec un faible rendement de 10%. Cependant, en comparaison à la méthode « a », elle permet de montrer que l'utilisation d'un solvant à plus haut point d'ébullition favorise la réaction.

Enfin, la méthode « d » (ZrCl<sub>4</sub> / Toluène) a permis une nette amélioration des rendements (Tableau 6, lignes 14 à 16). Sur la base des premiers essais, le toluène a été utilisé comme solvant. Le catalyseur a également été changé pour utiliser le chlorure de zirconium(IV), puisque différentes études ont récemment montré que cet acide de Lewis pouvait être utilisé dans ce type de réaction.<sup>285</sup> L'hypothèse émise concernant l'augmentation des rendements se situe donc principalement au niveau du catalyseur. Contrairement à l'APTS ou à l'HCl, le chlorure de zirconium(IV) serait plus affin pour l'oxygène du carbonyle que pour l'azote de l'amine. Celui-ci se complexerait à l'oxygène pour rendre le carbonyle plus électrophile, sans désactiver l'amine contrairement aux catalyseurs qui protonent l'amine (comme HCl ou APTS) et empêchent la réaction en diminuant sa nucléophilie.

Cette première voie de synthèse s'est donc révélée efficace pour l'obtention des esters pyroglutamiques *N*-arylés (*cf* Tableau 5). Cependant, les difficultés rencontrées lors de la dernière étape de la voie de synthèse 1 nous ont amenés à développer une seconde stratégie.

# II-2- Description de la voie de synthèse 2

Cette voie de synthèse fait intervenir les mêmes réactions que la première, à la différence que la réaction d'aminolyse est réalisée sur le PGM lors d'une première étape, puis l'amide pyroglutamique est mis en réaction dans un couplage de type Buchwald. Cela présente l'avantage de pouvoir réaliser la première étape sur des quantités de matière importantes, à partir du PGM et de la 2,4-dichlorobenzylamine (groupement présent dans la plupart des composés envisagés), pour pouvoir greffer différents groupements aryles sur l'azote lactamique lors d'une dernière étape, et ainsi diminuer le nombre de réactions.



Schéma 14. Etapes de synthèse de la voie 2.

<sup>&</sup>lt;sup>285</sup> Lanigan, R. M. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 7453.

# II-2-1- Aminolyse du PGM : synthèse des composés 109 à 112

Pour la synthèse de ces composés, la réaction est réalisée sans solvant à une température comprise entre 100 et 120°C. Le PGM permet de jouer ce rôle en solubilisant à chaud les différentes amines mises en réaction. Le catalyseur utilisé dans le cas de ces substrats est l'APTS.H<sub>2</sub>O.



*Schéma 15. Réactifs et conditions : (i)* RNH<sub>2</sub>, APTS.H<sub>2</sub>O, 100 – 120°C, 20 – 90 h, 50 – 90%.

Ligne (littérature)	N° produit	R	Temp. °C	Durée (h)	Rdt (%)
1	109	2-Cl-Bz	100	20	90
2	110	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	100	24	90
3	111	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	120	90	50
4 <sup>(286)</sup>	112	4-Me-Ph	100	24	85

 Tableau 7. Rendements obtenus pour les produits 109 à 112.

Les amides **109**, **110** et **112** (Tableau 7, lignes 1, 2, et 4) ont été obtenus avec de très bons rendements. Une nette différence est observée pour le composé **111** (Tableau 7, ligne 3), dont la synthèse fait intervenir une amine aromatique, moins réactive qu'une amine aliphatique. Une fois de plus, les différences observées entre les résultats présentés dans les tableaux 6 et 7, tant en termes de rendement qu'au niveau de la durée des réactions, montrent que la réactivité de l'ester méthylique est fonction de la substitution de l'azote lactamique.

L'utilisation du chlorure de zirconium(IV) dans les réactions d'aminolyse de la voie 1 a été réalisée ultérieurement à la synthèse des composés **109** à **112** de la voie 2 et n'a donc pas été utilisée ici.

<sup>&</sup>lt;sup>286</sup> Rigo, B. et al. J. Heterocycl. Chem. **1995**, 32, 1599.

# *II-2-2- Synthèse de l'amide 114 : forme racémique du composé 21 de la littérature*

Pour la synthèse de ce composé, des conditions similaires à celles utilisées précédemment ont été appliquées. La réaction est réalisée sans solvant à 120°C en présence d'APTS, à partir du *N*méthyl pyroglutamate de méthyle **113** précédemment synthétisé au laboratoire.<sup>287</sup>



Schéma 16. Réactifs et conditions : (i) 2,4-dichloro-benzylamine, APTS monohydrate, N<sub>2</sub>, 120°C, 24 h, 80%.

L'amide **114** est obtenu avec des temps de réaction et des rendements similaires aux composés **109**, **110**, et **112** (Tableau 7). Ce composé nous permettra d'avoir une référence interne lors des tests pharmacologiques réalisés sur nos composés ; il nous permettra aussi de comparer notre méthode de tests à celles de la littérature.

# II-2-3- Synthèse des composés 102, 104, et 115 – 116 par arylation des amides pyroglutamiques

Pour la synthèse de ces produits nous avons employé la même méthode que celle présentée précédemment pour l'arylation du PGM.<sup>282</sup> En effet, ces conditions de réaction optimisées permettent d'éviter des réactions secondaires de *N*-arylation de la fonction amide. De plus, ces réactions ont été réalisées à température ambiante, ce qui représente des conditions très douces pour ce type de couplage. Le solvant utilisé est le 1,4-dioxane, à température ambiante en présence de DMEDA, d'iodure de cuivre, et de carbonate de césium.



*Schéma 17. Réactifs et conditions : (i)* Ar-I, CuI, *N*,*N*'-DMEDA, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-dioxane, T.A., 24 – 48 h, 0 – 70%.

<sup>&</sup>lt;sup>287</sup> Kolocouris, N. Bull. Soc. Chim. Fr. **1973**, *3*, 1053.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	R	Durée (h)	Conversion <sup>ª</sup> (Rdt) <sup>b</sup> %
1	110	102	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	48	30 (25)
2	111	104	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	48	0
3	112	115	Ph	4-Me-Ph	24	50 (35)
4	109	116	Ph	2-CI-Bz	27	85 (70)

#### Tableau 8. Rendements obtenus pour les produits 102, 104, 115, et 116.

<sup>a</sup> La conversion de la réaction est déterminée par RMN.

<sup>b</sup> Les rendements sont donnés en pourcentage de produit pur isolé.

Toutes ces réactions ont été suivies par RMN, et stoppées uniquement lorsque celles-ci n'avançaient plus. Cette méthode nous a donc permis d'obtenir le composé **102** (Tableau 8, ligne 1) qui n'avait pas pu être obtenu par amidification du *N*-(3,5-dichlorophényl)pyroglutamate de méthyle **85** (Tableau 6, ligne 9). Nous avons également synthétisé les composés **115** et **116** (Tableau 8, lignes 3 et 4). Cependant, le rendement obtenu pour le composé **115** est relativement faible. De même que l'absence de réaction dans le cas du composé **104** (Tableau 8, ligne 2) montre que ces conditions de réaction doivent être optimisées pour ce type de substrat.

Si nous comparons les deux voies de synthèse employées pour le développement de cette série, nous remarquons que la voie 2 (faisant intervenir une réaction d'aminolyse sur la fonction ester du PGM, puis un couplage de type Buchwald sur les dérivés pyroglutamides) est tout à fait intéressante pour la synthèse d'une famille chimique possédant un même amide substitué, puisqu'elle permet de diminuer le nombre d'étape. De plus, cette voie d'accès est originale et souligne la sélectivité de la réaction puisqu'aucun produit secondaire de *N*-arylation de l'amide n'a été obtenu. Cependant, les rendements modérés obtenus soulignent qu'une optimisation des conditions est nécessaire.

Concernant la voie 1, l'amélioration des rendements de la dernière étape par l'utilisation du chlorure de zirconium(IV) rend cette voie tout à fait intéressante puisque les deux étapes sont réalisées avec de bons rendements. Cependant, une étude plus large impliquant le chlorure de zirconium devra être menée ; cela dans le but de valider son rôle dans l'optimisation des conditions.

**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 2** 

### General procedure for the synthesis of compounds 80 to 92:



Reagents and conditions: (i) Ar-X, Cul, N,N'-DMEDA, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxane, 60°C to 100°C, 4 – 112 h, 25 – 90%.

A suspension of coupling substrate (methyl pyroglutamate **49**) (2 equiv), copper (I) iodide (0.5 equiv), cesium carbonate (2-2.5 equiv), and the corresponding aryl halide (1 equiv) in 1,4-dioxane was placed under nitrogen atmosphere. The coupling ligand (N,N'-dimethylethylenediamine (DMEDA)) (1 equiv) was added dropwise with a syringe. The mixture was then stirred at a temperature between 60 to 100°C for various periods of time (4 – 112 h). The mixture got blue very quickly (this color corresponds to the complex copper–ligand formation) and the catalytic cycle started. All insoluble salts deposited after cooling to room temperature were collected by filtration, and then washed with dichloromethane. The resulting filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was partitioned between water and dichloromethane. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/n-heptane or DCM/MeOH) to afford pure compounds (**80** to **92**).

Methyl 1-phenylpyroglutamate (80).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (20.00 g, 140.0 mmol), iodobenzene (14.28 g, 70.0 mmol), cesium carbonate (45.61 g, 140.0 mmol), copper (I) iodide (6.67 g, 35.0 mmol), and DMEDA (7.5 mL, 70.0 mmol) in dioxane (120 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 4 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **80** as a white solid in 90% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>282</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.11-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.39-2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.65-2.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.73 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.74 (dd, *J* = 9.0, 3.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar*H*), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar*H*), 7.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar*H*).

Methyl 1-(4-chlorophenyl)pyroglutamate (81).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-4chlorobenzene (2.68 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 24 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (4/6) to generate pure product **81** as a white solid in 60% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>283</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) 2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.46-2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.66-2.80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.73 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.71 (dd, *J* = 9.2, 3.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.33 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, Ar*H*), 7.42 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, Ar*H*).

# Methyl 1-(4-cyanophenyl)pyroglutamate (82).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 4bromobenzonitrile (2.55 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 12 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (4/6) to generate pure product **82** as a white solid in 70% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>282</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) 2.20-2.28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.74-2.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.77 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.78 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.66 (m, 4H, Ar*H*).

# Methyl 1-(4-methoxyphenyl)pyroglutamate (83).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-4methoxybenzene (2.62 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 12 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **83** as a white solid in 85% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>282</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) 2.08-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.45-2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.67-2.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.66 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH).

# Methyl 1-(4-hydroxyphenyl)pyroglutamate (84).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-4hydroxybenzene (2.42 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 112 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (6/4) to generate pure product **84** as a brown solid in 25% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 140 – 142°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 5/5) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.07-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.48-2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.72-2.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.63 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.14 (br s, 1H, OH), 6.78 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.24 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 52.6 (CH<sub>3</sub>), 62.9 (CH), 116.2 (2CH), 125.5 (2CH), 129.9 (C), 154.8 (C), 172.3 (C), 175.2 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>: C, 61.27; H, 5.57; N, 5.95. Found: C, 61.36; H, 5.83; N, 5.66%.

# Methyl 1-(3,5-dichlorophenyl)pyroglutamate (85).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-3,5-dichlorobenzene (3.16 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 4 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (4/6) to generate pure product **85** as a white solid in 65% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 84 – 86°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.08-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.45-2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.77 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.70 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.16 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.2 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH<sub>3</sub>), 61.2 (CH), 119.4 (2CH), 125.4 (CH), 135.4 (2C), 140.2 (C), 171.7 (C), 174.3 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 288.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.58 min. Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>: C, 50.02; H, 3.85; N, 4.86. Found: C, 49.94; H, 4.14; N, 4.79%.

# Methyl 1-(2,4-dimethoxyphenyl)pyroglutamate (86).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-2,4-dimethoxybenzene (3.04 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 100°C for 40 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **86** as a white solid in 50% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 105 – 107°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.10-2.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.46-2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.59-2.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.68 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>), 4.67 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.46-6.53 (m, 2H, ArH), 7.29 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.4 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>), 55.6 (CH<sub>3</sub>), 61.5 (CH), 99.5 (CH), 104.5 (CH), 118.4 (C), 130.7 (CH), 1455.7 (C), 160.4 (C), 170.7 (C), 175.6 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 280.2 (MH<sup>+</sup>), tr 2.90 min. Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>: C, 60.21; H, 6.14; N, 5.02. Found: C, 59.87; H, 6.50; N, 4.84%.





The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-2,4-dichlorobenzene (3.16 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 50 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **87** as a yellow oil in 45%; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 5/5) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.26-2.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54-2.78 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.71 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.71 (dd, *J* = 8.7, 3.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.30 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.8 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 52.6 (CH<sub>3</sub>), 61.1 (CH), 128.1 (CH), 130.1 (CH), 132.2 (CH), 133.0 (C), 133.3 (C), 134.8 (C), 171.9 (C), 175.1 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>: C, 50.02; H, 3.85; N, 4.86. Found: C, 50.36; H, 3.83; N, 5.26%.



A secondary reaction of *N*-coupling between the starting bromide derivative and the ligand furnished the *N*-arylated compound (*N-(2,4-dichlorophenyl)-N,N'-dimethylethane-1,2-diamine*) **78** as a yellow oil in 3% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.31 (br s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.79 (m, 4H, CH<sub>3</sub>NH), 3.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.17 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 41.2 (CH<sub>3</sub>), 45.5 (CH<sub>3</sub>), 53.5 (CH<sub>2</sub>), 56.7 (CH<sub>2</sub>), 122.0 (CH), 127.4 (CH), 130.3 (CH), 127.8 (C), 129.3 (C), 148.4 (C). Anal. calcd for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: C, 51.52; H, 6.05; N, 12.02. Found: C, 51.16; H, 5.93; N, 12.00%.

## Methyl 1-(3-trifluoromethylphenyl)pyroglutamate (88).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-3trifluoromethylbenzene (2.39 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 5 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (6/4) to generate pure product **88** as a white solid in 90% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>282</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) 2.20-2.28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50-2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.76-2.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.75 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.78 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.47 (dd, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 2H, ArH), 7.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.79 (s, 1H, ArH).

# Methyl 1-(2-chlorophenyl)pyroglutamate (89).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1-bromo-2chlorobenzene (2.68 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 30 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **89** as a beige solid in 30% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 67 – 68°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.23-2.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.52-2.77 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.71 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.74 (dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.31 (m, 2H, ArH), 7.46 (m, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ (ppm) 23.8 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 52.5 (CH<sub>3</sub>), 61.4 (CH), 127.7 (CH), 129.6 (CH), 130.3 (CH), 131.3 (CH), 132.1 (C), 134.6 (C), 172.1 (C), 175.1 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>3</sub>: C, 56.82; H, 4.77; N, 5.52. Found: C, 56.61; H, 4.81; N, 5.54%.



A secondary reaction of *N*-coupling between the starting bromide derivative and the ligand furnished the *N*-arylated compound (*N*-(*2*-chlorophenyl)-*N*,*N'*-dimethylethane-1,*2*-diamine) **79** as a yellow oil in 10% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.49 (br s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.77 (m, 4H, CH<sub>3</sub>NH), 3.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.99 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.14 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.22 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.37 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 34.52 (CH<sub>3</sub>), 41.78 (CH<sub>3</sub>), 47.57 (CH<sub>2</sub>), 52.80 (CH<sub>2</sub>), 122.16 (CH), 124.46 (CH), 127.63 (CH), 129.64 (C), 130.66 (CH), 148.92 (C). Anal. calcd for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>: C, 60.45; H, 7.61; N, 14.10. Found: C, 60.52; H, 7.81; N, 13.92%.

# Methyl N-1-(pyridin-4-yl)pyroglutamate (90).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 1bromopyridine hydrochloride (2.72 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (11.38 g, 35.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 100°C for 5 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (96/4) to generate pure product **90** as an orange oil in 75% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>284</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.15-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.43-2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.68-2.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.76 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.79 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.51 (s, 2H, Ar*H*), 8.53 (br s, 2H, Ar*H*). Methyl 1-(thiophen-2-yl)pyroglutamate (91).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 2iodothiophene (2.93 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 24 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (4/6) to generate pure product **91** as a brown solid in 65% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 91 – 92°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.21-2.30 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.48-2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.73-2.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.77 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.71 (dd, *J* = 9.4, 2.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.46 (dd, *J* = 4.0, 1.2 Hz, 1H, ArH), 6.85 (dd, *J* = 5.5, 4.0 Hz, 1H, ArH), 6.95 (dd, *J* = 5.5, 1.2 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.0 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 51.4 (CH<sub>3</sub>), 61.9 (CH), 117.6 (CH), 117.7 (C), 128.4 (CH), 133.1 (CH), 171.7 (C), 176.8 (C). Anal. calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S: C, 53.32; H, 4.92; N, 6.22; S, 14.23. Found: C, 53.28; H, 4.81; N, 6.54; S, 14.19%.

Methyl 1-(quinolin-5-yl)pyroglutamate (92).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (4.00 g, 28.0 mmol), 5bromoquinoline (2.91 g, 14.0 mmol), cesium carbonate (9.12 g, 28.0 mmol), copper (I) iodide (1.33 g, 7.0 mmol), and DMEDA (1.51 mL, 14.0 mmol) in dioxane (30 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 60°C for 24 h. The residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (4/6) to generate pure product **92** as a white solid in 80% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 124 – 127°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.31-2.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.65-2.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.80-2.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.63 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.73 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.47 (dd, *J* = 8.6, 3.9 Hz, 1H, Ar*H*), 7.50 (s, 1H, Ar*H*), 7.73 (dd, *J* = 8.6, 7.5 Hz, 1H, Ar*H*), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar*H*), 8.21 (s, 1H, Ar*H*), 8.94 (dd, *J* = 4.3, 1.6 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 24.1 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 61.8 (CH), 121.5 (CH), 125.4 (CH), 128.9 (CH), 130.3 (2CH), 135.0 (2C), 149.0 (C), 150.8 (CH), 172.0 (2C). Anal. calcd for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 66.66; H, 5.22; N, 10.36. Found: C, 66.83; H, 5.52; N, 10.28%.

General procedure for the synthesis of compounds 94 to 108:



*Reagents and conditions:* (*i*): (*a*) RNH<sub>2</sub>, PTSA monohydrate, CH<sub>3</sub>CN, 80°C, 48 – 170 h, 13 – 79%; or (*b*) RNH<sub>2</sub>, HCl (37%), 110°C, 190 h, 23%; or (*c*) RNH<sub>2</sub>, PTSA monohydrate, toluene, reflux, 160 h, 10%; or (*d*) RNH<sub>2</sub>, ZrCl<sub>4</sub>, toluene, reflux, 50 – 160 h, 72 – 80%.

## <u>Method a:</u>

A mixture of methyl pyroglutamate derivative (**80** to **92**) (1.0 equiv), the appropriate amine (1.5 equiv), *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.1 equiv), and acetonitrile (4 mL) was stirred under reflux for 48 to 150 hours. After cooling to room temperature, the solution was diluted in dichloromethane (25 mL), and washed successively by 1N HCl (10 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (10 mL) and then water (10 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was then purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH or EtOAc/*n*-heptane in various proportions, or recrystallized to give pure product (**94** to **101**).

1-(4-Methoxyphenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (94).



The general procedure was followed using methyl 1-(4-methoxyphenyl)pyroglutamate **83** as substrate (1.50 g, 6.0 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.59 g, 9.0 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.11 g, 0.6 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 90 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (8/2) to generate pure product **94** as a white solid in 20% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 154 – 158°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.15-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.48-2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.65-2.76 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.34 (dd, *J* = 14.7, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.47 (dd, *J* = 14.7, 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.60 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.14 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, ArH), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.08 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.5 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH<sub>2</sub>), 40.9 (CH<sub>2</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>), 63.6 (CH), 114.4 (2CH), 123.3 (2CH), 127.2 (CH), 129.3 (CH), 130.6 (C), 130.7 (CH), 133.5 (C), 134.0 (C), 134.1 (C), 157.5 (C), 171.2 (C), 174.5 (C). Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 58.03; H, 4.61; N, 7.12. Found: C, 58.26; H, 4.62; N, 6.88%.

5-Oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (95).



The general procedure was followed using methyl 1-phenylpyroglutamate **80** as substrate (1.50 g, 6.8 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.80 g, 10.2 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.7 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 110 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (98/2) to generate pure product **95** as a yellow solid in 60% yield; mp (DCM/MeOH) 128 – 129°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.18-2.27 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.52-2.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.72-2.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.34 (dd, *J* = 15.2, 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.48 (dd, *J* = 15.2, 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.70 (dd, *J* = 8.6, 4.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.18 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.07 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, ArH), 7.45 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.6 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 40.9 (CH<sub>2</sub>), 63.2 (CH), 121.2 (2CH), 125.8 (CH), 127.3 (CH), 129.3 (2CH), 129.4 (CH), 130.6 (CH), 133.4 (C), 134.0 (C), 134.2 (C), 137.7 (C), 171.2 (C), 174.6 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 59.52; H, 4.44; N, 7.71. Found: C, 59.32; H, 4.14; N, 7.72%.

5-Oxo-1-(3-trifluoromethylphenyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (96).



The general procedure was followed using methyl 1-(3-trifluoromethylphenyl)pyroglutamate **88** as substrate (1.40 g, 3.8 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.00 g, 5.7 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.06 g, 0.4 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 110 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (100/0 to 85/15) to generate pure product **96** as a beige solid in 21% yield; mp (DCM/MeOH) 120 – 124°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.15-2.29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.52-2.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.74-2.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.36 (dd, *J* = 14.7, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.48 (dd, *J* = 14.7, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.70 (dd, *J* = 8.9, 3.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.38 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.11 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.28 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.39-7.44 (m, 2H, ArH), 7.60-7.65 (m, 1H, ArH), 7.76-7.79 (sym m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (CH<sub>2</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 62.9 (CH), 117.5 (q, *J* = 3.9 Hz, CH), 122.1 (q, *J* = 3.9 Hz, CH), 123.6 (q, *J* = 272.1 Hz, C), 123.9 (CH), 127.4 (CH), 129.8 (CH), 131.1 (CH), 131.6 (q, *J* = 32.0 Hz, C), 133.1 (CH), 134.05 (C), 134.5 (C), 138.35 (C), 170.5 (C), 174.7 (C). Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 52.92; H, 3.51; N, 6.50. Found: C, 53.06; H, 3.28; N, 6.47%.

1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (97).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **87** as substrate (0.60 g, 2.1 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (0.55 g, 3.1 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.04 g, 0.2 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 100 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (100/0 to 90/10) to generate pure product **97** as a yellow solid in 35% yield; mp (DCM/MeOH) 114 – 116°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.22-2.33 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.46-2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.67-2.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.38 (sym m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.55 (dd, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.16 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.12 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, ArH), 7.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.35 (m, 1H, ArH), 7.42 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.8 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 63.0 (CH), 127.4 (CH), 128.2 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 130.2 (CH), 131.0 (C), 131.2 (CH), 132.5 (C), 133.2 (C), 134.2 (C), 134.5 (C), 134.7 (C), 170.2 (C), 175.1 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.03; H, 3.27; N, 6.48. Found: C, 49.60; H, 3.20; N, 6.42%.

5-Oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid [2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-amide (98).



The general procedure was followed using 5-oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **80** as substrate (1.50 g, 6.8 mmol), 2-(2,4-dichlorophenyl)ethylamine (1.94 g, 10.2 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.7 mmol) in acetonitrile (8 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 120 h. The residue was recrystallized from DCM/diethyl ether (1/4) to generate pure product **98** as a beige solid in 79% yield; mp (DCM/diethyl ether) 175 – 178°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.11-2.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.45-2.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 4.61 (dd, *J* = 8.5, 3.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.83 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.04 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.21 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.36 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.8 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>), 38.9 (CH<sub>2</sub>), 63.1 (CH), 120.8 (2CH), 125.6 (CH), 127.3 (CH), 129.3 (2CH), 129.5 (CH), 131.5 (CH), 133.2 (C), 134.4 (C), 134.6 (C), 137.9 (C), 171.2 (C), 174.6 (C). Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 60.49; H, 4.81; N, 7.43. Found: C, 60.52; H, 4.72; N, 7.42%.

5-Oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid cyclohexylmethylamide (99).



The general procedure was followed using 5-oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **80** as substrate (1.50 g, 6.8 mmol), cyclohexylmethylamine (1.17 g, 10.3 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.13 g, 0.7 mmol) in acetonitrile (8 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 120 h. The residue was recrystallized from DCM/diethyl ether (1/4) to generate pure product **99** as a beige solid in 13% yield; mp (DCM/diethyl ether) 171 – 174°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 0.65-0.80 (m, 2H, *CH*<sub>2</sub>), 1.03-1.20 (m, 3H, 2*CH*<sub>2</sub>), 1.22-1.28 (sym m, 1H, *CH*), 1.51-1.76 (m, 5H, 3*CH*<sub>2</sub>), 2.04-2.13 (m, 1H, *CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*CH*), 2.23 (sym m, 2H, CONHC*H*<sub>2</sub>), 2.31-2.40 (m, 1H, *CH*<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.44-2.53 (m, 1H, *CH*<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55-2.67 (m, 1H, *CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>CH), 4.44 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H, *CH*<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.15 (br s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.28-7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 24.0 (2CH<sub>2</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>), 30.1 (2CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 36.1 (CH), 45.4 (CH<sub>2</sub>), 63.9 (CH), 120.0 (2CH), 124.4 (CH), 128.8 (2CH), 139.3 (C), 175.3 (C), 177.8 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 71.97; H, 8.05; N, 9.33. Found: C, 72.26; H, 8.15; N, 9.18%.
1-(4-Chlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (100).



The general procedure was followed using 1-(4-chlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **81** as substrate (1.00 g, 3.9 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.04 g, 5.9 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.08 g, 0.8 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99.5/0.5) to generate pure product **100** as a white powder in 39% yield; mp (DCM/MeOH) 124 – 126°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.13-2.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.64-2.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.34 (dd, *J* = 15.2, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.46 (dd, *J* = 15.2, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.61 (dd, *J* = 8.8, 4.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.35 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H,CONHCH<sub>2</sub>), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.12 (dd, *J* = 8.0, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, ArH), 7.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.6 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 63.3 (CH), 122.4 (2CH), 127.4 (CH), 129.4 (2CH), 129.5 (CH), 131.0 (CH), 131.2 (C), 133.4 (C), 134.2 (C), 134.5 (C), 136.4 (C), 170.9 (C), 174.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 397.0 (MH<sup>+</sup>), tr 3.77 min. Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 54.36; H, 3.80; N, 6.68. Found: C, 54.60; H, 4.08; N, 6.36%.

1-(4-Cyanophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (101).



The general procedure was followed using 1-(4-cyanophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **82** as substrate (0.80 g, 3.3 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (0.87 g, 4.9 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.06 g, 0.7 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was then stirred at 80°C for 170 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99.5/0.5) to generate pure product **101** as a white powder in 16% yield; mp (DCM/MeOH) 185 – 188°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.13-2.22 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.45-2.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.73-2.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CON*H*CH<sub>2</sub>), 4.37 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.45 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.16 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar*H*), 7.63 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.4 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>), 62.3 (CH), 108.0 (C), 118.4 (C), 120.6 (2CH), 127.2 (CH), 129.3 (CH), 131.0 (CH), 133.0 (2CH), 133.4 (C), 134.1 (C), 134.3 (C), 142.0 (C), 170.8 (C), 175.3 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 388.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.50 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 58.78; H, 3.89; N, 10.82. Found: C, 59.06; H, 4.08; N, 10.66%.

#### Method b for the synthesis of compound 103:

A mixture of methyl pyroglutamate derivative **91** (1.0 equiv), the appropriate amine (2.0 equiv), and a catalytic amount of a 12N HCl solution, was stirred at 110°C for 190 hours. After cooling to room temperature, the solution was diluted in dichloromethane (20 mL), and washed successively by 1N HCl (10 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (10 mL) and then water (10 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was then purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH to generate pure product **103**. 5-oxo-1-thiophen-2-ylpyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (103).



The general procedure was followed using 5-oxo-1-thiophen-2-ylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **91** as substrate (0.40 g, 1.8 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (0.63 g, 3.6 mmol), and 12N HCl (3.3  $\mu$ L). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (97.5/2.5) to generate pure product **103** as a brown powder in 23% yield; mp (DCM/MeOH) 156 – 159°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.24-2.35 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.52-2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.66-2.80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.39 (dd, *J* = 15.7, 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.52 (dd, *J* = 15.7, 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.63 (dd, *J* = 9.2, 2.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.43 (dd, *J* = 3.9, 1.2 Hz, 1H, ArH), 6.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.80 (dd, *J* = 5.5, 3.9 Hz, 1H, ArH), 6.91 (dd, *J* = 5.5, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.14 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.9 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 63.5 (CH), 112.2 (CH), 119.2 (C), 123.9 (CH), 127.3 (CH), 129.4 (CH), 130.8 (CH), 133.4 (CH), 134.1 (C), 134.2 (C), 138.8 (C), 170.6 (C).

### Method c for the synthesis of compound 105:

A mixture of methyl pyroglutamate derivative **80** (1.0 equiv), the appropriate amine (2.0 equiv), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.05 equiv), was stirred in toluene (1 mL) under reflux for 160 hours. After cooling to room temperature, the solution was diluted in dichloromethane (20 mL), and washed successively by 1N HCl (10 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (10 mL) and then water (10 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was then purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane, then recrystallized form acetonitrile to generate pure product **105**.

5-Oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid (2,4-dichlorophenyl)amide (105).



The general procedure was followed using 5-oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **80** as substrate (1.00 g, 4.6 mmol), 2,4-dichloroaniline (1.48 g, 9.2 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.04 g, 0.2 mmol) in toluene (1 mL). The mixture was then stirred under reflux for 160 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (3/7 to 4/6), and then recrystallized from acetonitrile to generate pure product **105** as blue crystalls in 10% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 178 – 181°C, *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.7. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.28-2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.59-2.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.73-2.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.21 (m, 2H, Ar*H*), 7.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar*H*), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.56 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 2H, Ar*H*), 7.97 (br s, 1H, CON*H*), 8.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.9 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH<sub>2</sub>), 63.5 (CH), 121.4 (2CH), 122.7 (CH), 124.1 (C), 126.1 (CH), 127.9 (CH), 128.8 (CH), 129.4 (2CH), 130.1 (C), 132.3 (C), 137.5 (C), 169.4 (C), 174.5 (C).

### Method d for the synthesis of compounds 106 to 108:

A mixture of methyl pyroglutamate derivative (1.0 equiv), the appropriate amine (2.0 equiv), and zirconium(IV) chloride (0.05 equiv), was stirred in toluene under reflux for various periods (50 to 160 hours). After cooling to room temperature, the solution was evaporated under reduce pressure. The residue was then purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH, and then recrystallized from acetonitrile to generate pure product.

5-Oxo-1-pyridin-4-ylpyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (106).



The general procedure was followed using 5-oxo-1-pyridin-4-ylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **90** as substrate (1.00 g, 4.5 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.60 g, 9.0 mmol), zirconium(IV) chloride (0.05 g, 0.2 mmol) in toluene (2.5 mL). The mixture was then stirred under reflux for 50 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (95/5), and then recrystallized from acetonitrile to generate pure product **106** as a white powder in 75% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 208 – 211°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.96-2.04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.37-2.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.56-2.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.35 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.88 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.40 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, ArH), 7.62 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.48 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, ArH), 8.98 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.4 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 60.5 (CH), 113.5 (2CH), 127.8 (CH), 129.2 (CH), 131.0 (CH), 133.0 (C), 133.7 (C), 135.5 (C), 145.6 (C), 150.7 (2CH), 171.2 (C), 175.9 (C).

5-Oxo-1-quinolin-5-ylpyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (107).



The general procedure was followed using 5-oxo-1-quinolin-5-ylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **92** as substrate (1.00 g, 3.7 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.30 g, 7.4 mmol), zirconium(IV) chloride (0.06 g, 0.3 mmol) in toluene (3 mL). The mixture was then stirred under reflux for 100 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (95/5), and then recrystallized from acetonitrile to generate pure product **107** as a white powder in 72% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 209 – 212°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.35-2.45 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50-2.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.87-2.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.17 (dd, *J* = 14.4, 5.2 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.27 (dd, *J* = 14.4, 5.2 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.51 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.10 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.74 (br s, 1H, ArH), 6.96 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.17 (s, 1H, ArH), 7.34 (m, 2H, ArH), 7.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 8.07 (m, 2H, ArH), 8.90 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.38 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 65.2 (CH), 121.7 (CH), 125.3 (C), 127.2 (2CH), 128.9 (CH), 129.3 (2CH), 130.3 (2CH), 130.8 (CH), 133.0 (C), 133.9 (C), 134.3 (C), 148.9 (C), 150.9 (C), 170.4 (C), 175.5 (C).

1-(2-Chlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (108).



The general procedure was followed using 1-(2-chlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **89** as substrate (0.70 g, 2.80 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (0.97 g, 5.60 mmol), zirconium(IV) chloride (0.03 g, 0.14 mmol) in toluene (3 mL). The mixture was then stirred under reflux for 160 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (97/3), and then recrystallized from acetonitrile to generate pure product **108** as a white powder in 80% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 171 – 173°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.6/0.4) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.20-2.30 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.46-2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.66-2.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.32 (dd, *J* = 15.6, 6.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.38 (dd, *J* = 15.6, 6.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.59 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar*H*), 7.08 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.19-7.29 (m, 3H, Ar*H*), 7.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.40 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 24.0 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 40.9 (CH<sub>2</sub>), 6.3.3 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (CH), 129.4 (CH), 129.9 (CH), 130.4 (CH), 130.7 (CH), 131.8 (C), 133.4 (C), 134.1 (C), 134.2 (C), 134.6 (C), 170.7 (C), 175.2 (C).

### General procedure for the synthesis of compounds 109 to 112:



*Reagents and conditions:* (i) RNH<sub>2</sub>, *p*-toluenesulfonic acid monohydrate, N<sub>2</sub> atmosphere, 100°C or 120°C, 20 – 90 h, 50 - 90%.

A stirred mixture of methyl pyroglutamate **49** (1 equiv), the appropriate amine (1 equiv for aliphatic amine or 2 equiv for aromatic amine), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.1 equiv) was heated at 100 or  $120^{\circ}$ C under nitrogen atmosphere for various periods (17 to 90 hours). Upon cooling to room temperature, the residual solid was washed with diethyl ether, and then recrystallized from the appropriate solvent, or separated by flash chromatography on pre-packed silica column to provide pure compounds **109 – 112**.

### 5-Oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide (109).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (6.60 g, 46.0 mmol), 2chlorobenzylamine (6.10 g, 46.0 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.88 g, 4.6 mmol) was heated at 100°C under nitrogen atmosphere for 20 hours. Upon cooling to room temperature, the precipitate was washed with diethyl ether, and recrystallized from acetonitrile to generate pure product **109** as a white solid in 90% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 114 – 116°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9/1) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.10-2.50 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.16 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.50 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.05 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.21 (m, 2H, ArH), 7.26 (br s, 1H, CHNH), 7.33 (m, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  25.8 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 41.5 (CH<sub>2</sub>), 57.1 (CH), 127.1 (CH), 129.1 (CH), 129.6 (CH), 130.0 (CH), 133.6 (C), 135.1 (C), 172.1 (C), 179.6 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 253.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.22 min. Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 57.04; H, 5.19; N, 11.09. Found: C, 56.71; H, 4.98; N, 11.07%.

### 5-Oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (110).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (5.70 g, 39.80 mmol), 2,4dichlorobenzylamine (7.00 g, 39.80 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.76 g, 3.98 mmol). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 100°C for 24 h. The residue was then washed with diethyl ether, and recrystallized from acetonitrile to generate pure product **110** as a white solid in 90% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 140 – 142°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.2/0.8) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.04 (br s, 1H, CHN*H*), 2.10-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.23-2.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.17 (dd, *J* = 9.2, 4.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.48 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.21 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.30 (br s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.7 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>), 57.0 (CH), 127.4 (2CH), 129.4 (CH), 130.8 (C), 133.8 (C), 134.2 (C), 172.5 (C), 179.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 287.0 (MH<sup>+</sup>), tr 3.26 min. Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.20; H, 4.21; N, 9.76. Found: C, 50.13; H, 4.18; N, 9.72%.

### 5-Oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (2,4-dichlorophenyl)amide (111).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (2.00 g, 12.70 mmol), 2,4dichloroaniline (4.12 g, 25.40 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.24 g, 1.27 mmol). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 120°C for 90 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (98/2 to 90/10) to generate pure product **111** as a purple solid in 50% yield; mp (DCM/MeOH) 163 – 166°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.2/0.8) = 0.7. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.30-2.50 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.58-2.70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.34 (dd, *J* = 9.2, 4.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.26 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.9 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 57.7 (CH), 123.5 (CH), 125.1 (C), 127.9 (CH), 129.1 (CH), 130.5 (C), 132.4 (C), 170.7 (C), 179.9 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 273.1 (MH<sup>+</sup>), tr 3.24 min. Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 48.38; H, 3.69; N, 10.26. Found: C, 48.73; H, 4.02; N, 9.92%.

#### 5-Oxopyrrolidine-2-carboxylic acid p-tolylamide (112).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (6.00 g, 42.0 mmol), *p*-toluidine (9.00 g, 84.0 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.80 g, 4.2 mmol). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 100°C for 24 h. The residue was then washed with diethyl ether, and recrystallized from acetonitrile to generate pure product **112** as a white solid in 85% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>286</sup> <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d<sub>6</sub>*, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.93-2.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.08-2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.27-2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.17 (dd, *J* = 8.3, 4.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.87 (br s, 1H, NH), 9.93 (br s, 1H, NH).

Experimental procedure for the synthesis of 1-methyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide **114**:



Reagents and conditions: (i) 2,4-dichlorobenzylamine, p-toluenesulfonic acid monohydrate, 120°C, 24 h, 80%.

A stirred mixture of 1-methyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **113** (4.00 g, 25.5 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (6.72 g, 38.2 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.24 g, 1.3 mmol) was heated at 120°C for 24 hours. After cooling to room temperature, the residue was recrystallized from ethyl acetate to give pure product **114** as white crystalls in 80% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>287 1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.80-1.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.15-2.33 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.63 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.36 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.45 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.62 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.72 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>).

General procedure for the synthesis of compounds 102, and 115 – 116:



Reagents and conditions: (i) Ar-I, Cul, N,N'-DMEDA, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxane, r.t., 24 – 48 h, 25 – 70%.

For the synthesis of these compounds, the general procedure described for the copper-coupling applied to methyl pyroglutamate, was employed using 1 equivalent of pyroglutamide derivatives **109** to **112**. The residues were recrystallized or purified by flash chromatography on pre-packed silica column to afford pure compounds (**102**, **115**, and **116**).

1-(3,5-Dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4-dichlorobenzylamide (102).



The general procedure was followed using **110** as substrate (1.00 g, 3.5 mmol), 1-iodo-3,5dichlorobenzene (0.79 g, 3.5 mmol), cesium carbonate (2.27 g, 7.0 mmol), copper (I) iodide (0.33 g, 1.8 mmol), and DMEDA (0.31 g, 3.5 mmol) in dioxane (15 mL). The mixture was then stirred at room temperature for 48 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (98/2) to generate pure product **102** as a white powder in 25% yield; mp (DCM/MeOH) 194-195°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.15-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.66-2.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.37 (dd, *J* = 14.9, 5.9 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.52 (dd, *J* = 14.9, 5.9 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.27 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.12-7.20 (m, 3H, ArH), 7.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.6 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (CH<sub>2</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub>), 62.7 (CH), 118.9 (2CH), 125.4 (CH), 127.5 (CH), 129.5 (CH), 131.2 (CH), 133.1 (C), 134.0 (C), 134.6 (C), 135.5 (2C), 139.6 (C), 170.3 (C), 174.6 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.03; H, 3.27; N, 6.48. Found: C, 50.23; H, 3.16; N, 6.72%.

### 5-Oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid p-tolylamide (115).



The general procedure was followed using **112** as substrate (1.00 g, 4.6 mmol), iodobenzene (0.94 g, 4.6 mmol), cesium carbonate (2.98 g, 9.2 mmol), copper (I) iodide (0.44 g, 2.3 mmol), and DMEDA (0.40 g, 4.6 mmol) in dioxane (15 mL). The mixture was then stirred at room temperature for 24 h. The residue was recrystallized from a solution of diethyl ether/EtOH/MeOH (10/20/1) to generate pure product **115** as colorless crystals in 35% yield; mp (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O/EtOH/MeOH) 221 – 223°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9/1) = 0.7. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.02-2.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.39-2.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.56-2.68 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.11 (m, 3H, Ar*H*), 7.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar*H*), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar*H*), 10.28 (s, 1H, CO*N*H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 20.9 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 62.4 (CH), 119.8 (2CH), 121.2 (2CH), 125.0 (CH), 129.1 (2CH), 129.6 (2CH), 133.2 (C), 136.5 (C), 139.2 (C), 170.0 (C), 174.8 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 73.45; H, 6.16; N, 9.52. Found: C, 73.24; H, 6.37; N, 9.57%.

5-Oxo-1-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide (116).



The general procedure was followed using **109** as substrate (1.00 g, 4.0 mmol), iodobenzene (0.81 g, 4.0 mmol), cesium carbonate (2.58 g, 8.0 mmol), copper (I) iodide (0.38 g, 2.0 mmol), and DMEDA (0.35 g, 4.0 mmol) in dioxane (15 mL). The mixture was then stirred at room temperature for 27 h. The residue was recrystallized from a solution of diethyl ether/EtOH (1/2) to generate pure product **116** as a white powder in 70% yield; mp ( $C_4H_{10}O/EtOH$ ) 150 – 151°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9/1) = 0.7. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.17-2.28 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.48-2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.66-2.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.42 (dd, *J* = 15.2, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.49 (dd, *J* = 15.2, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.68 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.25 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.99 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.14-7.21 (m, 2H, ArH), 7.30 (m, 3H, ArH), 7.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 41.5 (CH<sub>2</sub>), 63.2 (CH), 121.2 (2CH), 125.7 (CH), 127.0 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (2CH), 129.5 (CH), 129.8 (CH), 133.4 (C), 134.7 (C), 137.8 (C), 171.0 (C), 174.6 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 65.75; H, 5.21; N, 8.52. Found: C, 65.83; H, 5.16; N, 8.54%.

### CHAPITRE V :

### **STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 3**

Les principales modulations effectuées dans cette série se situent au niveau de la fonction amide centrale, retrouvée dans les deux premières séries. L'objectif du développement de la série 3 était d'étudier l'importance de cette fonction quant à l'activité des molécules. Dans un premier temps, la fonction amide a été remplacée par une fonction amine tout en conservant les groupements importants identifiés dans les autres séries. Puis, la même étude a été conduite en inversant cette fonction amide pour obtenir des composés analogues « rétro-amides ».

Nous présenterons, dans un premier temps, la sous-série des amines (les 5aminopyrrolidones). Puis, la synthèse des « rétro-amides » sera détaillée.

### I- Synthèse de la sous-série des amines

Pour la synthèse de ces composés, la 5-méthoxypyrrolidone **117** (synthétisée précédemment au laboratoire selon les méthodes de la littérature<sup>288</sup>) a été utilisée comme synthon de départ. A partir de ce composé, deux stratégies sont envisageables :

- La première consiste à fonctionnaliser l'azote dans un premier temps, en y greffant les groupements phényles ou benzyles envisagés, avant de faire réagir différentes amines (aliphatiques ou aromatiques en position 5).
- La seconde est de réaliser les étapes de la première stratégie dans l'ordre inverse.

Ces deux stratégies sont illustrées par le Schéma 18. Nous allons présenter et détailler chacune de ces voies, avant de discuter de leurs avantages et inconvénients.



**Schéma 18.** Réactions générales des voies 1 et 2 : (i) N-benzylation ; (ii) et (iii) substitution via un sel de N-acyliminium ; (iv) N-benzylation ; (v) réaction de type Buchwald.

<sup>&</sup>lt;sup>288</sup> Iwasaki, T. et al. J. Org. Chem. **1977**, 42, 2419.

### I-1- Description de la voie de synthèse 1

Cette voie de synthèse fait intervenir deux étapes :

- la première consiste en une substitution nucléophile permettant de greffer divers groupements benzyles sur l'azote lactamique ;
- la seconde permet de substituer le groupe méthoxy en position 5 par une fonction amine, en passant par la formation d'un sel de N-acyliminium intermédiaire.



Schéma 19. Schéma de synthèse global de la voie 1. (i) substitution nucléophile ; (ii) substitution électrophile.

### I-1-1- N-benzylation de la 5-méthoxypyrrolidone : synthèse des composés 118 à 121

Cette réaction est réalisée selon un mode opératoire décrit dans la littérature.<sup>289</sup> La *N*benzylation est effectuée dans le tétrahydrofurane (THF) à température ambiante, en présence d'hydroxyde de potassium, et de bromure de tétra-*n*-butylammonium (TBAB) en tant qu'agent de transfert de phase.



*Schéma 20. Réactifs et conditions : (i)* ArCH<sub>2</sub>X, KOH, TBAB, THF, T.A., 2 – 24 h, 26 – 62%.

<sup>&</sup>lt;sup>289</sup> Toja, E. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 415.

Ligne	N° produit	Ar	Durée (h)	Rdt (%)
1	118	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	20	62
2	119	4-Cl-Ph	2	26
3	120 <sup>289</sup>	Ph	23	55
4	121	2-Cl-Ph	24	32

Tableau 9. Rendements obtenus pour les produits 118 à 121.

Les rendements obtenus lors de cette étape sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. En effet, on observe des variations de rendement en fonction des substituants portés par le groupement benzyle. Cela étant probablement dû aux différences de solubilité des composés, puisque les rendements présentés ici sont exprimés pour des produits purs, isolés après recristallisation. De plus, on observe dans certains cas la formation de produits secondaires de réaction issus de la déméthylation du méthoxy en position 5, pour donner un groupe hydroxyle (*cf* Schéma 20, composés **119b** et **121b**). Cependant, ces produits ont seulement été identifiés par RMN dans les milieux réactionnels, et n'ont pas été isolés.

### I-1-2- Synthèse des 5-aminopyrrolidones 122 à 125 par réaction électrophile sur les 5-méthoxypyrrolidones N-benzylés

Très peu de composés analogues à ces 5-aminopyrrolidones sont décrits dans la littérature. De plus, ces composés étaient synthétisés par réaction entre la 5-éthoxypyrrolidone et l'amine désirée en chauffant à 150°C.<sup>290</sup> La méthode que nous avons développée, en faisant réagir ces amines au reflux du dichlorométhane en présence d'acide triflique, a permis d'améliorer ces conditions de réaction. En effet, ces conditions plus douces représentent une nouvelle voie d'accès aux 5-aminopyrrolidones.



**Schéma 21.** Réactifs et conditions : (ii) : méthode « a » : RNH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, DCM, reflux, 24 h, 0 – 62% ; ou méthode « b » : RNH<sub>2</sub>, APTS monohydrate, DCM, reflux, 24 h, 0%.

<sup>&</sup>lt;sup>290</sup> Kosugi, Y. et al. *Heterocycles* **1980**, *14*, 1245.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	R	Méthode	Rdt (%)
1	120	122	Ph	4-MeO-Ph	а	62
2	121	123	2-Cl-Ph	4-MeO-Ph	а	46
3	118	124	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	а	0
4	120	125	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	b	0

Tableau 10. Rendements obtenus pour les produits 122 à 125.

Cette méthode nous a permis d'obtenir uniquement les composés pour lesquels une amine aromatique a été mise en réaction avec la N-benzyl 5-méthoxypyrrolidone désirée (Tableau 10, lignes 1 et 2). En comparaison avec la littérature, ces composés sont obtenus avec des rendements corrects (compris entre 46 et 62%) en 24 heures, et en ne chauffant qu'à 50°C. Cependant, lorsque nous tentons de faire réagir la 2,4-dichlorobenzylamine sur le composé 118 (Tableau 10, ligne 3), aucune réaction n'est observée. L'hypothèse émise est que l'acide triflique présent dans le milieu entraîne la protonation totale de ces amines aliphatiques plus nucléophiles que les amines aromatiques, les empêchant ainsi de réagir. Nous avons donc réalisé un autre essai en utilisant un acide plus faible, l'APTS (Tableau 10, ligne 4); cela dans le but de minimiser la protonation de cette amine pour lui permettre de réagir. Cependant, cet essai s'est également soldé par un échec. Une étude méthodologique est donc nécessaire pour trouver un catalyseur nous permettant d'obtenir ces dérivés portant une amine aliphatique. En comparaison avec la synthèse des composés de la série précédente, le chlorure de zirconium(IV) pourrait être envisagé. En effet, s'il s'agit bel et bien d'un problème de protonation de l'amine ne la rendant plus nucléophile, cet acide de Lewis pourrait palier ce phénomène, car il est connu pour avoir peu d'affinité pour les atomes d'azote (moins que pour les atomes d'oxygène).

### I-2- Description de la voie de synthèse 2

Cette voie de synthèse est subdivisée en deux routes différentes, avec une première étape commune qui consiste à greffer une amine aromatique en position 5 de la pyrrolidone par substitution électrophile du groupe méthoxy dans des conditions identiques à celles présentées précédemment. A partir de ces 5-amino-arylpyrrolidones, une réaction de substitution nucléophile permet de greffer divers groupements benzyliques sur l'azote lactamique, alors qu'un couplage au cuivre permet d'insérer divers groupements aryles.



**Schéma 22.** Schéma de synthèse global de la voie 2. (iii) substitution via un sel de *N*-acyliminium; (iv) *N*-benzylation; (v) réaction de type Buchwald.

## I-2-1- Synthèse des composés 126 et 127 par substitution nucléophile du groupe méthoxy de la 5-méthoxypyrrolidone

Ces composés ont été synthétisés à partir de la 5-méthoxypyrrolidone par substitution nucléophile du groupe méthoxy par différentes amines aromatiques. Les conditions réactionnelles utilisées sont identiques à celles décrites pour la synthèse des composés **122** à **125**.



Schéma 23. Réactifs et conditions : (iii) RNH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, DCM, reflux, 24 h, 44 – 58%.

Tableau 11. Rendements obtenus pour les produits 126 et 127.

Ligne	N° produit	R	Rdt (%)
1	126	4-OMe-Ph	58
2	127	2-OMe-Ph	44

Ces composés sont obtenus avec des rendements du même ordre que pour les analogues *N*benzylés décrits dans le paragraphe précédent. I-2-2- N-benzylation de la 5-aminopyrrolidone 126 : synthèse des N-benzyl-5amino-arylpyrrolidones 122 – 123 et 128 – 129

Pour la synthèse de ces composés, des conditions identiques à celles utilisées précédemment décrites avec la 5-méthoxypyrrolidone ont été appliquées. Les composés finaux **122** et **123** obtenus par la voie 1 ont également été synthétisés par la voie 2. Cela nous permettra de comparer l'efficacité des deux voies.



Schéma 24. Réactifs et conditions : (iv) ArCH<sub>2</sub>X, KOH, TBAB, THF, T.A., 3 h, 38 – 47%.

Ligne	N° produit	Ar	x	Rdt (%)
1	122	Ph	Br	40
2	123	2-Cl-Ph	Cl	47
3	128	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Cl	45
4	129	4-Cl-Ph	Cl	38

Tableau 12. Rendements obtenus pour les produits 122 à 123 et 128 à 129.

Les rendements obtenus pour les réactions de *N*-benzylation effectuées sur la 5-(4-méthoxyphénylamino)-pyrrolidone **126** (Tableau 12) sont légèrement plus faibles que ceux observés pour la *N*-benzylation de la 5-méthoxypyrrolidone **117** (Tableau 9). Les rendements globaux obtenus pour les composés de type *N*-benzyl-5-(arylamino)pyrrolidone sont donc sensiblement les mêmes qu'ils soient synthétisés par l'une ou l'autre voie.

## I-2-3- N-arylation des 5-(arylamino)pyrrolidones 126 et 127 : synthèse des composés 130 et 131

Cette étape consiste en une réaction de Buchwald entre un halogénure d'aryle et les aminopyrrolidones **126** et **127**. Pour la synthèse de ces composés, des conditions identiques à celles décrites pour les composés **80** à **93** de la série 2 ont été appliquées.<sup>282</sup>



*Schéma 25. Réactifs et conditions :* (*v*) Arl, Cul, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMEDA, 1,4-dioxane, 60°C, 15 h, 23 – 25%.

Ligne	N° substrat	N° produit	R	Ar	Rdt (%)
1 <sup>a</sup>	126	130	4-MeO-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	23
2 <sup>b</sup>	127	131	2-MeO-Ph	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	25

Tableau 13. Rendements obtenus pour les produits 130 et 131.

<sup>a</sup> Lors de cette synthèse les composés **132** et **133** ont également été isolés avec des rendements respectifs de 33 et 35%.

<sup>b</sup> Lors de cette synthèse les composés **134** et **135** ont également été isolés avec des rendements respectifs de 30 et 26%.

Les conditions de couplage de type Buchwald, mises au point pour les esters pyroglutamiques ont permis d'obtenir les composés **130** et **131** (Tableau 13). Cependant, les rendements obtenus sont plutôt faibles. Cela s'explique par la formation de produits secondaires dans des proportions importantes (Tableau 13 et Schéma 25). En effet, lors de ces deux réactions nous avons constaté qu'il y avait un clivage de l'amine en position 5 de la pyrrolidone. Cela donnant lieu à la formation des anisidines **132** et **134** avec des rendements respectifs de 33 et 30%.<sup>291,292</sup> De plus, la formation de ces amines dans les milieux réactionnels entraîne leur condensation sur elles-mêmes ; ce qui provoque la formation des azobenzènes **133** et **135** avec des rendements respectifs de 35 et 26%.<sup>293,294</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>291</sup> Srivastava, A. et al. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5092.

<sup>&</sup>lt;sup>292</sup> Li, Y. et al. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5450.

<sup>&</sup>lt;sup>293</sup> Cepanec, I. et al. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5614.

<sup>&</sup>lt;sup>294</sup> Zhang, M. et al. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 3428.

Nous avons pensé, dans un premier temps, que ce clivage de l'amine était dû à la présence d'eau dans le milieu réactionnel. Nous avons donc travaillé en milieu totalement anhydre, mais le même résultat a été observé. En travaillant à température ambiante, le clivage de l'amine aromatique n'est pas évité non plus. Des essais doivent être réalisés dans le but de déterminer le mécanisme de cette réaction inverse ; cela dans le but d'adapter les conditions réactionnelles à ces dérivés.

### II- Synthèse de la sous-série des rétro-amides

Comme pour la série précédente, la 5-méthoxypyrrolidone **117** (synthétisée précédemment au laboratoire<sup>288</sup>) a été utilisée comme synthon de départ. A partir de ce composé, deux voies de synthèse principales ont été conçues ; l'une permet d'aboutir aux « rétro-amides » *N*-benzylés sur l'azote lactamique, l'autre donne accès aux « rétro-amides » *N*-arylés. Quant au composé **153**, il a été synthétisé par une autre voie de synthèse que nous présenterons à la fin de ce chapitre.



*Schéma 26. Réactions générales des voies 1, 2, et 3 : (i)* substitution nucléophile ; (*ii*) substitution électrophile ; (*iii*) réaction de type Buchwald ; (*iv*) substitution électrophile ; (*v*) substitution électrophile ; (*vi*) réaction de type Buchwald.

### II-1- Description de la voie de synthèse 1

La première étape de cette voie de synthèse permet de synthétiser les 5méthoxypyrrolidones *N*-benzylés **118** à **121**, qui sont ensuite mises en réaction avec l'amide désiré. La synthèse de ces intermédiaires ayant déjà été présentée précédemment, cette étape ne sera pas détaillée dans ce paragraphe.



Schéma 27. Réactions générales de la voie 1 : (i) N-benzylation ; (ii) substitution via un sel de N-acyliminium.

# II-1-1- Synthèse des 5-amidopyrrolidones N-benzylées 136 et 142 via un sel d'acyliminium

Cette étape consiste à faire réagir divers amides (aliphatiques ou aromatiques) sur le groupement méthoxy en position 5 des pyrrolidones *N*-benzylées **118** à **121**. Cette réaction de substitution, impliquant le sel d'acyliminium intermédiaire (Schéma 28), est effectuée dans les mêmes conditions que celles qui ont été développées pour la synthèse des 5-aminopyrrolidones, au reflux du dichlorométhane en présence d'acide triflique et sous atmosphère d'azote.



*Schéma 28. Réactifs et conditions : (ii)* RCONH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, DCM, reflux, 17 – 80 h, 49 – 91%.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	R	Durée (h)	Rdt (%)
1	118	136	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	17	70
2	119	137	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	21	84
3	120	138	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	24	79
4	121	139	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	25	91
5	118	140	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	80	62
6	119	141	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	48	49
7	121	142	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	80	61

Tal	bleau 14.	Rendements o	btenus pour	les produits	: <b>136</b> à <b>142</b> .
-----	-----------	--------------	-------------	--------------	-----------------------------

Les rendements obtenus pour les composés **136** à **142** (Tableau 14) sont globalement très bons. Cependant, nous remarquons que l'on obtient de meilleurs rendements lorsque ce sont des amides aromatiques qui sont mis en réaction. En effet, les rendements sont compris entre 49 et 62% avec les benzylamides (Tableau 14, lignes 5 à 7), alors qu'ils vont de 79 à 91% avec les acétamides (Tableau 14, lignes 1 à 4). Malgré les variations observées, ces conditions représentent une voie d'accès tout à fait efficace pour ce type de composés.

### II-2- Description de la voie de synthèse 2

Cette voie de synthèse permet l'accès aux dérivés « rétro-amides » *N*-arylés. Elle fait intervenir deux étapes ; la première consiste en une réaction de Buchwald permettant l'arylation de la 5-méthoxypyrrolidone **117**, et la seconde est une réaction de substitution nucléophile identique à celle employée pour les composés **136** à **142**.



Schéma 29. Réactions générales de la voie 2 : (iii) couplage de type Buchwald ; (iv) substitution électrophile.

### II-2-1- N-Arylation de la 5-méthoxypyrrolidone : synthèse des 5méthoxypyrrolidones N-arylées 143 à 145

Cette réaction de *N*-arylation est un couplage de type Buchwald effectué entre un halogénure d'aryle et la 5-méthoxypyrrolidone **117**. Elle est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la synthèse des composés **130** et **131** de la série des amines ; dans le dioxane à 60°C en présence de DMEDA et d'iodure de cuivre(I), avec le carbonate de césium en tant que base.



Schéma 30. Réactifs et conditions : (iii) Arl, Cul, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMEDA, 1,4-dioxane, 60°C, 22 – 88 h, 48 – 68%.

Ligne (littérature)	N° produit	Ar	Durée (h)	Rdt (%)
1 <sup>(295)</sup>	143	Ph	23	52
2	144	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	88	48
3	145	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	22	68

Tableau 15. Rendements obtenus pour les produits 143 à 145.

Les composés **143** à **145** ont été obtenus avec de bons rendements. Cependant, nous remarquons une nouvelle fois que la présence d'un substituant en position *ortho* sur le groupement aryle entraîne une cinétique de réaction plus lente et des rendements légèrement plus faibles (Tableau 15, ligne 2).

# II-2-2- Synthèse des 5-amidopyrrolidones N-arylés 146 à 151 via un sel d'acyliminium

Cette deuxième étape de la voie 2 de synthèse permet d'accéder aux « rétro-amides » **146** à **151** *N*-arylés, analogues des « rétro-amides » **136** à **142** *N*-benzylés, *via* un sel d'acyliminium. Elle est

<sup>&</sup>lt;sup>295</sup> Brunton, S. et al. *ARKIVOC* **2000**, *iii*, 292.

effectuée au reflux du dichlorométhane en présence d'acide triflique et sous atmosphère d'azote ; conditions identiques à celles présentées précédemment.



Schéma 31. Réactifs et conditions : (iv) RCONH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, DCM, reflux, 21 – 80 h, 34 – 95%.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	R	Durée (h)	Rdt (%)
1	143	146	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	25	96
2	145	147	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	21	81
3	144	148	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	31	95
4	143	149	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	22	34
5	145	150	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	80	36
6	144	151	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	22	36

Tableau 16. Rendements obtenus pour les produits 146 à 151.

De la même manière que pour la synthèse des rétro-amides *N*-benzylés **136** à **142**, nous remarquons que ces conditions opératoires sont très efficaces pour le couplage des benzamides (Tableau 16, lignes 1 à 3). Cependant, dans le cas des benzylamides (Tableau 16, lignes 4 à 6), les rendements sont quasiment divisés par 3. Il serait donc intéressant de réaliser une optimisation de la réaction pour les benzylamides, en changeant notamment le catalyseur.

### II-3- Description de la voie de synthèse 3

Le composé **153** est obtenu en deux étapes à partir de la 5-méthoxypyrrolidone **117**. La voie de synthèse utilisée est identique à celle appliquée pour la synthèse des produits **130** et **131** de la sous-série des amines. En effet, la première étape consiste à greffer un benzamide en position 5 de la pyrrolidone par substitution électrophile du groupement méthoxy en conditions acides. Puis, un couplage de type Buchwald permet la *N*-arylation de l'azote lactamique.



Schéma 32. Réactions générales de la voie 3 : (v) substitution électrophile ; (vi) couplage de type Buchwald.

II-3-1- Synthèse du 3,4,5-trimethoxy-N-(5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide 152 par substitution électrophile

Cette réaction est effectuée dans le dichlorométhane à reflux en présence d'acide triflique, et sous atmosphère d'azote.



Schéma 33. Réactifs et conditions : (v) 3,4,5-triméthoxybenzamide, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, DCM, reflux, 6 h, 90%.

Le très bon rendement obtenu pour le composé **152** est en accord avec les rendements obtenus pour les composés **146** à **148** (Tableau 16) qui portent eux aussi un groupe benzamide en position 5 de la pyrrolidone.

II-3-2- Synthèse du 3,4,5-trimethoxy-N-(5-oxo-1-phenylpyrrolidin-2-yl)benzamide 153 par N-arylation du 3,4,5-trimethoxy-N-(5-oxopyrrolidin-2yl)benzamide 152

Cette réaction est un couplage de type Buchwald réalisé sur le composé 152.



Schéma 34. Réactifs et conditions : (vi) iodobenzène, Cul, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMEDA, 1,4-dioxane, 80°C, 50 h, 12%.

Le composé **153** a été obtenu avec un faible rendement de 12%. Cela s'explique par la formation de produits secondaires. En effet, les composés **154** et **155** ont été isolés à la fin de cette réaction.<sup>296,297</sup> Comme lors des couplages réalisés sur les 5-aminopyrrolidones **130** et **131**, nous observons le clivage du groupement porté en position 5 de la pyrrolidone. Cela abouti à la formation de l'amide de départ avec un rendement de 45%. De plus, la présence de cette molécule dans le milieu réactionnel entraîne une réaction secondaire avec l'iodobenzene qui vient se greffer sur cet amide pour former le composé **155** avec un rendement de 3%. Cette réaction secondaire est un couplage de type Buchwald, catalysé par le cuivre mis en réaction. Une optimisation de ces conditions de réaction est donc nécessaire. Toutefois, nous avons la possibilité d'accéder à ces composés en effectuant les réactions dans un ordre inverse, puisque nous avons pu remarquer que de bons rendements ont été obtenus en procédant de cette façon.

### III- Synthèse du 2,4-dichloro-N-(1-methyl-5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide 157

Le composé **157** a été synthétisé à partir de la 5-méthoxy-1-méthyl-pyrrolidone **156** synthétisée antérieurement au laboratoire.<sup>298</sup> Ce composé est l'analogue de la molécule **114** de la série 2. Cette substitution est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment ; au reflux du dichlorométhane sous atmosphère d'azote, en présence d'acide triflique.



Schéma 35. Réactifs et conditions : (i) 2,4-dichlorobenzamide, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, DCM, reflux, 5 h, 70%.

Dans le cas de ce composé également, ces conditions opératoires permettent d'obtenir un bon rendement de 70%.

<sup>&</sup>lt;sup>296</sup> Hall, J. D. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1409.

<sup>&</sup>lt;sup>297</sup> Cook, J. W. et al. *J. Chem. Soc.* **1944**, *Part III*, 322.

<sup>&</sup>lt;sup>298</sup> Kleber, C. et al. *Synlett* **2003**, *8*, 1189.

**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 3** 

### General procedure for the synthesis of compounds 118 to 123:



*Reagents and conditions:* (*i*) ArCH<sub>2</sub>X, KOH, tetrabutylammonium bromide (TBAB), N<sub>2</sub> atmosphere, THF, r.t., 2 – 24 h, 26 – 62%.

A mixture of pyrrolidin-2-one derivative (1 equiv), the appropriate benzyl halide (1 equiv), potassium hydroxide (1.1 equiv), and tetrabutylammonium bromide (0.064 equiv) in THF, was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for various periods of time (2 – 24 h). Insoluble salts were filtered, and the residual filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash liquid chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/n-heptane, or recrystallized from the appropriate solvent.

#### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one (118).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidone **117** (50.00 g, 0.43 mol), 2,4dichlorobenzyl chloride (84.90 g, 0.43 mol), potassium hydroxide (26.80 g, 0.48 mol), and tetrabutylammonium bromide (8.93 g, 0.028 mol) in THF (400 mL). The mixture was stirred for 20 hours. The residue was recrystallized from diethyl ether to generate pure compound **118** as a white powder in 62% yield; mp (( $C_2H_5$ )<sub>2</sub>O) 104 – 105°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 8/2) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.98-2.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.53-2.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.24 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.35 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.75 (dd, *J* = 6.3, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.81 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 7.22 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.9 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 53.4 (CH<sub>3</sub>), 89.7 (CH), 127.3 (CH), 129.3 (CH), 131.1 (CH), 132.9 (C), 134.0 (C), 134.3 (C), 175.1 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>: C, 52.58; H, 4.78; N, 5.11. Found: C, 52.81; H, 4.68; N, 4.82%.

### 1-(4-Chlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one (119).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidone **117** (50.00 g, 0.43 mol), 4-chlorobenzyl chloride (70.00 g, 0.43 mol), potassium hydroxide (26.80 g, 0.48 mol), and tetrabutylammonium bromide (8.93 g, 0.028 mol) in THF (400 mL). The mixture was stirred for 2 hours. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure compound **119** as a yellow oil in 26% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.96-2.04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.06-2.15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.53-2.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.21 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.03 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.72 (dd, *J* = 6.3, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.86 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.7 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 52.9 (CH<sub>3</sub>), 89.1 (CH), 128.8 (2CH), 129.8 (2CH), 133.5 (C), 135.1 (C), 174.8 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>CINO<sub>2</sub>: C, 60.13; H, 5.89; N, 5.84. Found: C, 60.12; H, 5.68; N, 6.07%.

1-Benzyl-5-methoxypyrrolidin-2-one (120).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidone **117** (10.00 g, 0.087 mol), benzyl bromide (14.90 g, 0.087 mol), potassium hydroxide (5.40 g, 0.096 mol), and tetrabutylammonium bromide (1.80 g, 0.0055 mol) in THF (70 mL). The mixture was stirred for 23 hours. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure compound **120** as a yellow oil in 55% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>289 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.94-2.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54-2.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.22 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.01 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.73 (dd, *J* = 6.2, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.96 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 7.27-7.36 (m, 5H, Ar*H*).

### 1-(2-Chlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one (121).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidone **117** (10.00 g, 0.087 mol), 2-chlorobenzyl chloride (14.00 g, 0.087 mol), potassium hydroxide (5.40 g, 0.096 mol), and tetrabutylammonium bromide (1.80 g, 0.0055 mol) in THF (80 mL). The mixture was stirred for 24 hours. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure compound **121** as a yellow oil in 32% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.97-2.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54-2.65 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.24 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.36 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.75 (dd, *J* = 6.3, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.90 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 7.27-7.25 (m, 2H, ArH), 7.30-7.34 (m, 1H, ArH), 7.35-7.39 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 24.0 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 41.6 (CH<sub>2</sub>), 53.4 (CH<sub>3</sub>), 89.6 (CH), 127.0 (CH), 128.9 (CH), 129.6 (CH), 130.2 (CH), 133.7 (C), 134.1 (C), 175.0 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>CINO<sub>2</sub>: C, 60.13; H, 5.89; N, 5.84. Found: C, 59.73; H, 6.14; N, 6.24%.

### 1-Benzyl-5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one (122).



The general procedure was followed using 5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one **126** (2.00 g, 9.70 mmol), benzyl bromide (1.66 g, 9.70 mmol), potassium hydroxide (0.60 g, 11.00 mmol), and tetrabutylammonium bromide (0.20 g, 0.62 mmol) in THF (20 mL). The mixture was stirred for 3 hours. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure compound **122** as a yellow powder in 40% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 134 – 139°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.85-1.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.62 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArN*H*), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.91 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.94-4.99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar*H*), 6.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar*H*), 7.14 (dd, *J* = 7.6, 2.1 Hz, 2H, Ar*H*), 7.23-7.32 (m, 3H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 43.6 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>), 69.8 (CH), 115.0 (2CH), 116.1 (2CH), 127.5 (CH), 128.2 (2CH), 128.6 (2CH), 136.9 (C), 139.1 (C), 153.3 (C), 173.9 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 72.95; H, 6.80; N, 9.45. Found: C, 72.71; H, 6.51; N, 9.50%.




The general procedure was followed using 5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one **126** (2.00 g, 9.70 mmol), 2-chlorobenzyl chloride (1.60 g, 9.70 mmol), potassium hydroxide (0.60 g, 11.00 mmol), and tetrabutylammonium bromide (0.20 g, 0.62 mmol) in THF (20 mL). The mixture was stirred for 3 hours. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure compound **123** as a brown powder in 47% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 117 – 119°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.91-2.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.64 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.40 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.88 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.96-5.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, ArH), 6.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, ArH), 7.22 (m, 3H, ArH), 7.31-7.35 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 41.4 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>), 70.3 (CH), 115.0 (2CH), 116.3 (2CH), 127.0 (CH), 128.8 (CH), 129.4 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (C), 134.1 (C), 138.7 (C), 153.4 (C), 174.2 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 65.35; H, 5.79; N, 8.47. Found: C, 64.90; H, 6.01; N, 8.50%.

#### General procedure for the synthesis of compounds 126 and 127:



*Reagents and conditions:* (i) ArNH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, N<sub>2</sub> atmosphere, DCM, reflux, 24 h, 44 – 58%.

Anisidine (1 equiv) was added to a mixture of 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (1 equiv) in dichloromethane under inert atmosphere and the resulting reaction medium was heated to reflux. Triflic acid (5% vol.) was then added using a syringe. Two phases were then visualized in the medium, which was stirred at reflux for 24 hours. After cooling to room temperature, the mixture was neutralized to pH=7 with aqueous NaOH 2M, then extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>. Volatiles were removed *in vacuo* to give the crude product which was purified by flash liquid chromatography or crystallized in absolute ethanol.

# 5-(4-Methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one (126).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (10.00 g, 87.0 mmol), 4methoxyaniline (5.35 g, 87.0 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h in dichloromethane (30 mL). The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (7/3) to generate pure product **126** as a white solid in 58% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 127 – 130°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3296, 3147, 1687, 1506, 1439, 1225, 1179, 1041. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.85-1.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.41-2.49 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50-2.60 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.19 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.53 (br s, 1H, ArNH), 6.63 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH), 6.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 28.8 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>), 66.3 (CH), 115.1 (2CH), 116.1 (2CH), 139.1 (C), 153.5 (C), 177.0 (C). Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: C, 64.06; H, 6.84; N, 13.58. Found: C, 63.61; H, 6.56; N, 13.32%.

#### 5-(2-Methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one (127).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (10.00 g, 87.0 mmol), 2methoxyaniline (10.71 g, 87.1 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h in dichloromethane (50 mL). The precipitate was then filtered and washed with dichloromethane, then diethyl ether, and recrystallized from absolute ethanol to generate pure product **127** as a white solid in 44% yield. IR v cm<sup>-1</sup>: 3369, 3326, 1683, 1604, 1592, 1515, 1471, 1451, 1247. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.92-2.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.26-2.71 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.56 (s large, 1H, NH), 5.28-5.39 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.12 (br s, 1H, ArNH), 6.63-6.69 (m, 1H, ArH), 6.73-6.93 (m, 3H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 28.9 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 55.4 (CH<sub>3</sub>), 64.6 (CH), 110.2 (CH), 111.0 (CH), 118.7 (CH), 121.3 (CH), 135.1 (C), 147.2 (C), 177.0 (C). Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: C, 64.06; H, 6.84; N, 13.58. Found: C, 63.73; H, 6.77; N, 13.54%. General procedure for the synthesis of compounds 128 and 129:



Reagents and conditions: (i) ArCH<sub>2</sub>X, KOH, TBAB, N<sub>2</sub> atmosphere, THF, r.t., 3 h, 38 – 45%.

The general procedure developed for compounds **118** to **123** was employed for the synthesis of compounds **128** and **129**, using compound **126** as starting material.

#### 1-(2,4-Dichlorobenzyl)-5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one (128).



The general procedure was followed using 5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one **126** (2.00 g, 9.70 mmol), 2,4-dichlorobenzyl chloride (1.90 g, 9.70 mmol), potassium hydroxide (0.60 g, 11.00 mmol), and tetrabutylammonium bromide (0.20 g, 0.62 mmol) in THF (20 mL). The mixture was stirred for 3 hours. The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **128** as a white powder in 45% yield; mp (( $C_2H_5$ )\_2O) 137 – 138°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.91-2.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.63 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.53 (br s, 1H, NH), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.38 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.81 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.00 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH), 6.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.20 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>), 57.7 (CH<sub>3</sub>), 70.3 (CH), 115.0 (2CH), 116.3 (2CH), 127.2 (CH), 129.4 (CH), 130.3 (CH), 132.9 (C), 133.8 (C), 134.2 (C), 138.6 (C), 153.5 (C), 174.2 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 59.19; H, 4.97; N, 7.67. Found: C, 59.01; H, 4.78; N, 7.81%.

### 1-(4-Chlorobenzyl)-5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one (129).



The general procedure was followed using 5-(4-methoxyphenylamino)pyrrolidin-2-one **126** (2.00 g, 9.70 mmol), 4-chlorobenzyl chloride (1.60 g, 9.70 mmol), potassium hydroxide (0.60 g, 11.00 mmol), and tetrabutylammonium bromide (0.20 g, 0.62 mmol) in THF (20 mL). The mixture was stirred for 3 hours. The residue was recrystallized from absolute ethanol to give pure product **129** as a white powder in 38% yield; mp (EtOH) 101 – 103°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.84-1.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.34-2.61 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.46 (br s, 1H, NH), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.83 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.92-5.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.49 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, ArH), 6.75 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, ArH), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.7 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 43.0 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>), 69.8 (CH), 115.0 (2CH), 116.1 (2CH), 128.7 (2CH), 129.6 (2CH), 133.3 (C), 135.5 (C), 139.0 (C), 153.4 (C), 173.9 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 65.35; H, 5.79; N, 8.47. Found: C, 64.90; H, 6.01; N, 8.50%.

#### **EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 3**

# General procedure for the synthesis of compounds 130 and 131:



Reagents and conditions: (i) ArI, CuI, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMEDA, N<sub>2</sub> atmosphere, dioxane, 60°C, 15 h, 23 – 25%.

A suspension of coupling substrate aminopyrrolidinones **126** or **127** (1 equiv), 0.5 equiv of copper (I) iodide, cesium carbonate (2 equiv), and 1 equiv of corresponding aryl iodide in dioxane was placed under nitrogen (inert atmosphere). The coupling ligand (N,N'-dimethylethylenediamine) (1 equiv) was added dropwise with a syringe. The mixture was then stirred at 60°C for 15 hours. The mixture got blue very quickly (this color corresponds to the complex copper–ligand formation) and the catalytic cycle started. All insoluble salts deposited after cooling to room temperature were collected by filtration then washed with dichloromethane. The resulting filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was partitioned between water and dichloromethane. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane to afford pure compounds **130** – **131**.

1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-[(4-methoxyphenyl)amino]pyrrolidin-2-one (130).



The general procedure was followed using 5-[(4-methoxyphenyl)amino]pyrrolidin-2-one **126** (1.60 g, 7.75 mmol), 2,4-dichloroiodobenzene (2.11 g, 7.75 mmol), cesium carbonate (5.06 g, 15.50 mmol), copper (I) iodide (0.74 g, 3.90 mmol), and DMEDA (0.83 mL, 7.75 mmol) in dioxane (35 mL). The resulting mixture was then stirred at 60°C for 15 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **130** as a white solid in 23% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 112 – 115°C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.02-2.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.56-2.77 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.76 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, N*H*), 5.54-5.60 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.42 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, Ar*H*), 6.62 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, Ar*H*), 7.08-7.15 (m, 2H, Ar*H*), 7.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 22.0 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 53.3 (CH<sub>3</sub>), 57.0 (CH), 114.7 (2CH), 115.2 (CH), 117.2 (2CH), 122.3 (CH), 128.2 (C), 129.8 (CH), 134.6 (C), 143.2 (C), 152.9 (C), 153.2 (C), 174.1 (C). Anal. calcd for C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 58.13; H, 4.59; N, 7.98. Found: C, 58.55; H, 5.00; N, 8.11%.



The cleavage of the amine bound of the starting material **126** furnished the aromatic amine in 33% yield: **4-methoxyaniline 132**; <sup>1</sup>H NMR (DMS0- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.41 (br s, 2H, ArNH<sub>2</sub>), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.65 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 6.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH). The physico-chemical characteristics correspond to those described in the literature.<sup>291</sup>



The formation of this compound **132** also led to the condensation of two **4-methoxyaniline** to give compound **133** in 35% yield, with the same physico-chemical characteristics as described;<sup>293 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.89 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>), 7.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, Ar*H*), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, Ar*H*).

1-(3,5-Dichlorophenyl)-5-[(2-methoxyphenyl)amino]pyrrolidin-2-one (131).



The general procedure was followed using 5-[(2-methoxyphenyl)amino]pyrrolidin-2-one **127** (0.40 g, 2.00 mmol), 3,5-dichloroiodobenzene (0.44 g, 2.00 mmol), cesium carbonate (1.26 g, 4.00 mmol), copper (I) iodide (0.19 g, 0.97 mmol), and DMEDA (0.25 mL, 2.00 mmol) in dioxane (20 mL). The resulting mixture was then stirred at 60°C for 14 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **131** as a white solid in 25% yield; *R*<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.4; mp (EtOAc/*n*-heptane) 107 – 108°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3368, 1713, 1585, 1562, 1513, 1445, 1370, 1204, 740. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.11-2.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.42-2.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.54-2.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.74-2.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 5.63 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.77-6.80 (m, 2H, ArH), 6.83-6.89 (m, 1H, ArH), 7.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 1<sup>3</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.5 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>), 71.7 (CH), 110.2 (CH), 112.2 (CH), 119.2 (CH), 121.2 (CH), 121.3 (2CH), 125.7 (CH), 134.4 (C), 135.0 (2C), 139.4 (C), 147.5 (C), 173.9 (C). Anal. calcd for C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 58.13; H, 4.59; N, 7.98. Found: C, 58.44; H, 4.69; N, 7.86%.



A secondary reaction of the amine bound cleavage of the starting material **127** furnished the aromatic amine in 30% yield: **2-methoxyaniline 134**; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.78 (br s, 2H, ArNH<sub>2</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.70-6.75 (m, 2H, ArH). 6.77-8.81 (m, 2H, ArH). The physico-chemical caracteristics correspond to those described in the literature.<sup>292</sup>



The formation of this compound **134** also led to the condensation of two **2-methoxyaniline** to give compound **135** in 26% yield, with the same physico-chemical characteristics as described;<sup>294 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 4.02 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>), 7.01 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar*H*), 7.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar*H*), 7.40-7.43 (m, 2H, Ar*H*), 7.62-7.66 (m, 2H, Ar*H*).

#### General procedure for the synthesis of compounds 136 to 142:



*Reagents and conditions:* (*i*) RNH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, N<sub>2</sub> atmosphere, DCM, reflux, 17 – 80 h, 49 – 91%.

The same procedure as described for the synthesis of compounds **126** and **127** was employed for the synthesis of compounds **136** to **142**. All compounds were purified by flash chromatography on prepacked silica column, or recrystallized.

2,4-Dichloro-N-[1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]benzamide (136).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **118** (1.00 g, 3.7 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (0.80 g, 4.0 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 17 h in dichloromethane (15 mL). The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **136** as a white powder in 70% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. mp (EtOAc/*n*-heptane) 139 – 141°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3241, 1689, 1643. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.00-2.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.71 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.45 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.81 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.70 (td, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NHCO), 7.19-7.24 (m, 2H, ArH), 7.32 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.4 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 41.5 (CH<sub>2</sub>), 64.9 (CH), 127.5 (CH), 127.8 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 130.6 (CH), 131.2 (CH), 131.5 (C), 132.1 (C), 132.5 (C), 134.2 (C), 134.3 (C), 137.6 (C), 165.0 (C), 174.6 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.03; H, 3.27; N, 6.48. Found: C, 50.07; H, 3.24; N, 6.59%.

2,4-Dichloro-N-[1-(4-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]benzamide (137).



The general procedure was followed using 1-(4-chlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **119** (1.00 g, 4.2 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (0.90 g, 4.6 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 21 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **137** as a white powder in 84% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. mp ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O) 152 – 154°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3265, 1665. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.87-1.99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.40-2.66 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.23 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.67 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.76 (td, *J* = 9.0, 3.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NHCO), 7.27 (sym m, 3H, ArH), 7.30 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.42 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.1 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 64.2 (CH), 127.7 (CH), 128.9 (2CH), 130.0 (2CH), 130.2 (CH), 131.2 (CH), 131.4 (C), 132.2 (C), 133.7 (C), 135.3 (C), 137.5 (C), 165.3 (C), 174.2 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 54.36; H, 3.80; N, 7.04. Found: C, 54.21; H, 3.88; N, 7.20%.

# N-(1-Benzyl-5-oxopyrrolidin-2-yl)-2,4-dichlorobenzamide (138).



The general procedure was followed using 1-benzyl-5-methoxypyrrolidin-2-one **120** (1.00 g, 4.9 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (1.02 g, 5.4 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **138** as a white powder in 79% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. mp (( $C_2H_5$ )\_2O) 151 – 153°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3270, 1667. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.90-1.99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.41-2.66 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.30 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.70 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.77 (td, *J* = 5.8, 3.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NHCO), 7.24-7.36 (m, 7H, ArH), 7.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.2 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 44.5 (CH<sub>2</sub>), 64.6 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (CH), 128.4 (2CH), 128.8 (2CH), 130.2 (CH), 131.1 (CH), 131.4 (C), 132.4 (C), 136.8 (C), 137.4 (C), 165.2 (C), 174.3 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 59.52; H, 4.44; N, 7.71. Found: C, 59.30; H, 4.54; N, 7.79%.

2,4-Dichloro-N-[1-(2-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]benzamide (139).



The general procedure was followed using 1-(2-chlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **121** (1.00 g, 4.2 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (0.90 g, 4.6 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 25 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **139** as a white powder in 91% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. mp ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O) 135 – 138°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3251, 1660. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.98-2.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.45-2.70 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.45 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.85 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.69 (td, *J* = 8.6, 2.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NHCO), 7.20-7.23 (m, 2H, ArH), 7.24-7.29 (m, 2H, ArH), 7.32-7.36 (m, 1H, ArH), 7.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.4 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 41.9 (CH<sub>2</sub>), 65.0 (CH), 127.1 (CH), 127.5 (CH), 129.0 (CH), 129.5 (CH), 129.8 (CH), 130.0 (CH), 131.0 (CH), 131.4 (C), 132.6 (C), 133.5 (C), 133.6 (C), 137.1 (C), 165.2 (C), 174.8 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 54.36; H, 3.80; N, 7.04. Found: C, 54.30; H, 3.95; N, 6.98%.

N-[1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]-2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (140).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **118** (1.00 g, 3.7 mmol), 2-(2,4-dichloro-phenyl)acetamide (0.80 g, 4.0 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 80 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from absolute ethanol to give pure product **140** as a white powder in 62% yield; R<sub>*f*</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.2. mp (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 88 – 89°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3255, 1683. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.79-1.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.39-2.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.53-2.65 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.55 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>Ar), 4.31 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.64 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.50 (sym m, *J* = 7.0, 3.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NHCO), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.17 (m, 2H, ArH), 7.25 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.3 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 41.4 (CH<sub>2</sub>), 64.7 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (CH), 129.5 (CH), 129.7 (CH), 130.2 (CH), 130.7 (C), 132.4 (CH), 132.5 (C), 134.0 (C), 134.1 (C), 134.5 (C), 134.8 (C), 168.9 (C), 174.7 (C). Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 51.15; H, 3.61; N, 6.28. Found: C, 49.66; H, 3.71; N, 5.85%.

N-[1-(4-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]-2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (141).



The general procedure was followed using 1-(4-chlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **119** (1.00 g, 4.2 mmol), 2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (1.00 g, 4.7 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from absolute ethanol to give pure product **141** as a white powder in 49% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.3. mp (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 87 – 88°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3247, 1693. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.67-1.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.32-2.60 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>Ar), 4.14 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.53 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.59 (sym m, *J* = 7.0 Hz, 3.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.83 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, NHCO), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.19-7.28 (m, 5H, ArH), 7.42 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.1 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 64.9 (CH), 127.8 (CH), 128.8 (2CH), 129.7 (2CH), 129.8 (CH), 130.7 (C), 132.5 (CH), 133.6 (C), 134.5 (C), 134.9 (C), 135.4 (C), 169.1 (C), 174.2 (C). Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.43; H, 4.16; N, 6.80. Found: C, 55.15; H, 3.91; N, 6.77%.

N-[1-(2-chlorobenzyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]-2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (142).



The general procedure was followed using 1-(2-chlorobenzyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **121** (1.00 g, 4.2 mmol), 2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (1.00 g, 4.7 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 80 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from absolute ethanol to give pure product **142** as a white powder in 61% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.3. mp (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 144 – 145°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3255, 1682. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.83-1.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.37-2.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.53 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>Ar), 4.34 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 4.72 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ar), 5.32 (td, *J* = 7.4, 3.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NHCO), 7.14-7.25 (m, 5H, Ar*H*), 7.35 (dd, *J* = 6.7, 2.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.37 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.4 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 41.9 (CH<sub>2</sub>), 46.9 (CH), 127.2 (CH), 127.8 (CH), 129.0 (CH), 129.2 (CH), 129.6 (CH), 129.7 (CH), 130.8 (CH), 132.4 (C), 133.4 (C), 133.8 (C), 134.4 (C), 134.9 (C), 168.8 (C), 174.7 (C). Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.43; H, 4.16; N, 6.80. Found: C, 55.60; H, 4.28; N, 6.36%.

#### General procedure for the synthesis of compounds 143 to 145:



Reagents and conditions: (i) ArI, CuI, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMEDA, N<sub>2</sub> atmosphere, dioxane, 60°C, 22 – 88 h, 48 – 68%.

The same procedure as described for the synthesis of compounds **130** and **131** was employed for the synthesis of compounds **143** to **145**, using compound **117** as substrate. All compounds were purified by flash chromatography on pre-packed silica column.





The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (2.00 g, 17.4 mmol), iodobenzene (3.60 g, 17.4 mmol), cesium carbonate (11.3 g, 34.8 mmol), copper (I) iodide (1.65 g, 8.7 mmol), and DMEDA (1.87 mL, 17.4 mmol) in dioxane (25 mL). The resulting mixture was then stirred at 60°C for 23 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **143** as a colorless oil in 52% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>295 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.12-2.19 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.24-2.34 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.55 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.73-2.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.29 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.35 (dd, *J* = 5.9, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.22 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.39 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.52 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 2H, ArH).

#### N-(2,4-Dichlorophenyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one (144).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (10.55 g, 92.0 mmol), 2,4dichloroiodobenzene (12.44 mL, 92.0 mmol), cesium carbonate (59.70 g, 184.0 mmol), copper (I) iodide (8.72 g, 46.0 mmol), and DMEDA (9.86 mL, 92.0 mmol) in dioxane (100 mL). The resulting mixture was then stirred at 60°C for 88 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **144** as a yellow oil in 48% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.5; IR v cm<sup>-1</sup>: 1708, 1586, 1479, 1402, 1295, 1194, 1073, 962, 885, 792. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.13-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.36-2.54 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH$ ), 2.68-2.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.24 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.18 (dd, *J* = 5.9, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.31 (m, 2H, ArH), 7.50 (t, *J* = 1.2 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.6 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 55.3 (CH<sub>3</sub>), 92.2 (CH), 128.0 (CH), 130.1 (CH), 131.7 (CH), 133.0 (C), 133.4 (C), 134.5 (C), 174.7 (C). Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>: C, 50.79; H, 4.26; N, 5.38. Found: C, 50.92; H, 4.49; N, 5.63%.

#### N-(3,5-Dichlorophenyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one (145).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (2.1 g, 18.2 mmol), 3,5dichloroiodobenzene (5.0 g, 18.2 mmol), cesium carbonate (11.9 g, 36.4 mmol), copper (I) iodide (1.8 g, 9.1 mmol), and DMEDA (2.3 mL, 18.2 mmol) in dioxane (25 mL). The resulting mixture was then stirred at 60°C for 22 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **145** as a white solid in 68% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.5; mp (EtOAc/*n*-heptane) 70 – 71°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 1688, 1571, 1447, 1404, 1365, 1304, 1211, 1132, 1071, 871, 801, 687. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.12-2.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.71-2.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.34 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.32 (dd, *J* = 5.9, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.20 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 23.9 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH<sub>3</sub>), 91.2 (CH), 120.5 (2CH), 125.6 (CH), 135.1 (2C), 139.8 (C), 174.2 (C). Anal. calcd for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>: C, 50.79; H, 4.26; N, 5.38. Found: C, 50.79; H, 4.20; N, 5.57%.

#### General procedure for the synthesis of compounds 146 to 152:



*Reagents and conditions:* (i) R2NH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, N<sub>2</sub> atmosphere, DCM, reflux, 6 – 80 h, 34 – 96%.

The same procedure as described for the synthesis of compounds **126** and **127** was employed for the synthesis of compounds **146** to **151**. All compounds were purified by flash chromatography on prepacked silica column, or recrystallized.

### 2,4-Dichloro-N-(5-oxo-1-phenylpyrrolidin-2-yl)benzamide (146).



The general procedure was followed using 5-methoxy-1-phenylpyrrolidin-2-one **143** (0.50 g, 2.6 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (0.55 g, 2.9 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 25 h in dichloromethane (10 mL). The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **146** as a white powder in 96% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.5. mp (( $C_2H_5$ )<sub>2</sub>O) 162 – 163°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3275, 1693, 1639. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.07-2.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.57-2.82 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.36-6.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NHCO), 7.18-7.26 (m, 2H, Ar*H*), 7.33-7.41 (m, 4H, Ar*H*), 7.49-7.54 (m, 2H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.7 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 66.0 (CH), 122.8 (2CH), 126.1 (CH), 127.5 (CH), 129.1 (2CH), 130.1 (CH), 131.0 (CH), 131.4 (C), 132.4 (C), 136.4 (C), 137.3 (C), 165.2 (C), 173.5 (C). Anal. calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 58.47; H, 4.04; N, 8.02. Found: C, 58.36; H, 4.24; N, 7.86%.

#### 2,4-Dichloro-N-[1-(3,5-dichlorophenyl)-5oxopyrrolidin-2-yl]benzamide (147).



The general procedure was followed using 1-(3,5-dichlorophenyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **145** (1.00 g, 3.9 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (0.80 g, 4.2 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 21 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **147** as a white powder in 81% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.7. mp ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O) 144 – 145°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3231, 1714, 1641. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.10-2.18 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.58-2.83 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.30-6.36 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.65 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NHCO), 7.19 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 26.6 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 65.6 (CH), 120.5 (2CH), 125.8 (CH), 127.8 (CH), 130.2 (CH), 131.1 (CH), 131.3 (C), 132.1 (C), 135.3 (2C), 137.6 (C), 138.4 (C), 165.3 (C), 173.3 (C). Anal. calcd for C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 48.84; H, 2.89; N, 6.70. Found: C, 48.50; H, 2.67; N, 6.53%.

# 2,4-Dichloro-N-[1-(2,4-dichlorophenyl)-5oxopyrrolidin-2-yl]benzamide (148).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **144** (1.00 g, 3.9 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (0.80 g, 4.2 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 31 h in dichloromethane (15 mL). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to give pure product **148** as a yellow oil in 95% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. IR v cm<sup>-1</sup>: 3285, 1674. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.12-2.22 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.71 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.74-2.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.16-6.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NHCO), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.8 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 66.4 (CH), 127.6 (CH), 128.1 (CH), 130.2 (CH), 130.3 (CH), 131.1 (CH), (CH), 131.4 (C), 132.1 (C), 132.4 (C), 133.8 (C), 135.1 (C), 137.4 (C), 165.2 (C), 173.7 (C). Anal. calcd for C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 48.84; H, 2.89; N, 6.70. Found: C, 49.10; H, 3.04; N, 6.86%.

# 2-(2,4-Dichlorophenyl)-N-(5-oxo-1-phenylpyrrolidin-2-yl)acetamide (149).



The general procedure was followed using 5-methoxy-1-phenylpyrrolidin-2-one **143** (0.80 g, 4.2 mmol), 2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (1.00 g, 4.7 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 22 h in dichloromethane (15 mL). The residue was recrystallized from absolute ethanol to give pure product **149** as a white powder in 34% yield;

R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.4. mp (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 156 – 157°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3281, 1698. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.86-1.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.47-2.73 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.52 (d, J = 6.7 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>Ar), 5.88 (d, J = 8.6 Hz, 1H, CONH), 6.17-6.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.12-7.37 (m, 6H, ArH), 7.44 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH).

#### 2-(2,4-Dichlorophenyl)-N-[1-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]acetamide (150).



The general procedure was followed using 1-(3,5-dichlorophenyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **145** (1.00 g, 3.9 mmol), 2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (0.90 g, 4.2 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 80 h in dichloromethane (15 mL). The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **150** as a white powder in 36% yield;  $R_f$  (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.3. mp (EtOAc/*n*-heptane) 175 – 176°C. IR v cm<sup>-1</sup>: 3201, 1685. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.91-1.99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.51-2.73 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>Ar), 5.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, CON*H*), 6.10-6.15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C*H*), 7.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar*H*), 7.21 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.36 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, Ar*H*). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.03; H, 3.27; N, 6.48. Found: C, 50.07; H, 3.24; N, 6.59%.

2-(2,4-Dichlorophenyl)-N-[1-(2,4-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-2-yl]acetamide (151).



The general procedure was followed using 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-methoxypyrrolidin-2-one **144** (1.00 g, 3.9 mmol), 2-(2,4-dichlorophenyl)acetamide (0.90 g, 4.2 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 22 h in dichloromethane (15 mL). The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (5/5) to generate pure product **151** as a yellow oil in 36% yield; R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 9/1) = 0.3. IR v cm<sup>-1</sup>: 3299, 1680. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.93-2.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50-2.71 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.48 (d, *J* = 16.9 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>Ar), 5.99 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NHCO), 7.04 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 2H, ArH), 7.18 (td, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, ArH), 7.39 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.9 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 65.9 (CH), 127.7 (CH), 128.1 (CH), 129.6 (CH), 130.1 (CH), 130.7 (CH), 130.8 (CH), 132.1 (C), 132.2 (C), 133.9 (C), 134.3 (C), 134.7 (C), 134.9 (C), 169.0 (C), 171.2 (C). Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.03; H, 3.27; N, 6.48. Found: C, 50.01; H, 3.29; N, 6.64%.

# 3,4,5-Trimethoxy-N-(5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide (152).



The general procedure was followed using 5-methoxypyrrolidin-2-one **117** (3.00 g, 26.1 mmol), 3,4,5trimethoxybenzamide (6.00 g, 26.1 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 6 h in dichloromethane (25 mL). The precipitate was then filtrated and washed with dichloromethane, then diethyl ether, and recrystallized from absolute ethanol to generate pure product **152** as a white solid in 90% yield; mp (EtOH) 202 – 204°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.86-1.97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.08-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.31-2.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>), 5.60 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.20 (s, 2H, ArH), 8.15 (br s, 1H, CONH), 8.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CHNH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 27.6 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (2CH<sub>3</sub>), 60.1 (CH<sub>3</sub>), 60.6 (CH), 105.0 (2CH), 129.1 (C), 140.2 (C), 152.6 (2C), 165.2 (C), 176.5 (C). Anal. calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 57.14; H, 6.16; N, 9.52. Found: C, 57.24; H, 6.32; N, 9.44%.

#### **EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 3**

Experimental procedure for the synthesis of compounds 153:



Reagents and conditions: (i) ArI, CuI, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMEDA, N<sub>2</sub> atmosphere, dioxane, 80°C, 50 h, 12%.

The same procedure as described for the synthesis of compounds **130** and **131** was employed for the synthesis of 3,4,5-trimethoxy-*N*-(5-oxo-1-phenyl-pyrrolidin-2-yl)-benzamide **153**.

A suspension of coupling substrate **152** (1.00 g, 3.40 mmol), copper (I) iodide (0.32 g, 1.70 mmol), cesium carbonate (2.22 g, 6.80 mmol), and iodobenzene (0.69 g, 3.40 mmol) in dioxane (15 mL) was placed under nitrogen (inert atmosphere). The coupling ligand (*N*,*N'*-dimethylethylenediamine) (0.30 g, 3.40 mmol) was added dropwise with a syringe. The mixture was then stirred at 80°C for 50 h. The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (98/2) to generate pure product **153** as white powder in 12% yield; *R<sub>f</sub>* (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.4; mp (DCM/MeOH) 192 – 194°C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d<sub>6</sub>*, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.94-2.04 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.45-2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.71-2.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>), 6.23-6.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.09 (s, 2H, Ar*H*), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.53 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*), 8.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CHN*H*). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d<sub>6</sub>*, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.0 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (2CH<sub>3</sub>), 60.1 (CH<sub>3</sub>), 65.5 (CH), 104.9 (2CH), 122.6 (2CH), 125.1 (CH), 128.6 (2CH), 128.7 (C), 137.5 (C), 140.3 (C), 152.5 (2C), 165.2 (C), 173.6 (C). Anal. calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 64.85; H, 5.99; N, 7.56. Found: C, 64.78; H, 5.92; N, 7.54%.



The cleavage of the amide moiety of the starting material **152** furnished the aromatic amide **154** as a white powder in 45% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>296</sup> <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>), 7.21 (s, 2H, ArH), 7.31 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7.93 (s, 1H, NH<sub>2</sub>).



A secondary reaction between side product **154** and iodobenzene catalyzed by Cul and DMEDA furnished compound **155** as a white solid in 3% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>297</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.90 (s, 9H, 3OCH<sub>3</sub>), 7.07 (s, 2H, ArH), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, ArH), 7.63 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, ArH), 7.89 (s, 1H, CONH).

# 2,4-Dichloro-N-(1-methyl-5-oxopyrrolidin-2-yl)benzamide (157).



The same procedure as described for the synthesis of compounds **126** and **127** was employed for the synthesis of compound **157** using 5-methoxy-1-methylpyrrolidin-2-one **156** (1.00 g, 7.7 mmol), 2,4-dichlorobenzamide (1.62 g, 8.5 mmol), and triflic acid (5% vol.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 5 h in dichloromethane (15 mL). The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (97/3) to generate pure product **157** as a white solid in 70% yield;  $R_f$  (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.7; mp (DCM/MeOH) 115 – 118°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.85-1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.28-2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.42-2.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.84 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 5.72-5.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, CON*H*), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.42 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.1 (CH<sub>2</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>3</sub>), 66.3 (CH), 127.9 (CH), 130.4 (CH), 131.2 (CH), 131.8 (C), 133.3 (C), 137.5 (C), 166.2 (C), 174.6 (C). Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 50.20; H, 4.21; N, 9.76. Found: C, 50.38; H, 4.27; N, 9.42%.

CHAPITRE VI :

# STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 4

Cette série découle des pyroglutamides *N*-benzylés (série 1) pour lesquels le groupement *N*benzyle placé en position 1 a été remplacé par un motif amide de façon à orienter différemment le groupe lipophile. Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord les voies de synthèse globales utilisées pour le développement de cette série ; chaque voie sera ensuite détaillée et présentée étape par étape.

#### I- Synthèse des composés de la série 4

Pour la synthèse de ces composés, une première voie de synthèse avait été envisagée (voie 1). Cependant, les difficultés rencontrées lors de la dernière étape nous ont amenés à développer un second chemin réactionnel (voie 2) (Schéma 36). Ces deux voies de synthèse utilisent les mêmes réactions chimiques. La première méthode consiste à faire réagir, dans un premier temps, un isocyanate sur le PGM **49**, avant de réaliser une aminolyse de la fonction ester du dérivé formé pour aboutir aux composés finaux. La seconde voie (voie 2) fait d'abord intervenir l'aminolyse de la fonction ester du PGM **49**, avant de faire réagir les pyroglutamides ainsi formés avec les isocyanates désirés. Les problèmes rencontrés seront discutés lors de la présentation de chacune des voies.



Schéma 36. Voies de synthèse développées pour l'obtention des composés de la série 4.

#### II- Description des voies de synthèse

Dans cette partie nous présenterons en détails les étapes de synthèse de chaque voie étudiée. La synthèse du PGM **49** ayant déjà été présentée dans le chapitre précédent,<sup>276</sup> celle-ci ne sera pas détaillée dans ce chapitre.

### II-1- Description de la voie de synthèse 1

Cette voie de synthèse permet de greffer différents groupes arylcarbamoyles sur l'azote du PGM **49** par addition nucléophile du PGM sur un isocyanate. Une aminolyse de la fonction ester est ensuite nécessaire pour aboutir aux composés finaux envisagés.



Schéma 37. Réactions générales de la voie 1 : (i) addition nucléophile ; (ii) aminolyse.

II-1-1- Synthèse des N-arylcarbamoyl pyroglutamates de méthyle 158 à 161 par substitution nucléophile

Cette réaction consiste à faire réagir le PGM **49** avec l'isocyanate désiré au reflux du toluène, et sous atmosphère d'azote. Cette méthode, dont les conditions ont déjà été décrites par le laboratoire,<sup>299</sup> permet d'aboutir à des esters pyroglutamiques portant un groupe arylcarbamoyle sur l'azote lactamique.



*Schéma 38. Réactifs et conditions : (i)* R1NCO, toluène, reflux, 1 – 4 h, 77 – 86%.

<sup>&</sup>lt;sup>299</sup> Cauliez, P. et al. *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, *33*, 1233.

Ligne	N° produit	R1	Durée (h)	Rdt (%)
1	158	Ph	1	82
2	159	4-Cl-Ph	3	85
3	160	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	3	86
4	161	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	4	77

Tableau 17. Rendements obtenus pour les produits 158 à 161.

Cette méthode nous a permis d'obtenir les composés **158** à **161** avec de très bons rendements et des temps de réaction très courts (Tableau 17). Les composés **158** à **160** présentés dans ce tableau ayant été synthétisés lors d'une étude antérieure, leur caractérisation physico-chimique ne sera pas présentée dans la partie expérimentale de cette série.

# II-1-2- Synthèse des N-arylcarbamoyl pyroglutamides 162, 165, et 168 par aminolyse des esters pyroglutamiques N-arylcarbamoyles

Cette réaction consiste à faire réagir une benzylamine sur la fonction ester des composés précédents, en présence d'acide méthanesulfonique, au reflux de l'acétonitrile.



Schéma 39. Réactifs et conditions : (ii) R1NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, acétonitrile, reflux, 15 – 120 h, 4 – 22%.

Lors de ces synthèses, nous avons identifié de nombreuses réactions secondaires qui expliquent les faibles rendements observés pour les produits attendus (4 à 22%). Ces réactions sont illustrées dans le Schéma 40, dans lequel les mécanismes supposés de ces réactions secondaires sont indiqués.



Schéma 40. Mécanismes proposés pour les réactions secondaires observées lors des réactions d'aminolyse pour la synthèse des composés 162, 165, et 168. En noir : l'attaque de la fonction ester par l'amine entraîne la formation du produit désiré et de méthanol. En bleu : le méthanol formé attaque le groupe carbonyle du cycle lactame, ce qui entraîne une ouverture de ce cycle, puis une attaque intramoléculaire permet une cyclisation avec la formation d'un cycle hydantoïne, dont la fonction ester peut à nouveau être attaquée par l'amine toujours présente en solution. En vert : l'amine attaque le carbonyle du lactame et provoque l'ouverture de la pyrrolidone ; le produit formé peut ensuite être à nouveau attaqué par l'amine au niveau de sa fonction ester.

Tous ces composés ont été identifiés par RMN et isolés. Ces réactions secondaires peuvent, parfois, toutes se produire lors d'une même synthèse ; cela a pour conséquence d'entraîner de très faibles rendements pour les produits attendus, voire l'absence de ce produit. Il est également intéressant de noter que le réarrangement de pyroglutamates en hydantoïnes est décrit dans la littérature. Cependant, ce réarrangement est alors réalisé dans des conditions basiques (en présence d'hydrure de sodium).<sup>273</sup> Dans notre cas, nous sommes en conditions acides (présence d'APTS dans le milieu), et à notre connaissance ce type de réarrangement n'a jamais été décrit dans ces conditions. Cela constitue donc une piste intéressante pour le développement de nouvelles voies de synthèse permettant d'aboutir à ce type de composés. Nous allons maintenant traiter et illustrer chaque exemple mené pour cette réaction.

# Synthèse du composé 162



Schéma 41. Réactifs et conditions : (ii) benzylamine (1,5 équiv.), CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, acétonitrile, reflux, 15 h.

Lors de cette réaction le composé **162** a été obtenu avec un faible rendement de 22%. Cela s'explique par la formation d'une quantité importante du composé **163** (30%), ainsi que par le manque de réactivité de la fonction ester du produit **158**, puisque plus de 40% de la quantité de matière initiale de ce produit a été isolée en fin de réaction. Le composé **164** a été formé en trop faible quantité pour être isolé, et n'a été identifié que par RMN.

Synthèse du composé 165



Schéma 42. Réactifs et conditions : (ii) 2,4-dichlorobenzylamine (1 équiv.), CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, acétonitrile, reflux, 120 h.

Dans le but de minimiser les réactions secondaires entraînant des baisses de rendement en produit cible, nous avons mis en réaction un seul équivalent d'amine contre un équivalent et demi lors de la synthèse du composé **162**. Nous constatons, en effet, que les produits secondaires **166** et **167** sont obtenus en plus petites quantités, avec des rendements respectifs de 5 et 10%. Cependant, le produit attendu (composé **165**) est, lui aussi, obtenu avec un très faible rendement de 4%.

Synthèse du composé 168



Schéma 43. Réactifs et conditions : (ii) 2,4-dichlorobenzylamine (1 équiv.), CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, acétonitrile, reflux, 100 h.

Pour la synthèse du composé **168**, nous avions également tenté d'utiliser un seul équivalent d'amine. Cependant, nous avons constaté l'absence totale du produit souhaité dans le milieu réactionnel, et trois sous-produits ont été isolés. Les composés **169**, **170** et **171** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 17, 26 et 8%.

Après avoir réalisé ces trois tentatives de synthèse en réalisant la réaction d'aminolyse lors de la dernière étape qui conduit à des rendements très faibles, voire à l'impossibilité d'obtenir les produits souhaités, nous avons décidé de changer notre stratégie de synthèse. En effet, nous savons, grâce à la synthèse des séries précédentes, que l'aminolyse de la fonction ester peut s'avérer difficile selon le substituant porté par l'azote lactamique. Cependant, dans le cas du PGM **49**, les réactions d'aminolyse sont relativement aisées et conduisent généralement à de bons rendements. Nous avons donc choisi de synthétiser des dérivés pyroglutamides par aminolyse de la fonction ester du PGM **49**, pour les faire réagir ensuite avec les isocyanates désirés.

# II-2- Description de la voie de synthèse 2

Cette voie de synthèse consiste à réaliser une réaction d'aminolyse sur le PGM **49**, puis de faire réagir le dérivé pyroglutamide synthétisé avec un isocyanate dans les mêmes conditions que précédemment (*cf* II-1-1-).



Schéma 44. Réactions générales de la voie 2 : (i) aminolyse ; (ii) addition nucléophile.

# II-2-1- Synthèse des pyroglutamides 172 et 173 par aminolyse de la fonction ester du PGM 49

Cette réaction est réalisée entre le PGM **49** et l'amine désirée, à chaud, en présence d'APTS en tant que catalyseur. Les conditions utilisées sont identiques à celles décrites pour la synthèse des pyroglutamides **109** à **112** de la série 2 (*cf* II-2-1- du chapitre « Stratégie de synthèse – série 2 »).



Schéma 45. Réactifs et conditions : (i) RNH<sub>2</sub>, APTS monohydrate, 100 – 120°C, 17 – 21 h, 77 – 80%.

Ligne	N° produit	R2	Température °C	Durée (heures)	Rdt (%)
1	172	Me-cyclohexyle	100	21	80
2	173	Me-pyridin-4yle	120	17	77

Tableau 18. Rendements obtenus pour les produits 172 et 173.

Comme pour la synthèse des pyroglutamides précédents, les composés **172** et **173** sont obtenus avec de bons rendements (Tableau 18).

# II-2-2- Synthèse des N-carbamoyl-5-pyroglutamides 168 et 174 à 186

Cette réaction de substitution nucléophile consiste à faire réagir le dérivé pyroglutamide avec un isocyanate. Ces composés ont été synthétisés à partir des pyroglutamides **109** à **111**, et **172** à **173** (Tableau 19) en utilisant les mêmes conditions réactionnelles que celles décrites plus haut pour la synthèse des *N*-arylcarbamoyl pyroglutamates de méthyle **158** à **161** (*cf* II-1-1- de ce chapitre).<sup>299</sup>



Schéma 46. Réactifs et conditions : (ii) R1NCO, toluène, reflux, 1 – 24 h, 0 – 97%.

Ligne	N°substrat	N° produit	R1	R2	Durée (h)	Rdt (%)
1	110	168	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	15	81
2	109	174	1-adamantyle	2-Cl-Bz	20	63
3	110	175	Cyclohexyle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	18	82
4	110	176	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	1	90
5	110	177	1-adamantyle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	15	97
6	110	178	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	15	88
7	110	179	2,4-(OMe) <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	15	83
8	110	180	3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	22	64
9	110	181	3-CF <sub>3</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	16	73
10	110	182	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	24	55
11	110	183	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	5	80
12	172	184	Ph	Me- cyclohexyle	24	88
13	111	185	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	20	81
14	173	186	Ph	Me-pyridin- 4yle	24	Non obtenu

Tableau 19. Rendements obtenus pour les produits 168, et 174 à 186.

Cette voie de synthèse a permis d'obtenir l'ensemble des composés souhaités avec de très bons rendements (allant de 55 à 97%) (Tableau 19, lignes 1 à 13), à l'exception du composé **186** (Tableau 19, ligne 14) pour lequel aucune réaction n'a été observée. La difficulté de cette voie de synthèse résidait dans la possibilité de réactions secondaires entre l'isocyanate mis en réaction et l'azote de la fonction amide du pyroglutamide impliqué. Cependant, aucune réactions par RMN révélait une réaction complète pour l'ensemble de ces composés. Le suivi des réactions par RMN révélait une réaction complète pour une grande majorité des composés, et les différences de rendements s'expliquent par la perte de produits lors des recristallisations en fonction des solubilités respectives des composés dans le méthanol. Cette voie de synthèse s'est donc révélée très efficace par rapport à la première envisagée, et a donné l'accès à treize molécules originales. La première voie de synthèse étudiée a, elle, permis l'obtention de deux molécules analogues, et également de six produits secondaires présentant des structures originales intéressantes.
**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 4** 

Experimental procedure for the synthesis of methyl 1-(2,4-dichlorophenylcarbamoyl)pyroglutamate (161):



Reagents and conditions: (i) 2,4-dichlorophenyl isocyanate, toluene, N<sub>2</sub> atmosphere, reflux, 4 h, 77%.

To a stirred solution of methyl pyroglutamate **49** (0.76 g, 5.3 mmol) in refluxed toluene (15 mL), was added dropwise with a syringe 2,4-dichlorophenylisocyanate (1.00 g, 5.3 mmol) dissolved in toluene. The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 4 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from ethanol to generate pure product **161** as a white powder in 77% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.9/0.1) = 0.7. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.10-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.38-2.50 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.64-2.74 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.80-2.92 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.89 (dd, *J* = 10.0, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.22 (dd, *J* = 9.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, ArH), 8.23 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 10.97 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.4 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 53.0 (CH<sub>3</sub>), 58.1 (CH), 122.3 (CH), 124.2 (C), 127.8 (CH), 129.1 (CH), 129.2 (C), 133.6 (C), 149.6 (C), 171.6 (C), 176.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 331.0 (MH<sup>+</sup>), tr 3.88 min. Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 47.15; H, 3.65; N, 8.46. Found: C, 47.04; H, 3.74; N, 8.33%.

#### **EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 4**

### General procedure for the synthesis of compounds 162 to 171:



*Reagents and conditions:* (i)  $RNH_2$ , methanesulfonic acid, acetonitrile,  $N_2$  atmosphere, reflux, 15 – 120 h, 4 – 22%.

A stirred mixture of carbamoyl pyroglutamate derivative (1 equiv), the appropriate benzylamine (1 – 1.5 equiv), and methanesulfonic acid (0.2 equiv) was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 15 to 120 hours in acetonitrile. Upon cooling to room temperature, the solution was diluted in dichloromethane, and washed successively with 1M HCl (20 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> solution (20 mL), and then water (20 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane or DCM/Methanol in various proportions to give pure product.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-benzylamide 1-phenylamide (162) and 2-(3-phenylureido)pentanedioic acid bis-benzylamide (163).



The general procedure was followed using methyl 1-phenylcarbamoylpyroglutamate **158** (2.00 g, 7.6 mmol), benzylamine (1.23 g, 11.4 mmol), and methanesulfonic acid (0.15 g, 1.5 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 15 h. After cooling to room temperature, the precipitate of the reaction was isolated to give pure by-product **163** as a white powder in 30% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 230 – 233°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.77-2.02 (sym m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.28 (m, 5H, 2CONHCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CHNH), 6.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.18 (m, 12H, ArH), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 8.38 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, ArH), 8.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.68 (br s, 1H, PhNHCO). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 29.4 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 42.0 (2CH<sub>2</sub>), 52.4 (CH), 117.5 (CH), 121.1 (CH), 126.7 (CH), 127.1 (4CH), 128.2 (4CH), 128.7 (4CH), 139.3 (C), 139.6 (C), 140.3 (C), 154.7 (C), 171.4 (C), 171.9 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 445.3 (MH<sup>+</sup>), tr 3.53 min. Anal. calcd for C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C, 70.25; H, 6.35; N, 12.60. Found: C, 69.83; H, 6.82; N, 12.43%.

The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99.5/0.5) to generate pure product **162** as a white powder in 22% yield; mp (DCM/MeOH) 164 – 165°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.90-2.10 (sym m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.22-2.40 (sym m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.27 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CONHCH<sub>2</sub>), 7.25 (m, 3H, ArH), 7.28-7.41 (m, 5H, ArH), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 8.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.51 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 27.4 (CH<sub>2</sub>), 30.1 (CH<sub>2</sub>), 42.1 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH), 126.7 (CH), 126.8 (2CH), 127.2 (2CH), 127.7 (CH), 128.3 (2CH), 128.7 (2CH), 132.2 (C), 139.5 (C), 155.6 (C), 171.0 (C), 173.1 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 338.2 (MH<sup>+</sup>), tr 3.07 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 67.64; H, 5.68; N, 12.45. Found: C, 67.72; H, 5.82; N, 12.13%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-[(4-chlorophenyl)amide] 2-(2,4-dichlorobenzylamide) (165); 2-[3-(4-chlorophenyl)ureido]pentanedioic acid bis-(2,4-dichlorobenzylamide) (166); and 3-[1-(4-chlorophenyl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]propionic acid methyl ester (167).



The general procedure was followed using methyl 1-(4-chlorophenylcarbamoyl)pyroglutamate **159** (2.00 g, 6.7 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.19 g, 6.7 mmol), and methanesulfonic acid (0.13 g, 1.3 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 120 h. After cooling to room temperature, the precipitate of the reaction was isolated to give pure compound **166** as a white powder in 5% yield; mp (CH<sub>3</sub>CN) 226 – 228°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.77-2.10 (sym m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.25 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.31 (m, 5H, 2CONHCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.49 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CHNH), 7.23-7.48 (m, 8H, ArH), 7.59 (m, 2H, ArH), 8.43 (s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.67 (s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.84 (br s, 1H, PhNHCO). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 29.0 (CH<sub>2</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 39.5 (2CH<sub>2</sub> with DMSO), 52.5 (CH), 119.0 (2CH), 124.6 (2CH), 127.3 (2CH), 128.6 (2CH), 130.1 (2CH), 130.2 (C), 132.1 (C), 132.2 (C), 132.9 (C), 133.0 (C), 135.4 (C), 135.6 (C), 139.3 (C), 154.6 (C), 171.7 (C), 172.1 (C). Anal. calcd for C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>5</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C, 50.63; H, 3.76; N, 9.08. Found: C, 50.69; H, 3.72; N, 8.76%.

The filtrate was evaporated and the residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99.5/0.5) to generate pure product **165** as a brown powder in 4% yield; mp (DCM/MeOH) 210 – 211°C, R<sub>f</sub> (EtOAc/*n*-heptane 6/4) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d<sub>6</sub>*, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.85-1.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.40 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.58-2.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.35 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.79 (dd, *J* = 9.2, 6.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.42 (m, 2H, ArH), 7.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.62 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 8.85 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 10.54 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d<sub>6</sub>*, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.4 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 58.7 (CH), 121.2 (2CH), 127.3 (CH), 127.5 (C), 128.6 (CH), 128.9 (2CH), 130.1 (CH), 132.3 (C), 132.9 (C), 135.2 (C), 136.3 (C), 149.4 (C), 171.1 (C), 177.8 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 439.9 (MH<sup>+</sup>), tr 4.50 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 51.78; H, 3.66; N, 9.53. Found: C, 52.02; H, 3.92; N, 9.38%.

Compound **167** was also obtained during the separation on silica column as a second by-product of the reaction, due to the rearrangement of the pyroglutamic starting material **159** to hydantoine **167**. Brown powder in 10% yield; mp (DCM/MeOH) 115 – 117°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.87-1.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.02-2.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.50 (2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH *with DMSO*), 3.61 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.26 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar*H*), 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar*H*), 8.59 (s, 1H, NCON*H*). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.7 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 51.5 (CH<sub>3</sub>), 55.4 (CH), 128.3 (2CH), 128.7 (2CH), 131.0 (C), 132.1 (C), 155.3 (C), 172.6 (C), 172.8 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 296.9 (MH<sup>+</sup>), tr 3.48 min. Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 52.62; H, 4.42; N, 9.44. Found: C, 52.69; H, 4.60; N, 9.28%.

4-(2,4-dichlorobenzylcarbamoyl)-2-[3-(3,4-dichlorophenyl)ureido]butyric acid methyl ester (169); 2-[3-(3,4-dichlorophenyl)ureido]pentanedioic acid bis-(2,4-dichlorobenzylamide) (170); and N-(2,4dichlorobenzyl)-3-[1-(3,4-dichlorophenyl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]propionamide (171).



The general procedure was followed using methyl 1-(3,4-dichlorophenylcarbamoyl)pyroglutamate **160** (2.00 g, 6.0 mmol), 2,4-dichlorobenzylamine (1.06 g, 6.0 mmol), and methanesulfonic acid (0.12 g, 1.2 mmol) in acetonitrile (4 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 100 h. Compound **168** 5-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-[(3,4-chlorophenyl)amide] 2-(2,4-dichlorobenzylamide) was not obtained in these conditions. However, three by-products were isolated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99.5/0.5) to generate pure compounds **169**, **170** and **171**.

Compound **169** was obtained as a brown powder in 17% yield;  $R_f$  (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.90-2.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>C $H_2$ CH), 2.02-2.16 (m, 1H, CH<sub>2</sub>C $H_2$ CH), 2.53 (2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH with DMSO), 3.61 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.26 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.34 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.44 (m, 2H, ArH), 7.61 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.17 (s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.7 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 51.5 (CH<sub>3</sub>), 55.5 (CH), 126.7 (CH), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.6 (2CH), 130.2 (C), 130.4 (CH), 130.9 (C), 132.1 (C), 132.4 (C), 133.1 (C), 135.1 (C), 154.9 (C), 172.6 (2C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 508.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.57 min. Anal. calcd for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 47.36; H, 3.78; N, 8.28. Found: C, 47.67; H, 3.56; N, 7.90%.

Compound **170** was obtained as a white powder in 26% yield; mp (DCM/MeOH) 213 – 216°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.77-2.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.25 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.31 (m, 5H, 2CONHCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.21 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.35 (m, 4H, ArH), 7.46 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.86 (d, J = 2.0 Hz, 1H, NH), 8.43 (t, J = 5.2 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.68 (t, J = 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 9.03 (s, 1H, PhCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 28.9 (CH<sub>2</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 39.5 (2CH<sub>2</sub> with DMSO), 52.5 (CH), 117.6 (CH), 118.6 (CH), 122.4 (CH), 127.2 (2CH), 128.5 (CH), 128.6 (CH), 130.1 (CH), 130.2 (CH), 130.5 (C), 131.0 (C), 132.1 (C), 132.3 (C), 132.9 (C), 133.0 (C), 135.3 (C), 135.6 (C), 140.5 (C), 154.4 (C), 171.7 (C), 171.9 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 651.0 (MH<sup>+</sup>), tr 5.02 min. Anal. calcd for C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C, 47.96; H, 3.41; N, 8.60. Found: C, 47.61; H, 3.30; N, 8.48%.

Compound **171** was obtained as a white powder in 8% yield; mp (DCM/MeOH) 191 – 193°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.7/0.3) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.91-2.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.29 (m, 3H, CONHCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.39 (m, 3H, ArH), 7.69 (m, 3H, ArH), 8.44 (s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.64 (s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 27.1 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 39.5 (CH<sub>2</sub> with DMSO), 55.7 (CH), 126.7 (CH), 127.3 (CH), 128.2 (CH), 128.5 (CH), 130.1 (C), 130.2 (CH), 130.6 (CH), 130.9 (C), 132.1 (C), 132.2 (C), 132.9 (C), 135.6 (C), 154.9 (C), 171.4 (C), 172.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 476.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.40 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 48.03; H, 3.18; N, 8.84. Found: C, 48.16; H, 3.03; N, 8.81%.

General procedure for the synthesis of compounds 172 and 173:



R = methylcyclohexyl; methyl-4-pyridyl

*Reagents and conditions:* (i) RNH<sub>2</sub>, *p*-toluenesulfonic acid monohydrate, N<sub>2</sub> atmosphere, 100°C or 120°C, 17 – 21 h, 77 – 80%.

A stirred mixture of methyl pyroglutamate **49** (1 equiv), the appropriate amine (1 equiv), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.1 equiv) was heated at 100 or 120°C under nitrogen atmosphere for various periods (17 to 21 hours). Upon cooling to room temperature, the residual solid was washed with diethyl ether, and then recrystallized from the appropriate solvent to provide pure compounds **172** and **173**.

### N-(Cyclohexylmethyl)pyroglutamide (172).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (2.53 g, 17.70 mmol), *C*-cyclohexylmethylamine (2.00 g, 17.70 mmol), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.34 g, 1.77 mmol). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 100°C for 21 h. The residue was then washed with diethyl ether, and recrystallized from diethyl ether/isopropanol (1/1) to generate pure product **172** as a white powder in 80% yield; mp (( $C_2H_5$ )<sub>2</sub>O/*i*-propanol) 136 – 138°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.2/0.8) = 0.4. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 0.82-1.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.09-1.29 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.48 (sym m, 1H, CH), 1.62-1.78 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>), 2.20 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.27-2.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.53 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.16 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.46 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.10 (br s, 1H, CHNH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.9 (2CH<sub>2</sub>), 26.2 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (2CH<sub>2</sub>), 37.9 (CH<sub>2</sub>), 45.9 (CH), 57.3 (CH), 172.1 (C), 179.6 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 225.2 (MH<sup>+</sup>), tr 3.17 min.

#### N-(Pyridin-4-ylmethyl)pyroglutamide (173).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate **49** (3.96 g, 27.7 mmol), and *C*pyridin-4-ylmethylamine (3.00 g, 27.7 mmol), without *p*-toluenesulfonic acid monohydrate. The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 120°C for 17 h. The residue was then washed with diethyl ether, and recrystallized from acetonitrile to generate pure product **173** as a white solid in 77% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.2/0.8) = 0.2. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.88-1.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.07-2.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.26-2.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.32 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.26 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, Ar*H*), 7.91 (s, 1H, CHN*H*), 8.50 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, Ar*H*), 8.64 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CON*H*CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 25.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 55.9 (CH), 122.1 (2CH), 148.3 (C), 149.5 (2CH), 172.9 (C), 177.4 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 220.1 (MH<sup>+</sup>), tr 0.22 min.

### General procedure for the synthesis of compounds 168 and 174 to 185:



R1 and R2 = aromatic or aliphatic cycle

Reagents and conditions: (i) R1NCO, toluene, N<sub>2</sub> atmosphere, reflux, 1 – 24 h, 55 – 97%.

To a stirred solution of pyroglutamic derivative (1 equiv) in refluxed toluene (3 mL/mmol), was added dropwise with a syringe the appropriate isocyanate (1 equiv) dissolved in toluene. The solution was heated at reflux for various periods (1 – 24 hours) under nitrogen atmosphere. All reactions were followed by NMR spectroscopy and stopped at the end of the advancement of the reaction. After cooling to room temperature, methanol was added to the solution. The precipitate was then filtered and recrystallized from the appropriate solvent to give pure product. When product did not precipitate, the solution was evaporated and the residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/n-heptane or DCM/MeOH in various proportions to give pure product.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-[(3,4-dichlorophenyl)amide] 2-(2,4-dichlorobenzylamide) (168).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (1.50 g, 5.2 mmol) and 3,4-dichlorophenyl isocyanate (0.98 g, 5.2 mmol) in toluene (15 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 15 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 168 as a white powder in 81% yield; mp (MeOH) 200 – 203°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.7. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.84-1.97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.25-2.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.36 (s, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.79 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.38-7.65 (m, 5H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 8.86 (s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 10.59 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.5 (CH<sub>2</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 39.5 (CH<sub>2</sub> with DMSO), 58.7 (CH), 120.0 (CH), 121.1 (CH), 125.4 (C), 127.3 (CH), 128.6 (CH), 130.2 (CH), 130.8 (CH), 131.2 (C), 132.3 (C), 133.0 (C), 135.2 (C), 137.5 (C), 149.4 (C), 171.0 (C), 177.7 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 474.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.67 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 48.03; H, 3.18; N, 8.84. Found: C, 47.75; H, 3.03; N, 8.71%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-adamantan-1-ylamide 2-(2-chlorobenzylamide) (174).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2-chlorobenzylamide **109** (1.43 g, 5.6 mmol) and 1-adamantyl isocyanate (1.00 g, 5.6 mmol) in toluene (15 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 20 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The solution was then evaporated under reduce pressure, and the residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*heptane (5/5) to generate pure product **174** as an yellowish powder in 63% yield; mp (EtOAc/*n*heptane) 75 – 77°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.68 (s, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 1.98 (s, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 2.09 (s, 3H, 3CH), 2.10-2.18 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.38-2.45 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.46-2.52 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.89-2.97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.51 (dd, *J* = 14.2, 5.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.55 (dd, *J* = 14.2, 5.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.76 (dd, *J* = 8.8, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.14 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.21 (m, 2H, ArH), 7.35 (m, 2H, ArH), 8.39 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.1 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (2CH<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (2CH<sub>2</sub>), 41.6 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (2CH<sub>2</sub>), 51.9 (CH), 59.0 (CH), 127.1 (2CH), 128.9 (2CH), 129.6 (2CH), 129.7 (C), 133.6 (C), 135.4 (C), 151.4 (C), 170.5 (C), 177.3 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 430.1 (MH<sup>+</sup>), tr 4.60 min. Anal. calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>CIN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 64.25; H, 6.56; N, 9.77. Found: C, 64.32; H, 6.89; N, 9.58%. 5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-cyclohexylamide 2-(2,4-dichlorobenzylamide) (175).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (2.00 g, 7.0 mmol) and cyclohexyl isocyanate (0.87 g, 7.0 mmol) in toluene (20 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 18 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from ethanol to generate pure product 175 as a white powder in 82% yield; mp (EtOH) 137 – 142°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.15-1.45 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.05-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.25-2.40 (m, 1H, CH2CH2CH), 2.42-2.56 (m, 1H, CH2CH2CH), 2.82-2.96 (m, 1H, CH2CH2CH), 3.64 (m, 1H, CH), 4.44 (dd, J = 15.2, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.51 (dd, J = 15.2, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.19 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.30 (br s, 1H, CON*H*CH<sub>2</sub>), 7.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 8.42 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NCON*H*). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.2 (CH<sub>2</sub>), 24.5 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>), 49.0 (CH<sub>2</sub>), 58.9 (2CH), 127.3 (CH), 129.3 (CH), 130.5 (CH), 133.9 (C), 134.0 (C), 134.1 (C), 152.2 (C), 170.5 (C), 177.2 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 412.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.45 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 55.35; H, 5.62; N, 10.19. Found: C, 55.36; H, 6.14; N, 10.39%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-[(2-chlorophenyl)amide] 2-(2,4-dichlorobenzylamide) (176).



The procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid general 2,4dichlorobenzylamide 110 (2.00 g, 7.0 mmol) and 2-chlorophenyl isocyanate (1.07 g, 7.0 mmol) in toluene (20 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 1 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 176 as a white powder in 90% yield; mp (MeOH) 215 – 219°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.18-2.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.58-2.68 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.95-3.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.47 (dd, J = 15.6, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.54 (dd, J = 15.6, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.80 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.06 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.21 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.26 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.40 (m, 2H, ArH, CONHCH<sub>2</sub>), 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 11.04 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.7 (CH<sub>2</sub>), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 59.2 (CH), 121.8 (CH), 124.0 (C), 125.0 (CH), 127.4 (CH), 127.5 (CH), 129.4 (CH), 129.5 (CH), 130.6 (CH), 133.9 (C), 134.0 (C), 134.1 (C), 134.4 (C), 150.3 (C), 171.0 (C), 177.6 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 442.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.45 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 51.78; H, 3.66; N, 9.53. Found: C, 51.80; H, 3.73; N, 9.59%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-adamantan-1-ylamide 2-(2,4-dichlorobenzylamide) (177).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (1.50 g, 5.2 mmol) and 1-adamantyl isocyanate (0.93 g, 5.2 mmol) in toluene (15 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 15 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The solution was then evaporated under reduce pressure, and the residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/n-heptane (5/5) to generate pure product **177** as a white powder in 97% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 85 – 88°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.68 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 1.97 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 2.08 (m, 4H, 3CH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.42-2.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.86-2.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.45 (dd, J = 15.2, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.51 (dd, J = 15.2, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.76 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.17 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.26 (t, J = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.39 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.1 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (2CH<sub>2</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (2CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (2CH<sub>2</sub>), 51.9 (CH), 59.0 (CH), 127.4 (CH), 129.4 (2CH), 130.5 (2CH), 134.0 (C), 134.1 (2C), 134.2 (C), 151.4 (C), 170.7 (C), 177.3 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 464.2 (MH<sup>+</sup>), tr 4.80 min. Anal. calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 59.49; H, 5.86; N, 9.05. Found: C, 59.59; H, 6.26; N, 8.71%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-[(2,4-dichlorophenyl)amide] 2-(2,4-dichlorobenzylamide) (178).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (1.00 g, 3.5 mmol) and 2,4-dichlorophenyl isocyanate (0.66 g, 3.5 mmol) in toluene (10 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 15 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 178 as a white powder in 88% yield; mp (MeOH) 209 – 212°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.86-1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.29-2.43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.36 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.81 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.47 (dd, J = 9.2, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.24 (d, J = 9.2 Hz, 1H, ArH), 8.88 (t, J = 2.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 11.11 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.5 (CH<sub>2</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 39.5 (CH<sub>2</sub> with DMSO), 58.7 (CH), 121.9 (CH), 123.0 (CH), 127.3 (CH), 127.7 (C), 128.1 (CH), 128.6 (CH), 128.8 (CH), 130.1 (C), 132.3 (C), 133.0 (C), 133.6 (C), 135.2 (C), 149.3 (C), 171.0 (C), 178.2 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 475.9 (MH<sup>+</sup>), tr 4.78 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 48.03; H, 3.18; N, 8.84. Found: C, 48.02; H, 3.17; N, 8.76%.

acid

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic dimethoxyphenyl)amide] (179).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (1.00 g, 3.5 mmol) and 2,4-dimethoxyphenyl isocyanate (0.62 g, 3.5 mmol) in toluene (10 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 15 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 179 as a white powder in 83% yield; mp (MeOH) 204 – 205°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.15-2.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.35-2.43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55-2.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.92-3.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.45 (dd, J = 15.2, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.54 (dd, J = 15.2, 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.84 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.44 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H, ArH), 6.50 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ArH), 7.10 (t, J = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.17 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar*H*), 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar*H*), 10.71 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.4 (CH<sub>2</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 59.2 (CH<sub>3</sub>), 98.9 (CH), 103.9 (CH), 120.3 (CH), 121.1 (CH), 127.5 (CH), 129.5 (C), 130.7 (CH), 134.0 (C), 134.1 (C), 134.2 (C), 150.4 (C), 150.5 (C), 157.0 (C), 170.5 (C), 177.2 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 466.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.33 min. Anal. calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 54.09; H, 4.54; N, 9.01. Found: C, 53.91; H, 3.81; N, 8.91%.

acid

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic dichlorobenzylamide) (180).

CI



The general procedure followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic was acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (1.00 g, 3.5 mmol) and 3,5-bis-trifluoromethylphenyl isocyanate (0.89 g, 3.5 mmol) in toluene (10 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 22 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 180 as a white powder in 64% yield;  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.23-2.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.98-3.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.49 (dd, J = 15.2, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.57 (dd, J = 15.2, 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.78 (dd, J = 7.2, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.66 (t, J = 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.20 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.62 (s, 1H, ArH), 7.99 (s, 2H, ArH), 10.91 (br s, 1H, NCONH). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 543.8 (MH<sup>+</sup>), tr 5.05 min. Anal. calcd for  $C_{21}H_{15}Cl_2F_6N_3O_3$ : C, 46.51; H, 2.79; N, 7.75. Found: C, 46.49; H, 2.61; N, 7.69%.

1-[(3-

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-(2,4-dichlorobenzylamide) trifluoromethylphenyl)amide] (181).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (1.00 g, 3.5 mmol) and 3-trifluoromethylphenyl isocyanate (0.65 g, 3.5 mmol) in toluene (10 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 16 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 181 as a white powder in 73% yield;  $R_f$  (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.6. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.90-1.98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.37 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.81 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.38 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.59 (t, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.07 (s, 1H, ArH), 8.88 (t, J = 6.0 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 10.68 (br s, 1H, NCONH). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 474.0 (MH<sup>+</sup>), tr 4.58 min. Anal. calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 50.65; H, 3.40; N, 8.86. Found: C, 50.34; H, 3.30; N, 8.74%.

acid

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic trimethylphenyl)amide] (182).



The procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic general acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (0.70 g, 2.44 mmol) and 2,4,6-trimethylphenyl isocyanate (0.39 g, 2.44 mmol) in toluene (10 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The solution was then evaporated under reduce pressure, and the residue was separated by flash chromatography on prepacked silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product 182 as a white powder in 55% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.8. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 2.14 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.18-2.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38-2.45 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55-2.65 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.98-3.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.42 (dd, J = 6.0, 2.0 Hz, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.83 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.89 (s, 2H, ArH), 7.09-7.15 (m, 2H, ArH, CONHCH<sub>2</sub>), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 9.74 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 18.4 (2CH<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 21.3 (CH<sub>2</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 59.2 (CH), 127.4 (CH), 129.1 (2CH), 129.4 (C), 130.4 (C), 130.5 (CH), 134.0 (CH), 134.1 (C), 134.2 (C), 135.1 (2C), 137.3 (C), 151.7 (C), 170.5 (C), 177.8 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 448.1 (MH<sup>+</sup>), tr 4.57 min. Anal. calcd for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 58.94; H, 5.17; N, 9.37. Found: C, 58.80; H, 5.26; N, 9.25%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-(2,4-dichlorobenzylamide) 1-phenylamide (183).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid 2,4dichlorobenzylamide 110 (0.40 g, 1.4 mmol) and phenyl isocyanate (0.17 g, 1.4 mmol) in toluene (6 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 5 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product 183 as a white powder in 80% yield; mp (MeOH) 216 – 218°C,  $R_f$  (DCM/MeOH 9.6/0.4) = 0.8. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.85-1.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.40 (sym m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.58-2.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.36 (sym m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 4.80 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.11 (t, J = 7.2 Hz, 1H, ArH), 7.35 (t, J = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.43 (m, 2H, ArH), 7.51 (d, J = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.61 (m, 1H, ArH), 8.85 (t, J = 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 10.51 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.4 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 40.0 (CH<sub>2</sub> with DMSO), 58.7 (CH), 119.5 (2CH), 123.8 (CH), 127.3 (CH), 128.6 (CH), 129.1 (2CH), 130.1 (CH), 132.3 (C), 132.9 (C), 135.2 (C), 137.3 (C), 149.4 (C), 171.2 (C), 177.8 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 408.1 (MH<sup>+</sup>), tr 4.37 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 56.17; H, 4.22; N, 10.34. Found: C, 56.12; H, 3.96; N, 10.24%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-cyclohexylmethylamide 1-phenylamide (184).



The general procedure was followed using *N*-(cyclohexylmethyl)pyroglutamide **172** (0.40 g, 1.78 mmol) and phenyl isocyanate (0.21 g, 1.78 mmol) in toluene (6 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The solution was then evaporated under reduce pressure, and the residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane (4/6) to generate pure product **184** as a white powder in 88% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 119 – 124°C, R<sub>*f*</sub> (EtOAc/*n*-heptane 5/5) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 0.85-0.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.08-1.28 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.45 (sym m, 1H, CH), 1.60-1.74 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.15-2.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55-2.62 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.00-3.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CONHCH<sub>2</sub>), 4.79 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.59 (s, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.47 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 10.56 (br s, 1H, NCONH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.6 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (2CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 30.8 (2CH<sub>2</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 38.0 (CH<sub>2</sub>), 46.0 (CH), 59.4 (CH), 120.5 (2CH), 124.6 (CH), 129.1 (2CH), 137.1 (C), 150.6 (C), 170.3 (C), 177.8 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 344.2 (MH<sup>+</sup>), tr 4.16 min. Anal. calcd for C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 66.45; H, 7.34; N, 12.24. Found: C, 66.71; H, 7.42; N, 11.68%.

5-Oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-[(2,4-dichlorophenyl)amide] 1-phenylamide (185).



The general procedure was followed using 5-oxo-pyrrolidine-2-carboxylic acid (2,4dichlorophenyl)amide **111** (0.90 g, 3.3 mmol) and phenyl isocyanate (0.39 g, 3.3 mmol) in toluene (10 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 20 h. After cooling to room temperature a few amount of methanol was added. The precipitate was then filtered and recrystallized from methanol to generate pure product **185** as a white powder in 81% yield; mp (MeOH) 213 – 216°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.8. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.98-2.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.38-2.48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.60-2.81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.08 (dd, *J* = 5.6, 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar*H*), 7.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar*H*), 7.42 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.51 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar*H*), 7.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar*H*), 10.08 (br s, 1H, N*H*), 10.51 (br s, 1H, N*H*). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.4 (CH<sub>2</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 58.8 (CH), 119.6 (2CH), 123.9 (CH), 127.3 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (CH), 129.0 (C), 129.1 (2CH), 129.7 (C), 133.6 (C), 137.2 (C), 149.3 (C), 170.2 (C), 177.8 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 392.1 (MH<sup>+</sup>), tr 4.38 min. Anal. calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 55.12; H, 3.85; N, 10.71. Found: C, 54.91; H, 3.89; N, 10.75%.

CHAPITRE VII :

### **STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 5**

Pour la synthèse des composés de la série 2,5,6,7-tetrahydro-3*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,2,4]triazol-3-one (série 2), plusieurs voies de synthèse ont été initiées et sont, pour la plupart, toujours en cours d'études du fait des difficultés rencontrées. Comme pour les autres séries, la matière première utilisée est le PGM **49** ; la principale difficulté de cette synthèse se situe au niveau de la cyclisation en triazole accolé à la pyrrolidine.

I- Synthèse des composés de la série 5



Schéma 47. Voies de synthèse développées pour l'obtention des composés de la série 5.

La première voie de synthèse compte 5 étapes pour aboutir aux composés désirés. Cependant, les conditions réactionnelles testées jusqu'à maintenant pour la cyclisation en triazole (étape 3) n'ont pas abouties. D'autres conditions de réaction sont donc envisagées et seront étudiées dans la suite de ce projet.

En parallèle de la voie 1, la voie 2 (subdivisée en deux voies : 2.a et 2.b) a été étudiée. En effet, à partir de l'iminoéther (obtenu à partir du PGM), il est possible de synthétiser des amidrazones. Puis, en suivant la voie 2.a, une réaction d'amidification de la fonction ester permet d'aboutir aux amides correspondant, à partir desquels une dernière étape de cyclisation permet d'obtenir les composés finaux. Cependant, des problèmes de dégradation spontanée ont été observés pour les amidrazones, et la dernière étape n'a pas pu être testée. Pour contourner ces problèmes de dégradation, nous avons donc essayé de cycliser ces amidrazones avant de réaliser la réaction d'aminolyse de la fonction ester (voie 2.b). Cependant, ces composés n'ont pas été obtenus avec les conditions utilisées. Une mise au point de cette réaction est donc nécessaire.

Une troisième voie de synthèse (voie 3) a donc été mise en place. Globalement, le type de synthèse reste semblable à la voie 2 ; seul l'ordre des réactions diffère. Dans cette voie nous avons utilisé les pyroglutamides décrits dans les chapitres précédents. A partir de ces composés, une réaction d'éthérification pourrait conduire aux iminoéthers correspondants. A ce jour, seule l'utilisation du sulfate de diméthyle a été étudiée pour la synthèse de ces composés, et nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés. Nous envisageons donc d'utiliser le tétrafluoroborate de triéthyloxonium comme réactif de substitution à ce niveau de la synthèse. En effet, ce réactif est couramment utilisé pour ce type de réactions. Une fois ces dérivés obtenus, il est possible de rattraper la voie 2.a pour aboutir aux composés finaux.

### II- Description des voies de synthèse

### II-1- Description de la voie de synthèse 1

Cette voie de synthèse utilise le PGM **49** comme synthon de départ. A partir de ce composé, une alkylation de l'oxygène du lactame permet d'aboutir au composé **187** qui subit ensuite une attaque de sa fonction iminoéther par le carbazate de méthyle pour donner l'intermédiaire **188**. A partir de ce composé, il est, a priori, possible de cycliser le carbazate sur l'azote du cycle pyrrolidine pour obtenir le bicycle souhaité **189**, à partir duquel un couplage au cuivre, puis une réaction d'aminolyse devraient conduire aux molécules envisagées.



**Schéma 48.** Réactions générales de la voie 1 : (i) éthérification ; (ii) addition-élimination nucléophile ; (iii) cyclisation intramoléculaire ; (iv) couplage de type Buchwald ; (v) aminolyse.

### *II-1-1- Synthèse de l'iminoéther 187 par éthérification du carbonyle cyclique du PGM 49*

Le composé **187** est obtenu par éthérification du pyroglutamate de méthyle. Cette réaction est réalisée dans le sulfate de diméthyle (introduit en léger excès) à 60°C sous atmosphère d'azote. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé par introduction d'un léger excès de triéthylamine.<sup>300</sup>



Schéma 49. Réactifs et conditions : (ia) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>, 60°C, 12 h ; (ib) Et<sub>3</sub>N, éther diéthylique, 0°C, 80%.

Cette réaction a été réalisée à partir de plusieurs centaines de grammes de PGM **49**, et le composé **187** a été obtenu avec un rendement de 80% qui est en accord avec la littérature.<sup>300</sup>

# II-1-2- Synthèse de l'amidrazone 188 par condensation du carbazate de méthyle sur l'iminoéther 187

Cette réaction de substitution nucléophile fait intervenir le carbazate de méthyle qui attaque l'iminoéther du composé **187**. Elle est réalisée dans le méthanol à température ambiante sous atmosphère d'azote.



*Schéma 50. Réactifs et conditions : (ii)* NH<sub>2</sub>NHCOOCH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>, MeOH, T.A., 18 h, 60%.

Le rendement décrit pour ce composé est celui du produit pur isolé après recristallisation. La conversion de cette réaction est de l'ordre de 90% (suivi RMN) après une nuit de réaction à température ambiante. Les conditions de recristallisation de ce produit doivent donc être adaptées pour augmenter les rendements.

<sup>&</sup>lt;sup>300</sup> Fasseur, D. et al. *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 1285.

### II-1-3- Synthèse du bicycle 189 par cyclisation de l'amidrazone 188

Pour la synthèse du bicycle **189**, intermédiaire clé pour l'obtention des composés finaux envisagés dans cette série, différentes conditions réactionnelles ont été étudiées et sont illustrées dans le Schéma 51.



*Schéma 51. Réactifs et conditions : (iii)* « a » EtOH, reflux, 24 h, 0%, ou « b » Chlorobenzène, 115°C, 24 h, 0%, ou « c » Hexaméthyldisilazane, acide triflique, chlorobenzène, T.A. – reflux, 40 h, 0%.

La première méthode utilisée pour la cyclisation de ce composé (conditions « a ») consiste en un simple chauffage de l'amidrazone **188** dans l'éthanol à reflux. Cependant, aucune réaction n'est observée par analyse RMN du milieu réactionnel après 24 heures de chauffage.

Nous avons donc décidé d'utiliser un solvant ayant un point d'ébullition plus élevé : le chlorobenzène. Dans ces conditions (conditions « b »), le composé **188** est solubilisé dans le chlorobenzène chauffé à 115°C pendant 24 heures. A cette température, le suivi RMN de la réaction révèle une dégradation de l'amidrazone **188** en plusieurs produits secondaires non identifiés.

Dans le but de travailler dans des conditions plus douces, et ainsi éviter les problèmes de dégradation du composé de départ, nous avons réalisé un nouvel essai dans le chlorobenzène en présence d'hexaméthyldisilazane (HMDS), et d'une quantité catalytique d'acide triflique susceptible d'activer cette cyclisation (conditions « c ») (Ces conditions correspondent à celles utilisées au laboratoire pour des composés proches de structures proches). La réaction a débuté à température ambiante. Cependant, le manque de solubilité des composés à cette température nous a amené à chauffer le milieu réactionnel à 70°C ; température à laquelle la solution est limpide et homogène. La solution a donc été chauffée pendant 24 heures à cette température, mais aucun avancement n'a été constaté par RMN. Le milieu réactionnel a donc été chauffé au reflux du chlorobenzène pendant une nuit ; ce qui a, dans ce cas également, entraîné une dégradation de l'amidrazone **188**. Il sera donc nécessaire dans le futur que d'autres conditions de cyclisation de ces intermédiaires silylés soient expérimentées telles que l'utilisation d'une catalyse par l'ion fluorure.

Devant ces échecs, nous avons décidé d'étudier une autre voie de synthèse d'amidrazones (voie 2).

### II-2- Description de la voie de synthèse 2

Cette voie de synthèse utilise l'iminoéther **187** comme produit de départ. Il est mis en réaction avec des hydrazines aromatiques fraîchement préparées qui attaquent ensuite la fonction éther du composé **187** pour former des amidrazones. A partir de ces amidrazones, deux possibilités sont envisageables : la première consiste à réaliser une aminolyse de la fonction ester, avant de réaliser la cyclisation lors d'une dernière étape, alors que la seconde passe par la cyclisation de l'amidrazone en triazol-3-one avant de fonctionnaliser la partie droite de la molécule par une réaction d'aminolyse.



*Schéma 52. Réactions générales de la voie 2 : (i)* formation et réduction d'un sel de diazonium en hydrazine ; (*ii*) substitution nucléophile ; (*iii*) réaction d'aminolyse ; (*iv*) cyclisation.

### II-2-1- Synthèse des hydrazines aromatiques 190 et 191

Les hydrazines **190** et **191** ont été obtenues par réduction des sels de diazonium par le chlorure stanneux, formés à partir des anilines correspondantes en présence de nitrite de sodium. Ces réactions ont été réalisées en phase aqueuse acide en conservant une température inférieure à 5°C ; conformément aux conditions générales décrites dans la littérature.<sup>301</sup>

$$Ar-NH_2 \xrightarrow{ia} \left[Ar-N_2^+CI^-\right] \xrightarrow{ib} Ar-N_1-NH_2$$

*Schéma 53. Réactifs et conditions :* (*ia*) NaNO<sub>2</sub>, HCl 6N, T° < 5°C, 1 h ; (*ib*) SnCl<sub>2</sub>, HCl 12N, T° < 5°C, 2 h ; T.A., 18 h, 73 – 80%.

<sup>&</sup>lt;sup>301</sup> Gu, W. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4692.

Tableau 20. Rendements obtenus po	our les produits <b>190</b> et <b>191</b> .
-----------------------------------	---

Ligne	N° produit <sup>(litt.)</sup>	Ar	Rdt (%)
1	190 <sup>(302)</sup>	2,4-F <sub>2</sub> -Ph	73
2	191 <sup>(303)</sup>	4-F-Ph	80

Les produits **190** et **191** ont été obtenus avec de bons rendements qui sont en accord avec ceux décrits dans la littérature pour ce type de réaction.<sup>301</sup>

Une fois synthétisées, ces hydrazines ont pu être mises en réaction avec l'iminoéther **187** pour obtenir les amidrazones.

# II-2-2- Synthèse des amidrazones 194 à 197 par condensation des hydrazines aromatiques sur l'iminoéther 187

La synthèse des amidrazones **194** à **197** a été réalisée par condensation des hydrazines aromatiques (synthétisées précédemment ou commerciales) sur l'iminoéther **187**. Dans ces réactions, l'iminoéther joue à la fois le rôle de substrat et de solvant. Ces condensations sont réalisées à température ambiante pour éviter des réactions secondaires sur la fonction ester.



*Schéma 54. Réactifs et conditions : (ii)* ArNHNH<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, T.A., 24 h, 0 – 60%.

Ligne	N° réactif	N° produit	Ar	Rdt (%)
1	190	194	2,4-F <sub>2</sub> -Ph	53
2	192	195	Ph	23
3	193	196	2,6-Cl <sub>2</sub> -Ph	60
4	191	197	4-F-Ph	0

Tableau 21. Rendements obtenus pour les produits 194 à 197.

<sup>&</sup>lt;sup>302</sup> Banner, B. L. et al. US20070049632, **2007**.

<sup>&</sup>lt;sup>303</sup> Joshi, K. C. et al. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, *16*, 1141.

Malgré les conditions de réaction douces appliquées, des réactions secondaires se produisent lors de la synthèse de ces amidrazones, et cela explique les rendements moyens obtenus pour les composés **194** à **196** (Tableau 21, lignes 1 à 3). Le composé **197** (Tableau 21, ligne 4) n'a pas pu être isolé du mélange réactionnel complexe observé par RMN lors de cette réaction.

De plus, quelques jours ou quelques semaines après avoir purifié les composés obtenus, nous avons constaté une dégradation spontanée de ces molécules, sans pouvoir identifier les produits formés. Nous supposons que cette dégradation est due à la fonction amidrazones, probablement instable lorsqu'elle est substituée par ce type de groupement. Cela peut également expliquer les rendements moyens observés lors de ces synthèses.

Pour le développement de cette série, il serait donc judicieux de cycliser ces composés immédiatement après leur synthèse de façon à palier leur instabilité. Malgré ces observations, deux essais de réaction d'aminolyse ont été réalisés sur ces composés, de façon à voir si la présence de ce type de groupement sur la molécule permet d'obtenir des composés plus stables.

### II-2-3- Aminolyse de la fonction ester des dérivés amidrazones 195 et 196 : synthèse des composés 198 et 199

Ces réactions d'aminolyse ont été effectuées au reflux du dichlorométhane en présence d'un léger excès d'amine en milieu concentré.



Schéma 55. Réactifs et conditions : (iii) 2,4-dichlorobenzylamine, N<sub>2</sub>, DCM, reflux, 24 h, 0 – 41%.

Ligne	N° substrat	N° produit	Ar	Rdt (%)
1	195	198	Ph	0
2	196	199	2,6-Cl <sub>2</sub> -Ph	41

Tableau 22. Rendements obtenus pour les produits 198 et 199.

Le composé **199** a été obtenu avec un rendement modeste de 41% (Tableau 22, ligne 2). Cela s'explique par une réaction non totale, puisqu'environ 25% du substrat **196** a été récupérée lors de la purification. De plus, nous avons constaté la formation de produits secondaires, probablement issus de la dégradation de ce même substrat de départ. Pour la synthèse du composé **198** (Tableau 22, ligne 1), la dégradation du produit de départ **195** a été beaucoup plus importante, ce qui n'a pas permis d'obtenir le composé attendu. Seule une quantité infime de ce produit a été détectée lors de l'analyse du milieu réactionnel par LC-MS.

L'observation récurrente de ces problèmes de dégradation des amidrazones nous a donc amenés à étudier une autre voie de synthèse (voie 2.b) qui passe par une cyclisation des amidrazones avant de réaliser la réaction d'aminolyse. Cela pourra peut-être permettre d'augmenter la stabilité des composés intermédiaires qui pourront ensuite être mis en réaction dans les étapes suivantes, sans problème de dégradation.

### II-2-4- Cyclisation de l'amidrazone 196 : synthèse du composé 200

Dans le but de cycliser le composé **196** en son analogue fermé **200**, nous l'avons mis en réaction en présence de chloroformiate d'éthyle et d'un excès de carbonate de potassium dans le dichlorométhane en chauffant progressivement jusqu'à 40°C.



Schéma 56. Réactifs et conditions : (iv) chloroformiate d'éthyle, DCM, T.A. – 40°C, 48 h.

Le suivi RMN de cette réaction a permis d'observer, dans un premier temps, la formation probable d'un intermédiaire de réaction **201** (Schéma 57).



Schéma 57. Structure supposée de l'intermédiaire de réaction.

Après 24 heures de réaction à température ambiante, aucun changement n'étant observé par RMN, le milieu réactionnel a été chauffé à 40°C. Après 24 heures de chauffage à cette température, le milieu réactionnel a été analysé par LC-MS. Nous avons ainsi pu observer la formation de plusieurs produits, provenant notamment de dégradation, que nous n'avons pas pu caractériser, même si une quantité très faible du produit de cyclisation **200** a été identifiée par LC-MS, mais n'a pas pu être isolée.

Face à ces problèmes de dégradation spontanée des amidrazones, nous avons décidé d'abandonner ce type de méthode. En parallèle, une troisième voie de synthèse avait été initiée (voie 3 du schéma global de synthèse : *cf* premier paragraphe de ce chapitre). Cependant, ce schéma réactionnel passe également par la synthèse d'amidrazones ; ce qui peut poser les mêmes problèmes que précédemment. De plus, la première étape de cette synthèse (formation d'iminoéthers à partir des pyroglutamides et de sulfate de diméthyle) ayant échoué, nous avons décidé d'abandonner cette méthode. Nous présenterons cependant la seule tentative de réaction par cette voie.

### II-3- Description de la voie de synthèse 3

Le schéma réactionnel (Schéma 58) correspondant utilise les pyroglutamides synthétisés dans les séries précédentes. A partir de ces composés, la formation d'iminoéthers doit être réalisée. A ce jour, seul l'utilisation du sulfate de diméthyle a été étudiée sans permettre la synthèse des composés attendus. Cependant, il est envisagé d'utiliser le tétrafluoroborate de triéthyloxonium comme réactif ; cela ayant déjà été utilisé au laboratoire pour ce type de réactions.



Schéma 58. Réactions générales de la voie 3 : (i) éthérification ; (ii) substitution nucléophile ; (iii) cyclisation.

## II-3-1- Réaction du pyroglutamide 109 avec le sulfate de diméthyle: synthèse du composé 202

Cette réaction a été expérimentée au reflux de l'acétone en présence d'un léger excès de sulfate de diméthyle.



Schéma 59. Réactifs et conditions : (i) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, acétone, reflux, 24 h.

Cette réaction a été chauffée au reflux de l'acétone pendant 24 heures. Cependant, les suivis RMN et LC-MS n'ont pas révélé la formation du produit **202**, et nous avons décidé d'abandonner ce type de méthode.

En conclusion, la seule voie de synthèse qui semble envisageable consiste à faire réagir une hydrazide avec l'iminoether pyroglutamique, puis à cycliser l'amidrazone obtenue ; il sera donc nécessaire de trouver des conditions de réaction permettant de réaliser la cyclisation en triazolone **189** (Schéma 50). Un couplage de type Goldberg, puis une réaction d'aminolyse permettraient probablement d'obtenir les composés désirés.
**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 5** 

Experimental procedure for the synthesis of 5-methoxy-3,4-dihydro-2H-pyrrole-2-carboxylic acid methyl ester **187**:



Reagents and conditions: (i) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> atmosphere, 60°C, 12 h; (ii) Et<sub>3</sub>N, diethyl ether, 0°C, 80%.

A stirred mixture of methyl pyroglutamate **49** (200.00 g, 1.40 mol), and dimethyl sulfate (222.00 g, 1.76 mol) was heated at 60°C for 12 hours under nitrogen atmosphere. Upon cooling to room temperature, the mixture was added to an ice-cold solution of triethylamine (202.38 g, 2.00 mol) and diethyl ether (300 mL). After agitation with a polytron mixer, compound **187** was extracted four times with diethyl ether (500 mL) to generate a yellow oil sufficiently pure for the next step in 80% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>300 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.12-2.65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.75 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.52 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH).

Experimental procedure for the synthesis of 5-(methoxycarbonylhydrazono)pyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **188**:



*Reagents and conditions:* (*i*) NH<sub>2</sub>NHCOOCH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub> atmosphere, MeOH, r.t., 18 h, 60%.

To a solution of compound **187** (10.00 g, 0.064 mol) in methanol (30 mL), was added *N*-methoxycarbonylhydrazine (6.31 g, 0.070 mol). The mixture was then stirred at room temperature under nitrogen atmosphere overnight. The solution was then concentrated, and the residue was precipitated in diethyl ether. The solid was filtered, and recrystallized from diethyl ether/methanol (2/1 v/v) to give pure product **188** as a white solid in 60% yield; mp ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O/MeOH) 127 – 129°C, R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9/1) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.05-2.18 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.30-2.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.55-2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.2 (CH<sub>2</sub>), 28.2 (CH<sub>2</sub>), 52.4 (CH<sub>3</sub>), 52.7 (CH<sub>3</sub>), 58.6 (CH), 156.3 (C), 172.6 (C), 173.0 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 216.2 (MH<sup>+</sup>), tr 0.20 min. Anal. calcd for C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 44.65; H, 6.09; N, 19.53. Found: C, 44.50; H, 6.23; N, 19.78%.

#### **EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 5**

# General procedure for the synthesis of compounds 190 and 191:



*Reagents and conditions:* (*i*) NaNO<sub>2</sub>, HCl 6N, T < 5°C, 1 h; (*ii*) SnCl<sub>2</sub>, HCl 12N, T < 5°C, 2 h; (*iii*) r.t., 18 h, 73 – 80%.

To an ice-cooled solution (<5°C) of the appropriate aniline (1.00 equiv) in 6M HCl aqueous solution (40 mL), was slowly added sodium nitrite (1.05 equiv) diluted in water (8 mL), and the mixture was stirred for 1 hour. Tin dichloride (2.00 equiv) diluted in 12M HCl aqueous solution (25 mL) was then slowly added and the stirring was prolonged for 2 hours at the same temperature, and then at room temperature overnight. The precipitate obtained was filtered, and washed successively with 12M HCl aqueous solution, 2M NaOH aqueous solution and water. Products were sufficiently pure to be used in the next step.

#### (2,4-Difluorophenyl)hydrazine (190).



The general procedure was followed using (2,4-difluoro)aniline (5.00 g, 0.039 mol), sodium nitrite (2.83 g, 0.041 mol), and tin dichloride (14.79 g, 0.078 mol). Compound **190** was obtained as light brown crystals in 73% yield, with the same physicochemical characteristics as described;<sup>302 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.30 (s, 1H, NH), 6.78 (m, 2H, ArH), 7.05 (m, 1H, ArH).

# (4-Fluorophenyl)hydrazine (191).



The general procedure was followed using (4-fluoro)aniline (15.00 g, 0.135 mol), sodium nitrite (9.78 g, 0.142 mol), and tin dichloride (51.20 g, 0.270 mol). Compound **191** was obtained as a lavender powder in 80% yield, with the same physicochemical characteristics as described;<sup>303 1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.55 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.15 (s, 1H, NH), 6.75 (br s, 2H, ArH), 6.91 (br s, 2H, ArH).

General procedure for the synthesis of compounds 194 to 196:



*Reagents and conditions:* (*i*) ArNHNH<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> atmosphere, r.t., 24 h, 23 – 60%.

A solution of iminoether **187** (1.0 equiv), and the appropriate phenylhydrazine (1.0 equiv) was stirred for 24 hours at room temperature under nitrogen atmosphere. The solution was then evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column.





The general procedure was followed using iminoether **187** (2.18 g, 0.014 mol), and (2,4difluorophenyl)hydrazine **190** (2.00 g, 0.014 mol). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH to generate pure product **194** as a red oil in 53% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.5. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.39 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.26 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.70 (s, 2H, 2NH), 6.76 (m, 2H, ArH), 7.11 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.4 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 52.5 (CH<sub>3</sub>), 103.0 (t, *J* = 90 Hz, CH), 110.8 (dd, *J* = 86.8, 15.6 Hz, CH), 116.0 (CH), 133.0 (d, *J* = 40.4 Hz, C), 151.7 (d, *J* = 43.2 Hz, CH), 154.6 (C), 157.0 (C), 161.2 (C), 173.0 (C). LC-MS (APCl<sup>+</sup>) m/z: 270.1 (MH<sup>+</sup>), tr 2.42 min.

### Methyl 5-(2-phenylhydrazono)pyrrolidine-2-carboxylate (195).



The general procedure was followed using iminoether **187** (10.00 g, 0.064 mol), and phenylhydrazine (6.88 g, 0.064 mol). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting EtOAc/*n*-heptane to generate pure product **195** as a red powder in 23% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.8/0.2) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.35 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 5.56 (s, 2H, 2NH), 6.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, ArH), 6.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, ArH), 7.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, ArH). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 234.2 (MH<sup>+</sup>), tr 2.22 min.





The general procedure was followed using iminoether **187** (4.87 g, 0.031 mol), and (2,6dichlorophenyl)hydrazine (5.49 g, 0.031 mol). The residue was separated by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH to generate pure product **196** as a yellow oil in 60% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.9/0.1) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.73 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.28 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.84 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ (ppm) 26.2 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 57.9 (CH), 123.3 (2C), 125.4 (CH), 128.5 (2CH), 142.3 (C), 164.1 (C), 172.7 (C). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 302.1 (MH<sup>+</sup>), tr 2.23 min.

*Experimental procedure for the synthesis of N-(2,4-dichlorobenzyl)-5-(2-(2,6-dichlorophenyl)hydrazonopyrrolidine-2-carboxamide* **199**:



Reagents and conditions: (i) 2,4-dichlorobenzylamine, N<sub>2</sub> atmosphere, DCM, reflux, 24 h, 41%.

To a solution of compound **196** (1.65 g, 0.0055 mol) in dichloromethane (2 mL), was added 2,4dichlorobenzylamine (1.14 g, 0.0065 mol), and the mixture was heated under reflux for 24 hours under nitrogen (inert atmosphere). Upon cooling to room temperature, the mixture was concentrated and the residue was washed with heptane then diethylether. The product was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (95/5) to generate pure product **199** as a yellow oil in 41% yield; R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 9.5/0.5) = 0.3. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) 2.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.63 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.36 (m, 1H, ArH), 7.03 (m, 1H, ArH), 7.23 (m, 1H, ArH), 7.40 (m, 1H, ArH), 7.50 (m, 2H, ArH). LC-MS (APCI<sup>+</sup>) m/z: 447.1 (MH<sup>+</sup>), tr 2.90 min.

CHAPITRE VIII :

# STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 6

La série des 6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[2,1-c][1,2,4]triazol-3-ylamines (série 6) est une série analogue à la série 5 (*cf* chapitre précédent) qui résulte d'une modification du bicycle 2,5,6,7tetrahydro-3*H*-pyrrolo[2,1-c][1,2,4]triazol-3-one. Cette nouvelle série a été initiée en même temps que la série 5, et des difficultés similaires de synthèse ont été rencontrées. De ce fait, cette série n'est qu'au début de son développement, et nous recherchons actuellement des conditions réactionnelles nous permettant d'obtenir aisément les intermédiaires de réaction.

## I- Synthèse des composés de la série 6

Deux stratégies ont été conçues à partir de l'iminoéther **187**, permettant la synthèse des composés de cette série, avec globalement les mêmes réactions chimiques envisagées que pour la série précédente (série 5).

Une première méthode (voie 1) fait intervenir le dithiocarbazate de méthyle lors de la première étape, dans une réaction d'addition nucléophile pour obtenir l'analogue soufré **204** du composé **188** (*cf* chapitre précédent II-1-2-). A partir de cet intermédiaire, une cyclisation intramoléculaire permettrait d'aboutir à la formation du bicycle, dont le thiocarbonyle peut-être transformé en son thioéther correspondant sur lequel nous pourrions faire réagir différentes amines aromatiques, avant de réaliser une réaction d'aminolyse qui nous permettrait d'obtenir les composés finaux envisagés dans cette série.

Une autre stratégie (voie 2), plus courte, consiste à faire réagir lors d'une première étape des thiosemicarbazides sur l'iminoéther **187**. Puis, une étape de cyclisation est nécessaire avant de réaliser l'aminolyse de la fonction ester de ces intermédiaires.



Schéma 60. Voies de synthèse développées pour l'obtention des composés de la série 6.

## II- Description des voies de synthèse

## II-1- Description de la voie de synthèse 1

Selon cette méthode, nous avons choisi de travailler avec le dithiocarbazate de méthyle. En effet, les difficultés de cyclisation rencontrées lors de l'utilisation du carbazate de méthyle **188** (*cf* chapitre précédent II-1-2-) nous ont amenés à utiliser l'analogue soufré de ce composé, censé être plus réactif, et donc plus facilement cyclisable. Pour cela, nous avons dû préalablement synthétiser le dithiocarbazate de méthyle, réactif utilisé lors de la première étape.



**Schéma 61.** Réactions générales de la voie 1 : (i) addition nucléophile ; (ii) cyclisation ; (iii) éthérification ; (iv) substitution nucléophile ; (v) aminolyse.

# II-1-1- Synthèse du dithiocarbazate de méthyle 203

Le dithiocarbazate de méthyle **203** est obtenu par réaction de l'hydrate d'hydrazine sur le disulfure de carbone. Cette réaction est réalisée dans l'isopropanol en présence d'iodure de méthyle à une température maintenue en dessous de 10°C, selon des conditions décrites.<sup>304</sup>

$$H_2N-NH_2,H_2O \xrightarrow{i} H_2N \xrightarrow{H} S \xrightarrow{S} 203$$

Schéma 62. Réactifs et conditions : (i) CS<sub>2</sub>, KOH, isopropanol / eau, 0 – 10°C, 3 h, 56%.

Le composé **203** a été obtenu avec un rendement de 56% qui est conforme à celui décrit dans la littérature.<sup>304</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>304</sup> Klayman, D. L. et al. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 855.

# II-1-2- Addition nucléophile du dithiocarbazate de méthyle 203 sur l'iminoéther 187 : synthèse du composé 204

Le composé **204** est obtenu par addition nucléophile du dithiocarbazate de méthyle **203** sur l'iminoéther **187**. Cette réaction est réalisée à température ambiante sans solvant.



Schéma 63. Réactifs et conditions : (i) dithiocarbazate de méthyle, T.A., 16 h, 20%.

Lors de cette réaction, nous avons observé, lors des suivis CCM et RMN, la formation de plusieurs produits secondaires. L'analyse du milieu réactionnel par LC-MS nous a permis d'identifier la formation du produit désiré qui a été purifié par Flash Chromatography. Cependant, les impuretés présentes dans le milieu réactionnel rendent les purifications très difficiles, menant ainsi à de faibles rendements (R = 20%) en produit isolé. De plus, il est parfois nécessaire de réaliser plusieurs purifications, ce qui tend également à faire diminuer les rendements. Nous sommes donc actuellement dans une phase d'optimisation des conditions de réaction, dans le but d'aboutir à des milieux réactionnels plus simples à purifier ; étape nécessaire avant d'aller plus loin dans cette voie. Une autre solution pourrait être d'utiliser l'analogue synthétisé à partir du carbazate de méthyle, le composé **188** (*cf* chapitre précédent II-1-2-).

#### II-2- Description de la voie de synthèse 2

La première étape de cette voie de synthèse consiste à faire réagir des semicarbazides, ou thiosemicarbazides aromatiques sur l'iminoéther **187**. Ces intermédiaires pourront ensuite être cyclisés, avant d'être engagés dans une dernière réaction d'aminolyse de leur fonction ester.



Schéma 64. Réactions générales de la voie 2 : (i) transformation d'une amine en semicarbazide ; (ii) addition nucléophile ; (iii) cyclisation ; (iv) aminolyse.

# II-2-1- Synthèse des semicarbazides aromatiques 205 à 207 à partir des anilines correspondantes

Les composés 205 à 207 ont été synthétisés par réaction de l'hydrate d'hydrazine sur le carbamate formé par réaction entre l'amine et le chloroformiate de phényle. Cette réaction est réalisée dans le dichlorométhane en présence de pyridine. L'étape de formation du carbamate est réalisée à température ambiante, puis le milieu réactionnel est chauffé à reflux pour faire réagir l'hydrazine.<sup>305,306,307</sup>



Schéma 65. Réactifs et conditions : (i) chloroformiate de phényle, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, T.A., 4 h; (ii) H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O), reflux, 24 h, 0 – 50%.

Ligne	N° produit <sup>(litt.)</sup>	Ar	Rdt (%)
1	205 <sup>(307)</sup>	Ph	50
2	206 <sup>(308)</sup>	3,4-MeO <sub>2</sub> -Ph	10
3	207 <sup>(307)</sup>	3-CF <sub>3</sub> -Ph	0

Tableau 23. Rendements obtenus pour les produits 205 à 207.

<sup>&</sup>lt;sup>305</sup> Liu, Y. et al. *Molecules* **2011**, *16*, 4527.

 <sup>&</sup>lt;sup>306</sup> Thirumurugan, R. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3106.
 <sup>307</sup> Beukers, M. W. et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1492.

<sup>&</sup>lt;sup>308</sup> Baohui, Q. et al. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. **2013**, 346, 596.

Les faibles rendements obtenus (Tableau 23) sont principalement dus à des réactions secondaires menant à la formation de dimères (Schéma 66) observés par LC/MS et par RMN. Ces composés, dont le mécanisme de formation est illustré dans le Schéma 66, proviennent de la réaction de l'aniline n'ayant pas réagi sur le carbamate formé lors de la première étape. Ces réactions secondaires peuvent être diminuées en introduisant l'amine en défaut. Cependant, l'absence de réaction dans le cas du composé **207** (Tableau 23, ligne 3) ne peut être expliquée par ce phénomène. Il est probable qu'il y ait eu un problème au niveau des conditions de réaction ; il sera donc nécessaire de répéter cette synthèse.



*Schéma 66.* Mécanisme de formation des sous-produits identifiés lors de la synthèse des semicarbazides **205** à **207**.

## II-2-2- Condensation des thiosemicarbazides sur l'iminoéther

Il s'agit d'une réaction de condensation du thiosemicarbazide sur l'iminoéther **187**. Celle-ci est réalisée dans le méthanol ou sans solvant à température ambiante.



Schéma 67. Réactifs et conditions : (i) 4-chlorophényl thiosemicarbazide, sans solvant ou MeOH, T.A., 24 h.

Deux essais ont étaient réalisés pour la synthèse du composé **208**. Un premier dans le méthanol, et un second sans solvant. Cependant, aucune de ces conditions n'a permis d'obtenir le produit voulu. Des problèmes de solubilité dans le méthanol pour le thiosemicarbazide à température ambiante ont été rencontrés, ne donnant aucune réaction. Lors de l'essai sans solvant, un produit a été formé, mais le spectre RMN de cette substance ne correspond pas à celui du produit attendu, mais semble correspondre à la formation d'un dimère du thiosemicarbazide.

Nous recherchons toujours de nouvelles conditions de réaction en vue de l'obtention de composés de ce type ; ceux-ci nous permettant potentiellement d'aboutir aux composés finaux.

Cependant, il semble que la voie la plus prometteuse pour l'accès aux composés finaux des séries 5 et 6, soit celle qui utilise le carbazate de méthyle **188** (*cf* chapitre précédent II-1-2-). La difficulté réside au niveau de sa cyclisation qui n'est pas encore mise au point.

**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 6** 

#### Experimental procedure for the synthesis of methyl hydrazinecarbodithioate 203:

Carbon disulfide (49.92 g, 0.66 mol) was added dropwise (2 hours) to an ice-cooled mixture of hydrazine hydrate (98%) (32.84 g, 0.66 mol), potassium hydroxide (36.80 g, 0.66 mol) in water (53 mL), and isopropanol (64 mL) at  $0 - 10^{\circ}$ C. The stirring was prolonged for 1 hour after the end of adding carbon disulfide giving a yellow solid. Iodomethane (93.12 g, 0.66 mol) was added to give a white precipitate. The mixture was stirred for an additional hour, and the solid was filtered and washed with cold water (10°C). The crude product was recrystallized from dichloromethane to afford colorless methyl hydrazinecarbodithionate **203** in 56% yield, with the same physicochemical properties as described.<sup>304</sup>

Experimental procedure for the synthesis of 5-(methoxycarbonylhydrazono)pyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **204**:



*Reagents and conditions:* (*i*) NH<sub>2</sub>NHCSSCH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub> atmosphere, r.t., 16 h, 20%.

A mixture of iminoether **187** (23.15 g, 0.15 mol) and compound **203** (18.00 g, 0.15 mol) was stirred for 24 hours at room temperature under nitrogen atmosphere. The product was then purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH to give pure product **204** as a green oil in 20% yield; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.49 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.82 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH).

General procedure for the synthesis of compounds 205 and 206:



*Reagents and conditions:* (*i*) phenyl chloroformate, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 4 h; (*ii*) H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O), reflux, 24 h, 10 – 50%.

To a mixture of the appropriate aniline (1.0 equiv), pyridine (1.2 equiv) in DCM (30 mL), phenyl chloroformate (1.0 equiv) was added dropwise under ice-water bath and reacted at room temperature for 4 hours. The mixture was then evaporated under reduced pressure, and the residue was poured into saturated NaCl solution. The obtained precipitate was filtered and dried under vacuum. A mixture of the solid and hydrazine monohydrate (98%, 1.0 equiv) was refluxed for 12 hours. After cooling to room temperature, the precipitate was filtered and recrystallized from EtOH or water.

N-Phenylhydrazinecarboxamide (205).



The general procedure was followed using aniline (4.66 g, 0.050 mol), phenyl chloroformate (7.83 g, 0.050 mol), pyridine (4.90 g, 0.062 mol), and hydrazine hydrate (15 mL). The residue was then recrystallized from EtOH to give pure product **205** as white crystals in 50% yield, with the same physicochemical properties as described.<sup>307</sup>

# N-(3,4-Dimethoxyphenylhydrazine)carboxamide (206).



The general procedure was followed using 3,4-dimethoxyaniline (5.00 g, 0.033 mol), phenyl chloroformate (5.11 g, 0.033 mol), pyridine (3.13 g, 0.040 mol), and hydrazine hydrate (10 mL). The residue was then recrystallized from water to give pure product **206** as a yellow powder in 10% yield, with the same physicochemical properties as described.<sup>308</sup>

CHAPITRE IX :

# **STRATEGIE DE SYNTHESE - SERIE 7**

La conception de cette série des hydantoïnes (série 7) provient de l'identification des produits secondaires obtenus lors des réactions d'aminolyse réalisées sur des *N*-arylcarbamoyle pyroglutamates de méthyle (*cf* § II-1-2- du chapitre « STRATEGIE DE SYNTHESE – SERIE 4»). L'obtention de ces composés, issus du réarrangement de la pyrrolidone en hydantoïne, est illustrée dans le Schéma 68.



*Schéma 68.* Réaction générale de formation des hydantoïnes substituées par réaction entre une amine et un pyroglutamate de méthyle portant un groupe N-arylcarbamoyle.

Cette série n'est qu'au début de son développement et, pour le moment, peu de composés ont été synthétisés. Les substituants sélectionnés sont ceux de la littérature qui donnent lieu à de bonnes activités dans des séries similaires.<sup>258,259</sup> Le but est d'obtenir un premier groupe de composés, et d'orienter le développement de cette série en fonction des premiers résultats pharmacologiques.

# I- Synthèse des composés de la série 7

Au sein de cette série, deux sous-séries ont été développées en faisant varier la position de la fonction amide sur la chaîne latérale en position 4 du cycle hydantoïne (Schéma 69).



Schéma 69. Structures générales des sous-séries A et B développées dans la série 7.

Dans un premier temps, nous avons souhaité développer des composés analogues aux produits secondaires qui avaient été identifiés précédemment (Schéma 70). Pour aboutir aux composés substitués par une chaîne propionique (sou-série A), 3 voies de synthèse ont été développées : la *N*-acylurée **158**, après avoir subi un réarrangement en hydantoïne, est soumise à une réaction d'aminolyse (voie 1). Alternativement, il est possible d'hydrolyser la fonction ester de l'hydantoïne formée, et d'engager l'acide carboxylique correspondant dans un couplage peptidique (voie 2). Enfin, comme la littérature montre que dans des séries proches un groupe *N*-méthyle est préférable à un NH en position 3 du cycle, l'hydantoïne intermédiaire peut être *N*-méthylée, avant d'être engagée dans une réaction d'aminolyse (voie 3).



**Schéma 70.** Voies de synthèse développées pour l'obtention des composés de la sous-série A. (i) réarrangement ; (ii) amidification ; (iii) clivage de l'ester ; (iv) N-méthylation.

La sous-série B a été développée dans le but de faire varier la taille du tenseur séparant le cycle hydantoïne de la fonction amide (Schéma 71). Pour le développement de ces composés, une stratégie de synthèse linéaire a été mise en place à partir des données de la littérature sur la synthèse de certaines hydantoïnes.<sup>309</sup> Les deux premières étapes de protection / déprotection permettent de greffer un groupement *N*-méthyle sur le carbone central du malonate de diéthyle puis, la réaction de cet intermédiaire avec un isocyanate entraîne une cyclisation intramoléculaire en cycle hydantoïne. Ce dernier est ensuite engagé dans une réaction d'aminolyse.

<sup>&</sup>lt;sup>309</sup> Carr, G. et al. J. Med. Chem. Lett. **2008**, 51, 2634.



**Schéma 71.** Voies de synthèse développées pour l'obtention des composés de la sous-série B. (i) substitution nucléophile ; (ii) débenzylation ; (iii) cyclisation ; (iv) amidification.

Dans un premier temps, nous présenterons la synthèse des composés de la sous-série A en discutant les différentes stratégies de synthèse utilisées. Le développement de la sous-série B sera ensuite présenté.

# II- Synthèse des composés de la sous-série A

# II-1- Réarrangement des pyroglutamates en hydantoïnes : synthèse du composé 209

Le réarrangement des pyroglutamates en hydantoïnes est décrit dans la littérature,<sup>273,310</sup> mais reste assez peu documenté. Il est observé lors de la réaction d'un ester pyroglutamique sur un isocyanate en conditions basiques, selon un mécanisme illustré dans le Schéma 72.



*Schéma 72.* Réarrangement des esters pyroglutamiques en hydantoïnes par réaction avec un isocyanate en conditions basiques.

<sup>&</sup>lt;sup>310</sup> Dieltiens, N. et al. J. Org. Chem. **2006**, 71, 3863.

Dans notre cas, nous avons observé ce réarrangement en conditions acides (*cf* § II-1-2- du chapitre « STRATEGIE DE SYNTHESE – SERIE 4»), ce qui, à notre connaissance, n'est pas décrit dans la littérature. Cela nous a donc mené à réaliser une étude méthodologique pour la mise au point du réarrangement des pyroglutamates en hydantoïnes en conditions acides.



Schéma 73. Réactifs et conditions : (i) cf Tableau 24.

 Tableau 24. Conditions réactionnelles étudiées pour la synthèse du composé 209.

Ligne <sup>(litt.)</sup>	Acide (nbe d'équiv.)	Base (nbe d'équiv)	MeOH	Solvant	Température °C	Durée (h)	Rdt (%)
1	x	x	Excès	Dichloroéthane	80	40	0
2	APTS (0,1)	x	Excès	Dichloroéthane	80	120	56
3	APTS (0,1)	x	Excès	NMP	120	70	5
4	x	MeONa (excès)	Excès	THF	Reflux	40	0
5 <sup>(273)</sup>	x	NaH (1,1)	x	THF	Т.А.	16	70

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si la présence d'un acide dans le milieu réactionnel était nécessaire. Nous avons donc comparé deux conditions de réaction (Tableau 24, lignes 1 et 2) identiques en tout point, à l'exception de la présence (Tableau 24, ligne 2) ou de l'absence d'APTS (Tableau 24, ligne 1) dans le milieu. Cela a permis de montrer que l'APTS intervient, puisque en son absence il n'y a aucune réaction, alors qu'en présence de 0,1 équivalent on obtient un rendement de 56%. Il est important de noter que le produit de départ est récupéré à hauteur de 27% en fin de réaction, et que les 17% restant correspondent au produit de départ hydrolysé (nous avons utilisé de l'APTS hydraté comme catalyseur) (Schéma 74) que nous avons simplement identifié par RMN. Dans le but d'augmenter ce rendement et de diminuer les temps de réaction en chauffant plus fort, nous avons utilisé la *N*-méthylpyrrolidone comme solvant au lieu du dichloroéthane (Tableau 24, ligne 3). Dans ces conditions, nous n'avons obtenu qu'un rendement de 5% en 70

heures. Le produit majoritaire de la réaction étant l'acide **210** (Schéma 74) formé à hauteur de 50%. Le reste correspond au produit de départ **158** qui n'a pas réagi.

Ces conditions ont ensuite été comparées à celles de la littérature<sup>273</sup> (Tableau 24, ligne 5) qui montrent un meilleur rendement que pour nos essais en conditions acides. Des conditions analogues à celles de la littérature ont été étudiées en utilisant le méthanolate de sodium (Tableau 24, ligne 4) à la place de l'hydrure de sodium. Cependant, aucune réaction ne s'est produite dans ces conditions. Au vu des résultats obtenus, les conditions utilisant l'hydrure de sodium sont les meilleures en termes de rendement et de durée de réaction. Cependant, le rendement de 56% obtenu en conditions acides (Tableau 24, ligne 2) est encourageant, et il serait intéressant de réaliser une étude en faisant varier l'acide utilisé ainsi que le nombre d'équivalents.



Schéma 74. Structure du composé 210.

# II-2- Description de la voie de synthèse 1 pour les composés de la sous-série A

A partir de l'hydantoïne **209**, synthétisée précédemment par réarrangement du pyroglutamate **158**, une réaction d'aminolyse de la fonction ester a été effectuée dans le but d'aboutir aux produits cibles **210 - 211** envisagés. Cette amidification de la fonction ester est réalisée au reflux de l'acétonitrile en présence d'APTS (Schéma 75).



Schéma 75. Réactifs et conditions : (ii) RNH<sub>2</sub>, APTS, CH<sub>3</sub>CN, reflux, 72 heures.

Ligne	R	N° produit	Rdt (%)	N° sous-produit	Rdt (%)
1	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	210	0	183	14
2	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	211	0	212	0

Tableau 25. Rendements obtenus pour les produits 210 à 212.

Lors des deux essais réalisés (Tableau 25, lignes 1 et 2), les produits souhaités n'ont pas été obtenus et le produit de départ a été récupéré en fin de réaction. Cela montre la faible réactivité de la fonction ester, et donc la nécessité d'utiliser une stratégie de synthèse différente. Cependant, lors de la réaction entre la 2,4-dichlorobenzylamine et l'hydantoïne **209**, nous avons constaté la formation, avec un rendement de 14%, du produit **183** (Tableau 25, ligne 1) qui provient d'une réaction inverse de réarrangement de l'hydantoïne en pyrrolidone (le composé **183** est décrit dans le chapitre « *EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 4* »). Comme la littérature décrit des réactions de cyclisation intramoléculaire pour des composés de structures analogues dans l'acétonitrile en présence d'une base (Schéma 76),<sup>311</sup> nous pouvons proposer le mécanisme illustré dans le Schéma 77 pour la formation du produit **183**, dans lequel la 2,4-dichlorobenzylamine joue le rôle de base.



Schéma 76. Réaction de cyclisation intramoléculaire décrite dans la littérature.<sup>311</sup>



Schéma 77. Mécanisme supposé de formation du composé 183 à partir de l'hydantoïne 209.

<sup>&</sup>lt;sup>311</sup> Paz, J. et al. J. Org. Chem. **2010**, 75, 8039.

Suite à ces deux échecs, nous avons décidé d'utiliser la seconde stratégie de synthèse (voie 2) passant par la transformation de cette fonction ester en acide carboxylique, à partir duquel un couplage peptidique permet d'aboutir aux produits finaux.

# II-3- Description de la voie de synthèse 2 pour les composés de la sous-série A

Cette voie de synthèse comporte deux étapes à partir de l'ester **209** qui est transformé en acide, avant d'être engagé dans un couplage peptidique pour aboutir aux composés finaux.



Schéma 78. Réactions générales de la voie 2 : (i) clivage de la fonction ester ; (ii, iii) couplage peptidique.

# II-3-1- Clivage de la fonction ester du composé 209

Pour le clivage de la fonction ester du composé **209**, nous avons utilisé des conditions générales de clivage d'un groupe ester décrites dans la littérature,<sup>312</sup> nous permettant de ne pas faire intervenir une base (Schéma 76). Cette réaction est réalisée en présence de chlorotriméthylsilane et d'iodure de sodium, au reflux de l'acétonitrile.



Schéma 79. Réactifs et conditions : (i) Me<sub>3</sub>SiCl, NaI, CH<sub>3</sub>CN, reflux, 16 h, 90% ; (ii) H<sub>2</sub>O, 20°C.

Ces conditions nous ont permis d'obtenir l'acide carboxylique **213** avec un très bon rendement de 90%, et sans réaction secondaire.

<sup>&</sup>lt;sup>312</sup> Olah, G. A. et al. J. Org. Chem. **1979**, 44, 1247.

# II-3-2- Synthèse de l'amide 210 par couplage peptidique

Cette étape consiste à faire réagir l'acide carboxylique **213** avec la dicyclohexyl carbodiimide (DCC) pour former un ester activé sur lequel la 2,4-dichlorobenzylamine vient réagir pour former l'amide **210**. Cette réaction est réalisée à température ambiante dans l'acétonitrile.<sup>278</sup>



*Schéma 80. Réactifs et conditions : (ii)* 2,4-dichlorobenzylamine, DCC, CH<sub>3</sub>CN (1 mL/2 mmol), T.A., 4 heures ; (*iii*) EtOAc/MeOH/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, T.A., 1 nuit.

Par cette méthode, nous avons pu observer une conversion de 70% du produit de départ en produit cible par suivi RMN du milieu réactionnel. Le produit est actuellement en cours de purification.

# II-4- Description de la voie de synthèse 3 pour les composés de la sous-série A

Cette voie de synthèse comporte également deux étapes à partir de l'hydantoïne **209**. La première étape est une réaction de méthylation qui est suivie par une réaction d'aminolyse de l'ester méthylique.



Schéma 81. Réactions générales de la voie 3 : (i) N-méthylation ; (ii) aminolyse.

# II-4-1- N-méthylation de l'hydantoïne 209

Cette réaction de *N*-méthylation de l'hydantoïne **209** est réalisée dans l'acétone en présence de carbonate de potassium et d'un excès d'iodure de méthyle selon des conditions décrites dans la littérature.<sup>313</sup>



*Schéma 82. Réactifs et conditions : (i)* CH<sub>3</sub>I, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acétone, 0°C – T.A., 18 h, 70%.

Dans ces conditions, le composé **214** est obtenu avec un rendement de 70% qui est dans la gamme des rendements décrits dans la littérature.<sup>313</sup>

# II-4-2- Amidification de la fonction ester du composé 214

Cette étape consiste à faire réagir la 2,4-dichlorobenzylamine sur la fonction ester du composé **214** pour obtenir l'amide **215**. Cette réaction est réalisée à 120°C sans solvant, en présence d'APTS.



Schéma 83. Réactifs et conditions : (ii) 2,4-dichlorobenzylamine, 120°C, 20 h.

<sup>&</sup>lt;sup>313</sup> Glen, R. C. et al. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3566.

Le suivi de cette réaction par RMN a permis d'observer une conversion de 65% de l'ester **214** en amide **215**, avec un arrêt de l'avancement après 20 heures de réaction et l'absence de produit secondaire dans le milieu réactionnel. Le composé **215** est actuellement en cours de purification. Il est intéressant de remarquer que lorsque ce même type de réaction a été réalisé sur le composé **209** (analogue du composé **214** en forme NH, *cf* § II-1- de ce chapitre) la formation de l'amide n'a pas eu lieu. Cela peut être dû à « l'acidité » du NH qui neutralise, en partie, la 2,4-dichlorobenzylamine qui ne peut plus réagir.

# III- Synthèse des composés de la sous-série B

A partir du bromomalonate de diéthyle, quatre étapes permettent d'aboutir aux produits cibles envisagés dans cette série.<sup>304</sup> La première consiste à faire réagir la *N*-méthylbenzylamine sur le bromomalonate de diéthyle ; une hydrogénation catalytique permet ensuite la débenzylation du composé obtenu, ce qui fournit une méthylamine qui est ensuite mise en réaction avec un isocyanate pour être cyclisée, avant d'être engagée dans une réaction d'aminolyse.



*Schéma 84. Réactions générales pour la synthèse des composés de la sous-série B : (i)* substitution nucléophile ; *(ii)* hydrogénation catalytique ; *(iii)* cyclisation ; *(iv)* aminolyse.

# III-1- Synthèse du composé 216 par réaction de la N-méthyl-benzylamine sur le bromomalonate de diéthyle

Cette réaction de substitution nucléophile permettant d'aboutir au composé **216** par réaction de la *N*-méthylbenzylamine sur le bromomalonate de diéthyle a été réalisée selon des conditions décrites dans la littérature.<sup>314</sup> La réaction est effectuée au reflux de l'éthanol, en présence de diisopropyléthylamine (DIEA).



Schéma 85. Réactifs et conditions : (i) N-méthylbenzylamine, DIEA, EtOH, reflux, 4 h, 95%.

Le composé **216** est obtenu avec un rendement conforme à celui de la littérature.<sup>314</sup>

# III-2- Hydrogénation catalytique du composé 216

La débenzylation du malonate **216** permet d'aboutir au composé **217** par une hydrogénation catalytique réalisée dans l'éthanol en présence de palladium sur charbon à température ambiante.<sup>314</sup>



Schéma 86. Réactifs et conditions : (ii) Pd/C, H<sub>2</sub>, EtOH, T.A., 90 h, 60%.

Cette réaction a été réalisée à partir de 11 grammes du malonate **216**. Une conversion de 90% du composé **216** en produit déprotégé **217** a été observée par analyse RMN du milieu réactionnel brut, et la purification par distillation sous vide a permis d'obtenir un rendement de 60% en produit pur isolé.

<sup>&</sup>lt;sup>314</sup> Chai, C. L. L. et al. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8722.

## III-3- Cyclisation du malonate 217 par réaction avec l'isocyanate d'isopropyle

La réaction du composé **217** sur l'isocyanate d'isopropyle dans le toluène à 80°C permet d'aboutir à l'hydantoïne **218** par cyclisation intramoléculaire.<sup>304</sup>



Schéma 87. Réactifs et conditions : (iii) isocyanate d'isopropyle, N<sub>2</sub>, toluène, 80°C, 18 h.

Le suivi de cette réaction par RMN a permis d'observer une conversion de 76% en produit **218** après 18 heures de chauffage. Ce produit est actuellement en cours de purification, et une dernière étape permettra d'aboutir aux produits cibles de cette sous-série par aminolyse de la fonction ester. En cas de non réaction dans ces conditions, nous réaliserons le clivage de l'ester en utilisant le chlorotriméthylsilane en présence d'iodure de sodium au reflux de l'acétonitrile (comme pour la sous-série A) puis, un couplage peptidique sera effectué pour obtenir la formation de l'amide. Ces premiers composés originaux seront ensuite évalués vis-à-vis de leur activité potentielle sur le récepteur P2X<sub>7</sub>.
**EXPERIMENTAL SECTION OF SERIES 7** 

Experimental procedure for the synthesis of 3-(2,5-dioxo-1-phenylimidazolidin-4-yl)propionic acid methyl ester **209**:



Reagents and conditions: (i) NaH, THF, r.t., 16 h, 70%.

To a stirred mixture of 5-oxo-1-phenylcarbamoylpyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester **158** (3.0 g, 0.011 mol) in THF (15 mL), was added sodium hydride (0.3 g, 0.013 mol). The solution was then stirred at room temperature for 16 hours. The mixture was neutralized to pH=7 with aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution, then extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>. Volatiles were removed *in vacuo* to give the crude product which was purified by flash liquid chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **209** as a white powder in 70% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>273</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.10-2.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.25-2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.71 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.26 (td, *J* = 5.6, 1.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 6.38 (s, 1H, NH), 7.39 (m, 3H, ArH), 7.47 (m, 2H, ArH).

Experimental procedure for the synthesis of 3-(2,5-dioxo-1-phenylimidazolidin-4-yl)propionic acid **213**:



Reagents and conditions: (i) Me<sub>3</sub>SiCl, NaI, CH<sub>3</sub>CN, reflux, 16 h, 90%.

A mixture of compound **209** (2.00 g, 7.6 mmol), sodium iodide (3.43 g, 22.8 mmol) and trimethylsilyl chloride (1.66 g, 15.2 mmol) in 10 mL of acetonitrile was refluxed for 16 hours under nitrogen atmosphere. After cooling to room temperature, 15 mL of water were added and organics were extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aqueous solution, then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was recrystallized from diethyl ether to give pure product **213** as a white powder in 90% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>315</sup> <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.82-1.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 1.99-2.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.26 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.33-7.43 (m, 3H, ArH), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, ArH), 8.53 (br s, 1H, NH), 12.24 (br s, 1H, COOH).

<sup>&</sup>lt;sup>315</sup> Finkbeiner, H. J. Am. Chem. Soc. **1964**, 86, 961.

Experimental procedure for the synthesis of 3-(3-methyl-2,5-dioxo-1-phenylimidazolidin-4-yl)propionic acid methyl ester **214**:



Reagents and conditions: (i) CH<sub>3</sub>I, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetone, 0°C to r.t., 18 h, 70%.

To a stirred suspension of potassium carbonate (0.70 g, 5.0 mmol) in acetone (15 mL) at 0°C was added compound **209** (1.20 g, 4.6 mmol) followed by methyl iodide (1.30 g, 9.2 mmol), and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature overnight. The solution was poured onto water and extracted with ethyl acetate. The extracts were washed with water and brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated, and the residue was purified by flash chromatography on pre-packed silica column, eluting DCM/MeOH (99/1) to generate pure product **214** as a brown powder in 70% yield; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.16-2.29 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.32-2.43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.44-2.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.02 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.09 (dd, *J* = 6.7, 3.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 7.34-7.40 (m, 3H, ArH), 7.43-7.48 (m, 2H, ArH).

# Experimental procedure for the synthesis of 2-(benzylmethylamino)malonic acid diethyl ester 216:



Reagents and conditions: (i) Benzyl-methyl-amine, DIEA, EtOH, reflux, 4 h, 95%.

A mixture of 2-bromo-malonic acid diethyl ester (12.00 g, 0.05 mol), benzylmethylamine (6.08 g, 0.05 mol) and DIEA (6.49 g, 0.05 mol) in 80 mL of ethanol was refluxed for 4 hours. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate and hydrobromide of DIEA was filtered. The filtrate was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to generate compound **216** as an orange oil in 95% yield, sufficiently pure to be used for the next step. The physicochemical properties are identical with those of the literature.<sup>314</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.16 (s, 1H, NCH), 4.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, ArH), 7.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, ArH), 7.39 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, ArH).

Experimental procedure for the synthesis of 2-methylaminomalonic acid diethyl ester 217:



Reagents and conditions: (i) Pd/C, H<sub>2</sub> atmosphere, EtOH, r.t., 90 h, 60%.

To a mixture of compound **216** (11.0 g, 0.039 mol) in ethanol (70 mL), was added a catalytic amount of palladium on carbon. The mixture was placed under hydrogen atmosphere (1 Bar), and stirred at room temperature until the end of the reaction which was followed by NMR spectroscopy. The mixture was then filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was distilled under vacuum (118°C, 40 mBar) to give pure product **217** as a colorless liquid in 60% yield, with the same physicochemical properties as described;<sup>314</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.12 (br s, 1H, NH), 2.45 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 3.96 (s, 1H, NHCH), 4.23 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.27 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

# CHAPITRE X :

# SEPARATION DES ENANTIOMERES

## I- Objectif de la séparation chirale

L'ensemble des produits cibles synthétisés lors de ces travaux de thèse possèdent un carbone asymétrique dans leur structure. En effet, toutes les séries construites autour du motif pyrrolidone présentent un tel carbone en position 5 du cycle, et en position 4 pour les séries hydantoïnes (Figure 50).



Figure 50 : Position du carbone asymétrique dans les différentes séries développées.

Dans la démarche de développement d'un médicament il est indispensable, lorsqu'un carbone asymétrique est présent dans la structure du composé, d'évaluer l'activité pharmacologique de chaque énantiomère. En effet, en fonction des structures développées et de la cible biologique, des propriétés tout à fait différentes peuvent être observées pour chacun de ceux-là (activités différentes, affinités variables, toxicité, effets inverses, sélectivité...). La connaissance de l'ensemble de ces propriétés pharmacologiques est donc nécessaire pour le développement d'une molécule, tant en termes d'optimisation de son activité biologique, que pour l'approbation de son développement clinique par les autorités compétentes telle que la Food and Drug Administration (FDA) ou l'Agence Européenne du Médicament (AEM).

Pour satisfaire à ces critères, deux alternatives sont possibles :

- utiliser des techniques de synthèse énantiosélectives,
- ou réaliser la séparation des énantiomères à partir des mélanges racémiques obtenus par synthèse classique.

La première méthode est parfois difficile à mettre en œuvre. En effet, en fonction du substrat, il est souvent nécessaire de mettre au point une synthèse spécifique permettant d'obtenir préférentiellement un des deux énantiomères. De plus, ce type de synthèse peut faire intervenir l'utilisation de réactifs parfois coûteux, et deux voies de synthèse sont nécessaires pour obtenir chacun des énantiomères. Cette méthode peut donc se révéler difficile à mettre en place, coûteuse, mais également chronophage.

Dans cette étude, nous avons choisi de travailler avec des produits de départ sous forme de mélanges racémiques, ou d'utiliser des voies de synthèse racémisantes. Les produits finaux des différentes séries ont par conséquent été obtenus sous forme de mélanges racémiques.

Dans notre démarche, les composés sont évalués pour leur activité sur le récepteur dans un premier temps sous forme de mélanges racémiques. La composition des racémates d'intérêt (montrant une activité sur le P2X<sub>7</sub>R) est ensuite quantifiée par chromatographie liquide haute performance en phase chirale (CLHP). Une fois la composition du mélange connue, une étude de la séparation des énantiomères est réalisée.

La première étape consiste à déterminer les conditions optimales de séparation en CLHP à l'échelle analytique :

- choix de la phase stationnaire chirale permettant une bonne séparation des énantiomères,
- choix de la phase mobile conduisant à des temps de rétention courts et des résolutions correctes (>1,5).

Ces conditions sont ensuite transposées à l'échelle semi-préparative puis, à l'échelle préparative pour pouvoir isoler séparément chaque énantiomère pur.

Dans notre étude, une fois les conditions de séparation optimales déterminées en CLHP, nous avons utilisé la chromatographie en phase supercritique (CPS) qui est une technique beaucoup plus rapide que la CLHP. En effet, la phase mobile étant constituée de dioxyde de carbone à l'état supercritique et d'un modificateur organique (méthanol, éthanol, acétonitrile...), il est possible de travailler à des pressions plus faibles avec des débits plus importants. De plus, cette technique présente également l'avantage d'utiliser peu de solvant dans la composition de la phase mobile ; ce qui entraîne un gain de temps et d'argent lors de l'isolation des échantillons en sortie de colonne.

Après isolation des échantillons, la pureté énantiomérique de chacun est quantifiée en CPS, et la mesure du pouvoir rotatoire est déterminée à l'aide d'un polarimètre.

Enfin, chaque énantiomère optiquement pur est testé pour son activité sur le récepteur dans le but de comparer les résultats entre eux (mélange racémique, et chaque énantiomère seul).

#### SEPARATION DES ENANTIOMERES

La détermination de la configuration absolue des énantiomères actifs est ensuite étudiée par diffraction des rayons X par le Dr Frédérique CAPET de l'Université de Lille 1 (travail en cours).

Actuellement, les premières molécules à avoir été identifiées comme antagonistes P2X<sub>7</sub>R au sein de nos séries ont fait l'objet de cette étude qui a mené à la rédaction d'une publication dans *Journal of Chromatography A* (Baudelet, D. et al. *J. Chrom. A.* **2014**, *1363*, 257). Cette publication décrit en détails la démarche mise en place pour chacun des antagonistes identifiés dans nos séries. Les autres molécules actives identifiées sont actuellement en cours de séparation par cette même méthode.

CHAPITRE XI :

**EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES** 

Dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique de nos composés, différents tests cellulaires ont été ou vont être réalisés. Ces tests nous permettront d'évaluer, dans un premier temps, l'activité de nos molécules vis-à-vis du récepteur P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R), et dans un second temps, l'effet thérapeutique qu'ils entraînent ; les activités anti-inflammatoires et anticancéreuses seront évaluées. Ce screening permettra également d'établir des relations structure-activité sur lesquelles nous nous baserons pour proposer des pharmacomodulations futures.

# I- Protocoles expérimentaux des tests biologiques réalisés

## I-1- Culture cellulaire

Les cellules utilisées sont des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) sur-exprimant le récepteur P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R) humain ou murin. Afin de réaliser cette sur-expression, un plasmide contenant le gène P2X<sub>7</sub>R et un gène de résistance à la blasticydine a été inséré dans les cellules par transfection stable. Ces cellules ont été obtenues et fournies par le Dr Sahil ADRIOUCH (Inserm U905, Rouen).

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM + Glutamax (Gibco) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et 1 % de Pénicilline / Streptomycine. Les cellules sont traitées à la Blasticydine (Sigma) et sont mises en culture dans une étuve à 37°C, avec 5% de CO<sub>2</sub>. Afin de décoller les cellules, le milieu est retiré et les cellules sont lavées avec du PBS. De la trypsine est ajoutée et les cellules sont placées cinq minutes dans l'incubateur afin de les décrocher. Puis, du milieu de culture complet est ajouté afin d'inhiber l'action de la trypsine. Enfin, les cellules sont repiquées à 200.000 cellules / mL dans une flasque T75.

#### I-2- Mesure de l'activité des composés sur le P2X<sub>7</sub>R

Les cellules sont centrifugées cinq minutes à 1100 rpm afin d'éliminer le milieu. Puis, elles sont lavées dans un milieu dépourvu de SVF, et à nouveau centrifugées. Enfin, elles sont resuspendues dans un nouveau milieu sans SVF à deux millions par mL pour le marquage au Fluo-3 AM (Molecular Probes).

## I-2-1- Evaluation de l'activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R par spectrofluorimétrie

Les cellules sont incubées en présence de la sonde Fluo-3 AM à 0,5 µM pendant 20 minutes à 37°C. Puis, le tube contenant les cellules est centrifugé (5 min à 1100 rpm) afin d'enlever le surplus de Fluo-3 AM. Ce culot est repris dans un tampon spécifique pour l'étude du récepteur à un million de cellules par mL. Ce tampon est composé de sucrose à 300 mM, KCl à 5 mM, MgCl<sub>2</sub> à 1 mM, CaCl<sub>2</sub> à 1 mM, glucose à 10 mM, HEPES à 20 mM, à pH 7,4. Lorsque le récepteur est activé, on observe une entrée de calcium dans la cellule. Le Fluo-3 AM réagit avec le calcium intracellulaire et fluoresce dans le vert (longueur d'onde d'excitation à 506 nm / longueur d'onde d'émission à 526 nm). Par la sonde Fluo-3 AM, il est donc possible d'étudier l'ouverture du canal ionique P2X<sub>7</sub>.

Cette étude est réalisée en amont de la cytométrie en flux ; elle nous permet d'effectuer un screening de nos molécules avant de déterminer les Cl<sub>50</sub> des composés les plus intéressants par triple marquage en cytométrie en flux qui est une technique plus sensible. La manipulation est réalisée en plaques 96 puits. La lecture de la fluorescence se fait immédiatement après activation des récepteurs par le BzATP. La lecture est réalisée par le lecteur de plaques Varioskan (Thermo Scientific) avec une excitation à 500 nm et une émission à 530 nm. Les résultats sont enregistrés et analysés par le logiciel SkanIt RE.

I-2-2- Evaluation de l'activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R par cytométrie en flux a. Principe du cytomètre en flux



Figure 51 : Mesure de la fluorescence émise par les cellules, par utilisation de filtres, de miroirs dichroïques, et des détecteurs correspondants.

Les cellules passent une à une devant un faisceau laser qui permet de mesurer ou d'évaluer des paramètres cellulaires (taille, granulosité, fluorescence à diverses longueurs d'ondes).

Les intensités lumineuses mesurées sont très faibles, les détecteurs utilisés sont des photomultiplicateurs. Chaque signal est envoyé vers son détecteur (Figure 51) à l'aide de miroirs et de filtres : les miroirs sont dits « dichroïques » puisqu'ils transmettent une partie du rayonnement et réfléchissent l'autre partie. Par exemple, un miroir dichroïque 488 va réfléchir tous les rayonnements inférieurs ou égaux à 488 nanomètres et va transmettre les autres. Le cytomètre CYAN (Beckman Coulter) est capable d'exploiter neuf couleurs différentes. L'utilisation de plusieurs fluorochromes permet de détecter plusieurs paramètres en même temps. Ainsi, pour l'évaluation de l'activité de nos composés, un triple marquage a été réalisé. Cela dans le but d'observer différents phénomènes de façon simultanée (taille, granulosité, entrée de calcium, ouverture ou fermeture du pore, et viabilité cellulaire).

Le CYAN est relié à un ordinateur qui enregistre les données et affiche les résultats des mesures grâce à l'utilisation du logiciel Summit 4.3.

#### b. Marquage par la sonde Fluo-3 AM

Pour les manipulations en cytométrie en flux, le protocole est le même qu'en spectrofluorimétrie avec la sonde Fluo-3 AM (cf § I-2-1-).

#### c. Marquage par la sonde TO-PRO 3

Afin d'étudier la seconde activité du récepteur, c'est-à-dire la formation du pore transmembranaire, la sonde TO-PRO 3 (Molecular Probes) est utilisée. Cette sonde a une taille qui lui permet de pouvoir pénétrer dans la cellule lorsque le pore membranaire est formé par les récepteurs P2X<sub>7</sub> après activation prolongée par le BzATP. La sonde migre dans le noyau et s'intercale au sein de l'ADN ce qui conduit à une modification de sa fluorescence. Le TO-PRO 3 fluoresce dans le rouge lointain (longueur d'onde d'excitation à 642 nm / longueur d'onde d'émission à 661 nm). Le TO-PRO 3 est un analogue rouge du YO-PRO 1, fluorochrome vert (longueur d'onde d'excitation à 491 nm / longueur d'onde d'émission à 509 nm) couramment utilisé dans la littérature pour l'étude de P2X7R. Ainsi, il est possible de mesurer la variation d'ouverture du pore membranaire.

Le TO-PRO 3 permet donc l'étude simultanée du flux calcique (filtre vert) et de l'ouverture du large pore (filtre rouge lointain). Le TO-PRO 3 est ajouté à 10 nM final dans le tampon phosphate contenant les cellules.

#### d. Marquage à l'iodure de propidium (IP)

L'iodure de propidium (IP, Molecular Probes) est ajouté à 75 nM final au tampon phosphate contenant les cellules. Il fluoresce dans le rouge (longueur d'onde d'excitation à 535 nm / longueur d'onde d'émission à 617 nm). P2X<sub>7</sub>R n'est pas perméable à l'IP dans nos conditions expérimentales (données de l'étude non montrées). En effet, la littérature rapporte que l'entrée d'IP par P2X7R ne se fait qu'en présence de fortes concentrations d'IP (5µM) et de BzATP (3 mM). L'IP sert donc de sonde de viabilité en marquant l'ADN des cellules ayant perdues leur intégrité membranaire. Cette méthode permet d'identifier les cellules mortes présentant une forte incorporation de TO-PRO 3 due à la perte de leur intégrité membranaire et de les exclure lors de l'exploitation des résultats. Cela nous permet d'avoir une mesure plus précise de l'inhibition de l'ouverture du pore membranaire.

#### e. Principe de la manipulation

Les cellules sont incubées en présence des antagonistes potentiels pendant 15 minutes dans des tubes à hémolyse avant l'ajout de l'agoniste de référence, le BzATP (100  $\mu$ M final par puits). Chaque condition est réalisée en duplicate. La fluorescence est mesurée une heure après l'incubation à l'aide du cytomètre CYAN (Beckman Coulter). En présence du BzATP, 50% des cellules vivantes (IP négatives) vont présenter : une augmentation du marquage au Fluo-3 due l'entrée de calcium dans la cellule, un marquage au TOPRO-3 positif par la formation du pore membranaire, et une diminution de la taille due à l'efflux potassique. C'est sur cette population que les effets des antagonistes sont observés pour la détermination de leur Cl<sub>50</sub>. Pour évaluer une possible activité agoniste des molécules testées, le même protocole est appliqué en absence de BzATP.

Les différentes molécules sont solubilisées dans le DMSO. Afin d'écarter toute activité antagoniste ou agoniste du DMSO, une condition en présence de celui-ci a été effectuée. Enfin, on utilise comme contrôle positif d'activité antagoniste, l'AZ11645373 (ou AZ) (Sigma) qui est un antagoniste spécifique des récepteurs P2X<sub>7</sub>.<sup>316</sup> Les tests d'activité sont réalisés par le Dr Xavier DEZITTER.

<sup>&</sup>lt;sup>316</sup> Stokes, L. et al. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 880.

# I-3- Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire I-3-1- Evaluation de la cytotoxicité sur cellules saines

La cytotoxicité de nos composés a été évaluée par le Dr Xavier DEZITTER, par un test utilisant le MTS sur trois lignées HEK293 (HEK293 sauvage, HEK293 transfectée pour le P2X<sub>7</sub>R humain, HEK293 transfectée pour le P2X<sub>7</sub>R murin), selon le protocole suivant :

Cinq milles cellules par puits sont mises en culture dans une plaque 96 puits. Après 24 heures, les différentes molécules sont ajoutées à la concentration finale de  $10^{-5}$  M dans les puits.

Soixante-douze heures après, un sel de tetrazolium, le MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium) (Celltiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, ProMega) est ajouté aux cellules. Le MTS subit alors une bio-réduction en sa forme formazan permettant de visualiser l'activité red-ox des cellules. Cette réaction est principalement attribuée aux enzymes mitochondriales et aux transporteurs d'électrons. Le formazan forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. La plaque est lue par le PowerWave XS (BioTech) à la longueur d'ondes de 490 nm.



L'augmentation de l'absorbance est le marqueur de la prolifération cellulaire. En effet, plus il reste de cellules vivantes, plus il se forme de dérivés formazan de couleur pourpre. Ainsi, plus l'absorbance augmente, moins l'action antiproliférative est importante.

## I-3-2- Evaluation de la cytotoxicité sur un panel de 60 lignées cancéreuses

L'ensemble des composés a été soumis au National Cancer Institute (NCI) aux Etats-Unis, dans le but d'évaluer leur cytotoxicité. Cette évaluation est réalisée dans un premier temps sur un panel de 60 lignées de cellules cancéreuses (leucémie, cancer des poumons, cancer du côlon, cancer du système nerveux central, mélanome, cancer ovarien, cancer rénal, cancer de la prostate et enfin cancer du sein...). Puis, les composés montrant les meilleurs résultats sont évalués sur modèles animaux.

#### Protocole :

Les produits acceptés par le NCI font l'objet d'une première évaluation biologique sur le panel des 60 lignées : la prolifération cellulaire est mesurée pour une concentration de 10<sup>-5</sup> M de composé à tester. Si la molécule possède une activité faible ou nulle vis-à-vis de la prolifération cellulaire, les tests sont stoppés à ce stade. Si, par contre, la molécule possède une forte activité inhibitrice à cette concentration, elle est évaluée au stade supérieur. Cette nouvelle étape consiste à mesurer l'inhibition, cette fois à 5 concentrations différentes : 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>,10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-8</sup> M. Les résultats obtenus permettent d'accéder au profil d'activité de la molécule.

Si la molécule présente encore une forte inhibition de la prolifération cellulaire à la concentration de 10<sup>-8</sup> M, elle est à nouveau évaluée par le BEC (Biological Committee Evaluation) afin d'envisager des essais précliniques. Si le BEC confirme son intérêt pour des essais précliniques, le produit est d'abord testé sur des souris saines afin de déterminer sa DMT (Dose Maximale Tolérée).

Durant 14 jours, on observe la perte de poids engendrée par l'injection de solution à 400, 200 et 100 mg/kg sur trois souris. Si une souris perd plus de 20 % de son poids initial ou si une toxicité est observée, elle est sacrifiée. Si les trois souris sont sacrifiées, le même processus est renouvelé avec des concentrations de 50, 25 et 12.5 mg/kg et répété jusqu'à déterminer la dose maximale tolérée et les doses à injecter, lors de l'étape suivante, sur des souris qui ont développé des tumeurs. L'étape suivante consiste à répéter ce test sur ces souris infectées avec les doses préconisées ci-avant.

#### I-4- Evaluation in vitro et in vivo de l'activité anti-inflammatoire

La lignée de monocytes humains THP-1 sera utilisée. Les cellules seront cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau fœtal inactivé et 1 % de Pénicilline / Streptomycine. Les cellules seront incubées pendant 3, 6, 9 et 24 heures avec 1 µg/ml de LPS en présence ou absence d'un ligand P2X<sub>7</sub> (ou d'un antagoniste P2X<sub>7</sub> de référence : contrôle positif). Les lysats cellulaires seront collectés pour l'évaluation de l'expression en ARNm du TNF-alpha et de l'IL1- $\beta$  par PCR en temps réel. En parallèle, les surnageants de culture seront prélevés pour l'évaluation des concentrations protéiques de TNF-alpha et IL1- $\beta$  par un test ELISA (R&D System).

Les composés présentant les résultats sur cellules les plus prometteurs seront évalués chez la souris. Des modèles murins de colites induites au TNBS seront utilisés dans le cadre de cette étude. Les personnes directement impliquées pour cette tâche sont le Dr Xavier DEZITTER (EA4481, Lille), ainsi que le Dr Mathilde BODY-MALAPEL et le Pr Pierre DESREUMAUX (Inserm U995, Lille).

### **II- Résultats et discussion**

# II-1- Activités des molécules sur le P2X<sub>7</sub>R humain II-1-1- Evaluation de l'activité des molécules synthétisées

Pour l'évaluation de l'activité de nos molécules sur le P2X<sub>7</sub>R, une première sélection des composés est réalisée par spectrofluorimétrie en plaque à une concentration de 10<sup>-5</sup> M. Les composés retenus lors de ce screening sont ensuite évalués par le test d'activité en cytométrie en flux. Dans ce test basé sur la mesure de la fluorescence, une méthode de triple marquage a été mise au point. Elle nous permet à la fois, d'observer l'ouverture du canal ionique (par l'entrée de calcium) et la formation du pore membranaire (par l'entrée de TO-PRO 3), et de quantifier la mort cellulaire ; ce qui nous permet d'être beaucoup plus précis qu'en spectrofluorimétrie. Dans ce test, nous avons fait le choix de déterminer uniquement les Cl<sub>50</sub> des composés montrant au moins 50% d'inhibition de l'activité du récepteur à une concentration de 10<sup>-5</sup> M. Les résultats présentés pour ce test ont tous été obtenus sur la lignée HEK293 exprimant le P2X<sub>7</sub>R humain. Les composés seront évalués prochainement sur la lignée HEK293 exprimant le P2X<sub>7</sub>R de rat.

Dans cette partie du mémoire, seules les structures des composés ayant présenté une activité sur P2X<sub>7</sub>R humain seront montrées (*cf* Tableau 26). Cependant, lors de la discussion des RSA nous nous appuierons aussi sur les structures de quelques composés inactifs. Des tableaux relatifs à chaque série, et montrant l'ensemble des résultats obtenus (positifs et négatifs), apparaissent à la fin de ce paragraphe. Il est également à noter que les résultats présentés dans cette première partie ont été obtenus en mesurant l'activité des composés sous leur forme racémique. L'évaluation des énantiomères purs ayant été séparés à partir des racémiques actifs sera présentée ensuite.

Ligne	N° produit	Structures	% d'inhibition à 10 <sup>-5</sup> M	СІ <sub>50</sub> (µМ)	Cl₅o valeur littérature (µM)
1	56		100	1,13	-
2	71		85	3,46	-
3	95		50	10,00	-
4	103		100	0,55	-
5	114	$O = \bigcup_{I = O}^{N} \bigcup_{I = O}^{N} \bigcup_{I = O}^{CI} \bigcup_{I = O}^{CI}$	100	0,47	-
6	138		40	N.D.	-

Tableau 26. Activités des antagonistes identifiés dans le test réalisé par cytométrie en flux.

<sup>a</sup> Antagoniste de référence utilisé comme témoin positif dans notre test d'activité.

<sup>b</sup> Composé décrit dans la littérature : forme énantiomériquement pure de notre molécule **114**.

#### **EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES**

Ligne	N° produit	Structures	% d'inhibition à 10 <sup>-5</sup> M	Cl₅₀ (µM)	Cl₅₀ valeur littérature (µM)
7	142		40	N.D.	-
8	147		100	6,74	-
9	171		50	10,00	-
10	181	$ \begin{array}{c}                                     $	60	8,00	-
11 <sup>ª</sup>	AZ11645373	$N \rightarrow 0$	100	0,02	0,02 <sup>(316)</sup>
12 <sup>b</sup>	21	O N O CI	x	x	0,03 <sup>(260)</sup>

<sup>a</sup> Antagoniste de référence utilisé comme témoin positif dans notre test d'activité.
 <sup>b</sup> Composé décrit dans la littérature : forme énantiomériquement pure de notre molécule 114.

L'ensemble des hits identifiés au sein de nos séries de molécules présentent une activité antagoniste modérée sur P2X<sub>7</sub>R humain dans la gamme du micromolaire. Au total, 10 hits ont été identifiés parmi les molécules testées. C'est à partir de ces résultats que les RSA ont été déduites. Celles-ci sont discutées dans le paragraphe suivant.

Discussion des relations structure - activité (RSA) sur la base des premiers résultats

# Importance du groupe 2,4-dichlorophényle porté par le tenseur amide (CONH) ou rétroamide (NHCO)

Parmi les molécules que nous avons synthétisées et évaluées pour leur activité antagoniste potentielle, on remarque que toutes celles ayant montré une inhibition de l'activité de P2X<sub>7</sub>R Humain possèdent un motif 2,4-dichlorophényle porté par une fonction amide (CONH) ou rétro-amide (NHCO). En effet, à partir des pyroglutamides et dérivés, il a été décrit dans la littérature<sup>257,258</sup> qu'un groupement phényle substitué en positions 2,3- ou 2,4- par des halogènes ou un groupe trifluorométhyle était favorable dans cette zone, et donnait lieu à de meilleures activités que lorsque les substituants sont des groupes inducteurs donneurs d'électrons comme des méthoxy. De même, il a été montré qu'un cycle aliphatique de petite taille (cyclohexyle, cylopentyle...) entraîne une forte baisse de l'activité, voire une absence totale. Cela s'est également vérifié au sein de nos séries, puisqu'on remarque que les composés 54, 69, et 116 (Figure 52), analogues respectifs des hits 56, 71, et 95 (Tableau 26, lignes 1 à 3), ne présentent aucune activité sur P2X<sub>7</sub>R humain alors qu'ils ne diffèrent que par l'absence d'un atome de chlore en position 4 du groupe phényle porté par l'amide. De même, le composé 99 (Figure 52), pour lequel le groupe 2,4-dichlorophényle du composé 95 a été remplacé par un cyclohexyle, ne montre pas d'activité. Il apparaît donc évident que la présence de ce groupement est fondamentale pour aboutir à des composés potentiellement antagonistes des P2X<sub>7</sub>R. C'est pour cette raison que nous avons utilisé ce motif pour la majorité des composés décrits dans cette thèse.



<sup>0%</sup> d'inhibition à 10-5 M





Ó 116



0% d'inhibition à 10-5 M

0% d'inhibition à 10-5 M









CI

#### 4 Nature du groupement porté par l'azote cyclique

Parmi les dérivés pyroglutamiques décrits dans la littérature,<sup>258,259</sup> les composés les plus actifs présentent dans leur structure un petit groupement alkyle (méthyle, éthyle, isopropyle...) ou cyclo-alkyle (cyclopropyle, cyclobutyle...) porté par l'azote cyclique, à l'image du composé **21** (Tableau 26, ligne 12) qui est *N*-méthylé. Cependant, seulement peu de composés possédant un groupement volumineux en cette position ont déjà été synthétisés. Dans notre étude, nous avons souhaité développer les RSA dans cette zone en greffant des cycles aromatiques ou aliphatiques différemment substitués sur l'azote cyclique, et avec des orientations différentes dans l'espace en fonction de la nature du tenseur entre les deux cycles.

Parmi les hits identifiés dans nos différentes séries (Tableau 26), tous possèdent un cycle aromatique dans cette zone, à l'exception du composé **114** (Tableau 26, ligne 5) qui est *N*-méthylé. Il faut remarquer que ce composé correspond au composé **21** de la littérature. Nous l'avons synthétisé sous sa forme racémique pour nous en servir de comparaison lors de nos tests (Tableau 26, ligne 12). En comparant les Cl<sub>50</sub> des composés **56**, **71**, **103**, et **147** (Tableau 26, lignes 1, 2, 4, et 8) à celle du composé **114** (Tableau 26, ligne 5), on remarque peu de différences entre leur Cl<sub>50</sub> respectives qui sont toutes dans la gamme du petit micromolaire. De plus, on remarque que les Cl<sub>50</sub> des composés **103** et **114** (Tableau 26, lignes 4 et 5) sont tout à fait semblables, alors que le premier possède un groupement thiophène sur l'azote cyclique. Ces résultats montrent donc qu'il est possible d'obtenir des composés portant des groupements aromatiques plus volumineux que les groupes alkyles retrouvés dans la littérature (de 1 à 4 carbones), tout en étant aussi actifs. De plus, ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus pour les séries des pyrazole-acétamides<sup>255-257</sup> et des imidazolidinones<sup>259</sup> décrites dans la littérature, et qui présentent de tels groupements dans leur structure.

En comparant nos structures entre elles, nous avons également remarqué qu'un groupe benzyle (Tableau 26, ligne 1) est plus favorable qu'un phényle (Tableau 26, ligne 3), lui-même plus favorable qu'un groupe arylcarbamoyle (Tableau 26, ligne 10). En effet, le composé **181** (Tableau 26, ligne 10) est le seul à avoir montré une activité sur P2X<sub>7</sub>R humain au sein de cette série arylcarbamoyle, ce qui montre qu'un tel motif n'est pas favorable dans cette position. Cependant, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'un motif alkylcarbamoyle. Nous avons également remarqué que la substitution du groupe benzyle est très importante pour l'activité de la molécule. En effet, la présence d'un substituant en position *para*- sur l'aromatique placé en position 1 du cycle lactame, est délétère, et entraîne une perte totale de l'activité, à l'image des composés **53**, **66**, et **73** qui n'ont montré aucune activité sur le récepteur (Figure 53) en comparaison aux composés **56** et **71** (Tableau 26, lignes 1 et 2).



Figure 53 : Structures et activités des composés 53, 56, 66, 71, et 73.

Ces mêmes constatations ont été faites dans la série *N*-phényle, puisqu'en comparaison au composé **95** (Tableau 26, ligne 3), les composés **94** et **100** ne montrent aucune activité (Figure 54).



Figure 54 : Structures et activités des composés 94, 95, et 100.

L'encombrement provoqué par un groupe benzhydryle dans cette zone est également délétère, puisque les composés **76** et **77** n'ont montré aucune activité (Figure 55).



Figure 55 : Structures et activités des composés 76 et 77.

En résumé, même en présence d'un groupe benzyle (Tableau 26, ligne 1) ou thiophène (Tableau 26, ligne 4) sur l'azote cyclique en série pyroglutamique, il est possible d'obtenir des antagonistes P2X<sub>7</sub>R ayant une Cl<sub>50</sub> dans la même gamme que les molécules portant un petit groupe alkyle (Tableau 26, ligne 5).

#### **Wature du tenseur central**

Dans l'ensemble des séries d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R décrites dans la littérature, les molécules présentent un tenseur central, le plus souvent, de type amide (CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>) et de taille variable. Des modulations de ce tenseur ont donc été effectuées dans différentes séries, et notamment dans la série des pyrazole-acétamides,<sup>257</sup> dont les substituants utilisés sont semblables à ceux retrouvés en série pyroglutamique. Il en ressort que la fonction amide (CONH) semble être la plus favorable dans cette série en comparaison à un rétro-amide (NHCO), une urée (NHCONH), ou un oxadiazole. Cependant, cette étude n'a pas été réalisée au sein même des dérivés pyroglutamiques, dans lesquels on retrouve exclusivement un amide présentant l'enchaînement suivant : cycle-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Ar.<sup>258,259</sup> Nous avons donc évalué l'importance de ce tenseur au sein de la série des dérivés pyroglutamiques en faisant varier la nature de cette fonction, ainsi que la longueur de chaîne. La longueur de chaîne a été modifiée, l'amide a été remplacé par un rétro-amide avec une chaîne de longueur variable (cycle-NH-CO-Ar ou cycle-NH-CO-CH<sub>2</sub>-Ar), ainsi que par des amines aromatiques (cycle-NH-Ar).

Parmi les composés testés, aucune amine n'a montré une quelconque activité sur le récepteur. Cela montre que le carbonyle est important pour l'activité des composés. En effet, la présence de ce dernier peut être importante en différents points :

- variation de la longueur du tenseur entre le motif central et l'aromatique ;
- orientation dans l'espace des substituants à chaque extrémité du tenseur ;
- implication potentielle dans une liaison hydrogène avec le récepteur.

Concernant les rétro-amides testés, certains montrent une activité antagoniste modérée (Tableau 26, lignes 6 à 8). Cependant, les amides de structures comparables (Tableau 26, lignes 1 à 5) ont montré de meilleurs résultats. Le tenseur central de type amide (CONH) semble donc, au vu des premiers résultats, être le linker optimal au sein de ces séries. Cependant, certains rétro-amides, comme le composé **149** (Figure 56) analogue de l'amide **95** (Tableau 26, ligne 3), n'ont pas encore été testés. La comparaison de ces derniers résultats permettra donc de conclure sur l'efficacité des différents linkers. Cependant, la comparaison de l'amide **71** (Tableau 26, ligne 2) et du rétro-amide **142** (Tableau 26, ligne 7) (composés analogues) montre que l'enchaînement –CONHCH<sub>2</sub>Ar- est plus favorable que –NHCOCH<sub>2</sub>Ar-.



 $1712X_7 (C_{50} = 10,00 \mu M)$ 

Figure 56 : Structures et activités des composés 95 et 149.

Concernant la longueur de chaîne du tenseur central, les résultats issus des différentes variations montrent que la présence d'un groupe méthylène entre la fonction amide et l'aromatique est favorable. En effet, en comparaison aux composés **71** et **95** (Tableau 26, lignes 2 et 3), leurs analogues respectifs **70** et **98** (Figure 57) n'ont montré aucune activité.



Figure 57 : Structures et activités des composés 70, 71, 95 et 98.

L'enchaînement –cycle-CONHCH<sub>2</sub>-Ar est donc le motif optimal pour l'orientation des différents groupements. Ce qui laisse supposer que la position du carbonyle et de l'azote est importante pour la formation potentielle de liaisons hydrogènes avec le récepteur, et que la présence du méthylène permet d'orienter correctement le groupe aromatique dans une zone hydrophobe du site de liaison, grâce à un certain degré de liberté et à une distance optimale.

Cependant, de nouveaux résultats sont encore nécessaires en série rétro-amide (NHCO), puisqu'à ce jour, le composé le plus actif identifié est la molécule **147** (Tableau 26, ligne 8) qui ne possède pas de groupe méthylène entre le rétro-amide et l'aromatique.

Pour conclure sur la nature et la longueur optimales de ce tenseur central, il serait intéressant de synthétiser le composé **157bis** (Figure 58), analogue des composés **114** (Tableau 26, ligne 5) et **157** (Figure 58), dont le premier possède une  $CI_{50}$  de 0,47  $\mu$ M sur P2X<sub>7</sub>R Humain, alors que le deuxième n'a aucune activité sur ce récepteur.



Figure 58 : Structures et activités des composés 114, 157, et 157bis.

## **4** Importance de la stéréochimie

Parmi les dérivés pyroglutamiques décrits dans la littérature,<sup>258,259</sup> il a été montré que, dans certains cas, l'isomère de configuration absolue *S* est plus actif que le *R*. C'est notamment le cas des énantiomères **219S** et **219R** (Figure 59) qui présentent des activités différentes. C'est également le cas des composés **114** et **21** (Tableau 26, lignes 5 et 12), dont le premier (mélange racémique) présente une  $CI_{50}$  quinze fois plus importante que l'énantiomère pur de configuration *S*.



Figure 59 : Structures et activités des composés 21, 114, 219S, et 219R.<sup>258</sup>

Sur la base de ces observations, nous avons souhaité synthétiser l'ensemble de nos composés sous forme de mélanges racémiques pour réaliser leur screening pour ensuite séparer les énantiomères des racémates ayant montré une activité. Ainsi, nous pourrons déterminer l'activité propre à chacun, ce qui est primordial dans le processus de développement d'un médicament. En effet, il est bien connu que la stéréochimie d'un composé peut influer sur ses propriétés pharmacologiques. Il est donc nécessaire de déterminer les propriétés de chaque énantiomère lorsqu'une molécule présente un ou plusieurs centres chiraux.

Comme présenté dans le chapitre précédent (« SEPARATION DES ENANTIOMERES »), une étude de séparation des énantiomères a été réalisée par CLHP et CPS. À ce jour, seuls les énantiomères purs des racémiques 56 et 71 (Tableau 26, lignes 1 et 2) ont été obtenus. Les autres racémiques identifiés en tant que hits sont en cours de séparation. Après avoir été séparés, les énantiomères des composés 56 et 71 ont fait l'objet d'une mesure de leur pureté énantiomérique par CPS avant d'être testés, et une pureté de plus de 99% à la limite de détection près a été observée. Le pouvoir rotatoire de chaque composé a également été mesuré. Cependant, nous n'avons, pour le moment, pas encore connaissance de la configuration absolue de chaque énantiomère. Le Dr Frédérique CAPET travaille actuellement à la résolution de ces structures 3D par diffraction des rayons X. Le seul paramètre permettant de différencier les énantiomères entre eux est leur pouvoir rotatoire. Nous utiliserons donc les codes suivants : composés 56lev et 71 lev pour les composés lévogyres, et 56dex et 71dex pour les composés dextrogyres.



Tableau 27. Comparaison des activités des antagonistes 56 et 71 avec celles de leurs énantiomères purs.

Chaque énantiomère a été évalué pour son activité sur P2X<sub>7</sub>R, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les mélanges racémiques respectifs qui ont été testés à nouveau lors du test des énantiomères.

Concernant le composé **56**, on remarque que les deux énantiomères présentent une activité dans la gamme du micromolaire avec, une activité légèrement meilleure pour l'énantiomère lévogyre que pour le dextrogyre. Cependant, cette différence d'activité est faible, et la Cl<sub>50</sub> du composé **56lev** est semblable à celle du mélange racémique (Tableau 27).

Pour le composé **71**, la différence est beaucoup plus nette. En effet, le composé **71dex** n'a montré aucune activité à une concentration de  $10^{-5}$  M, alors que le composé **71lev** montre lui une Cl<sub>50</sub> améliorée par rapport au mélange racémique (Tableau 27).

Ces résultats permettent de constater que l'importance de la stéréochimie au sein de cette série dépend des substituants portés par la molécule, puisque dans un cas les deux énantiomères sont actifs (composé **56**), alors que pour le composé **71** on observe une activité seulement pour l'énantiomère lévogyre. Cela peut être expliqué par la présence du chlore sur le groupe benzyle porté par l'azote lactamique qui modifie l'orientation de ce motif et qui vient s'additionner à l'effet de la stéréochimie. En effet, pour le composé **56** qui ne porte pas de substituants sur ce groupement benzyle, la différence d'activité entre les deux énantiomères est moins importante. Il est également intéressant de remarquer que l'énantiomère lévogyre est le plus actif dans les deux cas. L'évaluation des prochains énantiomères purs nous permettra peut-être de savoir si cette corrélation est généralisable au sein de cette série. Il sera également important de déterminer les configurations absolues de chaque énantiomère pour pouvoir établir de nouvelles RSA et orienter la synthèse des futures molécules.

#### Potentiel des hydantoïnes en tant qu'antagonistes P2X<sub>7</sub>R

Parmi les hydantoïnes, le seul composé à avoir été testé jusqu'ici est la molécule **171** (Tableau 26, ligne 9) qui présente une  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ M. Même si cette activité est relativement faible, ce résultat reste très encourageant quant au potentiel de cette série. En effet, ce composé est un produit secondaire de réaction qui, au vu des RSA déduites, ne possède pas les groupes les plus favorables pour une bonne activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R. Avec une chaîne latérale plus courte de type amide en position 4 du cycle portant un groupe 2,4-dichlorophényle, un petit groupe alkyle ou cyclo-alkyle sur l'azote en position 1, et un méthyle sur l'azote en position 3, il serait possible d'aboutir à des composés très actifs en comparaison à ceux de la littérature (Figure 60).





Figure 60 : Structures envisagées dans la série 7 sur la base des RSA établies et des données de la littérature.<sup>259</sup>

Ces composés sont actuellement en cours de synthèse, et sont très intéressants en termes de structure, puisqu'aucun antagoniste P2X<sub>7</sub>R de ce type n'a encore été reporté dans la littérature. Cependant, lorsque l'on compare les structures envisagées à celles des imidazolidinones de la Figure 60, ou aux pyrazoles de la littérature,<sup>255-257</sup> ces composés sont suffisamment proches en termes de structure et d'orientation des substituants pour espérer obtenir des composés très actifs. De plus, il est bien connu que les hydantoïnes font partie des structures privilégiées pour la conception de molécules biologiquement actives. Au vu de la stéréochimie des molécules **24** à **26** (Figure 60), il sera également intéressant de réaliser des tests biologiques sur les différents énantiomères au sein de cette série.

#### Conclusions des RSA obtenus pour l'activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R

Grâce aux premiers résultats obtenus dans les différentes séries développées durant cette thèse, nous avons pu, à la fois confirmer des RSA de la littérature, mais également en établir de nouvelles.

En effet, nous avons pu constater que, pour une bonne activité (de la même façon que pour la majorité des composés décrits dans la littérature), un motif phényle substitué en positions 2,3- ou 2,4- par des halogènes ou des groupes trifluorométhyles (en 3- ou en 4-) est indispensable sur la partie droite de la molécule.

Au niveau du tenseur central, l'amide (CONHCH<sub>2</sub>-Ar) semble être le linker idéal, même si des résultats ont été obtenus en série rétro-amide (NHCOCH<sub>2</sub>-Ar).

Concernant le groupe porté par l'azote cyclique, nous avons pu montrer que même en présence d'un groupe aromatique (Tableau 26, ligne 4), il est possible d'obtenir des activités semblables à celles observées en présence d'un petit groupe alkyle (Tableau 26, ligne 5) ; ce qui n'avait jamais été montré dans cette position en série pyroglutamique dans la littérature. De plus, il sera intéressant d'évaluer l'activité des énantiomères purs de ce racémate qui, comme nous l'avons vu, peut être nettement meilleure. A partir de ces résultats, il sera sans doute intéressant de remplacer ce thiophène par des groupes analogues ou isostères (pyridin-2yle, furan-2yle, 2-chlorophényle...), puisque ce composé présente une Cl<sub>50</sub> 20 fois plus faible que le composé **95** qui porte un phényle. Cette nette différence d'activité peut-être due à une interaction supplémentaire entre le soufre (dans cette position « *ortho* ») et le récepteur.

Au niveau de la stéréochimie des composés, nous avons pu voir que son importance était variable en fonction des composés et de leurs substituants. Cependant, l'étude de tous les énantiomères reste nécessaire. A partir de ces résultats, plusieurs modulations sont à envisager. Concernant les dérivés pyroglutamiques, il semble indispensable de conserver la fonction amide sur la partie droite, toujours avec un aromatique de type 2,4-dichlorophényle. Cependant, l'aromatique porté par l'azote cyclique ne semble pas être dans la position la plus favorable, même si certains bons résultats ont été observés. Nous proposons donc de faire varier la position de ce groupe sur la pyrrolidone, en développant notamment des composés de type amidines (Figure 61).



R1 = cycles aromatiques ou aliphatiques R2 = petits groupes alkyles

Figure 61 : Structure générale des composés de type amidine envisagés.

De cette façon, l'orientation des différents groupements serait semblable à celle retrouvée dans la famille des pyrazole-acétamides qui donnent lieu à de bonnes activités (Figure 62).<sup>255-257</sup>



Figure 62 : Structure et activité du composé 19 de la famille des pyrazole-acétamides.

De même, il est possible de greffer ce type de groupement en alpha du carbonyle de la pyrrolidone (Figure 63), et ainsi se rapprocher des structures de type imidazolidinones (*cf* Figure 60).



R1 = cycles aromatiques ou aliphatiques R2 = petits groupes alkyles

Figure 63 : Structure générale des composés de type amidine envisagés en alpha du carbonyle cyclique.

Cette dernière approche permet également de protéger une position de métabolisation des dérivés pyroglutamiques. En effet, il a été montré que ces composés sont rapidement métabolisés du fait d'une hydroxylation en alpha du carbonyle, suivie d'une glucuronidation. Diverses modulations ont donc été rapportées permettant d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces composés, comme l'introduction d'un hétéroatome, ou de groupements méthyles (Figure 64).



Figure 64 : Pharmacomodulations réalisées en série pyroglutamique pour la protection d'une position de métabolisation.

C'est à partir de ces modulations que les imidazolidinones précédentes ont été développées. Elles se sont révélées plus actives, et présentent également de meilleures propriétés pharmacocinétiques.

Cela nous a donc poussé à poursuivre le développement des hydantoïnes lorsque nous avons identifié ces composés lors de la synthèse des séries précédentes.

En termes de modifications de cycle, l'influence d'une thiazolidin-2-one n'a pas été évaluée. Cependant, l'utilisation du soufre peut se révéler bénéfique d'un point de vue pharmacologique.<sup>317</sup> En effet, le remplacement d'un oxygène par un soufre est classique en termes de pharmacomodulations, et malgré le fait qu'il s'agisse d'isostères, des différences peuvent être observées au niveau des activités biologiques entre deux composés. Il serait donc intéressant de développer quelques composés analogues à ceux de la littérature en utilisant ce motif central (Figure 65).



R = petits groupes alkyles K = CO ou amidines aromatiques

<sup>&</sup>lt;sup>317</sup> Kunzler, A. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 74.
## Figure 65 : Structure générale des composés de type thiazolidin-2-one envisagés.

A partir de ces résultats nous proposons trois nouvelles séries originales, en plus des trois séries débutées dans cette thèse qui sont toujours en cours de développement. L'ensemble des résultats qui seront obtenus à partir de ces nouveaux composés permettra probablement d'aboutir à des composés très actifs. Cependant, ces composés doivent également faire l'objet d'une évaluation de leur activité sur la lignée HEK293 transfectée pour P2X<sub>7</sub>R murin, dans l'éventualité de tests chez l'animal.

Tableaux récapitulatifs des composés testés ou en attente de test dans les différentes séries

 Tableau 28. Résultats obtenus dans le test d'activité pour les composés de la série 1.



Ligne	N° produit	R1	R2	R3	R4	% d'inhibition à 10 <sup>-5</sup> M	Cl <sub>50</sub> (μM)
1	53	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Н	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	0	-
2	54	Ph	Н	2-Cl-Bz	Н	0	-
3	55	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Н	2-Cl-Bz	Н	0	-
4	56	Ph	н	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	н	100	1,13
5	57	Ph	н	Bz	н	0	-
6	58	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	н	Bz	Н	0	-
7	59	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Н	furan-2ylMe	н	0	-
8	61	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	н	2,4-(MeO) <sub>2</sub> -	н	0	-
9	62	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	н	2-MeO-Bz	н	0	-
10	63	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	н	Phénéthyle	Н	0	-
11	64	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	Н	Bz	$CH_3$	0	-
12	65	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	н	Me-pyridin-	н	0	-
13	66	4-NO <sub>2</sub> -Ph	Н	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	0	-
14	69	2-Cl-Ph	н	2-Cl-Bz	н	0	-
15	70	2-Cl-Ph	н	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	н	0	-
16	71	2-Cl-Ph	н	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	85	3,46
17	72	4-Cl-Ph	Н	2-Cl-Ph	Н	0	-
18	73	4-Cl-Ph	н	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	н	0	-
19	76	Ph	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	0	-
20	77	4-Cl-Ph	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	Н	0	-

Dans cette série, seuls les composés **56** et **71** (Tableau 28, lignes 4 et 16) ont montré une activité antagoniste de P2X<sub>7</sub>R Humain lors du test réalisé sur la lignée HEK293 transfectée pour ce récepteur. Les résultats présentés dans ce tableau sont ceux obtenus à partir des mélanges racémiques. Les activités obtenues à partir des énantiomères purs ont été présentées plus haut.

**Tableau 29.** Résultats obtenus dans le test d'activité pour les composés de la série 2.

Ligne	N° produit	R1	R2	% inhibition à 10 <sup>-5</sup> M	СІ <sub>50</sub> (µМ)	
1	94	4-MeO-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-	-
2	95	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	50	10,00	
3	96	3-CF <sub>3</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-	
4	97	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-	
5	98	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Phénéthyle	0	-	
6	99	Ph	Cyclohexylméthyle	0	-	
7	100	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-	
8	101	4-CN-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-	
9	103	Thiophèn-2-yle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	100	0,55	
10	102	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-	
11	105	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
12	106	4-Pyridyle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	En cours de test	-	
13	107	Quinoléin-5-yle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	En cours de test	-	
14	108	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	En cours de test	-	
15	114	Me	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	100	0,47	
16	115	Ph	4-Me-Ph	0	-	
17	116	Ph	2-Cl-Bz	0	-	

Dans cette série, 3 composés (Tableau 29, lignes 2, 9, et 15) ont été identifiés comme antagonistes P2X<sub>7</sub>R lors du test sur la lignée HEK293 transfectée pour le récepteur humain. Trois composés, présentant potentiellement les groupements adéquats pour une activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R, sont en cours de test (Tableau 29, lignes 12 à 14). Les mélanges racémiques des composés **95**, **103**, et **114** (Tableau 29, lignes 2, 9, et 15) sont actuellement en cours de séparation pour pouvoir évaluer l'activité de chaque énantiomère.

## EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES

 Tableau 30. Résultats obtenus dans le test d'activité pour les composés de la série 3.

Ligne	N° produit	R1	х	R2	% inhibition à 10 <sup>-5</sup> M	Cl <sub>50</sub> (μM)	
1	122	Bz	NH	4-MeO-Ph	0	-	-
2	123	2-Cl-Bz	NH	4-MeO-Ph	0	-	
3	128	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	NH	4-MeO-Ph	0	-	
4	129	4-Cl-Bz	NH	4-MeO-Ph	0	-	
5	130	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	NH	4-MeO-Ph	0	-	
6	131	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	NH	2-MeO-Ph	0	-	
7	136	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
8	137	4-Cl-Bz	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
9	138	Bz	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	40	N.D.	
10	139	2-Cl-Bz	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
11	140	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	NHCOCH <sub>2</sub>	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
12	141	4-Cl-Bz	NHCOCH <sub>2</sub>	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
13	142	2-Cl-Bz	NHCOCH <sub>2</sub>	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	40	N.D.	
14	146	Ph	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
15	147	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	100	6,74	
16	148	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
17	149	Ph	NHCOCH <sub>2</sub>	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	En cours de test	-	
18	150	3,5-Cl₂-Ph	NHCOCH <sub>2</sub>	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	
19	151	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	NHCOCH <sub>2</sub>	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	En cours de test	-	
20	153	Ph	NHCO	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> - Ph	En cours de	-	
21	157	Me	NHCO	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-	

Dans cette série, 2 composés ont montré une inhibition moyenne du récepteur à une concentration de  $10^{-5}$  M (Tableau 30, lignes 9 et 13). Le composé **147** (Tableau 30, ligne 15) a, lui, montré une meilleure activité. En effet, une inhibition totale de l'activité du récepteur a été observée à une concentration de  $10^{-5}$  M, pour une Cl<sub>50</sub> déterminée de 6,74 µM. Les énantiomères purs ont été isolés à partir du mélange racémique, et l'évaluation de leur activité sera réalisée prochainement. Il reste également à évaluer l'activité de 3 composés dans cette série (Tableau 30, lignes 17, 19, et 20).

Tableau 31. Résultats obtenus dans le test d'activité pour les composés de la série 4.



Ligne	N° produit	N° produit R1		% inhibition à	Cl <sub>50</sub> (μM)
				10 <sup>-5</sup> M	
1	162	Ph	Bz	0	-
2	165	4-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
3	168	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
4	174	1-adamantyle	2-Cl-Bz	0	-
5	175	Cyclohexyle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
6	176	2-Cl-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
7	177	1-adamantyle	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
8	178	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
9	179	2,4-(OMe) <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
10	180	3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
11	181	3-CF <sub>3</sub> -Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	60	8,00
12	182	2,4,6-Me3-Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	En cours de test	-
13	183	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	0	-
14	184	Ph	Me-cyclohexyle	0	-
15	185	Ph	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	0	-

Dans cette série, seul le composé **181** (Tableau 31, ligne 11) a montré une activité antagoniste modérée vis-à-vis de P2X<sub>7</sub>R humain. Les énantiomères purs de ce racémate sont en cours de séparation pour une évaluation pharmacologique prochaine. Même si un composé reste à tester dans cette série (Tableau 31, ligne 12), le motif carbamoyle sur l'azote lactamique ne semble pas favorable pour l'obtention d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R. Cependant, il serait intéressant de synthétiser quelques composés portant un groupe alkylcarbamoyle (de méthyle, d'éthyle, d'isopropyle...).

Concernant les séries triazoles (séries 5 et 6), elles sont toujours en cours de développement, et actuellement aucun produit cible n'a été obtenu. Leur évaluation pharmacologique sera réalisée dans les mois à venir et nous permettra d'obtenir de nouvelles RSA.

Pour la série des hydantoïnes, le seul composé à avoir été isolé et testé est le composé **171** (Tableau 26, ligne 9) qui présente une  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ M. Des composés de cette série qui sont actuellement en cours de purification, et qui présentent potentiellement des substituants plus favorables à une bonne activité, seront testés prochainement.

## II-1-2- Screening d'une série de benzothiazolones

La série des benzothiazolones a été développée lors de mon stage de Master 2 Recherche en Conception du Médicament au sein du Laboratoire de Pharmacochimie de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol. Cette série avait été initiée par le Pr Régis MILLET pour obtenir de nouveaux agonistes sélectifs des récepteurs aux cannabinoïdes CB<sub>2</sub> pour une utilisation potentielle dans le traitement des MICI. En effet, ces récepteurs à sept domaines transmembranaires sont impliqués dans les phénomènes inflammatoires. Au total, quarante composés finaux ont été synthétisés et testés pour leur affinité et activité vis-à-vis des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. Au sein de cette famille, 15 composés ont été identifiés comme agonistes sélectifs des récepteurs CB<sub>2</sub> parmi lesquels, les composés **220**, **221**, et **222** se sont révélés être les plus intéressants, puisqu'ils se sont montrés efficaces sur des modèles de colites induites au TNBS chez la souris (Figure 66).



Figure 66 : Structures des benzothiazolones 220, 221, et 222 actives sur des modèles de souris de colites induites au TNBS.

Ces composés font actuellement l'objet d'une déclaration d'invention pour le dépôt d'un brevet français.

L'analyse de ces structures nous a permis de constater que certains composés synthétisés à cette occasion présentaient des éléments pharmacophoriques semblables à ceux retrouvés dans les antagonistes P2X<sub>7</sub>R (présence d'un hétérocycle azoté, de groupements lipophiles à chaque extrémité de la molécule, et également un tenseur de type amide pour certaines molécules).

Ces composés ont donc fait l'objet d'un screening pour évaluer leur activité sur le P2X<sub>7</sub>R par le test de cytométrie en flux utilisant la lignée HEK293 transfectée pour le récepteur humain.

Il en ressort que trois molécules, les composés **223**, **224** et **225** présentent une activité antagoniste  $P2X_7R$  avec des  $CI_{50}$  dans la gamme du micromolaire (Figure 67), et une inhibition totale de l'activité du récepteur à une concentration de  $10^{-5}$  M. Cependant, ces molécules ne présentent pas d'activité sur le récepteur CB<sub>2</sub>.



Figure 67 : Structures et activités des benzothiazolones 223, 224, et 225 identifiées comme antagonistes P2X<sub>7</sub>R humain.

A partir de ces structures, il serait intéressant de réaliser quelques pharmacomodulations comme :

- des variations de la taille de la chaîne portée par l'azote cyclique,
- l'introduction de petits cycles aromatiques ou aliphatiques dans cette même position,
- des variations de la taille de la chaîne amide,
- ainsi que l'introduction de cycles aromatiques correctement substitués à la place de l'adamantane.

Cette étude permettrait d'envisager le développement d'une nouvelle série à partir de la benzothiazolone en tant qu'hétérocycle azoté central, dont les premiers résultats sont très encourageants. De plus, il serait intéressant d'obtenir des composés actifs sur les récepteurs CB<sub>2</sub> et les P2X<sub>7</sub>R de façon à obtenir une synergie des effets anti-inflammatoires.

## II-2- Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire II-2-1- Evaluation sur cellules saines

La cytotoxicité de l'ensemble des composés a été évaluée sur les trois lignées non tumorales HEK293 à partir desquelles nous réalisons nos tests d'activité ; parmi elles, la lignée sauvage n'exprimant pas P2X<sub>7</sub>R, la lignée transfectée pour P2X<sub>7</sub>R humain (HEK293 *h*-P2X<sub>7</sub>R), et la lignée transfectée pour P2X<sub>7</sub>R de rat (HEK293 *r*-P2X<sub>7</sub>R). Cette évaluation d'inhibition de la prolifération cellulaire est réalisée selon un test au MTS, dont le protocole a été décrit précédemment (§ I-3-1-). Les composés sont testés en triplicate à une concentration de 10<sup>-5</sup> M, puis la Cl<sub>50</sub> est déterminée sur la lignée lorsque le composé montre au moins 50% d'inhibition de la prolifération à cette concentration.

Dans cette partie, nous ne présenterons que les résultats significatifs. Dans le but de simplifier la lecture de ces résultats, nous les présenterons par série, avant de les discuter de manière globale. Nous indiquerons les pourcentages d'inhibition en bleu, et les Cl<sub>50</sub> exprimées en micromolaire en rouge.

## *Présentation des résultats*

 Au sein de la première série (série 1), un seul composé a montré une inhibition significative de la prolifération cellulaire. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

 Tableau 32. Cytotoxicité du composé 77 sur cellules non cancéreuses.



HEK293 sauvage	НЕК293 <i>h</i> -Р2Х <sub>7</sub> R	HEK293 <i>r</i> -P2X <sub>7</sub> R
34%	42%	6,30 μM

 Dans la seconde série des *N*-aryle pyroglutamides (série 2), un seul composé a montré une inhibition de la prolifération cellulaire ; cette fois spécifiquement sur la lignée HEK293 *h*-P2X<sub>7</sub>R. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

## Tableau 33. Cytotoxicité du composé 97 sur cellules non cancéreuses.



HEK293 sauvage	HEK293 <i>h</i> -P2X <sub>7</sub> R	HEK293 <i>r</i> -P2X <sub>7</sub> R
0%	10 µM	0%

 Dans la série des amines et rétro-amides (série 3), sept composés ont présenté une inhibition de la prolifération significative. Les résultats sont présentés dans le Tableau 34.

 Tableau 34. Cytotoxicité des composés de la série 3 sur cellules non cancéreuses.



Ligne	N° produit	R1	x	HEK293	HEK293	HEK293
	it produit		K	sauvage	<i>h</i> −P2X <sub>7</sub> R	<i>r</i> -P2X <sub>7</sub> R
1	136	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	NHCO	25%	38%	7,2 μM
2	137	4-Cl-Bz	NHCO	37%	38%	4,7 μM
3	140	2,4-Cl <sub>2</sub> -Bz	NHCOCH <sub>2</sub>	35%	10 µM	3,7 μM
4	142	2-Cl-Bz	NHCOCH <sub>2</sub>	0%	46%	6,5 μM
5	146	Ph	NHCO	0%	49%	7,6 μM
6	148	2,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	NHCO	0%	45%	4,8 μM
7	150	3,5-Cl <sub>2</sub> -Ph	NHCOCH <sub>2</sub>	10%	45%	0,3 μM

 Dans la série des N-carbamoyle pyroglutamides (série 4), huit composés ont montré une inhibition significative de la prolifération sur une ou plusieurs lignées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 35.

 Tableau 35. Cytotoxicité des composés de la série 4 sur cellules non cancéreuses.



Ligne	N° produit	R	HEK293 sauvage	HEK293	HEK293
	•	•		<i>h</i> -P2X₂R	<i>r</i> -P2X₂R
1	168	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	9,2 μM	9,4 μM	2,8 μM
2	175	Cyclohexyl	8,1%	10 µM	0%
3	176	2-Cl-Ph	42%	48%	2,8 μM
4	178	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	39%	46%	3,2 μM
5	179	2,4-(MeO) <sub>2</sub> -Ph	6,9 μM	5,3 μM	2,0 μM
6	180	3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	8,2 μM	8,7 μM	4,1 μM
7	181	3-CF <sub>3</sub> -Ph	27%	41%	0,5 μΜ
8	183	Ph	44%	42%	3,8 μM

#### **4** Interprétation des résultats

Au total, 17 composés ont montré une inhibition significative de la prolifération cellulaire visà-vis d'une, ou de plusieurs lignées.

En analysant ces résultats, nous avons pu constater que, d'une manière intéressante, tous ces composés sont plus actifs sur la lignée HEK293 transfectée pour le récepteur de rat, à l'exception du composé **97** (Tableau 33). L'inhibition de la prolifération sur la lignée sauvage étant généralement faible, voire non significative.

Il est également intéressant de remarquer que, à l'exception des composés **142** (Tableau 34, ligne 4) et **181** (Tableau 35, ligne 7), aucun des composés présentant une cytotoxicité significative n'a présenté une inhibition de l'activité de P2X<sub>7</sub>R humain. De plus, tous ces composés présentent des éléments structuraux communs avec :

- un cycle pyrrolidone,
- un tenseur central de type amide (CONH) ou rétro-amide (NHCO) (aucune amine cytotoxique),
- un groupe 2,4-dichlorophényle porté par le tenseur central,
- et généralement, un substituant en position *para* du cycle porté par l'azote lactamique.

Ces constatations permettent d'émettre l'hypothèse que le mécanisme d'inhibition de la prolifération cellulaire de ces composés passe par une interaction avec P2X<sub>7</sub>R qui serait différente de celle observée lors du test d'activité par cytométrie en flux. En effet, les pourcentages d'inhibition sont corrélés à l'expression du récepteur. De plus, la faible homologie de séquence entre le P2X<sub>7</sub>R humain et celui de rat peut expliquer que ces molécules ne soient pas actives sur le P2X<sub>7</sub>R humain, tout en pouvant interagir avec le P2X<sub>7</sub>R de rat pour l'inhibition de la prolifération cellulaire.

L'évaluation de l'activité des composés sur la lignée HEK293 transfectée pour le récepteur de rat sera bientôt réalisée par cytométrie en flux. Ces résultats nous permettront de voir s'il existe une réelle corrélation entre l'activité de ces molécules sur le P2X<sub>7</sub>R de rat et leur action cytotoxique.

## II-2-2- Evaluation sur les 60 lignées cancéreuses du NCI

Aucune des molécules testées par le NCI n'a montré une inhibition significative de la prolifération cellulaire sur les lignées utilisées. Une hypothèse probable serait que ces lignées n'expriment pas le P2X<sub>7</sub>R, ou que les P2X<sub>7</sub>R exprimés par ces lignées soient des variants du récepteur qui sont différents de celui exprimé dans les cellules HEK293 que nous utilisons. En effet, il a été montré dans différentes pathologies, et notamment dans certains types de cancers que différents variants du récepteur pouvaient être exprimés ; ces récepteurs n'étant pas toujours fonctionnels. De ce fait, si le mécanisme d'inhibition de la prolifération cellulaire de nos composés passe par une interaction avec le variant P2X<sub>7</sub>R exprimé dans nos lignées HEK293, alors l'expression d'un autre variant P2X<sub>7</sub>R (ou d'un récepteur non fonctionnel) entraînera une perte d'activité de nos composés.

Les molécules n'ayant pas été sélectionnées par le NCI seront évaluées sur la lignée d'adénocarcinome colique HT-29 par le Dr Xavier DEZITTER.

## II-3- Evaluation in vitro et in vivo de l'activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire potentielle de nos composés sera réalisée à partir de septembre 2014. Ces tests seront réalisés selon les protocoles décrits en début de ce Chapitre (§ I-4-).

Dans un premier temps, l'effet anti-inflammatoire des antagonistes identifiés sera mesuré *in vitro* en utilisant la lignée de monocytes THP-1 différenciés en macrophages. Ce test repose sur le dosage de l'IL-1β sécrétée par les macrophages grâce à un test ELISA.

Les composés les plus prometteurs seront ensuite testés sur des modèles de colites induites au TNBS chez la souris.

De cette façon, nous pourrons observer si l'inhibition du P2X<sub>7</sub>R de nos composés permet d'obtenir un effet anti-inflammatoire dans ce type de pathologies.

# **CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux ligands potentiellement antagonistes sélectifs des récepteurs purinergiques P2X<sub>7</sub>, dans le but d'évaluer leurs caractères anti-inflammatoire et anticancéreux, d'abord sur cellules puis sur modèles animaux. Le but final de ces travaux étant d'évaluer le potentiel de tels composés à être utilisés dans la maladie cancéreuse, ainsi que dans le traitement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. Nos travaux sont basés sur les études antérieures réalisées au sein de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, ainsi que sur les données de la littérature.

En effet, durant les dix dernières années, un nombre croissant de groupes de recherche académiques et industriels s'est penché sur le développement d'antagonistes potentiellement sélectifs des P2X<sub>7</sub>R, et notamment au sein de l'ICPAL.

## I- Bilan des travaux réalisés durant ce projet de thèse et conclusions

## I-1- Conception et synthèse des composés

L'étude des antagonistes P2X<sub>7</sub>R obtenus à l'ICPAL (dans les séries des 2,5-dihydropyrazolo-[4,3-*c*]-quinoléin-3-ones et des pyrazol-5-ones), et des structures décrites dans la littérature nous a permis d'établir les premières relations structure-activité (RSA). En effet, nous avons pu, dans un premier temps, définir les éléments pharmacophoriques semblant indispensables pour obtenir une activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R ; à savoir : un tenseur central (souvent de type amide) reliant deux groupements lipophiles, dont les tailles et les orientations peuvent varier en fonction des séries développées.

Sur cette base, nous avons réalisé, avec l'aide du Dr Amaury FARCE (EA4481, Lille), une étude de modélisation moléculaire dans le but de définir un « pharmacophore » d'antagoniste P2X<sub>7</sub>R de manière plus précise, et ainsi avoir une conception plus rationnelle de nos séries de composés. Pour ce faire, trois séries chimiques (de structures proches de celles souvent travaillées au laboratoire) décrites dans la littérature en tant qu'antagonistes P2X<sub>7</sub>R et possédant des activités dans la gamme du nanomolaire ont été sélectionnées, et un « pharmacophore » virtuel a pu être défini.

C'est à partir de cet « outil » que nous avons pu concevoir 7 séries chimiques, toutes développées à partir de l'acide pyroglutamique.

Au total, plus de 140 nouvelles molécules ont été synthétisées et décrites dans ce manuscrit, avec parmi elles 73 composés finaux synthétisés sous forme de mélanges racémiques. En plus de l'obtention de structures nouvelles, les stratégies développées ont permis d'accéder à de nouvelles voies de synthèse, comme pour l'obtention des 5-amino- ou 5-amidopyrrolidones (composés de la série 3). De nouvelles conditions pour le réarrangement des esters pyroglutamiques en hydantoïnes ont également été découvertes, même si elles sont pour le moment moins efficaces que celles décrites dans la littérature. Concernant la chimie développée, il est également important de noter que malgré les difficultés rencontrées pour la cyclisation du triazole accolé au pyrrole (séries 5 et 6), l'accès à ces composés par les voies de synthèse envisagées pourra être valorisé, puisqu'à ce jour cela n'a jamais été décrit.

## I-2- Evaluations pharmacologiques et résultats obtenus

De façon à pouvoir réaliser le maximum de tests biologiques au sein de notre groupe de recherche, le Dr Xavier DEZITTER a réalisé la mise au point des premiers tests envisagés. Nous disposons donc, maintenant, d'un test d'activité sur P2X<sub>7</sub>R effectué par cytométrie en flux qui nous permet d'être très précis dans nos mesures grâce à l'utilisation d'un triple marquage.

Par ce test, l'activité de plus de 60 des 73 nouvelles molécules finales a été déterminée. Parmi elles, dix hits ont été identifiés pour une activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R dans la gamme du micromolaire. Cela a permis d'étoffer les RSA, notamment au sein des séries de dérivés pyroglutamiques. En effet, l'une des molécules les plus actives identifiées, le composé **103** (Figure 68), présente, malgré la présence d'un cycle aromatique porté par l'azote lactamique, une activité similaire à celle du composé **114** (Figure 68) qui est *N*-méthylé.



Figure 68 : Structures et activités des composés 103 et 114.

Nous avons donc pu montrer que, malgré ce qui est décrit dans la littérature, il est possible d'obtenir des composés avec un cycle aromatique dans cette position qui soient aussi actifs que ceux portant un petit groupe alkyle. De plus, l'activité du composé **21** (Figure 68), énantiomère pur de configuration *S* dont le racémique correspondant est le composé **114** (Figure 68), laisse présager une activité très intéressante pour l'un des énantiomères du composé **103**. En effet, durant ce travail nous avons également débuté la séparation des énantiomères qui constituent les mélanges racémiques identifiés en tant que hits ; ce qui nous a permis d'observer d'importantes différences d'activités dans certains cas.

Dans ces séries, une dizaine de molécules doivent encore être évaluées dans ce test d'activité. Cela nous permettra d'étoffer les RSA discutées dans le chapitre « EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES ».

En plus de l'identification des hits dans les séries de dérivés pyroglutamiques développées, le screening de la série des benzothiazolones a permis l'identification de 3 hits qui possèdent une activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R dans la gamme du micromolaire (Figure 69).



Figure 69 : Structures et activités des benzothiazolones 223, 224 et 225 identifiées comme antagonistes P2X<sub>7</sub>R humain.

Malgré leurs activités modérées, ces molécules sont très intéressantes. Tout d'abord, parce que cet hétérocycle central n'a jamais été utilisé pour le développement d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R, mais également parce que ces hits ne possèdent pas les groupements les plus favorables à une bonne activité antagoniste P2X<sub>7</sub>R. Le remplacement des longues chaînes carbonées ainsi que la substitution de l'adamantane par un groupe phényle correctement substitué pourraient donner lieu à des composés bien plus actifs. De même que la longueur de la chaîne amide ainsi que sa position sur l'hétérocycle central peuvent être étudiées. Enfin, l'absence de carbones asymétriques dans cette série la rend également intéressante. L'inhibition de la prolifération cellulaire de nos composés a également été évaluée sur les trois lignées HEK293 non cancéreuses qui nous ont été fournies par le Dr Sahil ADRIOUCH (U905, Rouen). Il s'agit des mêmes lignées que celles utilisées pour le test d'activité, à savoir :

- la lignée HEK293 sauvage,
- la lignée HEK293 transfectée pour le P2X<sub>7</sub>R humain,
- et la lignée HEK293 transfectée pour le P2X<sub>7</sub>R de rat.

Lors de ces tests, nous avons pu identifier 17 dérivés pyroglutamiques (parmi les 4 premières séries) qui présentent une activité cytostatique. L'analyse des résultats nous a permis d'observer que cette activité était corrélée à l'expression du P2X<sub>7</sub>R. En effet, l'inhibition de la prolifération est toujours plus importante pour les lignées transfectées pour P2X<sub>7</sub>R que pour la lignée sauvage.

Cependant, aucune des molécules testées par le NCI n'a montré une inhibition significative de la prolifération cellulaire lors de l'évaluation sur les 60 lignées cancéreuses. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre précédent (*cf* « *EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES* »), cela peut être dû à la non expression de P2X<sub>7</sub>R dans ces lignées, ou à l'expression d'un autre variant de récepteur que celui exprimé dans nos lignées HEK293. Il sera donc important de réaliser l'évaluation du potentiel anticancéreux de nos composés sur une lignée exprimant le même variant fonctionnel, de façon à voir s'il existe réellement une corrélation entre la cytotoxicité des composés et l'expression de P2X<sub>7</sub>R, autrement dit, si le mécanisme d'inhibition de la prolifération cellulaire de nos composés passe par une interaction avec ce récepteur.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire potentielle de nos composés sera réalisée à partir de septembre 2014.

Dans un premier temps, l'effet anti-inflammatoire des antagonistes identifiés sera mesuré *in vitro* en utilisant la lignée de monocytes THP-1 différenciés en macrophages. Ce test repose sur le dosage de l'IL-1β sécrétée par les macrophages grâce à un test ELISA. Il sera réalisé par le Dr Xavier DEZITTER.

Les composés les plus prometteurs seront ensuite testés sur des modèles de souris de colites induites au TNBS. Cette partie sera réalisée dans l'équipe du Pr Pierre DESREUMAUX (U995, Lille).

De cette façon, nous pourrons observer si l'inhibition du P2X<sub>7</sub>R de nos composés permet d'obtenir un effet anti-inflammatoire dans ce type de pathologies.

## II- Perspectives envisagées pour la suite de l'étude

## II-1- Conception et synthèse de nouveaux composés

Concernant le pharmacophore défini par modélisation moléculaire au début de notre étude, nous souhaiterions affiner ce modèle en y intégrant les hits identifiés dans nos différentes séries.

En termes de synthèse de nouvelles molécules, nous souhaitons poursuivre le développement des triazoles (séries 5 et 6), et achever la synthèse des hydantoïnes (série 7) qui semblent prometteuses pour l'obtention d'antagonistes P2X<sub>7</sub>R puissants. Les quelques modulations envisagées à partir des benzothiazolones identifiées comme antagonistes P2X<sub>7</sub>R seront également effectuées.

En plus de ces séries, nous envisageons également de développer les séries **8**, **9** et **10** (Figure 70). En effet, ces amidines sont originales et elles nous permettront d'étoffer les RSA en série pyroglutamique. La présence d'un groupe aromatique n'étant pas toujours favorable lorsqu'il est porté par l'azote lactamique, nous ferons varier sa position sur le cycle de façon à obtenir une orientation semblable à celle retrouvée dans les pyrazole-acétamides pour ce type de groupements.



Figure 70 : Structures générales des séries 8, 9 et 10 envisagées.

## **II-2- Evaluations pharmacologiques**

Les composés seront prochainement évalués pour leur activité antagoniste potentielle sur la lignée HEK293 transfectée pour le P2X<sub>7</sub>R de rat. De cette façon nous verrons si les hits identifiés sont actifs sur les deux espèces, ou s'il existe des différences. Cela sera également un moyen de vérifier si les composés qui ont montré une inhibition significative de la prolifération sur cette lignée inhibent l'activité du P2X<sub>7</sub>R de rat. De cette façon il sera possible d'établir des corrélations entre l'inhibition de l'activité du récepteur, et l'activité cytostatique de ces composés.

Les énantiomères des racémiques identifiés en tant que hits seront séparés et évalués dans les différents tests biologiques.

Nous souhaitons également déterminer quelles sont les voies de signalisation qui sont touchées lors de l'inhibition de l'activité de P2X<sub>7</sub>R par nos hits. Nous étudierons tout d'abord la voie de la caspase-1 pour valider un potentiel effet anti-inflammatoire de nos composés.

Pour finir, nous souhaitons également développer un test d'affinité utilisant la Résonance Plasmonique de Surface (RPS), de façon à évaluer l'affinité de nos composés pour le P2X<sub>7</sub>R, et ainsi obtenir des informations sur leur site de liaison. **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 

- <sup>1</sup> Khakh, B. S. ; Burnstock, G. Sci. Am. 2009, 301, 84.
- <sup>2</sup> Drury, A. N. ; Szent-Györgyi, A. *J. Physiol.* **1929**, *68*, 213.
- <sup>3</sup> Lythgoe, B. ; Todd, A. R. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1947**, *1*, 15.
- <sup>4</sup> Holton, P. J. Physiol. (London) **1959**, 145, 494.
- <sup>5</sup> Burnstock, G. ; Holman, M. E. J. Physiol. **1962**, *160*, 446.
- <sup>6</sup> Burnstock, G. ; Holman, M. E. J. Physiol. **1962**, *160*, 461.
- <sup>7</sup> Burnstock, G. *Pharmacol. Rev.* **1972**, *24*, 509.
- <sup>8</sup> Gillespie, J. H. J. Physiol. **1934**, 80, 345.
- <sup>9</sup> Burnstock, G. In *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach.*
- Straub, R. W.; Bolis, L. eds.; Raven Press, New York. 1978. pp. 107-118.
- <sup>10</sup> Brown, C. M. ; Burnstock, G. *Br. J. Pharmacol.* **1981**, *73*, 617.
- <sup>11</sup> Kennedy, C. ; Burnstock, G. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *111*, 49.
- <sup>12</sup> Abbracchio M. P. ; Burnstock, G. *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445.
- <sup>13</sup> Daly, J. W. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. **1985**, 19, 29.
- <sup>14</sup> Webb, T. E.; Simon, J.; Krishek, B. J.; Bateson, A. N.; Smart, T. G.; King, B. F.; Burnstock, G.;
- Barnard, E. A. FEBS Lett. 1993, 324, 219.
- <sup>15</sup> Burnstock, G. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 238.
- <sup>16</sup> Ralevic, V. ; Burnstock, G. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413.
- <sup>17</sup> Palmer, T. M. ; Stiles, G. L. *Neuropharmacol.* **1995**, *34*, 683.
- <sup>18</sup> North, R. A. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 1013.
- <sup>19</sup> Valera, S. ; Hussy, N. ; Evans, R. J. ; Adami, N. ; North, R. A. ; Surprenant, A. ; Buell, G. Nature **1994**,
- 371, 516.
- <sup>20</sup> Jiang, L. H. ; Baldwin, J. M. ; Roger, S. ; Baldwin, S. A. Front. Pharmacol. **2013**, *4*, 1.
- <sup>21</sup> Di Virgilio, F. *Immunol. Today* **1995**, *16*, 524.
- <sup>22</sup> Guile, S. D. ; Alcaraz, L. ; Birkinshaw, T. N. ; Bowers, K. C. ; Ebden, M. R. ; Furber, M. ; Stocks, M. J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3123.

- <sup>24</sup> Stagg, J. ; Smyth, M. J. *Oncogene* **2010**, *29*, 5346.
- <sup>25</sup> Stehle, J. H.; Rivkees, S. A.; Lee, J. J.; Weaver, D. R.; Deeds, J. D.; Reppert, S. M. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 384.
- <sup>26</sup> Linden J. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1994**, *15*, 298.
- <sup>27</sup> Fields, R. D. ; Burnstock, G. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 423.
- <sup>28</sup> Freissmuth, M. ; Schütz, W. ; Linder, M. E. J. Biol. Chem. **1991**, 266, 17778.
- <sup>29</sup> Piersanti, G.; Bartoccini, F.; Lucarini, S.; Cabri, W.; Stasi, M. A.; Riccioni, T.; Borsini, F.; Tarzia,
- G.; Minetti, P. J. Med. Chem. 2013, 56, 5456.
- <sup>30</sup> Canas, P. M. ; Porciuncula, L. O. ; Cunha, G. M. A. ; Silva, C. G. ; Machado, N. J. ; Oliveira, J. M. A. ; Oliveira, C. R. ; Cunha, R. A. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 14741.
- <sup>31</sup> Feoktistov, I. ; Biaggioni, I. J. Clin. Invest. **1995**, *96*, 1979.
- <sup>32</sup> Palmer, T. M. ; Benovic, J. L. ; Stiles, G. L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29607.
- <sup>33</sup> Abbracchio, M. P. ; Boeynaems, J. M. ; Barnard, E. A. ; Boyer, J. L. ; Kennedy, C. ; Miras-Portugal, M.

T. ; King, B. F. ; Gachet, C. ; Jacobson, K. A. ; Weisman, G. A. ; Burnstock, G. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 52.

<sup>34</sup> Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.;
Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. *Pharmacol. Rev.* 2006, *58*, 281.

<sup>35</sup> Chhatriwala, M. ; Ravi, R. G. ; Patel, R. I. ; Boyer, J. L. ; Jacobson, K. A. ; Harden, T. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 1038.

- <sup>36</sup> Jacobson, K. A. ; Jarvis, M. F. ; Williams, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4057.
- <sup>37</sup> Lustig, K. D. ; Shiau, A. K. ; Brake, A. J. ; Julius, D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1993**, 90, 5113.
- <sup>38</sup> Xu, J. ; Chalimonuik, M. ; Shu, Y. ; Simonyi, A. ; Sun, A. Y. ; Gonzalez, F. A. ; Weisman, G. A. ; Wood,
- W. G.; Sun, G. Y. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 2003, 69, 437.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Ferrari, D. ; Pizzirani, C. ; Adinolfi, E. ; Lemoli, R. M. ; Curti, A. ; Idzko, M. ; Panther, E. ; Di Virgilio, F.

J. Immunol. 2006, 176, 3877.

- <sup>39</sup> Communi, D. ; Pirotton, S. ; Parmentier, M. ; Boeynaems, J. M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30849.
- <sup>40</sup> Chang, K. ; Hanaoka, K. ; Kumada, M. ; Takuwa, Y. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26152.
- <sup>41</sup> Communi, D. ; Parmentier, M. ; Boeynaems, J. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *222*, 303.
   <sup>42</sup> Communi, D. ; Robaye, B. ; Boeynaems, J. M. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 1199.
- <sup>43</sup> Hollopeter, G. ; Jantzen, H. M. ; Vincent, D. ; Li, G. ; England, L. ; Ramakrishnan, V. ; Yang, R. B. ; Nurden, P. ; Nurden, A. ; Julius, D. ; Conley, P. B. *Nature* **2001**, *409*, 202.
- <sup>44</sup> Communi, D.; Gonzalez, N. S.; Detheux, M.; Brézillon, S.; Lannoy, V.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41479.
- <sup>45</sup> Nomura, N. ; Nagase, T. ; Miyajima, N. ; Sazuka, T. ; Tanaka, A. ; Sato, S. ; Seki, N. ; Kawarabayasi, Y. ; Ishikawa, K. ; Tabata, S. *DNA Res.* **1994**, *1*, 251.
- <sup>46</sup> Chambers, J. K. ; McDonald, L. E. ; Sarau, H. M. ; Ames, R. S. ; Freema, K. ; Foley, J. J. ; Zhu, Y. ; McLaughlin, M. M. ; Murdock, P. ; McMilan, L. ; Trill, J. ; Swift, A. ; Aiyar, N. ; Taylor, P. ; Vawter, L. ; Naheed, S. ; Szekeres, P. ; Hervieu, G. ; Scott, C. ; Watson, J. M. ; Murphy, A. J. ; Duzic, E. ; Klein, C. ; Bergsma, D. J. ; Wilson, S. ; Livi, G. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10767.
- <sup>47</sup> Brake, A. J. ; Wagenbach, M. J. ; Julius, D. *Nature* **1994**, *371*, 519.
- <sup>48</sup> Valera, S.; Talabot, F.; Evans, R. J.; Gos, A.; Antonarakis, S. E.; Morris, M. A.; Buell, G. N. *Receptors Channels* **1995**, *3*, 283.
- <sup>49</sup> Baroja-Mazo, A. ; Barberà-Cremades, M. ; Pelegrin, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 79.
- <sup>50</sup> Egan, T. M. ; Samways, D. S. ; Li, Z. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 501.
- <sup>51</sup> Roberts, J. A.; Vial, C.; Digby, H. R.; Agboh, K. C.; Wen, H.; Atterbury-Thomas, A.; Evans, R. J. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 486.
- <sup>52</sup> Kawate, T. ; Michel, J. C. ; Birdsong, W. T. ; Gouaux, E. *Nature* **2009**, *460*, 592.
- <sup>53</sup> King, B. F. ; Townsend-Nicholson, A. ; Widman, S. S. ; Thomas, T. ; Spyer, K. M. ; Burnstock, G. J. *Neurosci.* **2000**, *20*, 4871.
- <sup>54</sup> Lê, K. T. ; Babinski, K. ; Séguéla, P. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 7152.

<sup>55</sup> Soto, F. ; Garcia-Guzman, M. ; Karschin, C. ; Stühmer, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *223*, 456.

<sup>56</sup> Le Feuvre, R. ; Brough, D. ; Rothwell, N. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 447, 261.

<sup>57</sup> Bean, B. P. ; Williams, C. A. ; Ceelen, P. W. J. Neurosci. **1990**, *10*, 11.

<sup>58</sup> Evans, R. J. *Eur. Biophys. J.* **2009**, *38*, 319.

<sup>59</sup> Jiang, L. H. ; Kim, M. ; Spelta, V. ; Bo, X. ; Surprenant, A. ; North, R. A. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 8903.

<sup>60</sup> Vial, C. ; Roberts, J. A. ; Evans, R. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 487.

<sup>61</sup> Donnelly-Roberts, D. L. ; Jarvis, M. F. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 571.

<sup>62</sup> Nicke, A. ; Kerschensteiner, D. ; Soto, F. J. Neurochem. **2005**, *92*, 925.

<sup>63</sup> Khakh, B. S. ; Bao, X. R. ; Labarca, C. ; Lester, H. A. *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 322.

<sup>64</sup> Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R. A.; Buell, G. Science **1996**, 272, 735.

<sup>65</sup> Di Virgilio, F.; Baricordi, O. R.; Romagnoli, R.; Baraldi, P. G. *Curr. Drug. Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **2005**, *5*, 85.

<sup>66</sup> Evans, R. J. ; Lewis, C. ; Buell, G. ; Valera, S. ; North, R. A. ; Surprenant, A. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 178.

<sup>67</sup> King, B. F. ; Ziganshina, L. E. ; Pintor, J. ; Burnstock, G. Br. J. Pharmacol. **1996**, *117*, 1371.

<sup>68</sup> Gever, J. R.; Cockayne, D. A.; Dillon, M. P.; Burnstock, G.; Ford, A. P. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 513.

<sup>69</sup> Chen, C. C. ; Akopian, A. N. ; Sivilotti, L. ; Colguhoun, D. ; Burnstock, G. ; Wood, J. N. *Nature* **1995**, *377*, 428.

<sup>70</sup> Garcia-Guzman, M.; Stühmer, W.; Soto, F. Brain Res. Mol. Brain Res. **1997**, 47, 59.

<sup>71</sup> Wirkner, K. ; Sperlagh, B. ; Illes, P. *Mol. Neurobiol.* **2007**, *36*, 165.

<sup>72</sup> Bo, X.; Zhang, Y.; Nassar, M.; Burnstock, G.; Schoepfer, R. *FEBS Lett.* **1995**, *375*, 129.

<sup>73</sup> Garcia-Guzman, M.; Soto, F.; Gomez-Hernandez, J. M.; Lund, P. E.; Stühmer, W. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 109.

<sup>74</sup> Hattori, M. ; Gouaux, E. *Nature* **2012**, *485*, 207.

<sup>75</sup> Collo, G.; North, R. A.; Kawashima, E.; Merlo-Pich, E.; Neidhart, S.; Surpenant, A.; Buell, G. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 2495.

<sup>76</sup> Bo, X. ; Schoepfer, R. ; Burnstock, G. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14401.

<sup>77</sup> Garcia-Guzman, M. ; Soto, F. ; Laube, B. ; Stühmer, W. *FEBS Lett.* **1996**, *388*, 123.

- <sup>78</sup> Meyer, M. P. ; Gröschel-Stewart, U. ; Robson, T. ; Burnstock, G. *Dev. Dyn.* **1999**, *216*, 442.
- <sup>79</sup> Khakh, B. S.; Proctor, W. R.; Dunwiddie, T. V.; Labarca, C.; Lester, H. A. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7289.
- <sup>80</sup> Cockcroft, S. ; Gomperts, B. D. *Biochem. J.* **1980**, *188*, 789.
- <sup>81</sup> Rassendren, F. ; Buell, G. N. ; Virginio, C. ; Collo, G. ; North, R. A. ; Surprenant, A. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5482.
- <sup>82</sup> Fuller, S. J. ; Stokes, L. ; Skarratt, K. K. ; Gu, B. J. ; Wiley, J. S. *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 257.
- <sup>83</sup> Buell, G. N. ; Talabot, F. ; Gos, A. ; Lorenz, J. ; Lai, E. ; Morris, M. A. ; Antonarakis S. E. *Receptors Channels* **1998**, *5*, 347.
- <sup>84</sup> Burnstock, G. ; Kennedy, C. *Adv. Pharmacol.* **2011**, *61*, 333.
- <sup>85</sup> Lewis, C. ; Neidhart, S. ; Holy, C. ; North, R. A. ; Buell, G. ; Surprenant, A. *Nature* **1995**, *377*, 432.
- <sup>86</sup> Craigie, E. ; Birch, R. E. ; Unwin, R. J. ; Wildman, S. S. *Front. Physiol.* **2013**, *4* : 216.
- <sup>87</sup> Guo, C. ; Masin, M. ; Qureshi, O. S. ; Murrell-Lagnado, R. D. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 1447.
- <sup>88</sup> Alves, L. A.; Da Silva, J. H.; Ferreira, D. N.; Fidalgo-Neto, A. A.; Teixeira, P. C.; De Souza, C. A.;
- Caffarena, E. R. ; De Freitas, M. S. Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 4531.
- <sup>89</sup> Cao, L. ; Young, M. T. ; Broomhead, H. E. ; Fountain, S. J. ; North, R. A. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12916.
- <sup>90</sup> Jiang, R. ; Taly, A. ; Lemoine, D. ; Martz, A. ; Cunrath, O. ; Grutter, T. *EMBO J.* **2012**, *31*, 2134.
- <sup>91</sup> Vial, C. ; Rigby, R. ; Evans, R. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 350, 244.
- <sup>92</sup> Khakh, B. S. Nat. Rev. Neurosci. 2001, 2, 165.
- <sup>93</sup> Pelegrin, P. ; Surprenant, A. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. **2008**, 12, 377.

<sup>&</sup>lt;sup>94</sup> North, R. A. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1996**, *8*, 474.

<sup>95</sup> Cheewatrakoolpong, B.; Gilchrest, H.; Anthes, J. C.; Greenfeder, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 17.

<sup>96</sup> Chengqun, S. ; Heid, M. E. ; Keyel, P. A. ; Salter, R. S. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e61886.

<sup>97</sup> Evans, R. J. Br. J. Pharmacol. **2010**, 161, 961.

<sup>98</sup> Nakazawa, K. ; Inoue, K. ; Ohno, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *347*, 141.

<sup>99</sup> North, R. A.; Jarvis, M. F. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *83*, 759.

<sup>100</sup> Jiang, R. ; Lemoine, D. ; Martz, A. ; Taly, A. ; Gonin, S. ; Prado de Carvalho, L. ; Specht, A. ; Grutter,

T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011, 108, 9066.

<sup>101</sup> Roger, S. ; Mei, Z. Z. ; Baldwin, J. M. ; Dong, L. ; Bradley, H. ; Baldwin, S. A. ; Surprenant, A. ; Jiang,

L. H. J. Psychiatr. Res. 2010, 44, 347.

<sup>102</sup> Wilkinson, W. ; Jiang, L. H. ; Surprenant, A. ; North, R. A. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1159.

<sup>103</sup> Stelmashenko, O.; Lalo, U.; Yang, Y.; Bragg, L.; North, R. A.; Compan, V. *Mol. Pharmacol.* 2012, *82*, 760.

<sup>104</sup> Mehta, N. ; Kaur, M. ; Singh, M. ; Chand, S. ; Vyas, B. ; Silakari, P. ; Bahia, M. S. ; Silakari, O. *Bioorg.* 

Med. Chem. 2014, 22, 54.

<sup>105</sup> Ennion, S. ; Evans, R. J. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 303.

<sup>106</sup> Clyne, J. D. ; Wang, L. F. ; Hume, R. I. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 3873.

<sup>107</sup> Schwarz, N.; Fliegert, R.; Adriouch, S.; Seman, M.; Guse, A. H.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 139.

<sup>108</sup> Lenertz, L. Y. ; Wang, Z. ; Guadarrama, A. ; Hill, L. M. ; Gavala, M. L. ; Bertics, P. J. *Biochemistry* **2010**, *49*, 4611.

<sup>109</sup> Roger, S.; Pelegrin, P.; Surprenant, A. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 6393.

<sup>110</sup> Denlinger, L. C. ; Sommer, J. A. ; Parker, K. ; Gudipaty, L. ; Fisette, P. L. ; Watters, J. W. ; Proctor, R.

A.; Dubyak, G. R.; Bertics, P. J. J. Immunol. 2003, 171, 1304.

<sup>111</sup> Smart, M. L. ; Gu, B. ; Panchal, R. G. ; Wiley, J. ; Cromer, B. ; Williams, D. A. ; Petrou, S. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8853.

<sup>112</sup> Becker, D. ; Woltersdorf, R. ; Boldt, W. ; Schmitz, S. ; Braam, U. ; Schmalzing, G. ; Markwardt, F. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25725.

- <sup>113</sup> Kim, M. ; Jiang, L. H. ; Wilson, H. L. ; North, R. A. ; Surprenant, A. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6347.
- <sup>114</sup> Arulkumaran, N.; Unwin, R. J.; Tam, F. W. K. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2011**, *20*, 897.
- <sup>115</sup> Schwarz, N. ; Drouot, L. ; Nicke, A. ; Fliegert, R. ; Boyer, O. ; Guse, A. H. ; Haag, F. ; Adriouch, S. ; Koch-Nolte, F. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e41269.
- <sup>116</sup> North, R. A. ; Verkhratsky, A. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 479.
- <sup>117</sup> Deaglio, S. ; Dwyer, K. M. ; Gao, W. ; Friedman, D. ; Usheva, A. ; Erat, A. ; Chen, J. F. ; Enjyoji, K. ;
- Linden, J. ; Oukka, M. ; Kuchroo, V. K. ; Strom, T. B. ; Robson, S. C. J. Exp. Med. 2007, 204, 1257.
- <sup>118</sup> Bours, M. J. ; Swennen, E. L. ; Di Virgilio, F. ; Cronstein, B. N. ; Dagnelie, P. C. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 358.
- <sup>119</sup> Dubyak, G. R. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 1697.
- <sup>120</sup> D'Hondt, C. ; Ponsaerts, R. ; De Smedt, H. ; Vinken, M. ; De Vuyst, E. ; De Bock, M. ; Wang, N. ; Rogiers, V. ; Leybaert, L. ; Himpens, B. ; Bultynck, G. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 305.
- <sup>121</sup> Gorini, S. ; Gatta, L. ; Pontecorvo, L. ; Vitiello, L. ; Ia Sala, A. Am. J. Blood Res. **2013**, *3*, 14.
- <sup>122</sup> Gu, B. ; Bendall, L. J. ; Wiley, J. S. *Blood* **1998**, *92*, 946.
- <sup>123</sup> Gu, B. J. ; Wiley, J. S. *Blood* **2006**, *107*, 4946.
- <sup>124</sup> Andrei, C. ; Margiocco, P. ; Poggi, A. ; Lotti, L. V. ; Torrisi, M. R. ; Rubartelli, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, *101*, 9745.

<sup>125</sup> McKenzie, A. ; Wilson, H. L. ; Kiss-Toth, E. ; Dower, S. K. ; North, R. A. ; Surprenant, A. *Immunity* **2001**, *15*, 825.

- <sup>126</sup> Costa-Junior, H. M. ; Sarmento Vieira, F. ; Coutinho-Silva, R. *Purinergic Signal.* **2011**, 7, 7.
- <sup>127</sup> Gan, B. S. ; Krump, E. ; Shrode, L. D. ; Grinstein, S. Am. J. Physiol. **1998**, 275, C1158.
- <sup>128</sup> Virginio, C. ; Mckenzie, A. ; North, R. A. ; Surprenant, A. *J. Physiol.* **1999**, *519*, 335.
- <sup>129</sup> Lister, M. F. ; Sharkey, J. ; Sawatzky, D. A. ; Hodgkiss, J. P. ; Davidson, D. J. ; Rossi, A. G. ; Finlayson,

K. J. Inflamm. **2007**, 4, 5.

- <sup>130</sup> Lemaire, I. ; Falzoni, S. ; Leduc, N. ; Zhang, B. ; Pellegatti, P. ; Adinolfi, E. ; Chiozzi, P. ; Di Virgilio, F.
   *J. Immunol.* **2006**, *177*, 7257.
- <sup>131</sup> Elssner, A. ; Duncan, M. ; Gavrilin, M. ; Wewers, M. D. J. Immunol. 2004, 172, 4987.
- <sup>132</sup> Ferrari, D.; Pizzirani, C.; Gulinelli, S.; Callegari, G.; Chiozzi, P.; Idzko, M.; Panther, E.; Di Virgilio,
  F. *Br. J. Pharmacol.* 2007, *150*, 445.
- <sup>133</sup> Volonté, C. ; Apolloni, S. ; Skaper, S. D. ; Burnstock, G. CNS Neurol. Disord. Drug. Targets 2012, 11,
  705.
- <sup>134</sup> Steinberg, T. H. ; Silverstein, S. C. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3118.
- <sup>135</sup> Jantaratnotai, N. ; Choi, H. B. ; McLarnon, J. G. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 442.
- <sup>136</sup> Sun, S. H. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 351.
- <sup>137</sup> Jelassi, B.; Chantôme, A.; Alcaraz-Pérez, F.; Baroja-Mazo, A.; Cayuela, M. L.; Pelegrin, P.; Surprenant, A.; Roger, S. *Oncogene* **2011**, *30*, 2108.
- <sup>138</sup> Ryu, J. K. ; Jantaratnotai, N. ; Serrano-Perez, M. C. ; McGeer, P. L. ; McLarnon, J. G. J. Neuropathol. *Exp. Neurol.* 2011, 70, 13.
- <sup>139</sup> Pelegrin, P. ; Surprenant, A. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5071.
- <sup>140</sup> Locovei, S. ; Scemes, E. ; Qiu, F. ; Spray, D. C. ; Dahl, G. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 483.
- <sup>141</sup> Iglesias, R.; Locovei, S.; Roque, A.; Alberto, A. P.; Dahl, G.; Spray, D. C.; Scemes, E. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2008**, *295*, 752.
- <sup>142</sup> Ma, W. ; Hui, H. ; Pelegrin, P. ; Surprenant, A. J. Pharmacol. Exp. Ther. **2009**, 328, 409.
- <sup>143</sup> Silverman, W.; Locovei, S.; Dahl, G. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. **2008**, 295, C761.
- <sup>144</sup> Schachter, J. ; Motta, A. P. ; De Souza-Zamorano, A. ; Da Silva-Souza, H. A. ; Guimaraes, M. Z. ; Persechini, P. M. *J. Cell. Sci.* **2008**, *121*, 3261.
- <sup>145</sup> Qu, Y.; Misaghi, S.; Newton, K.; Gilmour, L. L.; Louie, S.; Cupp, J. E.; Dubyak, G. R.; Hackos, D.;
   Dixit, V. M. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 6553.
- <sup>146</sup> Lemaire, I. ; Falzoni, S. ; Zhang, B. ; Pellegatti, P. ; Di Virgilio, F. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 3878.
- <sup>147</sup> Gunosewoyo, H.; Coster, M. J.; Kassiou, M. Cur. Med. Chem. **2007**, 14, 1505.

- <sup>148</sup> Tatham, P. E. ; Lindau, M. J. Gen. Physiol. **1990**, 95, 459.
- <sup>149</sup> Zemkova, H. ; Balik, A. ; Jindrichová, M. ; Vávra, V. *Physiol. Res.* **2008**, *57*, S23.
- <sup>150</sup> Cankurtaran-Sayar, S. ; Sayar, K. ; Ugur, M. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 1323.
- <sup>151</sup> Pelegrin, P. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 908.
- <sup>152</sup> Cabrini, G. ; Falzoni, S. ; Forchap, S. L. ; Pellegatti, P. ; Balboni, A. ; Agostini, P. ; Cuneo, A. ; Castoldi, G. ; Baricordi, O. R. ; Di Virgilio, F. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 82.
- <sup>153</sup> Ohlendorff, S. D.; Tofteng, C. L.; Jensen, J. E.; Petersen, S.; Civitelli, R.; Fenger, M.; Abrahamsen,
- B.; Hermann, A. P.; Eiken, P.; Jørgensen, N. R. Pharmacogenet. Genomics 2007, 17, 555.
- <sup>154</sup> Shemon, A. N. ; Sluyter, R. ; Fernando, S. L. ; Clarke, A. L. ; Dao-Ung, L. P. ; Skarratt, K. K. ;
- Saunders, B. M. ; Tan, K. S. ; Gu, B. J. ; Fuller, S. J. ; Britton, W. J. ; Petrou, S. ; Wiley, J. S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2079.
- <sup>155</sup> Feng, Y. H. ; Li, X. ; Wang, L. ; Zhou, L. ; Gorodeski, G. I. J. Biol. Chem. **2006**, 281, 17228.
- <sup>156</sup> Nicke, A. ; Kuan, Y. H. ; Masin, M. ; Rettinger, J. ; Marquez-Klaka, B. ; Bender, O. ; Górecki, D. C. ;
- Murrell-Lagnado, R. D.; Soto, F. J. Biol. Chem. 2009, 284, 25813.
- <sup>157</sup> Burnstock, G. ; Knight, G. E. Int. Rev. Cytol. **2004**, 240, 31.
- <sup>158</sup> Dinarello, C. A. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2002**, *20*, S1.
- <sup>159</sup> Bevilacqua, M. P. ; Stengelin, S. ; Gimbrone, M. A. Jr. ; Seed, B. *Science* **1989**, *243*, 1160.
- <sup>160</sup> Perregaux, D. ; Gabel, C. A. J. Biol. Chem. **1994**, 269, 15195.
- <sup>161</sup> Alves, L. A. ; Bezerra, R. J. S. ; Faria, R. X. ; Ferreira, L. G. B. ; Frutuoso, V. S. *Molecules* **2013**, *18*, 10953.
- <sup>162</sup> Dinarello, C. A. Annu. Rev. Immunol. **2009**, 27, 519.
- <sup>163</sup> Parvathenani, L. K.; Tertyshnikova, S.; Greco, C. R.; Roberts, S. B.; Robertson, B.; Posmantur, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13309.
- <sup>164</sup> Ghayur, T. ; Banerjee, S. ; Hugunin, M. ; Bulter, D. ; Herzog, L. ; Carter, A. ; Quintal, L. ; Sekut, L. ; Talanian, R. ; Paskind, M. ; Wong, W. ; Kamen, R. ; Tracey, D. ; Allen, H. *Nature* **1997**, *386*, 619.

- <sup>165</sup> Gu, Y. ; Kuida, K. ; Tsutsui, H. ; Ku, G. ; Hsiao, K. ; Fleming, M. A. ; Hayashi, N. ; Higashino, K. ; Okamura, H. ; Nakanishi, K. ; Kurimoto, M. ; Tanimoto, T. ; Flavell, R. A. ; Sato, V. ; Harding, M. W. ; Livingston, D. J. ; Su, M. S. *Science* **1997**, *275*, 206.
- <sup>166</sup> Dinarello, C. A. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 732.
- <sup>167</sup> Goldblatt, F. ; Isenberg, D. A. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *140*, 195.
- <sup>168</sup> Moynagh, P. N. J. Anat. **2005**, 207, 265.
- <sup>169</sup> Shore, S. A. ; Moore, P. E. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 859.
- <sup>170</sup> Braddock, M. ; Quinn, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 330.
- <sup>171</sup> Gwee, K. A. ; Collins, S. M. ; Read, N. W. ; Rajnakova, A. ; Deng, Y. ; Graham, J. C. ; McKendrick, M.
- W. ; Moochhala, S. M. Gut. 2003, 52, 523.
- <sup>172</sup> Keating, C. ; Pelegrin, P. ; Martinez, C. M. ; Grundy, D. J. Immunol. **2011**, 187, 1467.
- <sup>173</sup> Nicklin, M. J. H. ; Hughes, D. E. ; Barton, J. L. ; Ure, J. M. ; Duff, G. W. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 303.
- <sup>174</sup> Horai, R. ; Saijo, S. ; Tanioka, H. ; Nakae, S. ; Sudo, K. ; Okahara, A. ; Ikuse, T. ; Asano, M. ; Iwakura,
- Y. J. Exp. Med. **2000**, 191, 313.
- <sup>175</sup> Walker, D. G. ; Kim, S. U. ; McGeer, P. L. J. Neurosci. Res. **1995**, 40, 478.
- <sup>176</sup> Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.;
- Miller, D. K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J.; Elliston, K. O.; Ayala, J. M.; Casano, F. J.;
- Chin, J.; Ding, G. J. F.; Egger, L. A.; Gaffney, E. P.; Limjuco, G.; Palyha, O. C.; Raju, S. M.; Rolando,
- A. M. ; Salley, J. P. ; Yamin, T. T. ; Lee, T. D. ; Shively, J. E. ; Maccross, M. ; Mumford, R. A. ; Schmidt, J.
- A.; Tocci, M. J. Nature **1992**, 356, 768.
- <sup>177</sup> Gauer, S. ; Sichler, O. ; Obermuller, N. ; Holzmann, Y. ; Kiss, E. ; Sobkowiak, E. ; Pfeilschifter, J. ; Geiger, H. ; Mühl, H. ; Hauser, I. A. *Kidney Int.* **2007**, *72*, 1081.
- <sup>178</sup> Dinarello, C. A. *Immunity* **2004**, *20*, 243.
- <sup>179</sup> Gallucci, S. ; Matzinger, P. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 114.
- <sup>180</sup> Ia Sala, A.; Ferrari, D.; Di Virgilio, F.; Idzko, M.; Norgauer, J.; Girolomoni, G. *J. Leukoc. Biol.* 2003, 73, 339.

<sup>181</sup> Roberts, J. A. ; Lukewich, M. K. ; Sharkey, K. A. ; Furness, J. B. ; Mawe, G. M. ; Lomax, A. E. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 659.

<sup>182</sup> Friedman, D. J.; Kunzli, B. M.; YI, A. R.; Sevigny, J.; Berberat, P. O.; Enjyoji, K.; Csizmadia, E.;
 Friess, H.; Robson, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16788.

- <sup>183</sup> Cesaro, A.; Brest, P.; Hofman, V.; Hébuterne, X.; Wildman, S.; Ferrua, B.; Marchetti, S.; Doglio,
  A.; Vouret-Craviari, V.; Galland, F.; Naquet, P.; Mograbi, B.; Unwin, R.; Hofman, P. Am. J. Physiol. *Gastrointest. Liver Physiol.* 2010, 299, G32.
- <sup>184</sup> Sanz, J. M. ; Di Virgilio, F. J. Immunol. **2000**, 164, 4893.
- <sup>185</sup> Solle, M. ; Labasi, J. ; Perregaux, D. G. ; Stam, E. ; Petrushova, N. ; Koller, B. H. ; Griffiths, R. J. ; Gabel, C. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 125.
- <sup>186</sup> Labasi, J. M.; Petrushova, N.; Donovan, C.; McCurdy, S.; Lira, P.; Payette, M. M.; Brissette, W.; Wicks, J. R.; Audoly, L.; Gabel, C. A. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 6436.
- <sup>187</sup> Ferrari, D. ; Villalba, M. ; Chiozzi, P. ; Falzoni, S. ; Ricciardi-Castagnoli, P. ; Di Virgilio, F. J. Immunol. **1996**, 156, 1531.
- <sup>188</sup> Ferrari, D. ; Chiozzi, P. ; Falzoni, S. ; Hanau, S. ; Di Virgilio, F. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 579.
- <sup>189</sup> Brough, D. ; Le Feuvre, R. A. ; Iwakura, Y. ; Rothwell, N. J. *Mol. Cell. Neurosci.* **2002**, *19*, 272.
- <sup>190</sup> Lawson, L. J. ; Perry, V. H. ; Dri, P. ; Gordon, S. *Neuroscience* **1990**, *39*, 151.
- <sup>191</sup> Mogi, M. ; Harada, M. ; Narabayashi, H. ; Inagaki, H. ; Minami, M. ; Nagatsu, T. *Neurosci. Lett.* **1996**, *211*, 13.
- <sup>192</sup> Marcellino, D. ; Suarez-Boomgaard, D. ; Sanchez-Reina, M. D. J. Neural Transm. **2010**, 117, 681.
- <sup>193</sup> Tran, C. N. ; Lundy, S. K. ; Fox, D. A. *Pathophysiology* **2005**, *12*, 183.
- <sup>194</sup> Ryan, L. M. ; Rachow, J. W. ; McCarty, D. J. J. Rheumatol. **1991**, *18*, 716.
- <sup>195</sup> Solini, A. ; Chiozzi, P. ; Morelli, A. ; Fellin, R. ; Di Virgilio, F. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 297.
- <sup>196</sup> Gourine, A. V. ; Poputnikov, D. M. ; Zhernosek, N. ; Melenchuk, E. V. ; Gerstberger, R. ; Spyer, K. M.
- ; Gourine, V. N. Br. J. Pharmacol. 2005, 146, 139.

<sup>197</sup> Dell'Antonio, G. ; Quattrini, A. ; Cin, E. D. ; Fulgenzi, A. ; Ferrero, M. E. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 3378.

<sup>198</sup> Feldmann, M. ; Brennan, F. M. ; Maini, R. N. Annu. Rev. Immunol. **1996**, *14*, 397.

- <sup>199</sup> Jo, S. K. ; Cha, D. R. ; Cho, W. Y. ; Kim, H. K. ; Chang, K. H. ; Yun, S. Y. ; Won, N. H. *Nephron.* **2002**, *91*, 406.
- <sup>200</sup> Shum, P. ; Gross, A. ; Ma, L. ; McGarry, D. G. ; Gregory, H. ; Rampe, D. ; Ringheim, G. ; Sabol, J. S. ;
   Francis, A. WO 2005014555, **2005**.
- <sup>201</sup> Mariathasan, S.; Weiss, D. S.; Newton, K.; McBride, J.; O'Rourke, K.; Roose-Girma, M.; Lee, W.
  P.; Weinrauch, Y.; Monack, D. M.; Dixit, V. M. *Nature* 2006, 440, 228.
- <sup>202</sup> Pfeiffer, Z. A. ; Aga, M. ; Prabhu, U. ; Watters, J. J. ; Hall, D. J. ; Bertics, P. J. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 75, 1173.
- <sup>203</sup> Allam, R. ; Darisipudi, M. N. ; Rupanagudi, K. V. ; Lichtnekert, J. ; Tschopp, J. ; Anders, H. J. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 2714.
- <sup>204</sup> Ferrari, D. ; Chiozzi, P. ; Falzoni, S. ; Dal Susino, M. ; Melchiorri, L. ; Baricordi, O. R. ; Di Virgilio, F. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 1451.
- <sup>205</sup> Sluyter, R. ; Shemon, A. N. ; Wiley, J. S. J. Immunol. **2004**, 172, 3399.
- <sup>206</sup> Jelassi, B. ; Anchelin, M. ; Chamouton, J. ; Cayuela, M. L. ; Clarysse, L. ; Li, J. ; Gore, J. ; Jiang, L. H. ;
   Roger, S. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 1487.
- <sup>207</sup> Pearce, J. M. J. Neurol. **2002**, 249, 1749.
- <sup>208</sup> Marx, J. Science **2004**, 306, 966.

<sup>209</sup> El Omar, E. M.; Carrington, M.; Chow, W. H.; McColl, K. E. L.; Bream, J. H.; Young, H. A.;
Herrera, J.; Lissowska, J.; Yuan, C. C.; Rothman, N.; Lanyon, G.; Martin, M.; Fraumeni, J. F.; Rabkin
C. S. *Nature* 2000, 404, 398.

<sup>&</sup>lt;sup>210</sup> El Omar, E. M.; Carrington, M.; Chow, W. H.; McColl, K. E. L.; Bream, J. H.; Young, H. A.;
Herrera, J.; Lissowska, J.; Yuan, C. C.; Rothman, N.; Lanyon, G.; Martin, M.; Fraumeni, J. F.; Rabkin,
C. S. *Nature* **2001**, *412*, 99.
- <sup>211</sup> Adinolfi, E. ; Melchiorri, L. ; Falzoni, S. ; Chiozzi, P. ; Morelli, A. ; Tieghi, A. ; Cuneo, A. ; Castoldi, G. ;
  Di Virgilio, F. ; Baricordi, O. R. *Blood* 2002, *99*, 706.
- <sup>212</sup> Slater, M. ; Danieletto, S. ; Pooley, M. ; The, L. C. ; Gidley-Baird, A. ; Barden, J. A. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *83*, 1.
- <sup>213</sup> Li, X. ; Zhou, L. ; Feng, Y. H. ; Abdul-Karim, F. W. ; Gorodeski, G. I. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2006**, *15*, 1906.
- <sup>214</sup> Solini, A.; Cuccato, S.; Ferrari, D.; Santini, E.; Gulinelli, S.; Callegari, M. G.; Dardano, A.; Faviana,
  P.; Madec, S.; Di Virgilio, F.; Monzani, F. *Endocrinology*. **2008**, *149*, 389.
- <sup>215</sup> Slater, M.; Danieletto, S.; Gidley-Baird, A.; The, L. C.; Barden, J. A. *Histopathology*. 2004, 44, 206.
  <sup>216</sup> Adinolfi, E.; Raffaghello, L.; Giuliani, A. L.; Cavazzini, L.; Capece, M.; Chiozzi, P.; Bianchi, G.;
  Kroemer, G.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F. *Cancer Res.* 2012, *72*, 2957.
- <sup>217</sup> Baricordi, O. R.; Ferrari, D.; Melchiorri, L.; Chiozzi, P.; Hanau, S.; Chiari, E.; Rubini, M.; Di Virgilio, F. *Blood* **1996**, *87*, 682.
- <sup>218</sup> Adinolfi, E. ; Callegari, M. G. ; Ferrari, D. ; Bolognesi, C. ; Minelli, M. ; Wieckowski, M. R. ; Pinton, P. ; Rizzuto, R. ; Di Virgilio, F. *Mol. Biol. Cell.* **2005**, *16*, 5054.
- <sup>219</sup> Chen, S. ; Ma, Q. ; Krafft, P. R. ; Chan, Y. ; Tang, J. ; Zhang, J. ; Zhang, J. H. *Crit. Care Med.* 2013, 41, 466.
- <sup>220</sup> Wang, W. ; Xiao, J. ; Adachi, M. ; Liu, Z. ; Zhou, J. Cell. Physiol. Biochem. **2011**, 28, 199.
- <sup>221</sup> Bian, S.; Sun, X.; Bai, A.; Zhang, C.; Li, L.; Enjyoji, K.; Junger, W. G.; Robson, S. C.; Wu, Y. *PLoS One* **2013**, *8*, e60184.
- <sup>222</sup> Agteresch, H. J.; Dagnelie, P. C.; Van der Gaast, A.; Stijnen, T.; Wilson, J. H. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 321.
- <sup>223</sup> Chessell, I. P.; Hatcher, J. P.; Bountra, C.; Michel, A. D.; Hughes, J. P.; Green, P.; Egerton, J.;
  Murfin, M.; Richardson, J.; Peck, W. L.; Grahames, C. B.; Casula, M. A.; Yiangou, Y.; Birch, R.;
  Anand, P.; Buell, G. N. *Pain.* **2005**, *114*, 386.

<sup>224</sup> Chen, Y.; Zhang, X.; Wang, C.; Li, G.; Gu, Y.; Huang, L. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 16773.

- <sup>225</sup> Clark, A. K.; Staniland, A. A.; Marchand, F.; Kaan, T. K.; McMahon, S. B.; Malcangio, M. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 573.
- <sup>226</sup> Honore, P.; Donnelly-Roberts, D.; Namovic, M. T.; Hsieh, G.; Zhu, C. Z.; Mikusa, J. P.;
  Hernandez, G.; Zhong, C.; Gauvin, D. M.; Chandran, P.; Harris, R.; Medrano, A. P.; Carroll, W.;
  Marsh, K.; Sullivan, J. P.; Faltynek, C. R.; Jarvis, M. F. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006, 319, 1376.
- <sup>227</sup> Yoshida, Y. ; Murata, Y. *Med. Clin. North Am.* **1990**, *74*, 67.
- <sup>228</sup> Shoda, R. ; Matsueda, K. ; Yamato, S. ; Umeda, N. Am. J. Clin. Nutr. **1996**, 63, 741.
- <sup>229</sup> Thia, K. T.; Loftus, E. V.; Sandborn, W. J.; Yang, S. K. Am. J. Gastroenterol. **2008**, 103, 3167.
- <sup>230</sup> Wada, S.; Sato, K.; Ohta, R.; Wada, E.; Bou, Y.; Fujiwara, M.; Kiyono, T.; Park, E. Y.; Aoi, W.;
   Takagi, T.; Naito, Y.; Yoshikawa, T. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8807.
- <sup>231</sup> Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J. P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk,
- C.; O'Morain, C. A.; Gassull, M.; Binder, V.; Finkel, Y.; Cortot, A.; Modigliani, R.; Laurent-Puig, P.;
- Gower-Rousseau, C. ; Macry, J. ; Colombel, J. F. ; Sahbatou, M. ; Thomas, G. Nature 2001, 411, 599.
- <sup>232</sup> Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran,
- T. ; Karaliuskas, R. ; Duerr, R. H. ; Achkar, J. P. ; Brant, S. R. ; Bayless, T. M. ; Kirschner, B. S. ; Hanauer,
- S. B.; Nuñez, G.; Cho, J. H. Nature 2001, 411, 603.
- <sup>233</sup> Waller S. ; Tremelling, M. ; Bredin, F. ; Godfrey, L. ; Howson, J. ; Parkes, M. Gut. **2006**, 55, 809.
- <sup>234</sup> Stoll, M. ; Corneliussen, B. ; Costello, C. M. ; Waetzig, G. H. ; Mellgard, B. ; Koch, W. A. ; Rosenstiel,
- P.; Albrecht, M.; Croucher, P. J.; Seegert, D.; Nikolaus, S.; Hampe, J.; Lengauer, T.; Pierrou, S.;
- Foelsch, U. R. ; Mathew, C. G. ; Lagerstrom-Fermer, M. ; Schreiber, S. Nat. Genet. 2004, 36, 476.
- <sup>235</sup> Xavier, R. J. ; Podolsky, D. K. *Nature* **2007**, *448*, 427.
- <sup>236</sup> Podolsky, D. K. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 417.
- <sup>237</sup> Neurath, M. F.; Fuss, I.; Pasparakis, M.; Alexopoulou, L.; Haralambous, S.; Meyer zum Büschenfelde, K. H.; Strober, W.; Kollias, G. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 1743.

<sup>238</sup> Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A.; Coffman, R. L. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 2348.

<sup>239</sup> Guillory, R. J. ; Jeng, S. J. *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 259.

<sup>240</sup> Maguire, M. H. ; Nobbs, D. M. ; Einstein, R. ; Middleton, J. C. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 415.

<sup>241</sup> Wang, X.; Arcuino, G.; Takano, T.; Lin, J.; Peng, W. G.; Wan, P.; Li, P.; Xu, Q.; Liu, Q. S.;
Goldman, S. A.; Nedergaard, M. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 821.

- <sup>242</sup> Baxter, A. ; Brough, S. ; McInally, T. ; Mortimore, M. ; Cladingboel, D. WO 9929660, **1999**.
- <sup>243</sup> Baxter, A. ; McInally, T. ; Mortimore, M. ; Cladingboel, D. WO 9929661, **1999**.
- <sup>244</sup> Baxter, A. ; Cheshire, D. ; McInally, T. ; Mortimore, M. ; Cladingboel, D. WO 9929686, **1999**.

<sup>245</sup> Friedle, S. A. ; Curet, M. A. ; Watters, J. J. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2010**, *5*, 35.

- <sup>246</sup> Gargett, C. E. ; Wiley, J. S. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 1483.
- <sup>247</sup> Tokumitsu, H.; Chijiwa, T.; Hagiwara, M.; Mizutani, A.; Terasawa, M.; Hidaka, H. J. Biol. Chem. **1990**, 265, 4315.
- <sup>248</sup> Hopper, A. T. ; Campbell, B. M. ; Kao, H. ; Pintchovski, S. A. ; Staal, R. G. W. Annu. Rep. Med. Chem. **2012**, 47, 37.

<sup>249</sup> Baxter, A.; Bent, J.; Bowers, K.; Braddock, M.; Brough, S.; Fagura, M.; Lawson, M.; McInally, T.;
 Mortimore, M.; Robertson, M.; Weaver, R.; Webborn, P. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003, *13*, 4047.
 <sup>250</sup> Furber, M.; Alcaraz, L.; Bent, J. E.; Beyerbach, A.; Bowers, K.; Braddock, M.; Caffrey, M. V.;

Cladingboel, D.; Collington, J.; Donald, D. K.; Fagura, M.; Ince, F.; Kinchin, E. C.; Laurent, C.;

Lawson, M.; Luker, T. J.; Mortimore, M. M.; Pimm, A. D.; Riley, R. J.; Roberts, N.; Robertson, M.;

Theaker, J.; Thorne, P. V.; Weaver, R.; Webborn, P.; Willis, P. J. Med. Chem. 2007, 50, 5882.

<sup>251</sup> Evans, R. ; Eyssade, C. ; Ford, R. ; Martin, B. ; Thompson, T. ; Willis, P. WO 2004106305, **2004**.

<sup>252</sup> Nelson, D. W. ; Sarris, K. ; Kalvin, D. M. ; Namovic, M. T. ; Grayson, G. ; Donnelly-Roberts, D. L. ;

Harris, R.; Honore, P.; Jarvis, M. F.; Faltynek, C. R.; Carroll, W. A. J. Med. Chem. 2008, 51, 3030.

<sup>253</sup> Nelson, D. W.; Gregg, R. J.; Kort, M. E.; Perez-Medrano, A.; Voight, E. A.; Wang, Y.; Grayson, G.; Namovic, M. T.; Donnelly-Roberts, D. L.; Niforatos, W.; Honore, P.; Jarvis, M. F.; Faltynek, C. R.; Carroll, W. A. J. Med. Chem. **2006**, *49*, 3659.

- <sup>254</sup> Florjancic, A. S. ; Peddi, S. ; Perez-Medrano, A. ; Li, B. ; Namovic, M. T. ; Grayson, G. ; Donnelly-Roberts, D. L. ; Jarvis, M. F. ; Carroll, W. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2089.
- <sup>255</sup> Beswick, P. J.; Billinton, A.; Chambers, L. J.; Dean, D. K.; Fonfria, E.; Gleave, R. J.; Medhurst, S. J.
  ; Michel, A. D.; Moses, A. P.; Patel, S.; Roman, S. A.; Roomans, S.; Senger, S.; Stevens, J. A.;
  Walter, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4653.
- <sup>256</sup> Gleave, R. J. ; Walter, D. S. ; Beswick, P. J. ; Fonfria, E. ; Michel, A. D. ; Roman, S. A. ; Tang, S. P.
   *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4951.
- <sup>257</sup> Chambers, L. J.; Stevens, J. A.; Moses, A. P.; Michel, A. D.; Walter, D. S.; Davies, D. J.; Livermore,
  D. G.; Fonfria, E.; Demont, E. H.; Vimal, M.; Theobald, P. J.; Beswick, P. J.; Gleave, R. J.; Roman, S.
  A.; Senger, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3161.
- <sup>258</sup> Abdi, M. H. ; Beswick, P. J. ; Billinton, A. ; Chambers, L. J. ; Charlton, A. ; Collins, S. D. ; Collis, K. L. ;
- Dean, D. K. ; Fonfria, E. ; Gleave, R. J. ; Lejeune, C. L. ; Livermore, D. G. ; Medhurst, S. J. ; Michel, A. D.
- ; Moses, A. P. ; Page, L. ; Patel, S. ; Roman, S. A. ; Senger, S. ; Slingsby, B. ; Steadman, J. G. A. ; Stevens,
- A. J. ; Walter, D. S. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 5080.
- <sup>259</sup> Abberley, L. ; Bebius, A. ; Beswick, P. J. ; Billinton, A. ; Collis, K. L. ; Dean, D. K. ; Fonfria, E. ; Gleave,
- R. J. ; Medhurst, S. J. ; Michel, A. D. ; Moses, A. P. ; Patel, S. ; Roman, S. A. ; Scoccitti, T. ; Smith, B. ; Steadman, J. G. A. ; Walter, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6370.
- <sup>260</sup> Murphy, N. ; Cowley, T. R. ; Richardson, J. C. ; Virley, D. ; Upton, N. ; Walter, D. ; Lynch, M. A. *Brain Pathology* **2012**, *22*, 295.
- <sup>261</sup> Lee, W. G.; Lee, S. D.; Cho, J. H.; Jung, Y.; Kim, J. H.; Hien, T. T.; Kang, K. W.; Ko, H.; Kim, Y. C. J. *Med. Chem.* **2012**, *55*, 3687.

- <sup>262</sup> Letavic, M. A. ; Lord, B. ; Bischoff, F. ; Hawryluk, N. A. ; Pieters, S. ; Rech, J. C. ; Sales, Z. ; Velter, A.
- I. ; Ao, H. ; Bonaventure, P. ; Contreras, V. ; Jiang, X. ; Morton, K. L. ; Scott, B. ; Wang, Q. ; Wickenden, A. D. ; Carruthers, N. I. ; Bhattacharya, A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 419.
- <sup>263</sup> Donnelly-Roberts, D. L.; Namovic, M. T.; Surber, B.; Vaidyanathan, S. X.; Perez-Medrano, A.;
   Wang, Y.; Carroll, W. A.; Jarvis, M. F. *Neuropharmacology* **2008**, *56*, 223.
- <sup>264</sup> Wilkinson, S. M.; Gunosewoyo, H.; Barron, M. L.; Boucher, A.; McDonnell, M.; Turner, P.;
  Morrison, D. E.; Bennett, M. R.; McGregor, I. S.; Rendina, L. M.; Kassiou, M. ACS Chem. Neurosci.
  2014, 5, 335.
- <sup>265</sup> Boucher, A. A. ; Arnold, J. C. ; Hunt, G. E. ; Spiro, A. ; Spencer, J. ; Brown, C. ; McGregor, I. S. ; Bennett, M. R. ; Kassiou, M. *Neuroscience* **2011**, *189*, 170.
- <sup>266</sup> Keystone, E. C. ; Wang, M. M. ; Layton, M. ; Hollis, S. ; McInnes, I. B. ; D1520C00001 Study Team.
   Ann. Rheum. Dis. **2012**, *71*, 1630.
- <sup>267</sup> Duplantier, A. J. ; Dombroski, M. A. ; Subramanyam, C. ; Beaulieu, A. M. ; Chang, S. P. ; Gabel, C. A.
- ; Jordan, C. ; Kalgutkar, A. S. ; Kraus, K. G. ; Labasi, J. M. ; Mussari, C. ; Perregaux, D. G. ; Shepard, R. ;
- Taylor, T. J.; Trevena, K. A.; Whitney-Pickett, C.; Yoon, K. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011, 21, 3708.
- <sup>268</sup> Chambers, L. J. ; Gleave, R. ; Senger, S. ; Walter, D. S. WO 2008003697, **2008**.
- <sup>269</sup> Beswick, P. J.; Chambers, L. J.; Davies, D. J.; Dean, D.; Demont, E. H.; Roomans, S.; Walter, D. S.
  WO 2007141267, **2007**.
- <sup>270</sup> Beswick, P. J. ; Walter, D. S. WO 2007141269, **2007**.
- <sup>271</sup> Ali, Z.; Laurijssens, B.; Ostenfeld, T.; McHugh, S.; Stylianou, A.; Scott-Stevens, P.; Hosking, L.;
   Dewit, O.; Richardson, J. C.; Chen, C. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *75*, 197.
- <sup>272</sup> Betschmann, P.; Bettencourt, B.; Donnelly-Roberts, D.; Friedman, M.; George, J.; Hirst, G.; Josephsohn, N.; Konopacki, D.; Li, B.; Maull, J.; Morytko, M. J.; Moore, N. S.; Namovic, M.; Rafferty, P.; Salmeron-Garcia, J. A.; Tarcsa, E.; Wang, L.; Woller, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3848.

- <sup>273</sup> Dieltiens, N.; Claeys, N. D.; Zhdankin, V. V.; Nemykin, V. N.; Allaert, B.; Verpoort, F.; Stevens, C.
  V. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *11*, 2649.
- <sup>274</sup> Bourry, A. ; Rigo, B. ; Sanz, G. ; Couturier, D. J. Heterocyclic Chem. **2002**, 39, 119.
- <sup>275</sup> Mavromoustakos, T.; Moutevelis-Minakakis, P.; Kokotos, C. G.; Kontogianni, P.; Politi, A.;
  Zoumpoulakis, P.; Findlay, J.; Cox, A.; Balmforth, A.; Zoga, A.; Iliodromitis, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4353.
- <sup>276</sup> Cauliez, P. ; Rigo, B. ; Fasseur, D. ; Couturier, D. J. Heterocyclic Chem. **1991**, 28, 1143.
- <sup>277</sup> Zhao, S. ; Freeman, J. P. ; Bacon, C. L. ; Fox, G. B. ; O'Driscoll, E. ; Foley, A. G. ; Kelly, J. ; Farrell, U. ;
- Regan, C.; Mizsak, S. A.; Szmuszkovicz, J. Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 1647.
- <sup>278</sup> Snider, B. B. ; Song, F. ; Foxman, B. M. J. Org. Chem. **2000**, 65, 793.
- <sup>279</sup> Guram, A. S. ; Rennels, R. A. ; Buchwald, S. L. Angew. Chem. Int. Ed. **1995**, 34, 1348.
- <sup>280</sup> Surry, D. S. ; Buchwald, S. L. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2008**, 47, 6338.
- <sup>281</sup> Haldon, E. ; Alvarez, E. ; Nicasio, M. C. ; Pérez, P. J. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 8298.
- <sup>282</sup> Ghinet, A. ; Oudir, S. ; Hénichart, J. P. ; Rigo, B. ; Pommery, N. ; Gautret, P. *Tetrahedron* 2010, 66, 215.
- <sup>283</sup> Phillips, D. P. ; Zhu, X. F. ; Lau, T. L. ; He, X. ; Yang, K. ; Liu, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7293.
- <sup>284</sup> Mitra, A. W. ; Hansen, M. K. ; Laurila, M. E. ; Kolis, S. P. ; Martinelli, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 6580.
- <sup>285</sup> Lanigan, R. M. ; Sheppard, T. D. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 7453.
- <sup>286</sup> Rigo, B. ; Erb, B. ; El Ghammarti, S. ; Gautret, P. ; Couturier, D. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 1599.
- <sup>287</sup> Kolocouris, N. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, *3*, 1053.
- <sup>288</sup> Iwasaki, T. ; Horikawa, H. ; Matsumoto, K. ; Miyoshi, M. J. Org. Chem. **1977** , 42 , 2419.
- <sup>289</sup> Toja, E. ; Gorini, C. ; Zirotti, C. ; Barzaghi, F. ; Galliani, G. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 415.
- <sup>290</sup> Kosugi, Y. ; Hamaguchi, H. ; Nagasaka, T. ; Ozawa, N. ; Ohki, S. *Heterocycles* **1980**, *14*, 1245.
- <sup>291</sup> Srivastava, A. ; Jain, N. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5092.
- <sup>292</sup> Li, Y. ; Zhu, X. ; Meng, F. ; Wan, Y. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5450.

<sup>293</sup> Cepanec, I. ; Litvic, M. ; Udikovic, J. ; Pogorelic, I. ; Lovric, M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5614.

<sup>294</sup> Zhang, M. ; Zhang, R. ; Zhang, A.-Q. ; Li, X. ; Liang, H. Synth. Commun. **2009**, *39*, 3428.

<sup>295</sup> Brunton, S. ; Jones, K. *ARKIVOC* **2000**, *iii*, 292.

<sup>296</sup> Hall, J. D. ; Duncan-Gould, N. W. ; Siddiqi, N. A. ; Kelly, J. N. ; Hoeferlin, L. A. ; Morrison, S. J. ;
 Wyatt, J. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1409.

<sup>297</sup> Cook, J. W.; Graham, W.; Cohen, A.; Lapsley, R. W.; Lawrence, C. A. *J. Chem. Soc.* **1944**, *Part III*, 322.

<sup>298</sup> Kleber, C. ; Andrade, Z. ; Alexandre, R. F. *Synlett* **2003**, *8*, 1189.

<sup>299</sup> Cauliez, P.; Fasseur, D.; Couturier, D.; Rigo, B.; Kolocouris, A. *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, *33*, 1233.

<sup>300</sup> Fasseur, D. ; Rigo, B. ; Leduc, C. ; Cauliez, P. ; Couturier, D. *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 1285.
 <sup>301</sup> Gu, W. ; Wang, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4692.

<sup>302</sup> Banner, B. L. ; Bilotta, J. ; Fotouhi, N. ; Gillespie, P. ; Goodnow, R. ; Hamilton, M. ; Haynes, N.-E. ; Kowalczyk, A. ; Mayweg, A. ; Myers, M. ; Pietranico-Cole, S. ; Scott, N. ; Thakkar, K. ; Tilley, J. US20070049632, **2007**.

<sup>303</sup> Joshi, K. C. ; Pathak, V. N. ; Garg, U. J. Heterocyclic Chem. **1979**, *16*, 1141.

<sup>304</sup> Klayman, D. L. ; Bartosevich, J. F. ; Griffin, T. S. ; Mason, C. J. ; Scovill, J. P. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 855.

<sup>305</sup> Liu, Y.; Cui, Y.; Lu, W.; Luo, W.; Wang, J.; Huang, J.; Guo, C. *Molecules* **2011**, *16*, 4527.

<sup>306</sup> Thirumurugan, R. ; Sriram, D. ; Saxena, A. ; Stables, J. ; Yogeeswari, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3106.

<sup>307</sup> Beukers, M. W. ; Wanner, M. J. ; Von Frijtag Drabbe Künzel, J. K. ; Klaasse, E. C. ; IJzerman, A. P. ; Koomen, G. J. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1492.

<sup>308</sup> Baohui, Q. ; Haiyan, T. ; Di, W. ; Jinying, B. ; Yandan, S. ; Ping, G. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2013**, *346*, 596.

<sup>309</sup> Carr, G. ; Chung, M. K. ; Mauk, A. G. ; Andersen, R. J. J. Med. Chem. Lett. **2008**, *51*, 2634.

- <sup>310</sup> Dieltiens, N. ; Claeys, D. D. ; Stevens, C. V. J. Org. Chem. **2006**, *71*, 3863.
- <sup>311</sup> Paz, J. ; Pérez-Balado, C. ; Iglesias, B. ; Munoz, L. J. Org. Chem. **2010**, 75, 8039.
- <sup>312</sup> Olah, G. A. ; Narang, S. C. ; Balaram Gupta, B. G. ; Malhotra, R. J. Org. Chem. **1979**, 44, 1247.
- <sup>313</sup> Glen, R. C. ; Martin, G. R. ; Hill, A. P. ; Hyde, R. M. ; Woollard, P. M. ; Salmon, J. A. ; Buckingham, J. ;
- Robertson, A. D. J. Med. Chem. 1995, 38, 3566.
- <sup>314</sup> Chai, C. L. L. ; Elix, J. A. ; Huleatt, P. B. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8722.
- <sup>315</sup> Finkbeiner, H. J. Am. Chem. Soc. **1964**, 86, 961.
- <sup>316</sup> Stokes, L. ; Jiang, L. H. ; Alcaraz, L. ; Bent, J. ; Bowers, K. ; Fagura, M. ; Furber, M. ; Mortimore, M. ;
- Lawson, M.; Theaker, J.; Laurent, C.; Braddock, M.; Surprenant, A. Br. J. Pharmacol. 2006, 149, 880.
- <sup>317</sup> Kunzler, A. ; Neuenfeldt, P. D. ; Das Neves, A. M. ; Pereira, C. M. ; Marques, G. H. ; Nascente, P. S. ;
- Fernandes, M. H.; Hübner, S. O.; Cunico, W. Eur. J. Med. Chem. 2013, 64, 74.