



UNIVERSITE DE LILLE 2 – DROIT ET SANTE

INSTITUT DE CHIMIE PHARMACEUTIQUE ALBERT LESPAGNOL

THESE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : *Sciences du médicament*

Présentée et soutenue le 25 septembre 2015

par

Lucas LEMAIRE

Synthèse de composés pyrimido[5,4-*d*]- et pyrido[3,2-*d*]oxazoles et développement de nouveaux agonistes potentiels des récepteurs CB₂ pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Membres du jury

Directeur de thèse :	Pr Régis MILLET	Professeur, Université de Lille 2
Co-encadrante :	Dr Natascha LELEU-CHAVAIN	Maitre de conférences, Université de Lille 2
Rapporteurs :	Pr Pascal CARATO	Professeur, Université de Poitiers
	Dr Thierry LOMBERGET	Maitre de conférences, Université de Lyon 1
Examineurs :	Pr Philippe CHAVATTE	Professeur, Université de Lille 2
	Pr Bernard PIROTTE	Professeur, Université de Liège

« Ce n'est qu'en essayant continuellement, que l'on finit par réussir.
Ou, en d'autres termes : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche »

Devise Shadock

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert l'Espagnol, au sein de l'unité INSERM U995-LIRIC, sous la direction du Professeur Régis Millet. Ce projet a été financé par l'Université de Lille 2.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements :

- A mon directeur de thèse : Monsieur le Professeur Régis Millet. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités pour mener à bien cette thèse. Je vous remercie de tout ce que vous avez fait pour moi, de vos enseignements et de vos conseils.

- A ma co-encadrante de thèse : Madame le Docteur Natascha Leleu-Chavain, je te dois beaucoup. Un simple remerciement ne serait pas suffisant compte tenu des heures que tu as passées à corriger les fautes de mes différents écrits (et il y en avait).

- A mes rapporteurs : Monsieur le Professeur Pascal Carato et Monsieur le Docteur Thierry Lomberget. C'est un honneur de vous avoir dans mon jury de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

- A mes examinateurs :

Monsieur le Professeur Bernard Pirotte. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

Monsieur le Professeur Philippe Chavatte, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de l'ICPAL. Je souhaiterais aussi vous remercier pour vos enseignements à travers le Mastère en Drug Design et pour vos conseils.

Aux personnes ayant contribué au bon déroulement de cette thèse :

Madame Amélie Barczyk, merci bwaaaah'coup d'avoir effectué les évaluations pharmacologiques *in vitro* de mes produits même si il semblerait que je n'ai pas assez payé pour avoir de bons résultats.

Monsieur le Docteur Xavier Dezitter, je te remercie pour ta sympathie et ta bonne humeur. Ton humour décalé et tendancieux à toujours réussi à me faire rire. N'hésite surtout pas à me contacter si tu as besoin d'un barman pour ton gîte.

Madame Perrine Six, je te remercie d'avoir effectué mes analyses LCMS et surtout pour les bons moments passés à l'ICP. Je te dois quelques-uns de mes plus beaux surnoms, hérités lors de nos parties de belotes.

Madame Frédérique Klupsch, je te remercie pour toutes tes réponses à mes nombreuses questions de chimie et pour l'aide que tu m'as apportée durant mes 3 années de thèse. Tu devrais te lancer dans la fabrication de déguisements (et surtout de minions).

Monsieur le Docteur Aurélien Tourteau, je te remercie de m'avoir supporté et tenu compagnie pendant mes premières années à l'ICP. Tu as été un collègue et un ami. Même si tes goûts musicaux restent discutables, tu as toujours été motivé pour aller boire un verre. Je vous souhaite, à Caro et à toi, le meilleur pour la suite.

Madame le Docteur Séverine Ravez, je ne peux que te remercier pour tout. Tu as su me remotiver quand je doutais de mes capacités. Les blagues salaces, les bières au café Leffe, les soirées poker... Je me souviendrai de tous ces bons moments. Surtout, ne change pas. Je vous souhaite le meilleur pour le futur, à Chris et à toi (une fois).

Monsieur le Docteur Davy Baudalet, *alias* Oncle Dave, je te remercie pour tous ces fous rires, que ce soit à l'ICP ou à l'extérieur. J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir, qui sait, peut-être autour d'un welsh chez Mich.

Monsieur Wei Tuo, merci d'avoir supporté ma musique pendant 2 ans. Désormais ce sera toi le responsable du labo. Je te souhaite une excellente réussite pour ta thèse et pour la suite.

Monsieur Omar Castillo-Aguilera, merci de m'avoir appris certaines règles de français. Bon courage et bonne réussite pour ta thèse.

Monsieur Stéphane Arsenlis, merci pour tous ces fous rires. Je suis content de t'avoir rencontré. N'oublie pas : tchiki tchika (bien appuyé). Et bonne chance pour la thèse.

Madame Mélanie Bollier, merci pour ta bonne humeur et ta prestation de Boris. Bon courage pour ta thèse.

Monsieur Florian Bacquet, Madame Cassandra Hogie, je vous remercie pour votre participation à mes travaux et votre motivation, même si le succès des synthèses n'était pas toujours au rendez-vous. N'oubliez pas, comme le roseau, la fougère plie mais ne rompt pas. Bon courage pour la suite.

Madame le Docteur Emmanuelle Lipka, je vous remercie pour votre aide et pour l'intérêt que vous avez porté à la séparation des composés chiraux présentés dans ces travaux.

Monsieur le Docteur John Spencer, je vous remercie grandement pour votre collaboration à mes travaux et votre aide précieuse dans la publication de mon article.

Madame Frédérique Crepel, je te remercie pour ta disponibilité et l'ambiance que tu mets au café et le midi, à la base de nombreux jeux de mots vaseux et de fous rires. C'est quand tu le veux que je reviens faire des photos (ou barman) à ton club de danse.

Aux personnes rencontrées durant cette thèse :

Monsieur le Professeur Patrick Depreux, Monsieur le Docteur Christophe Furman, Madame le Docteur Laurence Goossens, je vous remercie pour votre aide, vos conseils ainsi que les connaissances que vous m'avez apportées à travers vos cours.

Monsieur le Docteur Nicolas Renault, Monsieur le Docteur Xavier Laurent, Marion Gay, Romain Duroux, ce fut un plaisir de vous connaître et d'avoir passé de bons moments en votre compagnie.

A mes parents, ainsi qu'à ma sœur, je vous dis un grand merci pour m'avoir soutenu tout au long de ma formation et d'avoir cru en mes capacités. Ce n'est que le début d'une grande histoire que je compte écrire à vos côtés.

LISTE DES ABREVIATIONS

Δ^9 -THC	Δ^9 -Tétrahydrocannabinol
2-AG	2-Arachidonoylglycérol
AC	Adénylate cyclase
ACEA	Arachidonoyl-2-chloroéthylamide
AcOH	Acide acétique
ACPA	Arachidonylcyclopropylamide
AEA	N-Arachidonoyléthanolamide
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCP	β -Caryophyllène
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Bis(triméthylsilyl)acétamide
CB ₁	Récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CB ₂	Récepteur aux cannabinoïdes de type 2
CCFA	Crohn's & Colitis Foundation of America
CDTA	Transacylase calcium-dépendante
CHO	Ovaires de hamster chinois
DAG	Diacylglycérol
DAGL	Diacylglycérol lipase
DCI	Acide chlorhydrique deutéré
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMF-DMA	Diméthylformamide-diméthylacétal
DMSO- <i>d</i> ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DSS	Sulfate de dextran sodique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique

EFCCA	European Federation of Crohn's and ulcerative Colitis Associations
ERK	Extracellular signal-related protein kinase
Et ₃ N	Triéthylamine
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
FAK	Focal adhesion kinase
FAN	Factor-associated with neutral sphingomyelinase activation
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HBTU	Hexafluorophosphate de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
IAMC	Indice d'Activité de la Maladie de Crohn
IFN-γ	Interféron-γ
IL-1β	Interleukine 1β
IL-4	Interleukine 4
IP ₃	Inositol triphosphate
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal-kinase
kDa	Kilo Dalton
<i>K_i</i>	Constante d'affinité
LPI	Lysophosphatidylinositol
MAG	Monoacylglycérol
MAGL	Monoacylglycérol lipase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MW	Micro-onde
NAE	<i>N</i> -Acyléthanolamine
NAPE-PLD	<i>N</i> -Acylphosphatidyléthanolamine phospholipase D
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NGF	Nerve growth factor
nM	Nanomolaire

NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
NT	Neurotransmetteur
PA	Acide phosphatidique
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEI	Polyéthylèneimine
PI	Phosphatidylinositol
PI ₃ K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	Protéine kinase
PL	Phospholipide
ppm	Partie par million
RCH	Rectocolite hémorragique
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSA	Relations structure-activité
SEP	Sclérose en plaque
SNC	Système nerveux central
SPT	Sérine palmitoyltransférase
TA	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
THF- <i>d</i> ₈	Tétrahydrofurane deutéré
TNBS	Acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TRIS HCl	Trizma [®] hydrochloré
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	14
I. Généralités sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.....	15
1. Epidémiologie et étiologie des MICI.....	15
2. Symptômes et complications des MICI	20
3. Evaluation des MICI.....	22
4. Traitements actuels des MICI	23
II. Le système endocannabinoïde	27
1. Les récepteurs aux cannabinoïdes	29
a. Le récepteur CB ₁	30
i. Structure.....	30
ii. Distribution.....	31
iii. Les agonistes du récepteur CB ₁	32
iv. Les agonistes inverses et antagonistes du récepteur CB ₁	34
b. Le récepteur CB ₂	35
i. Structure.....	35
ii. Distribution.....	38
iii. Les agonistes du récepteur CB ₂	39
A. <i>Les phytocannabinoïdes</i>	39
B. <i>Les cannabinoïdes synthétiques</i>	41
B1. Les indoles	41
B2. Les benzimidazoles.....	42
B3. Les imidazopyridines	42
B4. Les pyrazoles bicycliques.....	43
B5. Les composés tricycliques	44
B6. Autres bicycles.....	44
B7. Les hétérocycles à 6 chaînons	45
B8. Les hétérocycles à 5 chaînons	47
B9. Les diazépanes.....	47
iv. Les agonistes inverses et antagonistes du récepteur CB ₂	48

c.	Le récepteur GPR55.....	50
i.	Structure.....	50
ii.	Distribution.....	51
iii.	Les agonistes du récepteur GPR55.....	52
iv.	Les agonistes inverses et antagonistes du récepteur GPR55.....	54
d.	Les hétérodimères.....	55
i.	Hétéromères CB ₁ /CB ₂	55
ii.	Hétéromères CB ₁ /GPR55.....	56
iii.	Hétéromères CB ₂ /GPR55.....	57
2.	Les endocannabinoïdes	57
a.	L'anandamide	58
b.	Le 2-arachidonoylglycérol	59
3.	Les voies de biotransformation des endocannabinoïdes.....	60
a.	Les voies de biosynthèse	60
i.	Biosynthèse de l'anandamide	60
ii.	Biosynthèse du 2-arachidonoylglycérol	61
b.	Les voies de biodégradation.....	63
i.	La fatty acid amide hydrolase.....	63
ii.	La monoacylglycerol lipase.....	64
4.	Les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs aux cannabinoïdes	65
a.	Voies de transduction du récepteur CB ₁	65
b.	Voies de transduction du récepteur CB ₂	70
III.	Le récepteur CB₂ en tant que cible thérapeutique	72
1.	Le récepteur CB ₂ et l'inflammation	73
a.	Le récepteur CB ₂ et les pathologies neurodégénératives	73
b.	Le récepteur CB ₂ et les MICI	74
c.	Le récepteur CB ₂ et les autres maladies inflammatoires	75
2.	Le récepteur CB ₂ et la douleur	77
3.	Les autres applications thérapeutiques du récepteur CB ₂	79
a.	Le récepteur CB ₂ et l'ostéoporose.....	79
b.	Le récepteur CB ₂ et le cancer	80
c.	Le récepteur CB ₂ et les hépatologies chroniques.....	81
d.	Implication du récepteur CB ₂ dans d'autres pathologies.....	82
IV.	Le récepteur P2X₇.....	83
	CONCEPTION.....	86

I. Travaux antérieurs	88
1. Travaux antérieurs sur les agonistes sélectifs du récepteur CB ₂	88
2. Travaux antérieurs sur les inhibiteurs de la FAAH	90
3. De la conception de nouveaux inhibiteurs de la FAAH à la conception d'agonistes sélectifs du récepteur CB ₂	93
II. Conception des différentes séries	95
1. Série A : les 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles	95
2. Série B : les <i>N</i> -(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides	96
3. Série C : les pyrimido[5,4- <i>d</i>]- et pyrido[3,2- <i>d</i>]oxazoles	98
a. Série C ₁ : les pyrimido[5,4- <i>d</i>]oxazoles	99
b. Série C ₂ : les pyrido[3,2- <i>d</i>]oxazoles	102
STRATEGIE DE SYNTHÈSE	103
I. Synthèse des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles 5-12 (série A)	104
1. Réaction d' <i>O</i> -alkylation : synthèse du composé 1	105
2. Réaction de Claisen : synthèse du composé 2	105
3. Réaction de cyclisation en isoxazole : synthèse du composé 3	106
4. Réaction de saponification : synthèse du composé 4	107
5. Réaction d'amidification : synthèse des composés 5-12	107
II. Synthèse des <i>N</i>-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides 33-48 (série B)	109
1. Réaction d' <i>O</i> -alkylation : synthèse des composés 13-17	110
2. Réaction de saponification : synthèse des composés 18-22	111
3. Réaction d'acylation : synthèse des chlorures d'acyle non commerciaux	112
4. Cyclisation en oxazole : synthèse des composés 23-32	112
a. Formation du cycle oxazole	112
b. Optimisation de la réaction par chauffage traditionnel	113
c. Optimisation de la réaction par micro-ondes	114
d. Synthèse des composés 23-32	115
5. Réaction d'amidification : synthèse des composés 33-48	116
III. Synthèse des pyrimido[5,4-<i>d</i>]- et pyrido[3,2-<i>d</i>]oxazoles 50-70 (série C)	117
1. Série C ₁ : les pyrimido[5,4- <i>d</i>]oxazoles 50-66	118
a. Condensation avec le diméthylformamide-diméthylacétale : synthèse des composés 50-51	118
b. Cyclisation par réarrangement de Dimroth : synthèse des composés 52-56	119
c. Réaction de cyclisation en oxazolopyrimidine non substituée : synthèse des composés 57-60	123
d. Réaction d'amidification : synthèse des composés 61-64	125

i.	Synthèse des composés 61-64	125
ii.	Différents essais pour obtenir le composé 72	126
e.	Synthèse de la 6,7-dihydropyrimido[5,4- <i>d</i>][1,3]oxazole-7-one 65	128
f.	Cyclisation en 7-aminopyrimido[5,4- <i>d</i>][1,3]oxazol-5-ol : synthèse du composé 66	133
2.	Série C2 : les pyrido[3,2- <i>d</i>]oxazoles 67-70	135
a.	Cyclisation en 7-amino-5-oxo-4,5-dihydropyrido[3,2- <i>d</i>][1,3]oxazole-6-carboxylate d'éthyle : synthèse du composé 67	135
b.	Cyclisation en 7-amino-pyrido[3,2- <i>d</i>][1,3]oxazole : synthèse des composés 68-70	138
EVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES.....		142
I.	Evaluations pharmacologiques sur les récepteurs CB₁ et CB₂	143
1.	Mesure de l'affinité des composés vis-à-vis des récepteurs CB ₁ et CB ₂	143
a.	Affinité des composés 5-12 pour le récepteur CB ₂	144
b.	Affinité des composés 33-48 pour les récepteurs CB ₁ et CB ₂	146
c.	Affinité des composés 62-64 pour le récepteur CB ₂	150
2.	Mesure de l'activité fonctionnelle des composés vis-à-vis des récepteurs CB ₁ et CB ₂	150
II.	Evaluations pharmacologiques sur le récepteur P2X₇	151
1.	Mesure du caractère inhibiteur de l'activité du récepteur P2X ₇	151
2.	Inhibition de l'activité du récepteur P2X ₇ par des composés de la série B	153
3.	Inhibition de l'activité du récepteur P2X ₇ par des composés de la série C	154
III.	Activité mixte agoniste du récepteur CB₂ / antagoniste du récepteur P2X₇	156
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		158
PARTIE EXPERIMENTALE.....		164
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		250
PUBLICATIONS.....		270

INTRODUCTION

I. Généralités sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), dont les deux principales formes sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), sont des maladies entraînant une inflammation chronique, intermittente ou continue, du système digestif. Ces maladies s'expriment principalement chez l'adulte jeune et évoluent par périodes de poussées, de durée et de fréquence variable selon les patients, entrecoupées de périodes de rémission.

La pathogénèse de ces maladies n'est, à ce jour, que partiellement connue. La synergie de facteurs génétiques et environnementaux, tels la modification de la flore bactérienne intraluminaire et une perméabilité intestinale accrue, peut être à l'origine d'une dérégulation de l'immunité intestinale ayant pour conséquence la formation de lésions gastro-intestinales.

1. Epidémiologie et étiologie des MICI

Plusieurs études cliniques ont été effectuées dans différentes régions du monde. Ainsi, la CCFA (Crohn's & Colitis Foundation of America) recense 1,4 millions de personnes souffrant de MICI aux Etats Unis.¹ L'EFCCA (European Federation of Crohn's and ulcerative Colitis Associations) estime, dans une étude clinique nommée IMPACT réalisée entre 2010 et 2011, à 2,2 millions de personnes affectées par ces maladies en Europe.² En France, 60 000 personnes souffrent de la MC et environ 40 000 sont affectées par la RCH. Environ 6 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, avec une incidence respective de 8,2 et 7,2 pour 100 000 pour la MC et la RCH entre 2000 et 2002 dans le nord de la France.³ Dans cette même zone, une étude nommée EPIMAD a montré une augmentation de l'incidence des MICI, et particulièrement de la MC, durant les 30 dernières années (figure 1).⁴

¹ <http://www.ccfa.org/what-are-crohns-and-colitis/> (mai 2015)

² <http://www.efcca.org/index.php/about-efcca/what-are-ibd> (mai 2015)

³ Bernstein, C.N.; Shanahan, F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*. **2008**, *57*, 1185 - 1191.

⁴ Gower-Rousseau, C.; Vasseur, F.; Fumery, M.; Savoye, G.; Salleron, J.; Dauchet, L.; Turck, D.; Cortot, A.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J.F. Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). *Digest. Liver Dis.* **2013**, *45*, 89 - 94.

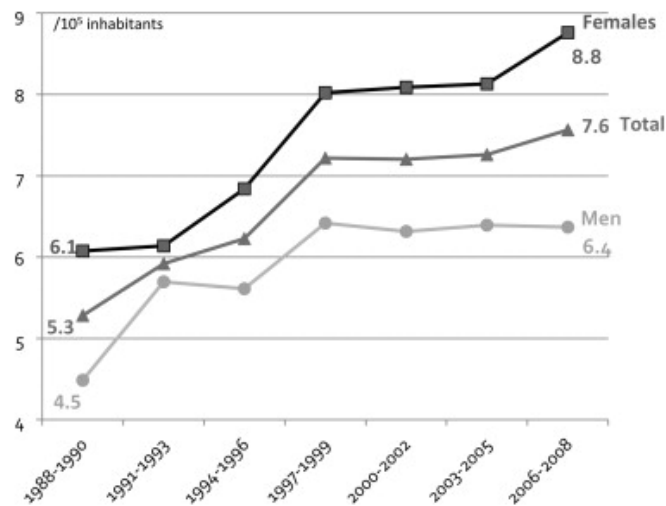


Figure 1. Incidence de la MC dans le nord de la France entre 1988 et 2008

La répartition des cas de MICI dans le monde n'est pas homogène (figure 2). De manière générale, les pays du Sud semblent nettement moins affectés que les pays du Nord. En effet, l'augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en développement semble être corrélée avec l'occidentalisation du mode de vie dans ces pays. De même, la nature des régions (urbaines – rurales), ainsi que le niveau économique et social des populations (privilégiées – désavantagées) influent sur l'incidence des MICI. La plupart des études tendent à montrer que la classe sociale la plus élevée est la première à être concernée, avant que la maladie ne se généralise à toute la population. Plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène ont déjà été émises. Les répartitions inégales, mondiales et nationales, de ces maladies impliqueraient des facteurs environnementaux, tels que la pollution, l'alimentation, le mode de vie ou encore le stress, plus présents dans les pays développés ou en voie de développement. De plus, la « théorie hygiéniste », pourrait expliquer les différences observées entre les pays pauvres et les pays riches. Cette théorie stipule que l'augmentation du niveau de vie et de l'hygiène diminuerait l'exposition aux infections et donc l'efficacité du système immunitaire des individus, favorisant l'apparition de maladies immunitaires chroniques.

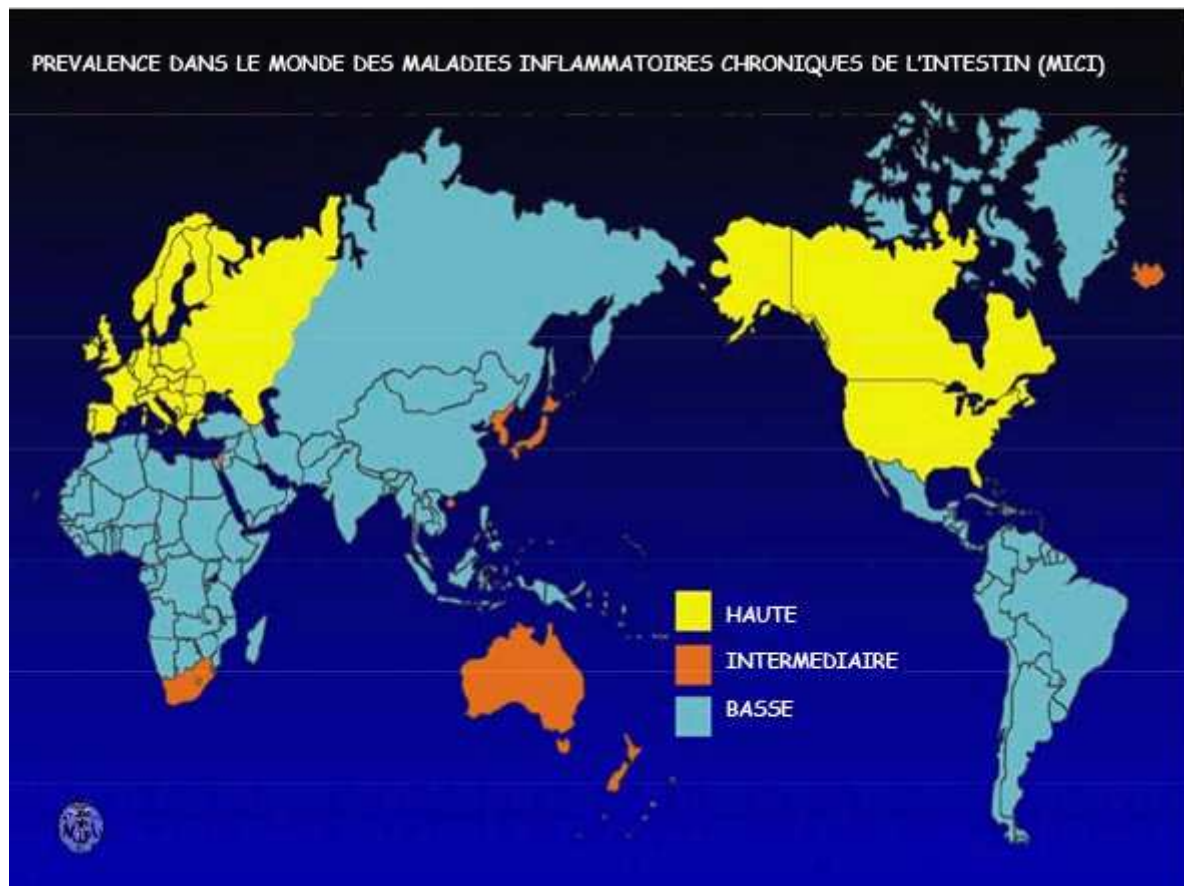


Figure 2. Prévalence des MICI dans le monde⁵

De plus, l'apparition fréquente des MICI à l'adolescence suggère l'implication d'un facteur hormonal. Ces maladies sont le plus souvent diagnostiquées chez des sujets âgés de 20 à 30 ans, et 15% des cas concernent des enfants. Une légère inégalité homme – femme peut être observée dans la répartition des MICI. En France, en 2012, 56% des personnes souffrant de MICI étaient des femmes. On peut cependant faire une différenciation entre les deux maladies : aucune différence n'est observée pour la RCH (51% de femmes – 49% d'hommes) alors que dans le cas de la MC, 59% des sujets malades sont des femmes. Cette différence pourrait disparaître à l'avenir en raison de l'augmentation de l'incidence de la MC chez les hommes durant les dernières années.

D'après l'étude IMPACT de l'EFCCA, en Europe, 61% des hommes concernés par les MICI souffrent de la MC et 36% de la RCH. Ces chiffres se retrouvent chez la femme. En effet, la même prédominance de la MC peut être observée : 64% contre 32% pour la RCH.⁶

⁵ <http://www.hepatoweb.com/Crohn-Frequence.php> (mai 2015)

⁶ <http://www.efcca-solutions.net/media/european/EuropeanReport.pdf> (mai 2015)

Cette prédominance est inversée dans les pays en voie de développement où l'incidence des MICI est en augmentation. Ainsi, en Amérique Latine, la RCH est la forme de MICI la plus répandue, avec un ratio RCH / MC de 5,8. Il en est de même dans d'autres régions du monde, comme en Corée du Sud, avec un ratio RCH / MC de 2,3.

Les causes exactes à l'origine des MICI ne sont actuellement pas encore entièrement déterminées. Comme cités précédemment, de nombreux facteurs environnementaux peuvent intervenir dans le développement de ces maladies. En effet, des études ont montré que des individus ayant changé de région, et donc de mode de vie, possèdent le même risque de contracter la maladie que la population parmi laquelle ils vivent.

Un exemple important de ces facteurs environnementaux est le tabac. Il a été montré que le tabac possédait des actions opposées selon le type de MICI.⁷ Chez les fumeurs, le risque de RCH est réduit d'environ 40% et l'âge auquel la maladie est contractée est grandement retardé chez les hommes (environ 25 ans pour les non fumeurs contre 42 ans pour les anciens fumeurs). Cette différence d'âge n'est pas observée chez les femmes, pour des raisons encore inexpliquées.⁸ De plus, le risque de contracter une RCH augmente chez les anciens fumeurs, démontrant un effet suspensif du tabac. Contrairement à la RCH, la MC est favorisée par le tabac : les fumeurs présentent une probabilité plus importante de contracter la maladie. Cet effet inducteur est plus important chez les femmes que chez les hommes.⁹

Un deuxième facteur induisant un effet sur les MICI est l'appendicectomie. Cette opération semble protéger de l'apparition de la RCH avec une réduction du risque de 70%. De plus, si une RCH est contractée après une appendicectomie, l'évolution de la maladie est moins importante. Cet effet n'est, au contraire, pas observé lorsque l'opération est effectuée après l'apparition de la maladie. Inversement, l'appendicectomie pourrait avoir des effets aggravant sur l'apparition de la MC chez le patient opéré.¹⁰ Actuellement, le rôle biologique de l'appendice sur l'apparition des MICI n'a pas encore été caractérisé. Deux théories ont été

⁷ Calkins, B.M. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **1989**, *34*, 1841 – 1854.

⁸ Benoni, C.; Nilsson, A. Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *Scand. J. Gastroenterol.* **1987**, *22*, 1130 – 1136.

⁹ Persson, P.G.; Ahlbom, A.; Hellers, G. Inflammatory bowel disease and tobacco smoke - a case control study. *Gut.* **1990**, *31*, 1377 – 1381.

¹⁰ Russel, M.G.; Dorant, E.; Brummer, R.J.; Van de Kruis, M.A.; Muris, J.W.; Bergers, J.M.; Goedhard J. ; Stockbrügger, R.W. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease : results of a large case-control study. *South Limburg Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology.* **1997**, *113*, 377 - 382.

néanmoins avancées : la présence dans l'appendice d'un agent bactérien pourrait être responsable de la RCH ou encore l'état inflammatoire prédisposant à l'appendicite aurait un effet protecteur contre le développement ultérieur d'une RCH.

S'il est reconnu que ces pathologies multifactorielles impliquent des facteurs environnementaux, une prédisposition génétique semble toutefois être requise pour le développement des MICI. Il a été observé que dans une famille où un des parents est affecté par une MICI, l'enfant a 1% de risque de développer à son tour une de ces maladies. Lorsque les deux parents sont atteints d'une MICI, ce risque passe alors à 33%.¹¹ De plus, des études ont été effectuées sur des jumeaux mono- et dizygotes. Pour la MC, il a été montré que si l'un des jumeaux est affecté par la maladie, le deuxième jumeau a 3,9% de risque de contracter la même maladie dans le cas de dizygotes et que cette probabilité augmente à 58,3% dans le cas de jumeaux monozygotes.¹²

Ces résultats ont naturellement incité les scientifiques à rechercher une origine génétique au développement des MICI. Au cours de ces études, trois équipes européennes et américaines ont mis en évidence, en 2001, le premier gène de susceptibilité pour la MC. Il s'agit du gène NOD2/CARD15 situé sur le chromosome 16.^{13,14,15} Il a été montré que des mutations sur ce gène entraînent une réponse immunitaire déficiente vis-à-vis des bactéries intestinales ayant pour conséquence des modifications de la population bactérienne dans la lumière intestinale.¹⁶ D'autres mutations génétiques susceptibles de favoriser l'apparition de MICI ont été par ailleurs identifiées, telles que des mutations sur les gènes OCTN, DLG5 et IL10, respectivement situés sur les chromosomes 5, 10 et 1.^{17,18}

¹¹ <http://www.afa.asso.fr/article/voir/mici-et-heredite.html> (mai 2005)

¹² Tysk, C.; Lindberg, E.; Jarnerot, G.; Floderus-Myrhed, B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. **1988**, *29*, 990 - 996.

¹³ 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. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **2001**, *411*, 599 – 603.

¹⁴ 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.; Nunez, G.; Cho, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **2001**, *411*, 603 – 606.

¹⁵ Hampe, J.; Cuthbert, A.; Croucher, P.J.; Mirza, M.M.; Mascheretti, S.; Fisher, S.; Frenzel, H.; King, K.; Hasselmeier, A.; MacPherson, A.J.; Bridger, S.; Van Deventer, S.; Forbes, A.; Nikolaus, S.; Lennard-Jones, J.E.; Foelsch, U.R.; Krawczak, M.; Lewis, C.; Schreiber, S.; Mathew, C.G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, **2001**, *357*, 1925 - 1928.

¹⁶ Strober, W.; Asano, N.; Fuss, I.; Kitani, A.; Watanabe, T. Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 249 - 260.

¹⁷ Cucchiara, S.; Latiano, A.; Palmieri, O.; Staiano, A.M.; D'Inca, R.; Guariso, G.; Vieni, G.; Rutigliano, V.; Borrelli, O.; Valvano, M.R.; Annese, V. Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1221 - 1229.

2. Symptômes et complications des MICI

Les MICI sont caractérisées par une modification du comportement du système immunitaire vis-à-vis des bactéries de la flore intestinale. Chez un sujet sain, ces bactéries sont tolérées et considérées comme du soi alors que chez un patient souffrant de MICI, le système immunitaire va agir de manière agressive à l'encontre de ces bactéries. Ce dérèglement est responsable du maintien de l'activation des lymphocytes T et d'une modification dommageable du ratio cytokines pro-inflammatoires / cytokines anti-inflammatoires. En effet, les modèles expérimentaux de colite, induite chez la souris par utilisation de sulfate de dextran sodique (DSS) ou d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS), ainsi que des études menées sur des patients atteints de MICI, ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que le « tumor necrosis factor- α » (TNF- α) et l'interleukine 1 β (IL-1 β),¹⁹ et immunorégulatrices, telles l'interferon- γ (IFN- γ) et l'interleukine 4 (IL-4).^{20,21} Ces dernières peuvent être associées à différents types de lésions. L'analyse des lésions dites aiguës montre un profil d'expression de cytokines de type interferon- γ tandis que les lésions dites chroniques mettent en évidence l'implication d'interleukines-4.

Malgré une ressemblance épidémiologique et étiologique entre la MC et la RCH, des différences peuvent être observées sur la localisation et la profondeur des lésions liées à chacune de ces pathologies. En effet, la MC se caractérise par des lésions pouvant être présentes sur l'ensemble du système digestif, de la bouche à l'anus, mais de façon discontinue alors que la RCH n'affecte que l'iléon, le côlon et le rectum de manière continue. Au niveau macroscopique, la MC 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, la MC

¹⁸ Pigneur, B.; Escher, J.; Elawad, M.; Lima, R.; Buderus, S.; Kierkus, J.; Guariso, G.; Canioni, D.; Lambot, K.; Talbot, C.; Shah, N.; Begue, B.; Rieux-Laucat, F.; Goulet, O.; Cerf-Bensussan, N.; Neven, B.; Ruemmele, F.M. Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: a survey of the Genius Working Group. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2013**, *19*, 2820 - 2828.

¹⁹ Neurath, M.F.; Fuss, I.; Pasparakis, M.; Alexopoulou, L.; Haralambous, S.; Meyer zum Büschenfelde, K.H.; Strober, W.; Kollias, G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 1743 - 1750.

²⁰ Jergens, A.E.; Sonea, I.M.; O'Connor, A.M.; Kauffman, L.K.; Grozdanic, S.D.; Ackermann, M.R.; Evans, R.B. Intestinal cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: a meta-analysis with critical appraisal. *Comp. Med.* **2009**, *59*, 153 - 162.

²¹ Bisping, G.; Lügering, N.; Lütke-Brintrup, S.; Pauels, H.G.; Schürmann, G.; Domschke, W.; Kucharzik, T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN- γ) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, *123*, 15 - 22.

entraîne des infiltrations lymphoplasmocytaires avec conservation de la mucosécrétion alors que pour la RCH, des infiltrations de polynucléaires sous forme de cryptites accompagnées d'une diminution de la mucosécrétion sont observées.

Les MICI sont des maladies évoluant par périodes de poussées dont les symptômes altèrent la qualité de vie des patients et sont à l'origine d'une gêne responsable du caractère prohibé de ces pathologies. Les symptômes, de nature et de gravité variables selon la région du tube digestif atteinte, sont présents pendant les périodes de poussées et peuvent diminuer, voire disparaître, pendant les périodes de rémission.

Les deux symptômes prédominants sont des douleurs abdominales et des diarrhées fréquentes, parfois sanglantes, pouvant alterner avec des épisodes de constipation. À ces symptômes peuvent s'ajouter des douleurs lors de la défécation ainsi que des urgences défécatoires sévères. Dans certains cas, d'autres symptômes peuvent aussi être associés aux MICI, tels que la fatigue, l'anorexie et la fièvre. Il est aussi possible d'observer, chez certains patients (environ 25% des cas), des manifestations extra-intestinales à différents niveaux : affections articulaires, cutanées, oculaires ou hépatiques.

Les complications associées à la RCH et à la MC sont principalement observées au niveau intestinal. On retrouve parmi elles, des hémorragies liées à la présence d'ulcères, des perforations intestinales, des sténoses, des fistules, des maladies péri-anales, des abcès intra-abdominaux (MC) et, dans de rares cas, des mégacôlons toxiques potentiellement mortels. La probabilité d'apparition d'un cancer du côlon chez le patient souffrant d'une RCH est aussi augmentée, ainsi que dans le cas de la MC, lorsqu'une partie importante du côlon est touchée par la maladie. En effet, il a été montré que le risque de contracter ce cancer augmente significativement quelques années après le diagnostic de ces maladies (8 à 10 ans). Différents facteurs entrent en compte dans l'apparition de ce cancer : l'âge du malade à l'apparition de la maladie, la durée de la maladie (10 ans après le diagnostic, le risque augmente de 1% chaque année), l'étendue de la maladie et l'existence d'antécédents familiaux.

De plus, il a été remarqué que les personnes souffrant de MICI étaient plus sujettes à des troubles de l'humeur (anxiété et dépression) et étaient plus sensibles à l'ostéoporose, aux maladies thrombo-emboliques ainsi qu'à des épisodes artériels ischémiques que les personnes saines.

3. Evaluation des MICI

Il existe, pour la MC ainsi que pour la RCH, des méthodes permettant d'évaluer la gravité de la maladie reposant sur plusieurs facteurs et signes cliniques.²²

Pour la MC, la sévérité de la pathologie est évaluée par son IAMC (Indice d'Activité de la Maladie de Crohn). Cet indice repose sur 8 facteurs pondérés, listés dans le tableau 1.

Critères		Pondération
Nombre de selles non moulées au cours des 7 derniers jours		x 2
Douleurs ventrales au cours des 7 derniers jours (0 = aucune, 1 = légères, 2 = moyennes, 3 = fortes)		x 5
Etat général au cours des 7 derniers jours (0 = bon, 1 = moyen, 2 = mauvais, 3 = très mauvais, 4 = insupportable)		x 7
Complications (1 point par complication)	Douleur articulaire	x 20
	Inflammation oculaire	
	Lésion dermique	
	Infection périanale	
	Autres fistules	
Elévation de la température corporelle sur 7 jours		x 30
Traitement symptomatique de la diarrhée		
Résistance abdominale (0 = non, 2 = douteuse, 5 = sûre)		x 10
Déviation de l'hématocrite		x 6
Déviation du poids standard en pourcentage		x 1

Tableau 1. Calcul de l'IAMC pour la MC

On considère qu'il y a rémission de la maladie lorsque l'IAMC est inférieur à 150.

²² http://www.gastro.medline.ch/Services_et_outils/Scores_cliniques/Scores_cliniques.php (mai 2015)

La gravité de la RCH est, quant à elle, déterminée par le Score Mayo se basant sur quatre critères distincts (tableau 2).

Critères	0	1	2	3
Fréquence des selles par jour	normal	1 à 2 selles	3 à 4 selles	> 5 selles
Saignement rectal	absence	traces de sang	hématurie évidente	en dehors des selles
Observations endoscopiques	normale	colite légère	colite modérée	colite sévère
Evaluation global du médecin	normal	maladie légère	maladie modérée	maladie sévère

Tableau 2. Calcul du Score Mayo pour la RCH

Un score de 2 à 5 points correspond à une maladie légère. À partir de 6 points, on parle d'une maladie modérée à sévère.

La détermination de la sévérité des MICI chez un patient, ainsi que les symptômes observés lors du développement de la maladie permettent une meilleure prise en charge du malade.

4. Traitements actuels des MICI

Actuellement, aucun traitement curatif des MICI n'existe. À ce jour, les méthodes mises en place pour lutter contre ces maladies permettent, dans le meilleur des cas, d'induire une rémission clinique ainsi que de diminuer le risque de récurrence. A cela, viennent s'ajouter différents traitements visant à diminuer l'inconfort des symptômes de la maladie durant les périodes de poussées. Pour ces raisons, le traitement des MICI est basé sur une médication de longue durée impliquant une combinaison de plusieurs médicaments. Enfin, une option non médicamenteuse, l'intervention chirurgicale, peut être envisagée pour ralentir le développement de la maladie.

Du fait de l'existence de certains facteurs environnementaux, la modification du régime alimentaire ainsi que du mode de vie du patient peut être considérée comme un premier aspect du traitement. L'impact du régime alimentaire sur l'activité inflammatoire des MICI est encore mal connu mais une restriction sur certains types d'aliments peut aider à une baisse de la symptomatologie. Par exemple, les aliments comme les céréales, les épices,

l'alcool et les produits laitiers pouvant augmenter la diarrhée et les crampes, sont à proscrire afin de limiter la fréquence des selles. Il est aussi possible de diminuer les éventuels symptômes obstructifs grâce à un régime liquidien. Concernant le mode de vie, la gestion du stress ainsi que la gestion psychologique de la maladie par le patient peuvent améliorer les conditions de vie de ce dernier.

Différents types de médicaments peuvent être utilisés pour traiter les MICI selon la gravité de la maladie.

Les anti-inflammatoires dérivés des 5-aminosalicylés (figure 3) sont prescrits en première intention. Le chef de file, et le plus ancien composé de cette famille, est la sulfasalazine (Salazopyrine®). Cette famille est aussi représentée par la mésalazine (Pentasa®) et l'olsalazine (Dipentum®). Ces composés présentent une bonne tolérance, ainsi que peu d'effets indésirables, ce qui rend la surveillance du traitement simple et permet leur utilisation sur de grandes durées. Environ 85% des patients atteints de MICI se voient prescrire ce type de médicament.

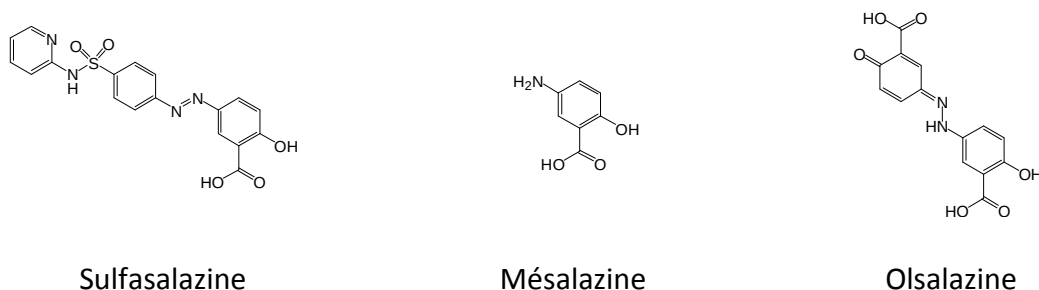
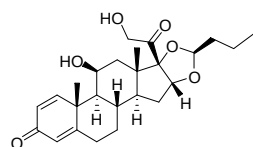
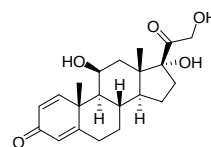


Figure 3. Structures chimiques de la sulfasalazine, de la mésalazine et de l'olsalazine

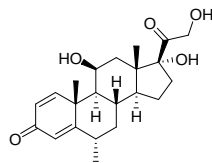
En seconde intention ou lors de poussées plus sévères, les corticoïdes (figure 4) sont alors prescrits. Leur mode d'administration varie selon les composés. Le budésonide (Entocort®) et la prednisolone (Solupred®) sont administrés par voie orale, alors que la méthylprednisolone (Solu-Médrol®) et l'hydrocortisone (Solu-Cortef®) sont administrés par voie intraveineuse. Ces composés sont responsables d'effets gênants : prise de poids, bouffissure du visage, élévation de la tension artérielle, intolérance aux sucres, troubles de l'humeur, troubles endocriniens et osseux. Le traitement est habituellement débuté à des doses élevées, puis les posologies sont progressivement diminuées.



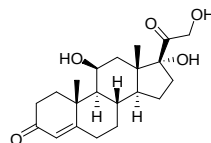
Budésonide



Prednisolone



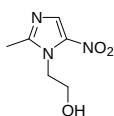
Méthylprednisolone



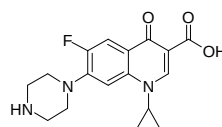
Hydrocortisone

Figure 4. Structures chimiques du budésonide, de la prednisolone, de la méthylprednisolone et de l'hydrocortisone

Les antibiotiques sont un traitement d'appoint des MICI. Ils sont particulièrement utilisés dans la prise en charge des localisations ano-rectales de la MC. Les deux antibiotiques les plus utilisés sont le métronidazole et la ciprofloxacine (figure 5).



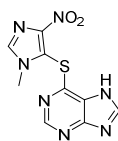
Métronidazole



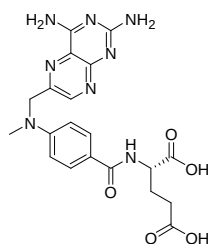
Ciprofloxacine

Figure 5. Structures chimiques du métronidazole et de la ciprofloxacine

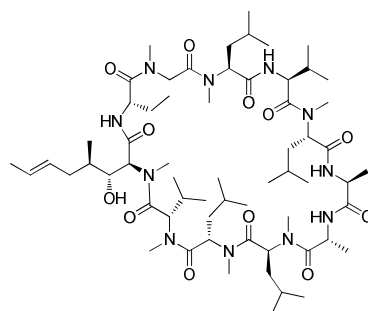
Les immunosuppresseurs (figure 6) sont de plus en plus utilisés dans le traitement des MICI. Ils sont la base du traitement d'entretien de la MC afin de retarder l'apparition de nouvelles poussées et, plus rarement, du traitement d'entretien de la RCH. On retrouve, parmi ces composés, l'azathioprine (Imurel®) ainsi que le méthotrexate (Méthotrexate®). Ils ont un délai d'action de quelques mois avant leur pleine efficacité. Ce délai peut être réduit par l'utilisation de ciclosporine. L'utilisation d'immunosuppresseurs impose une surveillance régulière de certains paramètres sanguins.



Azathioprine



Méthotrexate



Cyclosporine

Figure 6. Structures chimiques de l'azathioprine, du méthotrexate et de la cyclosporine

Des biothérapies peuvent être envisagées lorsqu'aucune réponse suffisante n'a été observée avec les traitements standards. Les patients sont alors traités avec des anticorps monoclonaux anti-TNF α , comme l'infliximab (Remicade®), l'adalimumab (Humira®) et le certolizumab (Cimzia®). Ces biothérapies sont très intéressantes face à des formes sévères de MICI mais leur association avec des immunosuppresseurs (limitant les réactions d'hypersensibilité liées aux biothérapies) reste contestée et leur coût (environ 4000€ / injection) en limite l'utilisation.

Lors de la survenue de complications ou d'une baisse d'efficacité du traitement chez le patient, la chirurgie est envisagée. Environ 70 à 75% des patients souffrant de la MC subissent, au cours de leur vie, une intervention chirurgicale contre 25 à 30% des patients souffrant de RCH. Ces interventions chirurgicales comprennent des drainages d'abcès, des résections segmentaires, des proctocolectomies totales ou encore des iléostomies temporaires ou définitives. Cependant, la chirurgie ne permet pas de guérir le patient. Elle permet uniquement de diminuer les symptômes et de retarder l'évolution de la maladie.

Des études sont actuellement en cours afin d'améliorer les traitements déjà existants. Une nouvelle génération de dérivés 5-aminosalicylés est à l'étude dans le but de développer des molécules plus efficaces, alliant un effet anti-inflammatoire à un effet préventif sur certains cancers.

Étant donné que des modifications de la flore intestinale pourraient être à l'origine ou aggraver une MICI, la recherche s'intéresse également aux probiotiques.²³ L'utilisation de ces bactéries « bénéfiques » pourrait permettre de rééquilibrer cette flore intestinale et d'apporter une action immunomodulatrice.

De nouvelles thérapies ciblant d'autres facteurs de l'inflammation seraient aussi susceptibles de compléter les traitements existants comme les anticorps anti-interleukines, les anticorps humanisés anti-interféron- γ ou encore les cellules souches mésenchymateuses qui ont montré dernièrement leurs effets bénéfiques chez les patients atteints de MICI avec fistules.²⁴

Enfin, des études ont montrées que le système endocannabinoïde, présent au sein du tractus gastro-intestinal, était modifié chez les patients souffrant de MICI.^{25,26,27} Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence le rôle bénéfique exercé par ce système endocannabinoïde sur l'inflammation intestinale.^{22,28,29,30} Pour cette raison, le système endocannabinoïde apparaît donc comme une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des MICI.³¹

II. Le système endocannabinoïde

Le cannabis, aussi appelé chanvre indien, est une des premières plantes cultivées par l'homme. Sa domestication, datant du néolithique, a débuté en Asie centrale et en Chine.

²³ Veerappan, G.R.; Betteridge, J.; Young, P.E. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2012**, *14*, 324 - 333.

²⁴ Ciccocioppo, R.; Bernardo, M.E.; Sgarella, A.; Maccario, R.; Avanzini, M.A.; Ubezio, C.; Minelli, A.; Alvisi, C.; Vanoli, A.; Calliada, F.; Dionigi, P.; Perotti, C.; Locatelli, F.; Corazza, G.R. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. **2011**, *60*, 788 - 798.

²⁵ Di Marzo, V.; Izzo, A.A. Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut*. **2006**, *55*, 1373 - 1376.

²⁶ Wright, K.; Rooney, N.; Feeney, M.; Tate, J.; Robertson, D.; Welham, M.; Ward, S. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology*. **2005**, *129*, 437 - 453.

²⁷ Marquez, L.; Suarez, J.; Iglesias, M.; Bermudez-Silva, F.J.; Rodriguez de Fonseca, F.; Andreu, M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One*. **2009**, *4*, e6893.

²⁸ Engel, M.A.; Kellermann, C.A.; Rau, T.; Burnat, G.; Hahn, E.G.; Konturek, P.C. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *59*, 673 - 689.

²⁹ Di Sabatino, A.; Battista, N.; Biancheri, P.; Rapino, C.; Rovedatti, L.; Astarita, G.; Vanoli, A.; Dainese, E.; Guerci, M.; Piomelli, D.; Pender, S.L.; MacDonald, T.T.; Maccarrone, M.; Corazza, G.R. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 574 - 583.

³⁰ Storr, M.A.; Keenan, C.M.; Zhang, H.; Patel, K.D.; Makriyannis, A.; Sharkey, K.A. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 1678 - 1685.

³¹ Alhouayek, M.; Muccioli, G.G. The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases: from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 615 - 625.

Les fibres de chanvre étaient utilisées pour la fabrication de matériaux, tels le papier, les cordages et les tissus. Une deuxième utilisation du chanvre était celle de sa résine, possédant des effets médicaux : le chanvre était utilisé pour soulager les crampes, les spasmes, les troubles du sommeil et les douleurs.³² De plus, les capacités hallucinogènes de cette plante, lui conférant un effet « magique », étaient très appréciées pour les rites religieux. Il faudra attendre le début du XIX^{ème} siècle, lors de la campagne de Napoléon en Egypte et de la conquête des Indes par l'Angleterre, pour que le cannabis commence à faire son apparition en Europe.

Le cannabis contient de très nombreuses substances chimiques : plus de 489 composés ont ainsi été référencés, dont plus de 70 appartiennent à la famille des cannabinoïdes.³³ Gaoni et Mechoulam ont identifié, en 1964, le principal composé psychoactif du cannabis : le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, figure 7).³⁴

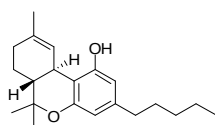


Figure 7. Structure chimique du Δ^9 -THC

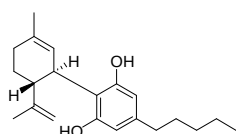
Aujourd'hui, le Δ^9 -THC est utilisé, avec le cannabidiol, en tant que principe actif dans un médicament : le Sativex[®]. Ce médicament a reçu une AMM en 2005 au Canada, en 2010 en Grande-Bretagne et en 2014 en France, avec un début de commercialisation en 2015. Il est prescrit pour le traitement des douleurs neuropathiques résistantes chez les personnes atteintes de sclérose en plaques. Il se présente sous la forme d'un spray oral, une alternative à la consommation de cannabis *via* des cigarettes qui à long terme peut provoquer des cancers des poumons.³⁵ D'autres cannabinoïdes sont utilisés dans des médicaments aux Etats-Unis et au Canada, tels que le dronabinol (Δ^9 -THC synthétique, Marinol[®]) et le nabilone (Césamet[®]), contre les nausées et vomissements causés par la chimiothérapie chez les patients souffrant d'un cancer ou contre la perte d'appétit chez les malades atteints du SIDA (figure 8).

³² Lambert, D.M. Les vertus thérapeutiques du cannabis à travers les millénaires. *Journal de Pharmacie de Belgique*. **2002**, 57, 21 – 29.

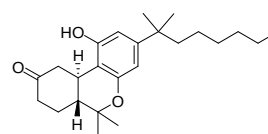
³³ Elsohly, M.A.; Slade, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. **2005**, 78, 539 - 548.

³⁴ Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1647 - 1657.

³⁵ Underner, M.; Urban, T.; Perriot, J.; de Chazeron I.; Meurice, J.C. Cannabis smoking and lung cancer. *Rev. Mal. Respir.* **2014**, 31, 488 - 498.



Cannabidiol



Nabilone

Figure 8. Structures chimiques du cannabidiol et du nabilone

En 1988, un récepteur membranaire auquel se lie le Δ^9 -THC a été mis en évidence au niveau du cerveau du rat.³⁶ Ce récepteur, appelé récepteur aux cannabinoïdes CB₁, a été cloné en 1990 par Matsuda *et al.*³⁷ D'autres études ont permis de rapidement mettre en évidence un deuxième récepteur membranaire aux cannabinoïdes, le récepteur CB₂ cloné en 1993.³⁸ En plus des cannabinoïdes exogènes tels que le Δ^9 -THC, ces récepteurs CB₁ et CB₂ possèdent des ligands endogènes, appelés endocannabinoïdes. C'est l'ensemble de ces récepteurs, de leurs ligands associés ainsi que des enzymes de biotransformation qui forme le système endocannabinoïde.

1. Les récepteurs aux cannabinoïdes

Deux récepteurs aux cannabinoïdes (CB₁ et CB₂) ont été identifiés et clonés, à ce jour, dans les tissus de mammifères. Cependant, il a récemment été montré que certains ligands endogènes des récepteurs aux cannabinoïdes se lient à des récepteurs orphelins appelés GPR55^{39,40} et GPR119⁴¹ qui ne présentent que peu d'homologie avec les récepteurs CB₁ et CB₂.

³⁶ Devane, W.A.; Dysarz, F.A. 3rd.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605 - 613.

³⁷ Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. **1990**, *346*, 561 - 564.

³⁸ Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. **1993**, *365*, 61 - 65.

³⁹ Pertwee, R.G. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 984 - 986.

⁴⁰ Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1092 - 1101.

⁴¹ Hansen, K.B.; Rosenkilde, M.M.; Knop, F.K.; Wellner, N.; Diep, T.A.; Rehfeld, J.F.; Andersen, U.B.; Holst, J.J.; Hansen, H.S. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1409 - 1417.

a. Le récepteur CB₁

i. Structure

Le récepteur CB₁ fait partie de la très grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à sept hélices transmembranaires. Il est encodé par le gène *CNR1* et se compose de 472 acides aminés (473 chez le rat, figure 9).⁴² La séquence du récepteur CB₁ est assez bien conservée entre les espèces. Par exemple, le récepteur CB₁ humain présente 97% d'homologie avec le récepteur de souris (100% lorsque l'on compare les régions transmembranaires).

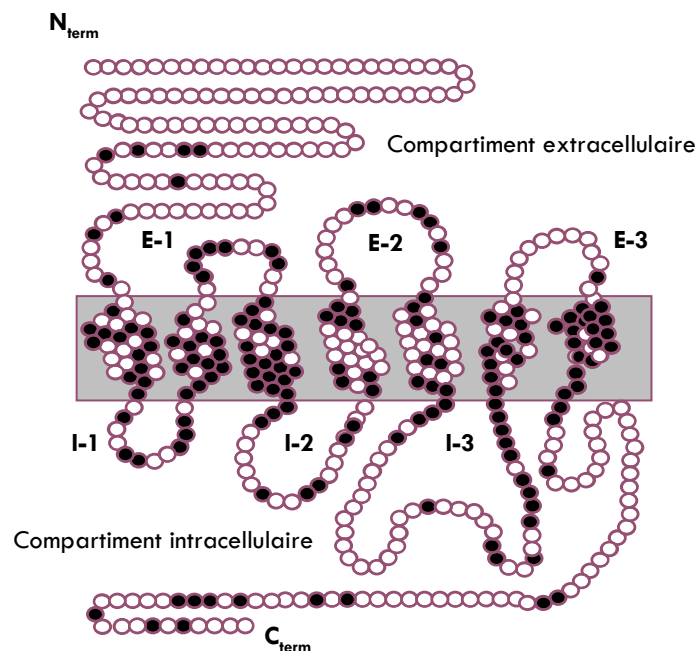


Figure 9. Structure 2D du récepteur CB₁

Actuellement, seule la structure bidimensionnelle du récepteur CB₁ a été déterminée. La structure tridimensionnelle de ce récepteur n'a pas encore été clairement élucidée. En effet, le récepteur humain CB₁ n'ayant pu être cristallisé, les modèles de ce récepteur disponibles sont des modèles moléculaires basés sur des comparaisons avec la structure de la

⁴² Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A.; Felder, C.C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B.R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161 - 202.

rhodopsine bovine.^{43,44} Récemment, des détails conformationnels, portant sur des fractions du récepteur CB₁, ont été obtenus expérimentalement.^{45,46,47}

ii. Distribution

Le récepteur CB₁ est principalement exprimé au niveau du système nerveux central où il est l'un des récepteurs les plus abondants.^{48,49} Il se retrouve notamment dans l'hippocampe, le cervelet et le striatum.⁵⁰ Cette localisation centrale du récepteur CB₁ est remarquablement corrélée avec les effets comportementaux des cannabinoïdes sur la mémoire, la cognition et les fonctions motrices. Le récepteur CB₁ a également été mis en évidence dans les tissus périphériques, notamment au niveau de l'appareil génito-urinaire (reins, placenta, prostate, testicules, utérus), du tractus gastro-intestinal (iléon, foie, pancréas, estomac), du tissu adipeux et dans les muscles squelettiques.^{51,52,53} Enfin, ce récepteur est aussi présent à de très faibles concentrations dans le système immunitaire.⁵⁴ On remarque également une quasi-absence de ce récepteur au niveau des centres de contrôle cardiovasculaire et respiratoire, ce qui explique l'absence de toxicité aigüe du cannabis envers les fonctions vitales.

⁴³ Salo, O.M.; Lahtela-Kakkonen, M.; Gynther, J.; Järvinen, T.; Poso, A. Development of a 3D model for the human cannabinoid CB₁ receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3048 - 3057.

⁴⁴ Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **2000**, *289*, 739 - 745.

⁴⁵ Choi, G.; Guo, J.; Makriyannis, A. The conformation of the cytoplasmic helix 8 of the CB₁ cannabinoid receptor using NMR and circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1668*, 1 - 9.

⁴⁶ Tiburu, E.K.; Bowman, A.L.; Struppe, J.O.; Janero, D.R.; Avraham, H.K.; Makriyannis, A. Solid-state NMR and molecular dynamics characterization of cannabinoid receptor-1 (CB₁) helix 7 conformational plasticity in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1788*, 1159 - 1167.

⁴⁷ Xie, X.Q.; Chen, J.Z. NMR structural comparison of the cytoplasmic juxtamembrane domains of G-protein-coupled CB₁ and CB₂ receptors in membrane mimetic dodecylphosphocholine micelles. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3605 - 3612.

⁴⁸ Breivogel, C.S.; Childers, S.R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptor. *Neurobiol. Dis.*, **1998**, *5*, 417 - 431.

⁴⁹ Zimmer, A.; Zimmer, A.M.; Hohmann, A.G.; Herkenham, M.; Bonner, T.I. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, *96*, 5780 - 5785.

⁵⁰ Galiègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 54 - 61.

⁵¹ Wagner, J.A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilatation mediated by CB₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *423*, 203 - 210.

⁵² Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 129 - 180.

⁵³ Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 771 - 784.

⁵⁴ Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 389 - 462.

iii. Les agonistes du récepteur CB₁

Actuellement, la recherche sur la conception d'agonistes du récepteur CB₁ reste très limitée. En effet, le Δ^9 -THC, ainsi que d'autres agonistes du récepteur CB₁ passant la barrière hémato-encéphalique (BHE), possèdent des effets centraux : psychotropes, sédatifs et cataleptiques. Ces effets réduisent grandement l'intérêt de ces composés pour une commercialisation en tant qu'outils pharmaceutiques.

Parmi les agonistes de synthèse du récepteur CB₁, nous retrouvons des analogues du Δ^9 -THC (figure 10), comme l'AM-411,⁵⁵ l'AM-4030⁵⁶ et l'HU-210.⁵⁷ Ensuite, des analogues de l'anandamide (AEA), ligand endogène du récepteur, ont été synthétisés. L'un de ces analogues de l'AEA, le plus rapporté, est l'arachidonylcyclopropylamide (ACPA).⁵⁸

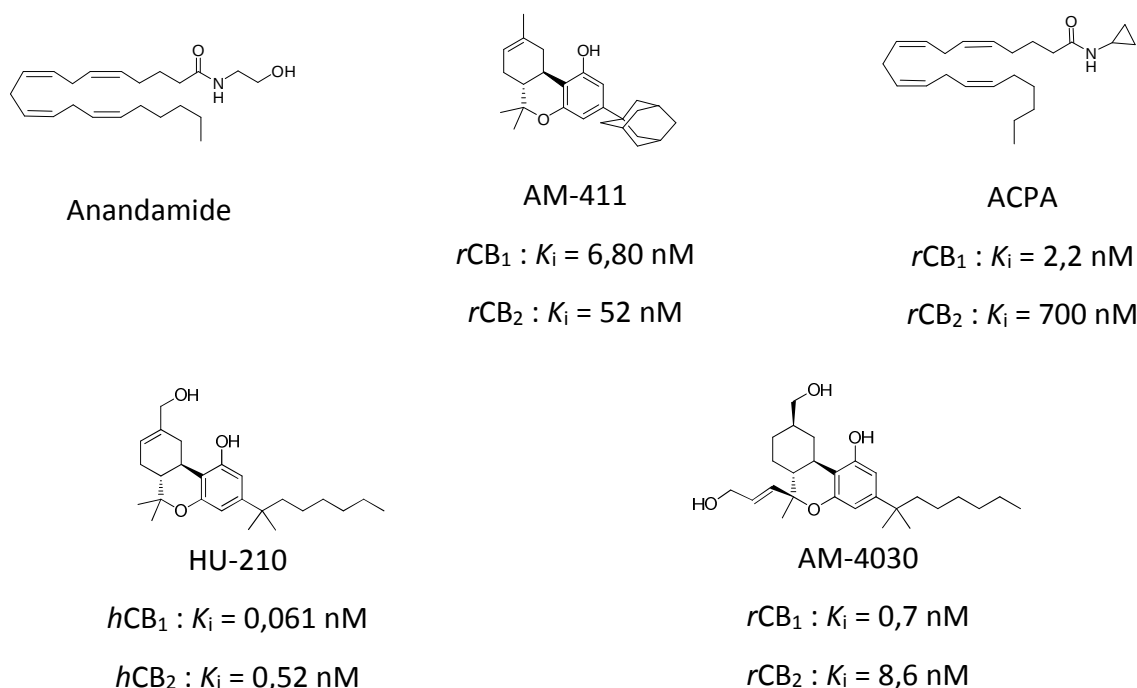


Figure 10. Structures chimiques de l'anandamide, de l'AM-411, de l'ACPA, du HU-210 et de l'AM-4030

⁵⁵ Lu, D.; Meng, Z.; Thakur, G.A.; Fan, P.; Steed, J.; Tartal, C.L.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H.; Deschamps, J.R.; Parrish, D.A.; George, C.; Järbe, T. U.; Lamb, R.J.; Makriyannis, A. Adamantyl cannabinoids: a novel class of cannabinergic ligands. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4576 - 4585.

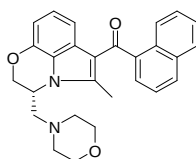
⁵⁶ Tius, M.A.; Hill, W.A.; Zou, X.L.; Busch-Petersen, J.; Kawakami, J.K.; Fernandez-Garcia, M.C.; Drake, D.J.; Abadji, V.; Makriyannis, A. Classical/non-classical cannabinoid hybrids; stereochemical requirements for the southern hydroxyalkyl chain. *Life Sciences*. **1995**, *56*, 2007 - 2012.

⁵⁷ Mechoulam, R.; Feigenbaum, J.J.; Lander, N.; Segal, M.; Järbe, T.U.; Hiltunen, A.J.; Consroe, P. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*. **1988**, *44*, 762 - 764.

⁵⁸ Hillard, C.J.; Manna, S.; Greenberg, M.J.; DiCamelli, R.; Ross, R.A.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.; Pertwee, R.G.; Campbell, W.B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1427 - 1433.

On peut remarquer que plusieurs de ces agonistes ne possèdent pas de sélectivité pour le récepteur CB₁ et possèdent donc également une activité sur le récepteur CB₂. L'ACPA, quant à lui, a une sélectivité marquée pour le récepteur CB₁ par rapport au récepteur CB₂.

Actuellement, l'agoniste synthétique du récepteur CB₁ le plus utilisé pour la recherche est le WIN-55,212-2 (figure 11). Il est notamment utilisé en tant qu'agoniste de référence et outil pharmacologique.



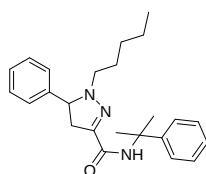
WIN-55,212-2

$rCB_1 : K_i = 3,3 \text{ nM}$

$rCB_2 : K_i = 62,3 \text{ nM}$

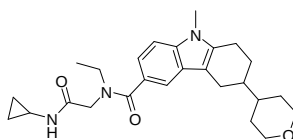
Figure 11. Structure chimique du WIN-55,212-2

Récemment, plusieurs brevets ont été déposés par des firmes pharmaceutiques comme Solvay Pharmaceuticals (composé I),⁵⁹ Astra-Zeneca (composé II)⁶⁰ ou Pfizer (Composé III, figure 12).⁶¹ Les applications majeures de ces brevets sont la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, différents types de douleurs (chronique, neuropathique,...) et l'ischémie cérébrale.



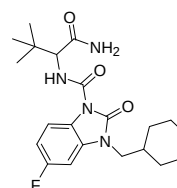
Composé I

$hCB_1 : K_i = 8,2 \text{ nM}$



Composé II

$hCB_1 : K_i = 4,2 \text{ nM}$



Composé III

$hCB_1 : K_i = 0,28 \text{ nM}$

Figure 12. Structures chimiques des composés I, II et III

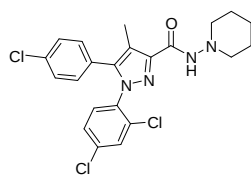
⁵⁹ Lange, J.H.M.; Zilaout, H.; Van Vliet, B.J. Preparation of 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as cannabinoid CB₁ receptor agonists. **2009**, WO2009037244.

⁶⁰ Beha, S.; Brown, W.; Johnstone, S.; Liu, Z.; Page, D.; Tomaszewski, M.; Wei, Z.Y.; Yue, S.Y. Preparation of substituted tetrahydrocarbazole for use as analgesics. **2009**, WO2009024819.

⁶¹ Ando, K.; Buchler, I.P.; Hedge, S.G.; Kawai, M.; Masuda, T.; Omura, H. Benzimidazolone derivatives and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of CB₁ and CB₂ receptor mediated diseases. **2008**, WO2008032164.

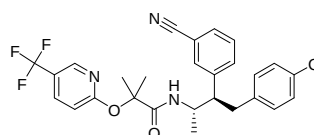
iv. Les agonistes inverses et antagonistes du récepteur CB₁

Plusieurs composés agonistes inverses des récepteurs CB₁ ont été étudiés en phase clinique, voire commercialisés en tant que médicaments anorexigènes, tels que le rimonabant (SR141716A, Sanofi, retiré du marché en 2008)⁶² ou le taranabant (MK-0364, Merck & Co, arrêté en phase III, figure 13).^{63,64} Malheureusement, le caractère néfaste des effets secondaires (vertiges, nausées et dépressions sévères) liés à ces molécules limite grandement leur utilisation.



Rimobant

rCB₁ : K_i = 1,98 nM



Taranabant

hCB₁ : K_i = 0,74 nM

Figure 13. Structures chimiques de deux agonistes inverses du récepteur CB₁ : le rimonabant et le taranabant

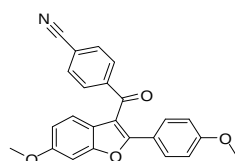
Les composés antagonistes des récepteurs CB₁ possèdent les mêmes capacités anorexigènes que les agonistes inverses. Un de ces composés le plus courant est le LY-320,135 (antagoniste sélectif du récepteur CB₁, figure 14).⁶⁵

⁶² Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240 - 244.

⁶³ Kipnes, M.S.; Hollander, P.; Fujioka, K.; Gantz, I.; Seck, T.; Erundu, N.; Shentu, Y.; Lu, K.; Suryawanshi, S.; Chou, M.; Johnson-Levonas, A.O.; Heymsfield, S.B.; Shapiro, D.; Kaufman, K.D.; Amatruda, J.M. A one-year study to assess the safety and efficacy of the CB1R inverse agonist taranabant in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2010**, *12*, 517 - 531.

⁶⁴ Kopka, I.E.; Lin, L.S.; Jewell, J.P.; Lanza, T.J.; Fong, T.M.; Shen, C.P.; Lao, Z.J.; Ha, S.; Castonguay, L.G.; Van der Ploeg, L.; Goulet, M.T.; Hagmann, W.K. Synthesis and cannabinoid-1 receptor binding affinity of conformationally constrained analogs of taranabant. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4757 - 4761.

⁶⁵ Felder, C.C.; Joyce, K.E.; Briley, E.M.; Glass, M.; Mackie, K.P.; Fahey, K.J.; Cullinan, G.J.; Hunden, D.C.; Johnson, D.W.; Chaney, M.O.; Koppel, G.A.; Brownstein, M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 291 - 297.



LY-320,135

$rCB_1 : K_i = 141 \text{ nM}$

$rCB_2 : K_i > 10000 \text{ nM}$

Figure 14. Structure chimique du LY-320,135, antagoniste du récepteur CB_1

b. Le récepteur CB_2

i. Structure

Les recherches sur le récepteur CB_1 ainsi que sur ses ligands ont menés à la découverte d'un deuxième récepteur aux cannabinoïdes, appelé récepteur CB_2 . Ce récepteur a été isolé en 1993 à partir de cellules leucémiques humaines HL-60.³⁸ Comme le récepteur CB_1 , le récepteur CB_2 appartient à la famille des RCPG à sept domaines transmembranaires. Il est constitué de 360 acides aminés chez l'Homme (figure 15) et est encodé par le gène *CNR2*.⁶⁶ Les récepteurs CB_1 et CB_2 présentent 44% d'homologie au niveau de la séquence totale d'acides aminés. Ce pourcentage passe à 68% lorsque l'on compare les régions transmembranaires.⁴² Contrairement au récepteur CB_1 , le récepteur CB_2 est moins conservé d'une espèce à une autre. Chez la souris, le récepteur CB_2 est constitué de 347 acides aminés et présente 82% d'homologie avec le récepteur humain.

Comme pour le récepteur CB_1 , la représentation tridimensionnelle du récepteur CB_2 humain n'a pas été déterminée et est principalement basée sur des comparaisons avec la structure de la rhodopsine bovine. Un modèle théorique du récepteur humain CB_2 basé sur les coordonnées du récepteur β_2 adrénergique a également été décrit.⁶⁷ De plus, comme pour

⁶⁶ Howlett, A.C. In: Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology; Pertwee, Ed., Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, **2005**, 168, pp. 53 - 79.

⁶⁷ Cichero, E.; Ligresti, A.; Allarà, M.; di Marzo, V.; Lazzati, Z.; D'Ursi, P.; Marabotti, A.; Milanese, L.; Spallarossa, A.; Ranise, A.; Fossa, P. Homology modeling in tandem with 3D-QSAR analyses: A computational approach to depict the agonist binding site of the human CB_2 receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4489 - 4505.

le récepteur CB₁, certains fragments de la structure du récepteur CB₂ ont été déterminés expérimentalement.^{68,69,70,71}

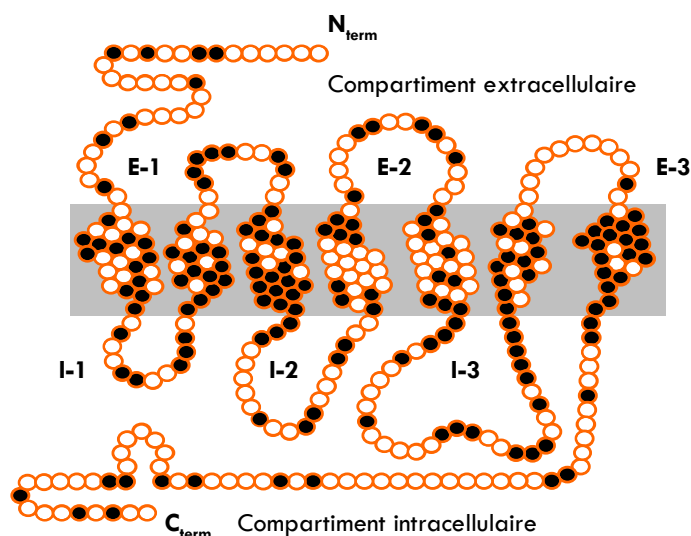


Figure 15. Structure 2D du récepteur CB₂

Des études de docking comparant les récepteurs aux cannabinoïdes à d'autres RCPG ont montré que les récepteurs CB₁ et CB₂ présentaient des différences vis-à-vis des autres RCPG au niveau de l'hélice 5 (absence d'une proline conservée par la totalité des RCPG, présence de ponts disulfures).⁷² Ces mêmes études ont également montré que le récepteur CB₂ différait de son homologue CB₁ par une partie N-terminale plus courte, sa deuxième boucle extracellulaire et sa partie C-terminale.

Ces études ont aussi permis de déterminer les sites importants pour les interactions ligand-récepteur du récepteur CB₂. Ainsi, les résidus Ser112^{3,31} et Phe197^{5,46} du récepteur CB₂ seraient à l'origine de cette interaction, qui ne serait pas retrouvée pour le récepteur CB₁.⁷³

⁶⁸ Zhao, J.; Zheng, H.; Xie, X.Q. NMR characterization of recombinant transmembrane protein CB2 fragment CB2(180-233). *Protein Pept. Lett.* **2006**, *13*, 335 – 342.

⁶⁹ Zhang, Y.; Xie, X.Q. Biosynthesis, purification, and characterization of a cannabinoid receptor 2 fragment (CB2(271-326)). *Protein Expr. Purif.* **2008**, *59*, 249 - 257.

⁷⁰ Choi, G.; Landin, J.; Xie, X.Q. The cytoplasmic helix of cannabinoid receptor CB2, a conformational study by circular dichroism and (1)H NMR spectroscopy in aqueous and membrane-like environments. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 169 - 177.

⁷¹ Zheng, H.; Zhao, J.; Sheng, W.; Xie, X.Q. A transmembrane helix-bundle from G-protein coupled receptor CB2: biosynthesis, purification, and NMR characterization. *Biopolymers.* **2006**, *83*, 46 - 61.

⁷² Montero, C.; Campillo, N.E.; Goya, P.; Paez, J.A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 75 - 83.

⁷³ Tuccinardi, T.; Ferrarini, P.L.; Manera, C.; Ortore, G.; Saccomanni, G.; Martinelli, A. Cannabinoid CB2/CB1 selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 984 - 994.

Les groupes lipophiles des ligands interagissent avec le résidu Phe197^{5,46}, tandis que l'acide aminé Ser112^{3,31} permet la formation d'une liaison hydrogène avec ses ligands (figure 16).

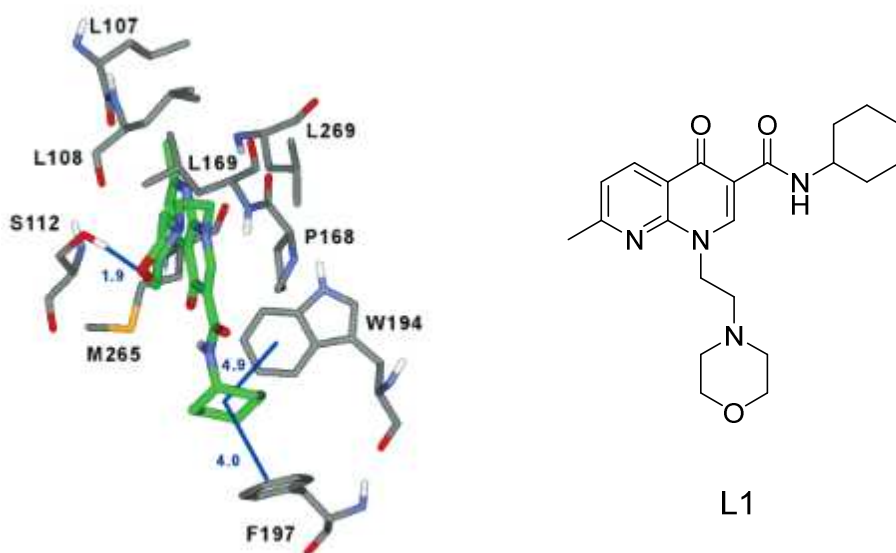


Figure 16. Docking du ligand L1 de le site de fixation du récepteur CB₂ (en bleu, les distances interatomiques en Angstrom)

Des études plus récentes ont montré l'implication d'autres résidus, tels que la Phe183, au niveau de la boucle extracellulaire 2, et la Phe281^{7,35}, dans l'interaction des composés SR144528 et CP55940 (respectivement agoniste inverse et agoniste du récepteur CB₂) avec le récepteur CB₂.⁷⁴ Ces interactions induisent des conformations structurales du récepteur CB₂ différentes, L'importance de ces résidus a aussi été démontrée par introduction de mutation. Par exemple, la mutation F281K, correspondant au remplacement de la Phe281^{7,35} par une lysine, entraîne une perte de l'interaction entre le récepteur et son ligand (figure 17).

⁷⁴ Feng, Z.; Alqarni, M.H.; Yang, P.; Tong, Q.; Chowdhury, A.; Wang, L.; and Xie, X. Modeling, Molecular Dynamics Simulation, and Mutation Validation for Structure of Cannabinoid Receptor 2 Based on Known Crystal Structures of GPCRs. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 2483–2499.

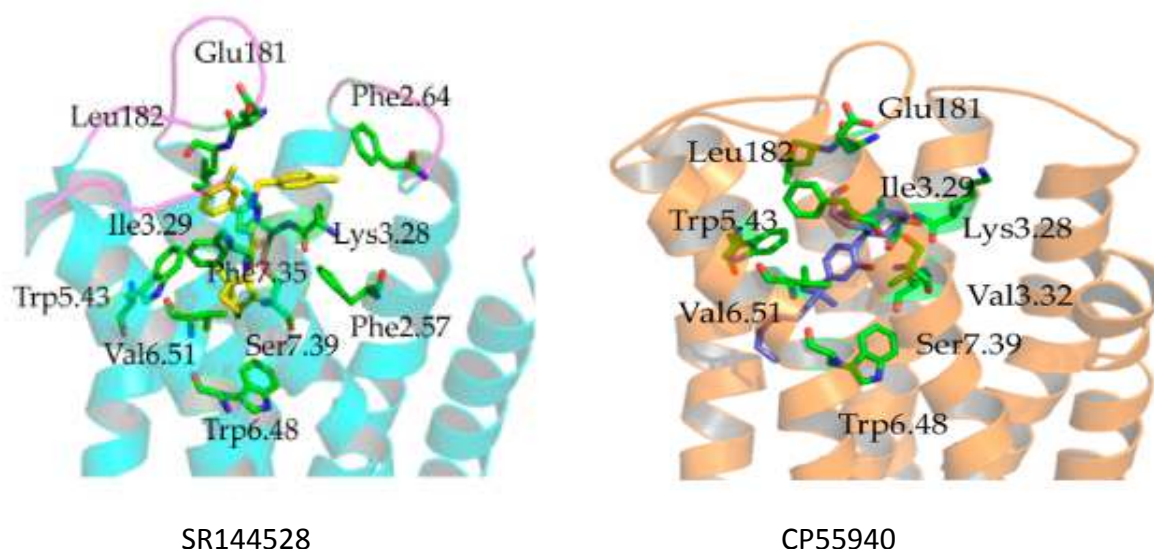


Figure 17. Modes de fixations du SR144528 et du CP55940 avec le récepteur CB₂.

ii. Distribution

Contrairement aux récepteurs CB₁, les récepteurs CB₂ se situent principalement dans les cellules du système immunitaire, telles les leucocytes, les lymphocytes B et T ou encore les macrophages, où leur concentration est nettement supérieure à celle de leurs homologues,⁷⁵ mais ils sont faiblement exprimés dans les cellules immunitaires non-activées. Cette localisation suggère leur implication dans les effets immunomodulateurs induits par les cannabinoïdes, comme la migration des cellules immunitaires et la modulation de la libération de cytokines.

Des études récentes ont aussi mis en évidence la présence du récepteur CB₂ dans des cellules neuronales en culture ainsi qu'au sein du système nerveux central (SNC) humain, de rongeurs et de singes dans des conditions normales (microglies, astrocytes et vaisseaux sanguins).^{76,77,78} De plus, au début de l'inflammation, le récepteur CB₂ est surexprimé dans le

⁷⁵ Klein, T.W.; Newton, C.A.; Friedman, H. Cannabinoids and the immune system. *Pain Res. Manag.* **2001**, *6*, 95 - 101.

⁷⁶ Ashton, J.C.; Friberg, D.; Darlington, C.L.; Smith, P.F. Expression of the cannabinoid CB₂ receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* **2006**, *396*, 113 - 116.

⁷⁷ Van Sickle, M.D.; Duncan, M.; Kingsley, P.J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J.S.; Marnett, L.J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q.J.; Patel, K.D.; Sharkey, K.A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science*. **2005**, *310*, 329 - 332.

⁷⁸ Gong, J.P.; Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Liu, Q.R.; Tagliaferro, P.A.; Brusco, A.; Uhl, G.R. Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **2006**, *1071*, 10 - 23.

SNC et les tissus périphériques.⁷⁹ Par ailleurs, le gène *CNR2* a aussi été retrouvé dans des tissus tels que la rate, les amygdales, la prostate et le thymus.^{80,81}

iii. Les agonistes du récepteur CB₂

De nombreuses recherches ont été effectuées sur les ligands sélectifs du récepteur CB₂, du fait du large spectre thérapeutique de ce type de ligands (sclérose en plaques, douleurs, inflammation, ...). De nombreuses structures différentes ont été développées, rendant la comparaison entre les séries chimiques et la proposition d'un pharmacophore général difficile. Seules les principales familles de composés agonistes sélectifs CB₂ naturels ou développés par les différents laboratoires pharmaceutiques seront évoquées.

A. Les phytocannabinoïdes

Les phytocannabinoïdes désignent les cannabinoïdes dérivés des composés naturels, principalement issus du cannabis. Ces composés peuvent être séparés en deux familles : les cannabinoïdes « classiques » et les cannabinoïdes « non classiques ».

Les composés dits « classiques » possèdent le même groupement tricyclique que le Δ⁹-THC. Des modifications structurales, notamment au niveau de l'hydroxyle phénolique, ont abouti à des optimisations du composé initial. Ainsi, le composé O-1057 est une prodrogué soluble dans l'eau qui, après clivage du groupement protecteur morpholinobutanoyl, présente un groupement hydroxyle. Ce composé s'est révélé avoir une action positive dans un modèle de douleur murin par administration intraveineuse.⁸² La suppression de ce groupement hydroxyle a permis d'augmenter la sélectivité du composé, et a donc abouti à la découverte d'un des agonistes sélectifs les plus utilisés, le JWH-133 (figure 18).⁸³

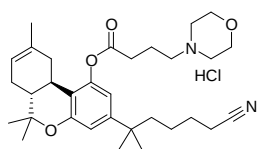
⁷⁹ Guindon, J.; Hohmann, A.G. Cannabinoid CB₂ receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 319 - 334.

⁸⁰ Berdyshev, E.V. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids.* **2000**, *108*, 169 - 190.

⁸¹ Sarfaraz, S.; Afaq, F.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1635 - 1641.

⁸² Pertwee, R.G.; Gibson, M.; Stevenson, L.A.; Ross, R.A.; Banner, K.; Saha, B.; Razdan, R.K.; and Martin, B.R. O-1057, a potent water-soluble cannabinoid receptor agonist with antinociceptive properties. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 1577 - 1584.

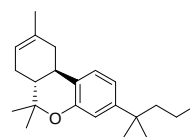
⁸³ Huffman, J.W.; Liddle, J.; Yu, S.; Aung, M.M.; Abood, M.E.; Wiley, J.L.; Martin, B.R. 3-(1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-Δ⁸-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB₂ receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2905-2914.



O-1057

hCB_2 : K_i = 11,0 nM

hCB_1 : K_i = 4,0 nM



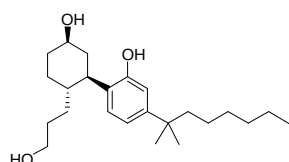
JWH-133

hCB_2 : K_i = 3,4 nM

rCB_1 : K_i = 677 nM

Figure 18. Structures chimiques de l'O-1057 et du JWH-133

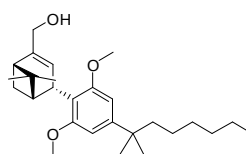
Les composés « non classiques » sont des composés tricycliques analogues au Δ^9 -THC dont le cycle pyranyle a été modifié ou des composés bicycliques ayant perdu la rigidité du Δ^9 -THC. Les relations structure-activité (RSA) de ces composés restent similaires à celles des cannabinoïdes classiques. Dans cette famille, on peut trouver, entre autres, le composé CP-55,940. Le $[^3H]$ CP-55,940 est utilisé en tant que radioligand de référence du récepteur CB_2 pour la découverte et la caractérisation des ligands de type cannabinoïde.^{84,36} Comme pour les cannabinoïdes classiques, une modification du groupement phénolique augmente la sélectivité pour le récepteur CB_2 . C'est le cas pour le composé HU-308 (figure 19) qui possède une activité anti-inflammatoire et analgésique sur un modèle d'inflammation induit par la formaline chez la souris.⁸⁵



CP-55,940

hCB_2 : K_i = 0,69 nM

hCB_1 : K_i = 0,58 nM



HU-308

hCB_2 : K_i = 22,7 nM

rCB_1 : K_i > 10 000 nM

Figure 19. Structures chimiques du CP-55,940 et du HU-308

⁸⁴ Showalter, V.M.; Compton, D.R.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB_2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, 278, 989 – 999.

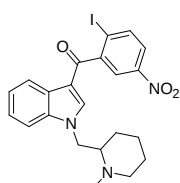
⁸⁵ Hanus, L.; Breuer, A.; Tchilibon, S.; Shiloah, S.; Goldenberg, D.; Horowitz, M.; Pertwee, R.G.; Ross, R.A.; Mechoulam, R.; Fride, E. HU-308: a specific agonist for CB_2 , a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 14228 – 14233.

B. Les cannabinoïdes synthétiques

Les cannabinoïdes synthétiques peuvent être regroupés en plusieurs familles que nous classerons ici en fonction de leur hétérocycle central.

B1. Les indoles

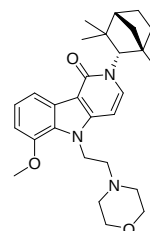
Les indoles constituent la première famille de composés synthétiques découverte au début des années 1990. Ces composés sont constitués d'un noyau indole substitué par un groupement lipophile en position C3 et par une chaîne aminoalkyle en position N1. Le composé le plus connu de cette famille est le WIN-55,212-2, décrit précédemment (paragraphe II.1.a.iii. figure 11). Son dérivé tritié, le $[^3\text{H}]$ WIN-55,212-2, est aussi largement utilisé en la recherche en tant que ligand de référence.⁸⁶ Un deuxième composé de cette famille est l'AM-1241 qui, sous forme de sel, présente une bonne solubilité dans l'eau. Ce composé possède une activité analgésique dans des modèles d'inflammation et de douleur neuropathique. L'énantiomère (*S*) est plus actif que l'énantiomère (*R*) ou que le mélange racémique.^{87,88} D'autres composés de cette famille ont montré des effets anti-inflammatoires chez le rat (composé IV, figure 20).⁸⁹



AM-1241

$h\text{CB}_2$: $K_i = 7,1 \text{ nM}$

$h\text{CB}_1$: $K_i = 580 \text{ nM}$



composé IV

$h\text{CB}_2$: $K_i = 1,0 \text{ nM}$

$h\text{CB}_1$: $K_i = 16 \text{ nM}$

Figure 20. Structures chimiques de l'AM-1241 et du composé IV

⁸⁶ Compton, D.R.; Gold, L.H.; Ward, S.J.; Balster, R.L.; Martin, B.R. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 263, 1118 – 1126.

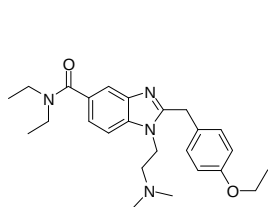
⁸⁷ Ibrahim, M.M.; Deng, H.; Zvonok, A.; Cockayne, D.A.; Kwan, J.; Mata, H.P.; Vanderah, T.W.; Lai, J.; Porreca, F.; Makriyannis, A.; Malan, T.P. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 10, 10529 – 10533.

⁸⁸ Bingham, B.; Jones, P.G.; Uveges, A.J.; Kotnis, S.; Lu, P.; Smith, V.A.; Sun, S.-C.; Resnick, L.; Chlenov, M.; He, Y.; Strassle, B.W.; Cummons, T.A.; Piesla, M.J.; Harrison, J.E.; Whiteside, G.T. Species-specific in vitro pharmacological effects of the cannabinoid receptor 2 (CB2) selective ligand AM1241 and its resolved enantiomers. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 151, 1061 – 1070.

⁸⁹ Wroblewski, S.T.; Chen, P.; Hynes, J., Jr.; Lin, S.; Norris, D.J.; Pandit, C.R.; Spergel, S.; Wu, H.; Tokarski, J.S.; Chen, X.; Gillooly, K.M.; Kiener, P.A.; McIntyre, K.W.; Patil-Koota, V.; Shuster, D.J.; Turk, L.A.; Yang, G.; Leftheris, K. Rational design and synthesis of an orally active indolopyridone as a novel conformationally constrained cannabinoid ligand possessing antiinflammatory properties. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2110 – 2116.

B2. Les benzimidazoles

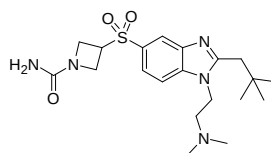
AstraZeneca est à l'origine de plusieurs composés benzimidazoles développés pour le traitement de la douleur. Le premier composé de cette série est le composé **V**.⁹⁰ RaQualia Pharma's s'est aussi intéressé au développement de cette famille. Le composé **VI**, se distingue par l'introduction d'un groupement sulfone.⁹¹ RaQualia Pharma's développe actuellement le composé RQ-00202730 (structure non dévoilée), agoniste sélectif CB₂, dans le traitement des MICI.⁹² Enfin, Pfizer a apporté sa contribution, avec le composé PF-03550096 (figure 21). Ce composé possède une stabilité métabolique intéressante ainsi qu'une très bonne biodisponibilité par voie orale chez le rat.⁹³ De plus, il supprime l'hypersensibilité viscérale dans un modèle de douleur colique induite au TNBS chez le rat.



composé **V**

hCB_2 : K_i = 38 nM

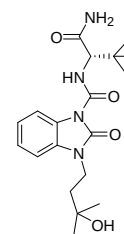
hCB_1 : K_i = 4600 nM



composé **VI**

hCB_2 : CE_{50} = 30 nM

hCB_1 : CE_{50} = 25000 nM



PF-03550096

hCB_2 : K_i = 8,0 nM

hCB_1 : K_i = 1460 nM

Figure 21. Structures chimiques du composé **V**, du composé **VI** et du PF-03550096

B3. Les imidazopyridines

Merck a décrit, dans un brevet, des agonistes du récepteur CB₂ dérivés des imidazopyridines, actifs sur des modèles murins de douleurs inflammatoires induites par l'adjuvant de Freund (mélange lipidique). Le composé **VII** (figure 22), possède le meilleur rapport entre efficacité et sélectivité.⁹⁴

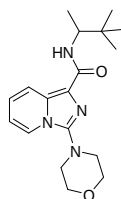
⁹⁰ Pagé, D.; Balaux, E.; Boisvert, L.; Liu, Z.; Milburn, C.; Tremblay, M.; Wei, Z.; Woo, S.; Luo, X.; Cheng, Y.-X.; Yang, H.; Srivastava, S.; Zhou, F.; Brown, W.; Tomaszewski, M.; Walpole, C.; Hodzic, L.; St-Onge, S.; Godbout, C.; Salois, D.; Payza, K. Novel benzimidazole derivatives as selective CB₂ agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3695 – 3700.

⁹¹ Ando, K.; Iwata, Y. N-Substituted Saturated Heterocyclic Sulfone Compounds with CB₂ Receptor Agonistic Activity. WO 2010084767, 2010.

⁹² <http://www.raqualia.com>.

⁹³ Omura, H.; Kawai, M.; Shima, A.; Iwata, Y.; Ito, F.; Masuda, T.; Ohta, A.; Makita, N.; Omoto, K.; Sugimoto, H.; Kikuchi, A.; Iwata, H.; Ando, K. The SAR studies of novel CB₂ selective agonists, benzimidazolone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3310 – 3314.

⁹⁴ Bilodeau, M.T.; Burgey, C.S.; Deng, Z.J.; Hartnett, J.C.; Kett, N.R.; Melamed, J.; Munson, P.M.; Nanda, K.K.; Thomson, W.; Trotter, B.W.; Wu, Z. Imidazopyridine Analogs as CB₂ Receptor Modulators, Useful in the Treatment of Pain, Respiratory and Non- Respiratory Diseases. WO 2008085302, 2008.



Composé **VII**

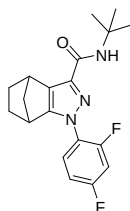
hCB_2 : $CE_{50} = 5,4$ nM

hCB_1 : $CE_{50} = 17000$ nM

Figure 22. Structure chimique du composé **VII**

B4. Les pyrazoles bicycliques

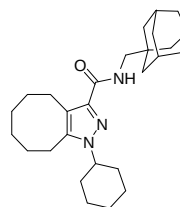
La principale différence entre les composés de cette famille repose sur la nature du cycle adjacent au cycle pyrazole. Glenmark Pharmaceuticals a, par exemple, développé des composés pontés, comme le composé **VIII**, actif sur des modèles de douleurs neuropathiques.⁹⁵ Le composé **IX** (figure 23), comportant un cyclooctane, a démontré une importante inhibition de la colite induite à l'huile de moutarde ou au DSS chez la souris par administration orale.⁹⁶



Composé **VIII**

hCB_2 : $CE_{50} = 0,61$ nM

hCB_1 : $CE_{50} = 854$ nM



Composé **IX**

hCB_2 : $CE_{50} = 6,6$ nM

hCB_1 : $CE_{50} = 71\%$ à 1000 nM

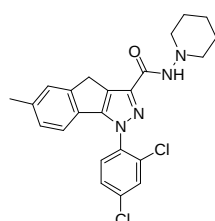
Figure 23. Structures chimiques du composé **VIII** et du composé **IX**

⁹⁵ Muthuppalanippan, M.; Balasubramanian, G.; Gullapalli, S.; Joshi, N.K.; Narayanan, S. Novel Cannabinoid Receptor Ligands, Pharmaceutical Compositions Containing Them, and Process for Their Preparation. WO 2006129178, 2006.

⁹⁶ Liotta, F. Hexahydro-cyclooctyl Pyrazole Cannabinoid Modulators. WO 2007044215, 2007.

B5. Les composés tricycliques

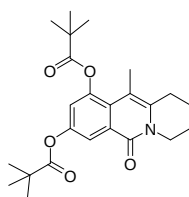
Cette série est née suite à des modifications effectuées sur le SR141716A (le rimonabant). La rigidification de ce composé a pour conséquence une perte importante d'affinité pour le récepteur CB₁ et un gain d'affinité pour le récepteur CB₂. Un des premiers composés à avoir été synthétisé est le composé **X**, qui présente une très bonne sélectivité et qui diminue l'allodynie tactile et l'hyperalgésie thermique sur des modèles de souris.^{97,98} Schering-Plough a développé d'autres composés tricycliques dont le Sch35966 qui s'est révélé être un très bon agoniste du récepteur CB₂ avec une affinité de 6,8 nM chez l'Homme ainsi qu'une très bonne sélectivité.⁹⁹ Plus récemment, des composés basés sur un tricycle de type 2*H*-pyrazolo[4,3-*c*]quinolin-3(5*H*)-one ont été développés à l'ICPAL (figure 24). Le composé ALICB459 issu de cette série est un agoniste du récepteur CB₂ actif par voie orale.¹⁰⁰



composé **X**

*h*CB₂ : *K*_i = 0,037 nM

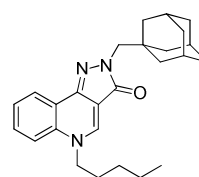
*h*CB₁ : *K*_i = 363 nM



Sch35966

*h*CB₂ : *K*_i = 6,8 nM

*h*CB₁ : *K*_i = 2630 nM



ALICB459

*h*CB₂ : *K*_i = 0,39 nM

*h*CB₁ : *K*_i > 3000 nM

Figure 24. Structures chimiques du composé **X**, du Sch35966 et de l'ALICB459

B6. Autres bicycles

Cette famille regroupe les différents bicycles comportant un ou plusieurs hétéroatomes. On y retrouve, entre autres, des dérivés de la purine. Le composé LY2828360 possède une

⁹⁷ Mussinu, J.-M.; Ruiu, S.; Mulè, A.C.; Pau, A.; Carai, M.A.M.; Loriga, G.; Murineddu, G.; Pinna, G.A. Tricyclic pyrazoles. Part 1: Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazole-based ligands for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 251 – 263.

⁹⁸ Luongo, L.; Palazzo, E.; tambaro, S.; Giordano, C.; Gatta, L.; Scafuro, M.A.; Rossi, F.; Lazzari, P.; Pani, L.; De Novellis, V.; Malcangio, M.; Maione, S. 1-(2',4'-Dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 177 – 185.

⁹⁹ Gonsiorek, W.; Lunn, C.A.; Fan, X.; Deno, G.; Kozlowski, J.; Hipkin, R.W. Sch35966 is a potent, selective agonist at the peripheral cannabinoid receptor (CB2) in rodents and primates. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1262 – 1271.

¹⁰⁰ El Bakali, J.; Muccioli, G.G.; Body-Malapel, M.; Djouina, M.; Klupsch, F.; Ghinet, A.; Barczyk, A.; Renault, N.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Lambert, D.M.; Millet, R. Conformational restriction leading to a selective CB2 cannabinoid receptor agonist orally active against colitis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 198 – 203.

affinité similaire pour les récepteurs de l'Homme et du rat (Homme $K_i = 37$ nM, rat $K_i = 40$ nM). Des études précliniques de ce composé sur des rats ont mis en évidence sa capacité à réduire la douleur dans un modèle de douleur articulaire du genou induite par du monoiodoacétate par voie orale.¹⁰¹ Certaines quinolones présentent aussi un caractère agoniste du récepteur CB₂. C'est le cas du composé **XI** (figure 25), qui possède un effet analgésique dans des modèles de douleurs inflammatoires induites par la formaline chez la souris.¹⁰²

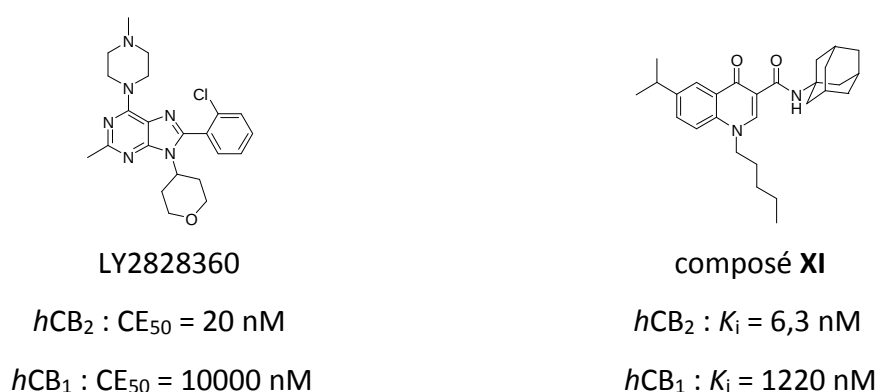


Figure 25. Structures chimiques du LY2828360 et du composé **XI**

B7. Les hétérocycles à 6 chaînons

Les composés de cette famille sont axés autour d'un cycle aromatique à 6 chaînons. GSK est à l'origine de plusieurs de ces composés. Le composé GW833972A, de type pyrimidine, est capable de réduire la douleur dentaire et peut être utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires et rhumatismales.^{103,104,105} GSK a aussi travaillé sur la synthèse de composés de type pyridine, comme le composé **XII**, possédant une très bonne sélectivité pour le

¹⁰¹ Hollinshead, S.P.; Tidwell, M.W.; Palmer, J.; Guidetti, R.; Sanderson, A.; Johnson, M.P.; Chambers, M.G.; Oskins, J.; Stratford, R.; Astles, P.C. Selective Cannabinoid Receptor Type 2 (CB₂) Agonists: Optimization of a Series of Purines Leading to the Identification of a Clinical Candidate for the Treatment of Osteoarthritic Pain. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5722 – 5733.

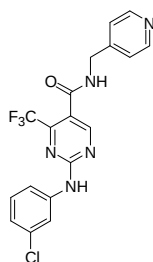
¹⁰² Pasquini, S.; Botta, L.; Semeraro, T.; Mugnaini, C.; Ligresti, A.; Palazzo, E.; Maione, S.; Di Marzo, V.; Corelli, F. Investigations on the 4-Quinolone-3-carboxylic Acid Motif. 2. Synthesis and Structure–Activity Relationship of Potent and Selective Cannabinoid-2 Receptor Agonists Endowed with Analgesic Activity in Vivo. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5075 – 5084.

¹⁰³ Eatherton, A.J.; Giblin, G.M.P.; Green, R.H.; Mitchell, W.L.; Naylor, A.; Rawlings, D.A.; Slingsby, B.P.; Whittington, A.R. Pyrimidine Derivatives and Their Use as CB₂ Modulators. WO 2004018433, **2004**.

¹⁰⁴ Worsley, M.A.; Clayton, N.M.; Goldsmith, P.; Giblin, G.; Wilson, A.; Boissonade, F.M. The Effect of CB₂ Agonist GW833972A on Trigeminal Fos Expression. Presented at the IADR Pan European Federation **2006**, Sep 13–16, 2006; No. 0454 Neuroscience Poster Session.

¹⁰⁵ Brown, A.J.; Conner, H.E.; Eatherton, A.J.; Giblin, G.M.P.; Jandu, K.S.; Knowles, R.G.; Mitchell, W.L.; Naylor, A.; O'Shaughnessy, C.T.; Rawlings, D.A.; Slingsby, B.P.; Tralau-Stewart, C.J.; Whittington, A.R.; Williamson, R.A. Combination of CB₂ Modulators and PDE4 Inhibitors for Use in Medicine. WO 2005074939, **2005**.

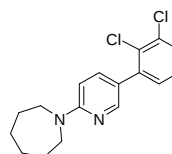
récepteur CB₂.¹⁰⁶ Merck a, quant à lui, travaillé sur des composés autour d'un groupement phényle. Le composé **XIII** possède des propriétés intéressantes contre les douleurs neuropathiques.¹⁰⁷ Plus récemment, des composés de type dihydropyridine ont été synthétisés à l'ICPAL. C'est le cas du composé ALICB573 (figure 26) qui possède un effet protecteur dans un modèle de colite induit au TNBS chez la souris.¹⁰⁸



GW833972A

hCB_2 : CE₅₀ = 50 nM

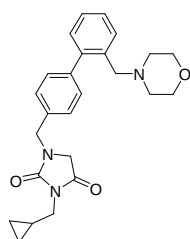
hCB_1 : CE₅₀ = 30000 nM



composé **XII**

hCB_2 : CE₅₀ = 39 nM

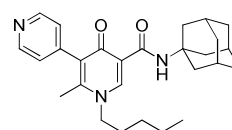
hCB_1 : CE₅₀ = 10000 nM



composé **XIII**

hCB_2 : CE₅₀ = 400 nM

hCB_1 : CE₅₀ = 1000 nM



ALICB573

hCB_2 : K_i = 36 nM

hCB_1 : K_i > 1000 nM

Figure 26. Structures chimiques du GW833972A, du composé **XII** et du composé **XIII**

¹⁰⁶ Gleave, R.J.; Beswick, P.J.; Brown, A.J.; Giblin, G.M.P.; Haslam, C.P.; Livermore, D.; Moses, A.; Nicholson, N.H.; Page, L.W.; Slingsby, B.; Swarbrick, M.E. 2-Amino-5-aryl-pyridines as selective CB₂ agonists: synthesis and investigation of structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6578 – 6581.

¹⁰⁷ Van Der Stelt, M.; Cals, J.M. G.B. 1-(Biphenyl-4-ylmethyl)imidazolidine-2,4-dione Derivatives and Their Use as CB₂ Receptor Agonists. WO 2010063721, **2010**.

¹⁰⁸ El Bakali, J.; Gilleron, P.; Body-Malapel, M.; Mansouri, R.; Muccioli, G.G.; Djouina, M.; Barczyk, A.; Klupsch, F.; Andrzejak, V.; Lipka, E.; Furman, C.; Lambert, D.M.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Millet, R. 4-Oxo-1,4-dihydropyridines as Selective CB₂ Cannabinoid Receptor Ligands Part 2: Discovery of New Agonists Endowed with Protective Effect Against Experimental Colitis. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8948 – 8952.

B8. Les hétérocycles à 5 chaînons

Différents types d'hétérocycles sont regroupés dans cette famille. On y retrouve des thiazolidènes, comme le composé A-836339, qui possède une bonne activité dans différents modèles de douleurs chez le rat (ex : les incisions de la peau).¹⁰⁹ Cette famille englobe aussi des composés de type pyrazole, comme le composé **XIV**. Ce composé possède une pharmacocinétique intéressante, ainsi qu'une bonne durée de demi-vie et présente une activité antinociceptive dans des modèles d'inflammation chez le rat.¹¹⁰ Enfin, on trouve également des composés de type isoxazole, comme le composé **XV** (figure 27), développé par Boehringer Ingelheim, présentant une activité pour le récepteur CB₂ de l'ordre du subnanomolaire.¹¹¹

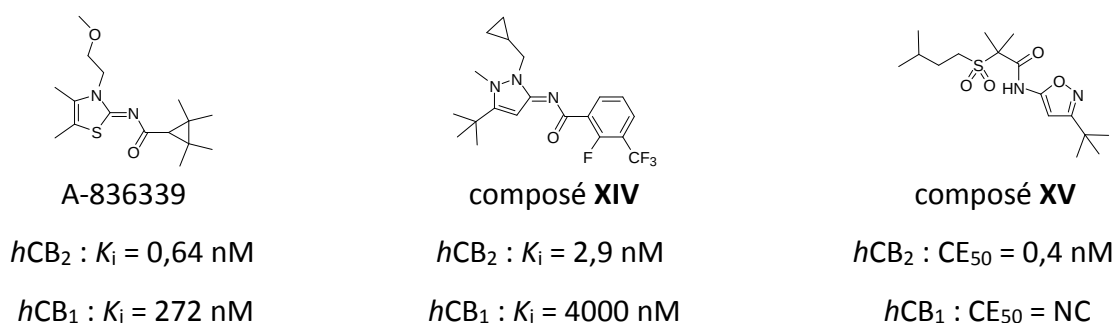


Figure 27. Structures chimiques de l'A-836339, du composé **XIV** et du composé **XV**

B9. Les diazépanes

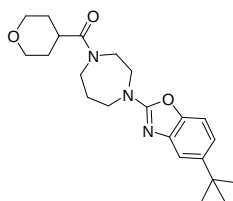
De nombreux composés de cette famille disposent de mauvais paramètres biologiques, tels la stabilité microsomiale et la solubilité. Cependant, des études sur les RSA de cette famille ont permis d'obtenir une molécule plus stable et ayant une solubilité aqueuse correcte, le composé **XVI** (figure 28).¹¹²

¹⁰⁹ Dart, M.J.; Carroll, W.A.; Florjancic, A.S.; Frost, J.M.; Gallagher, M.E.; Li, T.; Nelson, D.W.; Patel, M.V.; Peddi, S.; Perez-Medrano, A.; Ryther, K.B.; Tietje, K.R.; Kolasa, T. Novel Compound as Cannabinoid Receptor Ligands and Uses Thereof. WO 2007140385, **2007**.

¹¹⁰ Ohta, H.; Ishizaka, T.; Tatsuzuki, M.; Yoshinaga, M.; Iida, I.; Yamaguchi, T.; Tomishima, Y.; Futaki, N.; Toda, Y.; Saito, S. Imine derivatives as new potent and selective CB₂ cannabinoid receptor agonists with an analgesic action. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1111 – 1124.

¹¹¹ Berry, A.; Cirillo, P.F.; Hickey, E.R.; Riether, D.; Thomson, D.; Zindell, R.M.; Ermann, M.; Jenkins, J.E.; Mushi, I.; Taylor, M.; Chowdhury, C.; Palmer, C.; Blumire, N. Compounds Which Modulate the CB₂ Receptor. WO 2008039645, **2008**.

¹¹² Zindell, R.; Walker, E.R.; Scott, J.; et al. Aryl 1,4-diazepane compounds as potent and selective CB₂ agonists: optimization of drug-like properties and target independent parameters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4276 – 4280.



composé **XVI**

hCB_2 : $CE_{50} = 1 \text{ nM}$

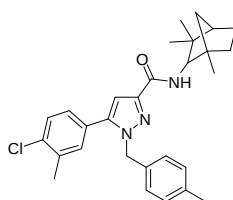
hCB_1 : $CE_{50} = 1170 \text{ nM}$

Figure 28. Structure chimique du composé **XVI**

iv. Les agonistes inverses et antagonistes du récepteur CB_2

Contrairement aux agonistes, le nombre de composés antagonistes ou agonistes inverses du récepteur CB_2 développés reste très faible.

Le premier agoniste inverse sélectif du récepteur CB_2 synthétisé est le SR144528 (figure 29), développé par Sanofi. Ce composé possède une affinité pour le récepteur CB_2 de l'ordre du subnanomolaire.^{113,114} Il a été obtenu suite à des modifications du rimonabant (figure 13).



SR144528

hCB_2 : $K_i = 0,60 \text{ nM}$

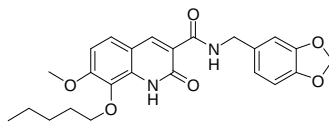
hCB_1 : $K_i = 400 \text{ nM}$

Figure 29. Structure chimique du SR144528

¹¹³ Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Millan, J.; Derocq, J.M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarran, M.; Bouaboula, M.; Calandra, B.; Portier, M.; Shire, D.; Brelière, J.C.; Le Fur, G.L. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB_2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 284, 644 - 650.

¹¹⁴ Griffin, G.; Wray, E.J.; Tao, Q.; McAllister, S.D.; Rorrer, W.K.; Aung, M.M.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of the cannabinoid CB_2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB_2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 377, 117 - 125.

L'agoniste inverse du récepteur CB₂ le plus décrit est le JTE-907 (figure 30). Ce composé possède des effets anti-inflammatoires chez la souris et présente des effets intéressants pour le traitement de la dermatite de contact allergique.¹¹⁵

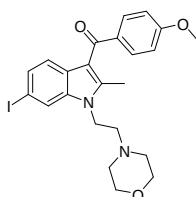


JTE-907

$hCB_2 : K_i = 35,9 \text{ nM}$

Figure 30. Structure chimique du JTE-907

Des composés de type indole, précédemment décrits comme agonistes du récepteur CB₂, se révèlent être des agonistes inverses de ce même récepteur. C'est le cas de l'AM-630 (figure 31), qui a montré des propriétés agonistes inverses sur cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) exprimant le récepteur CB₂.^{116,117,118}



AM-630

$hCB_2 : K_i = 31,2 \text{ nM}$

$hCB_1 : K_i = 5152 \text{ nM}$

Figure 31. Structure chimique de l'AM-630

Des études récentes ont aussi permis de montrer que des composés commercialisés en tant que modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes étaient des agonistes inverses du récepteur CB₂. C'est le cas, par exemple, du Raloxifène,¹¹⁹ du Lasofoxifène¹²⁰ ou encore du

¹¹⁵ Ueda, Y.; Miyagawa, N.; Matsui, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. Involvement of cannabinoid CB₂ receptor-mediated response and efficacy of cannabinoid CB₂ receptor inverse agonist, JTE-907, in cutaneous inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *520*, 164 – 171.

¹¹⁶ Landsman, R.S.; Makriyannis, A.; Deng, H.; Consroe, P.; Roeske, W.R.; Yamamura, H.I. AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB₁ receptor. *Life Sci.* **1998**, *62*, 109 - 113.

¹¹⁷ Ross, R.A.; Brockie, H.C.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.L.; Templeton, F.; Makriyannis, A.; Pertwee, R.G. Agonist-inverse agonist characterization at CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 665 - 672.

¹¹⁸ Hosohata, K.; Quock, R.M.; Hosohata, Y.; Burkey, T.H.; Makriyannis, A.; Consroe, P.; Roeske, W.R.; Yamamura, H.I. AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain. *Life Sci.* **1997**, *61*, 115 - 118.

¹¹⁹ Kumar, P.; Song, Z.H. Identification of raloxifene as a novel CB₂ inverse agonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *435*, 76 – 81.

Oc1ccc(cc1C(=O)c2cc(O)ccc2S)c3cc(OCN4CCCCC4)ccc3Oc1ccc2c(c1)CC[C@H]2(c3ccccc3)C4=CC=C(C=C4)OCCN5CCCC5CN(C)CCOc1ccc(cc1)/C(=C/c2ccccc2)/C(=C/c3ccccc3)

CB₁ : $K_i = 3200$ nM

le plus d'homologie avec le récepteur purinergique P2Y5 (29%)¹²⁴ mais ne possède que peu d'homologie avec les récepteurs CB₁ et CB₂ (respectivement 13,5% et 14,4%).

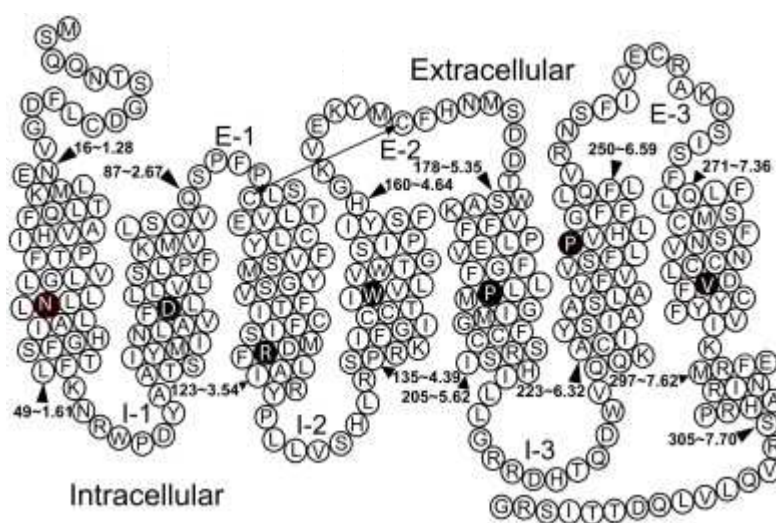


Figure 33. Structure 2D du récepteur GPR55¹²⁵

Actuellement, comme pour les récepteurs CB₁ et CB₂, la structure tridimensionnelle du récepteur GPR55 n'est pas déterminée. Les modèles existants sont basés sur des comparaisons avec la structure de différents récepteurs connus, comme par exemple, le récepteur de l'adénosine A2A.¹²⁶

ii. Distribution

L'ARNm du récepteur GPR55 est exprimé dans le cerveau, de manière abondante dans le noyau caudé et le putamen et, de manière moindre, dans l'hippocampe, le thalamus, le cervelet ou encore le cortex frontal. De plus, ce récepteur est aussi retrouvé au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques et du foie.

¹²⁴ Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Lee, D.K.; Lynch, K.R.; Cheng, R.; Heng, H.H.; George, S.R.; O'Dowd, B.F. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol. Brain Res.* **1999**, *64*, 193 - 198.

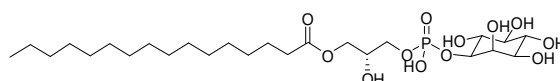
¹²⁵ Sharir, H.; Abood, M.E. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol. Therapeut.* **2010**, *126*, 301 - 313.

¹²⁶ Elbegdorj, O.; Westkaemper, R.B.; Zhang, Y. A homology modeling study toward the understanding of three-dimensional structure and putative pharmacological profile of the G-protein coupled receptor GPR55. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *39*, 50 - 60.

De manière plus générale, les récepteurs GPR55 sont présents au niveau des cellules endothéliales,¹²⁷ des cellules microgliales,¹²⁸ des ostéoclastes et ostéoblastes,¹²⁹ des cellules neuronales¹³⁰ et des lymphocytes.

iii. Les agonistes du récepteur GPR55

Le ligand endogène du récepteur GPR55 est le lysophosphatidylinositol (LPI, figure 34).¹³¹ Le LPI est un messager lipidique favorisant le relargage de l'insuline par les îlots de Langerhans. Ce composé possède aussi différents effets protecteurs, comme par exemple un effet neuroprotecteur dans un modèle d'ischémie globale transitoire par occlusion de quatre vaisseaux (deux artères vertébrales et deux artères carotidiennes).¹³²



Lysophosphatidylinositol

GPR55 : $K_i = 1200 \text{ nM}$

Figure 34. Structure chimique du LPI

Certains des composés agonistes du récepteur GPR55 sont des antagonistes des autres récepteurs aux cannabinoïdes. C'est le cas pour le composé AM-251 (figure 35), qui est un composé antagoniste du récepteur CB₁.

¹²⁷ Offertaler, L.; Mo, F.M.; Batkai, S.; Liu, J.; Begg, M.; Razdan, R.K.; Martin, B.R.; Bukoski, R.D.; Kunos, G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 699 – 705.

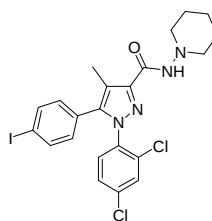
¹²⁸ Pietr, M.; Kozela, E.; Levy, R.; Rimmerman, N.; Lin, Y.H.; Stella, N.; Vogel, Z.; Juknat, A. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2071 – 2076.

¹²⁹ Whyte, L.S.; Ryberg, E.; Sims, N.A.; Ridge, S.A.; Mackie, K.; Greasley, P.J.; Ross, R.A.; Rogers, M.J. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2009**, *106*, 16511 – 16516.

¹³⁰ Lauckner, J.E.; Jensen, J.B.; Chen, H.Y.; Lu, H.C.; Hille, B.; Mackie, K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2008**, *105*, 2699 – 2704.

¹³¹ Yamashita, A.; Oka, S.; Tanikawa, T.; Hayashi, Y.; Nemoto-Sasaki, Y.; Sugiura, T. The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostag. Oth. Lipid M.* **2013**, *107*, 103 – 116.

¹³² Blondeau, N.; Lauritzen, I.; Widmann, C.; Lazdunski, M.; Heurteaux, C. A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2002**, *22*, 821 – 834.



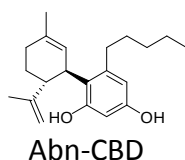
AM-251

GPR55 : $CE_{50} = 39 \text{ nM}$

$CB_1 : K_i = 7,49 \text{ nM}$

Figure 35. Structure chimique de l'AM-251

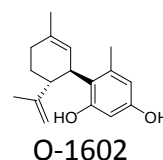
D'autres ligands agonistes de ce récepteur n'interagissent pas du tout avec les autres récepteurs aux cannabinoïdes. C'est par exemple le cas du Abn-CBD ou encore de l'O-1602 (figure 36). Ces deux composés sont des dérivés des cannabinoïdes naturels.



GPR55 : $CE_{50} = 2,5 \text{ nM}$

$CB_2 : CE_{50} = 30000 \text{ nM}$

$CB_1 : CE_{50} = 30000 \text{ nM}$



GPR55 : $CE_{50} = 13 \text{ nM}$

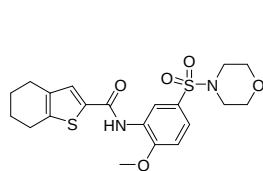
$CB_2 : CE_{50} = 30000 \text{ nM}$

$CB_1 : CE_{50} = 30000 \text{ nM}$

Figure 36. Structures chimiques de l'Abn-CBD et de l'O-1602

Récemment, trois nouveaux composés agonistes du récepteur GPR55 ont été publiés : le ML184 (pipérazine), le ML185 (triazoloquinoline tricyclique) et le ML186 (morpholino-sulfonylphénylamide, figure 37). Ces composés, comme ceux détaillés précédemment, sont sélectifs du récepteur GPR55.¹³³

¹³³ Heynen-Genel, S.; Dahl, R.; Shi, S.; Milan, L.; Hariharan, S.; Bravo, Y.; Sergienko, E.; Hedrick, M.; Dad, S.; Stonich, D.; Su, Y.; Vicchiarelli, M.; Mangravita-Novo, A.; Smith, L.H.; DY Chung, T.; Sharir, H.; Barak, L.S.; and Abood, M.E. Screening for Selective Ligands for GPR55 – Agonists. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. September 29, 2010; Last Update: May 26, 2011.

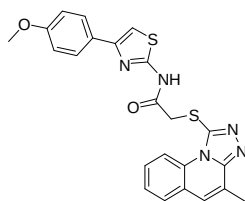


ML186

GPR55 : $K_i = 305$ nM

CB₂ : $K_i > 10000$ nM

CB₁ : $K_i > 10000$ nM

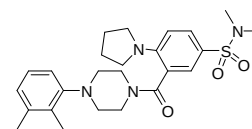


ML185

GPR55 : $K_i = 658$ nM

CB₂ : $K_i > 10000$ nM

CB₁ : $K_i > 10000$ nM



ML184

GPR55 : $K_i = 263$ nM

CB₂ : $K_i > 10000$ nM

CB₁ : $K_i > 10000$ nM

Figure 37. Structures chimiques du ML186, du ML185 et du ML184

iv. Les agonistes inverses et antagonistes du récepteur GPR55

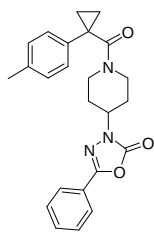
Un des antagonistes les plus importants du récepteur GPR55 est le CP-55,940 (GPR55 : $K_i = 194$ nM). Ce composé est également agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂ (hCB_1 : $K_i = 0,58$ nM et hCB_2 : $K_i = 0,69$ nM).¹³⁴

Il existe cependant plusieurs antagonistes de ce récepteur qui ne se lient pas aux autres récepteurs aux cannabinoïdes. C'est le cas des composés de type pipéradinyloxadiazolone (ML191), thiénopyrimidine (ML192) et quinoléine aryle sulfonamide (ML193).^{135,136} Les structures de ces trois composés sont différentes, ce qui rend difficile la recherche de RSA pour ces composés (figure 38). On peut néanmoins retrouver dans ces molécules la présence d'amides ou de sulfonamides ainsi que d'hétérocycles azotés. L'utilisation de ces composés est pour le moment limitée à la recherche.

¹³⁴ Kapur, A.; Zhao, P.; Sharir, H.; Bai, Y.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; and Abood, M.E. Atypical Responsiveness of the Orphan Receptor GPR55 to Cannabinoid Ligands. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29817 - 29827.

¹³⁵ Kotsikorou, E.; Sharir, H.; Shore, D.M.; Hurst, D.P.; Lynch, D.L.; Madrigal, K.E.; Heynen-Genel, S.; Milan, L.B.; Chung, T.D.Y.; Seltzman, H.H.; Bai, Y.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; Croatt, M.P.; Abood, M.E.; and Reggio, P.H. Identification of the GPR55 Antagonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligand. *Biochemistry*, **2013**, *52*, 9456 - 9469.

¹³⁶ Heynen-Genel, S.; Dahl, R.; Shi, S.; Milan, L.; Hariharan, S.; Sergienko, E.; Hedrick, M.; Dad, S.; Stonich, D.; Su, Y.; Vicchiarelli, M.; Mangravita-Novo, A.; Smith, L.H.; Chung, T.D.Y.; Sharir, H.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; Abood, M.E. Screening for Selective Ligands for GPR55 - Antagonists. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); **2010**.

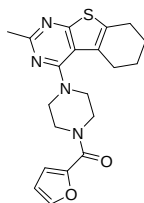


ML191

GPR55 : $K_i = 160$ nM

CB₂ : $K_i > 10000$ nM

CB₁ : $K_i > 10000$ nM

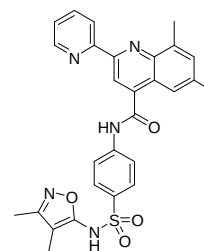


ML192

GPR55 : $K_i = 1080$ nM

CB₂ : $K_i > 10000$ nM

CB₁ : $K_i > 10000$ nM



ML193

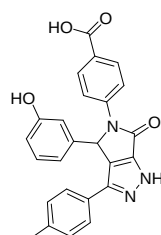
GPR55 : $K_i = 221$ nM

CB₂ : $K_i > 10000$ nM

CB₁ : $K_i > 10000$ nM

Figure 38. Structures chimiques du ML191, du ML192 et du ML193

Récemment, un nouveau composé antagoniste du récepteur GPR55 a permis de montrer un rôle potentiel de ce récepteur au sein des cellules endothéliales et des plaquettes, le CID16020046 (figure 39).¹³⁷



CID16020046

GPR55 : $Cl_{50} = 150$ nM

Figure 39. Structure chimique du CID16020046

d. Les hétérodimères

i. Hétéromères CB₁/CB₂

Des études menées en 2008 avaient montré l'existence de dimères entre le récepteur CB₁ et d'autres types de récepteurs, dopaminergique (D2) et adénosinergique (A2A).¹³⁸ Plus

¹³⁷ Kargl, J.; Brown, A.J.; Andersen, L.; Dorn, G.; Schicho, R.; Waldhoer, M.; and Heinemann, A. A Selective Antagonist Reveals a Potential Role of G Protein – Coupled Receptor 55 in Platelet and Endothelial Cell Function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *346*, 54 – 66.

¹³⁸ Navarro, G.; Carriba, P.; Gandía, J.; Ciruela, F.; Casadó, V.; Cortés, A.; Mallol, J.; Canela, E.I.; Lluís, C.; and Franco, R. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorld-Journal* **8**, **2008**, 1088–1097

récemment, il a été démontré que les récepteurs CB₁ et CB₂, agissant initialement seuls, étaient capables de former des dimères dans des cellules transfectées ainsi que dans différents tissus cérébraux où ils sont co-exprimés.¹³⁹ La formation de ces hétéromères est à l'origine d'interactions négatives entre les agonistes et les antagonistes de ces récepteurs. En effet, un antagoniste du récepteur CB₁ bloquera l'activité d'un agoniste du récepteur CB₂ et, inversement, un antagoniste du récepteur CB₂ aura un effet négatif sur l'activité d'un agoniste du récepteur CB₁.¹⁴⁰

ii. Hétéromères CB₁/GPR55

Comme pour les récepteurs CB₁ et CB₂, le récepteur GPR55 peut se dimériser avec le récepteur CB₁. L'étude sur cette dimérisation a été effectuée au niveau du striatum, dans lequel les deux récepteurs sont exprimés. Comme nous avons pu le voir précédemment, plusieurs molécules s'avèrent être des ligands des deux récepteurs mais peuvent avoir des spécificités différentes. La présence de ces hétéromères peut donc être à l'origine d'une réponse différente de celle résultant de l'activation des récepteurs seuls.¹⁴¹

Plus particulièrement, il a été observé que, dans les cellules exprimant ces deux récepteurs, la signalisation médiée par le récepteur GPR55 est inhibée par la présence du récepteur CB₁, mais uniquement lorsque celui-ci est inactif. Inversement, la capacité de signalisation du récepteur CB₁ est améliorée en présence du récepteur GPR55. Ces résultats ont été observés grâce à l'utilisation du SR141716A (antagoniste du récepteur CB₁ et agoniste du récepteur GPR55). Bien que ce composé soit un agoniste du récepteur GPR55, l'inactivation des récepteur CB₁ empêche la signalisation de GPR55.¹⁴²

¹³⁹ Koch, M.; Habazettl, I.; Dehghani, F.; Korf, H.W. The rat pineal gland comprises an endocannabinoid system. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 351 – 360.

¹⁴⁰ Callén, L.; Moreno, R.; Barroso-Chinea, P.; Moreno-Delgado, D.; Cortés, A.; Mallol, J.; Casadó, V.; Lanciego, J.L.; Franco, R.; Lluís, C.; Canela, E.I.; and McCormick, P.J. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20851 – 20865.

¹⁴¹ Martínez-Pinilla, E.; Reyes-Resina, I.; Oñativia-Astibia, A.; Zamarrubia, M.; Ricobaraz, A.; Navarro, G.; Moreno, E.; Dopeso-Reyes, I.G.; Sierrab, S.; Ricob, A.J.; Rodab, E.; Lanciego, J.L.; Franco, R. CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp. Neurol.* **2014**, *261*, 44 – 52.

¹⁴² Kargl, J.; Balenga, N.; Parzmair, G.P.; Brown, A.J.; Heinemann, A.; Waldhoer, M. The Cannabinoid Receptor CB1 Modulates the Signaling Properties of the Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44234 – 44248.

iii. Hétéromères CB₂/GPR55

Comme pour le récepteur CB₁, il a été montré que le récepteur CB₂ pouvait former des hétérodimères avec le récepteur GPR55. Cette dimérisation a été observée suite à une étude menée sur des neutrophiles humains, où les deux récepteurs sont exprimés.¹⁴³

Ces études ont permis de montrer que la dimérisation entre le récepteur CB₂ et le récepteur GPR55 entraîne une diminution des facteurs de transcription résultant de l'activation du récepteur GPR55 par la LPI (ligand endogène du récepteur GPR55).

De plus, il a été observé, pour les hétéromères CB₂/GPR55, un rétrocontrôle négatif d'un récepteur sur le second ainsi qu'une régulation de l'activité d'un des récepteurs suite à l'inactivation du second récepteur par un antagoniste. En effet, l'action du HU-308 (agoniste du récepteur CB₂) est atténuée lors d'une co-activation du dimère par la LPI ainsi que par l'utilisation d'un antagoniste (soit du récepteur CB₂, soit du récepteur GPR55). De même, l'activité induite par la LPI sur le récepteur GPR55 est réduite lors de l'utilisation du HU-308.¹⁴⁴

2. Les endocannabinoïdes

Les nombreuses recherches portant sur les récepteurs aux cannabinoïdes ont permis la découverte de leurs ligands endogènes, les endocannabinoïdes. Aujourd'hui, huit composés font partie de la famille restreinte des endocannabinoïdes.¹⁴⁵ On peut distinguer deux sous-groupes : les amides, comme l'anandamide, les esters et les éthers, comme le 2-arachidonoylglycérol (figure 40).

¹⁴³ Balenga, N.A.B.; Aflaki, E.; Kargl, J.; Platzer, W.; Schröder, R.; Blättermann, S.; Kostenis, E.; Brown, A.J.; Heinemann, A.; Waldhoer, M. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell. Res.* **2011**, *21*, 1452 – 1469.

¹⁴⁴ Moreno, E.; Andradás, C.; Medrano, M.; Caffarel, M.M.; Pérez-Gómez, E.; Blasco-Benito, S.; Gómez-Cañás, M.; Pazos, M.R.; Irving, A.J.; Lluís, C.; Canela, E.I.; Fernández-Ruiz, J.; Guzmán, M.; McCormick, P.J.; Sánchez, C. Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 21960 – 21972.

¹⁴⁵ Hanus, L.O. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 213 – 271.

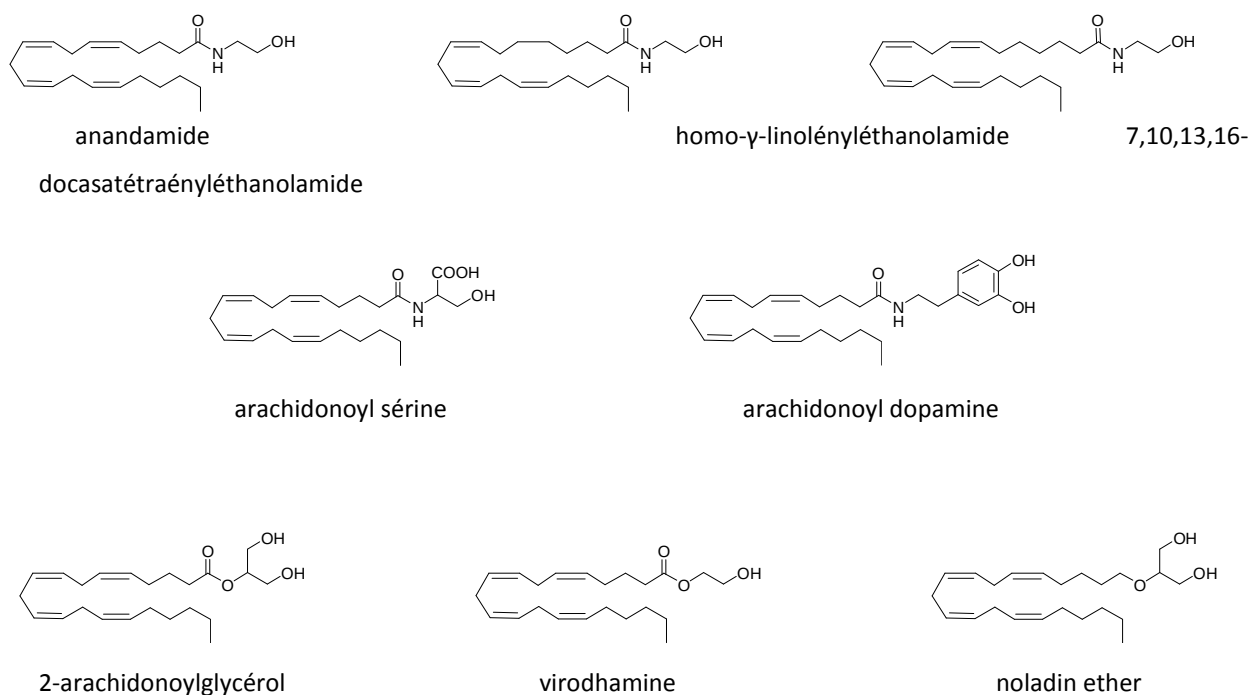


Figure 40. Structures chimiques des endocannabinoïdes

a. L'anandamide

Le premier ligand endogène des récepteurs CB₁ et CB₂ est le *N*-arachidonoyléthanolamide (AEA), encore appelé anandamide. Ce composé a été découvert en 1992 par l'équipe de Mechoulam, suite à des recherches menées sur des extraits de cerveau de porc.¹⁴⁶

L'AEA fait partie de la famille des *N*-acyléthanolamines (NAEs), un large groupe de lipides bioactifs. Cet endocannabinoïde se comporte comme un agoniste partiel des récepteurs CB₁ et CB₂, avec une affinité préférentielle pour le récepteur CB₁, (*K_i* de 72 nM et 370 nM, respectivement). Son profil pharmacologique est proche de celui du Δ⁹-THC.¹⁴⁷

L'AEA se retrouve dans de nombreux organes. En plus de sa présence au niveau central (hippocampe, thalamus, cervelet et cortex),¹⁴⁸ on le retrouve à de plus fortes concentrations dans les testicules et l'utérus chez le rat mais aussi, à diverses concentrations, au niveau de

¹⁴⁶ Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **1992**, 258, 1946 - 1949.

¹⁴⁷ Vogel, Z.; Barg, J.; Levy, R.; Saya, D.; Heldman, E.; Mechoulam, R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J. Neurochem*. **1993**, 61, 352 - 355.

¹⁴⁸ Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, **1994**, 372, 686 - 691.

l'intestin, de la rate et du cœur.¹⁴⁹ Des taux plus faibles d'AEA ont été observés dans le sérum, le plasma et le liquide céphalorachidien.

Cette distribution suggère que l'AEA n'est pas de nature hormonale. De plus, l'AEA semble se comporter comme un neurotransmetteur classique. Cependant, il n'est pas stocké dans des vésicules mais diffuse librement à travers la membrane cellulaire.¹⁵⁰ Une fois synthétisé, l'AEA peut interagir avec les récepteurs aux cannabinoïdes ou être hydrolysé par son enzyme de dégradation, la « fatty acid amide hydrolase » (FAAH).

b. Le 2-arachidonoylglycérol

Le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) est le deuxième endocannabinoïde le plus étudié. Il a été isolé en 1995 dans l'intestin canin.¹⁵¹

Le 2-AG fait partie de la famille des monoglycérides ou monoacylglycérols (MAG). Cet endocannabinoïde est un agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂ dont les affinités pour ces récepteurs sont respectivement de 58 nM et 145 nM. Comme pour l'AEA, le 2-AG possède une meilleure affinité pour le récepteur CB₁.¹⁵²

Tout comme l'AEA, le 2-AG est présent au niveau du cerveau (cortex, bulbe rachidien) où sa concentration peut atteindre 170 fois celle de l'AEA.^{153,154} Il est également présent au niveau du foie, de la rate, des poumons ou encore du cœur.¹⁵⁵

¹⁴⁹ Schmid, P.C.; Paria, B.C.; Krebsbach, R.J.; Schmid, H.H.; Dey, S.K. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4188 - 4192.

¹⁵⁰ Giuffrida, A.; Beltramo, M.; Piomelli, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 7 - 14.

¹⁵¹ Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; Pertwee, R.G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, A. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83 - 90.

¹⁵² Ben-Shabat, S.; Frider, E.; Sheskin, T.; Tamiri, T.; Rhee, M.H.; Vogel, Z.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *353*, 23 - 31.

¹⁵³ Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* **1997**, *388*, 773 - 778.

¹⁵⁴ Di Marzo, V. 2-Arachidonoyl-glycerol as an endocannabinoid: lime-light for a formerly neglected metabolite. *Biochemistry*, **1998**, *63*, 13 - 21.

¹⁵⁵ Avraham, Y.; Magen, I.; Zolotarev, O.; Vorobiov, L.; Nachmias, A.; Pappo, O.; Ilan, Y.; Berry, E.M.; Ackerman, Z. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist, in various rat tissues during the evolution of experimental cholestatic liver disease. *Prostag. Leukotr. Ess.* **2008**, *79*, 35 - 40.

L'AEA et le 2-AG ne sont pas stockés dans des vésicules. La durée de demi-vie de ces composés est très courte, ce qui induit leur synthèse « à la demande » au sein des cellules neuronales. Ainsi, ils agissent dans la cellule de production ou dans une cellule voisine.^{156,157}

3. Les voies de biotransformation des endocannabinoïdes

a. Les voies de biosynthèse

i. Biosynthèse de l'anandamide

Les mécanismes de biosynthèse de l'AEA au niveau du SNC ne sont pas encore totalement élucidés (schéma 1).^{148,158}

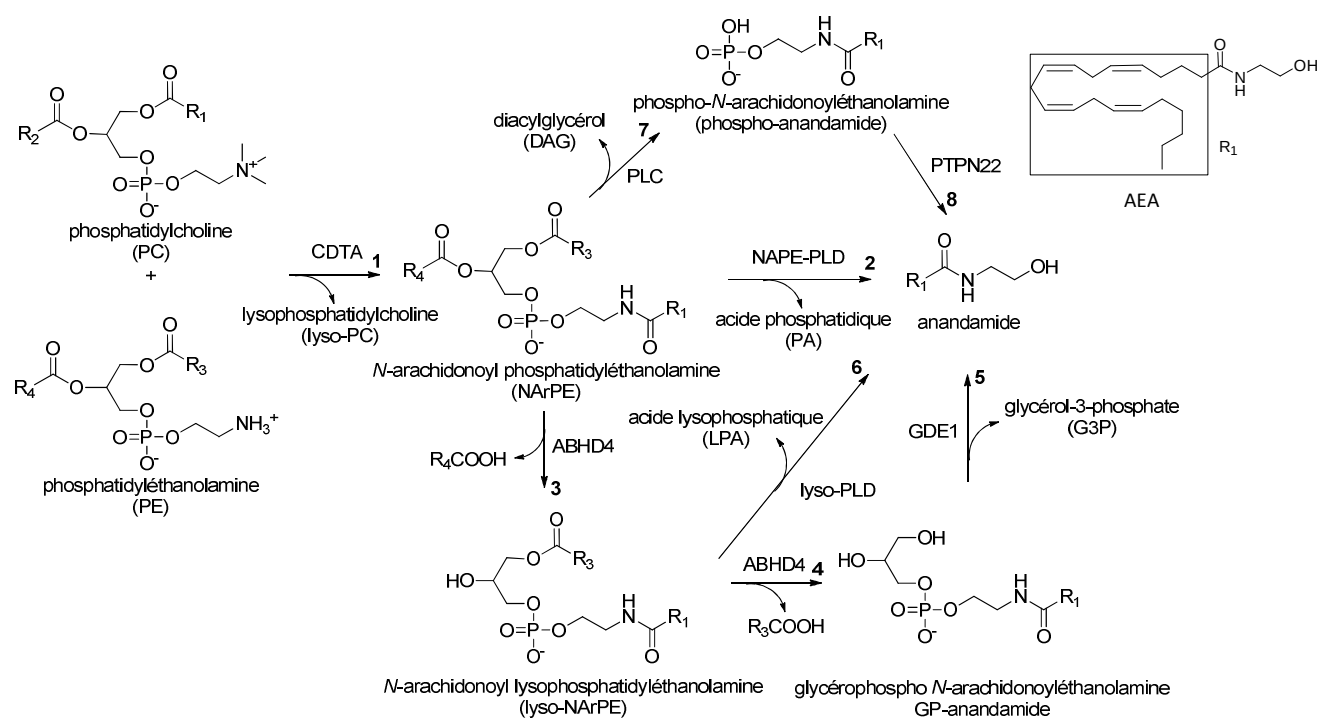


Schéma 1. Les voies de biosynthèse de l'AEA

En effet, plusieurs voies de biosynthèse de l'AEA peuvent être envisagées. L'étape 1, commune à toutes les voies de biosynthèse proposées, est l'amidification de la

¹⁵⁶ Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Melck, D.; Martin, B.R. Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 721 - 744.

¹⁵⁷ Piomelli, D.; Beltramo, M.; Glasnapp, S.; Lin, S.Y.; Goutopoulos, A.; Xie, X.Q.; Makriyannis, A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5802 - 5807.

¹⁵⁸ Cadas, H.; Gaillet, S.; Beltramo, M.; Venance, L.; Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 3934 - 3942.

phosphatidyléthanolamine (PE) par transfert enzymatique du groupement arachidonoyl d'un phospholipide membranaire (PL). Cette réaction, catalysée par une transacylase calcium-dépendante (CDTA), mène à la formation d'un intermédiaire : la NArPE.

La première voie de synthèse suppose la formation directe de l'AEA par action de la *N*-acylphosphatidyléthanolamine phospholipase D (NAPE-PLD, étape **2**) à partir de la NArPE.¹⁵⁹

La deuxième voie de synthèse envisage une double désacylation de la NArPE par la α/β -hydrolase domaine 4 (ABHD4, étape **3** et **4**) pour donner, successivement, la lyso-NArPE et la GP-anandamide.¹⁶⁰ Cette désacylation est ensuite suivie d'un clivage de la liaison phosphodiester par la glycérophosphodiesterase GDE1 (étape **5**) pour former l'AEA.¹⁶¹

La troisième voie de synthèse met en jeu l'hydrolyse de la liaison phosphodiester de l'intermédiaire monodésacylé (lyso-NArPE) par une lyso-phospholipase D (étape **6**).¹⁶²

Finalement, la dernière voie de synthèse propose le clivage de la NArPE par action d'une phospholipase C (étape **7**) pour former l'intermédiaire phospho-AEA suivi d'une déphosphorylation par la tyrosine phosphatase PTPN22 (étape **8**).¹⁶³

ii. Biosynthèse du 2-arachidonoylglycérol

Comme pour la synthèse de l'AEA, plusieurs voies de biosynthèse du 2-AG ont été proposées (schéma 2).¹⁶⁴

¹⁵⁹ Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5298 - 5305.

¹⁶⁰ Simon, G.M.; Cravatt, B.F. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine and a role for α/β -hydrolase 4 in this pathway. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26465 - 26472.

¹⁶¹ Simon, G.M.; Cravatt, B.F. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9341 - 9349.

¹⁶² Sun, Y.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ueda, N. Biosynthesis of anandamide and *N*-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* **2004**, *380*, 749 - 756.

¹⁶³ Liu, J.; Wang, L.; Harvey-White, J.; Huang, B.X.; Kim, H.Y.; Luquet, S.; Palmiter, R.D.; Krystal, G.; Rai, R.; Mahadevan, A.; Razdan, R.K.; Kunos, G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*. **2008**, *54*, 1 - 7.

¹⁶⁴ Kano, M.; Ohno-Shosaku, T.; Hashimoto, Y.; Uchigashima, M.; Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 309 - 380.

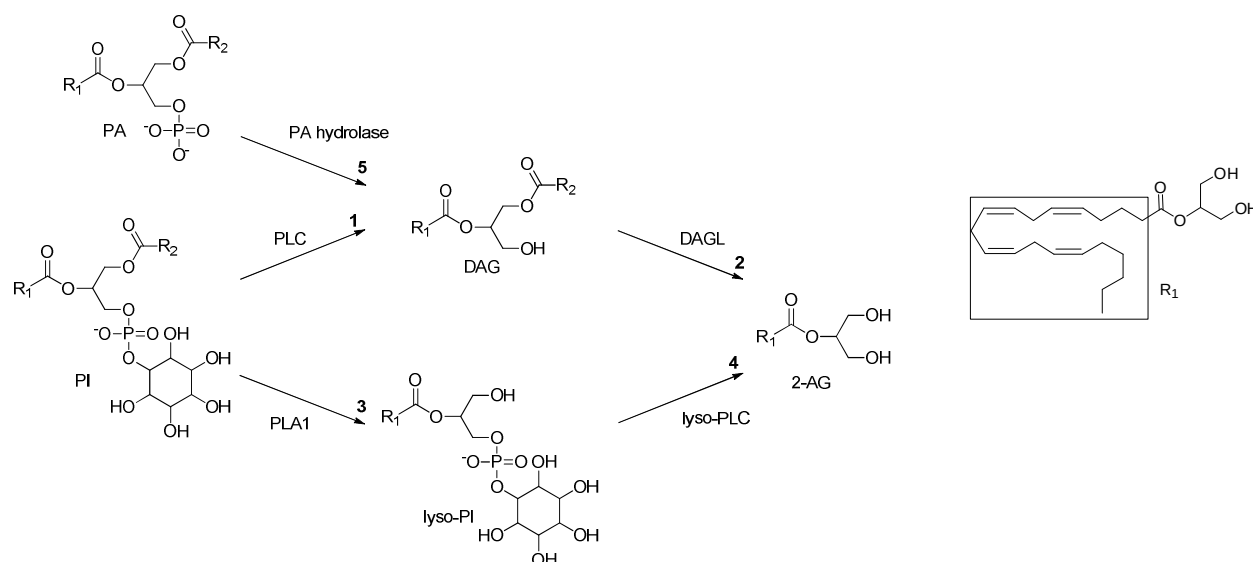


Schéma 2. Les voies de biosynthèse du 2-AG

La première voie de synthèse suppose que le phosphatidylinositol (PI) est hydrolysé par la phospholipase C (PLC) pour donner le diacylglycérol (DAG, étape 1). Une fonction ester du DAG est ensuite clivée pour former le 2-AG (étape 2) sous l'action de la diacylglycérol lipase (DAGL).¹⁶⁵

La deuxième voie de synthèse suppose l'hydrolyse du PI en 2-arachidonoyl-lipophosphatidylinositol (lyso-PI, étape 3) par action de la phosphatidylinositol-phospholipase A1 (PLA). Le lyso-PI est ensuite hydrolysé par la lysophospholipase C (lyso-PLC) pour donner le 2-AG (étape 4).¹⁶⁶

La dernière voie de biosynthèse envisagée se différencie de la première par la synthèse du DAG à partir de l'acide phosphatidique (PA) par une « phosphatidic acid hydrolase » (étape 5).¹⁶⁷

¹⁶⁵ Kondo, S.; Kondo, H.; Nakane, S.; Kodaka, T.; Tokumura, A.; Waku, K.; Sugiura, T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca^{2+} -dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* **1998**, *429*, 152 - 156.

¹⁶⁶ Ueda, H.; Kobayashi, T.; Kishimoto, M.; Tsutsumi, T.; Okuyama, H. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1874 - 1881.

¹⁶⁷ Bisogno, T.; Melck, D.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2113 - 2119.

b. Les voies de biodégradation

Les endocannabinoïdes ont une durée de vie très courte. Suite à leur interaction avec les récepteurs aux cannabinoïdes, ceux-ci sont dégradés par différentes enzymes. Les deux principales sont la « fatty acid amide hydrolase » (FAAH) et la « monoacylglycerol lipase » (MAGL).

i. La fatty acid amide hydrolase

La FAAH est une hydrolase de 63 kDa qui a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1985.¹⁶⁸ Cravatt *et al.* ont ensuite purifié et séquencé cette enzyme en 1996.¹⁶⁹ Celle-ci appartient à la famille des amidases à sérine et se compose de 579 acides aminés. L'homologie de cette enzyme est de 73% entre les différentes espèces desquelles elle a été clonée (humain, rat, souris et porc), valeur qui passe à 90% pour le domaine caractéristique des amidases situé entre les acides aminés 215 et 257.¹⁷⁰

On retrouve la FAAH à la fois au niveau central et au niveau périphérique chez l'Homme. Les organes présentant les plus grandes concentrations sont le foie, le rein, le poumon, la prostate, le petit intestin et les testicules.¹⁷¹ Au niveau central, la présence de cette enzyme est corrélée à celle du récepteur CB₁. Il existe cependant certaines régions présentant des récepteurs CB₁ où l'expression de la FAAH est inexistante.

La FAAH est une enzyme spécifique des dérivés d'acide gras à longue chaîne,¹⁷² et dégrade préférentiellement l'AEA. Elle ne circule pas librement dans le cytosol contrairement aux autres amidases à sérine mais est fortement liée à la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.¹⁷³

¹⁶⁸ Schmid, P.C.; Zuzarte-Augustin, M.L.; Schmid, H.H. Properties of rat liver N-acyl ethanolamine amidohydrolase. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14145 - 14149.

¹⁶⁹ Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. **1996**, *384*, 83 - 87.

¹⁷⁰ McKinney, M.K.; Cravatt, B.F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 411 - 432.

¹⁷¹ Labar, G.; Michaux, C. Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1882 - 1902.

¹⁷² Deutsch, D.G.; Ueda, N.; Yamamoto, S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **2002**, *66*, 201 - 210.

¹⁷³ Egertova, M.; Cravatt, B.F.; Elphick, M.R. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*. **2003**, *119*, 481 - 496.

La FAAH se présente sous la forme d'un dimère. Chaque monomère possède un plateau hydrophobe qui permet l'ancrage du monomère dans la membrane. Les plateaux hydrophobes des deux monomères sont positionnés du même côté, permettant un agencement unilatéral renforçant l'ancrage de l'enzyme dans la membrane.¹⁷⁰

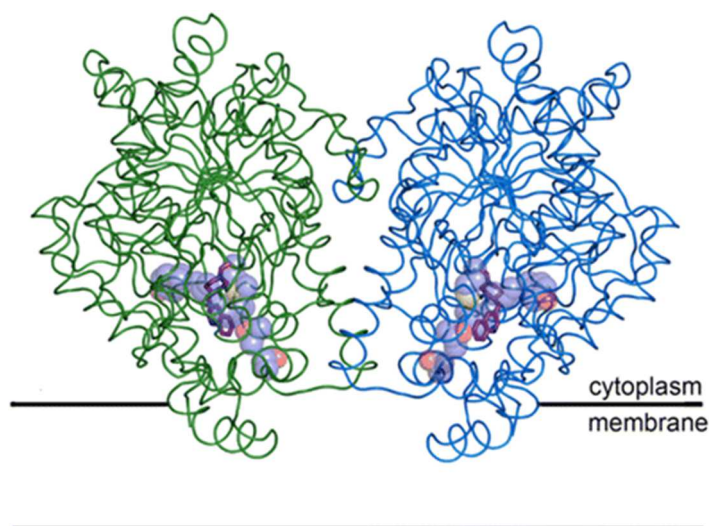


Figure 41. Structure tridimensionnelle de la FAAH

La FAAH hydrolyse la fonction amide de l'AEA, le dégradant en acide arachidonique et en éthanolamine (schéma 3).

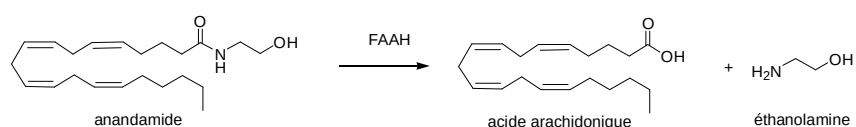


Schéma 3. Dégradation de l'AEA par la FAAH

ii. La monoacylglycerol lipase

La MAGL est une enzyme ubiquitaire de 33 kDa de la famille des α/β -hydrolases et a été isolée en 1976 par Tornqvist *et al.*¹⁷⁴ La MAGL est mieux conservée entre les espèces que la

¹⁷⁴ Tornqvist, H.; Belfrage, P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 813 - 819.

FAAH, avec une homologie entre l'Homme et la souris de 85%. Elle a été clonée chez l'Homme, la souris et le rat et est constituée de 303 acides aminés.¹⁷⁵

La distribution de la MAGL est proche de celle de la FAAH : on la retrouve au niveau central et périphérique. Elle a été localisée dans le foie, dans le tractus gastro-intestinal ou encore dans le tissu adipeux.¹⁷⁶ Au niveau central, comme pour la FAAH, la coprésence du récepteur CB₁ et de la MAGL est observée.¹⁷⁷

La MAGL hydrolyse des dérivés d'acide gras à longue et moyenne chaîne, et tout particulièrement le 2-AG.¹⁷⁸ Ce dernier se retrouve alors hydrolysé en acide arachidonique et en glycérol (schéma 4).

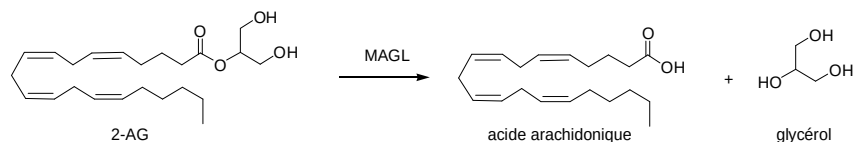


Schéma 4. Dégradation du 2-AG par la MAGL

4. Les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs aux cannabinoïdes

a. Voies de transduction du récepteur CB₁

La stimulation des récepteurs aux cannabinoïdes a un effet sur un certain nombre de voies de transduction (*via* des protéines G), que ce soit dans les neurones ou dans les tissus périphériques. Le couplage du récepteur CB₁ aux protéines G a été démontré sur des membranes cérébelleuses de rat. En effet, l'activation de ce récepteur induit une

¹⁷⁵ Hogestatt, E.D.; Jonsson, B.A.; Ermund, A.; Andersson, D.A.; Bjork, H.; Alexander, J.P.; Cravatt, B.F.; Basbaum, A.I.; Zygmunt, P.M. Conversion of acetaminophen to the bioactive *N*-acetylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31405 - 31412.

¹⁷⁶ Long, J.Z.; Nomura, D.K.; Cravatt, B.F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 744 - 753.

¹⁷⁷ Dinh, T.P.; Carpenter, D.; Leslie, F.M.; Freund, T.F.; Katona, I.; Sensi, S.L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 10819 - 10824.

¹⁷⁸ Saario, S.M.; Laitinen, J.T. Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 1903 - 1913.

augmentation de la liaison du guanosine triphosphate (GTP) radiomarqué ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$).¹⁷⁹ De plus, la plupart des effets induits par les cannabinoïdes sont sensibles à la toxine pertussique, ce qui suggère l'implication de protéines G de type $G_{i/o}$.

Au niveau neuronal, la localisation présynaptique du récepteur CB_1 est à l'origine d'une inhibition de la neurotransmission dans plusieurs régions du cerveau comme l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet, le noyau accumbens et le cortex.¹⁸⁰ La libération de nombreux neurotransmetteurs, tels le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA), est en effet inhibée par l'activation du récepteur CB_1 .

La figure 42 est un exemple de cette inhibition au niveau d'une synapse glutaminergique. Un stimulus présynaptique crée une dépolarisation et une entrée de calcium dans la cellule (étape 1), ce qui entraîne la libération de neurotransmetteurs (NT, étape 2). Ces derniers activent leurs récepteurs post-synaptiques et provoquent une dépolarisation conduisant à une entrée de calcium (étape 3), ce qui induit la synthèse d'endocannabinoïdes à partir de précurseurs lipidiques membranaires (étape 4). Ces derniers vont ensuite quitter la cellule post-synaptique pour aller activer les récepteurs CB_1 présynaptiques. Les sous-unités β et γ de la protéine G vont alors, suite à l'activation du récepteur, provoquer l'inhibition directe des canaux calciques voltage-dépendants de type T (étape 5),¹⁸¹ entraînant une diminution du taux de calcium intracellulaire et donc la libération des neurotransmetteurs.¹⁸² Enfin, les endocannabinoïdes n'ayant pas interagi avec leur récepteur vont être réabsorbés dans les neurones post- et présynaptiques avant d'être dégradés par leur enzyme respective (FAAH pour l'AEA et la MAGL pour le 2-AG, étapes 6 et 7).

¹⁷⁹ Selley, D.E.; Stark, S.; Sim, L.J.; Childers, S.R. Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[^{35}S]thio)triphosphate binding in rat brain membranes. *Life Sci.* **1996**, *59*, 659 - 668.

¹⁸⁰ Kawamura, Y.; Fukaya, M.; Maejima, T.; Yoshida, T.; Miura, E.; Watanabe, M.; Ohno-Shosaku, T.; Kano, M. The CB_1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2991 - 3001.

¹⁸¹ Chemin, J.; Monteil, A.; Perez-Reyes, E.; Nargeot, J.; Lory, P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7033 - 7040.

¹⁸² Wilson, R.I.; Nicoll, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* **2002**, *296*, 678 - 682.

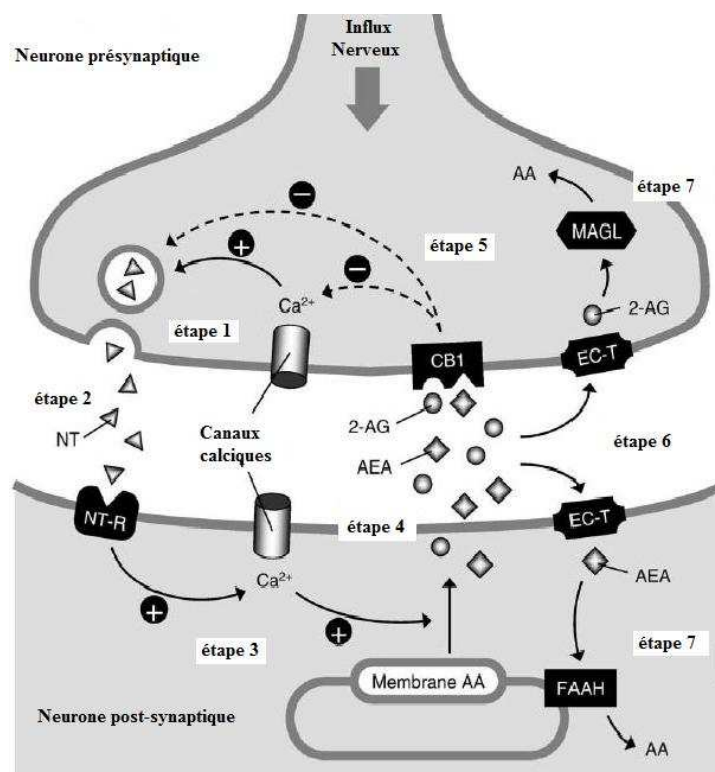


Figure 42. Action rétrograde des endocannabinoïdes

Dans les neurones et les tissus périphériques, l'activation du récepteur CB₁ *via* les protéines G_{i/o} joue principalement sur trois voies de signalisation intracellulaire : l'adénylate cyclase (AC), certains canaux ioniques et la voie des protéines kinases activées par des agents mitogènes (mitogen-activated protein kinases (MAPK)). Il est cependant possible, sous certaines conditions et dans certains systèmes, que le récepteur CB₁ soit couplé à des protéines de type G_s et/ou G_{q/11} en plus des G_{i/o}.¹⁸³

Lors de l'activation du récepteur CB₁, la sous unité G_{αi} de la protéine G_i inhibe l'AC, ce qui entraîne une diminution de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire (figure 43). Cependant, lors de l'utilisation de toxine pertussique, neutralisant les G_{i/o} et donc l'inhibition de l'AC, une réponse stimulatrice de l'AC peut être détectée, prouvant l'implication d'une protéine G_s.¹⁸⁴ Dépendante de l'AC, l'activité de la protéine

¹⁸³ Demuth, D.G.; Molleman, A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* **2006**, *78*, 549 - 563.

¹⁸⁴ Bonhaus, D.W.; Chang, L.K.; Kwan, J.; Martin, G.R. Dual activation and inhibition of adenylate cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *287*, 884 - 888.

kinase A (PKA) est régulée par la production d'AMPc. La PKA module la phosphorylation des canaux ioniques au potassium, provoquant l'activation de courants potassiques de type A.¹⁸⁵

En plus des canaux calciques de type T, l'activation du récepteur CB₁ entraîne le blocage d'autres canaux calciques, de type L,¹⁸⁶ N,¹⁸⁷ et P/Q,¹⁸⁸ par le biais d'une protéine de type G_{i/o} indépendante de l'activité cyclasique.¹⁸⁹ Cette inhibition n'est pas observée suite à l'utilisation de l'antagoniste SR141716A ou de la toxine pertussique. On parle alors d'inhibition indirecte.¹⁵²

La stimulation du récepteur CB₁ module également l'activité de plusieurs kinases intracellulaires. Par exemple, la phosphorylation de la « focal adhesion kinase » (FAK) dans les tranches hippocampales est stimulée par des agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes.¹⁹⁰ Cette phosphorylation, dépendante de la PKA, est bloquée par le SR141716A (antagoniste) ainsi que la toxine pertussique. L'activation du récepteur CB₁ exerce également un contrôle sur la voie des MAPK, telles que les « extracellular signal-related protein kinases » (ERKs) qui sont impliquées dans la régulation de l'expression de gènes et la synthèse protéique.¹⁹¹

D'autres MAPK sont activées par la stimulation des récepteurs CB₁, comme p38 et p42/44 MAPK ainsi que « c-Jun N-terminal-kinase » (JNK), qui jouent un rôle clé dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération et l'apoptose.¹⁹²

¹⁸⁵ Deadwyler, S. A.; Hampson, R. E.; Mu, J.; Whyte, A.; Childers, S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 273, 734 - 743.

¹⁸⁶ Gebremedhin, D.; Lange, A.R.; Campbell, W.B.; Hillard, C.J.; Harder, D.R. Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am. J. Physiol.* **1999**, 276, 2085 - 2093.

¹⁸⁷ Brown, S.P.; Safo, P.K.; Regehr, W.G. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 5623 - 5631.

¹⁸⁸ Hampson, A.J.; Bornheim, L.M.; Scanziani, M.; Yost, C.S.; Gray, A.T.; Hansen, B.M.; Leonoudakis, D.J.; Bickler, P.E. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 671 - 676.

¹⁸⁹ Mackie, K.; Hille, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 3825 - 3829.

¹⁹⁰ Derkinderen, P.; Toutant, M.; Burgaya, F.; Le Bert, M.; Siciliano, J.C.; De Franciscis, V.; Gelman, M.; Girault, J.A. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science.* **1996**, 273, 1719 - 1722.

¹⁹¹ Graham, E.S.; Ball, N.; Scotter, E.L.; Narayan, P.; Dragunow, M.; Glass, M. Induction of Krox-24 by endogenous cannabinoid type 1 receptors in Neuro2A cells is mediated by the MEK-ERK MAPK pathway and is suppressed by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 29085 - 29095.

¹⁹² Paradisi, A.; Pasquariello, N.; Barcaroli, D.; Maccarrone, M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB₁ receptor-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 6005 - 6012.

Les mécanismes permettant l'induction des MAPK ne sont pas encore clairement établis. Deux voies de signalisation ont, pour le moment, été proposées. Une de ces voies se base sur l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI₃K) par les sous-unités G_{βγ} de la protéine G_{i/o}. Puis Raf-1 serait stimulée et entraînerait la phosphorylation des MAPK. La deuxième voie impliquerait l'intervention de la protéine cytoplasmique FAN (« factor-associated with neutral sphingomyelinase activation »)¹⁹³ qui, couplée à une sphingomyélinase, permet la dégradation de la sphingomyéline en céramide, un agent mitogène de la famille des sphingolipides impliqué entre autres dans le cycle de la prolifération cellulaire.¹⁹⁴ Ce céramide est un second messenger important puisque *via* sa synthèse *de novo*, il inhibe la voie de survie tumorale PI₃K/Akt ou PI₃K/protéine kinase B (PKB). En effet, l'activation de la sérine palmitoyltransférase, *via* la stimulation du récepteur CB₁, dégrade les acides gras en céramide inhibant ainsi la protéine Akt, une protéine kinase sérine/thréonine-spécifique.¹⁹⁵

Dépendamment des MAPK, l'activation du récepteur CB₁ est à l'origine de l'expression de gènes précoces tels que Zif268, BDNF (impliqués notamment dans la plasticité synaptique), c-Fos et c-Jun qui contrôlent un certain nombre de processus cellulaires (différentiation, prolifération, apoptose).^{196,197}

Dans la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7 (cancer du sein), la stimulation des MAPK induite par l'AEA a pour conséquence une diminution de l'expression des récepteurs à la prolactine et des récepteurs aux neurotrophines à activité tyrosine kinase (Trk) par le biais d'une voie qui fait intervenir la PKA, qui est à l'origine d'un effet antiprolifératif.¹⁹⁸

¹⁹³ Sánchez, C.; Galve-Roperh, I.; Rueda, D.; Guzmán, M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 834 - 843.

¹⁹⁴ Fonseca, B.M.; Correia-da-Silva, G.; Teixeira, N.A. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis*, **2013**, *18*, 1526 - 1535.

¹⁹⁵ Radin, N.S. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem. J.* **2003**, *15*, 243 - 256.

¹⁹⁶ Derkinderen, P.; Valjent, E.; Toutant, M.; Corvol, J.C.; Enslen, H.; Ledent, C.; Trzaskos, J.; Caboche, J.; Girault, J.A. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2371 - 2382.

¹⁹⁷ Patel, N.A.; Moldow, R.L.; Patel, J.A.; Wu, G.; Chang, S.L. Arachidonyl ethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* **1998**, *797*, 225 - 233.

¹⁹⁸ Melck, D.; Rueda, D.; Galve-Roperh, I.; De Petrocellis, L.; Guzmán, M.; Di Marzo, V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 235 - 240.

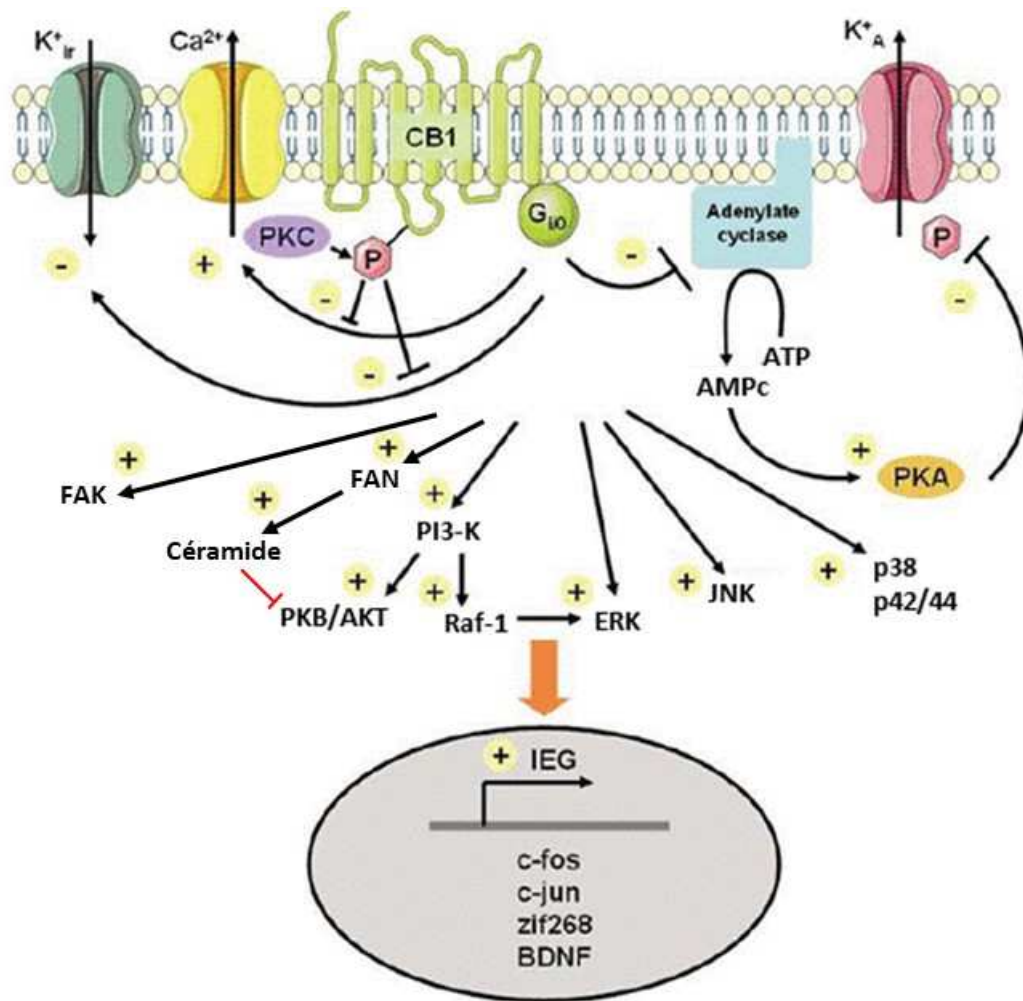


Figure 43. Principales voies de transduction associées au récepteur CB₁¹⁹⁹

b. Voies de transduction du récepteur CB₂

Le récepteur CB₂ possède des similitudes avec le récepteur CB₁ quant à ses voies de transduction. C'est particulièrement le cas au niveau de l'inhibition de l'AC. Cependant, une différence majeure entre les deux récepteurs repose sur l'absence d'interactions entre le récepteur CB₂ et les canaux ioniques.²⁰⁰

Concernant l'effet sur l'AC, il a été montré que les cannabinoïdes, en particulier l'AEA, induisent l'inhibition de l'AC de manière dose dépendante dans des cultures de cellules CHO

¹⁹⁹ Thèse du Dr. Virginie Lucas-Andrzejak, soutenue le 9 décembre 2010, 39.

²⁰⁰ Felder, C.C.; Joyce, K.E.; Briley, E.M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O.; Lai, Y.; Ma, A.L.; Mitchell, R.L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443 - 450.

transfectées par le récepteur CB₂, inhibition qui est bloquée par la toxine pertussique.²⁰¹ Contrairement au récepteur CB₁, le récepteur CB₂ est couplé uniquement à des protéines G_{i/o} et non à des protéines G_s.²⁰²

L'inhibition de l'AC induite par le récepteur CB₂, et par conséquent la diminution du taux d'AMPc, pourrait expliquer, en partie, la modulation des fonctions immunitaires exercée par les cannabinoïdes (figure 44).²⁰³ En effet, la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-2 est contrôlée par plusieurs protéines kinases (PKA et PKC) et régulatrices (AP-1, NF-AT et NF-κB) qui dépendent directement de ce taux en AMPc. Une diminution de ce taux équivaut donc à une diminution de la synthèse de ces cytokines pro-inflammatoires.

Tout comme son homologue, le récepteur CB₂ exerce aussi une action sur les MAPK. En effet, les cannabinoïdes activent la p42/44 MAPK dans des cellules CHO exprimant le récepteur CB₂, effet contrecarré par la toxine pertussique. Ils activent également l'expression de krox-24 *via* la PKC.²⁰⁴ Le WIN-55,212-2, un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes, a également été décrit comme un inhibiteur dose-dépendant de la phosphorylation de la p42/44 MAPK dans les cellules de rate de souris.²⁰⁵

Le récepteur CB₂ est aussi impliqué dans la synthèse *de novo* de céramide. Ce processus repose sur l'activation de la sérine palmitoyltransférase (SPT),¹⁸⁹ ce qui a pour conséquence l'inhibition de la voie de survie tumorale PI₃K/Akt ainsi qu'une action sur la voie des MAPK et en particulier la protéine ERK, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire.

Des études sur des cellules endothéliales pulmonaires de veau ont aussi montré une augmentation de l'efflux d'ions Ca²⁺ induit par l'AEA. Cet effet résulte de l'activation de la

²⁰¹ Slipetz, D.M.; O'Neill, G.P.; Favreau, L.; Dufresne, C.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Guay, D.; Labelle, M.; Metters, K.M. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 352 - 361.

²⁰² Calandra, B.; Portier, M.; Kerneis, A.; Delpech, M.; Carillon, C.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Shire, D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *374*, 445 - 455.

²⁰³ Kaminski, N.E. Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and altered gene expression. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1133 - 1140.

²⁰⁴ Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Marchand, J.; Canat, X.; Bourrie, B.; Rinaldi-Carmona, M.; Calandra, B.; Fur, G.; Casellas, P. Signaling pathway associated with stimulation of CB₂ peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Euro. J. Biochem.* **1996**, *237*, 704 - 711.

²⁰⁵ Kaplan, F.B.L.; Kaminski, N.E. Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/IO-stimulated mouse splenocytes. *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1503 - 1510.

phospholipase C *via* le récepteur CB₂, suivie par l'action de l'IP₃ sur la libération des ions Ca²⁺.²⁰⁶

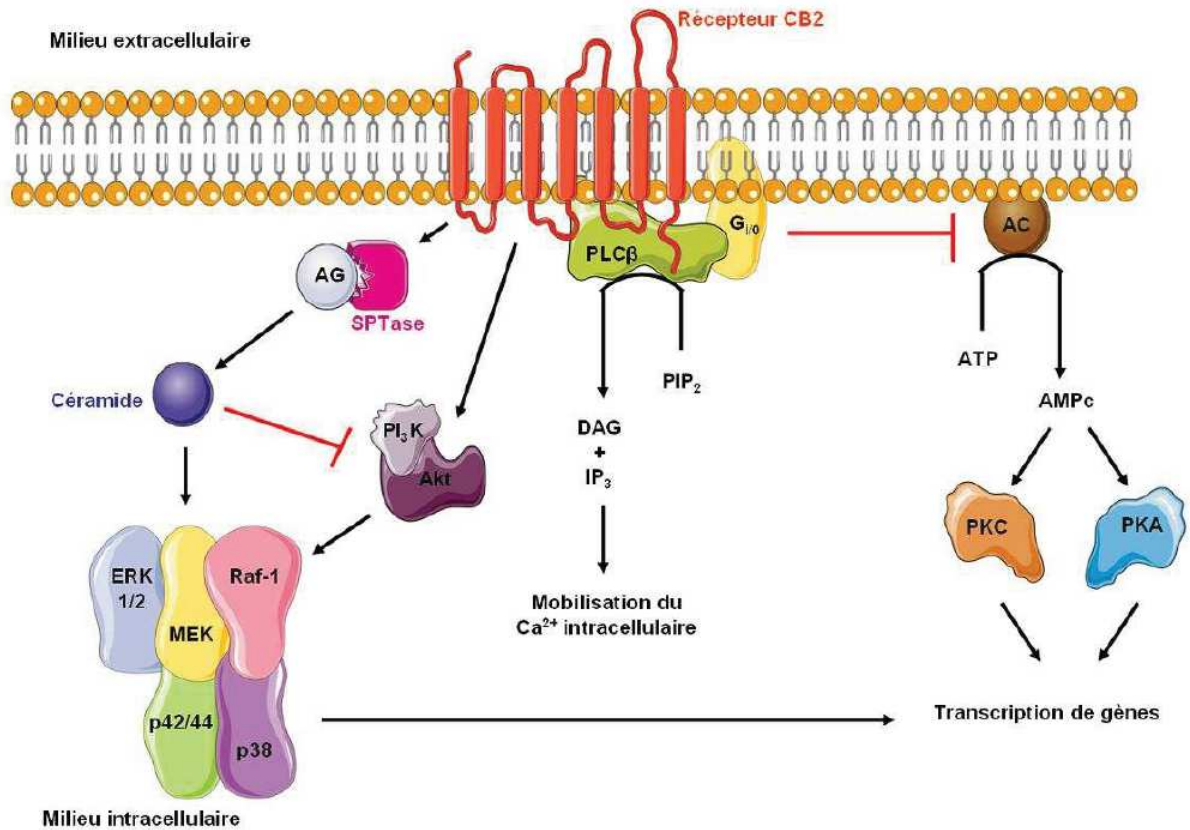


Figure 44. Voies de transduction associées au récepteur CB₂

III. Le récepteur CB₂ en tant que cible thérapeutique

Au cours de ces vingt dernières années, l'implication du système endocannabinoïde a été mise en évidence dans un grand nombre de fonctions pathologiques, que ce soit au niveau central ou au niveau périphérique. Ce système permet de maintenir l'homéostasie aussi bien dans des conditions physiologiques normales que pathologiques. Lors de certains épisodes pathologiques, l'expression des récepteurs CB₁ et CB₂, mais aussi le taux d'endocannabinoïdes, peuvent être augmentés. Outre l'effet néfaste de cette augmentation dans quelques pathologies, comme l'obésité, le système endocannabinoïde présente un rôle protecteur dans certains cancers ainsi que dans de nombreuses pathologies inflammatoires.

²⁰⁶ Zoratti, C.; Kipmen-Korgun, D.; Osibow, K.; Malli, R.; Graier, W.F. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB₂ receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 1351 - 1362.

C'est pourquoi la modulation de l'activité de ce système peut représenter une stratégie thérapeutique très prometteuse dans un large spectre de pathologies. Cependant, le récepteur CB₁, et les effets psychotropes lui étant liés, représente un frein important au développement de traitements basés sur des ligands de ce récepteur. Afin de contourner et de limiter ces effets secondaires centraux, le développement de nouveaux ligands sélectifs du récepteur CB₂ s'avère être une alternative des plus intéressantes.

1. Le récepteur CB₂ et l'inflammation

Le cannabis est connu depuis des millénaires pour traiter les différentes pathologies liées à l'inflammation.⁸⁰ La distribution du récepteur CB₂, très majoritairement au niveau des cellules du système immunitaire (central⁷⁷ et périphérique⁵⁰), ainsi que sa surexpression lors d'épisodes inflammatoires,²⁰⁷ suggèrent son implication dans le contrôle de l'inflammation. Ce contrôle se traduit par le maintien de l'homéostasie du système immunitaire, comme la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires et la prolifération, la migration et l'activation des cellules immunitaires.^{208,209}

Le récepteur CB₂ est impliqué, entre autres, dans les pathologies neurodégénératives, dans les MICI, dans l'athérosclérose ou encore dans la dermatite de contact.

a. Le récepteur CB₂ et les pathologies neurodégénératives

Le récepteur CB₂ possède un potentiel thérapeutique intéressant dans plusieurs pathologies neurodégénératives.

Des études ont montré l'implication de ce récepteur dans la maladie d'Alzheimer. Le récepteur CB₂, en plus de sa capacité à réguler la production de cytokines pro- et anti-

²⁰⁷ Mukhopadhyay, S.; Das, S.; Williams, E.A.; Moore, D.; Jones, J.D.; Zahm, D.S.; Ndengele, M.M.; Lechner, A.J.; Howlett, A.C. Lipopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB₂ cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *181*, 82 - 92.

²⁰⁸ Klegeris, A.; Bissonnette, C.J.; McGeer, P.L. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB₂ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 775 - 786.

²⁰⁹ Jordà, M.A.; Verbakel, S.E.; Valk, P.J.M.; Vankan-Berkhoudt, Y.V.; Maccarrone, M.; Finazzi-Agro, A.; Lowenberg, B.; Delwel, R. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*, **2002**, *99*, 2786 - 2793.

inflammatoires, joue un rôle dans la diminution des plaques A β , responsables de la mort neuronale et de la perte de connections synaptiques. En effet, il a été montré que l'agoniste sélectif des récepteurs CB₂, le JWH-015, induit une suppression des plaques A β par des cellules THP-1 (dérivés des macrophages) dans des tissus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et que cet effet est contrecarré par le SR144528 (agoniste inverse CB₂).²¹⁰ Ces conclusions ont été renforcées récemment par des études menées sur des souris CB₂^{-/-} montrant un développement de la pathologie, dû à la déficience en récepteurs CB₂, dans un modèle de maladie d'Alzheimer.²¹¹

Le récepteur CB₂ joue aussi un rôle important dans la sclérose en plaques (SEP). Des études menées sur des souris déficientes en récepteurs CB₁ ou CB₂ ont permis de montrer l'implication de ces deux récepteurs à différents niveaux. En effet, l'activation du récepteur CB₁ permettrait de réduire la spasticité liée à la maladie alors que le récepteur CB₂ permettrait de réduire l'inflammation *via* les cellules T et retarderait le développement de la maladie. Ces études ont aussi mis en évidence la probabilité accrue de développer la maladie chez les souris ne possédant pas de récepteur CB₂ en comparaison aux souris saines.²¹²

b. Le récepteur CB₂ et les MICI

Il a été observé, chez les patients atteints de MICI, une surexpression du système endocannabinoïde, récepteurs et endocannabinoïdes, dont le rôle est le rétablissement de l'homéostasie locale.²⁵

Tout particulièrement, des études ont permis de mettre en évidence le rôle protecteur du récepteur CB₂ dans ces maladies. En effet, plusieurs agonistes non sélectifs des récepteurs aux cannabinoïdes (CP-55,940, Δ^9 -THC et WIN-55,212-2) inhibent la production d'interleukine-8 (IL-8, une cytokine pro-inflammatoire) dans une lignée cellulaire HT-29 (cellules épithéliales du côlon). Cet effet n'a pas été retrouvé pour l'arachidonoyl-2-

²¹⁰ Benito, C.; Tolon, R.M.; Pazos, M.R.; Nunez, E.; Castillo, A.I.; Romero, J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 277 – 285.

²¹¹ Koppel, J.; Vingtdeux, V.; Marambaud, P.; d'Abramo, C.; Jimenez, H.; Stauber, M.; Friedman, R.; Davies, P. CB2 Receptor Deficiency Increases Amyloid Pathology and Alters Tau Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol. Med.* **2014**, *20*, 29 – 36.

²¹² Maresz, K.; Pryce, G.; Ponomarev, E.D.; Marsicano, G.; Croxford, J.L.; Shriver, L.P.; Ledent, C.; Cheng, X.; Carrier, E.J.; Mann, M.K.; Giovannoni, G.; Pertwee, R.G.; Yamamura, T.; Buckley, N.E.; Hillard, C.J.; Lutz, B.; Baker, D.; Dittel, B.N. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB₁ on neurons and CB₂ on autoreactive T cells. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 492 – 497.

chloroéthylamide (ACEA), un agoniste sélectif du récepteur CB₁. En revanche, la même inhibition est observée avec le JWH-015 (agoniste sélectif du récepteur CB₂), effet contrecarré par ajout de SR144528 (un antagoniste du récepteur CB₂).²¹³

Plusieurs études *in vivo* sont venues appuyer ces résultats. Différents modèles de colites induites à l'huile de moutarde ou par des agents chimiques, DSS ou TNBS, ont été utilisés pour ces études. Par exemple, il a été montré que le JWH-133 (agoniste sélectif du récepteur CB₂) diminuait l'inflammation du côlon dans le modèle de colite induite au DSS.²¹⁴ L'utilisation de souris déficientes en récepteurs CB₂ a permis de renforcer les résultats précédemment observés.³⁰

Plus récemment, il a été démontré que l'ALICB459 possédait un rôle protecteur dans un modèle murin de colite induite au TNBS. En effet, l'administration par voie orale de ce composé a résulté en la diminution du taux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β ainsi qu'une diminution des scores macroscopique et histologique de la maladie.¹⁰⁰

Ces résultats mettent en avant l'implication du récepteur CB₂ dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Son action bénéfique dans les épisodes inflammatoires liés aux MICI confirme l'intérêt des agonistes sélectifs du récepteur CB₂ en tant qu'agents thérapeutiques contre ces maladies.

c. Le récepteur CB₂ et les autres maladies inflammatoires

Le récepteur CB₂ joue aussi un rôle important dans d'autres maladies inflammatoires.

Dans l'athérosclérose, ce récepteur diminue l'inflammation vasculaire, la migration des cellules immunitaires ainsi que la formation de la plaque athérosclérotique. Ces différents

²¹³ Ihenetu, K.; Molleman, A.; Parsons, M.E.; Whelan, C.J. Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *458*, 207 - 215.

²¹⁴ Kimball, E.S.; Schneider, C.R.; Wallace, N.H.; Hornby, P.J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *291*, 364 - 371.

effets ont été démontrés dans un modèle murin d'athérosclérose suite à l'action du Δ^9 -THC et sont inhibés par l'administration du SR144528.²¹⁵

Une autre maladie inflammatoire sur laquelle le récepteur CB₂ possède un effet est la dermatite de contact. Pour cette maladie, les implications de ce récepteur ne sont pas encore clairement définies. Plusieurs études ont mis en avant un effet néfaste du système endocannabinoïde (récepteur CB₂ et 2-AG) dans cette maladie. En effet, l'administration de 2-AG dans un modèle murin de dermatite permettrait le développement de la maladie, alors que l'utilisation d'un antagoniste du récepteur CB₂ limiterait le développement des œdèmes et de l'infiltration de neutrophiles.^{216,217} Cependant, d'autres études évoquent un effet opposé à celui décrit précédemment et laissent supposer un effet bénéfique du récepteur CB₂ et du système endocannabinoïde dans cette maladie. Dans ces études, les souris traitées avec un antagoniste du récepteur CB₂ ou invalidées pour ce récepteur ont montré un développement de la maladie, contrairement aux souris traitées par l'AEA.²¹⁸ Les différences observées pourraient être dues à la quantité d'agent induisant la maladie utilisée, différente entre les études, induisant des effets physiologiques différents.

Des études récentes ont aussi montré l'implication du récepteur CB₂ dans l'inflammation oculaire aiguë. En effet, l'activation de ce récepteur par un agoniste, le HU-308, permet de réduire le relargage de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) et des facteurs de transcription (NF- κ B et AP-1), qui sont à l'origine de la transcription des gènes pro-inflammatoires.²¹⁹

²¹⁵ Steffens, S.; Veillard, N.R.; Arnaud, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Staub, C.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Frossard, J.L.; Mach, F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*, **2005**, *434*, 782 - 786.

²¹⁶ Mimura, T.; Oka, S.; Koshimoto, H.; Ueda, Y.; Watanabe, Y.; Sugiura, T. Involvement of the endogenous cannabinoid 2 ligand 2-arachidonyl glycerol in allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2012**, *159*, 149 - 156.

²¹⁷ Mimuraa, T.; Uedab, Y.; Watanabea, Y.; Sugiurac, T. The cannabinoid receptor-2 is involved in allergic inflammation. *Life Sci.* **2012**, *90*, 862 – 866.

²¹⁸ Karsak, M.; Gaffal, E.; Date, R.; Wang-Eckhardt, L.; Rehnelt, J.; Petrosino, S.; Starowicz, K.; Steuder, R.; Schlicker, E.; Cravatt, B.; Mechoulam, R.; Buettner, R.; Werner, S.; Di Marzo, V.; Tüting, T.; Zimmer, A. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*, **2007**, *316*, 1494 - 1497.

²¹⁹ Toguri, J.T.; Lehmann, C.; Laprairie, R.B.; Szczesniak, A.M.; Zhou, J.; Denovan-Wright E.M.; Kelly M.E.M. Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB2 receptor activation in endotoxin-induced uveitis. *Brit. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1448 – 1461.

2. Le récepteur CB₂ et la douleur

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel. Cinq grandes catégories de douleurs peuvent être distinguées : nociceptive, viscérale, inflammatoire, neurogène et fonctionnelle.²²⁰ Il existe aussi des douleurs psychogènes, ne possédant aucune cause somatique et qui proviennent, dans la majorité des cas, d'un retentissement psychologique.

L'utilisation du cannabis contre certaines douleurs remonte à des millénaires. Aujourd'hui, il est reconnu que les cannabinoïdes affectent la perception de la douleur au niveau périphérique, spinal et central. De nombreuses études mettent en avant le caractère anti-hyperalgésique des agonistes des récepteurs CB₂ dans plusieurs modèles expérimentaux animaux représentatifs des différents types de douleur.

La douleur viscérale provient, comme son nom l'indique, d'une distension des viscères. Peu d'études ont été menées sur ce type de douleur mais il a été montré que l'utilisation d'agonistes des récepteurs CB₁ et CB₂ permet de réduire la motilité viscérale dans un modèle d'inflammation du côlon provoquée par le TNBS.²²¹ Une seconde étude est venue corroborer ce résultat. En effet, l'agent probiotique *Lactobacillus acidophilus* induit une augmentation du taux de récepteurs CB₂ dans l'épithélium intestinal de rongeurs ainsi qu'une réduction des réponses viscéromotrices colorectales induites par instillation de butyrate. L'utilisation d'un agoniste inverse CB₂, l'AM-360, est à l'origine d'un effet inverse, indiquant clairement l'implication du récepteur CB₂.²²²

La douleur inflammatoire est associée à des lésions tissulaires et à l'inflammation qu'elles induisent. Pour ce type de douleur, les agonistes des récepteurs CB₂ se sont montrés efficaces dans différents modèles tels que l'hyperalgésie induite à la carragénine, la capsaïcine, la formaline et l'adjuvant de Freund. Entre autre, une étude a présenté une

²²⁰ Pharmacologie de la douleur, Par Pierre Beaulieu Publié par PUM, 2005, ISBN 2760619516, 9782760619517.

²²¹ Sanson, M.; Bueno, L.; Fioramonti, J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 2006, 18, 949 - 956.

²²² Rousseaux, C.; Thuru, X.; Gelot, A.; Barnich, N.; Neut, C.; Dubuquoy, L.; Dubuquoy, C.; Merour, E.; Geboes, K.; Chamillard, M.; Ouwehand, A.; Leyer, G.; Carcano, D.; Colombel, J.F.; Ardid, D.; Desreumaux, P. Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* 2007, 13, 35 - 37.

suppression de l'hyperalgésie thermique et mécanique induite par injection de carragénine au niveau de la patte postérieure de rat. Cet effet a été obtenu par administration intrapéritonéale (systémique) et intraplantaire (locale) de l'AM-1241 (agoniste CB₂), et disparaît suite à l'utilisation de SR144528.²²³ De plus, dans un modèle d'hyperalgésie induite par l'adjuvant de Freund chez le rat et la souris, une administration systémique du GW405833 (agoniste CB₂) supprime l'allodynie tactile et l'hyperalgésie mécanique de manière dose-dépendante, effet retrouvé de manière dose-dépendante avec l'A796260 (agoniste CB₂).²²⁴ Dernièrement, une équipe a montré que l'agoniste sélectif du récepteur CB₂, l'O-3223, induit une réduction de la douleur inflammatoire et neuropathique sans pour autant affecter la douleur basale ni modifier le comportement.²²⁵

La douleur neurogène est due à une lésion au niveau du système nerveux périphérique ou central. L'implication du récepteur CB₂ et l'efficacité de ses agonistes ont été mises en évidence, pour la première fois, dans un modèle de ligature d'un nerf spinal.⁸⁷ Dans cette étude, il a été montré que l'administration intrapéritonéale de l'AM-1241 (agoniste du récepteur CB₂) inhibait de manière dose-dépendante l'hypersensibilité tactile et thermique induite par la ligature de ces nerfs spinaux. Cet effet est contrecarré par l'utilisation de l'AM-630 (antagoniste du récepteur CB₂), confirmant l'implication de ce récepteur. D'autres modèles ont aussi été utilisés pour démontrer les effets bénéfiques du récepteur CB₂ dans ce type de douleur. Par exemple, une étude réalisée sur un modèle de douleur neurogène induite par ligature du nerf sciatique a pu imputer la réduction de l'hyperalgésie mécanique, chez le rat, au GW405833 (agoniste CB₂).²²⁶ L'implication du récepteur CB₂ a été prouvée par l'absence de cet effet chez des souris CB₂^{-/-}.

²²³ Nackley, A.G.; Makriyannis, A.; Hohmann, A.G. Selective activation of cannabinoid CB₂ receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience*. **2003**, *119*, 747 - 757.

²²⁴ Valenzano, K.J.; Tafesse, L.; Lee, G.; Harrison, J.E.; Boulet, J.M.; Gottshall, S.L.; Mark, L.; Pearson, M.S.; Miller, W.; Shan, S.; Rabadi, L.; Rotshteyn, Y.; Chaffer, S.M.; Turchin, P.I.; Elsemore, D.A.; Toth, M.; Koetzner, L.; Whiteside, G.T. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology*. **2005**, *48*, 658 - 672.

²²⁵ Kinsey, S.G.; Mahadevan, A.; Zhao, B.; Sun, H.; Naidu, P.S.; Razdan, R.K.; Selley, D.E.; Imad Damaj, M.; Lichtman, A.H. The CB₂ cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology*. **2011**, *60*, 244 - 251.

²²⁶ Whiteside, G.T.; Gottshall, S.L.; Boulet, J.M.; Chaffer, S.M.; Harrison, J.E.; Pearson, M.S.; Turchin, P.I.; Mark, L.; Garrison, A.E.; Valenzano, K.J. A role for cannabinoid receptors, but not endogenous opioids, in the antinociceptive activity of the CB₂-selective agonist, GW405833. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *528*, 65 - 72.

3. Les autres applications thérapeutiques du récepteur CB₂

L'implication du récepteur CB₂ a été démontrée dans d'autres pathologies, comme l'ostéoporose, les cancers ou les hépatologies chroniques.

a. Le récepteur CB₂ et l'ostéoporose

Il a été prouvé que les récepteurs CB₂ sont présents au niveau des ostéoblastes (cellules à l'origine de la formation des os) et des ostéoclastes (cellules à l'origine de la résorption des os), dont l'activité de ces derniers est augmentée chez les souris CB₂^{-/-}.²²⁷ D'après ces résultats, il semblerait que le système endocannabinoïde joue un rôle essentiel dans le maintien de la masse osseuse *via* CB₂.

Un agoniste du récepteur CB₂, le HU-308, a montré des effets différents sur les ostéoclastes et les ostéoblastes. Alors qu'il serait à l'origine d'une atténuation de la formation d'ostéoclastes, en inhibant la formation de leurs précurseurs, ce composé posséderait un effet mitogénique sur les ostéoblastes *in vitro*. Sur un modèle d'ostéoporose post-ménopause, induite par ablation des ovaires chez la souris, un traitement à base de HU-308 a diminué, de manière importante, la perte osseuse. Ce résultat a été mis en corrélation avec la baisse du taux d'ostéoclastes observée.⁸⁵

Cependant, d'autres résultats viennent contredire ces observations. Une autre équipe a, en effet, montré que l'utilisation d'un antagoniste/agoniste inverse du récepteur CB₂, l'AM-630, permet de réduire le nombre d'ostéoclastes et aurait donc un effet protecteur contre l'ostéoporose induite par ablation des ovaires chez la souris.²²⁸

Une explication à ces différentes observations serait un effet concentration-dépendant des ligands sur le récepteur CB₂. Pour cette raison, si l'implication du récepteur CB₂ dans la

²²⁷ Ofek, O.; Karsak, M.; Leclerc, N.; Fogel, M.; Frenkel, B.; Wright, K.; Tam, J.; Attar-Namdar, M.; Kram, V.; Shohami, E.; Mechoulam, R.; Zimmer, A.; Bab, I. Peripheral cannabinoid receptor CB₂ regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2006**, *103*, 696 – 701.

²²⁸ Idris, A.I.; van 't Hof, R.J.; Greig, I.R.; Ridge, S.A.; Baker, D.; Ross, R.A.; Ralston, S.H. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 774 – 779.

déperdition osseuse ne fait plus de doute, de nouvelles études doivent être menées afin de connaître les mécanismes des différents ligands du récepteur CB₂.

b. Le récepteur CB₂ et le cancer

L'implication du système endocannabinoïde dans le cancer remonte aux années 1970, quand des chercheurs se sont intéressés au pouvoir antiprolifératif du Δ^9 -THC envers des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires.²²⁹

Depuis, le rôle des cannabinoïdes a été beaucoup étudié. Leurs effets anti-cancéreux ont été démontrés *in vitro* contre le cancer du sein, de la prostate, de la peau, du pancréas, du poumon, des os et de la bouche. Les mécanismes d'action supposés sont complexes et impliqueraient une induction de l'apoptose, une action antiproliférative et une inhibition de l'angiogénèse.

Des études ont montré que dans les astrocytes (cellules saines), le Δ^9 -THC, le WIN-55,212-2 et le HU-210 (agonistes des récepteurs CB₁ et CB₂) présentent des activités anti-apoptotiques et que l'utilisation d'analogues de céramide induit l'apoptose de ces cellules.²³⁰ Au contraire, des travaux réalisés sur des cellules de gliomes ont mené à des conclusions opposées : les cannabinoïdes induiraient l'apoptose. Dans ce cas, l'effet pro-apoptotique serait dû à la modulation de la synthèse *de novo* de céramide par le récepteur CB₂.^{231,232} Il semblerait donc que les récepteurs CB₂ jouent des rôles différents selon les cellules où ils sont exprimés.

D'autres études ont été réalisées dans le cadre du cancer de la prostate. Il a d'abord été mis en évidence que les récepteurs aux cannabinoïdes étaient surexprimés au sein de cellules cancéreuses prostatiques PC-3. Dans ces mêmes cellules, le Δ^9 -THC a montré des effets

²²⁹ Munson, A.E.; Harris, L.S.; Friedman, M.A.; Dewey, W.L.; Carchman, R.A. Antineoplastic activity of cannabinoïdes. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 597 - 602.

²³⁰ Gómez Del Pulgar, T.; De Ceballos, M.L.; Guzmán, M.; Velasco, G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36527 - 36533.

²³¹ Sánchez, C.; De Ceballos, M.L.; Gomez del Pulgar, T.; Rueda, D.; Corbacho, C.; Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Huffman, J.W.; Ramón y Cajal, S.; Guzmán, M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5784 - 5789.

²³² Gómez del Pulgar, T.; Velasco, G.; Sánchez, C.; Haro, A.; Guzmán, M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 183 - 188.

différents selon la concentration. Pour une concentration de l'ordre du nanomolaire, une augmentation de la production de NGF (nervous growth actor) et une augmentation de la prolifération due à l'activation de la voie PI₃K/Akt, sont observées.²³³ Cependant, pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, l'apoptose des cellules PC-3 liée à la production de céramide, est observée.²³⁴

Enfin, des études *in vitro* ont montré que le WIN-55,212-2 inhibe la production de « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et de « vascular endothelial growth factor receptor-2 » (VEGFR-2) dans le processus d'angiogenèse. L'implication du récepteur CB₂ a bien été démontrée lors de la diminution de l'effet observé suite à l'ajout d'un antagoniste de ce même récepteur.²³⁵

c. Le récepteur CB₂ et les hépatologies chroniques

Il a été mis en évidence que le récepteur CB₂ est surexprimé dans les tissus hépatiques chez les patients souffrant d'hépatopathies.²³⁶ Des études comparant des souris saines avec des souris invalidées génétiquement pour le récepteur CB₂ ont révélé, qu'après une intoxication au tétrachlorure de carbone, les tissus hépatiques des souris CB₂^{-/-} sont significativement plus fibrosés que ceux des souris saines.²³⁷

Le récepteur CB₂ intervient dans d'autres pathologies telles l'encéphalopathie hépatique, où il possède un rôle protecteur au niveau neuronal ainsi qu'au niveau des lésions induites par ischémie-reperfusion (régulateur du taux de cytokines pro- et anti-inflammatoires).^{238,239}

²³³ Velasco, L.; Ruiz, L.; Sánchez, M.G.; Díaz-Laviada, I. Delta(9)-Tetrahydrocannabinol increases nerve growth factor production by prostate PC-3 cells. Involvement of CB1 cannabinoid receptor and Raf-1. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 531 - 535.

²³⁴ Ruiz, L.; Miguel, A.; Díaz-Laviada, I. Δ9-Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Letters.* **1999**, *458*, 400 – 404.

²³⁵ Blázquez, C.; González-Feria, L.; Álvarez, L.; Haro, A.M.; Casanova, L.; Guzmán, M. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5617 – 5623.

²³⁶ Lotersztajn, S.; Teixeira-Clerc, F.; Julien, B.; Deveaux, V.; Ichigotani, Y.; Manin, S.; Tran-Van-Nhieu, J.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A. CB₂ receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 286 - 289.

²³⁷ Julien, B.; Grenard, P.; Teixeira-Clerc, F.; Van Nhieu, J.T.; Li, L.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A.; Lotersztajn, S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB₂ in the liver. *Gastroenterology.* **2005**, *128*, 742 - 755.

²³⁸ Avraham, Y.; Israeli, E.; Gabbay, E.; Okun, A.; Zolotarev, O.; Silberman, I.; Ganzburg, V.; Dagon, Y.; Magen, I.; Vorobia, L.; Pappo, O.; Mechoulam, R.; Ilan, Y.; Berry, E.M. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *21*, 237 – 245.

²³⁹ Bátkai, S.; Osei-Hyiaman, D.; Pan, H.; El-Assal, O.; Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Hong, F.; Harvey-White, J.; Jafri, A.; Haskó, G.; Huffman, J.W.; Gao, B.; Kunos, G.; Pacher, P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1788 - 1800.

d. Implication du récepteur CB₂ dans d'autres pathologies

Des études ont récemment montré que des souris dépourvues de récepteurs CB₂ présentaient une prédisposition à l'alcoolémie. En effet, en présence d'eau et d'éthanol (situation de choix), celles-ci consomment plus d'alcool, et en de plus grandes quantités, que les souris sauvages. En outre, le sevrage de ces souris après l'administration d'une forte dose d'alcool entraîne des signes physiques ainsi qu'une nervosité plus importante en comparaison aux souris sauvages.²⁴⁰ L'implication du récepteur CB₂ a aussi été observée dans une autre étude suite à l'administration de β -caryophyllène (BCP, un agoniste du récepteur CB₂). Les effets observés ont été contrecarrés par l'administration de l'AM-630 (antagoniste).²⁴¹

Malgré l'utilisation répandue de la thérapie antirétrovirale hautement active, les troubles neurocognitifs associés au VIH restent fréquents. L'activation du récepteur CB₂ semble être un moyen prometteur pour atténuer ces troubles *via* l'inhibition de la réplication du VIH et la régulation de l'inflammation, permettant ainsi de diminuer la production de neurotoxines et, donc d'atténuer les lésions neuronales.²⁴² Une seconde étude a mis en avant un effet protecteur du Δ^9 -THC dans l'infection des macrophages par le HIV-1. En effet, l'administration de Δ^9 -THC lors de la différenciation des macrophages réduit la susceptibilité de ces cellules à être infectées par le VIH-1.²⁴³

Le récepteur CB₂ possède également un effet positif dans d'autres pathologies, telles la migraine²⁴⁴ ou la septicémie.²⁴⁵

²⁴⁰ Ortega-Alvaro, A.; Ternianov, A.; Aracil-Fernandez, A.; Navarrete, F.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Manzanares, J. Role of cannabinoid CB₂ receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict. Biol.* **2013**, *20*, 43 – 55.

²⁴¹ Al Mansouri, S.; Ojha, S.; Al Maamari, E.; Al Ameri, M.; Nurulain, S.M.; Bahi, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol. Biochem. Be.* **2014**, *124*, 260 – 268.

²⁴² Purohit, V.; Rapaka, R.S.; Rutter, J. Cannabinoid Receptor-2 and HIV-Associated Neurocognitive Disorders. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2014**, *9*, 447 – 453.

²⁴³ Williams, J.C.; Appelberg, S.; Goldberger, B.A.; Klein, T.W.; Sleasman, J.W.; Goodenow, M.M Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Treatment During Human Monocyte Differentiation Reduces Macrophage Susceptibility to HIV-1 Infection. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2014**, *9*, 369 – 379.

²⁴⁴ Greco, R.; Mangione, A.S.; Sandrini, G.; Nappi, G.; Tassorelli, C. Activation of CB₂ receptors as a potential therapeutic target for migraine: evaluation in an animal model. *J. Headache Pain*, **2014**, *15*, 14.

²⁴⁵ Sardinha, J.; Kelly, M.E.M.; Zhou, J.; Lehmann, C. Experimental Cannabinoid 2 Receptor-Mediated Immune Modulation in Sepsis. *Mediat. Inflamm.* **2014**, 2014, Article ID 978678, 7 pages.

L'ensemble des études citées dans cette dernière partie indique clairement l'importance du système endocannabinoïde, et plus particulièrement du récepteur CB₂. Ce récepteur intervient dans un large panel de pathologies, d'où l'importance des travaux à son égard ces dernières années et la volonté de développer des traitements visant ce récepteur. Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes focalisés sur les MICI, dont les traitements existants restent insuffisants, et plus particulièrement au développement de composés potentiellement agonistes du récepteur CB₂, pouvant donc présenter un effet anti-inflammatoire chez les patients souffrant de ces maladies.

IV. Le récepteur P2X₇

D'autres récepteurs possèdent une implication dans la régulation de l'inflammation liée aux MICI. C'est le cas du récepteur P2X₇, un récepteur purinergique ionotrope qui est activé par l'adénosine triphosphate (ATP, principal ligand endogène de la sous-famille P2X) pour former un canal ionique sélectif et perméable aux cations K⁺, Na⁺ et Ca²⁺.²⁴⁶ Ce récepteur a été cloné pour la première fois à partir de cerveaux de rats en 1996,²⁴⁷ et est composé de 595 acides aminés.

Le récepteur P2X₇ est exprimé dans l'ensemble de l'organisme à des concentrations différentes. Il est principalement exprimé au niveau des cellules d'origine hématopoïétique, qui incluent : les mastocytes, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, les fibroblastes, les granulocytes et les érythrocytes. Il est également présent au niveau des neurones, des cellules gliales du cerveau et des astrocytes ou encore à des niveaux plus faibles dans les cellules osseuses, les cellules épithéliales et endothéliales.²⁴⁸

L'activation de P2X₇ provoque la stimulation de plusieurs voies de transduction et notamment la libération d'interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18,²⁴⁹ qui sont impliquées dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques. Cependant, lors d'une stimulation prolongée de ce récepteur, celui-ci peut montrer un mode de

²⁴⁶ North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 1013 - 1067.

²⁴⁷ Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R.A.; Buell, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science*. **1996**, 272, 735 - 738.

²⁴⁸ Gunosewoyo, H.; Coster, M.J.; Kassiou, M. Molecular Probes for P2X₇ Receptor Studies. *Cur. Med. Chem.* **2007**, 14, 1505 - 1523.

²⁴⁹ Stagg, J.; Smyth, M.J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, **2010**, 29, 5346 - 5358.

fonctionnement tout à fait différent. En effet, une stimulation prolongée du récepteur P2X₇ entraîne la formation d'un pore membranaire non sélectif laissant entrer dans la cellule des molécules pouvant atteindre 900 Da. Ce mécanisme mène, généralement, la cellule vers un phénomène de mort par apoptose ou par nécrose, conférant à ce récepteur une activité cytolytique.²⁵⁰

Le récepteur P2X₇ ne présente qu'une faible sensibilité pour l'ATP. En effet, des concentrations de l'ordre du millimolaire sont nécessaires à l'activation de ce récepteur. Or, dans des conditions physiologiques, les concentrations extracellulaires en ATP sont de l'ordre du nanomolaire. Cependant, il a été montré que, lors de phénomènes inflammatoires, de l'ATP est libérée au niveau extracellulaire en quantités suffisantes pour activer le récepteur P2X₇.

Afin d'évaluer l'implication du récepteur P2X₇ dans l'inflammation chronique, plusieurs études ont été menées sur des souris pour lesquelles le gène du récepteur P2X₇ a été inactivé ou encore des souris traitées par des antagonistes du récepteur P2X₇, dans différents modèles d'inflammations chroniques. Les résultats de ces études ont montré que l'inhibition de l'activité de ce récepteur conduit à une amélioration de l'état des souris.²⁵¹

L'action anti-inflammatoire serait donc due à l'inactivation du récepteur, ce qui aurait comme conséquence l'inhibition de la libération de diverses cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, qui est la cause principale de l'inflammation.²⁵² Actuellement, plusieurs molécules sont en essai clinique pour le traitement de ces pathologies.

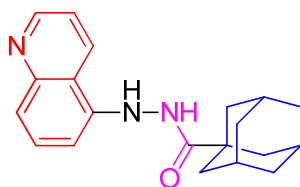
L'étude de plusieurs antagonistes du récepteur P2X₇ décrits dans la littérature a permis de déterminer trois groupements importants pour cette activité antagoniste.²⁶⁹ En effet, ces composés présentent, généralement, un hétérocycle aromatique azoté (en rouge), un accepteur de liaison hydrogène, comme une fonction amide (en violet) et un groupement

²⁵⁰ Steinberg, T.H.; Silverstein, S.C. Extracellular ATP₄ promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3118 - 3122.

²⁵¹ Guile, S.D.; Alcaraz, L.; Birkinshaw, T.N.; Bowers, K.C.; Ebdon, M.R.; Furber, M.; Stocks, M.J. Antagonists of the P2X₇ Receptor. From Lead Identification to Drug Development. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3123 - 3140.

²⁵² Lopez-Castejon, G.; Theaker, J.; Pelegrin, P.; Clifton, A.D.; Braddock, M.; Surprenant, A. P2X₇ Receptor-Mediated Release of Cathepsins from Macrophages Is a Cytokine-Independent Mechanism Potentially Involved in Joint Diseases. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 2611 - 2619.

lipophile, tel un groupement 1-adamantyle ou 3,4-diméthoxyphényle (en bleu). La figure 80 représente un antagoniste du récepteur P2X7 décrit dans la littérature (composé **XVII**).



$hP2X_7$: $Cl_{50} = 0,010 \mu M$

Figure 80. Structures chimiques du composé **XVII** (antagonistes du récepteur P2X₇ de la littérature)²⁵³

²⁵³ 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. Structure–Activity Relationship Studies on N'-Aryl Carbohydrazide P2X7 Antagonists. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3030 – 3034.

CONCEPTION

Plusieurs études, *in vitro* et *in vivo*, ont permis de montrer l'implication du système endocannabinoïde, et plus particulièrement du récepteur CB₂, dans la régulation de l'inflammation intestinale.

Dans un premier temps, il a été montré que les récepteurs aux cannabinoïdes sont surexprimés dans le côlon de souris traitées au TNBS, ainsi que dans l'intestin de patients souffrant de RCH.²⁵⁴

Dans un second temps, l'administration intrapéritonéale d'un agoniste sélectif du récepteur CB₂, le JWH-015, entraîne une diminution de la production d'interleukine 8 et de TNF- α , deux cytokines pro-inflammatoires.²¹⁰ Cet effet n'a pas été observé lors de l'administration d'un agoniste du récepteur CB₁, l'ACEA, ou chez des souris dépourvues du récepteur CB₂.

De plus, les patients atteints de MICI souffrent d'hypermotilité et d'hypersensibilité viscérale. Ces deux effets sont associés à l'inflammation intestinale et sont des manifestations cliniques des MICI. Des études ont montré que l'activation des récepteurs CB₂ permet de réduire ces effets liés à la maladie.²⁵⁵

Ainsi, ces nombreuses études mettent en évidence que le récepteur CB₂ constitue une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'inflammation liée aux MICI.

²⁵⁴ Izzo, A.A.; Camilleri, M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut*, **2008**, *5*, 1140 – 1155.

²⁵⁵ Mathison, R.; Ho, W.; Pittman, Q.J. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 1247 – 1254.

I. Travaux antérieurs

Les travaux que nous avons entrepris font suite à plusieurs séries développées antérieurement à l'ICPAL portant sur deux cibles différentes : les agonistes sélectifs du récepteur CB₂ et les inhibiteurs de la FAAH.

1. Travaux antérieurs sur les agonistes sélectifs du récepteur CB₂

Les travaux réalisés précédemment au laboratoire sur la synthèse d'agonistes sélectifs du récepteur CB₂ ont porté, entre autres, sur le développement de composés possédant un hétérocycle central de type 4-oxo-1,4-dihydroquinoléine substitué en position 3 par une fonction amide (figure 45).

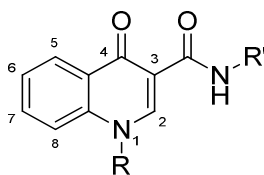


Figure 45. Structure générale des 4-oxo-1,4-dihydroquinoléines, agonistes CB₂ sélectifs, synthétisées précédemment au laboratoire

Différentes modulations ont été effectuées en positions 2, 5, 6, 7 et 8 de cet hétérocycle, ainsi que sur la fonction amide en position 3. Les principales modulations réalisées sur le bicyclic ont consisté en l'introduction d'un chlore ou d'un atome d'azote endocyclique. La fonction amide a, quant à elle, été remplacée par un rétroamide ou une cétone. Ces différentes modifications ont permis de dégager des éléments structuraux importants pour la synthèse de composés agonistes sélectifs du récepteur CB₂ à partir de ce motif.

Ainsi, deux groupements se sont révélés être importants dans la structure des agonistes CB₂ sélectifs : une chaîne aliphatique en position N1 (chaîne pentyle) et un groupement cyclique encombrant lipophile sur la fonction amide (groupement 1-adamantyle). Ces deux groupements viennent se positionner dans deux poches lipophiles du récepteur. La fonction

amide est, également, nécessaire à l'activité des composés agonistes CB₂ par sa capacité à former une liaison hydrogène avec la sérine 193 du récepteur (les composés sans groupement amide sont 200 fois moins actifs). Les interactions moléculaires de ces composés avec le récepteur CB₂ et le pharmacophore CB₂ proposé au laboratoire sont présentés dans la figure 46.

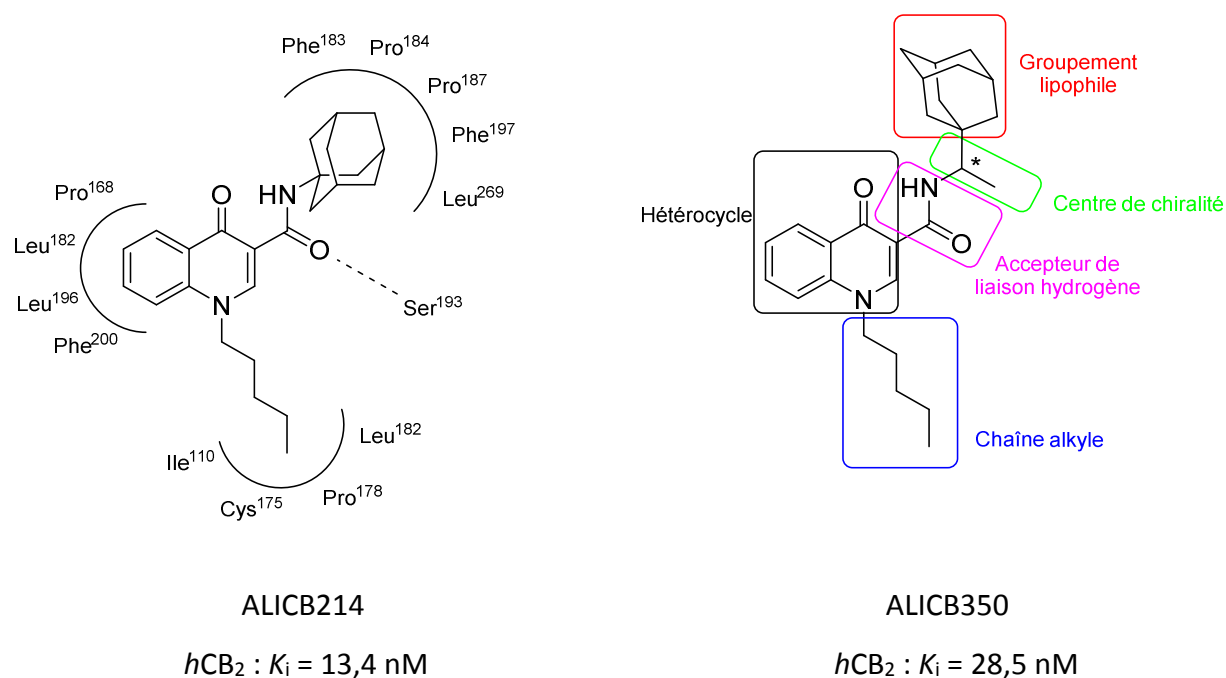


Figure 46. Interactions moléculaires des 4-oxo-1,4-dihydroquinoléines avec le récepteur CB₂ et pharmacophore CB₂ proposé au laboratoire

Ce pharmacophore peut éventuellement contenir un centre de chiralité entre la fonction présentant un accepteur de liaison hydrogène et le groupement cyclique lipophile par l'introduction d'une chaîne latérale, comme un méthyle par exemple. L'affinité de ces composés pour le récepteur CB₂ est sensiblement similaire à celle des composés ne possédant pas de centre chiral (respectivement des K_i de 28,5 et 13,4 nM, figure 44)).²⁵⁶

²⁵⁶ Stern, E.; Muccioli, G.G.; Bosier, B.; Hamtiaux, L.; Millet, R.; Poupaert, J.H.; Hénichart, J.P.; Depreux, P.; Goossens, J.F.; Lambert, D.M. Pharmacomodulations around the 4-Oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamides, a Class of Potent CB₂-Selective Cannabinoid Receptor Ligands: Consequences in Receptor Affinity and Functionality. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5471 – 5484.

2. Travaux antérieurs sur les inhibiteurs de la FAAH

Les travaux antérieurs du laboratoire portant sur la synthèse d'inhibiteurs de la FAAH se sont basés sur des modifications structurales de l'OL-135,²⁵⁷ chef de file des inhibiteurs de FAAH de la famille des α -cétohétero-cycles (figure 47).

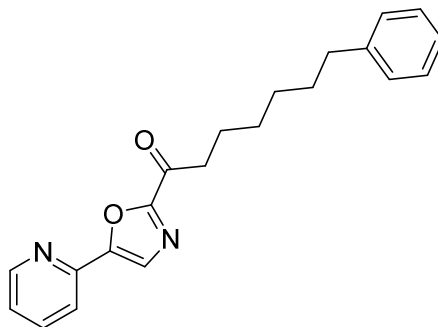


Figure 47. Structure chimique de l'OL-135

À partir de l'OL-135, une série de composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole a été développée au sein du laboratoire.

Plusieurs modulations ont été effectuées sur ce composé. Dans un premier temps, l'hétérocycle central de type oxazole a été remplacé par un nouvel hétérocycle à 5 chaînons, afin de conserver l'orientation des groupements greffés. Ainsi, des hétérocycles de type thiazole, oxadiazole, tétrazole et isoxazole ont été synthétisés. L'isoxazole a été retenu comme hétérocycle de choix pour le développement de composés inhibiteurs de la FAAH.

Deuxièmement, la fonction cétone, indispensable à l'activité du composé, a été remplacée par une fonction amide, possédant aussi un carbonyle. Les composés conservent une bonne activité inhibitrice de la FAAH. D'autres modulations ont été effectuées en remplaçant la fonction cétone par un rétroamide, un thioamide ou par une méthylamide mais l'introduction de ces fonctions a un impact négatif sur l'activité inhibitrice de la FAAH des composés.

²⁵⁷ Boger, D.L.; Miyauchi, H.; Du, W.; Hardouin, C.; Fecik, R.A.; Cheng, H.; Hwang, I.; Hedrick, M.P.; Leung, D.; Acevedo, O.; Guimarães, C.R.W.; Jorgensen, W. L.; Cravatt, B.F. Discovery of a Potent, Selective, and Efficacious Class of Reversible α -Ketoheterocycle Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Effective as Analgesics. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1849 – 1856.

A la suite de ces modulations, les groupements lipophiles ont également été modifiés. Tout d'abord, la pyridine de l'OL-135 a été remplacée par d'autres groupements aromatiques. Le groupement induisant la meilleure activité inhibitrice de la FAAH est le groupement biphenyle. Des études sur les différents isomères de position de ce groupement ont montré que la meilleure activité était obtenue pour le groupement *p*-biphenyle (composés ALIAE180, ALIAE197 et ALIAE201, figure 48).

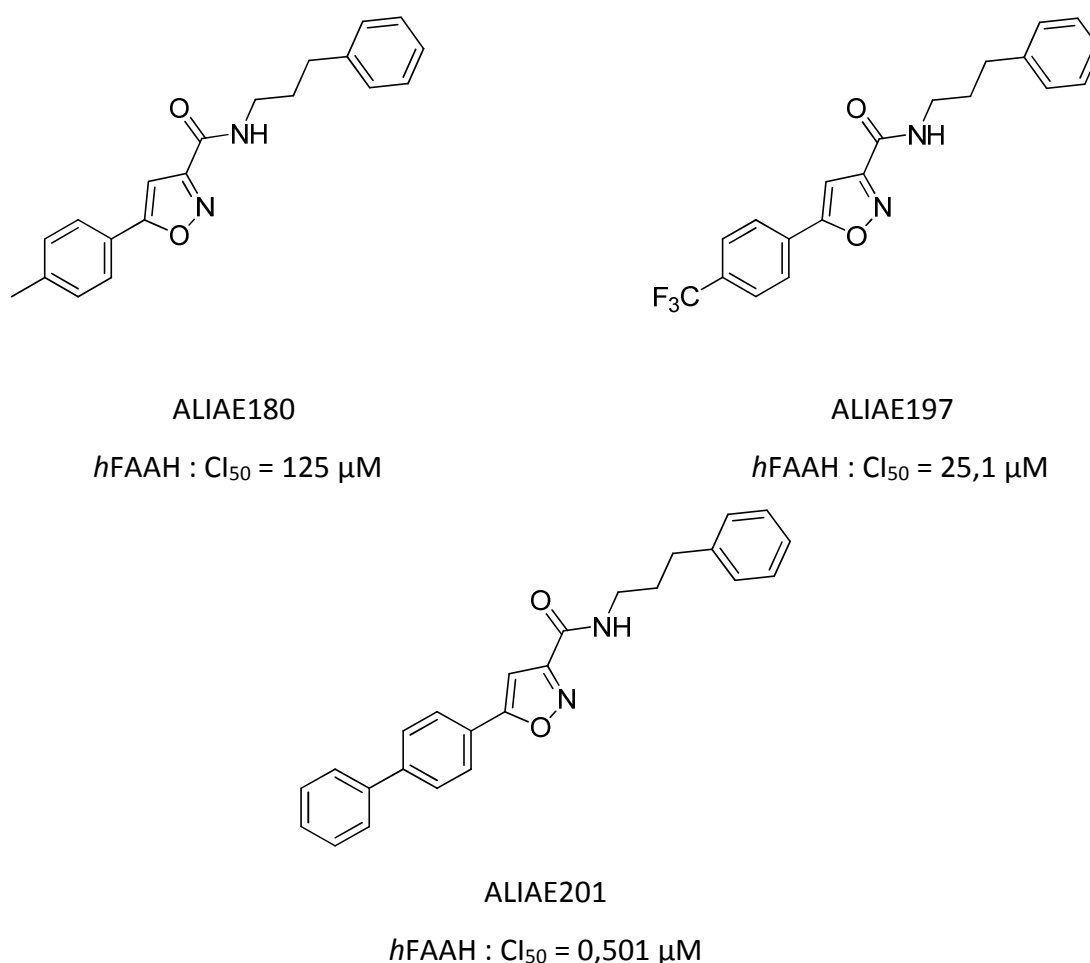


Figure 48. Structures chimiques des composés ALIAE180, ALIAE197 et ALIAE201

Enfin, le motif phénylhexyle a été remplacé par ses homologues inférieurs (1 à 3 carbones) ainsi que par un motif 3,4-méthylènedioxyphényléthyle et ses homologues inférieurs (0 à 1 carbones). Le composé montrant la meilleure inhibition de la FAAH est celui qui porte le motif 3,4-méthylènedioxyphényléthyle. Ce motif a donc été choisi pour remplacer le motif phénylhexyle de l'OL-135 (figure 49).

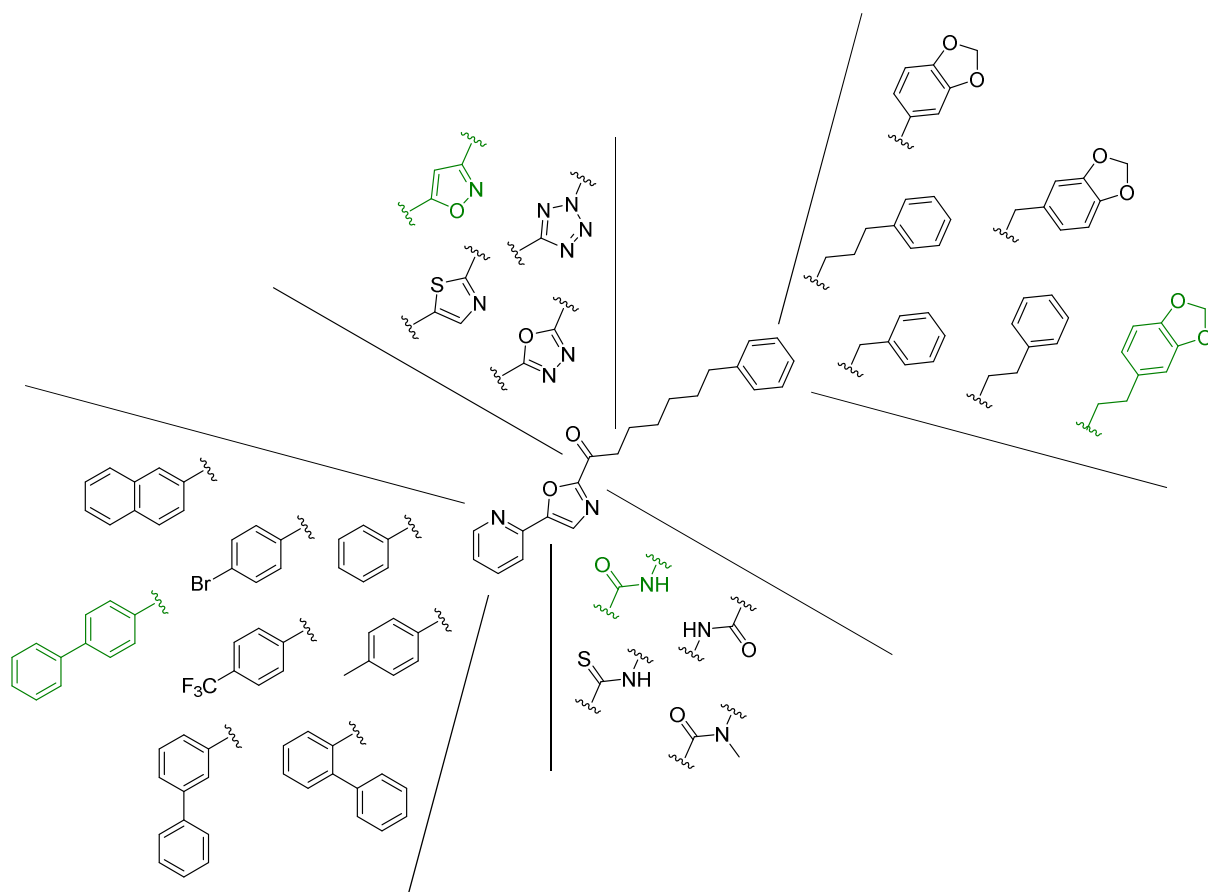
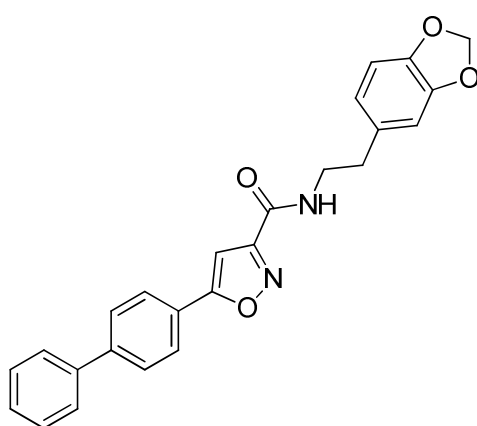


Figure 49. Modulations effectuées sur l'OL-135

Ces travaux ont abouti à la synthèse du composé ALIAE202 (figure 50) qui présente un effet anti-inflammatoire *in vivo* dans un modèle de colite induite au TNBS chez la souris.

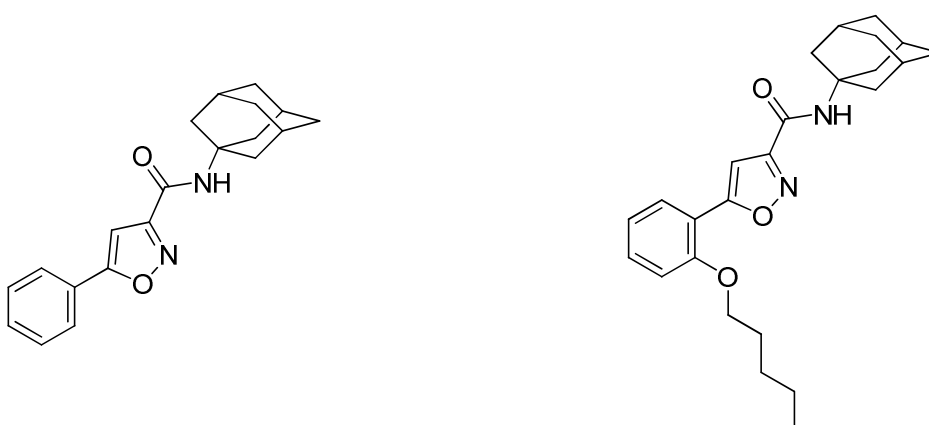


$hFAAH$: $Cl_{50} = 27$ nM

Figure 50. Structure chimique du composé ALIAE202

3. De la conception de nouveaux inhibiteurs de la FAAH à la conception d'agonistes sélectifs du récepteur CB₂

Les résultats pharmacologiques des composés 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles précédemment synthétisés au laboratoire ont mis en avant deux composés aux activités différentes : l'ALIAE206 et l'ALIAE218 (figure 51). Ce dernier diffère uniquement par la chaîne *O*-pentyle présente sur le groupement phényle. L'ALIAE206 possède une activité inhibitrice de la FAAH (CI_{50} = 459 nM) tandis que l'ALIAE218 possède une très bonne affinité pour le récepteur CB₂ (K_i = 36,0 nM).



ALIAE206

*h*FAAH : CI_{50} = 459 nM

*h*CB₂ : K_i > 3000 nM

ALIAE218

*h*FAAH : CI_{50} > 1000 nM

*h*CB₂ : K_i = 36,0 nM

Figure 51. Structures chimiques des composés ALIAE206 et ALIAE218

A partir de ces résultats, des travaux ont été effectués afin de concevoir de nouveaux composés possédant une activité mixte agoniste sélectif du récepteur CB₂ / inhibitrice de la FAAH.

Dans un premier temps, le positionnement de la chaîne *O*-pentyle sur le groupement phényle a été étudié afin de déterminer l'influence des positions *ortho*, *mé*ta et *para* sur l'activité des composés. Ensuite, l'influence de la longueur de la chaîne a été évaluée avec la synthèse d'homologues inférieurs (1 à 4 carbones) et supérieurs (6 à 8 carbones).

Dans un second temps, le groupement 1-adamantyle a été remplacé par différents groupements cycliques lipophiles de types aliphatique ou aromatique, ainsi que par des analogues du 1-adamantyle (figure 52).

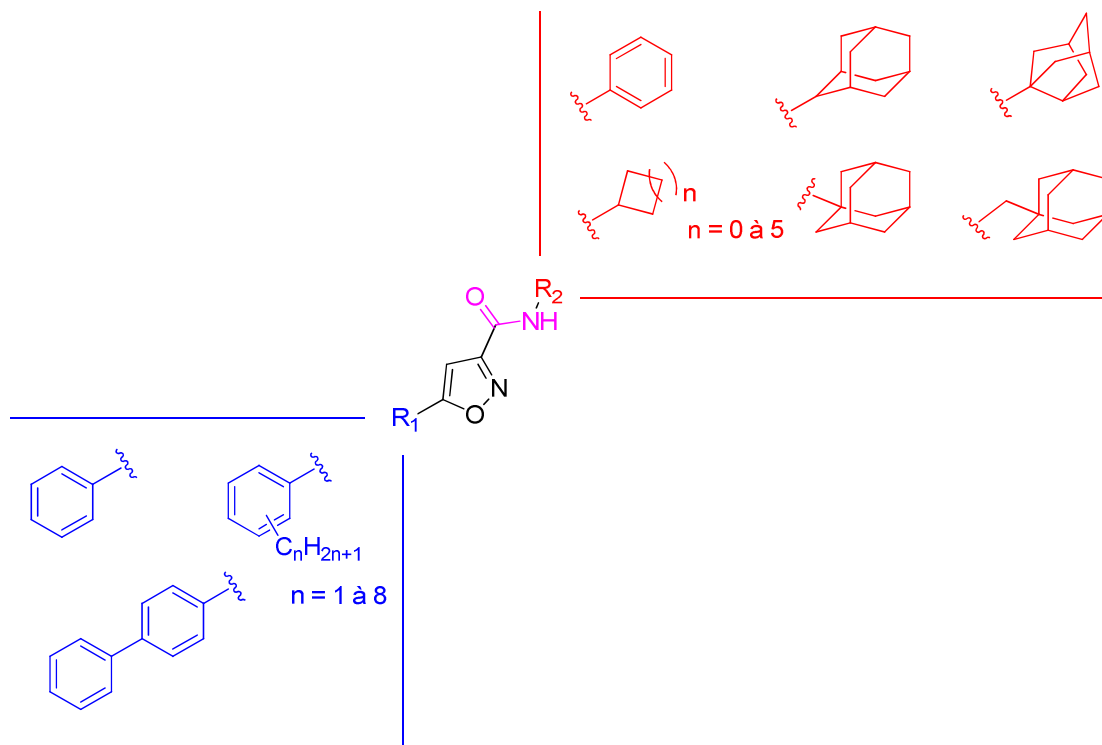
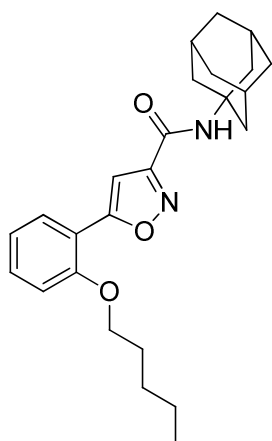


Figure 52. Structures des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles précédemment synthétisés au laboratoire

Comme pour la série des 4-oxo-1,4-dihydroquinoléines, la chaîne pentyle et le groupement 1-adamantyle se sont avérés optimaux pour l'activité agoniste CB₂ des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles.

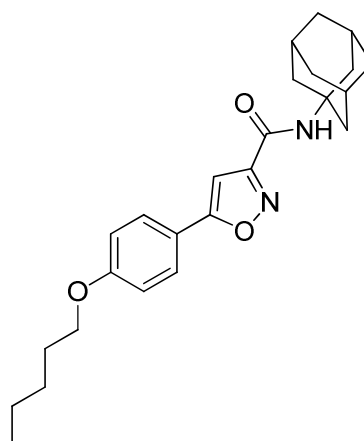
De plus, il a été observé que la position de la chaîne pentyle influençait significativement l'activité des composés. En effet, lorsque la chaîne *O*-pentyle est en position *para* sur le groupement phényle en position 5, les composés montrent une activité inhibitrice de la FAAH (composé ALIAE247, figure 53). Lorsque cette chaîne est en position *ortho*, sur le même groupement, alors les composés ont une activité agoniste sélective du récepteur CB₂ (composé ALIAE218).



ALIAE218

*h*FAAH : $Cl_{50} > 1000$ nM

*h*CB₂ : $K_i = 36,0$ nM



ALIAE247

*h*FAAH : $Cl_{50} = 8,0$ nM

*h*CB₂ : $K_i > 1000$ nM

Figure 53. Structures chimiques des composés ALIAE218 et ALIAE247

II. Conception des différentes séries

1. Série A : les 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles

Il a été montré que, dans la série des 4-oxo-1,4-dihydroquinoléines, un centre chiral pouvait être inséré entre le groupement amide porté par l'hétérocycle central et le groupement cyclique lipophile, comme par exemple l'introduction d'un méthyle.

En se basant sur ces résultats antérieurs, nous avons décidé d'insérer un centre chiral entre le groupement amide et le cycle lipophile dans la série des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles (figure 54).

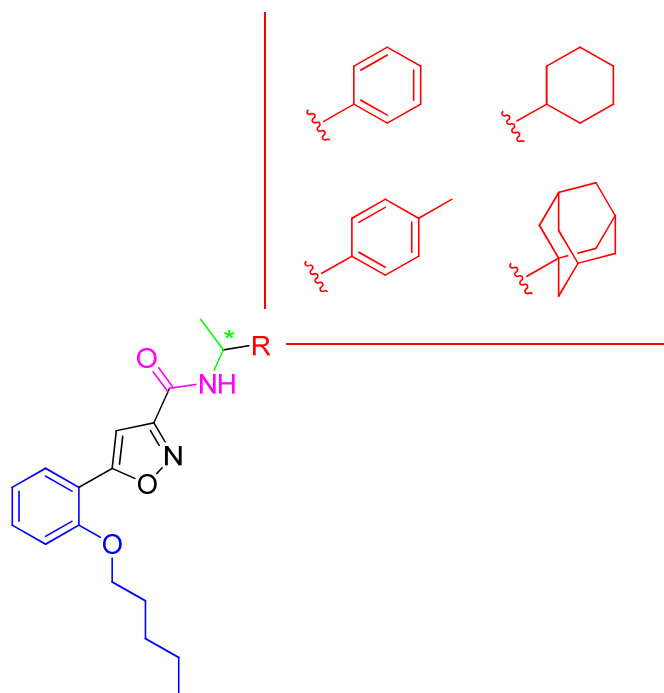


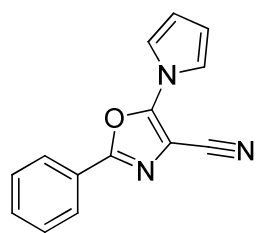
Figure 54. Structures générales des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles chiraux envisagés

Le but de cette modification a simplement été de compléter les études de RSA de la série des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles. Les différents énantiomères de ces composés ont été séparés afin de déterminer l'importance de la configuration de ce centre chiral sur l'activité de la molécule. Les mélanges racémiques ont été séparés par chromatographie en phase supercritique.

2. Série B : les *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides

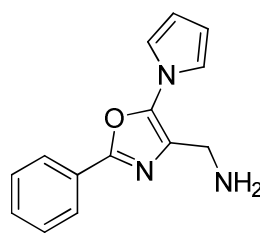
Des travaux récents ont mis en avant la synthèse de 5-amino-oxazole-4-carbonitriles en une étape.²⁵⁸ Les composés synthétisés ont été testés pour leur affinité pour le récepteur CB₂. Deux de ces composés ont montré une affinité modérée, de l'ordre du micromolaire, pour le récepteur CB₂ (composés XVIII et XIX, figure 55).

²⁵⁸ Spencer, J.; Patel, H.; Amin, J.; Callear, S.K.; Coles, S.J.; Deadman, J.J.; Furman, C.; Mansouri, R.; Chavatte, P.; Millet, R. Microwave-mediated synthesis and manipulation of a 2-substituted-5-amino-oxazole-4-carbonitrile library. *Tet. Lett.* **2012**, 53, 1656 – 1659.



composé XVIII

hCB_2 : $K_i = 14,2 \mu M$



composé XIX

hCB_2 : $K_i = 18,7 \mu M$

Figure 55. Structures chimiques des composés XVIII et XIX

Suite à ces résultats, nous avons développé la chimie autour de cet hétérocycle de type oxazole dans le but de synthétiser des composés agonistes sélectifs du récepteur CB_2 .

Les composés de cette série (figure 53) sont conçus directement autour du motif monocyclique 5-amino-oxazole-4-carbonitrile. Plusieurs similitudes peuvent être observées avec la série des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles. En effet, le cycle oxazole à cinq chaînons, conserve l'orientation des différents substituants et la fonction amine en position 5 permet l'introduction d'une fonction amide à cette position. Nous nous sommes donc appuyés sur les RSA développées pour les 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles pour le choix des substituants

Nous avons, dans un premier temps, choisi un groupement R_1 de type phényle substitué par une chaîne *O*-pentyle en *ortho*, *mé*ta ou *para*, en maintenant le groupement 1-adamantyle pour le groupement R_2 porté par la fonction amide.

Dans un second temps, la chaîne pentyle a été remplacée par son homologue inférieur (4 carbones) et supérieur (6 carbones) en positions *ortho*, *mé*ta et *para*. La chaîne *O*-alkyle a aussi été remplacée par un groupement phényle.

Enfin, le groupement 1-adamantyle a été remplacé par d'autres cycles lipophiles tels que le 3-noradamantyle, le cyclohexyle ou le méthyl-1-adamantane (R_2).

L'ensemble de ces modifications est représenté dans la figure 56.

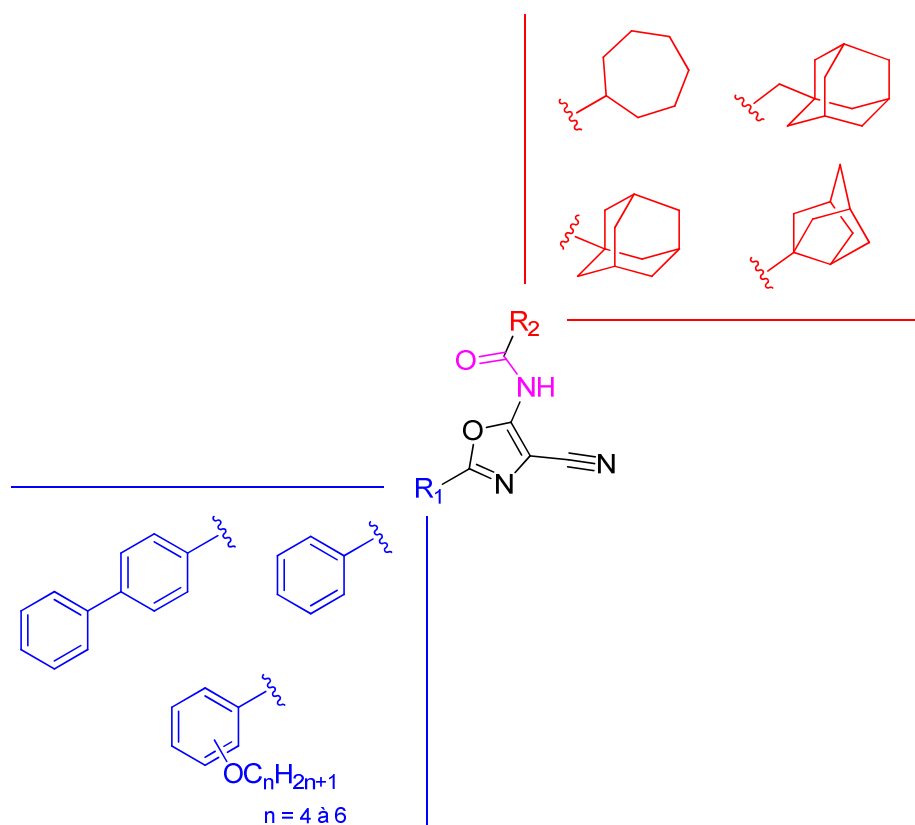


Figure 56. Structures générales des *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides envisagés

3. Série C : les pyrimido[5,4-*d*]- et pyrido[3,2-*d*]oxazoles

Le motif 5-amino-oxazole-4-carbonitrile utilisé dans la série B possède un système énamionitrile. De nombreuses publications ont mis en avant l'intérêt de ce système pour la synthèse de composés bicycliques originaux.^{259,260}

La série C décrite ici consiste en la synthèse de composés bicycliques à partir du motif 5-amino-oxazole-4-carbonitrile. Le but de cette série est de développer une nouvelle chimie autour de ces bicycles afin de concevoir et de synthétiser des agonistes sélectifs du récepteur CB₂ originaux.

De nombreux bicycles différents peuvent être synthétisés à partir du motif 5-amino-oxazole-4-carbonitrile (figure 57).

²⁵⁹ Ouklia, N.; Comessea, S.; Chafib, N.; Oulyadic, H.; Daïch, A. Unexpected reversible nitrogen atom transfer in the synthesis of polysubstituted imides and 7-aza-hexahydroindolones via enaminonitrile γ -lactams. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1459 – 1462.

²⁶⁰ Pilipecz, M.V.; Varga, T.R.; Mucsi, Z.; Scheiber, P.; Nemes, P. [3+3] Cyclization reactions of β -nitroenamines and β -enaminonitriles with α,β -unsaturated carboxylic acid chlorides. *Tetrahedron.* **2008**, 64, 5545 – 5550.

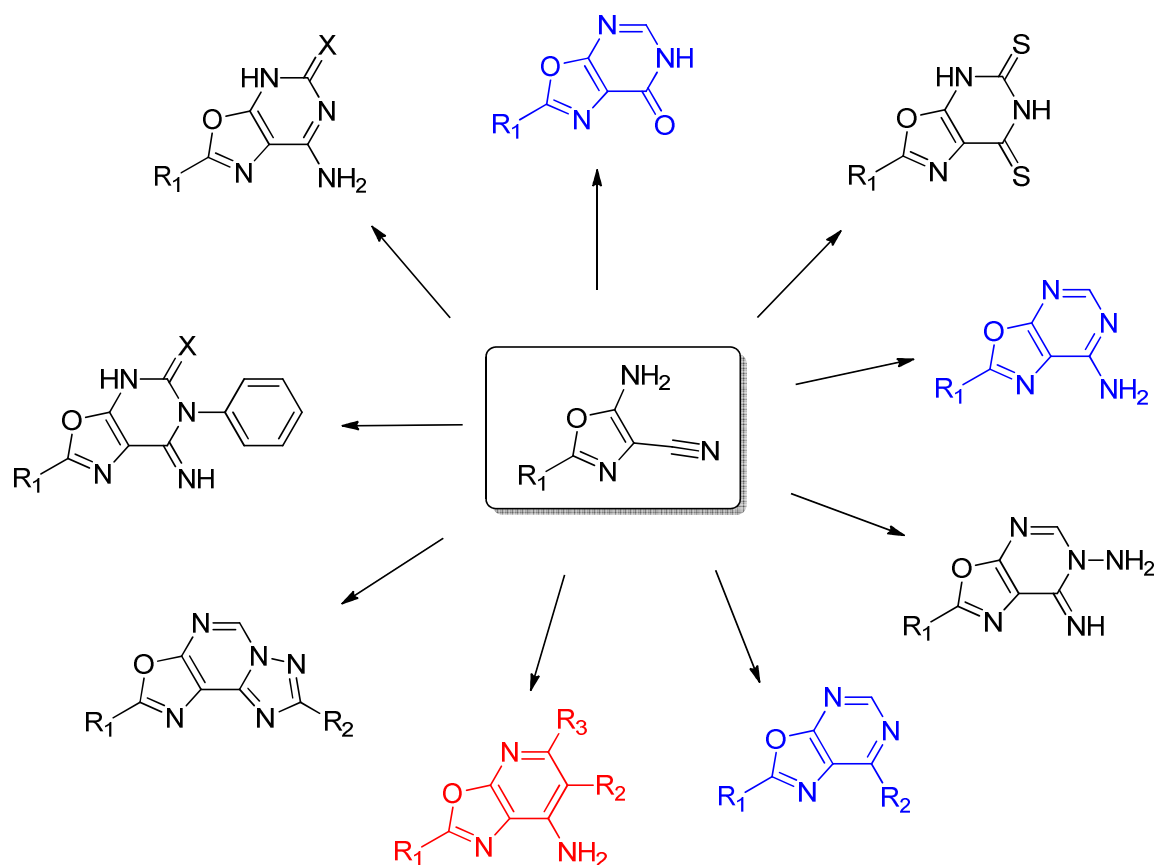
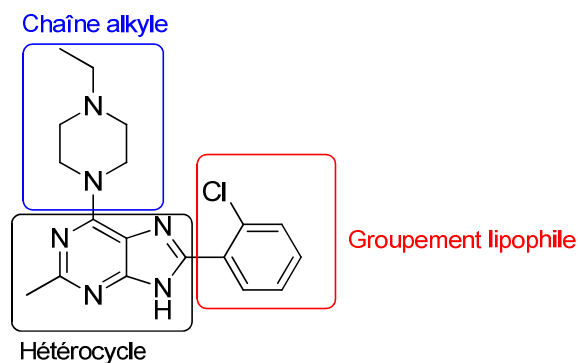


Figure 57. Exemples de bicycles pouvant être synthétisés à partir du motif 5-amino-oxazole-4-carbonitrile

Nous avons choisis de nous limiter à deux types de bicyclic, les pyrimido[5,4-*d*]- (en bleu) et les pyrido[3,2-*d*]oxazoles (en rouge).

a. Série C₁ : les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles

Récemment, de nouveaux hétérocycles ont été décrits en tant qu'agonistes CB₂, notamment des purines (composé XX, figure 58).¹⁰¹



$hCB_2 : K_i = 15,8 \text{ nM}$

Figure 58. Structure chimique du composé XX

Nous avons, dans un premier temps, remplacé l'hétérocycle de type purine par un pyrimido[5,4-*d*]oxazole. Nous avons alors envisagé différentes possibilités de modulations autour de ce bicyclic. Les structures générales des différentes molécules envisagées sont représentées dans la figure 59.

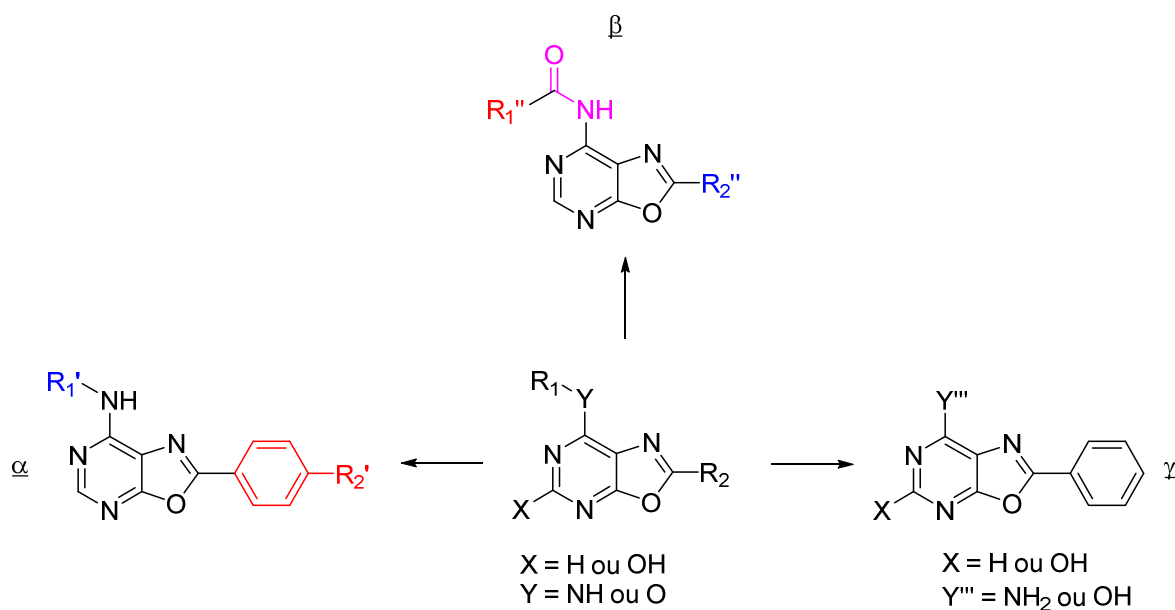


Figure 59. Structures générales des pyrimido[5,4-*d*]oxazoles envisagés

Dans un premier temps, nous avons choisi, en tant que groupement lipophile en position 2, un groupement phényle, substitué ($R_2' = \text{OC}_5\text{H}_{11}$) ou non ($R_2' = \text{H}$). Nous avons alors fait varier le groupement R_1' par différents groupements phényles substitués par des groupements hydroxyles ou méthoxyles (structure α , figure 60).

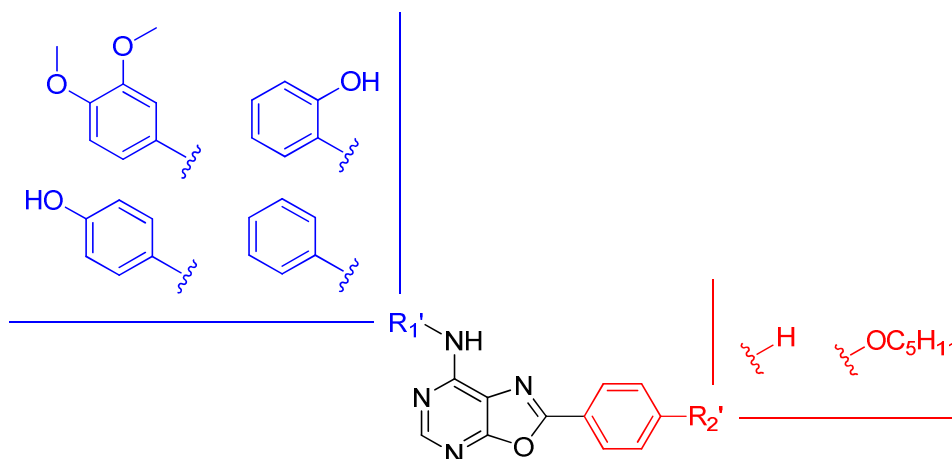


Figure 60. Structures générales des molécules de la sous-série α

Dans un second temps, nous avons introduit une fonction amide, portant un groupement cyclohexyle en tant que groupement cyclique lipophile, en position 7 du cycle pyrimido[5,4-*d*]oxazole. Nous avons conservé le groupement pentoxyphényle en position 2, qui avait montré son efficacité dans la série des 3-caroxamido-5-aryl-isoxazoles. Nous avons étudié l'influence de la position de la chaîne sur le phényle, en *ortho*, en *méta* ou en *para* (structure β , figure 61).

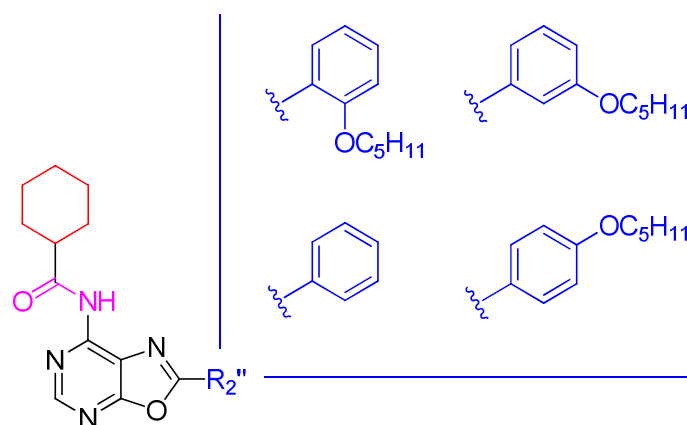


Figure 61. Structures générales des molécules de la sous-série β

En troisième intention, nous avons modulé le groupement Y en position 7 par l'introduction d'un groupement hydroxyle. De plus, l'introduction en position 5 d'un groupement hydroxyle a pu être réalisée.

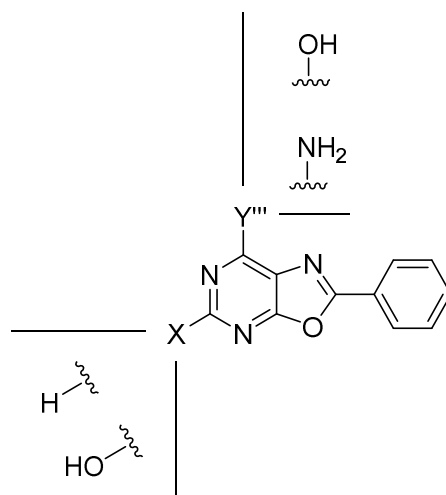


Figure 62. Structures générales des molécules de la sous-série γ

b. Série C₂ : les pyrido[3,2-*d*]oxazoles

Les travaux sur la série des pyrido[3,2-*d*]oxazoles ont eu pour but de développer la synthèse de composés bicycliques possédants différents substituants en positions 5 et 6. (figure 63). Nous avons synthétisé plusieurs composés en introduisant, en position 6, soit une fonction ester, soit une cétone et en modulant la position 5 par l'introduction d'un groupement méthyle ou hydroxyle.

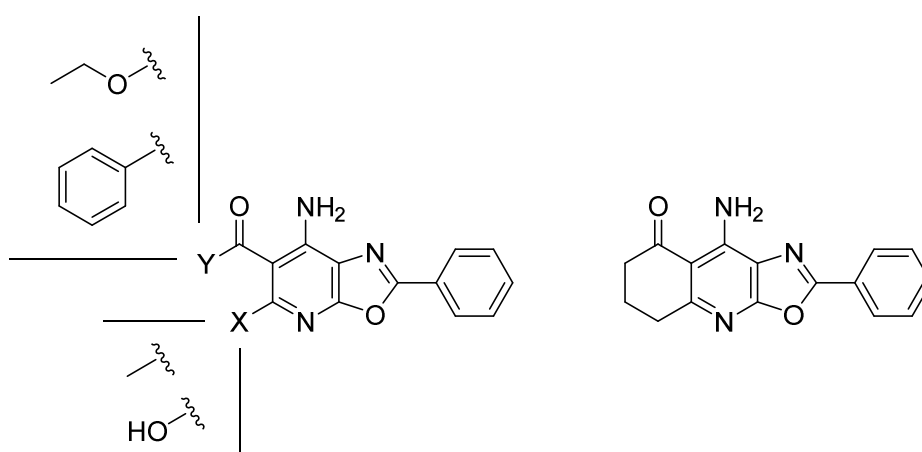


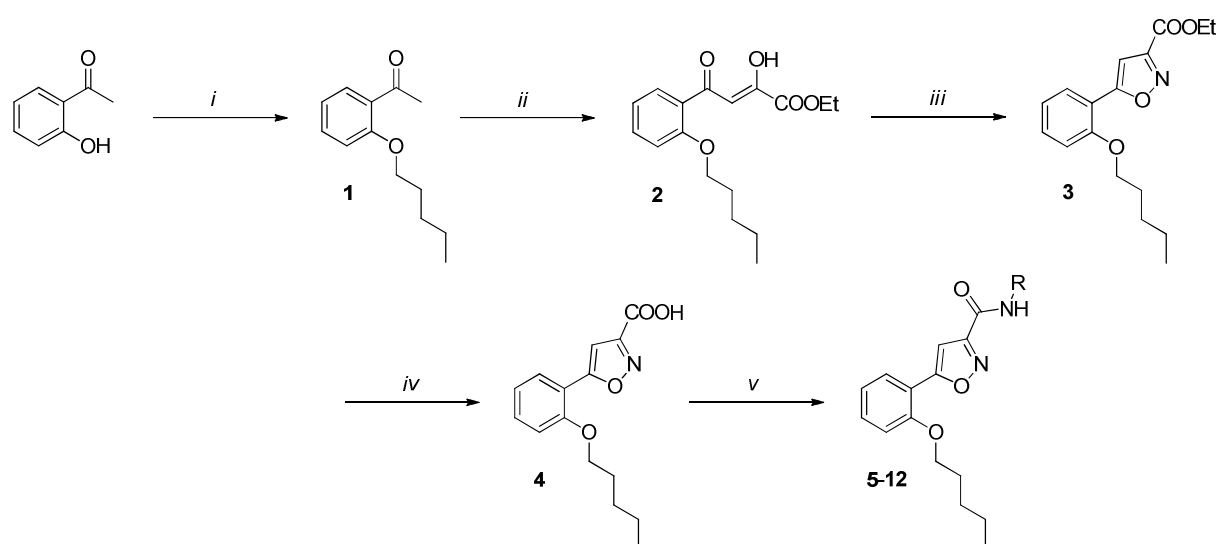
Figure 63. Structures générales des pyrido[3,2-*d*]oxazoles

STRATEGIE DE SYNTHESE

Trois séries différentes de composés ont été synthétisées. Cette partie stratégie de synthèse décrit les voies d'obtention des différents composés de ces séries : les composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole (série A), les composés de type *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amide (série B) et les composés bicycliques, de type pyrimido[5,4-*d*]- et pyrido[3,2-*d*]oxazole (série C).

I. Synthèse des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles 5-12 (série A)

Les 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles **5-12** sont obtenus en 5 étapes à partir de la 2-hydroxyacétophénone. La première étape est une réaction d'*O*-alkylation de la 2-hydroxyacétophénone commerciale. Le composé **1** obtenu intervient ensuite dans une réaction de Claisen, en présence d'oxalate de diéthyle, pour former le composé **2**. Ce dernier est alors cyclisé en isoxazole par réaction avec de l'hydroxylamine pour obtenir le composé **3**. Le groupement ester de ce composé est saponifié par une solution de soude pour donner l'acide carboxylique **4** qui est ensuite amidifié en présence des agents de couplage HOBt et HBTU pour obtenir les composés **5-12** (schéma 5).



(i) 1-bromopentane, K_2CO_3 , DMF, $90^\circ C$; (ii) 1) Na, oxalate de diéthyle, EtOH, $50^\circ C$ 2) HCl, TA ; (iii) NH_2OH , EtOH, reflux ; (iv) 1) NaOH, EtOH, TA 2) HCl, TA ; (v) R- NH_2 , HOBt, HBTU, Et_3N , $CHCl_3$, TA

Schéma 5. Synthèse des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles **5-12**

1. Réaction d'O-alkylation : synthèse du composé **1**

La 2-hydroxyacétophénone est O-alkylée par le 1-bromopentane (1,5 équivalents) en présence de K_2CO_3 (1,5 équivalents) dans le diméthylformamide (DMF) à 90°C pendant 4 heures. Le composé **1** a été obtenu avec un rendement quantitatif (schéma 6).

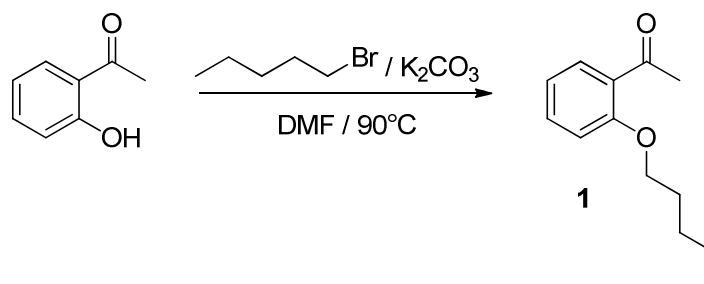


Schéma 6. Synthèse de l'éther **1**

2. Réaction de Claisen : synthèse du composé **2**

Le composé **1** précédemment obtenu a été mis en réaction avec de l'oxalate de diéthyle (2 équivalents) en présence d'éthanolate de sodium préparé *in situ* (2 équivalents). Cette réaction est réalisée à 50°C dans l'éthanol pendant 2 heures. Après réaction, le produit désiré est obtenu par acidification du milieu réactionnel par une solution de HCl (1N). Le rendement de cette réaction est de 91%.

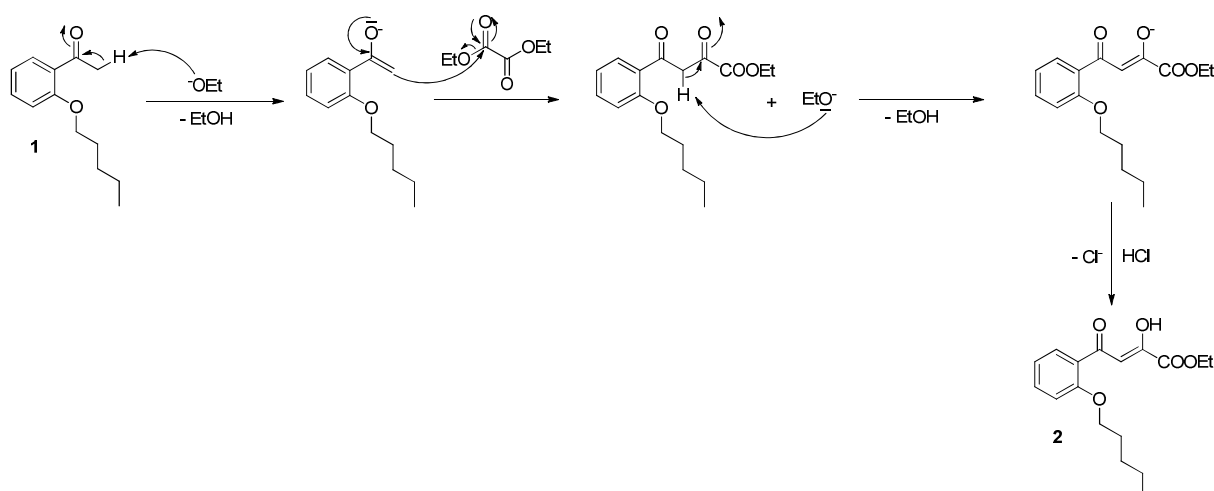


Schéma 7. Mécanisme de la réaction de Claisen

Le mécanisme de la réaction est décrit dans le schéma 7. L'éthanolate de sodium déprotone la cétone aromatique en α , générant ainsi la forme énol du composé **1**. Cet intermédiaire va alors attaquer l'un des carbones électrophiles de l'oxalate de diéthyle. L'éthanolate de sodium déprotone alors le carbone en α des deux carbonyles, générant ainsi la forme énolate qui est ensuite protonée par ajout d'acide chlorhydrique. Il est à noter que le produit pourrait exister sous deux formes : sa forme céto-énolique et sa forme α -cétoester. Cependant, le spectre RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ à 298K du composé **2** présente deux singulets à 10,68 et 7,61 ppm intégrant pour 1 proton correspondant à la forme céto-énolique. En effet, si le composé était sous sa forme α -cétoester, un seul singulet intégrant pour 2 protons correspondant à un CH_2 aurait été observé.

3. Réaction de cyclisation en isoxazole : synthèse du composé **3**

La cyclisation du composé **2** en isoxazole **3** s'effectue en présence d'hydroxylamine (1 équivalent). Cette réaction est réalisée dans l'éthanol à reflux pendant 4 heures.²⁶¹ Le rendement de cette réaction est de 85%.

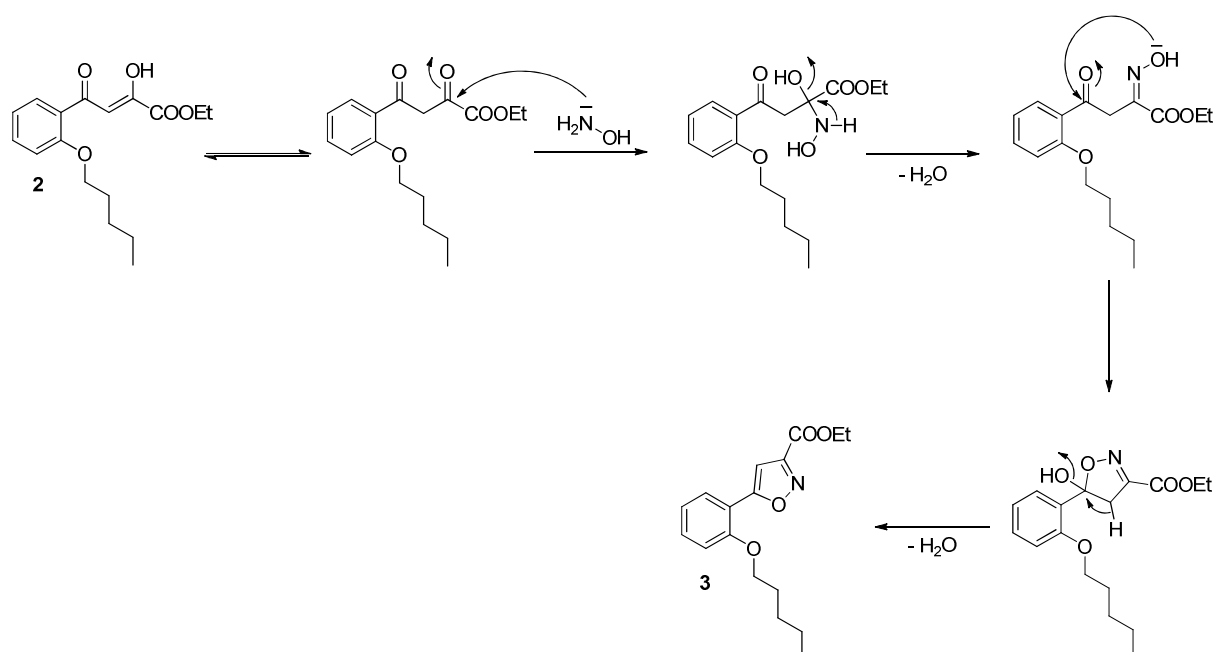


Schéma 8. Mécanisme de la réaction de cyclisation en isoxazole

²⁶¹ Zenga, L.F.; Zhanga, H.S.; Wangb, Y.H.; Sanchezc, T.; Zhengb, Y.T.; Neamatic, N.; Long, Y.Q. Efficient synthesis and utilization of phenyl-substituted heteroaromatic carboxylic acids as aryl diketo acid isosteres in the design of novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4521 – 4524.

Le mécanisme de cette réaction est décrit dans le schéma 8. Comme précisé précédemment, le composé **2** peut être présent sous deux formes tautomères. La forme active est la forme α -cétoester. La première étape de la réaction est l'attaque de l'azote de l'hydroxylamine sur le carbonyle de la cétone en α de la fonction ester (groupement attracteur) suivie d'une déshydratation aboutissant à la formation de l'oxime. Le groupement hydroxyle de cette oxime attaque ensuite le second carbonyle, formant ainsi un cycle dihydroisoxazole. La dernière étape est une déshydratation aboutissant à la formation de l'isoxazole **3**.

4. Réaction de saponification : synthèse du composé **4**

La fonction ester du composé **3** est saponifiée pour donner l'acide carboxylique **4**. Cette réaction est effectuée en présence d'un excès d'hydroxyde de sodium (8 équivalents) dans l'éthanol à température ambiante (TA) pendant 17 heures, suivi d'un traitement avec de l'acide chlorhydrique (3N) (schéma 9). Le rendement de cette réaction est de 99%.

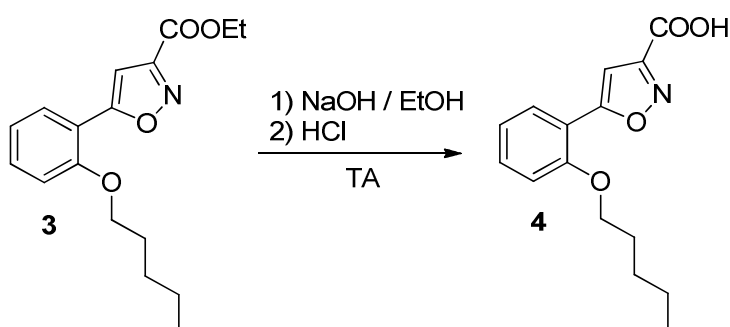


Schéma 9. Synthèse de l'acide carboxylique **4**

5. Réaction d'amidification : synthèse des composés **5-12**

L'acide carboxylique **4** a été mis en réaction, dans le cadre d'une réaction d'amidification, avec les amines chirales correspondantes (chlorhydratées ou non ; 1,2 équivalents) dans le chloroforme, en présence de triéthylamine (10 équivalents) et des agents de couplage HOBt (0,5 équivalents) et HBTU (1,5 équivalents) à température ambiante pendant 16 heures (schéma 10).

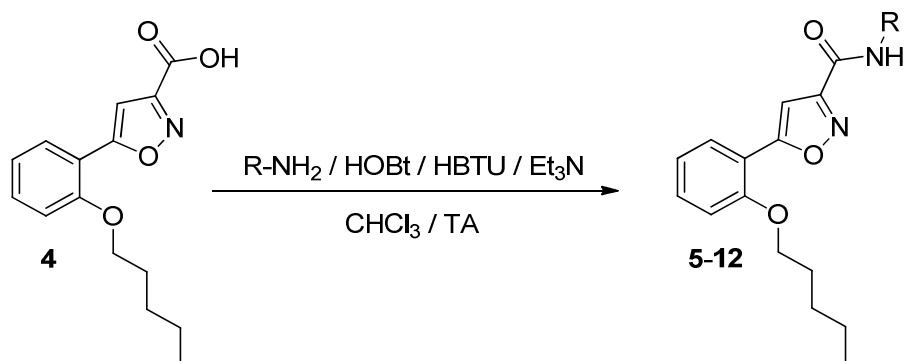


Schéma 10. Synthèse des amides **5-12**

Le mécanisme de la réaction est décrit dans le schéma 11 ci-dessous.

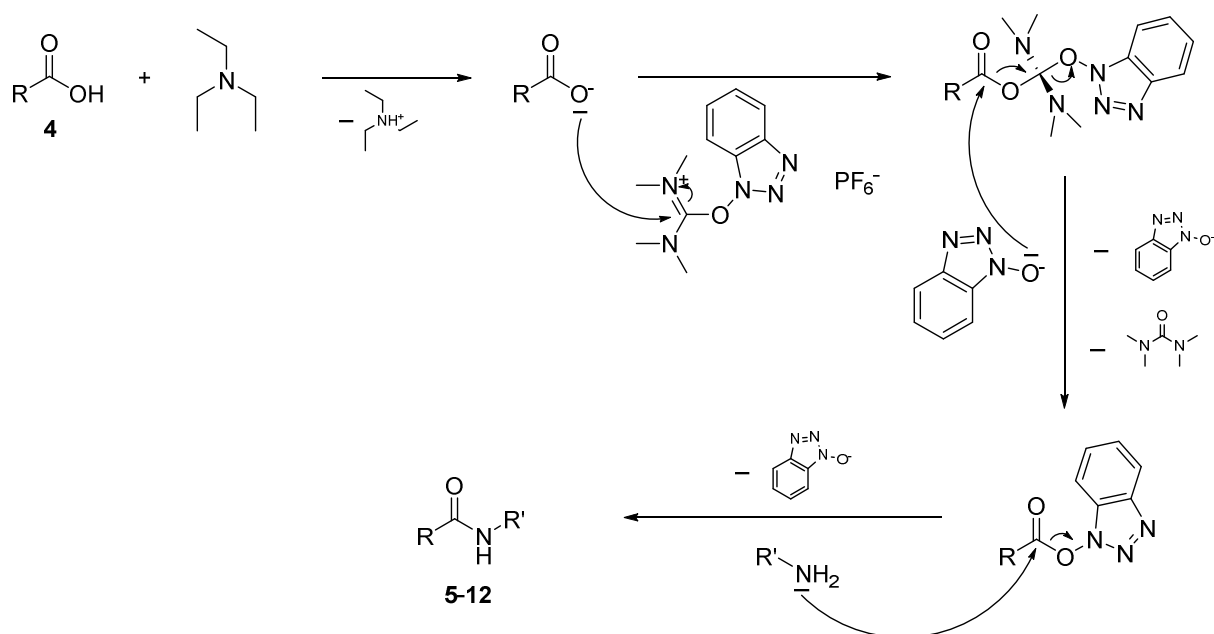


Schéma 11. Mécanisme de la réaction d'amidification en présence d'HOBT et d'HBTU

L'agent de couplage HBTU joue le rôle d'activateur de l'acide carboxylique en générant un ester activé qui réagit avec l'HOBT pour former un second ester qui est substitué par les amines correspondantes. L'HOBT sert d'activateur et est régénéré lors de cette ultime étape, d'où l'utilisation de 0,5 équivalents.

Les rendements de cette réaction sont compris entre 31 et 75% et sont regroupés dans le tableau 3 ci-dessous.

R	Composés	Rendements (%)
(±)-1-phényléthyle	5	36
(S)-(-)-1-phényléthyle	6	36
(R)-(+)-1-phényléthyle	7	35
(±)-1-(1-adamantyl)éthyle	8	31
(S)-(+)-1-cyclohexyléthyle	9	68
(R)-(-)-1-cyclohexyléthyle	10	63
(S)-(-)-1-(4-méthylphényl)éthyle	11	60
(R)-(+)-1-(4-méthylphényl)éthyle	12	75

Tableau 3. Rendements de la synthèse des composés **5-12**

II. Synthèse des *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides **33-48** (série B)

Les composés *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides sont obtenus en 2 ou 4 étapes à partir de chlorures d'acyle commerciaux ou synthétisés au laboratoire. Les chlorures d'acyle non commerciaux ont été synthétisés en trois étapes. Les hydroxybenzoates d'éthyle correspondants sont alkylés pour obtenir les esters **13-17** qui sont ensuite saponifiés pour donner les acides **18-22**. Ces acides sont finalement chlorés pour former les composés de type chlorure d'acyle. Les chlorures d'acyle sont ensuite mis en réaction avec du *p*-toluènesulfonate d'aminomalononitrile afin d'obtenir les oxazoles **23-32** par cyclisation. La dernière étape de synthèse est une réaction de couplage peptidique en présence des agents de couplage HOBt et HBTU qui permet d'obtenir les composés **33-48** (schéma 12).

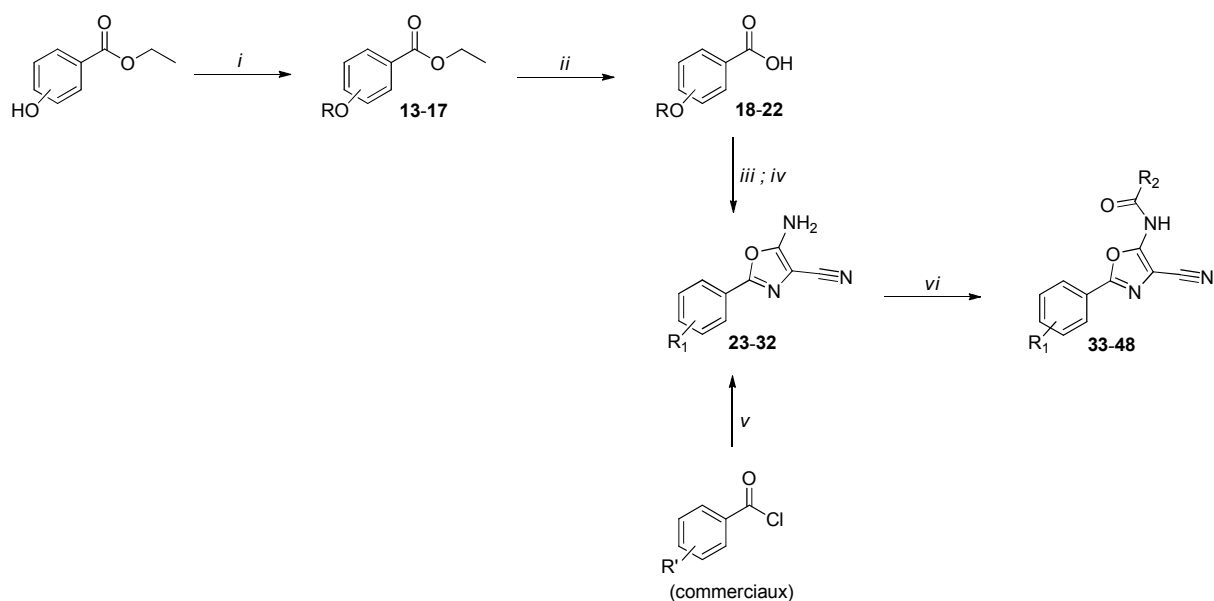


Schéma 12. Synthèse des *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides **33-48**

1. Réaction d'*O*-alkylation : synthèse des composés **13-17**

Les chlorures d'acyle non commerciaux ont été synthétisés. La première étape est une réaction d'*O*-alkylation des hydroxybenzoates d'éthyle correspondants (*ortho* et *méta*) par des 1-bromoalcanes (4 à 6 carbones ; 1,1 équivalents) dans le DMF à 90°C en présence de carbonate de potassium (1,5 équivalents) pendant 20 heures (schéma 13).

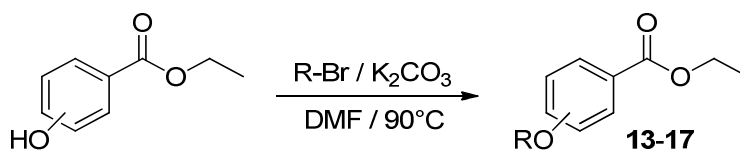


Schéma 13. Synthèse des esters **13-17**

Les rendements de cette réaction sont compris entre 94 et 99% et sont regroupés dans le tableau 4 ci-dessous.

O-R	Composés	Rendements (%)
2-pentyloxy	13	95
2-hexyloxy	14	97
3-butyloxy	15	98
3-pentyloxy	16	94
3-hexyloxy	17	99

Tableau 4. Rendements de synthèse des composés **13-17**

2. Réaction de saponification : synthèse des composés **18-22**

Le groupement ester des composés **13-17** est ensuite saponifié par traitement à la soude (10 équivalents) dans l'éthanol à température ambiante pendant 18 heures. Les sels obtenus sont ensuite traités avec de l'acide chlorhydrique (3N) pour obtenir les acides carboxyliques **18-22** (schéma 14).

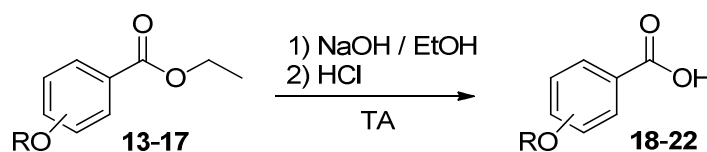


Schéma 14. Synthèse des acides carboxyliques **18-22**

Les rendements de cette réaction sont compris entre 73 et 94% et sont regroupés dans le tableau 5 ci-dessous.

O-R	Composés	Rendements (%)
2-pentyloxy	18	86
2-hexyloxy	19	92
3-butyloxy	20	94
3-pentyloxy	21	73
3-hexyloxy	22	85

Tableau 5. Rendements de synthèse des composés **18-22**

3. Réaction d'acylation : synthèse des chlorures d'acyle non commerciaux

Les chlorures d'acyle non commerciaux ont été obtenus à partir des acides **18-22**, synthétisés précédemment, par acylation par du chlorure de thionyle (6,6 équivalents) dans le dichlorométhane pendant 2 heures à température ambiante (schéma 15).

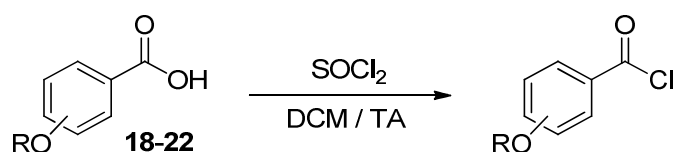


Schéma 15. Préparation des chlorures d'acyle intermédiaires

Ces produits sont sensibles à l'humidité de l'air et n'ont donc pas été isolés et caractérisés. Le solvant et l'excès de chlorure de thionyle ont été évaporés et les chlorures d'acyle obtenus ont été remis directement en réaction.

4. Cyclisation en oxazole : synthèse des composés **23-32**

a. Formation du cycle oxazole

Les oxazoles **23-32** ont été obtenus par réaction des chlorures d'acyle (1,1 équivalents), commerciaux ou synthétisés, avec du *p*-toluènesulfonate d'aminomalononitrile. Cette réaction s'effectue dans la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) à température ambiante pendant 16 heures (schéma 16).

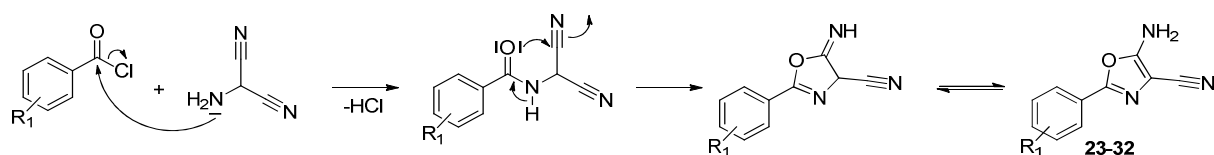


Schéma 16. Mécanisme de la synthèse des oxazoles **23-32**

La fonction amine de l'aminomalononitrile réagit d'abord avec le carbonyle du chlorure d'acyle puis le doublet libre de l'oxygène du groupement carbonyle attaque le carbone d'une

des fonctions nitriles. L'imine obtenue se tautomérise en énamine, aboutissant à la formation du cycle oxazole, plus stable.

b. Optimisation de la réaction par chauffage traditionnel

Dans un premier temps, la quantité de chlorure d'acyle a été optimisée. La réaction a été réalisée à température ambiante avec 2,2 équivalents au lieu de 1,1 équivalents. Cet excès de chlorure d'acyle permet d'améliorer nettement le rendement de la réaction de 33 à 68%.

Nous avons donc choisi de conserver cet excès de chlorure d'acyle et d'évaluer l'influence de la température sur le rendement de la réaction. Pour cela, nous avons effectué la synthèse du composé **23** à différentes températures comprises entre 0 et 110°C (0°C, TA, 40°C, 70°C et 110°C). Le tableau 6 ci-dessous regroupe les différents résultats obtenus.

Conditions opératoires	0°C	TA	40°C	70°C	110°C
1,1 équivalents	-	33	-	-	-
2,2 équivalents	57	68	77	38	6

Tableau 6. Pourcentages de composé **23** obtenu en fonction des conditions opératoires

Nous pouvons constater que le rendement de la réaction augmente avec la température. Cependant, pour des températures supérieures à 40°C, ce rendement diminue, et devient négligeable pour une température de 110°C.

La diminution de ce rendement peut s'expliquer par la formation d'un produit secondaire, le composé **49** (schéma 17), à des températures supérieures à 40°C.

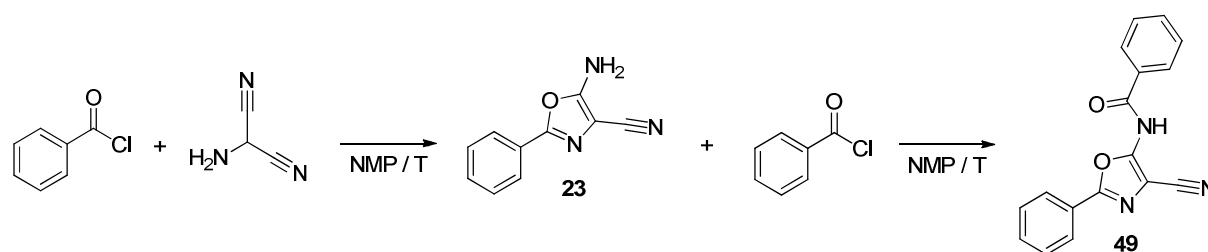


Schéma 17. Formation du produit secondaire **49**

Le composé **49** se forme par réaction de l'amine de l'oxazole **23** synthétisé sur le chlorure d'acyle.

Nous avons alors cherché à évaluer la quantité de produit secondaire **49** formé à température ambiante ainsi qu'à 110°C en présence de 1,1 ou 2,2 équivalents de chlorure d'acyle. Le tableau 7 ci-dessous regroupe les résultats obtenus en fonction des conditions opératoires.

Conditions opératoires	Composés	TA	110°C
1,1 équivalents	23	33%	43%
	49	0%	30%
2,2 équivalents	23	68%	11%
	49	< 5%	44%

Tableau 7. Pourcentages des composés **23** et **49** obtenus en fonction des conditions opératoires

Nous pouvons constater que la température a un impact plus important sur la formation du produit secondaire **49** que la quantité de chlorure d'acyle. En effet, à température ambiante, une petite quantité de produit indésirable est formée lors de l'utilisation d'un excès de chlorure d'acyle. Cependant, le chauffage du milieu réactionnel induit la formation du composé **49** en grande quantité, même lorsque le chlorure d'acyle est utilisé en proportion stœchiométrique. De plus, lorsque le chlorure d'acyle est utilisé en excès (2,2 équivalents), le composé **49** devient le produit majoritaire et on observe peu de formation du produit **23**.

Les conditions opératoires optimales pour cette synthèse par chauffage traditionnel sont un excès de chlorure d'acyle (2,2 équivalents) et une température de 40°C.

c. Optimisation de la réaction par micro-ondes

Afin d'optimiser davantage les conditions opératoires, la réaction a été effectuée par chauffage aux micro-ondes. Le composé **23** a été synthétisé à partir de *p*-toluènesulfonate d'aminomalononitrile et de chlorure de benzoyle (1,1 équivalents) dans la NMP pendant 15

minutes (puissance maximale de 150 W). Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la température sur le rendement. Le tableau 8 ci-dessous regroupe les différents résultats obtenus.

Conditions opératoires	100°C	120°C	140°C	160°C
Rendements (%)	42	63	59	49

Tableau 8. Rendements de la synthèse du composé **23** par chauffage aux micro-ondes en fonction de la température

De la même manière qu'avec le chauffage traditionnel, nous pouvons constater que le rendement de la réaction augmente avec la température. Cependant, pour des températures supérieures à 120°C, le produit secondaire **49** se forme en quantités non négligeables, entraînant une diminution du rendement du composé **23**.

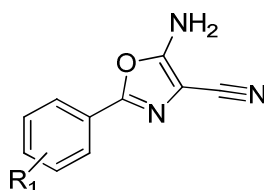
Nous avons ensuite évalué, pour une température de 120°C (température à laquelle nous obtenons le meilleur rendement), l'influence du temps de réaction. Le rendement de la réaction n'évolue quasiment pas avec le temps de réaction (63 à 68% respectivement pour 15 et 25 minutes).

Les différents résultats obtenus montrent clairement l'intérêt de l'utilisation d'un chauffage par micro-ondes dans le cadre de cette réaction : la diminution du temps de réaction, de 16 heures à 15 minutes, et la diminution de la formation du produit secondaire **49** due à la température de réaction (pas de formation du produit secondaire **49** à 120°C). En effet, nous pouvons voir que l'on obtient des rendements équivalents pour des réactions de 16 heures à température ambiante (68%) et de 15 minutes à 120°C par micro-ondes (63%).

d. Synthèse des composés **23-32**

Les composés **25-29** ont été synthétisés par chauffage traditionnel, à 40°C en présence de 2,2 équivalents de chlorure d'acyle. Les composés **23-24** et **30-32** ont été synthétisés par chauffage aux micro-ondes, à 120°C en présence de 1,1 équivalents de chlorure d'acyle.

Les rendements obtenus pour la synthèse des différents composés sont répertoriés dans le tableau 9 ci-dessous, et sont compris entre 60 et 78%.



R ₁	Composés	Rendements (%)	R ₁	Composés	Rendements (%)
H	23	68	3-pentyloxy	28	60
4-phényl	24	63	3-hexyloxy	29	72
2-pentyloxy	25	68	4-butyloxy	30	78
2-hexyloxy	26	61	4-pentyloxy	31	77
3-butyloxy	27	63	4-hexyloxy	32	66

Tableau 9. Rendements de la synthèse des composés **23-32**

5. Réaction d'amidification : synthèse des composés **33-48**

Les *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides **33-48** ont été obtenus par une réaction d'amidification dans des conditions similaires à celles de la réaction d'amidification de la série A (cf. I.4.). Les oxazoles **23-32** et les acides carboxyliques (1 équivalent) sont mis en réaction en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA ; 10 équivalents) et des agents de couplage HBTU (1,5 équivalents) et HOBt (0,5 équivalents) dans le DMF à température ambiante pendant 20 heures (schéma 18).

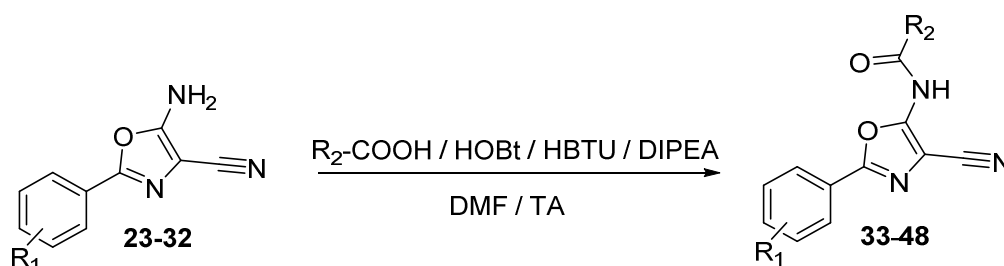


Schéma 18. Synthèse des amides **33-48**

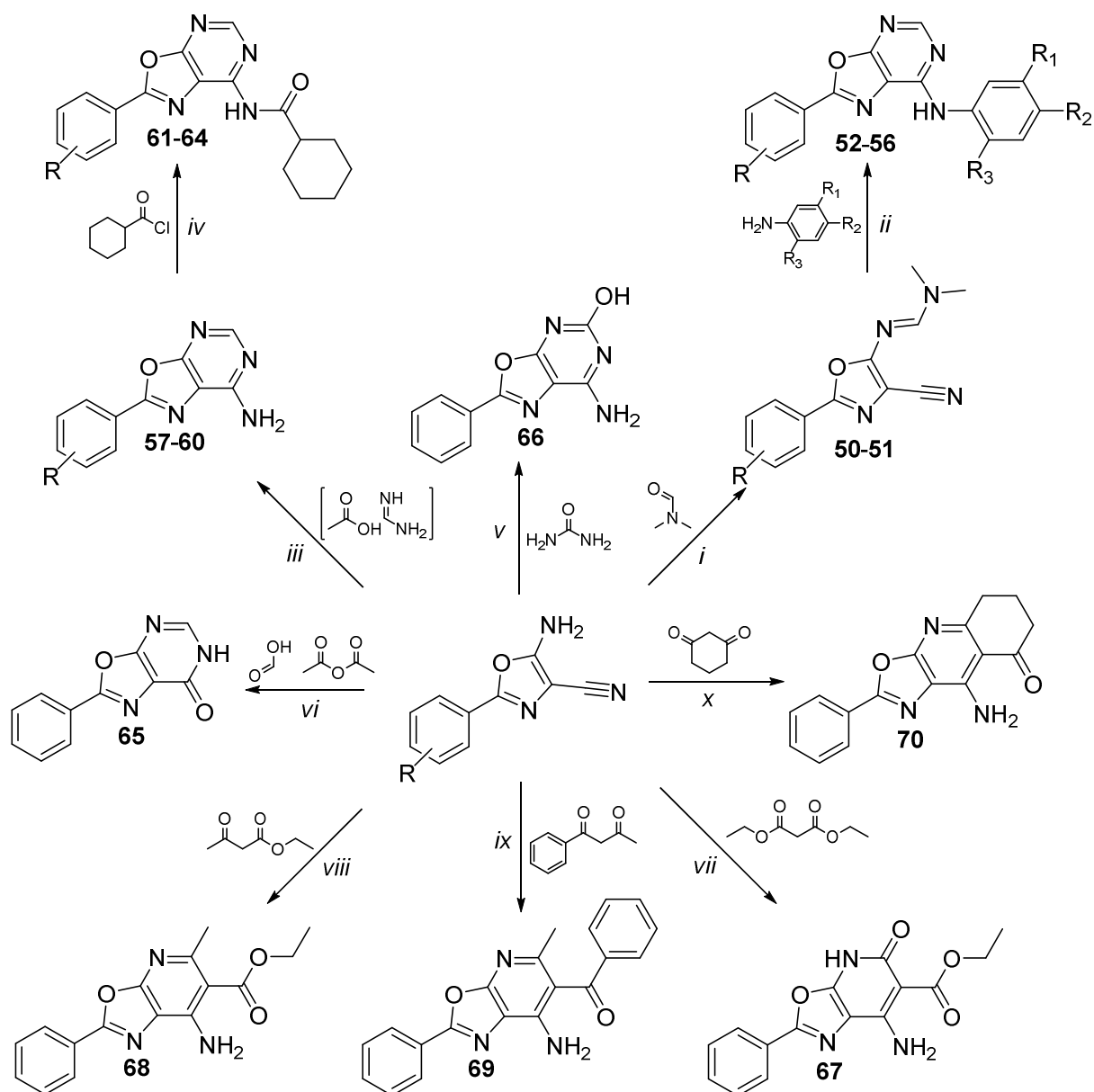
Les rendements obtenus pour la synthèse des différents composés sont répertoriés dans le tableau 10 ci-dessous, et sont compris entre 4 et 37%.

R₁	R₂	Composés	Rendements (%)
H	1-adamantane	33	31
H	3-noradamantane	34	24
4-Ph	1-adamantane	35	19
4-Ph	3-noradamantane	36	18
2-pentyloxy	1-adamantane	37	27
2-hexyloxy	1-adamantane	38	22
3-butyloxy	1-adamantane	39	21
3-pentyloxy	1-adamantane	40	19
3-hexyloxy	1-adamantane	41	35
4-butyloxy	1-adamantane	42	29
4-butyloxy	cyclohexane	43	18
4-pentyloxy	1-adamantane	44	19
4-pentyloxy	3-noradamantane	45	37
4-hexyloxy	1-adamantane	46	36
4-hexyloxy	3-noradamantane	47	17
4-pentyloxy	1-méthyladamantane	48	4

Tableau 10. Rendements de la synthèse des produits **33-48**

III. Synthèse des pyrimido[5,4-*d*]- et pyrido[3,2-*d*]oxazoles 50-70 (série C)

Les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles (série C₁) et les pyrido[3,2-*d*]oxazoles (série C₂) ont été obtenus par cyclisation en une ou deux étapes, principalement à partir de l'oxazole **23**. Le schéma 19 regroupe l'ensemble des composés synthétisés.



(i) NMP, 110°C ; (ii) AcOH, 110°C ; (iii) NMP, 100°C ; (iv) pyridine, 120°C ; (v) fusion ; (vi) 80°C ; (vii) SnCl₄, toluène, 110°C ; (viii) SnCl₄, toluène, 110°C ; (ix) SnCl₄, toluène, 110°C ; (x) SnCl₄, toluène, 110°C

Schéma 19. Synthèses des composés **50-70** (R = H ou OC₅H₁₁)

1. Série C₁ : les pyrimido[5,4-d]oxazoles **50-66**

a. Condensation avec le diméthylformamide-diméthylacétale : synthèse des composés **50-51**

La première étape de synthèse des bicycles est une réaction de condensation des composés **23** et **31** avec le diméthylformamide-diméthylacétale (DMF-DMA, 4 équivalents) dans la

NMP pendant 16 heures à 110°C afin de former les composés **50-51**.²⁶² Le mécanisme réactionnel est le suivant (schéma 20).

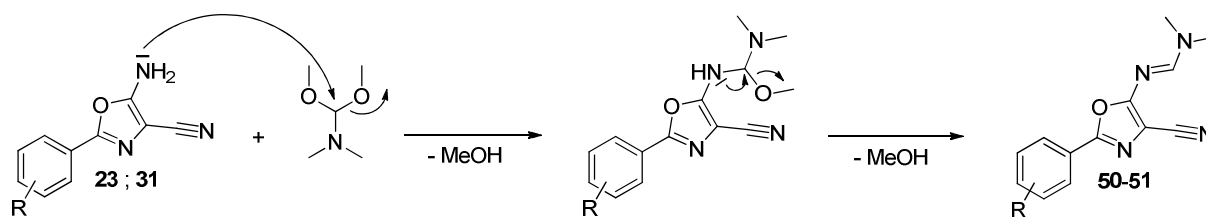


Schéma 20. Mécanisme de la synthèse des composés **50-51**

L'amine de l'oxazole substitue un des groupements méthoxyle du DMF-DMA. Le deuxième groupement méthoxyle est ensuite éliminé, formant les diméthyliminoformamides **50** et **51** désirés.

Les rendements de la réaction sont compris entre 58 et 80% et sont décrits dans le tableau 11 ci-dessous.

R	Composés	Rendements (%)
H	50	80
4-pentyloxy	51	58

Tableau 11. Rendements de la synthèse des composés **50-51**

b. Cyclisation par réarrangement de Dimroth : synthèse des composés **52-56**

La mise en réaction des amines aromatiques correspondantes (2 équivalents) avec les composés **50-51** précédemment synthétisés, dans l'acide acétique à 110°C pendant 16 heures, permet la formation des oxazolopyrimidines **52-56**.

²⁶² Albuschata, R.; Löwea, W.; Weberb, M.; Lugerb, P.; Jendrosseck, V. 4-Anilinoquinazolines with Lavendustin A subunit as inhibitors of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase: syntheses, chemical and pharmacological properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 1001 – 1011.

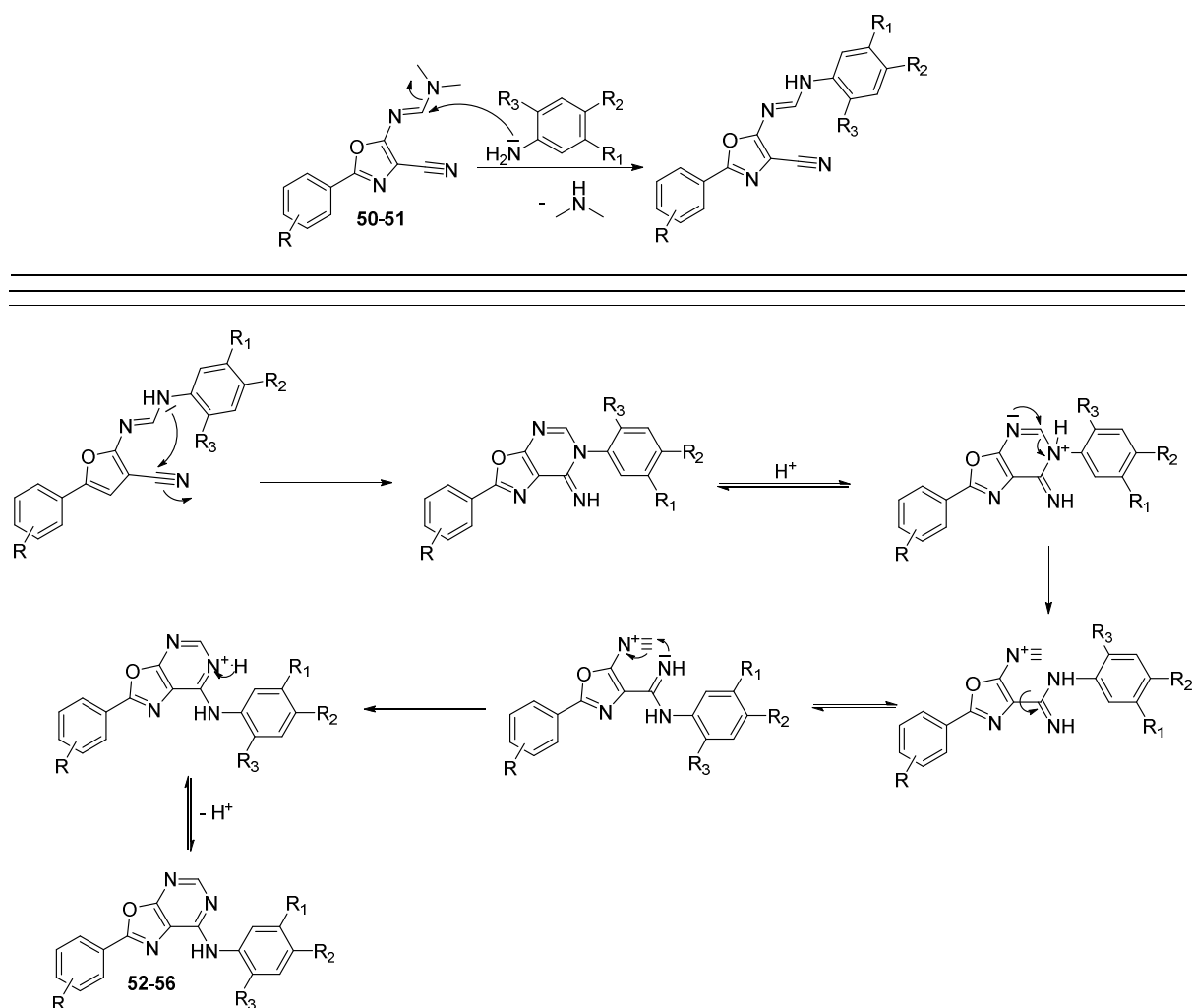


Schéma 21. Mécanisme de la cyclisation en pyrimido[5,4-*d*]oxazole

Le mécanisme réactionnel est décrit dans le schéma 21.²⁶³ La première étape de la cyclisation est une substitution du groupement partant diméthylamine par l'amine aromatique. L'amine secondaire nouvellement formée attaque ensuite le carbone de la fonction nitrile, engendrant la formation d'un composé bicyclique de type 6,7-dihydropyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazol-7-imine. La réaction étant effectuée en milieu acide (acide acétique), l'amine tertiaire endocyclique est alors protonée et le cycle formé est ouvert par délocalisation de la charge positive. Une fois le cycle ouvert, la libre rotation autour de la liaison simple C-C permet le changement d'orientation de l'amine secondaire et de l'imine. Cette imine va alors attaquer le méthylidyne ammonium pour former un nouveau cycle. Cette modification du cycle est appelée réarrangement de Dimroth. L'azote

²⁶³ Foucourt, A.; Dubouilh-Benard, C.; Chosson, E.; Corbière, C.; Buquet, C.; Iannelli, M.; Leblond, B.; Marsais, F.; Besson, T. Microwave-accelerated Dimroth rearrangement for the synthesis of 4-anilino-6-nitroquinazolines. Application to an efficient synthesis of a microtubule destabilizing agent. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 4495 – 4502.

quatenaire nouvellement formé est déprotoné pour finalement former les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles **52-56**.

Les rendements de ces réactions sont compris entre 8 et 39% et sont répertoriés dans le tableau 12 ci-dessous.

R	R ₁	R ₂	R ₃	Composés	Rendements (%)
H	H	H	H	52	39
H	OMe	OMe	H	53	36
H	H	OH	H	54	8
H	H	H	OH	55	79
4-pentyloxy	OMe	OMe	H	56	11

Tableau 12. Rendements de la synthèse des composés **52-56**

La même réaction a été tentée avec l'adamantanamine mais la formation du bicyclic de type pyrimido[5,4-*d*]oxazole n'a pas été observée. Le pK_a plus élevé de l'adamantanamine par rapport aux autres amines utilisées pourrait expliquer cette non réactivité.

En effet, si on écrit l'équilibre entre l'acide acétique et une amine (schéma 22), on obtient :



Schéma 22. Équilibre entre l'acide acétique et une amine en solution

Le tableau 13 ci-dessous regroupe les pK_a (formes acides) des différentes espèces en réaction.

Composés	pK _a (formes acides)
Acide acétique	4,76
Aniline	4,60
3,4-Diméthoxyaniline	4,66
4-Hydroxyaniline	5,48
2-Hydroxyaniline	4,78
Adamantanamine	10,79

Tableau 13. pK_a de l'acide acétique et de plusieurs amines

On peut, dans un premier temps, voir une importante différence de pK_a entre les amines aromatiques et l'adamantanamine qui possède un pK_a deux fois plus élevé.

La constante d'équilibre de la réaction de l'acide acétique avec chaque amine est donnée par la formule suivante :

$$K = \frac{K_{AH}}{K_{BH^+}}$$

Afin de faciliter les calculs, plusieurs approximations peuvent être réalisées :

- l'acide ne réagit qu'avec l'amine présente : $[BH^+] = [A^-]$
- $[B] = C_0 - [BH^+]$ où $C_0 = \frac{n_{amine}}{V_{acide\ acétique}}$
- $[AH] = 17,5 \text{ mol.l}^{-1}$ (concentration de la solution d'acide acétique glacial)

Ainsi, il est possible de déterminer le pourcentage d'amine ionisée dans le milieu réactionnel :

$$K = \frac{K_{AH}}{K_{BH^+}} = \frac{[BH^+] \times [A^-]}{[AH] \times [B]} = \frac{[BH^+]^2}{(C_0 - [BH^+]) \times 17,5}$$

D'où

$$[BH^+] = \frac{-17,5K + \sqrt{(17,5K)^2 + 70K \times C_0}}{2}$$

On obtient alors les résultats suivants (tableau 14) :

Amines	K	C ₀ (mmol.l ⁻¹)	[BH ⁺] (mmol.l ⁻¹)	[B] (mmol.l ⁻¹)	Pourcentage non ionisé
Aniline	10 ^{-0,16}	263	257,8	5,2	1,98%
3,4-Diméthoxyaniline	10 ^{-0,10}	250	245,7	4,3	1,72%
4-Hydroxyaniline	10 ^{0,72}	274	273,1	0,9	0,33%
2-Hydroxyaniline	10 ^{0,02}	170	168,4	1,6	0,94%
Adamantanamine	10 ^{6,03}	250	250,0	0	0%

Tableau 14. Fractions non ionisées en fonction des amines utilisées

L'adamantanamine n'est pas présente sous sa forme non ionisée dans le milieu réactionnel, d'où l'absence de réaction.

c. Réaction de cyclisation en oxazolopyrimidine non substituée : synthèse des composés 57-60

Le réarrangement de Dimroth, décrit précédemment ne permet d'obtenir que des composés de type pyrimido[5,4-*d*]oxazole substitués en position 7 par des groupements aromatiques. Une autre voie de synthèse peut être envisagée pour synthétiser des composés de type pyrimido[5,4-*d*]oxazole possédant un groupement amine non substitué en position 7. Cette réaction fait réagir les oxazoles **23**, **25**, **28** et **31** avec l'acétate de formamidine dans la NMP à 100°C pendant 4 heures (schéma 23).²⁶⁴

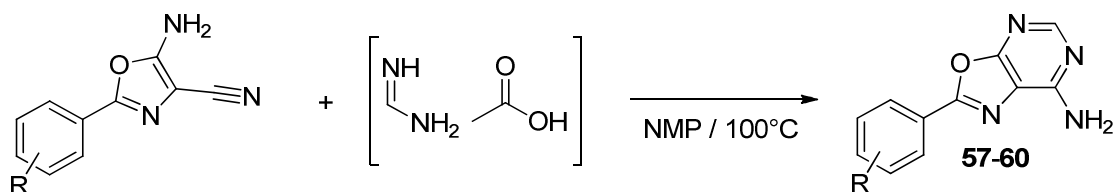


Schéma 23. Synthèse des pyrimido[5,4-*d*]oxazoles non substitués **57-60**

²⁶⁴ Barchéath, S.D.; Tawatao, R.I.; Corr, M.; Carson, D.A; Cottam, H.B. Inhibitors of Apoptosis in Lymphocytes: Synthesis and Biological Evaluation of Compounds Related to Pifithrin- α . *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409 – 6422.

Cette réaction suit le mécanisme proposé suivant (schéma 24) :

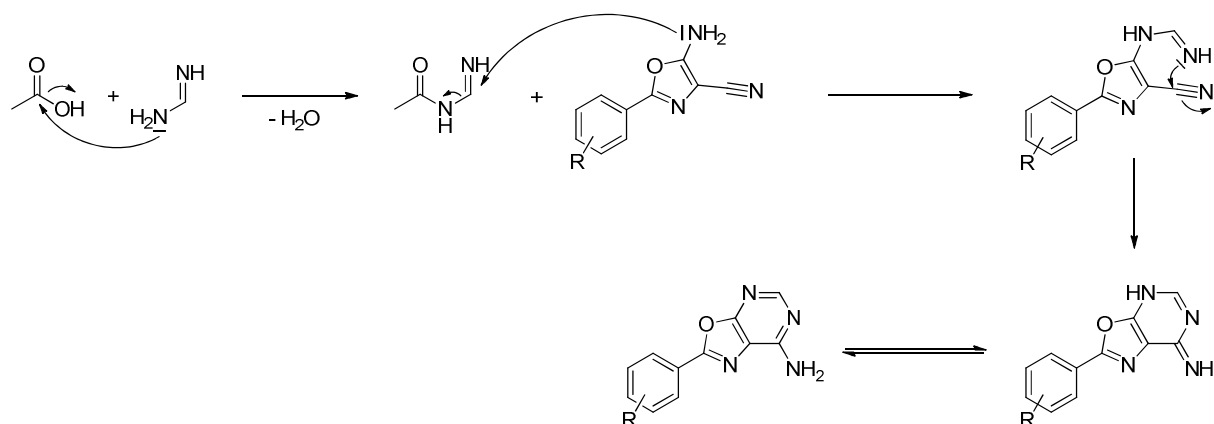


Schéma 24. Mécanisme de la formation des composés **57-60**

Initialement, cette réaction est effectuée dans le DMF à 100°C. Dans ces conditions, la formation d'un produit secondaire est observée. Ce produit secondaire **50** est issu de la condensation entre l'oxazole et le DMF (24%, figure 64).

Pour éviter cette réaction secondaire, le DMF a été remplacé par la NMP. À 100°C, aucun produit secondaire n'est observé. Cependant, l'augmentation de la température à 110°C entraîne la formation d'un produit secondaire résultant, lui-aussi, de la réaction entre le substrat et le solvant (composé **71**, 10%, figure 64).

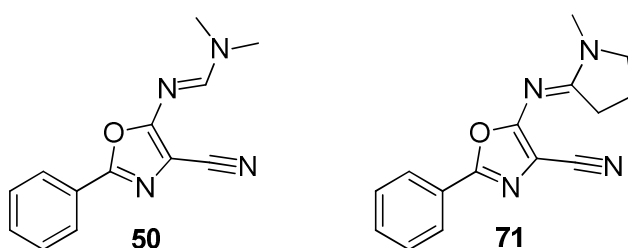


Figure 64. Structures chimiques des produits secondaires **50** et **71**

Pour éviter la formation de ces composés secondaires, la réaction est réalisée dans la NMP à 100°C. Les rendements de cette réaction sont compris entre 35 et 92% et sont référencés dans le tableau 15 ci-dessous.

R	Composés	Rendements (%)
H	57	75
2-pentyloxy	58	35
3-pentyloxy	59	92
4-pentyloxy	60	37

Tableau 15. Rendements de la synthèse des composés **57-60**

d. Réaction d'amidification : synthèse des composés **61-64**

i. Synthèse des composés **61-64**

Les amides **61-64** ont été synthétisés à partir des pyrimido[5,4-*d*]oxazoles **57-60** en présence de chlorure de cyclohexanecarbonyl (1,1 équivalents) dans la pyridine à 120°C pendant 24 heures (schéma 25).

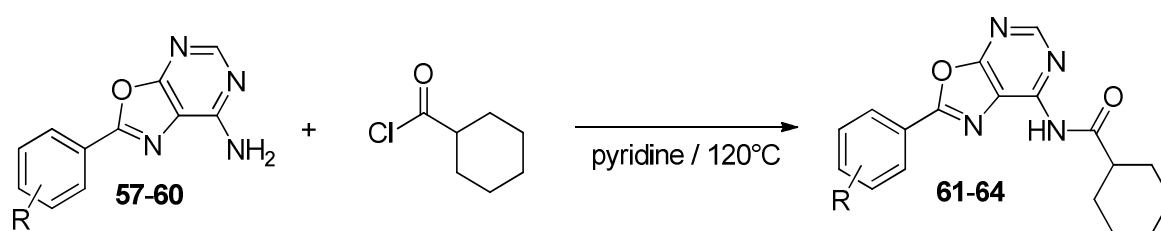


Schéma 25. Synthèse des amides **61-64**

Les rendements de cette réaction d'acylation sont compris entre 17 et 64% et sont répertoriés dans le tableau 16 ci-dessous.

R	Composés	Rendements (%)
H	61	64
2-pentyloxy	62	17
3-pentyloxy	63	24
4-pentyloxy	64	44

Tableau 16. Rendements de la synthèse des composés **61-64**

ii. Différents essais pour obtenir le composé **72**

Nous avons voulu réaliser la synthèse d'un amide portant un groupement 1-adamantyle en tant que groupement R' (composé **72**). Dans un premier temps, le composé **57** a été mis en réaction avec du chlorure d'adamantanecarbonyle (1,1 équivalents) dans la pyridine à température ambiante pendant 24 heures (schéma 26).

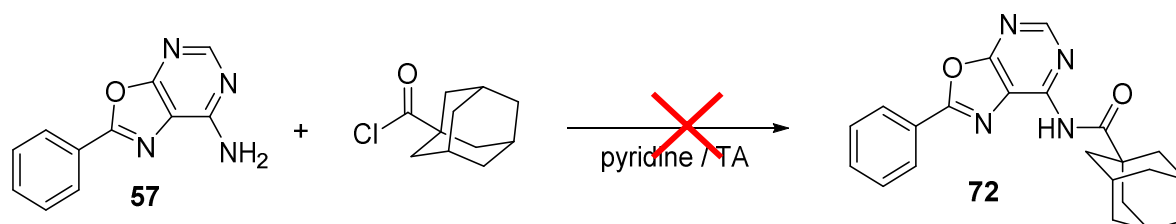


Schéma 26. Première voie de synthèse du produit **72** par utilisation d'un chlorure d'acyle dans la pyridine

L'acylation ne se produisant pas, le temps de réaction a été augmenté à 96 heures et la température à 40°C sans que le composé **72** ne se forme.

La pyridine a alors été remplacée par du tétrahydrofurane (THF) en présence de triéthylamine (1,5 équivalents) à température ambiante pendant 24 heures (schéma 27). La formation du composé **72** n'a toutefois toujours pas été observée.

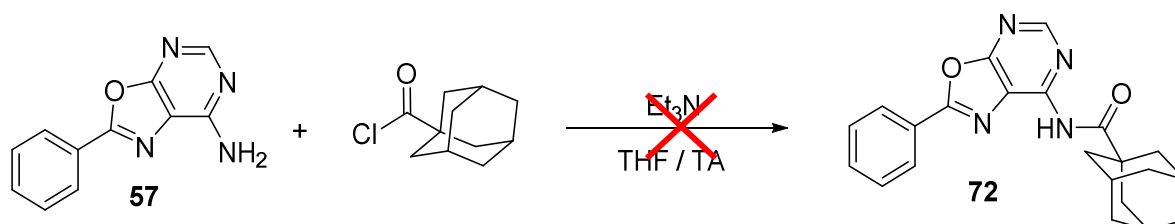


Schéma 27. Deuxième voie de synthèse du produit **72** par utilisation d'un chlorure d'acyle dans le THF

Nous avons alors essayé de synthétiser le composé **72** par une réaction de couplage de type peptidique. Le composé **57** a été mis en réaction avec l'acide 1-adamantanecarboxylique (0,9 équivalents) en présence de triéthylamine (9,1 équivalents) et des agents de couplage

HOBt (0,5 équivalents) et HBTU (1,4 équivalents) dans le chloroforme à température ambiante pendant 24 heures (schéma 28). Comme pour les essais précédents, la formation du composé **72** n'a pas été observée.

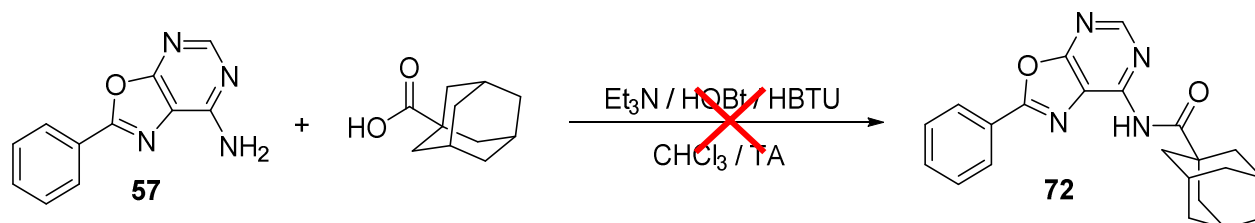


Schéma 28. Troisième voie de synthèse du composé **72** par réaction de couplage de type peptidique

Les modifications portant sur le carbonyle mis en réaction n'ayant pas montré de résultats, nous avons alors essayé d'augmenter la nucléophilie du composé **57**. Une quatrième voie de synthèse a donc été envisagée. La réactivité de l'amine a été augmentée par la synthèse du sel de sodium équivalent au composé **57** (composé **73**). Le composé **73** est obtenu à partir du composé **57** en présence d'hydruure de sodium (1,3 équivalents) dans le THF à 80°C pendant 48 heures (schéma 29). Le rendement de cette réaction est de 99%.

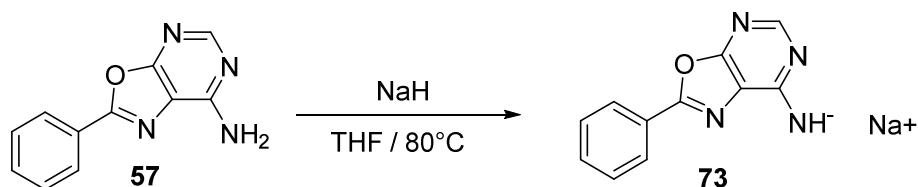


Schéma 29. Formation du sel **73** du composé **57**

Le sel **73** a ensuite été mis en réaction avec le chlorure d'adamantanecarboxyle (1 équivalent) dans le DMF à 80°C pendant 24 heures (schéma 30).

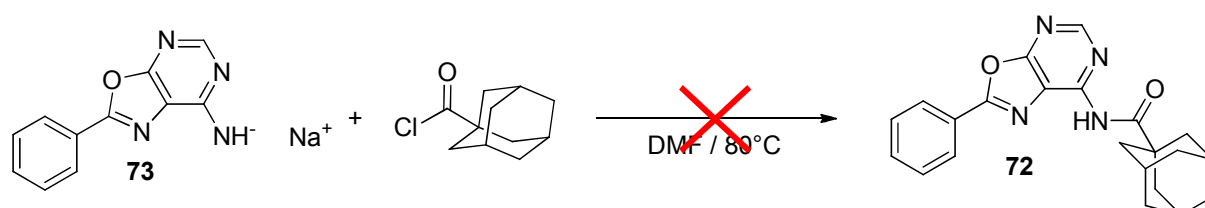


Schéma 30. Quatrième voie de synthèse du produit **72** à partir du sel **73**

Cependant, comme dans les cas précédents, la réaction n'a pas permis la formation du composé **72**. L'encombrement stérique lié au groupement adamantane pourrait être un facteur limitant de l'amidification des composés pyrimido[5,4-*d*]oxazoles.

e. Synthèse de la 6,7-dihydropyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazole-7-one

65

Dans un premier temps, nous avons voulu synthétiser la 6,7-dihydropyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazole-7-one **65** à partir du composé **23** dans un mélange acide formique / eau (85 : 15 v/v) à reflux pendant 16 heures.²⁶⁵

La réaction n'a pas permis la formation du produit désiré mais celle du composé **74** (schéma 31) avec un rendement de 29%.

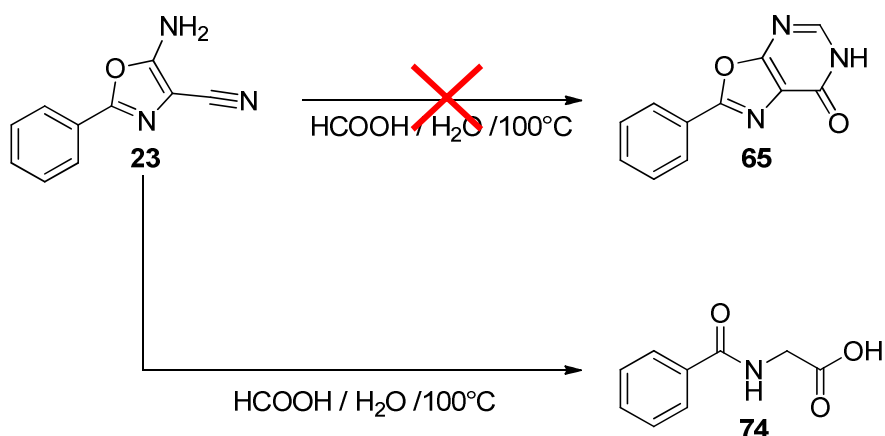


Schéma 31. Formation du composé **74** dans un mélange HCOOH / H₂O

La présence d'eau en milieu acide à haute température entraîne l'ouverture du cycle oxazole selon le mécanisme proposé suivant (schéma 32) :

²⁶⁵ Al-Afaleq, E.I.; Abubshait, S.A. Heterocyclic o-Aminonitriles: Preparation of Pyrazolo[3,4-*d*]-pyrimidines with Modification of the Substituents at the 1- Position. *Molecules*, **2001**, 6, 621 - 638.

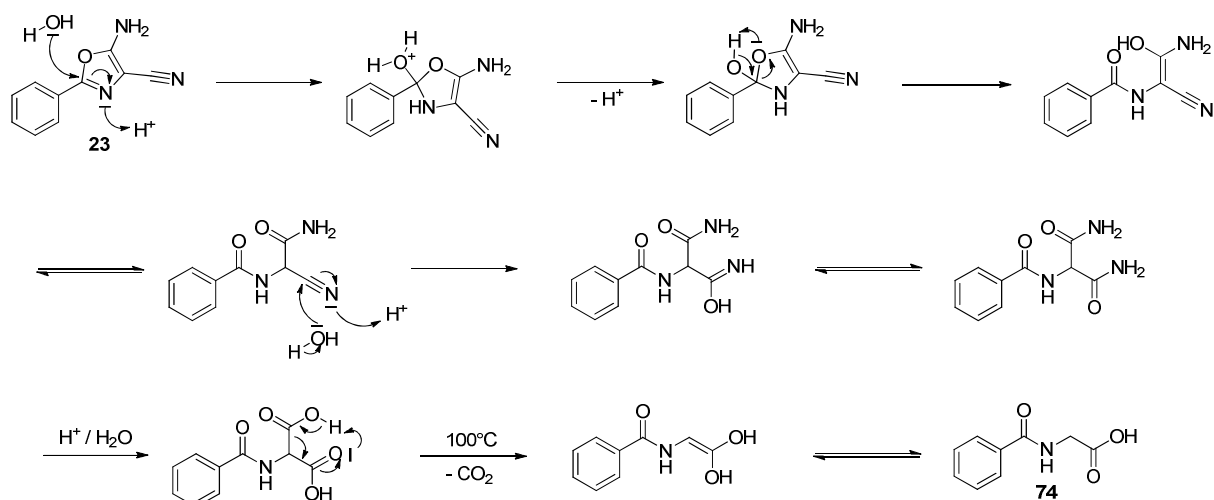


Schéma 32. Mécanisme de la formation du composé **74** dans un mélange COOH / H₂O

La protonation de l'atome d'azote *N3* du cycle oxazole due aux conditions acides du milieu permet l'attaque d'une molécule d'eau sur le carbone *C2* de l'oxazole, ce qui induit l'ouverture du cycle oxazole. Les fonctions nitrile et amide sont ensuite oxydées par la présence d'acide formique et d'eau, aboutissant à l'obtention d'un intermédiaire de type acide malonique. La température du milieu réactionnel (100°C) induit alors la décarboxylation de l'intermédiaire précédemment formé pour aboutir au composé **74**.

Pour éviter l'ouverture du cycle oxazole, les conditions opératoires ont dû être modifiées : l'eau qui sert de solvant a été remplacée par de l'anhydride acétique.²⁶⁶ Le composé **65** a été synthétisé à partir de l'oxazole **23** dans un mélange acide formique / anhydride acétique (50 : 50 v/v) à 80°C pendant 4h30. Nous proposons le mécanisme suivant pour cette réaction (schéma 33) :

²⁶⁶ Lampe, T.; Becker, E.; Kast, R.; Beck, H.; Jeske, M.; Schuhmacher, J.; Stoll, F.; Klein, M.; Akbaba, M.; Knorr, A.; Stasch, J.; Bärfacker, L.; Hillisch, A.; Karig, G.; Meininghaus, M.; Schlemmer, K.; Schohe-Loop, R. U.S. Patent 0,124,665 A1, 2011.

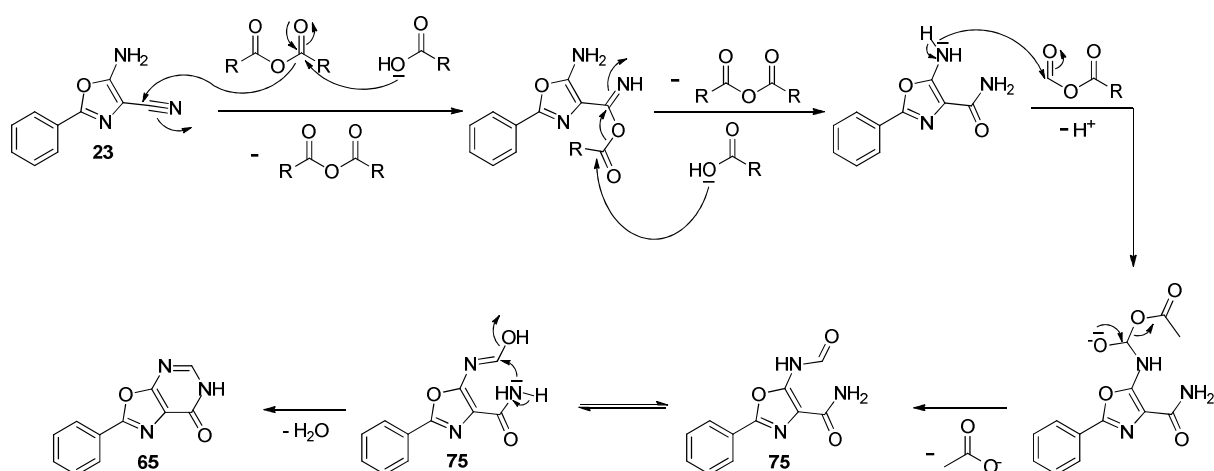
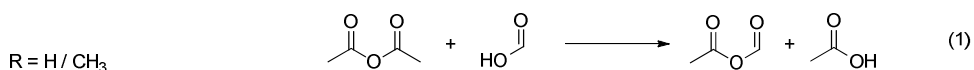


Schéma 33. Mécanisme de la formation du composé **65**

L'acide formique réagit avec l'anhydride acétique pour former l'anhydride acétique – formique qui est un agent de *N*-formylation (réaction (1), schéma 33).^{267,268} La réaction entre un anhydride et un acide carboxylique permet l'attaque d'un carboxylate sur le carbone de la fonction nitrile du composé **23**. De la même manière, un acide carboxylique attaque ensuite le carbonyl du groupement iminométhylcarboxylate nouvellement formé permettant la formation d'une fonction amide primaire et d'un nouvel anhydride. Ensuite, une réaction de *N*-formylation de l'amine par l'anhydride acétique – formique se produit pour former le composé intermédiaire **75**. Enfin, la cyclisation résulte d'une substitution nucléophile intramoléculaire favorisée par les conditions acides du milieu réactionnel pour aboutir au composé **65**.

Le rendement de cette réaction est de 37%. On observe que la réaction n'est pas terminée puisque le produit intermédiaire **75** a pu être isolé avec un rendement de 18%. L'augmentation de la durée du temps de réaction ne permet pas d'augmenter le rendement.

L'acquisition des spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé intermédiaire **75** dans le $\text{DMSO}-d_6$ justifie la présence de ce composé sous sa forme acide iminoformique. Concernant le

²⁶⁷ Strazzolini, P.; Giljmanmi, A.G.; Cauci, S. Acetic formic anhydride: a review. *Tetrahedron*. **1990**, 46, 1081 – 1118.

²⁶⁸ Gibson, H.W. Chemistry of formic acid and its simple derivatives. *Chem. Rev.* **1969**, 69, 673 – 692.

spectre RMN ^1H , un singulet intégrant pour un proton est observé à 7,63 ppm, caractéristique du proton d'un azométhine (le singulet aurait été aux environs de 10 ppm pour un aldéhyde). De même, un signal apparaît à 154 ppm sur le spectre RMN ^{13}C justifiant la forme acide iminoformique alors que pour un aldéhyde le signal sortirait vers 200 ppm.

Le composé **65** peut se trouver dans les trois formes tautomères suivantes (figure 65) :

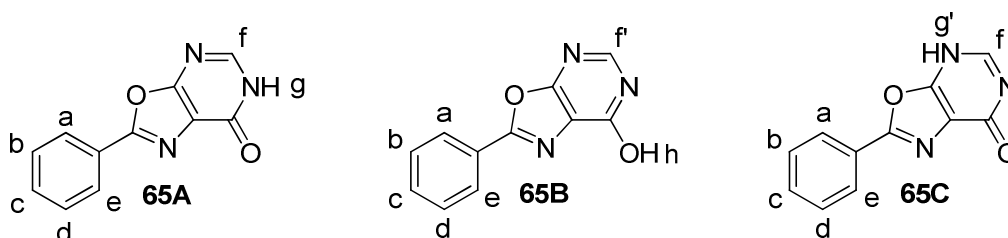


Figure 65. Formes tautomères du composé **65**

L'éventuelle tautomérisation du composé **65** et la présence de nombreux atomes d'azote dans la molécule rendent la caractérisation par RMN de celle-ci difficile. L'acquisition du spectre RMN ^1H dans le $\text{DMSO}-d_6$ ne permet pas d'observer tous les signaux. L'acquisition du spectre RMN ^1H dans le $\text{THF}-d_8$ a permis l'identification, en solution, de deux formes tautomères : une forme cétonique (**65A**) et une forme phénolique (**65B**). De plus, la diminution de la température d'acquisition, de 295K à 280K, a permis une meilleure résolution des signaux observés dans le $\text{THF}-d_8$.

En effet, le spectre RMN ^1H effectué dans le $\text{DMSO}-d_6$, à 295K, présente à 8,51 ppm un large singulet indiquant la présence de plusieurs formes tautomériques et correspondant au proton H_f (figure 66).

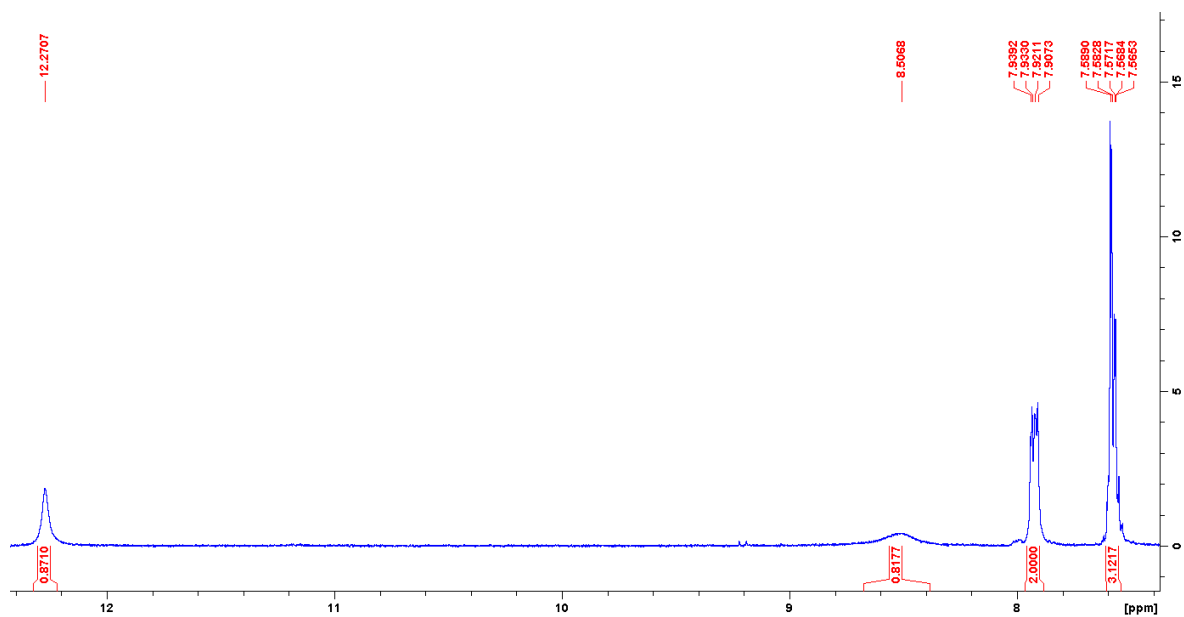


Figure 66. Spectre RMN ^1H du composé **65** acquis dans le $\text{DMSO-}d_6$ à 295K

Au contraire, lorsque le spectre RMN ^1H est acquis dans le $\text{THF-}d_8$, deux signaux distincts H_f et H_r intégrant pour un proton sont observés à 8,93 et 8,37 ppm, ce qui justifie bien la présence de deux formes différentes (Figure 67).

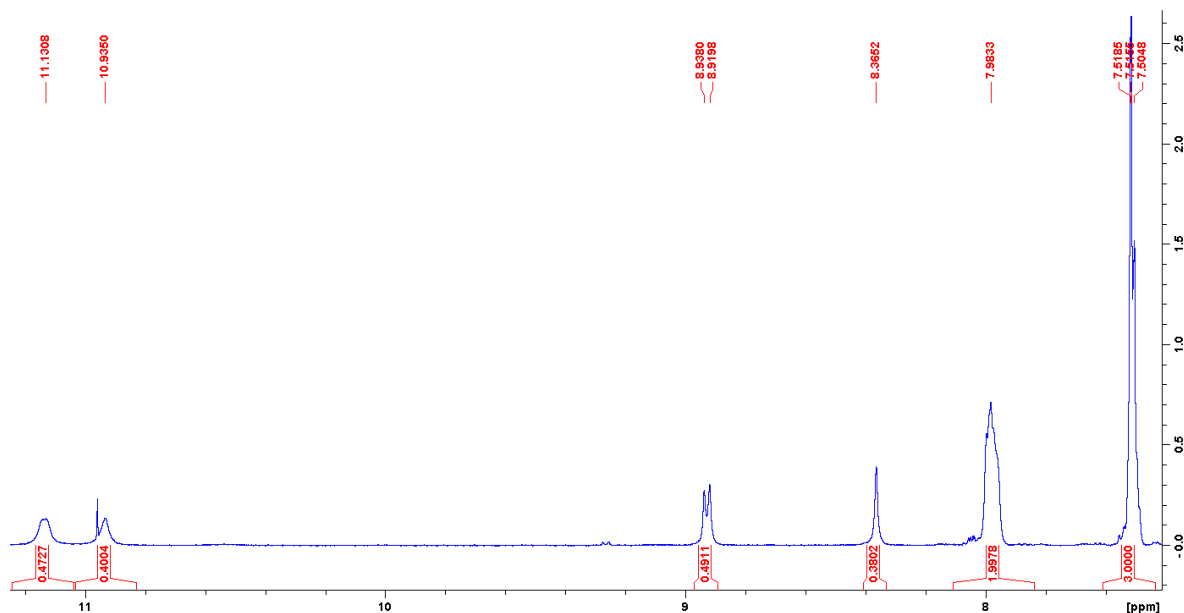


Figure 67. Spectre RMN ^1H du composé **65** acquis dans le $\text{THF-}d_8$ à 280K

Le signal à 8,93 ppm est un doublet intégrant pour un proton et possédant une constante de couplage $^3J_{\text{HH}} = 8,8 \text{ Hz}$, ce qui implique la proximité d'un autre proton (H_g ou $\text{H}_{g'}$, respectivement les formes **65A** ou **65C**). Dans la littérature, le tautomère le plus abondant

de la 4-(3*H*)-pyrimidone en solution est la forme équivalente à **65A**.²⁶⁹ Le signal à 8,37 ppm, quant à lui, est un singulet intégrant pour un proton et justifie la présence de la forme **65B** (*H_F*) puisque le proton ne couple avec aucun autre proton. L'introduction d'acide chlorhydrique deutéré (DCI) dans le THF-*d*₈ pour l'analyse RMN ¹H permet de stabiliser la forme **65B** en solution et de se limiter à la présence de ce seul tautomère dans le tube (figure 68).

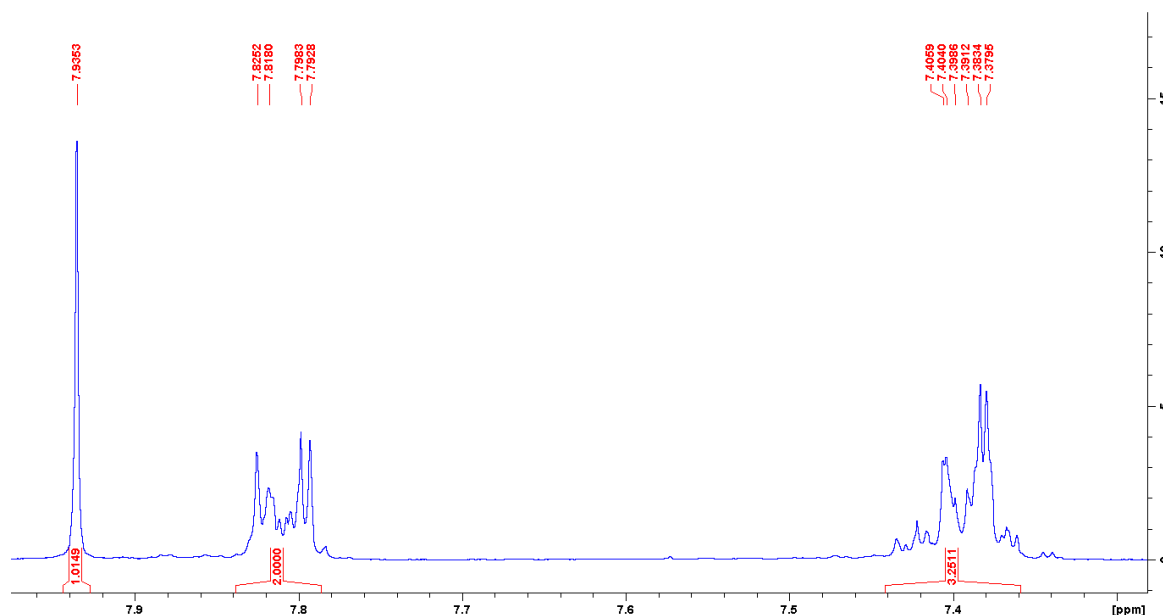


Figure 68. Spectre RMN ¹H du composé **65** acquis dans le THF-*d*₈ à 295K en présence de DCI

f. Cyclisation en 7-aminopyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazol-5-ol :
synthèse du composé **66**

Le 7-aminopyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazol-5-ol **66** a été synthétisé à partir de l'oxazole **23** et d'urée (2,1 équivalents) à 230°C (schéma 34). Le rendement de cette réaction est de 37%.

²⁶⁹ Lopez, C.; Claramunt, R.M.; Alkorta, I.; Elguero J. Solution and solid state (CPMAS) NMR studies of the tautomerism of six-membered heterocyclic compounds related to 2-pyridones. *Spectroscopy*, **2000**, 14, 121 - 126.

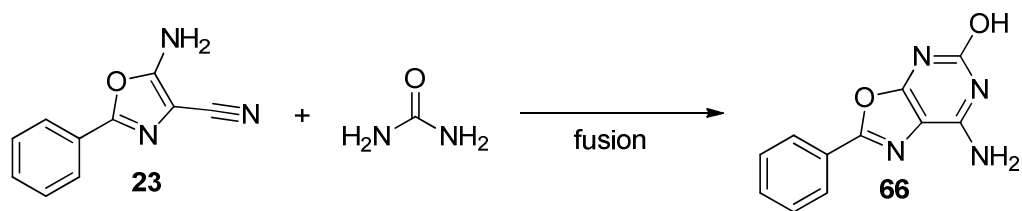


Schéma 34. Synthèse du composé **66**

Tout comme le composé **65**, le composé **66** peut se trouver sous plusieurs formes tautomères (figure 69) :

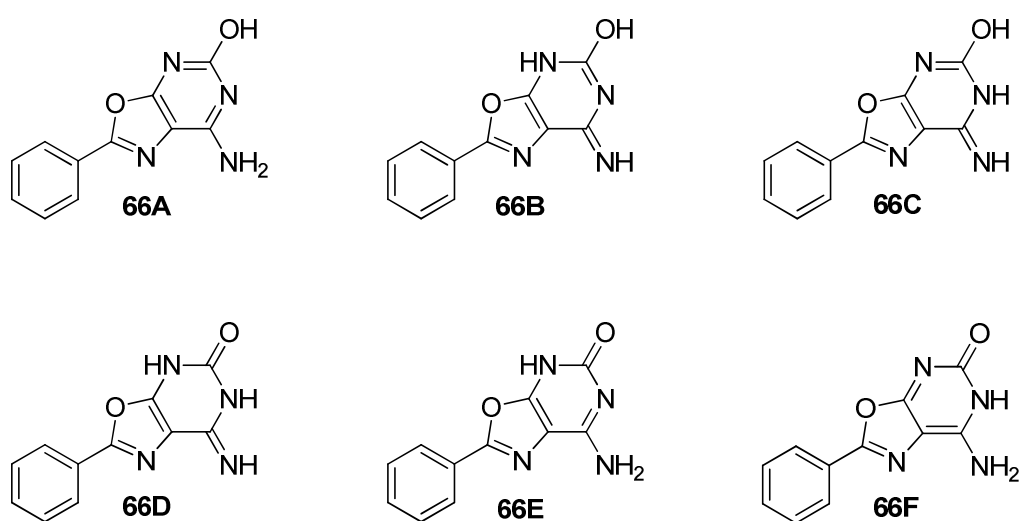


Figure 69. Formes tautomère du composé **66**

L'acquisition du spectre RMN ^1H dans le $\text{DMSO}-d_6$ présente trois signaux intégrant pour un proton à 13,66, 11,61 et 10,88 ppm, correspondant à des protons labiles, supposant que le composé est présent sous une forme imine (**66B**, **66C** ou **66D**). En effet, le composé n'adopte pas les formes **66A**, **66E** et **66F** car nous n'observons aucun signal intégrant pour deux protons caractéristique de la fonction amine primaire (figure 70). Dans la littérature, il a été montré que la cytosine existe majoritairement sous sa forme céto-imine, suggérant que la forme **66D** serait la forme du composé **66** en solution.²⁷⁰

²⁷⁰ Colominas, C.; Luque, F.J.; Orozco, M. Tautomerism and Protonation of Guanine and Cytosine. Implications in the Formation of Hydrogen-Bonded Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6811 – 6821.

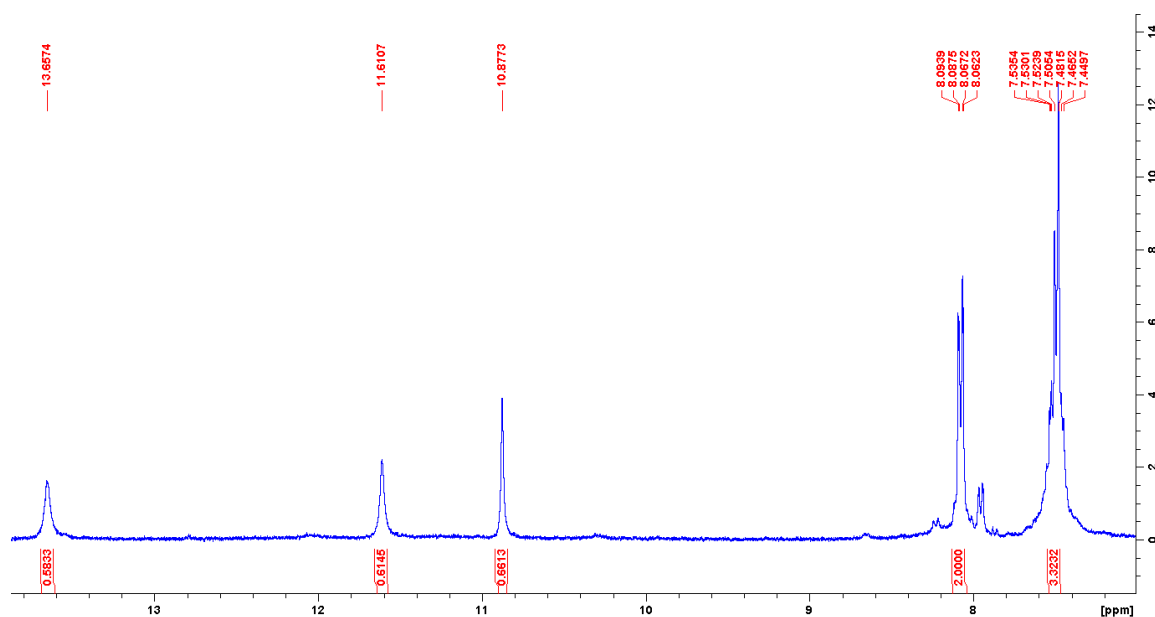


Figure 70. Spectre RMN ^1H du composé **66** acquis dans le $\text{DMSO}-d_6$ à 295K

2. Série C2 : les pyrido[3,2-*d*]oxazoles **67-70**

a. Cyclisation en 7-amino-5-oxo-4,5-dihydropyrido[3,2-*d*][1,3]oxazole-6-carboxylate d'éthyle : synthèse du composé **67**

Des composés de type pyrido[3,2-*d*]oxazole peuvent également être synthétisés à partir de l'oxazole **23**. Pour synthétiser le composé **67**, l'oxazole **23** a, dans un premier temps, été mis en réaction avec du malonate de diéthyle (1,5 équivalents) en présence d'éthanolate de sodium préparé *in situ* (4,3 équivalents) à 100°C pendant 1 heure (schéma 35) :

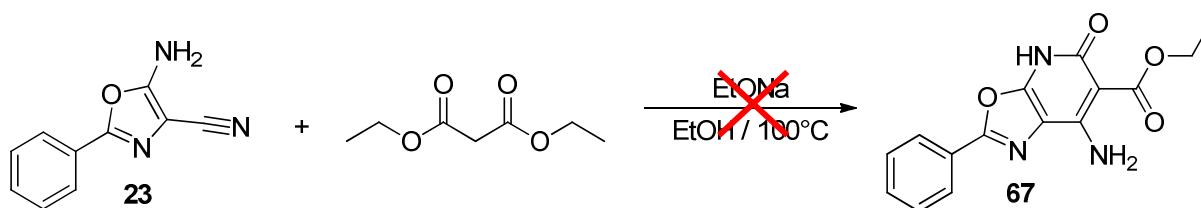


Schéma 35. Première voie de synthèse du composé **67** en présence d'éthanoate de sodium

L'éthanolate de sodium avait pour rôle de déprotoner le carbone en α des deux carbonyles de la molécule de malonate de diéthyle. Cependant, dans ces conditions, nous n'avons pas

obtenu le composé **67**. La base de cette réaction (l'éthanolate de sodium) a alors été remplacée par un acide de Lewis.

Le composé **67** a donc été synthétisé à partir de l'oxazole **23** et de malonate de diéthyle (1 équivalent) en présence de chlorure d'étain (2 équivalents) dans le toluène à 110°C pendant 72 heures (schéma 36). Le rendement de cette réaction est de 92%.

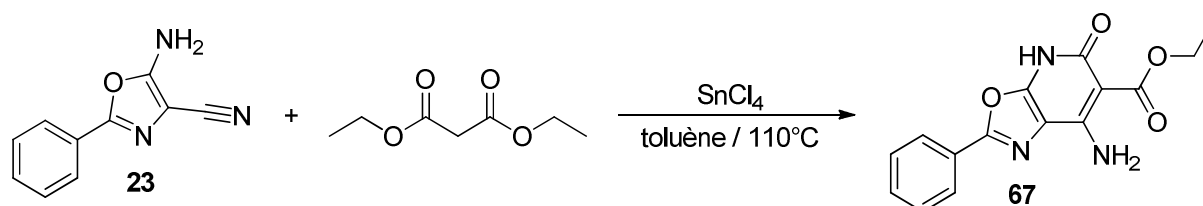


Schéma 36. Synthèse du composé **67** en présence de SnCl_4

Le mécanisme proposé de cette réaction est le suivant (schéma 37) :

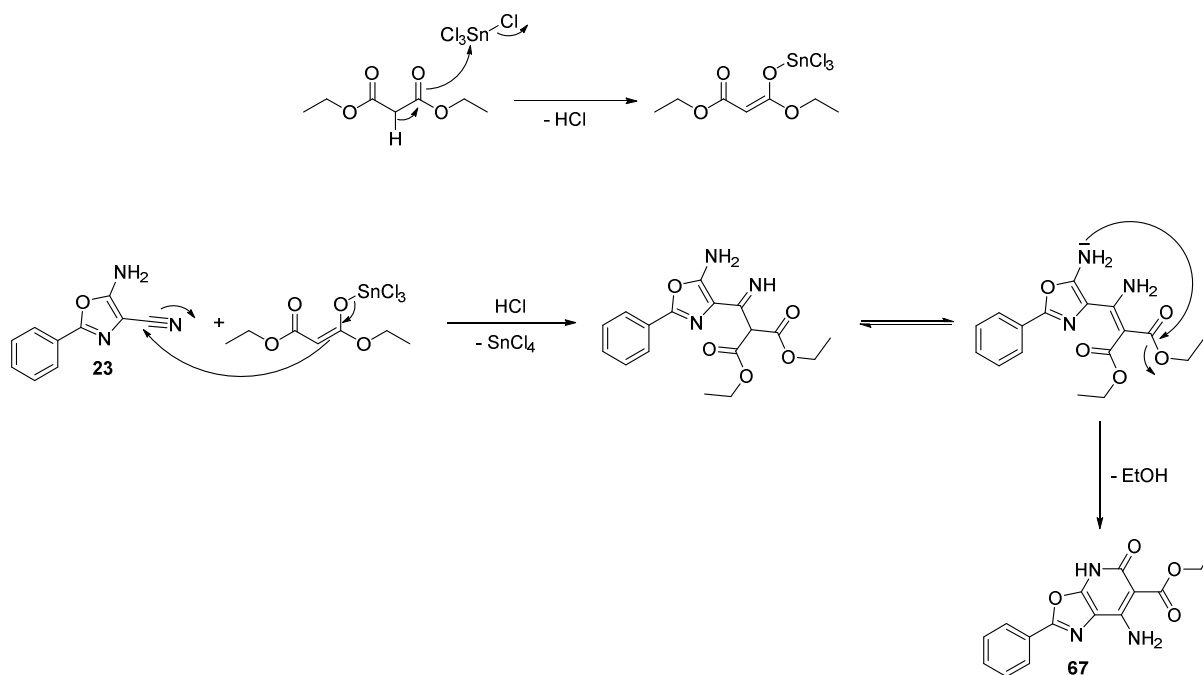


Schéma 37. Mécanisme de la formation du composé **67**

Le chlorure d'étain sert de promoteur et permet de favoriser la forme énole du malonate. Lors de la tautomérisation de ces énoles vers leur forme cétonique, le carbone central attaque le carbone de la fonction nitrile du composé **23**. L'intermédiaire obtenu se

tautomérise alors sous sa forme diamine.²⁷¹ Enfin, à température élevée, une réaction de substitution intramoléculaire s'effectue formant le composé **67** et libérant une molécule d'éthanol.

Comme pour les composés précédemment décrits, le composé **67** peut se trouver sous plusieurs formes tautomères (figure 71) :

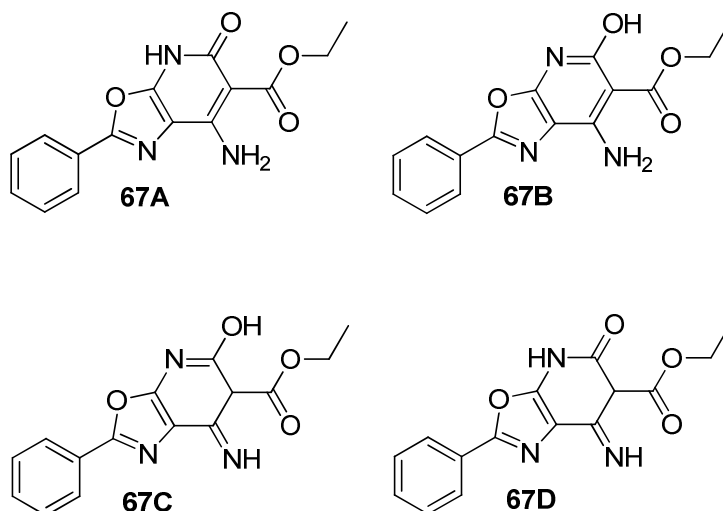


Figure 71. Formes tautomère du composé **67**

On observe sur le spectre RMN ¹H du composé **67** dans le DMSO-*d*₆ un signal intégrant pour un proton à 12,34 ppm et un signal intégrant pour deux protons à 7,70 ppm suggérant la présence d'une fonction NH₂. Ces observations excluent la présence des formes **67C** et **67D**. De plus, on observe sur le spectre RMN ¹³C du composé **67** dans le DMSO-*d*₆ un signal à 165,52 ppm suggérant la présence de la forme hydroxypyridine.²⁷² La forme pyridone présenterait, elle, un signal aux environs de 155 ppm. Le composé **67** semblerait donc être sous sa forme **67B** en solution.

²⁷¹ Scavo, F.; Helquist, P. Preparation of α,β-dehydro-β-amino acid derivatives by tin-promoted addition of malonates to simple nitriles. *Tet. Lett.* **1985**, 26, 2603 – 2606.

²⁷² Forlani, L.; Cristoni, G.; Boga, C.; Todesco, P.E.; Del Vecchio, E.; Selva, S.; Monari. Reinvestigation of the tautomerism of some substituted 2-hydroxypyridines. *ARKIVOC.* **2002**, 11, 198 - 215.

b. Cyclisation en 7-amino-pyrido[3,2-*d*][1,3]oxazole : synthèse des composés **68-70**

Les 7-amino-pyrido[3,2-*d*][1,3]oxazoles **68-70** ont été synthétisés à partir de l'oxazole **23** et de composés β -dicarbonylés (1 équivalent) en présence de chlorure d'étain (2 équivalents) dans le toluène à 110°C pendant 16 heures (schéma 38) :

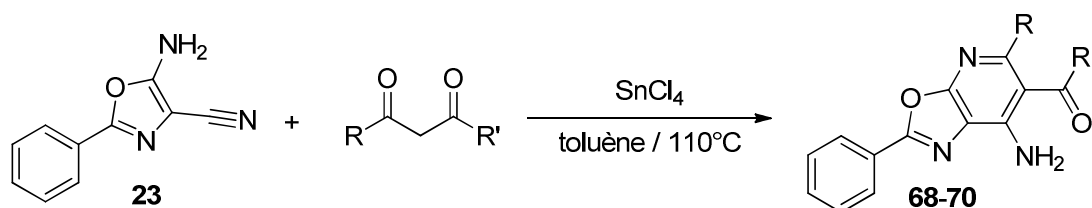


Schéma 38. Synthèse des composés **68-70**

Le mécanisme proposé de cette réaction est semblable au mécanisme de la formation du composé **67** (schéma 39) :

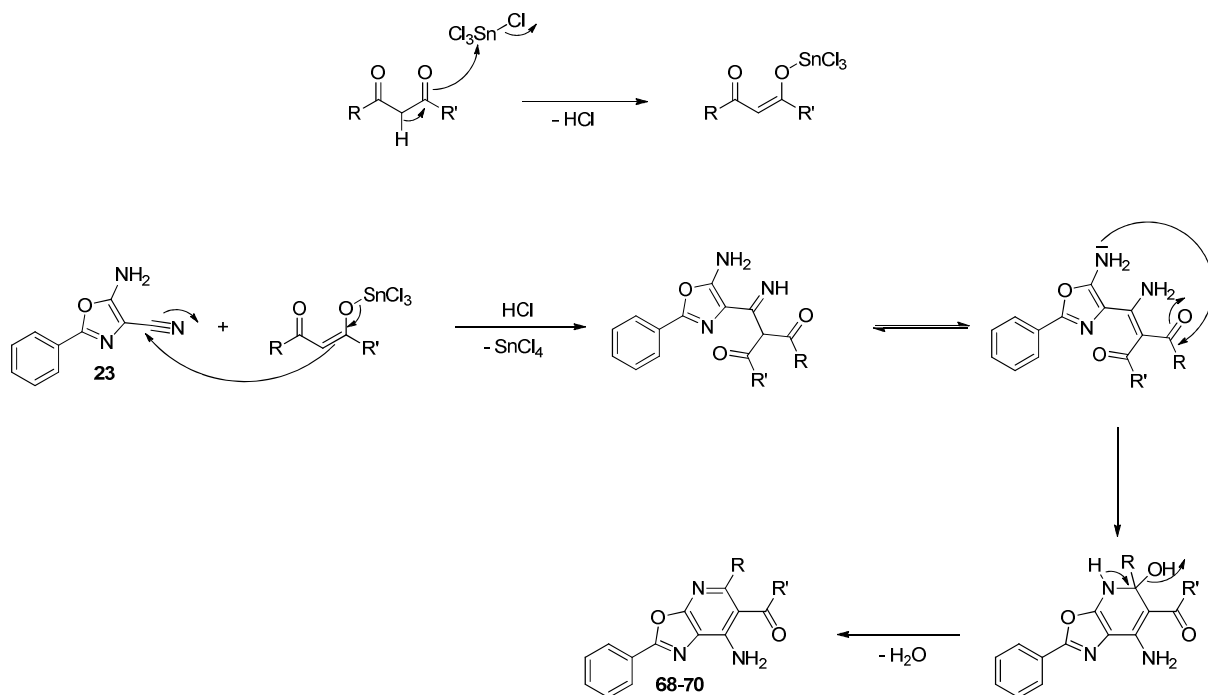


Schéma 39. Mécanisme de formation des composés **68-70**

La différence avec le mécanisme décrit pour le composé **67** est l'étape de cyclisation. Pour le composé **67**, cette étape consistait en une substitution du groupement *O*-éthyle d'un des

deux groupements esters. Dans le cas des composés **68-70**, cette étape de cyclisation est une condensation entre l'amine de l'oxazole **23** et le carbonyle en α du groupement R.

Concernant la synthèse du composé **70** (composé tricyclique), l'intermédiaire réactionnel a pu être isolé, le composé **77** (figure 72), justifiant que la première étape du mécanisme de cyclisation est l'attaque du carbone en α des deux groupements carbonyles sur le groupement nitrile de l'oxazole **23**.

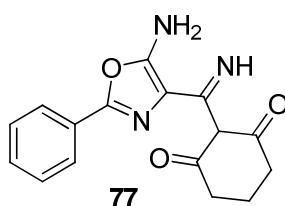


Figure 72. Structure chimique de l'intermédiaire réactionnel **77**

Les composés **68**, **69** et **70** peuvent se trouver sous plusieurs formes tautomères (figure 73).

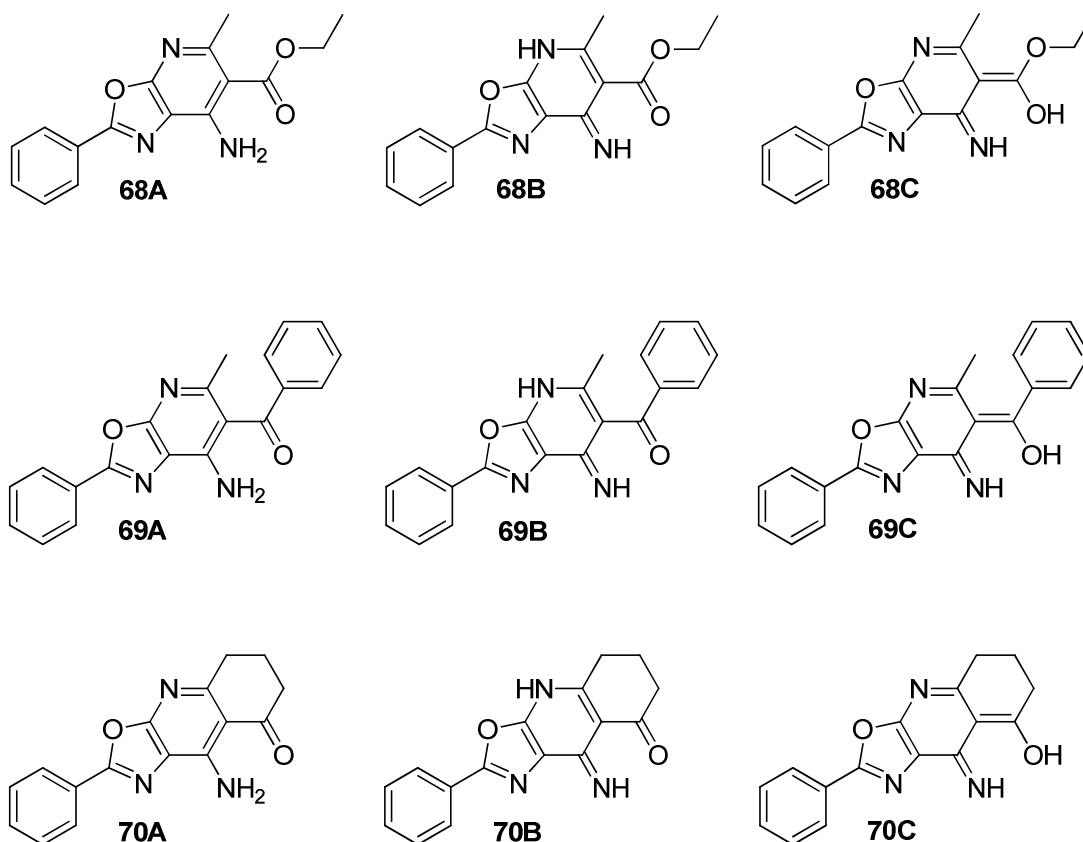


Figure 73. Formes tautomères des composés **68**, **69** et **70**

Le spectre RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ du composé **68** présente un singulet à 7,30 ppm intégrant pour deux protons caractéristique de la fonction NH_2 , indiquant que le composé se trouve sous la forme **68A** en solution (figure 74).

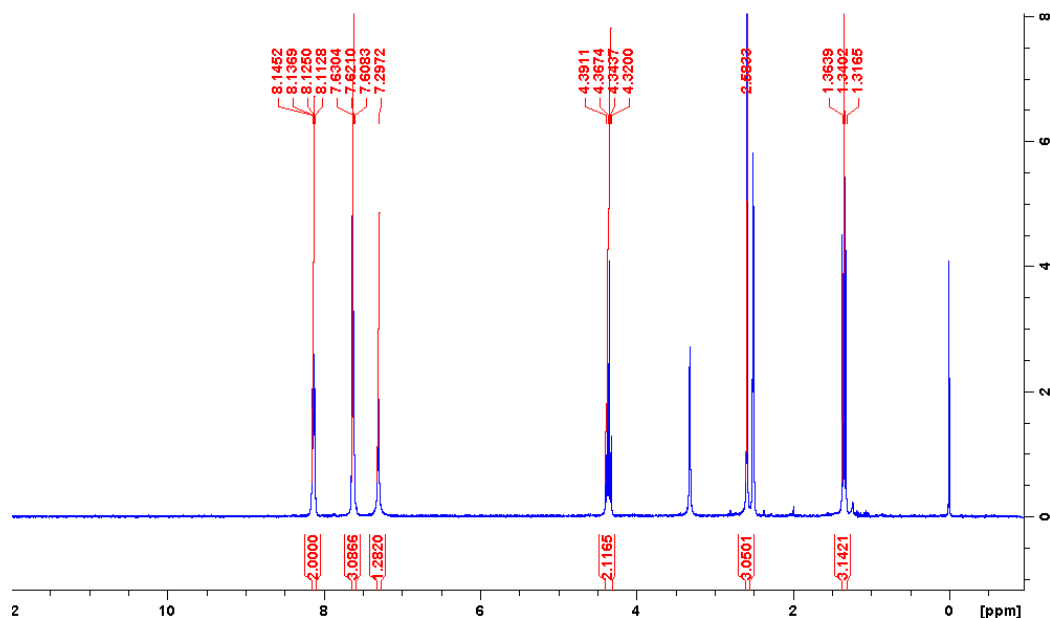


Figure 74. Spectre RMN ^1H du composé **68** acquis dans le $\text{DMSO-}d_6$ à 295K

Il en est de même pour le spectre RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ du composé **69** qui présente un singulet à 6,69 ppm intégrant pour deux protons, d'où la présence du composé sous la forme **69A** (figure 75).

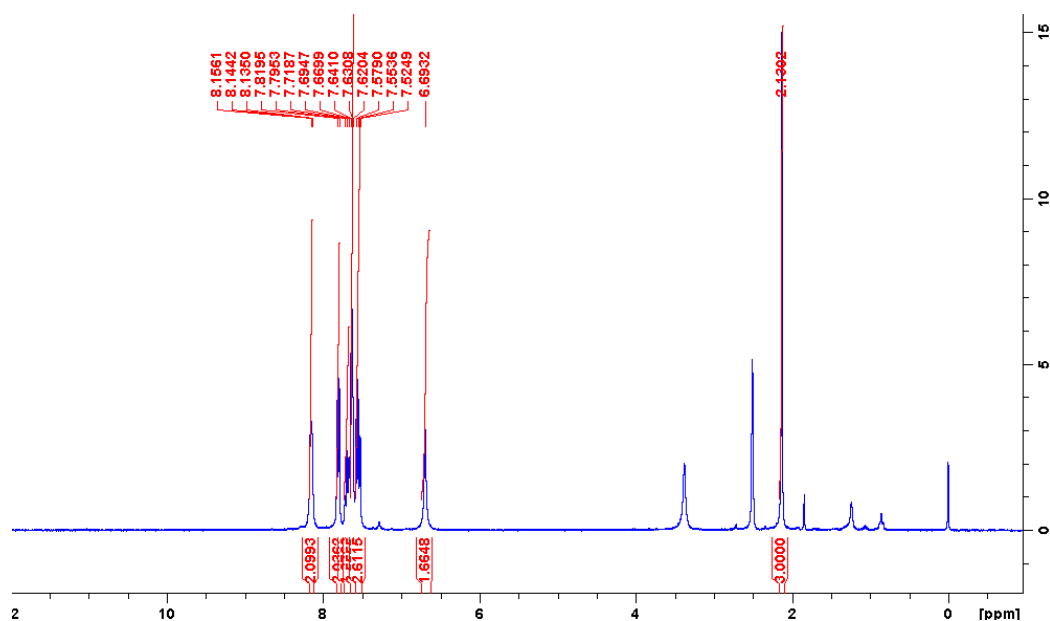


Figure 75. Spectre RMN ^1H du composé **69** acquis dans le $\text{DMSO-}d_6$ à 295K

En revanche, le spectre RMN ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ du composé **70** présente deux singulets, à 9,01 et 8,09 ppm, intégrant chacun pour un proton. Les protons énoïques ont un déplacement chimique d'environ 15-17 ppm, ce qui exclut la forme **70C**. Le composé **70** est donc sous sa forme **70B** en solution (figure 76).

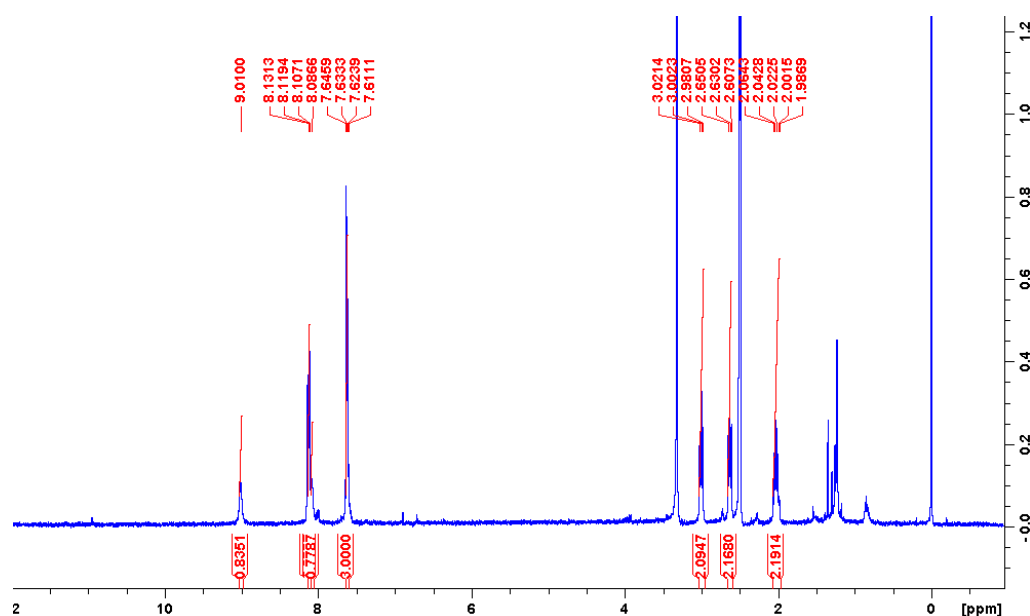


Figure 76. Spectre RMN ^1H du composé **70** acquis dans le $\text{DMSO-}d_6$ à 295 K

Les rendements de cette réaction sont compris entre 5 et 30% et sont répertoriés dans le tableau 17 ci-dessous.

R	R'	Composés	Rendements (%)
CH ₃	OEt	68	30
CH ₃	Ph	69	8
(CH ₂) ₃		70	5

Tableau 17. Rendements de la synthèse des composés **68-70**

RESULTATS PHARMACOLOGIQUES

I. Evaluations pharmacologiques sur les récepteurs CB₁ et CB₂

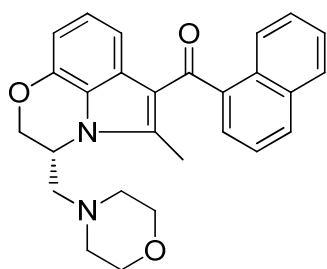
Les tests de liaison aux récepteurs aux cannabinoïdes ont été réalisés sur la plateforme de Binding par Mme Amélie BARCZYK. Ils ont été effectués à partir de membranes de cellules surexprimant de manière stable soit le récepteur CB₁ humain (*hCB₁*) soit le récepteur CB₂ humain (*hCB₂*).

1. Mesure de l'affinité des composés vis-à-vis des récepteurs CB₁ et CB₂

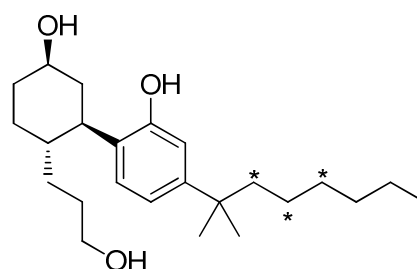
Le principe de ce test consiste à mesurer la capacité d'une molécule à déplacer un ligand de référence radiomarqué ([³H]-CP-55,940).

Dans cette étude, les composés ont été testés à 1 µM sur les deux récepteurs et, quand le déplacement était supérieur à 60%, les constantes d'inhibition (*K_i*) ont été déterminées, selon le protocole de Perkin Elmer.

Brièvement, les membranes (4 µg pour CB₂ et 8 µg pour CB₁) sont incubées dans le tampon de binding (Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2,5 mM, BSA 0,5 mg/L, pH 7,4) avec les composés à tester et le [³H]-CP-55,940 (0,5 nM), le radioligand de référence. Après 1h30 d'incubation à 30°C, les membranes sont récupérées sur plaque filtrante (Unifilter-96 GF/C), préalablement saturée avec du PEI 0,05%, à l'aide d'un « Filtermate Unifilter 96-Harvester » (Perkin Elmer). La plaque filtrante est ensuite lavée 10 fois avec un tampon de lavage froid (Tris HCl 5mM, pH 7,4) puis 30 µL de liquide scintillant sont ajoutés dans chaque puit. La radioactivité est alors mesurée à l'aide d'un TopCount NXT TM Microplate Scintillation Counter (Perkin Elmer). La liaison non spécifique a été déterminée en présence de 5 µM de (*R*)-(+)-WIN-55,212-2, un agoniste mixte CB₁ / CB₂ (figure 77). La liaison spécifique correspond à la différence entre liaison totale et liaison non spécifique.



(R)-(+)-WIN-55,212-2

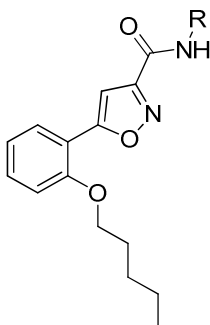


[³H]-CP-55,940

Figure 77. Structures du (R)-(+)-WIN-55,212-2 et du [³H]-CP-55,940

a. Affinité des composés 5-12 pour le récepteur CB₂

L'affinité des composés 5-12 pour le récepteur CB₂ est donnée dans le tableau 18 ci-dessous.



Composés	R	K_i (nM) <i>hCB₂</i>	Composés	R	K_i (nM) <i>hCB₂</i>
5		386 ± 33	10		464 ± 84
6		514 ± 244	9 + 10		369 ± 42
7		598 ± 251	11		> 1000
8		512 ± 196	12		> 1000
9		298 ± 48	11 + 12		> 1000

Tableau 18. Affinités des composés 5-12 pour le récepteur CB₂

Ces résultats peuvent être comparés aux résultats obtenus pour les isoxazoles précédemment synthétisés ne comportant pas de centre chiral (figure 78).

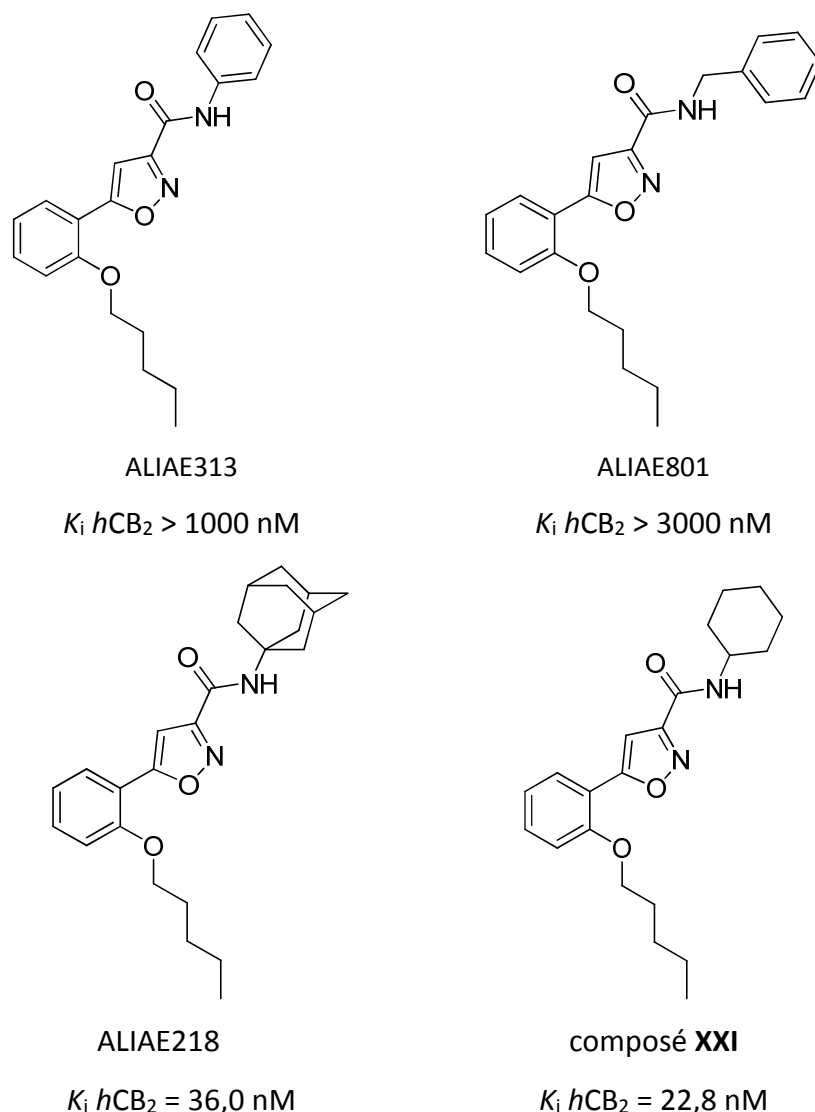


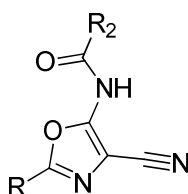
Figure 78. Structures chimiques des isoxazoles synthétisés précédemment au laboratoire

Nous pouvons voir que les composés ALIAE313 et ALIAE801 ne possèdent aucune affinité pour le récepteur CB₂. Cependant, l'ajout d'un groupement méthyle sur la chaîne latérale portée par la fonction amide de la molécule (composé **5**) confère une affinité modérée ($K_i = 386 \text{ nM}$) pour le récepteur CB₂. La bonne affinité du composé **XXI**, possédant un groupement cyclohexyle, pour le récepteur CB₂ semble indiquer que l'occupation spatiale de la molécule dans la cavité hydrophobe du récepteur est importante pour son affinité. Le composé ALIAE313 possédant un groupement phényle plan n'occupe pas cet espace. L'ajout d'une chaîne latérale permet d'augmenter le volume du groupement et donc d'améliorer l'affinité

du composé. On peut cependant remarquer que l'ajout d'un méthyle en position 4 du groupement phényle diminue l'affinité du composé pour le récepteur CB₂ (composés **11** et **12**). Enfin, lorsque le phényle est remplacé par un groupement 1-adamantyle (composé **8**) ou cyclohexyle (composés **9** et **10**), les composés possèdent une affinité pour le récepteur CB₂ mais moins importante que pour les composés ne possédant pas de centre chiral (ALIAE218 et le composé **XX**).

b. Affinité des composés **33-48** pour les récepteurs CB₁ et CB₂

L'affinité des composés **33-48** pour les récepteurs CB₂ et CB₁ est donnée dans le tableau 19 ci-dessous.



Composés	R	R ₂	K _i (nM)		Index de sélectivité CB ₂ vs CB ₁
			hCB ₂	hCB ₁	
33			> 1000	> 1000	-
34			> 1000	> 1000	-
35			> 1000	> 1000	-
36			> 1000	> 1000	-
37			> 1000	> 1000	-
38			> 1000	> 1000	-

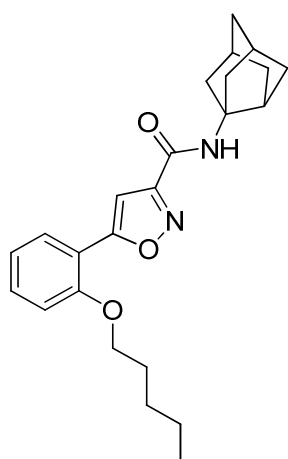
39			> 1000	> 1000	-
40			> 1000	> 1000	-
41			> 1000	> 1000	-
42			> 1000	> 1000	-
43			> 1000	> 1000	-
44			123	> 1000	> 8
45			> 1000	50% à 1 μ M	-
46			> 1000	> 1000	-
47			> 1000	> 1000	-
48			776 $\pm$ 96	> 1000	-

Tableau 19. Affinités des composés **21-36** pour les récepteurs CB₂ et CB₁

Contrairement à la série des isoxazoles, où le groupement 2-pentoxyphényle en position 5 est très important pour l'affinité pour le récepteur CB₂, le composé *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amide avec ce même groupement en position 2 (composé **37**, R = 2-pentoxyphényle, R₂ = 1-adamantyle) ne présente pas d'affinité pour le récepteur CB₂. De même, la présence d'une chaîne *O*-alkyle en position *mé*ta (composés **39-41**) ne permet pas aux composés d'avoir une affinité pour le récepteur CB₂. Les composés possédant un groupement biphényle en position 2 (composés **35** et **36**) ne possèdent pas non plus d'affinité pour le récepteur CB₂.

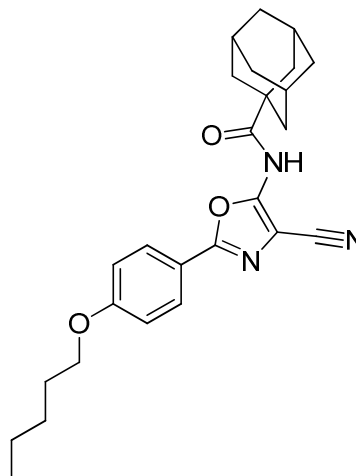
Un résultat étonnant a été obtenu pour le composé **44**, qui possède un groupement *O*-pentyle en *para*. Ce composé possède une affinité modérée pour le récepteur CB₂ ($K_i = 123$ nM) tandis que ses homologues inférieurs et supérieurs (composés **42** et **46**) ne possèdent aucune activité pour ce récepteur. De même, le remplacement du groupement 1-adamantyle par un 3-noradamantyle (composé **45**) entraîne une importante diminution de l'affinité du composé pour le récepteur. Enfin, l'introduction d'un groupement méthyladamantyle (composé **48**) entraîne une légère diminution de l'affinité du composé ($K_i = 776$ nM). Ce résultat diffère de ceux obtenus pour la série des isoxazoles. En effet, la présence d'une chaîne en position *para* pour ces composés entraînait une perte de l'affinité pour le récepteur CB₂.

L'ensemble de ces résultats laisse supposer que le composé **44** interagit d'une manière différente avec le récepteur CB₂ que les isoxazoles. Des études de docking ont été réalisées par le Dr. Nicolas RENAULT sur un modèle de récepteur CB₂. Ces études ont été réalisées pour les composés ALIAE809 et **44** (figure 79).



ALIAE809

$K_i \text{ hCB}_2 = 9,0 \text{ nM}$



44

$K_i \text{ hCB}_2 = 123 \text{ nM}$

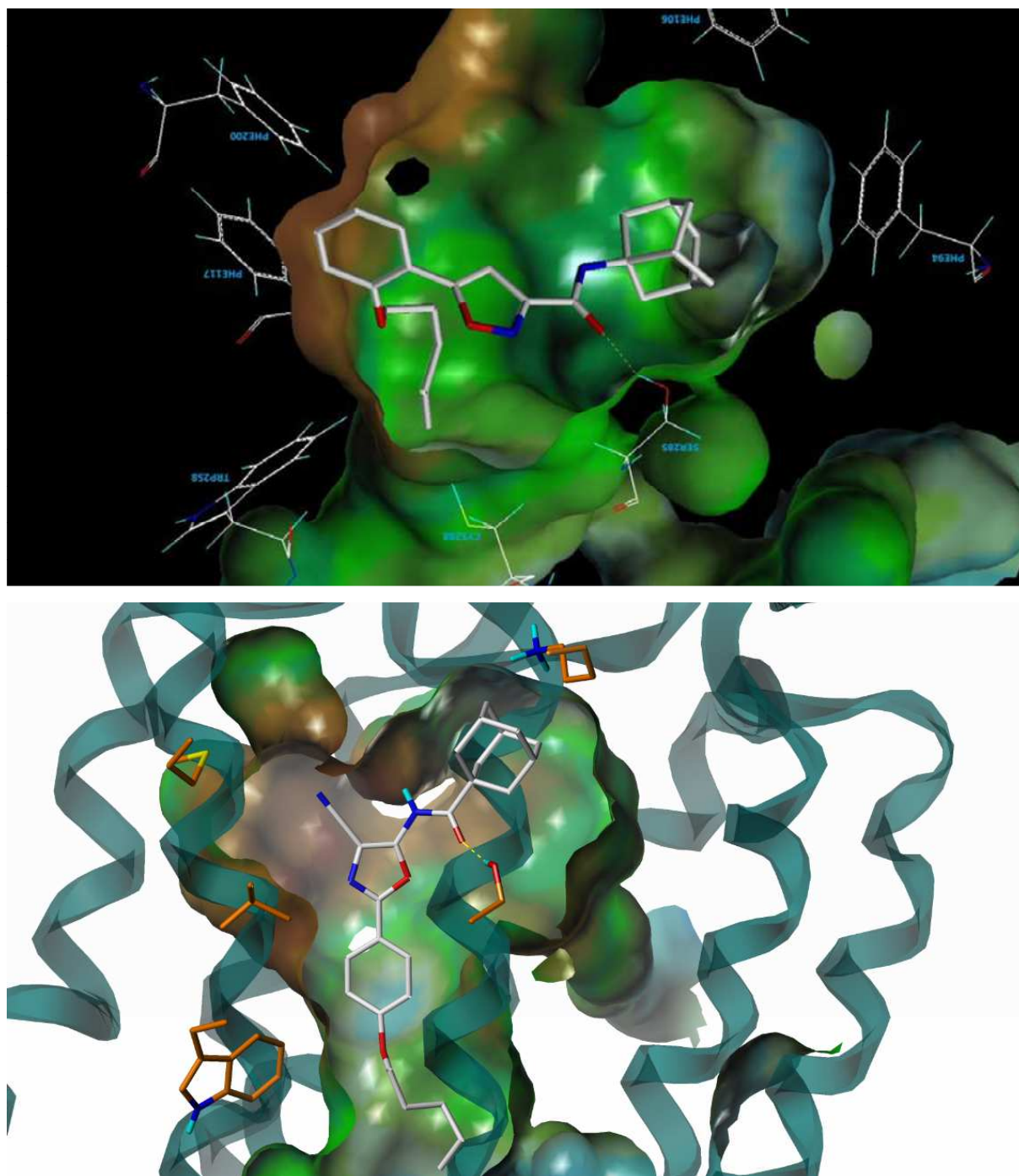


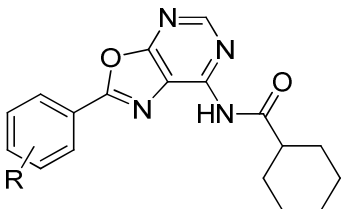
Figure 79. Structures chimiques et docking des composés ALIAE809 et **44** dans le récepteur CB₂

Le docking confirme bien une différence d'interaction des deux molécules avec le récepteur CB₂. Nous pouvons voir que, pour les deux composés, le groupement 1-adamantyle se place dans la même poche lipophile du récepteur. De même, la fonction amide peut effectuer une liaison hydrogène avec la sérine 285 du récepteur pour les deux molécules. La différence de positionnement entre les deux composés se situe au niveau du groupement pentoxyphényle. Pour le composé ALIAE809, ce groupement se situe à proximité de la

cystéine 288 tandis que pour le composé **44**, ce groupement se positionne le long des résidus hydrophobes de l'hélice 6 (tryptophane 248, valine 251 et méthionine 265). D'après ces observations, le composé **44** pourrait être un agoniste du récepteur CB₂. Cependant, des tests d'activités fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

c. Affinité des composés **62-64** pour le récepteur CB₂

L'affinité des composés **62-64** pour les récepteurs CB₂ et CB₁ est donnée dans le tableau 20 ci-dessous.



Composés	R	K_i (nM)
		<i>hCB₂</i>
62	2-pentyloxy	26% à 1 μ M
63	3-pentyloxy	11% à 1 μ M
64	4-pentyloxy	16% à 1 μ M

Tableau 20. Affinités des composés **62-64** pour le récepteur CB₂

Les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles **62-64** ne présentent pas d'affinité pour le récepteur CB₂. Les affinités des autres composés de la série C pour le récepteur CB₂ n'ont, pour le moment, pas évaluées.

2. Mesure de l'activité fonctionnelle des composés vis-à-vis des récepteurs CB₁ et CB₂

Pour les composés présentant une bonne affinité pour le récepteur CB₂, nous déterminerons la fonctionnalité grâce au test de liaison du [³⁵S]-GTP γ S sur des membranes de cellules exprimant le récepteur CB₂ humain.

Ce test consiste à mesurer le couplage du récepteur à la protéine G ou plus précisément, la liaison du GTP à la sous unité α de la protéine G permettant ainsi d'activer ou d'inhiber l'effecteur.

Les composés sont dilués dans le tampon de binding (HEPES 20 mM, $MgCl_2$ 3 mM, NaCl 200 mM, BSA 0,1%, saponine 10 $\mu g/mL$, pH 7,4) supplémenté de 30 μM de guanosine diphosphate (GDP) et sont mis en présence de 10 μg de membranes. L'ajout de [^{35}S]-GTP γ S (0,1 nM) va permettre de mesurer par scintillation, la quantité de GTP lié à la protéine G après 1 heure d'incubation à 30°C.

La comparaison avec la valeur obtenue sans la liaison d'un ligand (activité constitutive fixée à 100%) permet de déterminer une Efficacité max (E_{max}), qui renseigne sur le caractère agoniste, antagoniste ou agoniste inverse des composés testés. Un antagoniste ne modifiera pas l'état basal d'activité ($E_{max} = 100\%$), alors qu'un agoniste ou agoniste inverse, vont respectivement augmenter ($E_{max} > 100\%$) ou diminuer ($E_{max} < 100\%$) la liaison du [^{35}S]-GTP γ S. Cette valeur E_{max} est associée à une EC_{50} correspondant à la concentration en ligand pour laquelle 50% de la réponse est observée.

II. Evaluations pharmacologiques sur le récepteur P2X₇

1. Mesure du caractère inhibiteur de l'activité du récepteur P2X₇

Certaines des molécules que nous avons synthétisées présentent ces trois éléments pharmacophoriques, nous avons donc souhaité évaluer leur caractère antagoniste du récepteur P2X₇ (figure 81).

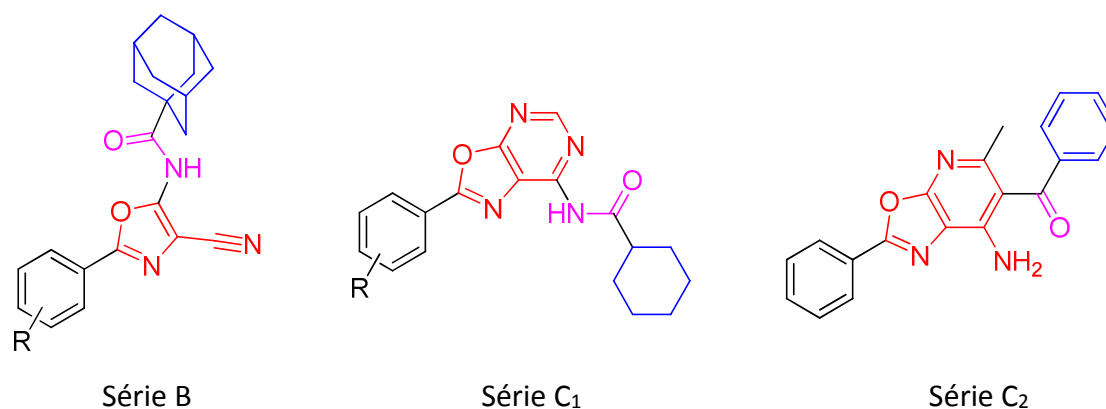


Figure 81. Composés testés pour leur activité antagoniste sur le récepteur P2X₇

La mesure de l'activité antagoniste des composés a été déterminée par cytométrie en flux et a été réalisée par le Dr. Xavier DEZITTER.

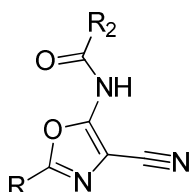
Le test pharmacologique sur le récepteur P2X₇ repose sur la mesure simultanée du flux calcique et de l'ouverture du large pore (perméable à des molécules < 900 Da) par cytométrie en flux. Ainsi, la concentration calcique intracellulaire est mesurée par la sonde Fluo-3 AM (Life Technologies). L'ouverture du large pore est évaluée par la sonde TO-PRO-3 (417 Da, Life Technologies), qui est un intercalant de l'ADN qui pénètre dans la cellule suite à l'activation du récepteur P2X₇. Enfin, la viabilité cellulaire est déterminée par un marquage à l'iodure de propidium (Life Technologies). Dans nos conditions expérimentales, l'iodure de propidium ne pénètre pas dans les cellules vivantes *via* le récepteur P2X₇ mais marque les cellules mortes afin de les retirer de l'étude car elles constituent un bruit de fond pour la mesure de l'entrée de TO-PRO-3.

Ce test pharmacologique sur récepteur P2X₇ est réalisé sur des cellules HEK-293 surexprimant le récepteur P2X₇ humain ou P2X₇ du rat. Ces cellules ont été obtenues auprès du Dr Sahil Adriouch (Université de Rouen). Brièvement, les cellules (10⁶/ml) sont marquées au Fluo-3 AM (50 nM) pendant 30 minutes à 37°C dans du milieu de culture dépourvu de sérum de veau fœtal. Les cellules sont ensuite centrifugées (1200 tpm, 5 min) puis reprises dans du tampon « P2X₇R » (HEPES 20 mM, sucrose 300 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, glucose 10 mM, pH 7,4) contenant du TO-PRO-3 (10 nM) et de l'iodure de propidium (75 nM). Les cellules (10⁵) sont pré-incubées en présence des molécules à tester (10⁻⁵ M) pendant 15 minutes avant l'ajout de l'agoniste de référence, le BzATP (2'-(3'-O-(4-

Benzoyl)benzoyl)adenosine 5'-triphosphate, 100 μM final dans 200 μl) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite analysées par le cytomètre Cyan (Beckman Coulter) à l'aide du logiciel d'analyse Summit (Beckman Coulter).

2. Inhibition de l'activité du récepteur P2X₇ par des composés de la série B

Dans un premier temps, nous avons testé différents *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amides présentant un groupement 1-adamantyle porté par la fonction amide (R₂) et divers groupements R en position 2 (phényle, composé **33**, biphenyle composé **35** et pentoxyphényle en *ortho*, *mé*ta et *para*, composés **37**, **40** et **44** respectivement). Nous avons ensuite, au vu des premiers résultats, remplacé le groupement 1-adamantyle par un 3-noradamantyle et utilisé un chaîne *O*-hexyle en position *ortho* sur le groupement phényle. Les pourcentages d'inhibition de l'activité du récepteur P2X₇ par des composés de la série B sont regroupés dans le tableau 21 ci-dessous.



Composés	R	R ₂	Inhibition <i>h</i> P2X ₇	Inhibition <i>r</i> P2X ₇	CI ₅₀ (μM) <i>h</i> P2X ₇
33			98%	2%	0,506 $\pm$ 0,051
34			61%	0%	-
35			28%	0%	-
37			100%	78%	0,317 $\pm$ 0,059

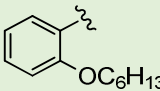
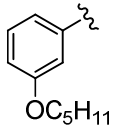
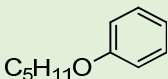
38			100%	49%	0,308 ± 0,080
40			21%	0%	-
44			7%	6%	-

Tableau 21. Pourcentages d'inhibition de l'activité du récepteur P2X₇ humain et murin à 10⁻⁵M par des composés de la série B

Les composés **33**, **37** et **38** inhibent l'activité du récepteur P2X₇ humain de 98 à 100% à 10 μM. Si la présence d'une chaîne *O*-alkyle substituant le groupement phényle n'est pas indispensable (composé **33**), la position *ortho* de cette chaîne sur le groupement phényle est importante pour l'activité antagoniste des composés sur le récepteur P2X₇. En effet, quand la chaîne *O*-pentyle est en position *mé*ta (composé **40**) ou en position *para* (composé **44**), l'activité antagoniste des composés disparaît. De plus, la présence d'un groupement 1-adamantyle sur la fonction amide permet une meilleure inhibition que le groupement 3-noradamantyle (composés **33** et **34**, présentant une inhibition respective de 98 et 61%).

Il est à noter que l'absence de chaîne en position *ortho* a pour conséquence une perte de l'inhibition de l'activité du récepteur P2X₇ du rat par le composé (composés **37** et **33**, présentant une inhibition respective de 78 et 2%).

3. Inhibition de l'activité du récepteur P2X₇ par des composés de la série C

Nous avons testé, dans un premier temps, les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles possédant un groupement 3,4-diméthoxyphényle (composés **53** et **56**) ou cyclohexyle sur une fonction amide (composés **61-64**) en position 7. Nous avons aussi évalué l'activité du pyrido[3,2-*d*]oxazole **69** présentant un groupement phényle sur une fonction carbonyle en position 6. Les pourcentages d'inhibition de l'activité du récepteur P2X₇ par des composés de la série C sont regroupés dans le tableau 22 ci-dessous.

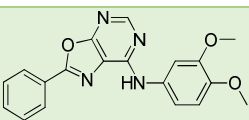
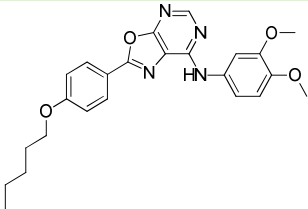
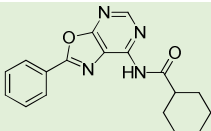
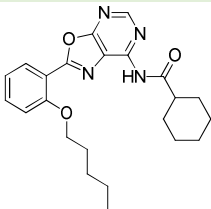
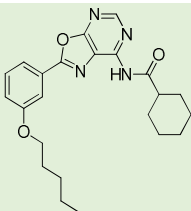
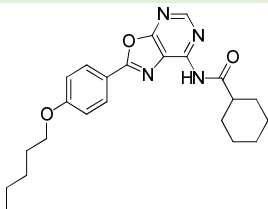
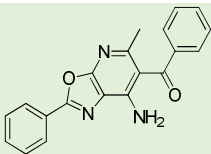
Composés	Structures	Inhibition <i>h</i> P2X ₇	Inhibition <i>r</i> P2X ₇
53		0%	0%
56		9%	7%
61		18%	0%
62		7%	0%
63		0%	0%
64		4%	0%
69		3%	0%

Tableau 22. Pourcentages d'inhibition du récepteur P2X₇ humain et murin à 10⁻⁵M par des composés de la série C

Au vu des résultats, les composés bicycliques actuellement synthétisés ne possèdent pas d'activité antagoniste sur le récepteur P2X₇ (composés **53**, **56** et **69**). Le composé **61** (possédant un phényle en position 2 et un cyclohexyle sur la fonction amide) présente une très faible activité inhibitrice de ce récepteur. L'ajout d'une chaîne *O*-pentyle en position

ortho, méta ou para (composés **62**, **63** et **64** respectivement) entraîne une perte de cette activité.

III. Activité mixte agoniste du récepteur CB₂ / antagoniste du récepteur P2X₇

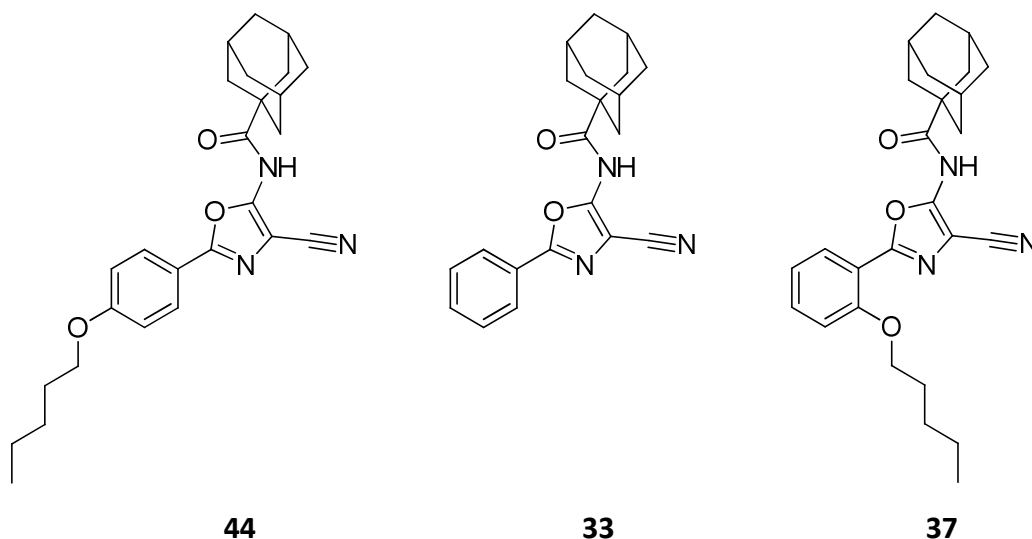


Figure 82. Structures chimiques des composés **44**, **33** et **37**

Au vu des résultats, le motif *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amide semble être intéressant pour la conception d'agonistes sélectifs du récepteur CB₂ (composé **44**) et d'antagonistes du récepteur P2X₇ (composés **33**, **37** et **38**). Selon les substituants sur l'hétérocycle, ces molécules ont montré une activité soit sur CB₂ soit sur P2X₇ (figure 82).

Pour les agonistes sélectifs du récepteur CB₂, deux éléments structuraux principaux sont essentiels : la présence d'une chaîne *O*-pentyle en position *para* sur un groupement phényle en position 2 de l'hétérocycle et d'un groupement 1-adamantyle sur la fonction amide en position 5. La présence et la position de la chaîne *O*-pentyle sont cruciales pour l'activité biologique de la molécule.

Lorsque cette chaîne est absente, aucune activité sur le récepteur CB₂ n'est observée mais les molécules possèdent alors un effet agoniste sur le récepteur P2X₇. De plus, lorsque la chaîne *O*-pentyle est en position *ortho* sur le groupement phényle en position 2 de

l'hétérocycle, les composés deviennent des antagonistes encore plus efficaces de ce récepteur.

Cependant, nous n'avons pu identifier de composés possédant une activité mixte agoniste du récepteur CB₂ / antagoniste du récepteur P2X₇ comme le montre le tableau 23. Il pourrait être envisageable, en substituant le phényle en position 2 par de nouveaux groupements, de concevoir un composé possédant une activité mixte agoniste du récepteur CB₂ / antagoniste du récepteur P2X₇.

Composés	R	R ₂	<i>h</i> CB ₂ K _i (nM)	Cl ₅₀ (μM) <i>h</i> P2X ₇
33			29% à 1 μM	0,506 ± 0,051
37			31% à 1 μM	0,317 ± 0,059
38			41% à 1 μM	0,308 ± 0,080
44			123	-

Tableau 23. Affinités pour le récepteur CB₂ et Cl₅₀ sur le récepteur P2X₇ des composés **33**, **37**, **38** et **44**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux agonistes sélectifs du récepteur CB₂, afin de développer de nouvelles séries de composés originaux et d'établir de nouvelles RSA sur ces séries. Pour cela, nous avons en premier lieu complété les études sur une série précédemment initiée au laboratoire en introduisant un centre de chiralité au sein des molécules (série A). Nous avons ensuite conçu et développé une nouvelle série de composés de type *N*-(4-cyano-2-aryloxazol-5-yl)-amide afin d'évaluer leur caractère agoniste du récepteur CB₂ (série B). Enfin, nous avons mis au point une chimie innovante pour la synthèse de composés bicycliques de type pyrimido[5,4-*d*]- et pyrido[3,2-*d*]oxazole dans le but de faciliter la synthèse ultérieure de nouveaux composés originaux (série C).

La série A comporte 4 composés chiraux, sous la forme des énantiomères purs ainsi que des mélanges racémiques. Ces composés complètent les RSA effectuées sur la série des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles développée précédemment au laboratoire. L'ajout d'une chaîne latérale entraîne une modification de l'affinité des composés pour le récepteur CB₂. Le composé **5**, possédant un groupement phényle possède une meilleure affinité que son homologue non méthylé, dû à une meilleure occupation spatiale de la poche hydrophobe du récepteur. Cependant, les composés possédant un groupement 1-adamantyle (composé **8**) et cyclohexyle (composé **9**) n'ont pas une affinité aussi bonne que leur homologue. De plus, il semblerait que les énantiomères *S* (composés **6** et **9**) possèdent une meilleure affinité pour le récepteur CB₂ que les énantiomères *R* (composés **7** et **10**).

La série B est constituée de 16 composés finaux (**33-48**) synthétisés à partir du motif 5-amino-oxazole-4-carbonitrile. Les groupements substituant l'hétérocycle central sont issus des observations réalisées sur les RSA des séries développées précédemment au laboratoire. Ces composés ont été testés pour leur affinité avec le récepteur CB₂. Nous avons voulu déterminer l'importance de la chaîne *O*-alkyle sur l'activité de ces composés. Ainsi, nous avons greffé des chaînes de 4 à 6 carbones en position *ortho*, *méta* et *para* sur le groupement phényle. Le seul composé ayant montré une affinité avec le récepteur CB₂ est le composé **44** avec un *K_i* de 123 nM (figure 83). La longueur de la chaîne est importante pour l'activité de ce composé. En effet, les homologues inférieurs (composé **42**) et supérieurs (composé **46**) n'ont aucune affinité pour le récepteur CB₂. Cependant, cette chaîne est en position *para* sur le groupement phényle, alors qu'elle est en position *ortho* dans la série des

isoxazoles. Cette observation peut laisser penser à un mode de liaison différent entre la molécule et le récepteur.

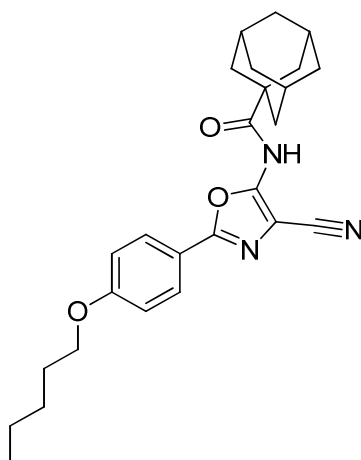


Figure 83. Structure chimique du composé **44**

Nous avons fait varier la chaîne présente sur le groupement phényle. De nouvelles modulations pourront être envisagées sur le groupement lipophile porté par la fonction amide (remplacement du 1-adamantyle) afin d'augmenter l'affinité des composés pour le récepteur CB₂. De plus, un docking de ce composé dans le récepteur CB₂ a été réalisé et accrédite le positionnement du composé au sein du récepteur. Cependant, un test de fonctionnalité est à envisager afin de caractériser l'activité du composé **44**.

De plus, certains composés de cette série ont été testés pour leur activité antagoniste du récepteur P2X₇. Trois composés ont montré une inhibition de 100% sur ce récepteur avec des Cl₅₀ de l'ordre du submicromolaire : les composés **33**, **37** et **38** (figure 84). Cependant, ces composés sont moins actifs sur les récepteurs de rat. Dans un premier temps, la longueur de la chaîne pourra être modulée avec la synthèse des homologues inférieurs et supérieurs. Ensuite, les composés seront testés sur des récepteurs P2X₇ de souris. Des résultats positifs permettraient éventuellement de continuer l'évaluation de façon *in vivo*. Enfin, les Cl₅₀ de ces composés seront déterminées.

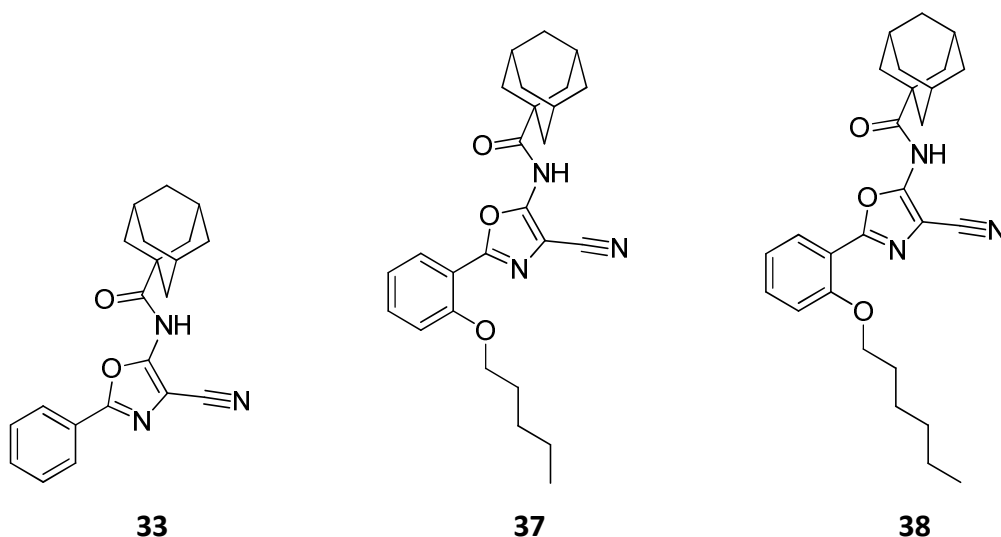


Figure 84. Structures chimiques des composés **33**, **37** et **38**

La série C a été développée autour du motif 5-amino-oxazole-4-carbonitrile. La présence d'un système énamionitrile dans ce motif nous a permis de synthétiser facilement de nouveaux bicycles de type pyrimido[5,4-*d*]- et pyrido[3,2-*d*]oxazole. Le but du travail effectué sur cette série a été de faire varier les différents substituants sur ces bicycles : en positions 5 et 7 pour la sous-série C₁ et en positions 5 et 6 pour la sous-série C₂. Au total, 11 pyrimido[5,4-*d*]oxazoles et 4 pyrido[3,2-*d*]oxazoles ont été synthétisés. Ces composés possèdent de nombreuses formes tautomères et la forme principale présente en solution a été, lorsque cela était possible, déterminée par RMN.

Concernant les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles, la principale modulation a été effectuée sur la position 7 du bicycle. Il nous a été possible, sur cette position, d'introduire un groupement hydroxyle (composé **65**) ou un groupement amine. Dans ce dernier cas, l'amine a été obtenue soit directement substituée par un groupement aromatique (composés **52-56**) soit non substituée (composés **57-60** et **66**). Enfin, cette amine non substituée a permis la synthèse de composés possédant une fonction amide en position 7 (composés **61-64**). En plus de ces modulations, il a été possible d'introduire un groupement hydroxyle en position 5 du bicycle (figure 85).

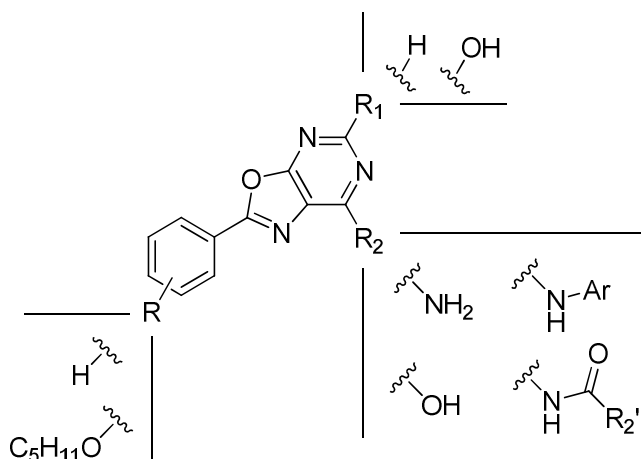


Figure 85. Modulations réalisées sur les pyrimido[5,4-*d*]oxazoles

Trois de ces pyrimido[5,4-*d*]oxazoles (composés **62-64**) ont été testés pour leur affinité pour le récepteur CB₂, sans résultat positif.

A partir de ces travaux, des modulations sur la position 2 du bicycle sont envisageables. Plus particulièrement, le groupement phényle peut être remplacé par une fonction amide et la chaîne pentyle pourrait être introduite en position 7, portée par un atome d'azote ou un atome d'oxygène (figure 86).

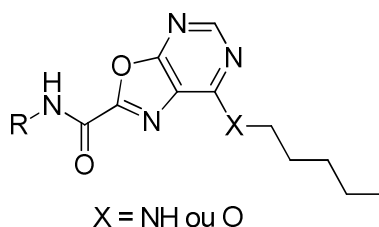


Figure 86. Structure chimique du composé envisagé

Concernant les pyrido[3,2-*d*]oxazoles, les modulations ont été effectuées en positions 5 et 6 du bicycle (figure 87). La position 5 peut être substituée par un groupement méthyle (composés **68-70**) ou par un groupement hydroxyle (composé **67**) tandis que la position 6 porte un groupement carbonyle. Pour les composés synthétisés, ce carbonyle peut être une fonction cétone (composés **69-70**) ou une fonction ester (composés **67-68**). Il a aussi été possible de synthétiser, en une étape, le composé **70**, tricyclique.

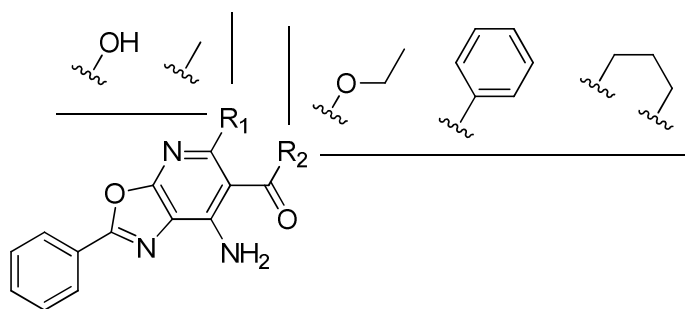


Figure 87. Modulations réalisées sur les pyrido[3,2-*d*]oxazoles

Comme décrit dans la partie conception de ce mémoire, dans le but de synthétiser de nouveaux agonistes sélectifs du récepteur CB₂ originaux, une finalité envisageable pour ce type de bicyclic serait la synthèse d'un composé possédant une chaîne pentyle en position 4, un groupement carbonyle en position 5 et une fonction amide substituée par un groupement 1-adamantyle en position 6 (figure 88). Ces substitutions sont envisagées suite aux résultats observés sur la série des 4-oxo-1,4-dihydroquinoléines.

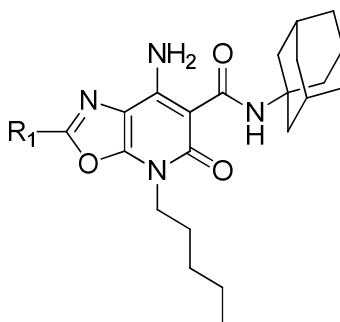


Figure 88. Structure chimique du composé envisagé

PARTIE EXPERIMENTALE

Tous les réactifs commerciaux et les solvants ont été utilisés sans purification supplémentaire.

La chromatographie sur couche mince est réalisée sur des plaques de gel de silice Polygram Sil G/UV254 d'épaisseur 0,2mm (réf. 805 023 Macherey Nagel). La révélation est faite sous UV (254 et 366 nm).

Les purifications par chromatographie sur colonne sont réalisées sur gel de silice 60, granulométrie 40-63 μm (réf. 9385.5000 Merck).

Les points de fusion sont déterminés à l'aide d'un appareil Büchi 535. Ils ne sont pas corrigés et sont exprimés en degré Celsius.

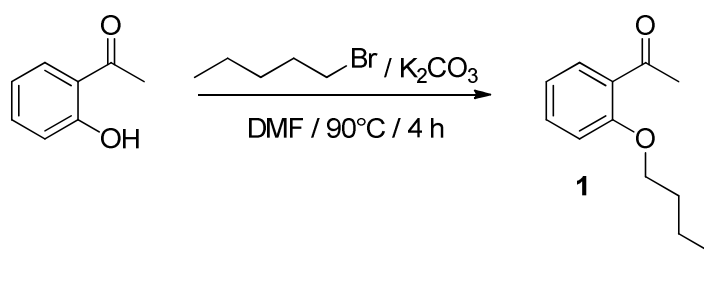
Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés sur un appareil à transformée de Fourier Bruker AC300P (300 MHz), avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne, dans le laboratoire de RMN du service commun de physico-chimie de l'Université de Lille 2. Les spectres sont enregistrés à température ambiante. Chaque signal est repéré par son déplacement chimique δ exprimé en ppm (partie par million), son intégration (nombre de protons), sa multiplicité (s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, m = multiplet ou massif) et, éventuellement, sa constante de couplage J en Hertz.

Tous les composés sont caractérisés par LC-MS. Le chromatographe liquide haute performance (colonne ODS, phase mobile : eau/acétonitrile/acide formique en mode gradient) est couplé à un détecteur UV et à un détecteur de masse de type APCI⁺ (ionisation chimique à pression atmosphérique). Les spectres sont enregistrés au Centre Universitaire des Mesures Analytiques de l'Université de Lille 2, sur un appareil Thermo Electron Surveyor MSQ.

Les analyses HRMS sont réalisées sur un analyseur TOF, utilisé en mode V avec une résolution massique de 9000, est couplé avec une source ESI (ionisation électrospray). Les spectres sont enregistrés au centre de spectroscopie de masse Waters, à Manchester (Royaume Uni).

Les réactions au micro-ondes sont réalisées avec un DiscoverSP CEM.

1-(2-Pentoxyphényl)éthanone (1**)**



La 2-hydroxyacétophénone est mise en solution dans le DMF et le carbonate de potassium est ajouté à la solution. Le milieu réactionnel est chauffé à 90°C puis le 1-bromopentane est introduit. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 4 heures. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de la soude (2N) et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol.

2-Hydroxyphénone	8,84 mL	73,4 mmol	1 éq
1-Bromopentane	13,8 mL	110 mmol	1,5 éq
Carbonate de potassium	15,2 g	110 mmol	1,5 éq
DMF	60 mL		

Formule brute : C₁₃H₁₈O₂

Masse molaire : 206,29 g.mol⁻¹

Rendement : 99 %

R_f (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,55

Aspect : solide blanc

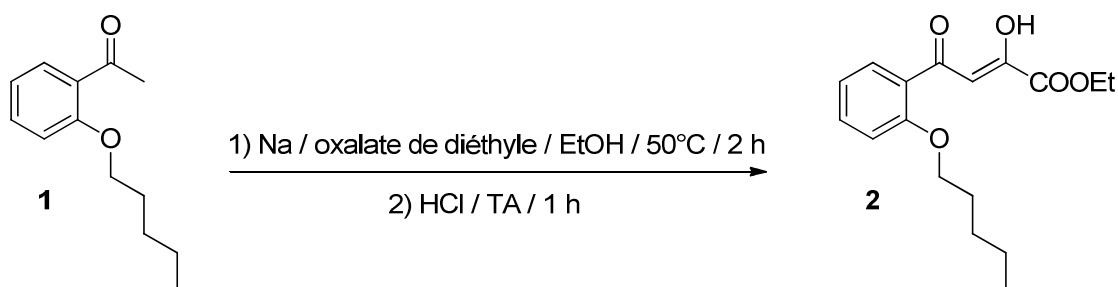
Pf : 29-31°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.57 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.48 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.10 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 6.97 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, OCH₂) ; 2.55 (s, 3H, CH₃) ; 1.77-1.73 (m, 2H, CH₂) ; 1.45-1.42 (m, 2H, CH₂) ; 1.25-1.21 (m, 2H, CH₂) ; 0.87 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 207.3 (MH⁺)

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-(2-pentoxyphényl)-2-butèneoate d'éthyle (2)



Le sodium est solubilisé dans l'éthanol. Le composé **1** et l'oxalate de diéthyle sont ensuite ajoutés dans la solution d'éthanolate de sodium et le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 2 heures. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de l'acide chlorhydrique (1N) et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite.

1	7,55 g	36,6 mmol	1 éq
Sodium	1,68 g	73,1 mmol	2 éq
Oxalate de diéthyle	10 mL	73,1 mmol	2 éq
EtOH	75 mL		

Formule brute : C₁₇H₂₂O₅

Masse molaire : 306,36 g.mol⁻¹

Rendement : 91 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (8:2)) : 0,59

Aspect : solide marron

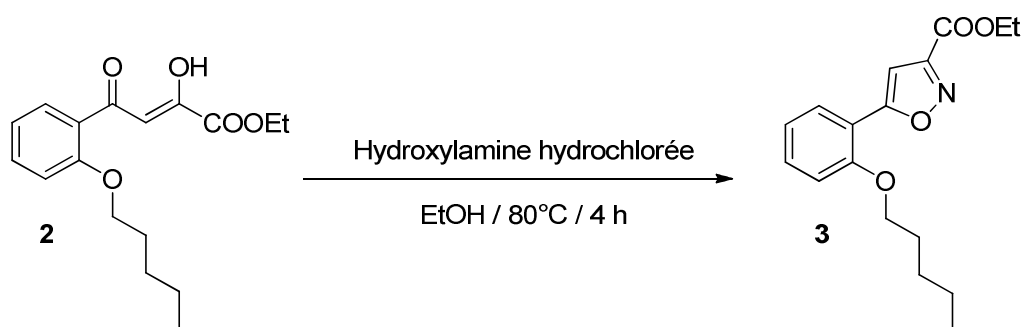
Pf : 105-107°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.68 (s, 1H, OH) ; 7.84 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Har) ; 7.81 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, Har) ; 7.61 (s, 1H, CH) ; 7.58 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Har) ; 7.23 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, Har) ; 4.28 (q, 2H, *J* = 7.4 Hz, OCH₂) ; 4.13 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, OCH₂) ; 1.81-1.77 (m, 2H, CH₂) ; 1.37-1.34 (m, 7H, 2CH₂ + CH₃) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 307.1 (MH⁺)

5-(2-Pentoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle (3)



Le composé **2** et l'hydroxylamine hydrochlorée sont solubilisés dans l'éthanol. Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 4 heures. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite.

2	11,0 g	35,9 mmol	1 éq
Hydroxylamine hydrochlorée	2,52 g	36,3 mmol	1 éq
EtOH	80 mL		

Formule brute : C₁₇H₂₁NO₄

Masse molaire : 303,36 g.mol⁻¹

Rendement : 85 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,61

Aspect : solide blanc

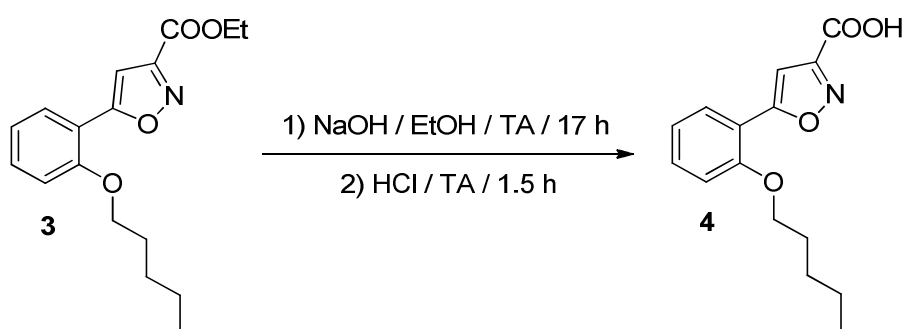
Pf : 58-60°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.91 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 7.52 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 7.24 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 7.13-7.11 (m, 2H, Har), 4.38 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz, OCH₂) ; 4.16 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, OCH₂) ; 1.85-1.81 (m, 2H, CH₂) ; 1.49-1.31 (m, 7H, 2CH₂ + CH₃) ; 0.92 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 304.6 (MH⁺)

Acide 5-(2-pentoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique (4)



L'hydroxyde de sodium est solubilisé dans l'éthanol. Le composé **3** est ajouté au milieu réactionnel et le mélange est agité pendant 17 heures à température ambiante. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de l'acide chlorhydrique (3N) et la solution est agitée pendant 1,5 heures à température ambiante. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide est recristallisé dans l'heptane.

3	9,28 g	30,6 mmol	1 éq
Hydroxyde de sodium	10,0 g	250 mmol	8,2 éq
EtOH	125 mL		

Formule brute : C₁₅H₁₇NO₄

Masse molaire : 275,31 g.mol⁻¹

Rendement : 99 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (5:5)) : 0,69

Aspect : solide blanc

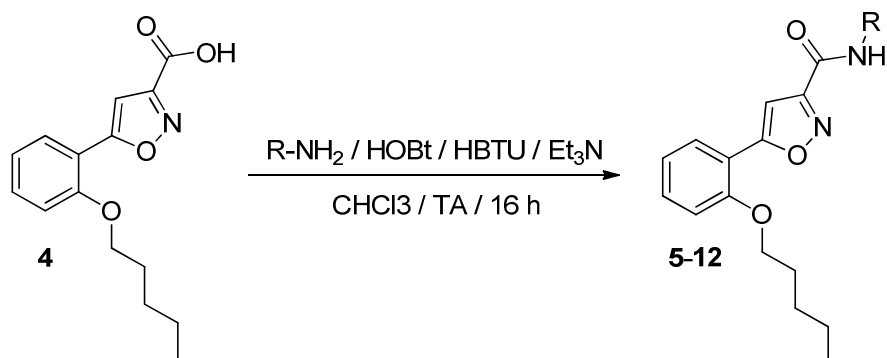
Pf : 128-130°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 12.78 (s, 1H, OH) ; 7.89 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.48 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.23 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.10 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.02 (s, 1H, CH) ; 4.16 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 1.83-1.79 (m, 2H, CH₂) ; 1.48-1.33 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

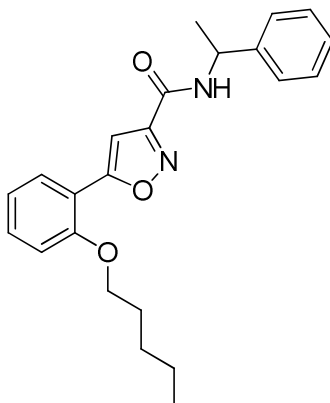
LCMS (APCI⁺) *m/z* 276.1 (MH⁺)

Mode opératoire général des réactions d'amidification – composés 5-12



Le composé **4** est solubilisé dans le chloroforme et la solution est refroidie à 0°C. L'HOBt, l'HBTU et la moitié de la triéthylamine sont ajoutés au milieu réactionnel. Dans un second ballon, l'amine est dissoute dans du chloroforme et le reste de triéthylamine est ajouté à cette solution. Après 45 minutes, la deuxième solution est ajoutée à la première et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est lavé à la soude (0,5N), à l'acide chlorhydrique (1N), à l'eau puis séché sur sulfate de magnésium et évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne puis lavé à chaud dans l'heptane.

N3-(1-Phényléthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide (5)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(±)-1-Phényléthylamine	0,22 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₃H₂₆N₂O₃

Masse molaire : 378,48 g.mol⁻¹

Rendement : 36 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,74

Aspect : solide blanc

Pf : 95-97°C

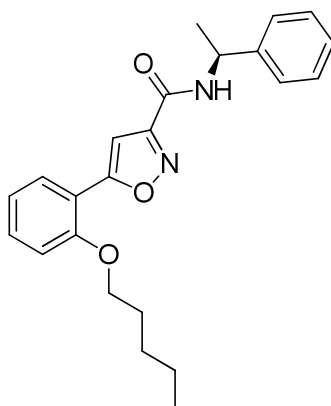
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9.28 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, NH) ; 7.89 (dd, 1H, *J* = 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.5 ; 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.43-7.40 (m, 2H, Har) ; 7.36-7.31 (m, 2H, Har) ; 7.27-7.21 (m, 2H, Har) ; 7.12 (td, 1H, *J* = 7.6 ; 0.9 Hz, Har) ; 7.05 (s, 1H, CH) ; 5.16 (quint, 1H, *J* = 7.4 Hz, CH) ; 4.16 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 1.82 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.49 (d, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃) ; 1.46-1.35 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 167.13 (CO) ; 159.94 (C) ; 158.36 (C) ; 155.91 (C) ; 144.65 (C) ; 132.78 (CHar) ; 128.75 (2CHar) ; 127.59 (CHar) ; 127.27 (CHar) ; 126.61 (2CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.22 (C) ; 113.45 (CHar) ; 102.97 (CH) ; 68.80 (CH₂) ; 48.86 (CH) ; 28.65 (CH₂) ; 28.26 (CH₂) ; 22.40 (CH₃) ; 22.28 (CH₂) ; 14.34 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 379.2 (MH⁺)

N3-((1S)-1-Phényléthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide (6)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(S)-(-)-1-Phényléthylamine	0,22 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₃H₂₆N₂O₃

Masse molaire : 378,48 g.mol⁻¹

Rendement : 36 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,74

Aspect : solide blanc

Pf : 95-97°C

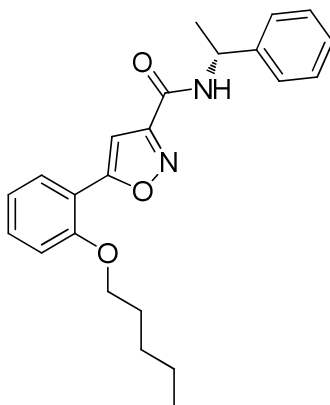
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9.28 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, NH) ; 7.90 (dd, 1H, *J* = 7.7 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.43-7.40 (m, 2H, Har) ; 7.36-7.31 (m, 2H, Har) ; 7.27-7.21 (m, 2H, Har) ; 7.12 (td, 1H, *J* = 7.6 ; 0.8 Hz, Har) ; 7.05 (s, 1H, CH) ; 5.16 (quint, 1H, *J* = 7.4 Hz, CH) ; 4.16 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, OCH₂) ; 1.82 (quint, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂) ; 1.49 (d, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃) ; 1.46-1.32 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 167.12 (CO) ; 159.94 (C) ; 158.35 (C) ; 155.90 (C) ; 144.65 (C) ; 132.77 (CHar) ; 128.75 (2CHar) ; 127.59 (CHar) ; 127.27 (CHar) ; 126.61 (2CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.21 (C) ; 113.44 (CHar) ; 102.97 (CH) ; 68.79 (CH₂) ; 48.85 (CH) ; 28.65 (CH₂) ; 28.26 (CH₂) ; 22.40 (CH₃) ; 22.28 (CH₂) ; 14.34 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 379.2 (MH⁺)

N3-((1R)-1-Phényléthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide (7)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(R)-(+)-1-Phényléthylamine	0,22 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₃H₂₆N₂O₃

Masse molaire : 378,48 g.mol⁻¹

Rendement : 35 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,74

Aspect : solide blanc

Pf : 95-97°C

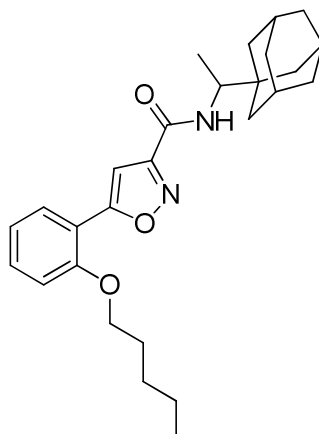
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9.28 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, NH) ; 7.90 (dd, 1H, *J* = 7.8 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.7 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.43-7.40 (m, 2H, Har) ; 7.36-7.31 (m, 2H, Har) ; 7.27-7.21 (m, 2H, Har) ; 7.11 (td, 1H, *J* = 7.7 ; 0.8 Hz, Har) ; 7.05 (s, 1H, CH) ; 5.16 (quint, 1H, *J* = 7.1 Hz, CH) ; 4.15 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, OCH₂) ; 1.82 (quint, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH₂) ; 1.49 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃) ; 1.46-1.34 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 167.13 (CO) ; 159.94 (C) ; 158.36 (C) ; 155.92 (C) ; 144.64 (C) ; 132.76 (CHar) ; 128.74 (2CHar) ; 127.60 (CHar) ; 127.27 (CHar) ; 126.61 (2CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.24 (C) ; 113.46 (CHar) ; 102.96 (CH) ; 68.81 (CH₂) ; 48.86 (CH) ; 28.65 (CH₂) ; 28.25 (CH₂) ; 22.38 (CH₃) ; 22.27 (CH₂) ; 14.33 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 379.2 (MH⁺)

N3-(1-Adamantyléthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide (8)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
1-(1-Adamantyl)éthylamine hydrochlorée	0,38 g	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₇H₃₆N₂O₃

Masse molaire : 436,60 g.mol⁻¹

Rendement : 31 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,84

Aspect : solide blanc

Pf : 108-110°C

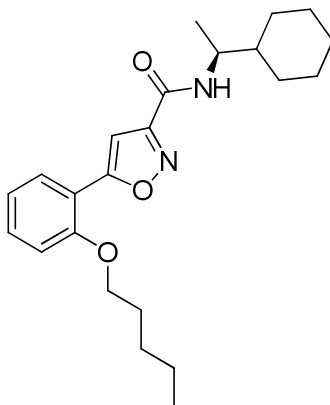
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.29 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, NH) ; 7.89 (dd, 1H, *J* = 7.8 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.3 ; 7.8 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.24 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, Har) ; 7.12 (td, 1H, *J* = 7.8 ; 0.7 Hz, Har) ; 7.05 (s, 1H, CH) ; 4.16 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 3.83-3.73 (m, 1H, CH) ; 1.94 (s, 3H, 3CH) ; 1.84 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.68-1.60 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.60-1.54 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.48-1.35 (m, 4H, 2CH₂) ; 1.07 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 166.91 (CO) ; 160.16 (C) ; 158.80 (C) ; 155.90 (C) ; 132.71 (CHar) ; 127.56 (CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.30 (C) ; 113.44 (CHar) ; 103.03 (CH) ; 68.80 (CH₂) ; 53.14 (CH) ; 38.35 (3CH₂) ; 37.08 (3CH₂) ; 36.55 (C) ; 28.68 (CH₂) ; 28.27 (CH₂) ; 28.25 (3CH) ; 22.30 (CH₂) ; 14.32 (CH₃) ; 14.22 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 437.3 (MH⁺)

N3-((1S)-1-Cyclohexyléthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide (9)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(S)-(+)-1-Cyclohexyléthylamine	0,25 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₃H₃₂N₂O₃

Masse molaire : 384,52 g.mol⁻¹

Rendement : 68 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,81

Aspect : solide blanc

Pf : 131-133°C

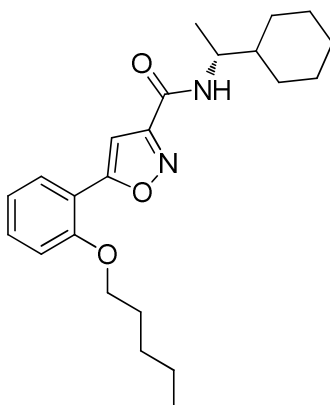
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.52 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NH) ; 7.89 (dd, 1H, *J* = 7.7 ; 1.6 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.7 ; 1.6 Hz, Har) ; 7.24 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, Har) ; 7.12 (td, 1H, *J* = 7.7 ; 0.8 Hz, Har) ; 7.04 (s, 1H, CH) ; 4.17 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, OCH₂) ; 3.85-3.78 (m, 1H, CH) ; 1.88-1.81 (m, 2H, CH₂) ; 1.79-1.62 (m, 5H, 2CH₂ + CH) ; 1.50-1.31 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.23-1.11 (m, 7H, 2CH₂ + CH₃) 0.90 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 166.99 (CO) ; 160.15 (C) ; 158.42 (C) ; 155.91 (C) ; 132.72 (CHar) ; 127.58 (CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.29 (C) ; 113.45 (CHar) ; 102.97 (CH) ; 68.81 (CH₂) ; 49.72 (CH) ; 42.55 (CH) ; 29.66 (CH₂) ; 29.48 (CH₂) ; 28.67 (CH₂) ; 28.29 (CH₂) ; 26.43 (CH₂) ; 26.12 (2CH₂) ; 22.30 (CH₂) ; 18.00 (CH₃) ; 14.34 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 385.2 (MH⁺)

N3-((1R)-1-Cyclohexyléthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide (10)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(S)-(+)-1-Cyclohexyléthylamine	0,25 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₃H₃₂N₂O₃

Masse molaire : 384,52 g.mol⁻¹

Rendement : 63 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,81

Aspect : solide blanc

Pf : 131-133°C

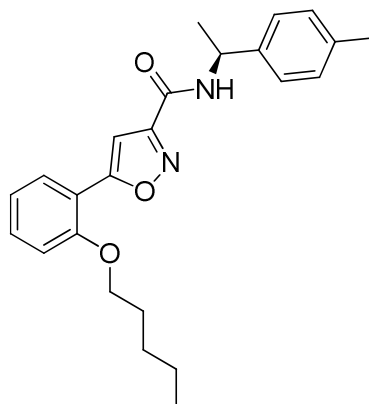
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.52 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NH) ; 7.89 (dd, 1H, *J* = 7.4 ; 1.6 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.4 ; 1.3 Hz, Har) ; 7.24 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Har) ; 7.11 (td, 1H, *J* = 7.4 ; 0.85 Hz, Har) ; 7.04 (s, 1H, CH) ; 4.17 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, OCH₂) ; 3.85-3.78 (m, 1H, CH) ; 1.88-1.81 (m, 2H, CH₂) ; 1.79-1.62 (m, 5H, 2CH₂ + CH) ; 1.50-1.31 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.23-1.11 (m, 7H, 3CH₂ + CH₃) 0.91 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 166.99 (CO) ; 160.15 (C) ; 158.42 (C) ; 155.90 (C) ; 132.72 (CHar) ; 127.58 (CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.29 (C) ; 113.45 (CHar) ; 102.97 (CH) ; 68.81 (CH₂) ; 49.72 (CH) ; 42.55 (CH) ; 29.66 (CH₂) ; 29.48 (CH₂) ; 28.67 (CH₂) ; 28.29 (CH₂) ; 26.43 (CH₂) ; 26.12 (2CH₂) ; 22.30 (CH₂) ; 18.00 (CH₃) ; 14.34 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 385.2 (MH⁺)

N3-((1S)-1-(4-Méthylphényl)éthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide
(11)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(S)-(-)-1-(4-Méthylphényl)éthylamine	0,26 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₄H₂₈N₂O₃

Masse molaire : 392,50 g.mol⁻¹

Rendement : 60 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,74

Aspect : solide blanc

Pf : 106-108°C

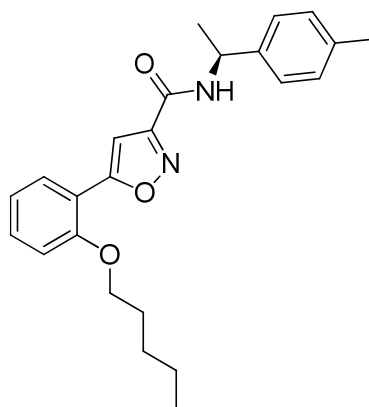
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9.21 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, NH) ; 7.90 (dd, 1H, *J* = 7.8 ; 1.6 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.4 ; 1.6 Hz, Har) ; 7.30-7.22 (m, 3H, Har) ; 7.14-7.09 (m, 3H, Har) ; 7.04 (s, 1H, CH) ; 5.12 (quint, 1H, *J* = 7.1 Hz, CH) ; 4.15 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 2.27 (s, 3H, CH₃) ; 1.82 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.46 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃) ; 1.44-1.32 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 167.10 (CO) ; 159.97 (C) ; 158.28 (C) ; 155.90 (C) ; 141.64 (C) ; 136.31 (C) ; 132.76 (CHar) ; 129.26 (2CHar) ; 127.58 (CHar) ; 126.55 (2CHar) ; 121.24 (CHar) ; 115.23 (C) ; 113.44 (CHar) ; 102.96 (CH) ; 68.80 (CH₂) ; 48.57 (CH) ; 28.65 (CH₂) ; 28.25 (CH₂) ; 22.37 (CH₃) ; 22.28 (CH₂) ; 21.09 (CH₃) ; 14.33 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 393.2 (MH⁺)

N3-((1R)-1-(4-Méthylphényl)éthyl)-5-(2-pentoxyphényl)-3-isoxazolecarboxamide
(12)



4	0,40 g	1,45 mmol	1 éq
(R)-(+)-1-(4-Méthylphényl)éthylamine	0,26 mL	1,74 mmol	1,2 éq
HOBt	0,10 g	0,73 mmol	0,5 éq
HBTU	0,83 g	2,18 mmol	1,5 éq
Triéthylamine	2,00 mL	14,3 mmol	9,9 éq
Chloroforme	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₄H₂₈N₂O₃

Masse molaire : 392,50 g.mol⁻¹

Rendement : 75 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,74

Aspect : solide blanc

Pf : 106-108°C

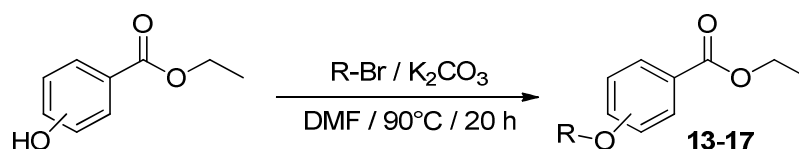
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9.21 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH) ; 7.89 (dd, 1H, *J* = 7.7 ; 1.9 Hz, Har) ; 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.5 ; 1.9 Hz, Har) ; 7.30-7.22 (m, 3H, Har) ; 7.14-7.09 (m, 3H, Har) ; 7.04 (s, 1H, CH) ; 5.12 (quint, 1H, *J* = 7.5 Hz, CH) ; 4.15 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, OCH₂) ; 2.27 (s, 3H, CH₃) ; 1.82 (quint, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂) ; 1.46 (d, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃) ; 1.44-1.32 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 167.09 (CO) ; 159.97 (C) ; 158.28 (C) ; 155.90 (C) ; 141.64 (C) ; 136.30 (C) ; 132.76 (CHar) ; 129.26 (2CHar) ; 127.58 (CHar) ; 126.55 (2CHar) ; 121.23 (CHar) ; 115.23 (C) ; 113.44 (CHar) ; 102.96 (CH) ; 68.80 (CH₂) ; 48.57 (CH) ; 28.65 (CH₂) ; 28.25 (CH₂) ; 22.36 (CH₃) ; 22.28 (CH₂) ; 21.09 (CH₃) ; 14.33 (CH₃).

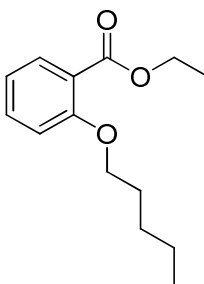
LCMS (APCI⁺) *m/z* 393.2 (MH⁺)

Mode opératoire général des réactions d'O-alkylation – composés **13-17**



L'hydroxybenzoate d'éthyle est mis en solution dans le DMF. Le carbonate de potassium est ensuite introduit dans le milieu réactionnel qui est chauffé à 90°C. Puis, le bromoalcane correspondant est introduit. Le mélange est chauffé sous agitation à 90°C pendant 20 heures. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de la soude (2N) et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite.

2-Pentoxybenzoate d'éthyle (**13**)



Salicylate d'éthyle	3,60 mL	24,5 mmol	1 éq
Carbonate de potassium	5,00 g	36,2 mmol	1,5 éq
1-bromopentane	3,40 mL	27,2 mmol	1,1 éq
DMF	40 mL		

Formule brute : C₁₄H₂₀O₃

Masse molaire : 236,31 g.mol⁻¹

Rendement : 95 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,83

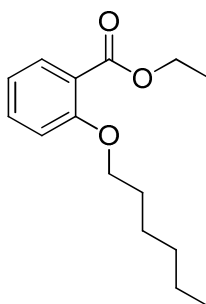
Aspect : huile jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 7.60 (dd, 1H, *J* = 7.5 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.47 (td, 1H, *J* = 7.5 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.08 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, Har) ; 6.97 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, Har) ; 4.24 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 3.98 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, OCH₂) ; 1.69 (quint, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂) ; 1.44-1.25 (m, 7H, CH₃ + 2CH₂) ; 0.87 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 237.2 (MH⁺)

2-Hexyloxybenzoate d'éthyle (**14**)



Salicylate d'éthyle	4,76 mL	32,4 mmol	1 éq
Carbonate de potassium	6,71 g	48,6 mmol	1,5 éq
1-Bromohexane	5,00 mL	35,6 mmol	1,1 éq
DMF	40 mL		

Formule brute : C₁₅H₂₂O₃

Masse molaire : 250,34 g.mol⁻¹

Rendement : 97 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,87

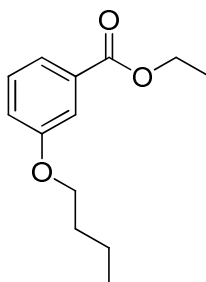
Aspect : huile jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.62 (dd, 1H, J = 7.4 ; 1.8 Hz, Har) ; 7.46 (ddd, 1H, J = 8.5 ; 7.4 ; 1.8 Hz, Har) ; 7.06 (d, 1H, J = 8.5 Hz, Har) ; 6.97 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Har) ; 4.24 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH₂) ; 3.97 (t, 2H, J = 6.9 Hz, OCH₂) ; 1.68 (quint, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.48-1.38 (m, 2H, CH₂) ; 1.30-1.25 (m, 7H, CH₃ + 2CH₂) ; 0.85 (t, 3H, J = 6.9 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) m/z 251.2 (MH⁺)

3-Butoxybenzoate d'éthyle (15)



3-Hydroxybenzoate d'éthyle	3,64 g	21,9 mmol	1 éq
Carbonate de potassium	3,92 g	28,4 mmol	1,3 éq
1-Bromobutane	2,60 mL	24,1 mmol	1,1 éq
DMF	25 mL		

Formule brute : C₁₃H₁₈O₃

Masse molaire : 222,29 g.mol⁻¹

Rendement : 98 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,81

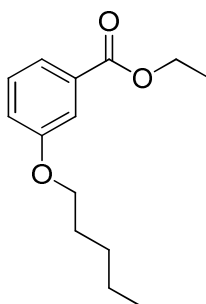
Aspect : huile jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.52 (dt, 1H, *J* = 7.7 ; 1.3 Hz, Har) ; 7.42-7.41 (m, 1H, Har) ; 7.39 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, Har) ; 7.18 (ddd, 1H, *J* = 7.7 ; 2.6 ; 1.3 Hz, Har) ; 4.29 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂) ; 3.98 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂) ; 1.68 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.42 (sextuplet, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃) ; 0.91 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 223.1 (MH⁺)

3-Pentoxybenzoate d'éthyle (**16**)



3-Hydroxybenzoate d'éthyle	3,14 g	18,9 mmol	1 éq
Carbonate de potassium	3,92 g	28,4 mmol	1,5 éq
1-Bromopentane	2,60 mL	20,8 mmol	1,1 éq
DMF	25 mL		

Formule brute : C₁₄H₂₀O₃

Masse molaire : 236,31 g.mol⁻¹

Rendement : 94 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,81

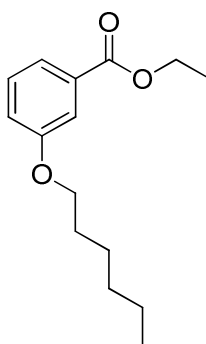
Aspect : huile jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.52 (dt, 1H, *J* = 7.8 ; 1.2 Hz, Har) ; 7.42-7.41 (m, 1H, Har) ; 7.39 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, Har) ; 7.16 (ddd, 1H, *J* = 7.8 ; 2.7 ; 1.2 Hz, Har) ; 4.28 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂) ; 3.96 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 1.69 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.39-1.32 (m, 4H, 2CH₂) ; 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃) ; 0.87 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 237.1 (MH⁺)

3-Hexyloxybenzoate d'éthyle (17)



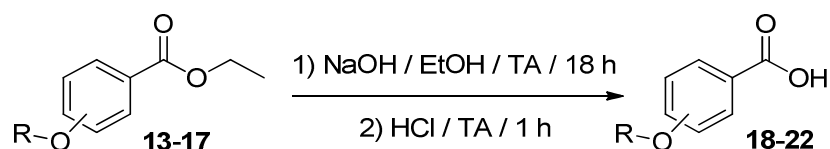
3-Hydroxybenzoate d'éthyle	5,38 g	32,4 mmol	1 éq
Carbonate de potassium	6,71 g	48,6 mmol	1,5 éq
1-Bromohexane	5,00 mL	35,6 mmol	1,1 éq
DMF	25 mL		

Données spectroscopiques

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 7.51 (dt, 1H, $J = 7.8 ; 1.1$ Hz, Har) ; 7.42-7.41 (m, 1H, Har) ; 7.39 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, Har) ; 7.17 (ddd, 1H, $J = 7.8 ; 2.7 ; 1.1$ Hz, Har) ; 4.28 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH₂) ; 3.96 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, OCH₂) ; 1.68 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH₂) ; 1.43-1.33 (m, 2H, CH₂) ; 1.32-1.24 (m, 7H, CH₃ + 2CH₂) ; 0.85 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz, CH₃).

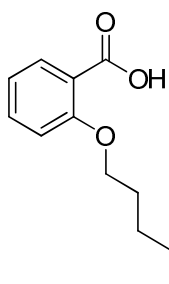
LCMS (APCI⁺) m/z 251.2 (MH⁺)

Mode opératoire général des réactions de saponification – composés 18-22



L'hydroxyde de sodium est solubilisé dans l'éthanol. Le benzoate d'éthyle est ensuite ajouté et le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures à température ambiante. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de l'acide chlorhydrique (3N) et la solution est agitée pendant 1 heure à température ambiante. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est recristallisé dans l'heptane.

Acide 2-pentoxybenzoïque (18)



13	3,51 g	14,9 mmol	1 éq
Hydroxyde de sodium	6,56 g	164 mmol	11 éq
EtOH	150 mL		

Formule brute : C₁₂H₁₆O₃

Masse molaire : 208,26 g.mol⁻¹

Rendement : 86 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (5:5)) : 0,81

Aspect : solide blanc

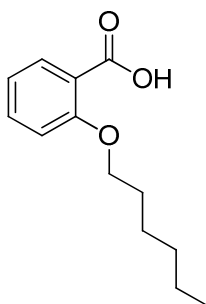
Pf : 142-144°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.18 (dd, 1H, *J* = 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.55 (td, 1H, *J* = 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.10 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Har) ; 6.97 (t, 1H, *J* = 7.6, Har) ; 4.25 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, OCH₂) ; 1.95-1.91 (m, 2H, CH₂) ; 1.48-1.43 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.95 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 209.2 (MH⁺)

Acide 2-hexyloxybenzoïque (19)



14	8,84 g	35,3 mmol	1 éq
Hydroxyde de sodium	15,54 g	388 mmol	11 éq
EtOH	120 mL		

Formule brute : C₁₃H₁₈O₃

Masse molaire : 222,29 g.mol⁻¹

Rendement : 92 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,86

Aspect : solide blanc

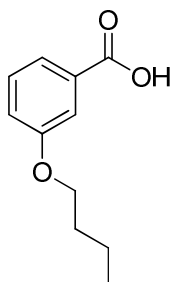
Pf : 171-173°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.45 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 7.23 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 6.93 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 6.85 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 3.95 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, OCH₂) ; 1.65 (quint, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH₂) ; 1.40-1.33 (m, 2H, CH₂) ; 1.28-1.23 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.86 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 223.2 (MH⁺)

Acide 3-butoxybenzoïque (20)



15	5,50 g	24,7 mmol	1 éq
Hydroxyde de sodium	8,90 g	223 mmol	9 éq
EtOH	150 mL		

Formule brute : C₁₁H₁₄O₃

Masse molaire : 194,23 g.mol⁻¹

Rendement : 94 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,57

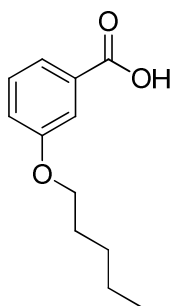
Aspect : huile jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.51-7.49 (m, 2H, Har) ; 7.21 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, Har) ; 6.92 (ddd, 1H, *J* = 8.1 ; 2.5 ; 0.7 Hz, Har) ; 3.90 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 1.65 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.39 (sextuplet, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 195.3 (MH⁺)

Acide 3-pentoxybenzoïque (21)



16	3,39 g	14,4 mmol	1 éq
Hydroxyde de sodium	6,31 g	158 mmol	11 éq
EtOH	150 mL		

Formule brute : C₁₂H₁₆O₃

Masse molaire : 208,26 g.mol⁻¹

Rendement : 73 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,56

Aspect : solide blanc

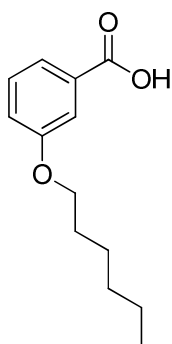
Pf : 199-201°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.52-7.48 (m, 2H, Har) ; 7.24 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, Har) ; 6.96 (ddd, 1H, *J* = 8.0 ; 2.7 ; 1.0 Hz, Har) ; 3.99 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 1.78 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.52-1.37 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.95 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 209.3 (MH⁺)

Acide 3-hexyloxybenzoïque (22)



17	7,58 g	30,2 mmol	1 éq
Hydroxyde de sodium	13,31 g	333 mmol	11 éq
EtOH	150 mL		

Formule brute : C₁₃H₁₈O₃

Masse molaire : 222,29 g.mol⁻¹

Rendement : 85 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,84

Aspect : solide blanc

Pf : 173-175°C

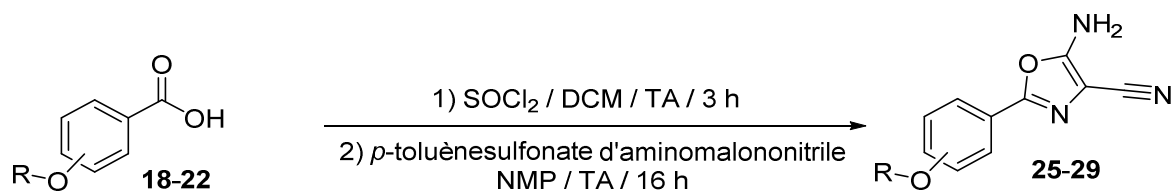
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 13.05 (s, 1H, OH) ; 7.52 (dt, 1H, *J* = 7.8 ; 1.22 Hz, Har) ; 7.43-4.41 (m, 1H, Har) ; 7.38 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, Har) ; 7.16 (ddd, 1H, *J* = 7.8 ; 2.6 ; 1.2 Hz, Har) ; 4.00 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂) ; 1.72 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.44-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.34-1.28 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 223.1 (MH⁺)

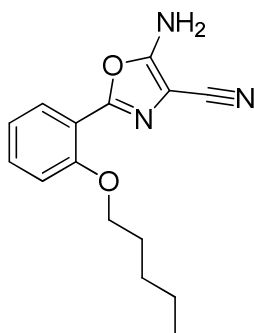
Mode opératoire général des réactions de cyclisation en oxazole – composés

25-29



L'acide carboxylique est dissous dans le dichlorométhane et le chlorure de thionyle est ajouté au milieu réactionnel. Celui-ci est laissé sous agitation à température ambiante, sous azote, pendant 3 heures. Le dichlorométhane et le chlorure de thionyle excédentaire sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est dissous dans la NMP et le *p*-toluènesulfonate d'aminomalononitrile est ajouté à la solution. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante, sous azote, pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec de l'eau et le produit est extrait deux fois avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est recristallisé dans le chloroforme.

2-(2-Pentoxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (25)



18	1,92 g	9,22 mmol	1,6 éq
Chlorure de thionyle	5,00 mL	68,9 mmol	11 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,50 g	5,92 mmol	1 éq
Dichlorométhane	10 mL		
NMP	15 mL		

Formule brute : C₁₅H₁₇N₃O₂

Masse molaire : 271,32 g.mol⁻¹

Rendement : 68 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,43

Aspect : solide blanc

Pf : 132-134°C

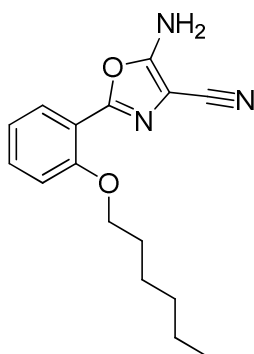
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.79 (s, 2H, NH₂) ; 7.62 (dd, 1H, *J* = 7.8 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.43 (ddd, 1H, *J* = 8.6 ; 7.8 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.15 (d, 1H, *J*₁ = 8.6 Hz, Har) ; 7.02 (td, 1H, *J* = 7.8 ; 0.64 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, OCH₂) ; 1.74 (quint, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂) ; 1.45-1.30 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.89 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.57 (C) ; 156.96 (C) ; 148.62 (C) ; 132.10 (CHar) ; 129.76 (CHar) ; 120.94 (CHar) ; 116.10 (C) ; 115.92 (C) ; 114.03 (CHar) ; 84.42 (CN) ; 68.83 (CH₂) ; 28.68 (CH₂) ; 28.07 (CH₂) ; 22.29 (CH₂) ; 14.39 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 272.1 (MH⁺)

2-(2-Hexyloxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (26)



19	4,00 g	16,0 mmol	2,2 éq
Chlorure de thionyle	3,91 mL	47,9 mmol	6,6 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	2,00 g	7,26 mmol	1 éq
Dichlorométhane	15 mL		
NMP	20 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₉N₃O₂

Masse molaire : 285,35 g.mol⁻¹

Rendement : 61 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,61

Aspect : solide blanc

Pf : 125-127°C

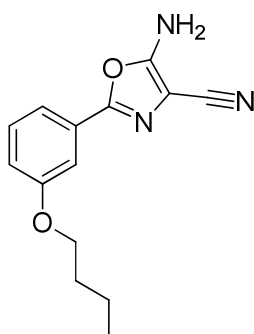
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.79 (s, 2H, NH₂) ; 7.61 (dd, 1H, *J* = 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.43 (ddd, 1H, *J* = 8.0 ; 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.15 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Har) ; 7.02 (td, 1H, *J* = 7.6 ; 0.9 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂) ; 1.73 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.49-1.39 (m, 2H, CH₂) ; 1.31-1.29 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.87 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.57 (C) ; 156.96 (C) ; 148.58 (C) ; 132.09 (CHar) ; 129.75 (CHar) ; 120.92 (CHar) ; 116.08 (C) ; 115.92 (C) ; 114.03 (CHar) ; 84.43 (CN) ; 68.85 (CH₂) ; 31.39 (CH₂) ; 28.94 (CH₂) ; 25.53 (CH₂) ; 22.51 (CH₂) ; 14.33 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 286.2 (MH⁺)

2-(3-Butoxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (27)



20	5,00 g	25,7 mmol	2,2 éq
Chlorure de thionyle	5,60 mL	77,2 mmol	6,6 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	2,96 g	11,7 mmol	1 éq
Dichlorométhane	10 mL		
NMP	15 mL		

Formule brute : C₁₄H₁₅N₃O₂

Masse molaire : 257,29 g.mol⁻¹

Rendement : 63 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,50

Aspect : solide blanc

Pf : 192-194°C

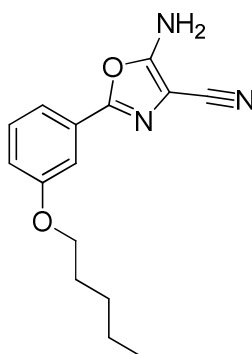
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.98 (s, 2H, NH₂) ; 7.42-7.31 (m, 2H, Har) ; 7.23-7.22 (m, 1H, Har) ; 7.04-7.01 (m, 1H, Har) ; 4.01 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, OCH₂) ; 1.71 (quint, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH₂) ; 1.50-1.38 (m, 2H, CH₂) ; 0.94 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.75 (C) ; 156.46 (C) ; 149.67 (C) ; 130.86 (CHar) ; 127.61 (C) ; 177.65 (CHar) ; 117.15 (CHar) ; 115.82 (C) ; 110.63 (CHar) ; 84.63 (CN) ; 67.80 (CH₂) ; 31.13 (CH₂) ; 19.15 (CH₂) ; 14.15 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 258.1 (MH⁺)

2-(3-Pentoxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (28)



21	1,90 g	9,12 mmol	2,2 éq
Chlorure de thionyle	1,98 mL	27,4 mmol	6,6 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,05 g	4,15 mmol	1 éq
Dichlorométhane	10 mL		
NMP	10 mL		

Formule brute : C₁₅H₁₇N₃O₂

Masse molaire : 271,32 g.mol⁻¹

Rendement : 60 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,51

Aspect : solide blanc

Pf : 188-190°C

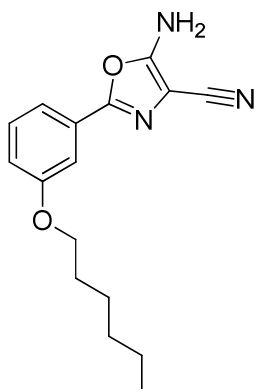
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.98 (s, 2H, NH₂) ; 7.42-7.31 (m, 2H, Har) ; 7.25-7.24 (m, 1H, Har) ; 7.04-7.01 (m, 1H, Har) ; 4.01 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂) ; 1.73 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.43-1.32 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.75 (C) ; 156.45 (C) ; 149.67 (C) ; 130.68 (CHar) ; 127.60 (C) ; 177.65 (CHar) ; 117.13 (CHar) ; 115.82 (C) ; 110.63 (CHar) ; 84.63 (CN) ; 68.08 (CH₂) ; 28.76 (CH₂) ; 28.11 (CH₂) ; 22.34 (CH₂) ; 14.38 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 272.2 (MH⁺)

2-(3-Pentoxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (29)



22	4,00 g	18,0 mmol	2,2 éq
Chlorure de thionyle	3,91 mL	54,0 mmol	6,6 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	2,07 g	8.17 mmol	1 éq
Dichlorométhane	10 mL		
NMP	15 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₉N₃O₂

Masse molaire : 285,35 g.mol⁻¹

Rendement : 72 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,53

Aspect : solide blanc

Pf : 188-190°C

Données spectroscopiques

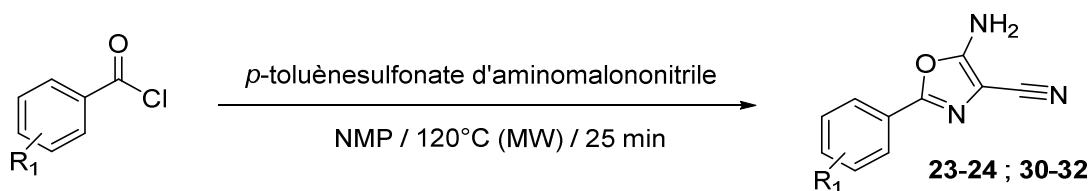
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.99 (s, 2H, NH₂) ; 7.42-7.37 (m, 1H, Har) ; 7.34-7.31 (m, 1H, Har) ; 7.25-7.24 (m, 1H, Har) ; 7.03 (ddd, 1H, *J* = 8.0 ; 2.5 ; 1.1, Har) ; 4.01 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 1.72 (quint, 2H, *J* = 6.5 Hz, CH₂) ; 1.44-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.33-1.28 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.75 (C) ; 156.45 (C) ; 149.67 (C) ; 130.87 (CHar) ; 127.60 (C) ; 177.65 (CHar) ; 117.15 (CHar) ; 115.82 (C) ; 110.63 (CHar) ; 84.62 (CN) ; 68.09 (CH₂) ; 31.44 (CH₂) ; 29.03 (CH₂) ; 25.59 (CH₂) ; 22.53 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 286.2 (MH⁺)

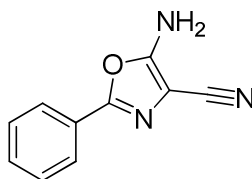
Mode opératoire général des réactions de cyclisation en oxazole (micro-ondes)

– composés **23-24** et **30-32**



Le chlorure d'acyle est dissous dans la NMP et le *p*-toluènesulfonate d'aminomalononitrile est ajouté à la solution. Le milieu réactionnel est chauffé à 120°C par micro-ondes pendant 25 minutes à 150 Watts. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec de l'eau et le produit est extrait deux fois avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est recristallisé à chaud dans le chloroforme.

2-Phényl-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (**23**)



Chlorure de benzoyle	0,52 mL	4,45 mmol	1,1 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,00 g	3,95 mmol	1 éq
NMP	8 mL		

Formule brute : C₁₀H₇N₃O

Masse molaire : 185,19 g.mol⁻¹

Rendement : 68 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,35

Aspect : solide blanc

Pf : 225-227°C

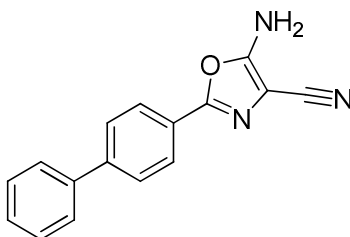
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.98 (s, 2H, NH₂) ; 7.77 (dd, 2H, *J* = 8.0 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.51-7.48 (m, 3H, Har).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.79 (C) ; 149.84 (C) ; 130.48 (CHar) ; 129.61 (2CHar) ; 126.43 (C) ; 125.41 (2CHar) ; 115.87 (C) ; 84.65 (CN).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 186.1 (MH⁺)

2-(4-Biphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (24)



Chlorure de 4-biphénylcabonyle	1,54 g	7,11 mmol	1,7 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,01 g	4,24 mmol	1 éq
NMP	20 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₁N₃O

Masse molaire : 261,29 g.mol⁻¹

Rendement : 63 %

R_f (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,24

Aspect : solide blanc

Pf : 270-272°C

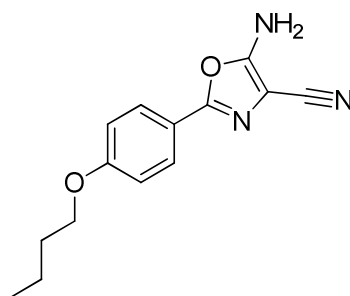
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.03 (s, 2H, NH₂) ; 7.87-7.80 (m, 4H, Har) ; 7.74-7.72 (m, 2H, Har) ; 7.52-7.47 (m, 2H, Har) ; 7.43-7.38 (m, 1H, Har).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.83 (C) ; 149.69 (C) ; 141.85 (C) ; 139.45 (C) ; 129.54 (2Char) ; 128.50 (Char) ; 127.79 (2Char) ; 127.12 (2Char) ; 126.00 (2Char) ; 125.36 (C) ; 115.89 (C) ; 84.81 (CN).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 262.1 (MH⁺)

2-(4-Butoxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (30)



Chlorure de 4-butoxybenzoyle	1,93 mL	8,69 mmol	2,2 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,00 g	3,95 mmol	1 éq
NMP	10 mL		

Formule brute : C₁₄H₁₅N₃O₂

Masse molaire : 257,29 g.mol⁻¹

Rendement : 78 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,48

Aspect : solide blanc

Pf : 205-207°C

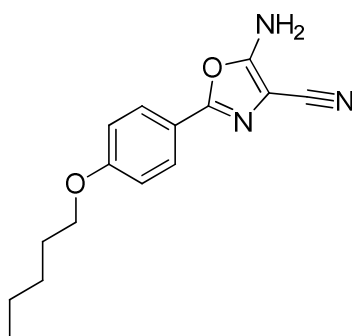
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.85 (s, 2H, NH₂) ; 7.68 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 7.04 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 4.02 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, OCH₂) ; 1.71 (quint, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂) ; 1,44 (sextuplet, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂) ; 0.93 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.53 (C) ; 160.57 (C) ; 150.09 (C) ; 127.18 (2CHar) ; 118.92 (C) ; 116.07 (C) ; 115.50 (2CHar) ; 84.22 (CN) ; 67.88 (CH₂) ; 31.08 (CH₂) ; 19.15 (CH₂) ; 14.13 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 258.0 (MH⁺)

2-(4-Pentoxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (31)



Chlorure de 4-pentoxybenzoyle	1,50 mL	7,19 mmol	1,8 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,00 g	3,95 mmol	1 éq
NMP	15 mL		

Formule brute : C₁₅H₁₇N₃O₂

Masse molaire : 271,32 g.mol⁻¹

Rendement : 77 %

R_f (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,17

Aspect : solide jaune

Pf : 220-222°C

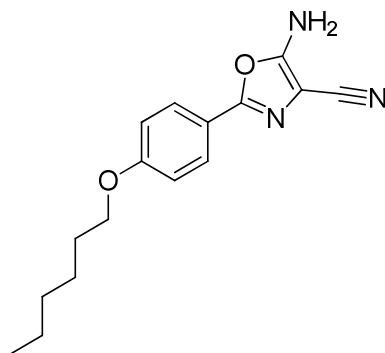
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.86 (s, 2H, NH₂) ; 7.69 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 7.04 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 4.01 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂) ; 1.72 (quint, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂) ; 1.42-1.33 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.54 (C) ; 160.57 (C) ; 150.10 (C) ; 127.19 (2CHar) ; 118.92 (C) ; 116.06 (C) ; 115.50 (2CHar) ; 84.23 (CN) ; 68.16 (CH₂) ; 28.72 (CH₂) ; 28.11 (CH₂) ; 22.32 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 272.2 (MH⁺)

2-(4-Hexyloxyphényl)-5-amino-oxazole-4-carbonitrile (32**)**



Chlorure de 4-hexyloxybenzoyle	1,93 mL	8,69 mmol	2,2 éq
<i>p</i> -Toluènesulfonate d'aminomalononitrile	1,00 g	3,95 mmol	1 éq
NMP	10 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₉N₃O₂

Masse molaire : 285,35 g.mol⁻¹

Rendement : 66 %

R_f (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,51

Aspect : solide blanc

Pf : 201-203°C

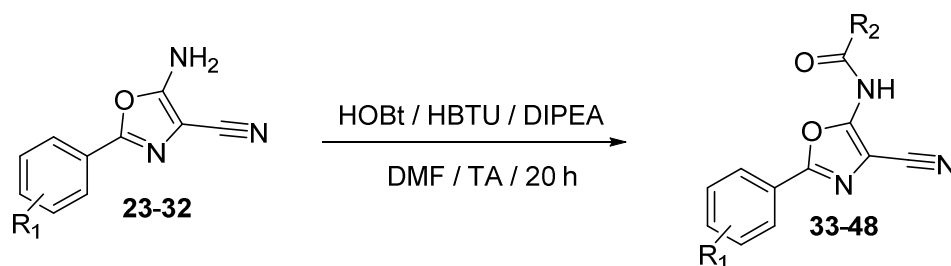
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 7.86 (s, 2H, NH₂) ; 7.68 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Har) ; 7.03 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Har) ; 4.01 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, OCH₂) ; 1.72 (quint, 2H, *J* = 6.7Hz, CH₂) ; 1.44-1.36 (m, 2H, CH₂) ; 1.35-1.27 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.53 (C) ; 160.56 (C) ; 150.09 (C) ; 127.18 (2CHar) ; 118.91 (C) ; 116.06 (C) ; 115.49 (2CHar) ; 84.22 (CN) ; 68.17 (CH₂) ; 31.43 (CH₂) ; 28.99 (CH₂) ; 25.59 (CH₂) ; 22.53 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

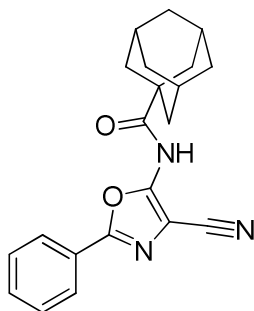
LCMS (APCI⁺) *m/z* 286.2 (MH⁺)

Mode opératoire général des réactions d'amidification – composés 33-48



L'acide carboxylique est solubilisé dans le DMF et la solution est refroidie à 0°C. L'HOBt, l'HBTU et la moitié de la DIPEA sont ajoutés au milieu réactionnel. Dans un second ballon, le 5-amino-oxazole-4-carbonitrile est dissous dans du DMF et le reste de DIPEA est ajouté à cette solution. Après 45 minutes, la deuxième solution est ajoutée à la première et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est solubilisé dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à la soude (0,5N), à l'acide chlorhydrique (1N), à l'eau puis séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne et recristallisé dans l'éthanol.

N-(4-Cyano-2-phényloxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**33**)



23	0,27 g	1,46 mmol	1,2 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,22 g	1,22 mmol	1 éq
HOBt	0,08 g	0,59 mmol	0,5 éq
HBTU	0,70 g	1,85 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,14 mL	12,3 mmol	10,1 éq
DMF	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₁H₂₁N₃O₂

Masse molaire : 347,42 g.mol⁻¹

Rendement : 31 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,53

Aspect : solide blanc

Pf : 248-250°C

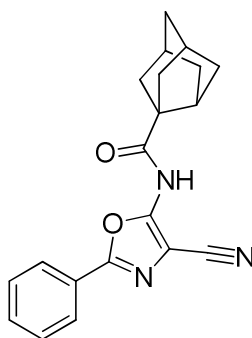
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.35 (s, 1H, NH) ; 7.93 (dd, 2H, *J* = 6.8 ; 3.7 Hz, Har) ; 7.59-7.57 (m, 3H, Har) ; 2.04 (s, 3H, 3CH) ; 1.94 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.71 (s, 6H, 3CH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.87 (CO) ; 154.79 (C) ; 151.79 (C) ; 131.85 (CHar) ; 129.82 (2CHar) ; 126.39 (2CHar) ; 125.65 (C) ; 113.88 (CN) ; 100.04 (C) ; 41.54 (C) ; 38.12 (3CH₂) ; 36.24 (3CH₂) ; 27.88 (3CH).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 348.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-phényloxazol-5-yl)noradamantane-3-carboxamide (**34**)



23	0,40 g	2,16 mmol	1,1 éq
Acide 3-noradamantylcarboxylique	0,33 g	1,99 mmol	1 éq
HOBt	0,13 g	0,96 mmol	0,5 éq
HBTU	1,11 g	2,93 mmol	1,5 éq
DIPEA	3,60 mL	20,7 mmol	10,4 éq
DMF	25 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₀H₁₉N₃O₂

Masse molaire : 333,14 g.mol⁻¹

Rendement : 24 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,49

Aspect : solide blanc

Pf : 241-243°C

Données spectroscopiques

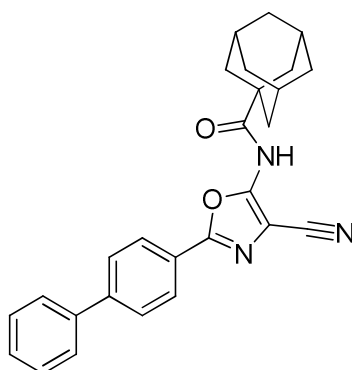
RMN ¹

H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.32 (s, 1H, NH) ; 7.94 (dd, 2H, *J* = 6.1 ; 3.2 Hz, Har) ; 7.59-7.57 (m, 3H, Har) ; 2.76 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, CH) ; 2.32 (s, 2H, 2CH) ; 2.05-1.85 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.64-1.60 (m, 4H, 2CH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.90 (CO) ; 154.85 (C) ; 151.56 (C) ; 131.88 (CHar) ; 129.83 (2CHar) ; 126.42 (2CHar) ; 125.63 (C) ; 113.90 (CN) ; 100.21 (C) ; 55.78 (C) ; 46.67 (2CH₂) ; 43.48 (2CH₂) ; 42.83 (CH₂) ; 37.41 (2CH) ; 34.55 (CH).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 334.1 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-biphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**35**)



24	0,30 g	1,15 mmol	1,0 éq
Acide 1-adamantyicarboxylique	0,20 g	1,11 mmol	1 éq
HOBt	0,08 g	0,59 mmol	0,5 éq
HBTU	0,61 g	1,61 mmol	1,5 éq
DIPEA	1,84 mL	10,6 mmol	9,5 éq
DMF	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₇H₂₅N₃O₂

Masse molaire : 423,52 g.mol⁻¹

Rendement : 19 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,55

Aspect : solide blanc

Pf : 255-257°C

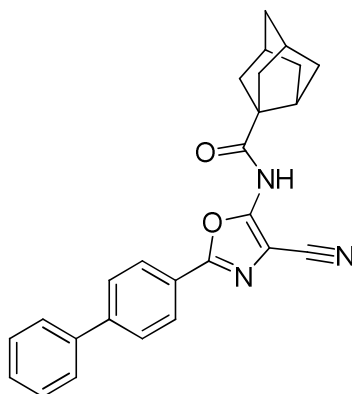
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.38 (s, 1H, NH) ; 8.01 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, Har) ; 7.90 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, Har) ; 7.76 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, Har) ; 7.52 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Har) ; 7.45-7.40 (m, 1H, Har) ; 2.05 (s, 3H, 3CH) ; 1.95 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.72 (s, 6H, 3CH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.79 (CO) ; 154.70 (C) ; 150.96 (C) ; 143.21 (C) ; 139.25 (C) ; 129.60 (2CHar) ; 128.78 (CHar) ; 127.98 (2CHar) ; 127.26 (2CHar) ; 127.02 (2CHar) ; 124.52 (C) ; 113.85 (CN) ; 105.47 (C) ; 41.55 (C) ; 38.10 (3CH₂) ; 36.23 (3CH₂) ; 27.87 (3CH).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 424.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-biphényl)oxazol-5-yl)noradamantane-3-carboxamide (**36**)



24	0,40 g	1,53 mmol	1,1 éq
Acide 3-noradamantylcarboxylique	0,23 g	1,38 mmol	1 éq
HOBt	0,10 g	0,74 mmol	0,5 éq
HBTU	0,79 g	2,08 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,40 mL	13,8 mmol	10,0 éq
DMF	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₆H₂₃N₃O₂

Masse molaire : 409,49 g.mol⁻¹

Rendement : 18 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,58

Aspect : solide blanc

Pf : 289-291°C

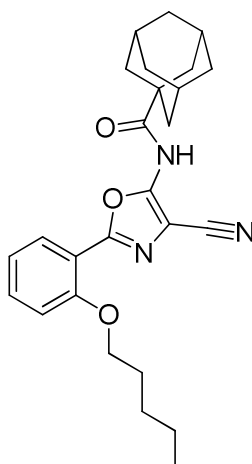
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.34 (s, 1H, NH) ; 8.02 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Har) ; 7.90 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Har) ; 7.76 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 7.51 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, Har) ; 7.45-7.40 (m, 1H, Har) ; 2.77 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, CH) ; 2.32 (s, 2H, 2CH) ; 2.06-1.85 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.65-1.61 (m, 4H, 2CH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.88 (CO) ; 154.68 (C) ; 151.55 (C) ; 143.21 (C) ; 139.24 (C) ; 129.59 (2CHar) ; 128.77 (CHar) ; 127.98 (2CHar) ; 127.25 (2CHar) ; 127.04 (2CHar) ; 124.52 (C) ; 113.92 (CN) ; 100.28 (C) ; 55.78 (C) ; 46.68 (2CH₂) ; 43.49 (2CH₂) ; 42.84 (CH₂) ; 37.42 (2CH) ; 34.56 (CH).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 410.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(2-pentoxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**37**)



25	0,25 g	0,92 mmol	1,1 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,15 g	0,84 mmol	1 éq
HOBt	0,06 g	0,42 mmol	0,5 éq
HBTU	0,48 g	1,26 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,03 mL	11,7 mmol	18,8 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₆H₃₁N₃O₃

Masse molaire : 433,56 g.mol⁻¹

Rendement : 27 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,72

Aspect : solide blanc

Pf : 142-144°C

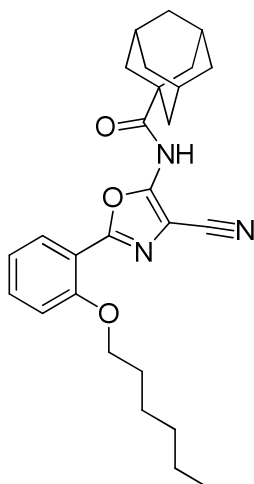
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.11 (s, 1H, NH) ; 7.75 (dd, 1H, *J* = 7.5 ; 1.8 Hz, Har) ; 7.53 (ddd, 1H, *J* = 8.5 ; 7.5 ; 1.8 Hz, Har) ; 7.21 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, Har) ; 7.08 (td, 1H, *J* = 7.5 ; 0.8 Hz, Har) ; 4.08 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, OCH₂) ; 2.03 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.76-1.71 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.46-1.38 (m, 2H, CH₂) ; 1.36-1.28 (m, 2H, CH₂) ; 0.87 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.98 (CO) ; 157.48 (C) ; 154.38 (C) ; 151.47 (C) ; 133.49 (CHar) ; 130.46 (CHar) ; 121.05 (CHar) ; 114.84 (C) ; 114.08 (CHar) ; 113.75 (CN) ; 100.90 (C) ; 68.93 (CH₂) ; 41.50 (C) ; 38.15 (3CH₂) ; 36.24 (3CH₂) ; 26.68 (CH₂) ; 28.17 (CH₂) ; 27.88 (3CH) ; 22.34 (CH₂) ; 14.36 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 434.5 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(2-hexyloxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**38**)



26	0,58 g	2,03 mmol	1,1 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,33 g	1,83 mmol	1 éq
HOBt	0,12 g	0,89 mmol	0,5 éq
HBTU	1,04 g	2,74 mmol	1,5 éq
DIPEA	4,44 mL	33,4 mmol	18,8 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₇H₃₃N₃O₃

Masse molaire : 447,58 g.mol⁻¹

Rendement : 22 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,70

Aspect : solide blanc

Pf : 109-111°C

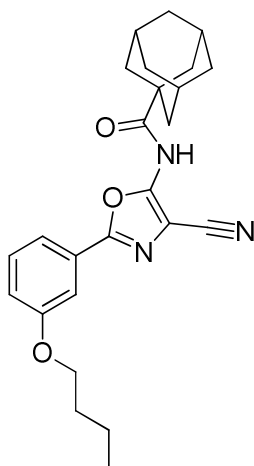
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.12 (s, 1H, NH) ; 7.76 (dd, 1H, *J* = 7.7 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.5 ; 7.5 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.21 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, Har) ; 7.08 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, Har) ; 4.08 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, OCH₂) ; 2.03 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.75-1.61 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.49-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.30-1.25 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.85 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.96 (CO) ; 157.48 (C) ; 154.39 (C) ; 151.48 (C) ; 133.50 (CHar) ; 130.48 (CHar) ; 121.05 (CHar) ; 114.85 (C) ; 114.07 (CHar) ; 113.73 (CN) ; 100.89 (C) ; 68.95 (CH₂) ; 41.51 (C) ; 38.16 (3CH₂) ; 36.24 (3CH₂) ; 31.50 (CH₂) ; 28.96 (CH₂) ; 27.89 (3CH) ; 25.68 (CH₂) ; 22.52 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 448.7 (MH⁺)

***N*-(4-Cyano-2-(3-butoxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (39)**



27	0,30 g	1,17 mmol	1,2 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,18 g	1,00 mmol	1 éq
HOBt	0,07 g	0,52 mmol	0,5 éq
HBTU	0,57 g	1,50 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,44 mL	18,3 mmol	18,3 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₅H₂₉N₃O₃

Masse molaire : 419,53 g.mol⁻¹

Rendement : 21 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,67

Aspect : solide blanc

Pf : 193-195°C

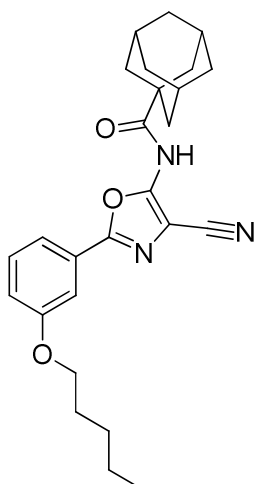
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.33 (s, 1H, NH) ; 7.48-7.46 (m, 2H, Har) ; 7.41-7.39 (m, 1H, Har) ; 7.14 (td, 1H, *J* = 6.7 ; 2.7 Hz, Har) ; 4.05 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, OCH₂) ; 2.04 (s, 3H, 3CH) ; 1.94 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.75-1.71 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.45 (sextuplet, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂) ; 0.94 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.83 (CO) ; 159.57 (C) ; 154.55 (C) ; 151.74 (C) ; 131.09 (CHar) ; 126.81 (C) ; 118.54 (2CHar) ; 113.85 (CN) ; 111.53 (CHar) ; 99.91 (C) ; 67.94 (CH₂) ; 41.45 (C) ; 38.12 (3CH₂) ; 36.24 (3CH₂) ; 31.13 (CH₂) ; 27.87 (3CH) ; 19.15 (CH₂) ; 14.16 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 420.3 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(3-pentoxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**40**)



28	0,30 g	1,11 mmol	1,1 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,18 g	1,00 mmol	1 éq
HOBt	0,07 g	0,52 mmol	0,5 éq
HBTU	0,57 g	1,50 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,44 mL	18,3 mmol	18,3 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₆H₃₁N₃O₃

Masse molaire : 433,56 g.mol⁻¹

Rendement : 19 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,77

Aspect : solide blanc

Pf : 188-190°C

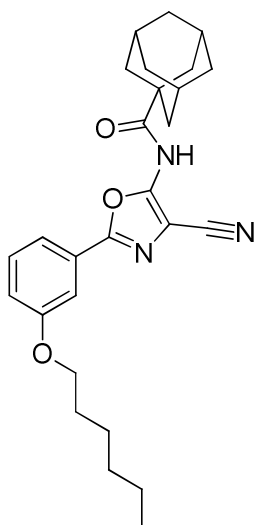
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.33 (s, 1H, NH) ; 7.48-7.46 (m, 2H, Har) ; 7.41-7.39 (m, 1H, Har) ; 7.14 (td, 1H, *J* = 6.7 ; 2.7 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 2.04 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.76-1.71 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.44-1.32 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.80 (CO) ; 159.56 (C) ; 154.55 (C) ; 151.70 (C) ; 131.10 (CHar) ; 126.80 (C) ; 118.57 (CHar) ; 118.51 (CHar) ; 113.85 (CN) ; 111.52 (CHar) ; 99.90 (C) ; 68.21 (CH₂) ; 41.53 (C) ; 38.11 (3CH₂) ; 36.23 (3CH₂) ; 28.75 (CH₂) ; 28.11 (CH₂) ; 27.87 (3CH) ; 22.34 (CH₂) ; 14.39 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 434.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(3-hexyloxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**41**)



29	0,35 g	1,20 mmol	1,1 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,20 g	1,09 mmol	1 éq
HOBt	0,07 g	0,52 mmol	0,5 éq
HBTU	0,62 g	1,63 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,64 mL	19,8 mmol	18,3 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₇H₃₃N₃O₃

Masse molaire : 447,58 g.mol⁻¹

Rendement : 35 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,73

Aspect : solide blanc

Pf : 193-195°C

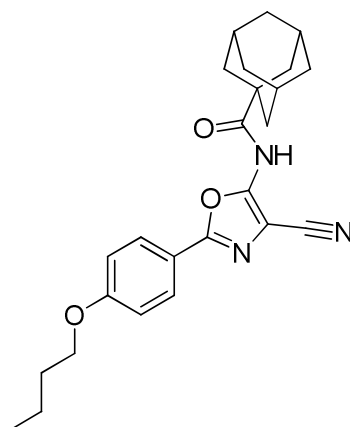
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.35 (s, 1H, NH) ; 7.49-7.46 (m, 2H, Har) ; 7.41-7.39 (m, 1H, Har) ; 7.14 (td, 1H, *J* = 6.6 ; 2.6 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 2.04 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.76-1.71 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.46-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.34-1.29 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.73 (CO) ; 159.55 (C) ; 154.60 (C) ; 151.55 (C) ; 131.09 (CHar) ; 126.78 (C) ; 118.57 (CHar) ; 118.52 (CHar) ; 113.79 (CN) ; 111.52 (CHar) ; 99.98 (C) ; 68.21 (CH₂) ; 41.53 (C) ; 38.09 (3CH₂) ; 36.23 (3CH₂) ; 31.44 (CH₂) ; 29.02 (CH₂) ; 27.86 (3CH) ; 25.58 (CH₂) ; 22.53 (CH₂) ; 14.379 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 448.3 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-butoxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**42**)



30	0,28 g	1,17 mmol	1,1 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,19 g	1,07 mmol	1 éq
HOBt	0,07 g	0,52 mmol	0,5 éq
HBTU	0,60 g	1,59 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,58 mL	20,0 mmol	18,8 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₂₅H₂₉N₃O₃

Masse molaire : 419,53 g.mol⁻¹

Rendement : 29 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,76

Aspect : solide blanc

Pf : 232-234°C

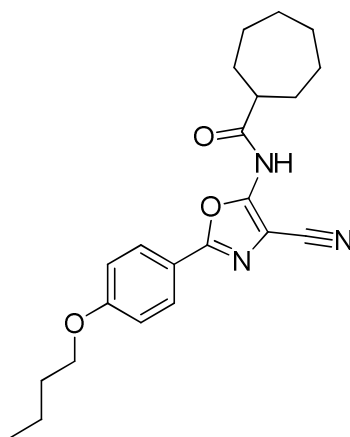
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.24 (s, 1H, NH) ; 7.84 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 4.05 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 2.03 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.74-1.71 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.45 (sextuplet, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂) ; 0.94 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 176.03 (CO) ; 161.54 (C) ; 155.02 (C) ; 151.69 (C) ; 128.20 (2CHar) ; 118.02 (C) ; 115.66 (2CHar) ; 114.09 (CN) ; 99.88 (C) ; 68.01 (CH₂) ; 41.51 (C) ; 38.21 (3CH₂) ; 36.27 (3CH₂) ; 31.06 (CH₂) ; 27.90 (3CH) ; 19.14 (CH₂) ; 14.13 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 420.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-butoxyphényl)oxazol-5-yl)cycloheptane-carboxamide (**43**)



30	0,30 g	1,17 mmol	1,1 éq
Acide cycloheptane carboxylique	0,18 g	1,06 mmol	1 éq
HOBt	0,07 g	0,53 mmol	0,5 éq
HBTU	0,60 g	1,59 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,57 mL	19,9 mmol	18,8 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₂H₂₇N₃O₃

Masse molaire : 381,48 g.mol⁻¹

Rendement : 18 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,75

Aspect : solide blanc

Pf : 205-207°C

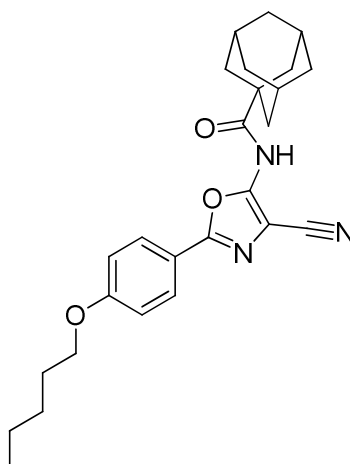
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.76 (s, 1H, NH) ; 7.81 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 4.05 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, OCH₂) ; 2.66-2.60 (m, 1H, CH) ; 1.90-1.84 (m, 2H CH₂) ; 1.74-1.62 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.58-1.40 (m, 8H, 4CH₂) ; 0.94 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.85 (CO) ; 161.55 (C) ; 154.74 (C) ; 150.88 (C) ; 128.19 (2CHar) ; 117.93 (C) ; 115.68 (2CHar) ; 113.95 (CN) ; 98.86 (C) ; 68.01 (CH₂) ; 45.54 (CH) ; 31.04 (CH₂) ; 30.92 (2CH₂) ; 28.35 (2CH₂) ; 26.31 (2CH₂) ; 19.14 (CH₂) ; 14.12 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 382.4 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-pentoxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**44**)



31	0,40 g	1,47 mmol	1,2 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,22 g	1,23 mmol	1 éq
HOBt	0,08 g	0,62 mmol	0,5 éq
HBTU	0,70 g	1,85 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,16 mL	12,4 mmol	10,1 éq
DMF	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₆H₃₁N₃O₃

Masse molaire : 433,56 g.mol⁻¹

Rendement : 19 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,60

Aspect : solide jaune

Pf : 247-249°C

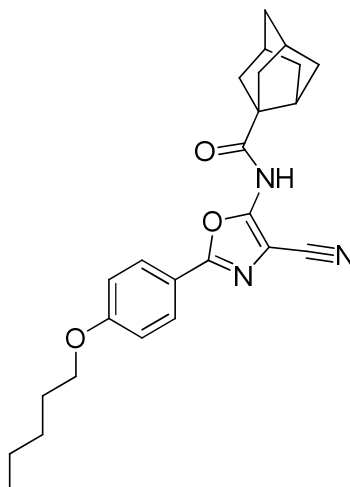
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.22 (s, 1H, NH) ; 7.84 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Har) ; 4.05 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, OCH₂) ; 2.04 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.76-1.71 (m, 8H, 4CH₂) ; 1.39-1.36 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.78 (CO) ; 161.60 (C) ; 155.25 (C) ; 151.14 (C) ; 128.26 (2CHar) ; 117.91 (C) ; 115.68 (2CHar) ; 113.88 (CN) ; 100.19 (C) ; 68.30 (CH₂) ; 41.50 (C) ; 38.12 (3CH₂) ; 36.24 (3CH₂) ; 28.69 (CH₂) ; 28.09 (CH₂) ; 27.87 (3CH) ; 22.32 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 434.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-pentoxyphényl)oxazol-5-yl)noradamantane-3-carboxamide
(45)



31	0,38 g	1,40 mmol	1,2 éq
Acide 3-noradamantylcarboxylique	0,20 g	1,20 mmol	1 éq
HOBt	0,09 g	0,67 mmol	0,6 éq
HBTU	0,70 g	1,85 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,16 mL	12,4 mmol	10,3 éq
DMF	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₅H₂₉N₃O₃

Masse molaire : 419,53 g.mol⁻¹

Rendement : 37 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,58

Aspect : solide blanc

Pf : 222-224°C

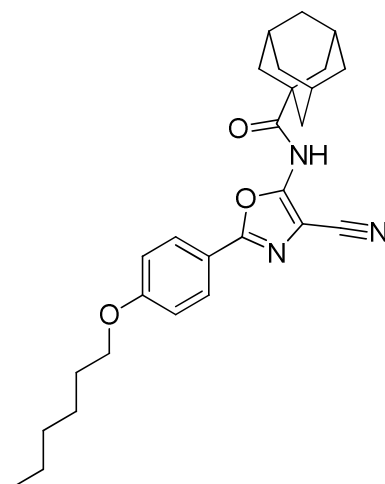
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.19 (s, 1H, NH) ; 7.85 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 4.05 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 2.74 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz, CH) ; 2.31 (s, 2H, 2CH) ; 2.04-1.86 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.76-1.71 (m, 2H, CH₂) ; 1.64-1.60 (m, 4H, 2CH₂) ; 1.42-1.34 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.91 (CO) ; 161.61 (C) ; 155.26 (C) ; 151.08 (C) ; 128.28 (2Char) ; 117.92 (C) ; 115.69 (2Char) ; 113.96 (CN) ; 100.29 (C) ; 68.30 (CH₂) ; 55.74 (C) ; 46.68 (2CH₂) ; 43.49 (2CH₂) ; 42.84 (CH) ; 37.41 (2CH) ; 34.55 (CH₂) ; 28.69 (CH₂) ; 28.09 (CH₂) ; 22.32 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 420.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-hexyloxyphényl)oxazol-5-yl)adamantane-1-carboxamide (**46**)



32	0,30 g	1,05 mmol	1,1 éq
Acide 1-adamantylcarboxylique	0,18 g	0,96 mmol	1 éq
HOBt	0,06 g	0,48 mmol	0,5 éq
HBTU	0,54 g	1,40 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,32 mL	18,0 mmol	18,8 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₂₇H₃₃N₃O₃

Masse molaire : 447,58 g.mol⁻¹

Rendement : 36 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,76

Aspect : solide blanc

Pf : 234-236°C

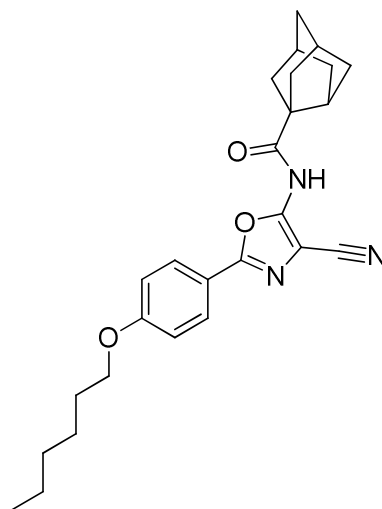
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.22 (s, 1H, NH) ; 7.84 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 4.05 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, OCH₂) ; 2.03 (s, 3H, 3CH) ; 1.93 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.71 (s, 6H, 3CH₂) ; 1.44-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.37-1.23 (m, 6H, 3CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 175.87 (CO) ; 161.60 (C) ; 155.29 (C) ; 151.26 (C) ; 128.26 (2CHar) ; 117.92 (C) ; 115.69 (2CHar) ; 113.98 (CN) ; 100.20 (C) ; 68.32 (CH₂) ; 41.51 (C) ; 38.14 (3CH₂) ; 36.24 (3CH₂) ; 31.41 (CH₂) ; 28.96 (CH₂) ; 27.87 (3CH) ; 25.57 (CH₂) ; 22.52 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 448.2 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-hexyloxyphényl)oxazol-5-yl)noradamantane-3-carboxamide (**47**)



32	0,30 g	1,05 mmol	1,1 éq
Acide 3-noradamantylcarboxylique	0,16 g	0,95 mmol	1 éq
HOBt	0,07 g	0,48 mmol	0,5 éq
HBTU	0,54 g	1,43 mmol	1,5 éq
DIPEA	2,32 mL	17,9 mmol	18,8 éq
DMF	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)

Formule brute : C₂₆H₃₁N₃O₃

Masse molaire : 433,56 g.mol⁻¹

Rendement : 17 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,73

Aspect : solide blanc

Pf : 202-204°C

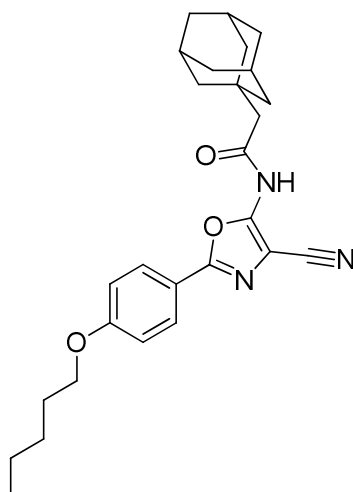
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.23 (s, 1H, NH) ; 7.85 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz, OCH₂) ; 2.74 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH) ; 2.31 (s, 2H, 2CH) ; 2.04-1.86 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.73-1.60 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.42-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.33-1.29 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 5.8 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.96 (CO) ; 161.59 (C) ; 155.20 (C) ; 151.20 (C) ; 128.26 (2CHar) ; 117.94 (C) ; 115.67 (2CHar) ; 114.00 (CN) ; 100.23 (C) ; 68.31 (CH₂) ; 55.76 (C) ; 46.70 (2CH₂) ; 43.49 (2CH₂) ; 42.85 (CH) ; 37.42 (2CH) ; 34.56 (CH₂) ; 31.42 (CH₂) ; 28.96 (CH₂) ; 25.57 (CH₂) ; 22.52 (CH₂) ; 14.36 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 434.4 (MH⁺)

N-(4-Cyano-2-(4-pentoxyphényl)oxazol-5-yl)-2-(1-adamanty)acétamide (**48**)



31	0,40 g	1,47 mmol	1,2 éq
Acide 1-adamantane acétique	0,28 g	1,23 mmol	1 éq
HOBt	0,08 g	0,62 mmol	0,5 éq
HBTU	0,70 g	1,85 mmol	1,5 éq
DIPEA	1,73 mL	12,4 mmol	10,1 éq
DMF	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (8 : 2)

Formule brute : C₂₇H₃₃N₃O₃

Masse molaire : 447,58 g.mol⁻¹

Rendement : 4 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : Aspect : solide blanc

Pf : 185-187°C

0,53

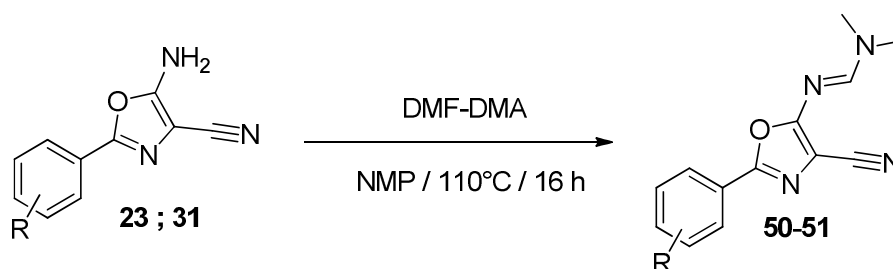
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 11.71 (s, 1H, NH) ; 7.82 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 7.10 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 4.04 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 2.18 (s, 2H, CH₂) ; 1.95 (s, 3H, 3CH) ; 1.76-1.58 (m, 14H, 7CH₂) ; 1.42-1.31 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 168.84 (CO) ; 161.57 (C) ; 155.00 (C) ; 150.58 (C) ; 128.25 (2CHar) ; 117.91 (C) ; 115.69 (2CHar) ; 113.83 (CN) ; 99.37 (C) ; 68.30 (CH₂) ; 49.65 (CH₂) ; 42.29 (3CH₂) ; 36.74 (3CH₂) ; 33.33 (C) ; 28.68 (CH₂) ; 28.43 (3CH) ; 28.09 (CH₂) ; 22.31 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

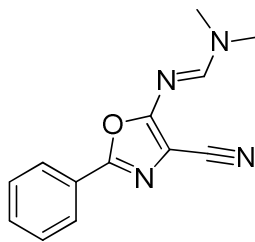
LCMS (APCI⁺) *m/z* 448.3 (MH⁺)

Mode opératoire général de condensation – composés 50-51



L'oxazole et le diméthylformamide-diméthylacétale sont solubilisés dans la NMP et le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau et le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée à sec.

N'-(4-Cyano-2-phényloxazol-5-yl)-N,N-diméthyliminoformamide (50)



23	1,00 g	5,40 mmol	1 éq
Diméthylformamide-diméthylacétal	2,90 mL	21,7 mmol	4,0 éq
NMP	15 mL		

Formule brute : C₁₃H₁₂N₄O

Masse molaire : 240,27 g.mol⁻¹

Rendement : 80 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,18

Aspect : solide blanc

Pf : 177-179°C

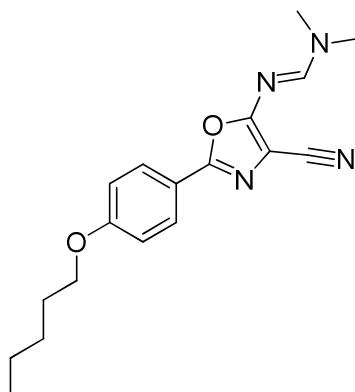
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.51 (s, 1H, CH) ; 7.95 (dd, 2H, *J* = 7.4 ; 2.2 Hz, Har) ; 7.53 (m, 3H, Har) ; 3.21 (s, 3H, CH₃) ; 3.07 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 163.33 (C) ; 156.81 (CH) ; 153.31 (C) ; 131.05 (CHar) ; 129.55 (2CHar) ; 126.60 (C) ; 126.05 (2CHar) ; 115.67 (C) ; 94.58 (CN) ; 41.11 (CH₃) ; 35.02 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 241.2 (MH⁺)

N'-(4-Cyano-2-phényloxazol-5-yl)-N,N-diméthyliminoformamide (51)



31	0,40 g	1,47 mmol	1 éq
Diméthylformamide-diméthylacétal	5,00 mL	37,6 mmol	25,6 éq
NMP	10 mL		

Formule brute : C₁₈H₂₂N₄O₂

Masse molaire : 326,40 g.mol⁻¹

Rendement : 58 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,21

Aspect : solide blanc

Pf : 86-88°C

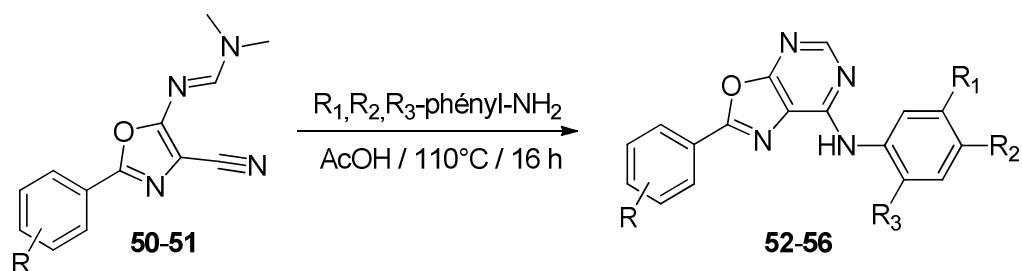
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.46 (s, 1H, CH) ; 7.86 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 7.05 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Har) ; 4.03 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, OCH₂) ; 3.19 (s, 3H, CH₃) ; 3.05 (s, 3H, CH₃) ; 1.73 (quint, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂) ; 1.39-1.36 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 162.59 (C) ; 161.02 (C) ; 156.52 (CH) ; 153.58 (C) ; 127.85 (2CHar) ; 119.04 (C) ; 115.82 (C) ; 115.39 (2CHar) ; 94.33 (CN) ; 68.20 (CH₂) ; 41.05 (CH₃) ; 34.95 (CH₃) ; 28.73 (CH₂) ; 28.11 (CH₂) ; 22.34 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

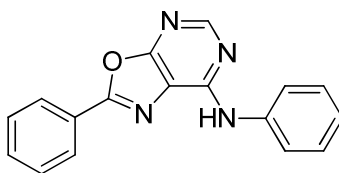
LCMS (APCI⁺) *m/z* 327.2 (MH⁺)

Mode opératoire général du réarrangement de Dimroth – composés 52-56



Le diméthyliminoformamide et l'amine aromatique sont solubilisés dans l'acide acétique glacial et le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 16 heures. Le produit est extrait deux fois au chloroforme. La phase organique est lavée trois fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne puis recristallisé dans l'éthanol.

N-Phényl-*N*-(2-phénylpyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazole-7-yl)amine (**52**)



50	0,30 g	1,25 mmol	1 éq
Aniline	0,24 mL	2,63 mmol	2,1 éq
Acide acétique	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₁₇H₁₂N₄O

Masse molaire : 288,31 g.mol⁻¹

Rendement : 39 %

R_f (cyclohexane/AcOEt (7:3)) : 0,57

Aspect : solide blanc

Pf : 214-216°C

Données spectroscopiques

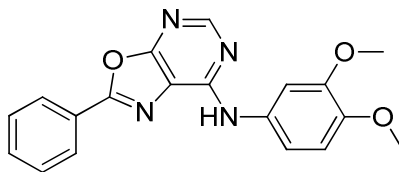
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.36 (s, 1H, NH) ; 8.50 (s, 1H, CH) ; 8.22 (dd, 2H, *J* = 7.7 ; 1.9 Hz, Har) ; 7.90 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, Har) ; 7.67-7.65 (m, 3H, Har) ; 7.38 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, Har) ; 7.11 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, Har).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.75 (C) ; 159.23 (CH) ; 154.23 (C) ; 152.92 (C) ; 139.47 (C) ; 132.58 (C) ; 129.91 (2CHar) ; 128.96 (2CHar) ; 127.61 (2CHar) ; 126.48 (CHar) ; 123.82 (CHar) ; 121.76 (2CHar) ; 117.66 (C).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 289.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 289.1087 ; calculé : 289.1089 (-0.7 ppm) ; C₁₇H₁₃N₄O (MH⁺)

N-(3,4-Diméthoxyphényl)-*N*-(2-phénylpyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazole-7-yl)amine
(53)



50	0,30 g	1,25 mmol	1 éq
3,4-Diméthoxyaniline	0,38 g	2,50 mmol	2,0 éq
Acide acétique	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₁₉H₁₆N₄O₃

Masse molaire : 348,36 g.mol⁻¹

Rendement : 36 %

R_f (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,36

Aspect : solide gris

Pf : 205-207°C

Données spectroscopiques

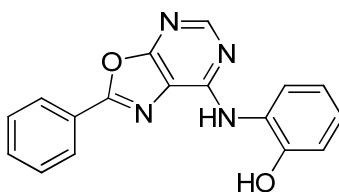
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.15 (s, 1H, NH) ; 8.46 (s, 1H, CH) ; 8.19 (d, 2H, *J* = 7.7 ; 1.9 Hz, Har) ; 7.66-7.64 (m, 3H, Har) ; 7.53 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, Har) ; 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.6 ; 2.2 Hz, Har) ; 6.96 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, Har) ; 3.77 (s, 3H, OCH₃) ; 3.76 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.61 (C) ; 158.97 (C) ; 154.31 (C) ; 152.97 (C) ; 148.89 (CH) ; 145.67 (C) ; 132.81 (C) ; 132.52 (C) ; 129.91 (2CHar) ; 127.51 (2CHar) ; 126.52 (CHar) ; 117.35 (C) ; 113.97 (CHar) ; 112.36 (CHar) ; 107.31 (CHar) ; 56.25 (CH₃) ; 55.95 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 349.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 349.1295 ; calculé : 349.1301 (-1.7 ppm) ; C₁₉H₁₇N₄O₃ (MH⁺)

2-((2-Phénylpyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-yl)amino)phénol (54**)**



50	0,40 g	1,67 mmol	1 éq
2-Aminophénol	0,37 g	3,40 mmol	2,0 éq
Acide acétique	20 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₁₇H₁₂N₄O₂

Masse molaire : 304,31 g.mol⁻¹

Rendement : 8 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,53

Aspect : solide rouge

Pf : 250-252°C

Données spectroscopiques

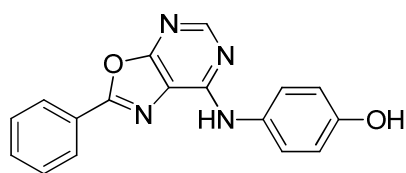
RMN 1H (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 9.96 (s, 1H, OH) ; 9.03 (s, 1H, NH) ; 8.45 (s, 1H, CH) ; 8.18 (dd, 2H, J = 6.9 ; 1.4 Hz, Har) ; 7.91 (d, 1H, J = 7.0 Hz, Har) ; 7.66-7.63 (m, 3H, Har) ; 7.05 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Har) ; 6.95 (d, 1H, J = 7.0 Hz, Har) ; 6.87 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Har).

RMN 13C (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 164.57 (C) ; 159.23 (CH) ; 154.36 (C) ; 153.37 (C) ; 149.93 (C) ; 132.60 (C) ; 129.88 (2CHar) ; 127.58 (2CHar) ; 126.46 (CHar) ; 126.37 (C) ; 125.79 (CHar) ; 124.39 (CHar) ; 119.52 (CHar) ; 117.55 (C) ; 116.05 (CHar).

LCMS (APCI+) m/z 305.2 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 305.1043 ; calculé : 305.1039 (1.3 ppm) ; C₁₇H₁₃N₄O₂ (MH⁺)

4-((2-Phénylpyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-yl)amino)phénol (55)



50	0,49 g	2,04 mmol	1 éq
4-Aminophénol	0,45 g	4,12 mmol	2,0 éq
Acide acétique	15 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₁₇H₁₂N₄O₂

Masse molaire : 304,31 g.mol⁻¹

Rendement : 79 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,36

Aspect : solide noir

Pf : 280-282°C

Données spectroscopiques

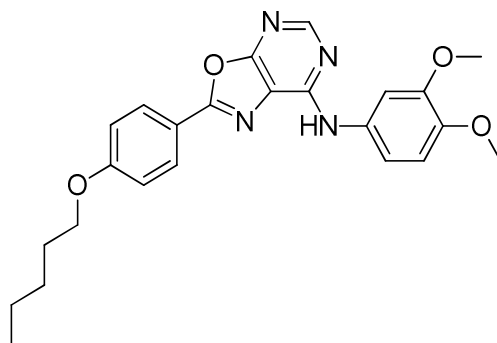
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.06 (s, 1H, OH) ; 9.28 (s, 1H, NH) ; 8.40 (s, 1H, CH) ; 8.18 (dd, 2H, *J* = 7.7 ; 1.9 Hz, Har) ; 7.65-7.63 (m, 3H, Har) ; 7.59 (d, 2H, *J*₁ = 8.9 Hz, Har) ; 6.77 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.57 (C) ; 158.82 (CH) ; 154.35 (2C) ; 153.17 (C) ; 132.42 (C) ; 130.70 (C) ; 129.87 (2CHar) ; 127.47 (2CHar) ; 126.56 (CHar) ; 124.02 (2CHar) ; 117.11 (C) ; 115.39 (2CHar).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 305.0 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 305.1036 ; calculé : 305.1039 (-1.0 ppm) ; C₁₇H₁₃N₄O₂ (MH⁺)

N-(3,4-Diméthoxyphényl)-*N*-(2-(4-pentoxyphényl)pyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazole-7-yl)amine (**56**)



51	0,20 g	0,61 mmol	1 éq
3,4-Diméthoxyaniline	0,19 g	1,24 mmol	2,0 éq
Acide acétique	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : dichlorométhane / méthanol (95 : 5)

Formule brute : C₂₄H₂₆N₄O₄

Masse molaire : 434,50 g.mol⁻¹

Rendement : 11 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,45

Aspect : solide gris

Pf : 146-148°C

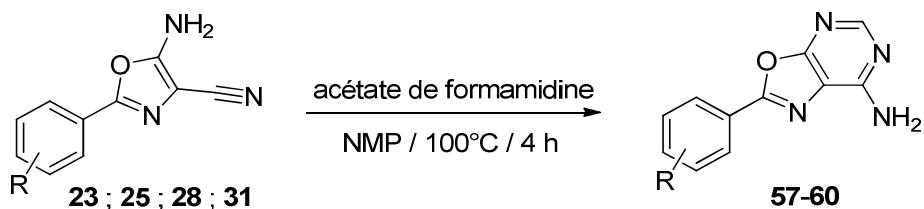
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.05 (s, 1H, NH) ; 8.42 (s, 1H, CH) ; 8.10 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 7.75 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, Har) ; 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.7 ; 2.51 Hz, Har) ; 7.17 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 6.95 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Har) ; 4.08 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂) ; 3.77 (s, 3H, OCH₃) ; 3.76 (s, 3H, OCH₃) ; 1.76 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.44-1.35 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.91 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.53 (C) ; 162.20 (C) ; 159.24 (CH) ; 153.82 (C) ; 152.70 (C) ; 148.95 (C) ; 145.61 (C) ; 133.05 (C) ; 129.43 (2CHar) ; 118.69 (C) ; 117.46 (C) ; 115.80 (2CHar) ; 113.85 (CHar) ; 112.42 (CHar) ; 107.25 (CHar) ; 68.42 (CH₂) ; 56.31 (CH₃) ; 56.00 (CH₃) ; 28.76 (CH₂) ; 28.15 (CH₂) ; 22.39 (CH₂) ; 14.43 (CH₃).

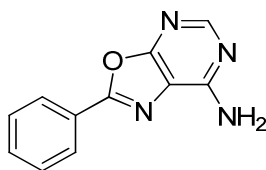
LCMS (APCI⁺) *m/z* 435.1 (MH⁺)

Mode opératoire général de la cyclisation en oxazolopyrimidine non substituée
– composés 57-60



L'oxazole et l'acétate de formamidine sont solubilisés dans la NMP et le milieu réactionnel est chauffé à 100°C pendant 4 heures. De l'eau est ajoutée au milieu et le solide formé est filtré et lavé trois fois à l'eau. Le produit est recristallisé dans le méthanol.

2-Phénylpyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-amine (57)



23	1,26 g	6,80 mmol	1 éq
Acétate de formamidine	1,08 g	10,4 mmol	1,5 éq
NMP	15 mL		

Formule brute : C₁₁H₈N₄O

Masse molaire : 212,21 g.mol⁻¹

Rendement : 75 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,14

Aspect : solide jaune

Pf : 291-293°C

Données spectroscopiques

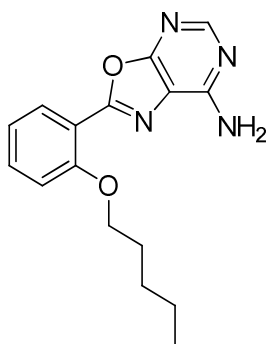
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.25 (s, 1H, CH) ; 8.14-8.11 (m, 2H, Har) ; 7.78 (s, 2H, NH₂) ; 7.63-7.61 (m, 3H, Har).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 167.73 (C) ; 158.35 (C) ; 157.02 (C) ; 154.73 (CH) ; 132.29 (CHar) ; 129.85 (2CHar) ; 127.32 (2CHar) ; 126.65 (C) ; 116.12 (C).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 213.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 213.0783 ; calculé : 213.0776 (-3.3 ppm) ; C₁₁H₉N₄O (MH⁺)

2-(2-Pentoxyphényl)pyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-amine (58)



25	0,67 g	2,47 mmol	1 éq
Acétate de formamidine	1,33 g	12,8 mmol	5,2 éq
NMP	20 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₈N₄O₂

Masse molaire : 298,35 g.mol⁻¹

Rendement : 35 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,21

Aspect : solide blanc

Pf : 134-136°C

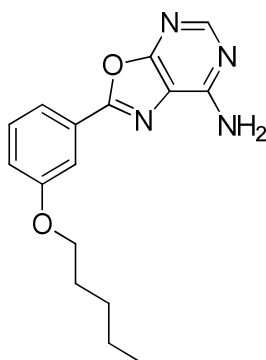
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.23 (s, 1H, CH) ; 7.92 (dd, 1H, *J* = 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.69 (s, 2H, NH₂) ; 7.57 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.6 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.25 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Har) ; 7.12 (td, 1H, *J* = 7.6 ; 0.8 Hz, Har) ; 4.13 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, OCH₂) ; 1.76 (quint, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂) ; 1.50-1.40 (m, 2H, CH₂) ; 1.36-1.29 (m, 2H, CH₂) ; 0.87 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.83 (C) ; 158.05 (C) ; 157.88 (C) ; 156.88 (C) ; 154.52 (CH) ; 133.69 (CHar) ; 131.24 (CHar) ; 121.09 (CHar) ; 116.05 (C) ; 115.65 (C) ; 114.23 (CHar) ; 68.90 (CH₂) ; 28.67 (CH₂) ; 28.05 (CH₂) ; 22.24 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 299.1 (MH⁺)

2-(3-Pentoxyphényl)pyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-amine (59)



28	0,70 g	2,58 mmol	1 éq
Acétate de formamidine	1,38 g	13,3 mmol	5,1 éq
NMP	20 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₈N₄O₂

Masse molaire : 298,35 g.mol⁻¹

Rendement : 92 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,24

Aspect : solide blanc

Pf : 167-169°C

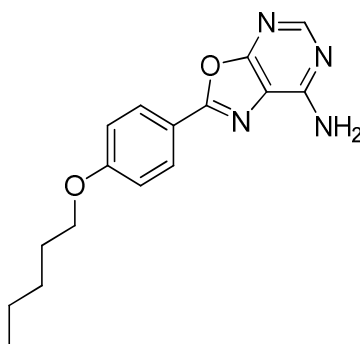
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.25 (s, 1H, CH) ; 7.78 (s, 2H, NH₂) ; 7.69 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.62-7.60 (m, 1H, Har) ; 7.51 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, Har) ; 7.19-7.17 (m, 1H, Har) ; 4.06 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, OCH₂) ; 1.76 (quint, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂) ; 1.47-1.33 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.91 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.70 (C) ; 159.56 (C) ; 158.21 (C) ; 157.01 (C) ; 154.75 (CH) ; 131.08 (CHar) ; 127.84 (C) ; 119.57 (CHar) ; 119.06 (CHar) ; 116.09 (C) ; 112.24 (CHar) ; 68.23 (CH₂) ; 28.77 (CH₂) ; 28.12 (CH₂) ; 22.36 (CH₂) ; 14.33 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 299.0 (MH⁺)

2-(4-Pentoxyphényl)pyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-amine (60)



31	0,30 g	1,10 mmol	1 éq
Acétate de formamidine	0,57 g	5,48 mmol	5,0 éq
NMP	20 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₈N₄O₂

Masse molaire : 298,35 g.mol⁻¹

Rendement : 37 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,19

Aspect : solide blanc

Pf : 204-206°C

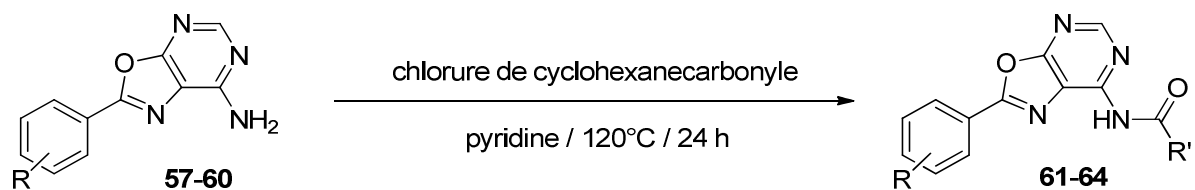
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 8.21 (s, 1H, CH) ; 8.04 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 7.68 (s, 2H, NH₂) ; 7.14 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, Har) ; 4.07 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂) ; 1.75 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) ; 1.43-1.35 (m, 4H, 2CH₂) ; 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 164.61 (C) ; 161.98 (C) ; 158.57 (C) ; 156.73 (C) ; 154.21 (CH) ; 129.18 (2CHar) ; 118.83 (C) ; 116.15 (C) ; 115.74 (2CHar) ; 68.34 (CH₂) ; 28.69 (CH₂) ; 28.10 (CH₂) ; 22.32 (CH₂) ; 14.37 (CH₃).

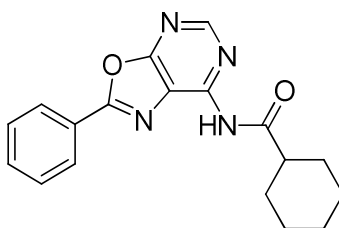
LCMS (APCI⁺) *m/z* 299.1 (MH⁺)

Mode opératoire général de la réaction d'amidification – composés 61-64



L'oxazolopyrimidine et le chlorure de cyclohexanecarbonyle sont solubilisés dans la pyridine et le milieu réactionnel est chauffé à 120°C pendant 24 heures sous azote. La pyridine est ensuite évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne puis recristallisé dans le méthanol.

N1-(2-Phénylpyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-yl)-1-cyclohexanecarboxamide (61)



57	0,41 g	1,93 mmol	1 éq
Chlorure de cyclohexanecarbonyle	0,47 mL	3,49 mmol	1,8 éq
Pyridine	15 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₁₈H₁₈N₄O₂

Masse molaire : 322,37 g.mol⁻¹

Rendement : 64 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,44

Aspect : solide blanc

Pf : 216-218°C

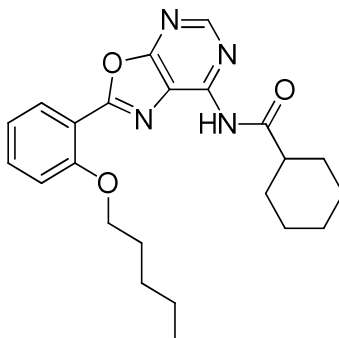
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.99 (s, 1H, NH) ; 8.75 (s, 1H, CH) ; 8.21 (dd, 2H, *J* = 7.8 ; 1.4 Hz, Har) ; 7.71-7.63 (m, 3H, Har) ; 2.68 (tt, 1H, *J* = 11.5 ; 3.6 Hz, CH) ; 1.92-1.88 (m, 2H, CH₂) ; 1.80-1.76 (m, 2H, CH₂) ; 1.68-1.66 (m, 1H, 1/2CH₂) ; 1.50-1.43 (m, 2H, CH₂) ; 1.35-1.25 (m, 3H, 3/2CH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.64 (CO) ; 166.29 (C) ; 160.36 (C) ; 153.79 (CH) ; 150.85 (C) ; 133.18 (CHar) ; 129.92 (2CHar) ; 128.09 (2CHar) ; 126.02 (C) ; 122.44 (C) ; 44.50 (CH) ; 29.39 (2CH₂) ; 25.85 (CH₂) ; 25.60 (2CH₂).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 323.1 (MH⁺)

N1-(2-(2-Pentoxyphényl)pyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-yl)-1-cyclohexanecarboxamide (62)



58	0,21 g	0,70 mmol	1 éq
Chlorure de cyclohexanecarbonyle	0,20 mL	1,49 mmol	2,1 éq
Pyridine	15 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₃H₂₈N₄O₃

Masse molaire : 408,49 g.mol⁻¹

Rendement : 17 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,54

Aspect : solide blanc

Pf : 188-190°C

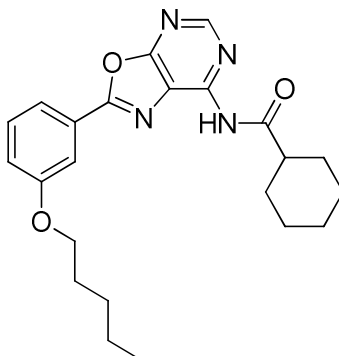
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.93 (s, 1H, NH) ; 8.74 (s, 1H, CH) ; 8.00 (dd, 1H, *J* = 7.7 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.63 (ddd, 1H, *J* = 8.4 ; 7.7 ; 1.7 Hz, Har) ; 7.28 (dd, 1H, *J* = 8.4 ; 0.9 Hz, Har) ; 7.16 (td, 1H, *J* = 7.7 ; 0.9 Hz, Har) ; 4.14 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, OCH₂) ; 2.65 (tt, 1H, *J* = 11.1 ; 3.4 Hz, CH) ; 1.91-1.87 (m, 2H, CH₂) ; 1.81-1.74 (m, 4H, 2CH₂) ; 1.68-1.65 (m, 1H, 1/2CH₂) ; 1.51-1.32 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.27-1.24 (m, 3H, 3/2CH₂) ; 0.88 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.55 (CO) ; 166.29 (C) ; 159.93 (C) ; 158.33 (C) ; 153.66 (CH) ; 150.70 (C) ; 134.55 (CHar) ; 131.70 (CHar) ; 122.55 (C) ; 121.16 (CHar) ; 115.11 (C) ; 114.29 (CHar) ; 68.99 (CH₂) ; 44.45 (CH) ; 29.37 (2CH₂) ; 28.70 (CH₂) ; 28.07 (CH₂) ; 25.86 (CH₂) ; 25.60 (2CH₂) ; 22.27 (CH₂) ; 14.38 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 409.2 (MH⁺)

N1-(2-(3-Pentoxyphényl)pyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-yl)-1-cyclohexanecarboxamide (63)



59	0,33 g	1,11 mmol	1 éq
Chlorure de cyclohexanecarbonyle	0,19 mL	1,40 mmol	1,3 éq
Pyridine	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₃H₂₈N₄O₃

Masse molaire : 408,49 g.mol⁻¹

Rendement : 24 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,56

Aspect : solide blanc

Pf : 194-196°C

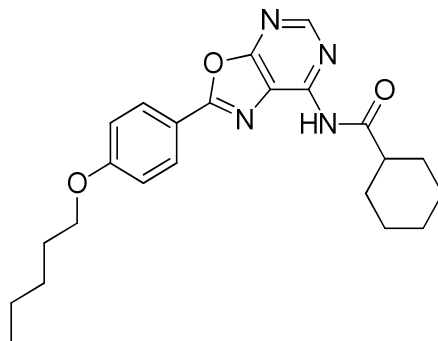
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10.98 (s, 1H, NH) ; 8.75 (s, 1H, CH) ; 7.68 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Har) ; 7.67-7.65 (m, 1H, Har) ; 7.55 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, Har) ; 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.4 ; 3.0 Hz, Har) ; 4.09 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, OCH₂) ; 2.73-2.66 (m, 1H, CH) ; 1.92-1.87 (m, 2H, CH₂) ; 1.79-1.76 (m, 4H, 2CH₂) ; 1.67-1.63 (m, 1H, 1/2CH₂) ; 1.46-1.33 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.27-1.24 (m, 3H, 3/2 CH₂) ; 0.91 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.66 (CO) ; 166.26 (C) ; 160.21 (C) ; 159.59 (C) ; 153.84 (CH) ; 150.89 (C) ; 131.22 (CHar) ; 127.21 (C) ; 122.28 (C) ; 120.36 (CHar) ; 119.72 (CHar) ; 113.17 (CHar) ; 68.34 (CH₂) ; 44.50 (CH) ; 29.38 (2CH₂) ; 28.75 (CH₂) ; 28.13 (CH₂) ; 25.85 (CH₂) ; 25.59 (2CH₂) ; 22.35 (CH₂) ; 14.33 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 409.1 (MH⁺)

*N*1-(2-(4-Pentoxyphényl)pyrimido[5,4-*d*][1,3]oxazol-7-yl)-1-cyclohexanecarboxamide (**64**)



60	0,10 g	0,34 mmol	1 éq
Chlorure de cyclohexanecarbonyle	0,08 mL	0,59 mmol	1,8 éq
Pyridine	10 mL		

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne : cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)

Formule brute : C₂₃H₂₈N₄O₃

Masse molaire : 408,49 g.mol⁻¹

Rendement : 44 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,51

Aspect : solide blanc

Pf : 208-210°C

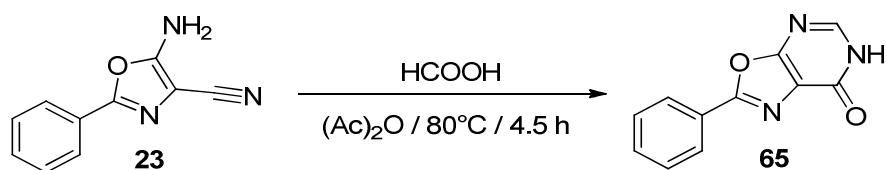
Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 10,90 (s, 1H, NH) ; 8.70 (s, 1H, CH) ; 8.12 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Har) ; 7.18 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Har) ; 4.09 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, OCH₂) ; 2,67 (tt, 1H, *J* = 11.3 ; 3.5 Hz, CH) ; 1.91-1.87 (m, 2H, CH₂) ; 1.81-1.72 (m, 4H, 2CH₂) ; 1.68-1.65 (m, 1H, 1/2CH₂) ; 1.46-1.35 (m, 6H, 3CH₂) ; 1.27-1.23 (m, 3H, 3/2CH₂) ; 0.91 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 174.60 (CO) ; 166.27 (C) ; 162.71 (C) ; 160.57 (C) ; 153.24 (CH) ; 150.30 (C) ; 130.07 (2CHar) ; 122.71 (C) ; 118.02 (C) ; 115.82 (2CHar) ; 68.44 (CH₂) ; 44.48 (CH) ; 29.40 (2CH₂) ; 28.68 (CH₂) ; 28.09 (CH₂) ; 25.85 (CH₂) ; 25.60 (2CH₂) ; 22.33 (CH₂) ; 14.38 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 409.1 (MH⁺)

2-Phényl-6,7-dihydropyrimido[5,4-d][1,3]oxazole-7-one (65)



L'acide formique est ajouté goutte à goutte dans l'anhydride acétique à 0°C et le mélange est agité à température ambiante pendant 30 minutes. Le composé **23** est ajouté au milieu réactionnel qui est ensuite chauffé à 80°C pendant 4,5 heures. Le mélange est dilué avec de l'eau à 0°C et le produit est extrait deux fois avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié chromatographie sur colonne (cyclohexane / acétate d'éthyle (5 : 5)) puis recristallisé dans l'éthanol.

23	0,30 g	1,62 mmol	1 éq
Acide formique	10 mL		
Anhydride acétique	10 mL		

Formule brute : C₁₁H₇N₃O₂

Masse molaire : 213,20 g.mol⁻¹

Rendement : 37 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,27

Aspect : solide blanc

Pf : 162-164°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 295 K : δ (ppm) : 12.27 (s, 1H, NH) ; 8.56-8.45 (m, 1H, CH) ; 7.94-7.91 (m, 2H, Har) ; 7.59-7.57 (m, 3H, Har).

RMN ¹H (THF-*d*₈) : 280 K : δ (ppm) : 11.13 (d, 0.47H, *J* = 9.1Hz, NH) ; 10.94 (s, 0.40H, OH) ; 8.93 (d, 0.51H, *J* = 9.1 Hz, CH) ; 8.37 (s, 0.40H, CH) ; 7.99-7.97 (m, 2H, Har) ; 7.52-7.50 (m, 3H, Har).

RMN ¹H (THF-*d*₈ - DCl) : 295 K : δ (ppm) : 7.94 (s, 1H, CH) ; 7.83-7.79 (m, 2H, Har) ; 7.41-7.38 (m, 3H, Har).

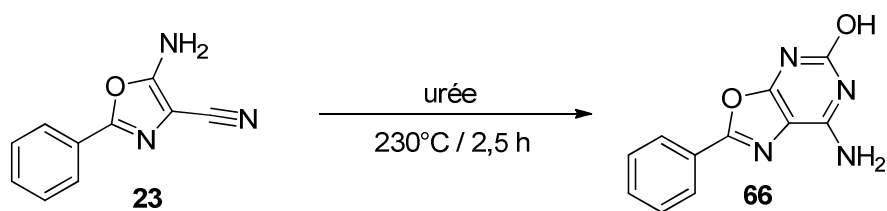
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 160.2 (CH) ; 155.04 (C) ; 131.98 (2CHar) ; 129.82 (2CHar) ; 126.48 (CHar) ; 125.50 (C) ; 113.40 (C).

RMN ¹³C (THF-*d*₈ - DCl) : δ (ppm) : 162.99 (C) ; 162.24 (CH) ; 151.06 (C) ; 130.47 (CHar) ; 129.58 (2CHar) ; 127.74 (C) ; 125.97 (2CHar) ; 114.99 (C) ; 87.21 (C).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 214.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 214.0611 ; calculé : 214.0611 (±0.0 ppm) ; C₁₁H₈N₃O₂ (MH⁺)

2-Phényl-6,7-dihydropyrimido[5,4-d][1,3]oxazole-7-one (66)



Le composé **23** et l'urée sont placés dans un ballon qui est chauffé à 230°C pendant 2,5 heures. Le mélange fondu est solubilisé dans de la soude (2N) chaude. La solution est ensuite acidifiée avec de l'acide acétique glacial et extraite avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne (dichlorométhane / méthanol (9 : 1)) puis recristallisé dans l'éthanol.

23	0,40 g	2,16 mmol	1 éq
Urée	0,27 g	4,50 mmol	2,1 éq

Formule brute : C₁₁H₈N₄O₂

Masse molaire : 228,21 g.mol⁻¹

Rendement : 37 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (4:6)) : 0,22

Aspect : solide marron

Pf : 251-253°C

Données spectroscopiques

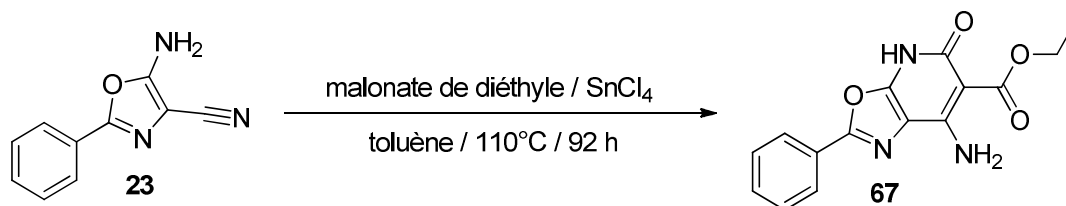
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 13.66 (s, 1H, OH) ; 11.61 (s, 1H, NH) ; 10.88 (s, 1H, NH) ; 8.09-8.06 (m, 2H, Har) ; 7.54-7.45 (m, 3H, Har).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 155.76 (C) ; 151.80 (C) ; 150.30 (C) ; 149.99 (C) ; 130.53 (CHar) ; 139.4 (2CHar) ; 129.37 (C) ; 126.67 (2CHar) ; 108.37 (C).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 229.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 229.0733 ; calculé : 229.0726 (3.1 ppm) ; C₁₁H₉N₄O₂ (MH⁺)

**7-Amino-5-oxo-2-phényl-4,5-dihydropyrido[3,2-d][1,3]oxazole-6-carboxylate
d'éthyle (67)**



Le composé **23** et le malonate de diéthyle sont dissous dans le toluène. Le chlorure d'étain est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 92 heures. Le solide obtenu est filtré et lavé trois fois avec du toluène. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne (cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)) puis recristallisé dans le dichlorométhane.

23	0,40 g	2,16 mmol	1 éq
Malonate de diéthyle	0,33 mL	2,16 mmol	1,0 éq
Chlorure d'étain	0,53 mL	4,32 mmol	2,0 éq
Toluène	15 mL		

Formule brute : C₁₅H₁₃N₃O₄

Masse molaire : 299,29 g.mol⁻¹

Rendement : 92 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,28

Aspect : solide jaune

Pf : 230-232°C

Données spectroscopiques

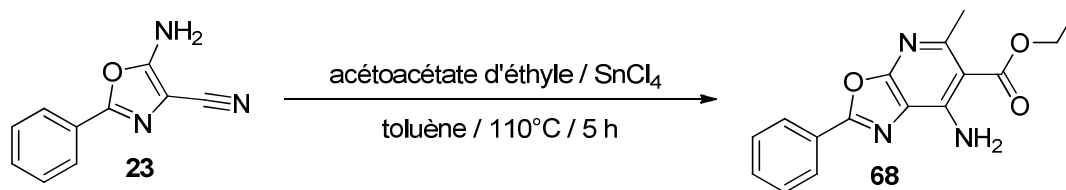
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 12.34 (s, 1H, NH) ; 8.09-8.06 (m, 2H, Har) ; 7.70 (s, 2H, NH₂) ; 7.61-7.59 (m, 3H, Har) ; 4.43 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂) ; 1.35 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 170.44 (CO) ; 162.52 (CO) ; 157.29 (C) ; 150.30 (C) ; 131.70 (CHar) ; 129.77 (2CHar) ; 129.41 (C) ; 126.92 (C) ; 126.79 (2CHar) ; 115.12 (C) ; 90.14 (C) ; 62.10 (CH₂) ; 14.66 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 300.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 300.0982 ; calculé : 300.0984 (-0.7 ppm) ; C₁₅H₁₄N₃O₄ (MH⁺)

7-Amino-5-méthyl-2-phénylpyrido[3,2-d][1,3]oxazole-6-carboxylate d'éthyle
(68)



Le composé **23** et le l'acétoacétate d'éthyle sont solubilisés dans le toluène. Le chlorure d'étain est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 5 heures. Le solide obtenu est filtré et lavé trois fois avec du toluène. Le solide est ensuite solubilisé dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la soude (0,5N) puis à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite.

23	0,40 g	2,16 mmol	1 éq
Acétoacétate d'éthyle	0,27 mL	2,16 mmol	1,0 éq
Chlorure d'étain	0,53 mL	4,32 mmol	2,0 éq
Toluène	20 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₅N₃O₃

Masse molaire : 297,32 g.mol⁻¹

Rendement : 30 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,59

Aspect : solide blanc

Pf : 167-169°C

Données spectroscopiques

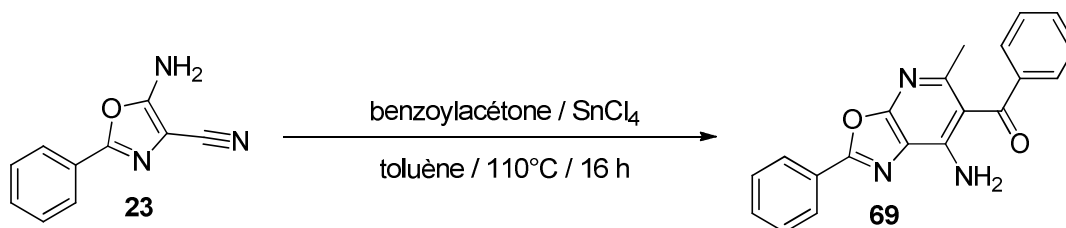
RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 8.15-8.11 (m, 2H, Har) ; 7.63-7.61 (m, 3H, Har) ; 7.30 (s, 2H, NH₂) ; 4.36 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH₂) ; 2.58 (s, 3H, CH₃) ; 1.34 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 167.93 (CO) ; 159.70 (C) ; 158.73 (C) ; 157.21 (C) ; 148.15 (C) ; 132.11 (CHar) ; 129.81 (2CHar) ; 127.17 (2CHar) ; 126.89 (C) ; 118.62 (C) ; 107.32 (C) ; 61.35 (CH₂) ; 26.22 (CH₃) ; 14.48 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) m/z 298.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 298.1190 ; calculé : 298.1192 (-0.7 ppm) ; C₁₆H₁₆N₃O₃ (MH⁺)

(7-Amino-5-méthyl-2-phénylpyrido[3,2-d][1,3]oxazol-6-yl)phénylméthanone
(69)



Le composé **23** et la benzoylacétone sont solubilisés dans le toluène. Le chlorure d'étain est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 16 heures. Le solide obtenu est filtré et lavé trois fois avec du toluène. Le solide est ensuite solubilisé dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la soude (0,5N) puis à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne (cyclohexane / acétate d'éthyle (6 : 4)).

23	0,40 g	2,16 mmol	1 éq
Benzoylacétone	0,35 g	2,16 mmol	1,0 éq
Chlorure d'étain	0,53 mL	4,32 mmol	2,0 éq
Toluène	20 mL		

Formule brute : C₂₀H₁₅N₃O₂

Masse molaire : 329,36 g.mol⁻¹

Rendement : 8 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,57

Aspect : solide blanc

Pf : 169-171°C

Données spectroscopiques

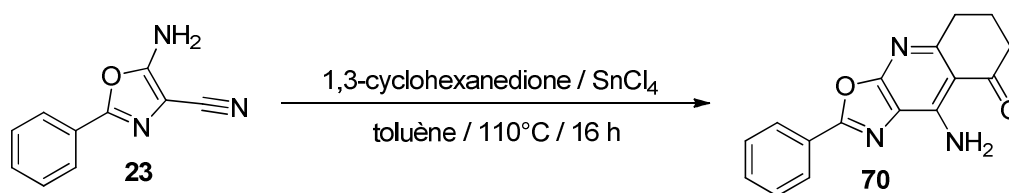
RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 8.16-8.13 (m, 2H, Har) ; 7.82-7.80 (m, 2H, Har) ; 7.72-7.62 (m, 4H, Har) ; 7.58-7.55 (m, 2H, Har) ; 6.69 (s, 2H, NH₂) ; 2.13 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ (ppm) : 197.24 (CO) ; 159.98 (C) ; 158.53 (C) ; 152.17 (C) ; 145.70 (C) ; 137.71 (C) ; 134.36 (CHar) ; 132.02 (CHar) ; 129.81 (4CHar) ; 129.45 (2CHar) ; 127.16 (2CHar) ; 127.09 (C) ; 118.44 (C) ; 116.27 (C) ; 23.78 (CH₃).

LCMS (APCI⁺) m/z 330.1 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 330.1245 ; calculé : 330.1243 (0.6 ppm) ; C₂₀H₁₆N₃O₂ (MH⁺)

9-Amino-2-phényl-5,6,7,8-tétrahydro[1,3]oxazolo[5,4-d]quinolin-8-one (70)



Le composé **23** et le 1,3-cyclohexanedione sont solubilisés dans le toluène. Le chlorure d'étain est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 16 heures. Le solide obtenu est filtré et lavé trois fois avec du toluène. Le solide est ensuite solubilisé dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la soude (0,5N) puis à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne (cyclohexane / acétate d'éthyle (5 : 5)).

23	0,40 g	2,16 mmol	1 éq
1,3-Cyclohexanedione	0,24 g	2,16 mmol	1,0 éq
Chlorure d'étain	0,53 mL	4,32 mmol	2,0 éq
Toluène	15 mL		

Formule brute : C₁₆H₁₃N₃O₂

Masse molaire : 279,30 g.mol⁻¹

Rendement : 5 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,35

Aspect : solide blanc

Pf : 244-246°C

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9,01 (s, 1H, NH) ; 8.13-8.09 (m, 2H, Har) ; 8.11 (s, 1H, NH) ; 7.65-7.61 (m, 3H, Har) ; 3.00 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂) ; 2.63 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂) ; 2.02 (quint, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂).

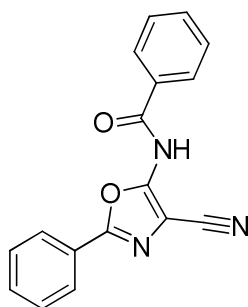
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 201.51 (CO) ; 164.80 (C) ; 160.58 (C) ; 158.66 (C) ; 149.75 (C) ; 132.16 (CHar) ; 129.84 (2CHar) ; 127.15 (2CHar) ; 126.79 (C) ; 118.82 (C) ; 109.91 (C) ; 39.56 (CH₂) ; 34.12 (CH₂) ; 21.80 (CH₂).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 280.0 (MH⁺)

HRMS (ESI⁺) : obtenu : 280.1083 ; calculé : 280.1086 (-1.1 ppm) ; C₁₆H₁₄N₃O₂ (MH⁺)

Intermédiaires et produits secondaires

N1-(4-Cyano-2-phényl-1,3-oxazol-5-yl)benzamide (49)



Formule brute : C₁₇H₁₁N₃O₂

Masse molaire : 289,30 g.mol⁻¹

Rendement : 30 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,57

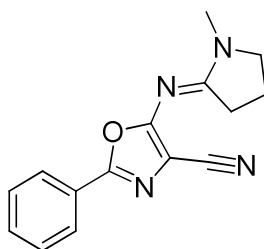
Aspect : solide gris

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 12.37 (s, 1H, NH) ; 8.07-8.04 (m, 2H, Har) ; 7.97-7.93 (m, 2H, Har) ; 7.72-7.67 (m, 1H, Har) ; 7.62-7.57 (m, 5H, Har).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 290.1 (MH⁺)

5-((1-Méthylpyrrolidin-2-ylidene)amino)-2-phényloxazole-4-carbonitrile (71)



Formule brute : C₁₅H₁₄N₄O

Masse molaire : 266,31 g.mol⁻¹

Rendement : 10 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,27

Aspect : solide gris

Pf : 171-173°C

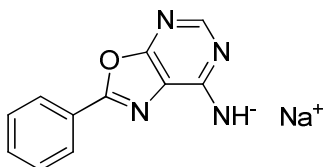
Données spectroscopiques

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 7.89-7.86 (m, 2H, Har) ; 7.52-7.50 (m, 3H, Har) ; 3.57 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2) ; 3.05 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2) ; 3.03 (s, 3H, CH_3) ; 2.07 (quint, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 167.28 (C) ; 162.73 (C) ; 153.32 (C) ; 138.88 (CHar) ; 129.62 (2CHar) ; 126.71 (C) ; 125.86 (2CHar) ; 115.96 (C) ; 95.58 (CN) ; 52.05 (CH_2) ; 32.17 (CH_3) ; 31.77 (CH_2) ; 19.24 (CH_2).

LCMS (APCI $^+$) m/z 267.0 (MH^+)

2-Phénylpyrimido[5,4-d][1,3]oxazol-7-aminoate de sodium (73)



Formule brute : $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_4\text{ONa}$

Masse molaire : 234,19 g.mol^{-1}

Rendement : 99 %

Rf (cyclohexane/AcOEt (6:4)) : 0,19

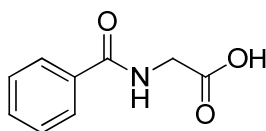
Aspect : solide blanc

Pf : 301-303°C

Données spectroscopiques

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 8.18 (s, 1H, NH) ; 8.13-8.10 (m, 2H, Har) ; 7.62-7.60 (m, 4H, Har + CH).

Acide 2-benzoylaminoacétique (74)



Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$

Masse molaire : 179,18 g.mol^{-1}

Rendement : 29 %

Rf (DCM/MeOH (9:1)) : 0,07

Aspect : solide blanc

Pf : 173-175°C

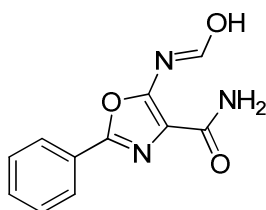
Données spectroscopiques

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 12.61 (s, 1H, OH) ; 8.83 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, NH) ; 7.88-7.85 (m, 2H, Har) ; 7.56-7.45 (m, 3H, Har) ; 3.92 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH₂).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 171.78 (C) ; 166.90 (C) ; 134.29 (C) ; 131.88 (CHar) ; 128.82 (2CHar) ; 127.69 (2CHar) ; 41.67 (CH₂).

LCMS (APCI⁺) m/z 180.1 (MH⁺)

Acide N-(4-(aminocarbonyl)-2-phényl-1,3-oxazol-5-yl)iminoformique (**75**)



Formule brute : C₁₁H₉N₃O₃

Masse molaire : 231,21 g.mol⁻¹

Rendement : 18 %

Rf (DCM/MeOH (9:1)) : 0,48

Aspect : solide blanc

Pf : 193-195°C

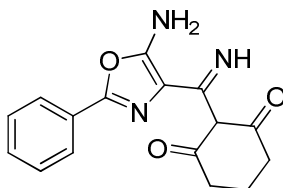
Données spectroscopiques

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 10.79 (s, 1H, OH), 8.73 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, NH), 7.97-7.93 (m, 2H, 2CH), 7.63 (s, 1H, CH), 7.58-7.55 (m, 3H, 3CH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 163.10 (C) ; 154.10 (CH) ; 131.35 (CHar) ; 129.70 (2CHar) ; 128.65 (C) ; 127.90 (C) ; 126.46 (C) ; 126.22 (2CHar) ; 119.14 (C).

LCMS (APCI⁺) m/z 232.1 (MH⁺)

2-((5-Amino-2-phényl-1,3-oxazol-4-yl)(imino)méthyl)-1,3-cyclohexanedione (77**)**



Formule brute : C₁₆H₁₅N₃O₃

Masse molaire : 297,32 g.mol⁻¹

Rendement : 6%

Rf (DCM/MeOH (9:1)) : 0,52

Aspect : solide blanc

Données spectroscopiques

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 9.43 (s, 1H, NH) ; 7.93-7.90 (m, 2H, Har) ; 7.64 (s, 1H, NH) ; 7.60-7.54 (m, 4H, 3Har + NH) ; 5.78 (s, 1H, CH) ; 2.63 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂) ; 2.24 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂) ; 1.94 (quint, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) : 197.33 (C) ; 163.70 (C) ; 158.33 (C) ; 153.26 (C) ; 149.17 (C) ; 131.17 (CHar) ; 129.74 (2CHar) ; 126.53 (C) ; 125.99 (2CHar) ; 117.36 (C) ; 105.09 (CH) ; 36.64 (CH₂) ; 28.19 (CH₂) ; 21.86 (CH₂).

LCMS (APCI⁺) *m/z* 298.0 (MH⁺)

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] <http://www.ccfa.org/what-are-crohns-and-colitis/> (mai 2015)
- [2] <http://www.efcca.org/index.php/about-efcca/what-are-ibd> (mai 2015)
- [3] Bernstein, C.N.; Shanahan, F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*. **2008**, *57*, 1185 - 1191.
- [4] Gower-Rousseau, C.; Vasseur, F.; Fumery, M.; Savoye, G.; Salleron, J.; Dauchet, L.; Turck, D.; Cortot, A.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J.F. Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). *Digest. Liver Dis.* **2013**, *45*, 89 - 94.
- [5] <http://www.hepatoweb.com/Crohn-Frequence.php> (mai 2015)
- [6] <http://www.efcca-solutions.net/media/european/EuropeanReport.pdf> (mai 2015)
- [7] Calkins, B.M. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **1989**, *34*, 1841 – 1854.
- [8] Benoni, C.; Nilsson, A. Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *Scand. J. Gastroenterol.* **1987**, *22*, 1130 – 1136.
- [9] Persson, P.G.; Ahlbom, A.; Hellers, G. Inflammatory bowel disease and tobacco smoke - a case control study. *Gut*. **1990**, *31*, 1377 – 1381.
- [10] Russel, M.G.; Dorant, E.; Brummer, R.J.; Van de Kruijs, M.A.; Muris, J.W.; Bergers, J.M.; Goedhard J.; Stockbrügger, R.W. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. **1997**, *113*, 377 - 382.
- [11] <http://www.afa.asso.fr/article/voir/mici-et-heredite.html> (mai 2015)
- [12] Tysk, C.; Lindberg, E.; Jarnerot, G.; Floderus-Myrhed, B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. **1988**, *29*, 990 - 996.
- [13] 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. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **2001**, *411*, 599 – 603.
- [14] 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.; Nunez, G.; Cho, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **2001**, *411*, 603 – 606.
- [15] Hampe, J.; Cuthbert, A.; Croucher, P.J.; Mirza, M.M.; Mascheretti, S.; Fisher, S.; Frenzel, H.; King, K.; Hasselmeyer, A.; MacPherson, A.J.; Bridger, S.; Van Deventer, S.; Forbes, A.; Nikolaus, S.; Lennard-Jones, J.E.; Foelsch, U.R.; Krawczak, M.; Lewis, C.; Schreiber, S.; Mathew, C.G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, **2001**, *357*, 1925 - 1928.
- [16] Strober, W.; Asano, N.; Fuss, I.; Kitani, A.; Watanabe, T. Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 249 - 260.

- [17] Cucchiara, S.; Latiano, A.; Palmieri, O.; Staiano, A.M.; D'Incà, R.; Guariso, G.; Vieni, G.; Rutigliano, V.; Borrelli, O.; Valvano, M.R.; Annese, V. Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1221 - 1229.
- [18] Pigneur, B.; Escher, J.; Elawad, M.; Lima, R.; Buderus, S.; Kierkus, J.; Guariso, G.; Canioni, D.; Lambot, K.; Talbotec, C.; Shah, N.; Begue, B.; Rieux-Laucat, F.; Goulet, O.; Cerf-Bensussan, N.; Neven, B.; Ruemmele, F.M. Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: a survey of the Genius Working Group. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2013**, *19*, 2820 - 2828.
- [19] Neurath, M.F.; Fuss, I.; Pasparakis, M.; Alexopoulou, L.; Haralambous, S.; Meyer zum Büschenfelde, K.H.; Strober, W.; Kollias, G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 1743 - 1750.
- [20] Jergens, A.E.; Sonea, I.M.; O'Connor, A.M.; Kauffman, L.K.; Grozdanic, S.D.; Ackermann, M.R.; Evans, R.B. Intestinal cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: a meta-analysis with critical appraisal. *Comp. Med.* **2009**, *59*, 153 - 162.
- [21] Bisping, G.; Lügering, N.; Lütke-Brintrup, S.; Pauels, H.G.; Schürmann, G.; Domschke, W.; Kucharzik, T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN- γ) in peripheral CD8⁺ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, *123*, 15 - 22.
- [22] http://www.gastro.medline.ch/Services_et_outils/Scores_cliniques/Scores_cliniques.php
- [23] Veerappan, G.R.; Betteridge, J.; Young, P.E. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2012**, *14*, 324 - 333.
- [24] Ciccocioppo, R.; Bernardo, M.E.; Sgarella, A.; Maccario, R.; Avanzini, M.A.; Ubezio, C.; Minelli, A.; Alvisi, C.; Vanoli, A.; Calliada, F.; Dionigi, P.; Perotti, C.; Locatelli, F.; Corazza, G.R. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut.* **2011**, *60*, 788 - 798.
- [25] Di Marzo, V.; Izzo, A.A. Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut.* **2006**, *55*, 1373 - 1376.
- [26] Wright, K.; Rooney, N.; Feeney, M.; Tate, J.; Robertson, D.; Welham, M.; Ward, S. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology.* **2005**, *129*, 437 - 453.
- [27] Marquez, L.; Suarez, J.; Iglesias, M.; Bermudez-Silva, F.J.; Rodriguez de Fonseca, F.; Andreu, M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One.* **2009**, *4*, e6893.
- [28] Engel, M.A.; Kellermann, C.A.; Rau, T.; Burnat, G.; Hahn, E.G.; Konturek, P.C. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *59*, 673 - 689.
- [29] Di Sabatino, A.; Battista, N.; Biancheri, P.; Rapino, C.; Rovedatti, L.; Astarita, G.; Vanoli, A.; Dainese, E.; Guerci, M.; Piomelli, D.; Pender, S.L.; MacDonald, T.T.; Maccarrone, M.; Corazza, G.R. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 574 - 583.
- [30] Storr, M.A.; Keenan, C.M.; Zhang, H.; Patel, K.D.; Makriyannis, A.; Sharkey, K.A. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 1678 - 1685.

- [31] Alhouayek, M.; Muccioli, G.G. The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases: from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 615 - 625.
- [32] Lambert, D.M. Les vertus thérapeutiques du cannabis à travers les millénaires. *Journal de Pharmacie de Belgique.* **2002**, *57*, 21 – 29.
- [33] Elsohly, M.A.; Slade, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* **2005**, *78*, 539 - 548.
- [34] Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1647 - 1657.
- [35] Underner, M.; Urban, T.; Perriot, J.; de Chazeron I.; Meurice, J.C. Cannabis smoking and lung cancer. *Rev. Mal. Respir.* **2014**, *31*, 488 - 498.
- [36] Devane, W.A.; Dysarz, F.A. 3rd.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605 - 613.
- [37] Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* **1990**, *346*, 561 - 564.
- [38] Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* **1993**, *365*, 61 - 65.
- [39] Pertwee, R.G. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 984 - 986.
- [40] Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1092 - 1101.
- [41] Hansen, K.B.; Rosenkilde, M.M.; Knop, F.K.; Wellner, N.; Diep, T.A.; Rehfeld, J.F.; Andersen, U.B.; Holst, J.J.; Hansen, H.S. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1409 - 1417.
- [42] Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A.; Felder, C.C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B.R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161 - 202.
- [43] Salo, O.M.; Lahtela-Kakkonen, M.; Gynther, J.; Järvinen, T.; Poso, A. Development of a 3D model for the human cannabinoid CB1 receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3048 - 3057.
- [44] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **2000**, *289*, 739 - 745.
- [45] Choi, G.; Guo, J.; Makriyannis, A. The conformation of the cytoplasmic helix 8 of the CB1 cannabinoid receptor using NMR and circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1668*, 1 - 9.
- [46] Tiburu, E.K.; Bowman, A.L.; Struppe, J.O.; Janero, D.R.; Avraham, H.K.; Makriyannis, A. Solid-state NMR and molecular dynamics characterization of cannabinoid receptor-1 (CB1) helix 7 conformational plasticity in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1788*, 1159 - 1167.
- [47] Xie, X.Q.; Chen, J.Z. NMR structural comparison of the cytoplasmic juxtamembrane domains of G-protein- coupled CB1 and CB2 receptors in membrane mimetic dodecylphosphocholine micelles. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3605 - 3612.

- [48] Breivogel, C.S.; Childers, S.R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptor. *Neurobiol. Dis.*, **1998**, *5*, 417 - 431.
- [49] Zimmer, A.; Zimmer, A.M.; Hohmann, A.G.; Herkenham, M.; Bonner, T.I. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **1999**, *96*, 5780 - 5785.
- [50] Galiègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 54 - 61.
- [51] Wagner, J.A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilatation mediated by CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *423*, 203 - 210.
- [52] Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 129 - 180.
- [53] Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 771 - 784.
- [54] Pacher, P.; Batkai, S.; kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 389 - 462.
- [55] Lu, D.; Meng, Z.; Thakur, G.A.; Fan, P.; Steed, J.; Tartal, C.L.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H.; Deschamps, J.R.; Parrish, D.A.; George, C.; Järbe, T. U.; Lamb, R.J.; Makriyannis, A. Adamantyl cannabinoids: a novel class of cannabinergic ligands. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4576 - 4585.
- [56] Tius, M.A.; Hill, W.A.; Zou, X.L.; Busch-Petersen, J.; Kawakami, J.K.; Fernandez-Garcia, M.C.; Drake, D.J.; Abadji, V.; Makriyannis, A. Classical/non-classical cannabinoid hybrids; stereochemical requirements for the southern hydroxyalkyl chain. *Life Sciences*. **1995**, *56*, 2007 - 2012.
- [57] Mechoulam, R.; Feigenbaum, J.J.; Lander, N.; Segal, M.; Järbe, T.U.; Hiltunen, A.J.; Consroe, P. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*. **1988**, *44*, 762 - 764.
- [58] Hillard, C.J.; Manna, S.; Greenberg, M.J.; DiCamelli, R.; Ross, R.A.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.; Pertwee, R.G.; Campbell, W.B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol Exp Ther.* **1999**, *289*, 1427 - 1433.
- [59] Lange, J.H.M.; Zilaout, H.; Van Vliet, B.J. Preparation of 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as cannabinoid CB1 receptor agonists. **2009**, WO2009037244.
- [60] Beha, S.; Brown, W.; Johnstone, S.; Liu, Z.; Page, D.; Tomaszewski, M.; Wei, Z.Y.; Yue, S.Y. Preparation of substituted tetrahydrocarbazole for use as analgesics. **2009**, WO2009024819.
- [61] Ando, K.; Buchler, I.P.; Hedge, S.G.; Kawai, M.; Masuda, T.; Omura, H. Benzimidazolone derivatives and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of CB1 and CB2 receptor mediated diseases. **2008**, WO2008032164.
- [62] Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240 - 244.
- [63] Kipnes, M.S.; Hollander, P.; Fujioka, K.; Gantz, I.; Seck, T.; Erondur, N.; Shentu, Y.; Lu, K.; Suryawanshi, S.; Chou, M.; Johnson-Levonas, A.O.; Heymsfield, S.B.; Shapiro, D.; Kaufman, K.D.; Amatruda, J.M. A one-year study to assess the safety and efficacy of the CB1R inverse agonist

taranabant in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2010**, *12*, 517 - 531.

[64] Kopka, I.E.; Lin, L.S.; Jewell, J.P.; Lanza, T.J.; Fong, T.M.; Shen, C.P.; Lao, Z.J.; Ha, S.; Castonguay, L.G.; Van der Ploeg, L.; Goulet, M.T.; Hagmann, W.K. Synthesis and cannabinoid-1 receptor binding affinity of conformationally constrained analogs of taranabant. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4757 – 4761.

[65] Felder, C.C.; Joyce, K.E.; Briley, E.M.; Glass, M.; Mackie, K.P.; Fahey, K.J.; Cullinan, G.J.; Hunden, D.C.; Johnson, D.W.; Chaney, M.O.; Koppel, G.A.; Brownstein, M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 291 - 297.

[66] Howlett, A.C. In: *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology*; Pertwee, Ed., Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, **2005**, *168*, pp. 53 - 79.

[67] Cichero, E.; Ligresti, A.; Allarà, M.; di Marzo, V.; Lazzati, Z.; D'Ursi, P.; Marabotti, A.; Milanesi, L.; Spallarossa, A.; Ranise, A.; Fossa, P. Homology modeling in tandem with 3D-QSAR analyses: A computational approach to depict the agonist binding site of the human CB2 receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4489 - 4505.

[68] Zhao, J.; Zheng, H.; Xie, X.Q. NMR characterization of recombinant transmembrane protein CB2 fragment CB2(180-233). *Protein Pept. Lett.* **2006**, *13*, 335 – 342.

[69] Zhang, Y.; Xie, X.Q. Biosynthesis, purification, and characterization of a cannabinoid receptor 2 fragment (CB2(271-326)). *Protein Expr. Purif.* **2008**, *59*, 249 - 257.

[70] Choi, G.; Landin, J.; Xie, X.Q. The cytoplasmic helix of cannabinoid receptor CB2, a conformational study by circular dichroism and (1)H NMR spectroscopy in aqueous and membrane-like environments. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 169 - 177.

[71] Zheng, H.; Zhao, J.; Sheng, W.; Xie, X.Q. A transmembrane helix-bundle from G-protein coupled receptor CB2: biosynthesis, purification, and NMR characterization. *Biopolymers.* **2006**, *83*, 46 - 61.

[72] Montero, C.; Campillo, N.E.; Goya, P.; Paez, J.A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 75 - 83.

[73] Tuccinardi, T.; Ferrarini, P.L.; Manera, C.; Ortore, G.; Saccomanni, G.; Martinelli, A. Cannabinoid CB2/CB1 selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 984 - 994.

[74] Feng, Z.; Alqarni, M.H.; Yang, P.; Tong, Q.; Chowdhury, A.; Wang, L.; and Xie, X. Modeling, Molecular Dynamics Simulation, and Mutation Validation for Structure of Cannabinoid Receptor 2 Based on Known Crystal Structures of GPCRs. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 2483–2499.

[75] Klein, T.W.; Newton, C.A.; Friedman, H. Cannabinoids and the immune system. *Pain Res. Manag.* **2001**, *6*, 95 - 101.

[76] Ashton, J.C.; Friberg, D.; Darlington, C.L.; Smith, P.F. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* **2006**, *396*, 113 - 116.

[77] Van Sickle, M.D.; Duncan, M.; Kingsley, P.J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J.S.; Marnett, L.J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q.J.; Patel, K.D.; Sharkey, K.A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science.* **2005**, *310*, 329 - 332.

- [78] Gong, J.P.; Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Liu, Q.R.; Tagliaferro, P.A.; Brusco, A.; Uhl, G.R. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **2006**, *1071*, 10 - 23.
- [79] Guindon, J.; Hohmann, A.G. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 319 - 334.
- [80] Berdyshev, E.V. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids.* **2000**, *108*, 169 - 190.
- [81] Sarfaraz, S.; Afaq, F.; Adhami, V.M.; Mukthar, H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1635 – 1641.
- [82] Pertwee, R.G.; Gibson, M.; Stevenson, L.A.; Ross, R.A.; Banner, K.; Saha, B.; Razdan, R.K.; and Martin, B.R. O-1057, a potent water-soluble cannabinoid receptor agonist with antinociceptive properties. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 1577 – 1584.
- [83] Huffman, J.W.; Liddle, J.; Yu, S.; Aung, M.M.; Abood, M.E.; Wiley, J.L.; Martin, B.R. 3-(1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy- Δ^8 -THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2905–2914.
- [84] Showalter, V.M.; Compton, D.R.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 989 – 999.
- [85] Hanus, L.; Breuer, A.; Tchilibon, S.; Shiloah, S.; Goldenberg, D.; Horowitz, M.; Pertwee, R.G.; Ross, R.A.; Mechoulam, R.; Friede, E. HU-308: a specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 14228 – 14233.
- [86] Compton, D.R.; Gold, L.H.; Ward, S.J.; Balster, R.L.; Martin, B.R. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *263*, 1118 – 1126.
- [87] Ibrahim, M.M.; Deng, H.; Zvonok, A.; Cockayne, D.A.; Kwan, J.; Mata, H.P.; Vanderah, T.W.; Lai, J.; Porreca, F.; Makriyannis, A.; Malan, T.P. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *10*, 10529 – 10533.
- [88] Bingham, B.; Jones, P.G.; Uveges, A.J.; Kotnis, S.; Lu, P.; Smith, V.A.; Sun, S.-C.; Resnick, L.; Chlenov, M.; He, Y.; Strassle, B.W.; Cummons, T.A.; Piesla, M.J.; Harrison, J.E.; Whiteside, G.T. Species-specific in vitro pharmacological effects of the cannabinoid receptor 2 (CB2) selective ligand AM1241 and its resolved enantiomers. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1061 – 1070.
- [89] Wroblewski, S.T.; Chen, P.; Hynes, J., Jr.; Lin, S.; Norris, D.J.; Pandit, C.R.; Spergel, S.; Wu, H.; Tokarski, J.S.; Chen, X.; Gillooly, K.M.; Kiener, P.A.; McIntyre, K.W.; Patil-Koota, V.; Shuster, D.J.; Turk, L.A.; Yang, G.; Leftheris, K. Rational design and synthesis of an orally active indolopyridone as a novel conformationally constrained cannabinoid ligand possessing antiinflammatory properties. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2110 – 2116.
- [90] Pagé, D.; Balaux, E.; Boisvert, L.; Liu, Z.; Milburn, C.; Tremblay, M.; Wei, Z.; Woo, S.; Luo, X.; Cheng, Y.-X.; Yang, H.; Srivastava, S.; Zhou, F.; Brown, W.; Tomaszewski, M.; Walpole, C.; Hodzic, L.; St-Onge, S.; Godbout, C.; Salois, D.; Payza, K. Novel benzimidazole derivatives as selective CB2 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3695 – 3700.
- [91] Ando, K.; Iwata, Y. N-Substituted Saturated Heterocyclic Sulfone Compounds with CB2 Receptor Agonistic Activity. WO 2010084767, 2010.
- [92] <http://www.raqualia.com>.

- [93] Omura, H.; Kawai, M.; Shima, A.; Iwata, Y.; Ito, F.; Masuda, T.; Ohta, A.; Makita, N.; Omoto, K.; Sugimoto, H.; Kikuchi, A.; Iwata, H.; Ando, K. The SAR studies of novel CB2 selective agonists, benzimidazolone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3310 – 3314.
- [94] Bilodeau, M.T.; Burgey, C.S.; Deng, Z.J. Hartnett, J.C.; Kett, N.R.; Melamed, J.; Munson, P.M.; Nanda, K.K.; Thomson, W.; Trotter, B.W.; Wu, Z. Imidazopyridine Analogs as CB2 Receptor Modulators, Useful in the Treatment of Pain, Respiratory and Non- Respiratory Diseases. WO 2008085302, 2008.
- [95] Muthuppalanippan, M.; Balasubramanian, G.; Gullapalli, S.; Joshi, N.K.; Narayanan, S. Novel Cannabinoid Receptor Ligands, Pharmaceutical Compositions Containing Them, and Process for Their Preparation. WO 2006129178, 2006.
- [96] Liotta, F. Hexahydro-cyclooctyl Pyrazole Cannabinoid Modulators. WO 2007044215, 2007
- [97] Mussinu, J.-M.; Ruii, S.; Mulè, A.C.; Pau, A.; Carai, M.A.M.; Loriga, G.; Murineddu, G.; Pinna, G.A. Tricyclic pyrazoles. Part 1: Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-based ligands for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 251 – 263.
- [98] Luongo, L.; Palazzo, E.; tambaro, S.; Giordano, C.; Gatta, L.; Scafuro, M.A.; Rossi, F.; Lazzari, P.; Pani, L.; De Novellis, V.; Malcangio, M.; Maione, S. 1-(2'4'-Dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through frunctional microglial changes in mice. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 177 – 185.
- [99] Gonsiorek, W.; Lunn, C.A.; Fan, X.; Deno, G.; Kozlowski, J.; Hipkin, R.W. Sch35966 is a potent, selective agonist at the peripheral cannabinoid receptor (CB2) in rodents and primates. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1262 – 1271.
- [100] El Bakali, J.; Muccioli, G.G.; Body-Malapel, M.; Djouina, M.; Klupsch, F.; Ghinet, A.; Barczyk, A.; Renault, N.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Lambert, D.M.; Millet, R. Conformational restriction leading to a selective CB2 cannabinoid receptor agonist orally active against colitis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 198 – 203.
- [101] Hollinshead, S.P.; Tidwell, M.W.; Palmer, J.; Guidetti, R.; Sanderson, A.; Johnson, M.P.; Chambers, M.G.; Oskins, J.; Stratford, R.; Astles, P.C. Selective Cannabinoid Receptor Type 2 (CB2) Agonists: Optimization of a Series of Purines Leading to the Identification of a Clinical Candidate for the Treatment of Osteoarthritic Pain. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5722 – 5733.
- [102] Pasquini, S.; Botta, L.; Semeraro, T.; Mugnaini, C.; Ligresti, A.; Palazzo, E.; Maione, S.; Di Marzo, V.; Corelli, F. Investigations on the 4-Quinolone-3-carboxylic Acid Motif. 2. Synthesis and Structure–Activity Relationship of Potent and Selective Cannabinoid-2 Receptor Agonists Endowed with Analgesic Activity in Vivo. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5075 – 5084.
- [103] Eatherton, A.J.; Giblin, G.M.P.; Green, R.H.; Mitchell, W.L.; Naylor, A.; Rawlings, D.A.; Slingsby, B.P.; Whittington, A.R. Pyrimidine Derivatives and Their Use as CB2 Modulators. WO 2004018433, **2004**.
- [104] Worsley, M.A.; Clayton, N.M.; Goldsmith, P.; Giblin, G.; Wilson, A.; Boissonade, F.M. The Effect of CB2 Agonist GW833972A on Trigeminal Fos Expression. Presented at the IADR Pan European Federation **2006**, Sep 13–16, 2006; No. 0454 Neuroscience Poster Session.
- [105] Brown, A.J.; Conner, H.E.; Eatherton, A.J.; Giblin, G.M.P.; Jandu, K.S.; Knowles, R.G.; Mitchell, W.L.; Naylor, A.; O'Shaughnessy, C.T.; Rawlings, D.A.; Slingsby, B.P.; Tralau- Stewart, C.J.; Whittington, A.R.; Williamson, R.A. Combination of CB2 Modulators and PDE4 Inhibitors for Use in Medicine. WO 2005074939, **2005**.

- [106] Gleave, R.J.; Beswick, P.J.; Brown, A.J.; Giblin, G.M.P.; Haslam, C.P.; Livermore, D.; Moses, A.; Nicholson, N.H.; Page, L.W.; Slingsby, B.; Swarbrick, M.E. 2-Amino-5-aryl-pyridines as selective CB2 agonists: synthesis and investigation of structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6578 – 6581.
- [107] Van Der Stelt, M.; Cals, J.M. G.B. 1-(Biphenyl-4-ylmethyl)imidazolidine-2,4-dione Derivatives and Their Use as CB2 Receptor Agonists. WO 2010063721, **2010**.
- [108] El Bakali, J.; Gilleron, P.; Body-Malapel, M.; Mansouri, R.; Muccioli, G.G.; Djouina, M.; Barczyk, A.; Klupsch, F.; Andrzejak, V.; Lipka, E.; Furman, C.; Lambert, D.M.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Millet, R. 4-Oxo-1,4-dihydropyridines as Selective CB2 Cannabinoid Receptor Ligands Part 2: Discovery of New Agonists Endowed with Protective Effect Against Experimental Colitis. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8948 – 8952.
- [109] Dart, M.J.; Carroll, W.A.; Florjancic, A.S.; Frost, J.M.; Gallagher, M.E.; Li, T.; Nelson, D.W.; Patel, M.V.; Peddi, S.; Perez-Medrano, A.; Ryther, K.B.; Tietje, K.R.; Kolasa, T. Novel Compound as Cannabinoid Receptor Ligands and Uses Thereof. WO 2007140385, **2007**.
- [110] Ohta, H.; Ishizaka, T.; Tatsuzuki, M.; Yoshinaga, M.; Iida, I.; Yamaguchi, T.; Tomishima, Y.; Futaki, N.; Toda, Y.; Saito, S. Imine derivatives as new potent and selective CB2 cannabinoid receptor agonists with an analgesic action. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1111 – 1124.
- [111] Berry, A.; Cirillo, P.F.; Hickey, E.R.; Riether, D.; Thomson, D.; Zindell, R.M.; Ermann, M.; Jenkins, J.E.; Mushi, I.; Taylor, M.; Chowdhury, C.; Palmer, C.; Blumire, N. Compounds Which Modulate the CB2 Receptor. WO 2008039645, **2008**.
- [112] Zindell, R.; Walker, E.R.; Scott, J.; et al. Aryl 1,4-diazepane compounds as potent and selective CB2 agonists: optimization of drug-like properties and target independent parameters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4276 – 4280.
- [113] Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Millan, J.; Derocq, J.M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarrau, M.; Bouaboula, M.; Calandra, B.; Portier, M.; Shire, D.; Brelière, J.C.; Le Fur, G.L. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 644 - 650.
- [114] Griffin, G.; Wray, E.J.; Tao, Q.; McAllister, S.D.; Rorrer, W.K.; Aung, M.M.; Martin, B.R.; Abood, M.E. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *377*, 117 - 125.
- [115] Ueda, Y.; Miyagawa, N.; Matsui, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. Involvement of cannabinoid CB2 receptor-mediated response and efficacy of cannabinoid CB2 receptor inverse agonist, JTE-907, in cutaneous inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *520*, 164 – 171.
- [116] Landsman, R.S.; Makriyannis, A.; Deng, H.; Consroe, P.; Roeske, W.R.; Yamamura, H.I. AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci.* **1998**, *62*, 109 - 113.
- [117] Ross, R.A.; Brockie, H.C.; Stevenson, L.A.; Murphy, V.L.; Templeton, F.; Makriyannis, A.; Pertwee, R.G. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 665 - 672.
- [118] Hosohata, K.; Quock, R.M.; Hosohata, Y.; Burkey, T.H.; Makriyannis, A.; Consroe, P.; Roeske, W.R.; Yamamura, H.I. AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain. *Life Sci.* **1997**, *61*, 115 - 118.

- [119] Kumar, P.; Song, Z.H. Identification of raloxifene as a novel CB2 inverse agonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *435*, 76 – 81.
- [120] Kumar, P.; Song, Z.H. CB2 cannabinoid receptor is a novel target for third-generation selective estrogen receptor modulators bazedoxifene and lasofoxifene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 144 - 149.
- [121] Prather, P.L.; FrancisDevaraj, F.; Dates, C.R.; Greer, A.K.; Bratton, S.M.; Ford, B.M.; Franks, L.N.; Radominska-Pandya, A. CB1 and CB2 receptors are novel molecular targets for Tamoxifen and 4OH-Tamoxifen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 339 - 343.
- [122] Sawzdargo, M.; George, S.R.; Nguyen, T.; Xu, S.J.; Kolakowski, L.F. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to cd22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *239*, 543 – 547.
- [123] Brown, A.; Wise, A. Identification of modulators of GPR55 activity. Assignee: GlaxoSmithKline. Patent WO00186305, **2001**.
- [124] Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Lee, D.K.; Lynch, K.R.; Cheng, R.; Heng, H.H.; George, S.R.; O'Dowd, B.F. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol. Brain Res.* **1999**, *64*, 193 - 198.
- [125] Sharir, H.; Abood, M.E. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol. Therapeut.* **2010**, *126*, 301 – 313.
- [126] Elbegdorj, O.; Westkaemper, R.B.; Zhang, Y. A homology modeling study toward the understanding of three-dimensional structure and putative pharmacological profile of the G-protein coupled receptor GPR55. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *39*, 50 – 60.
- [127] Offertaler, L.; Mo, F.M.; Batkai, S.; Liu, J.; Begg, M.; Razdan, R.K.; Martin, B.R.; Bukoski, R.D.; Kunos, G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 699 – 705.
- [128] Pietr, M.; Kozela, E.; Levy, R.; Rimmerman, N.; Lin, Y.H.; Stella, N.; Vogel, Z.; Juknat, A. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2071 – 2076.
- [129] Whyte, L.S.; Ryberg, E.; Sims, N.A.; Ridge, S.A; Mackie, K.; Greasley, P.J.; Ross, R.A.; Rogers, M.J. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2009**, *106*, 16511 – 16516.
- [130] Lauckner, J.E.; Jensen, J.B.; Chen, H.Y.; Lu, H.C.; Hille, B.; Mackie, K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2008**, *105*, 2699 – 2704.
- [131] Yamashita, A.; Oka, S.; Tanikawa, T.; Hayashi, Y.; Nemoto-Sasaki, Y.; Sugiura, T. The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostag. Oth. Lipid M.* **2013**, *107*, 103 – 116.
- [132] Blondeau, N.; Lauritzen, I.; Widmann, C.; Lazdunski, M.; Heurteaux, C. A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2002**, *22*, 821 - 834.
- [133] Heynen-Genel, S.; Dahl, R.; Shi, S.; Milan, L.; Hariharan, S.; Bravo, Y.; Sergienko, E.; Hedrick, M.; Dad, S.; Stonich, D.; Su, Y.; Vicchiarelli, M.; Mangravita-Novo, A.; Smith, L.H.; DY Chung, T.; Sharir, H.; Barak, L.S.; and Abood, M.E. Screening for Selective Ligands for GPR55 – Agonists. Probe Reports

from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. September 29, **2010**; Last Update: May 26, 2011.

[134] Kapur, A.; Zhao, P.; Sharir, H.; Bai, Y.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; and Abood, M.E. Atypical Responsiveness of the Orphan Receptor GPR55 to Cannabinoid Ligands. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29817 - 29827.

[135] Kotsikorou, E.; Sharir, H.; Shore, D.M.; Hurst, D.P.; Lynch, D.L.; Madrigal, K.E.; Heynen-Genel, S.; Milan, L.B.; Chung, T.D.Y.; Seltzman, H.H.; Bai, Y.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; Croatt, M.P.; Abood, M.E.; and Reggio, P.H. Identification of the GPR55 Antagonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligand. *Biochemistry*, **2013**, *52*, 9456 – 9469.

[136] Heynen-Genel, S.; Dahl, R.; Shi, S.; Milan, L.; Hariharan, S.; Sergienko, E.; Hedrick, M.; Dad, S.; Stonich, D.; Su, Y.; Vicchiarelli, M.; Mangravita-Novo, A.; Smith, L.H.; Chung, T.D.Y.; Sharir, H.; Caron, M.G.; Barak, L.S.; Abood, M.E. Screening for Selective Ligands for GPR55 - Antagonists. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); **2010**.

[137] Kargl, J.; Brown, A.J.; Andersen, L.; Dorn, G.; Schicho, R.; Waldhoer, M.; and Heinemann, A. A Selective Antagonist Reveals a Potential Role of G Protein – Coupled Receptor 55 in Platelet and Endothelial Cell Function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *346*, 54 – 66.

[138] Navarro, G.; Carriba, P.; Gandía, J.; Ciruela, F.; Casadó, V.; Cortés, A.; Mallol, J.; Canela, E.I.; Lluís, C.; and Franco, R. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorld-Journal* **8**, **2008**, 1088–1097

[139] Koch, M.; Habazettl, I.; Dehghani, F.; Korf, H.W. The rat pineal gland comprises an endocannabinoid system. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 351 – 360.

[140] Callén, L.; Moreno, R.; Barroso-Chinea, P.; Moreno-Delgado, D.; Cortés, A.; Mallol, J.; Casadó, V.; Lanciego, J.L.; Franco, R.; Lluís, C.; Canela, E.I.; and McCormick, P.J. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20851 - 20865.

[141] Martínez-Pinilla, E.; Reyes-Resina, I.; Oñatibia-Astibia, A.; Zamarbide, M.; Ricobaraz, A.; Navarro, G.; Moreno, E.; Dopeso-Reyes, I.G.; Sierrab, S.; Ricob, A.J.; Rodas, E.; Lanciego, J.L.; Franco, R. CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp. Neurol.* **2014**, *261*, 44 – 52.

[142] Kargl, J.; Balenga, N.; Parzmair, G.P.; Brown, A.J.; Heinemann, A.; Waldhoer, M. The Cannabinoid Receptor CB1 Modulates the Signaling Properties of the Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44234 - 44248.

[143] Balenga, N.A.B.; Aflaki, E.; Kargl, J.; Platzer, W.; Schröder, R.; Blättermann, S.; Kostenis, E.; Brown, A.J.; Heinemann, A.; Waldhoer, M. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell. Res.* **2011**, *21*, 1452 – 1469.

[144] Moreno, E.; Andradás, C.; Medrano, M.; Caffarel, M.M.; Pérez-Gómez, E.; Blasco-Benito, S.; Gómez-Cañas, M.; Pazos, M.R.; Irving, A.J.; Lluís, C.; Canela, E.I.; Fernández-Ruiz, J.; Guzmán, M.; McCormick, P.J.; Sánchez, C. Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 21960 - 21972.

[145] Hanus, L.O. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 213 - 271.

- [146] Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **1992**, *258*, 1946 - 1949.
- [147] Vogel, Z.; Barg, J.; Levy, R.; Saya, D.; Heldman, E.; Mechoulam, R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J. Neurochem*. **1993**, *61*, 352 - 355.
- [148] Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, **1994**, *372*, 686 - 691.
- [149] Schmid, P.C.; Paria, B.C.; Krebsbach, R.J.; Schmid, H.H.; Dey, S.K. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4188 - 4192.
- [150] Giuffrida, A.; Beltramo, M.; Piomelli, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 7 - 14.
- [151] Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; Pertwee, R.G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, A. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83 - 90.
- [152] Ben-Shabat, S.; Fride, E.; Sheskin, T.; Tamiri, T.; Rhee, M.H.; Vogel, Z.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *353*, 23 - 31.
- [153] Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. **1997**, *388*, 773 - 778.
- [154] Di Marzo, V. 2-Arachidonoyl-glycerol as an endocannabinoid: lime-light for a formerly neglected metabolite. *Biochemistry*, **1998**, *63*, 13 - 21.
- [155] Avraham, Y.; Magen, I.; Zolotarev, O.; Vorobiov, L.; Nachmias, A.; Pappo, O.; Ilan, Y.; Berry, E.M.; Ackerman, Z. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist, in various rat tissues during the evolution of experimental cholestatic liver disease. *Prostag. Leukotr. Ess.* **2008**, *79*, 35 - 40.
- [156] Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Melck, D.; Martin, B.R. Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 721 - 744.
- [157] Piomelli, D.; Beltramo, M.; Glasnapp, S.; Lin, S.Y.; Goutopoulos, A.; Xie, X.Q.; Makriyannis, A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5802 - 5807.
- [158] Cadas, H.; Gaillet, S.; Beltramo, M.; Venance, L.; Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci.* **1996**, *16*, 3934 - 3942.
- [159] Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5298 - 5305.

- [160] Simon, G.M.; Cravatt, B.F. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26465 - 26472.
- [161] Simon, G.M.; Cravatt, B.F. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9341 - 9349.
- [162] Sun, Y.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ueda, N. Biosynthesis of anandamide and *N*-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* **2004**, *380*, 749 - 756.
- [163] Liu, J.; Wang, L.; Harvey-White, J.; Huang, B.X.; Kim, H.Y.; Luquet, S.; Palmiter, R.D.; Krystal, G.; Rai, R.; Mahadevan, A.; Razdan, R.K.; Kunos, G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology.* **2008**, *54*, 1 - 7.
- [164] Kano, M.; Ohno-Shosaku, T.; Hashimoto-dani, Y.; Uchigashima, M.; Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 309 - 380.
- [165] Kondo, S.; Kondo, H.; Nakane, S.; Kodaka, T.; Tokumura, A.; Waku, K.; Sugiura, T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* **1998**, *429*, 152 - 156.
- [166] Ueda, H.; Kobayashi, T.; Kishimoto, M.; Tsutsumi, T.; Okuyama, H. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1874 - 1881.
- [167] Bisogno, T.; Melck, D.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2113 - 2119.
- [168] Schmid, P.C.; Zuzarte-Augustin, M.L.; Schmid, H.H. Properties of rat liver *N*-acylethanolamine amidohydrolase. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14145 - 14149.
- [169] Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* **1996**, *384*, 83 - 87.
- [170] McKinney, M.K.; Cravatt, B.F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 411 - 432.
- [171] Labar, G.; Michaux, C. Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1882 - 1902.
- [172] Deutsch, D.G.; Ueda, N.; Yamamoto, S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **2002**, *66*, 201 - 210.
- [173] Egertova, M.; Cravatt, B.F.; Elphick, M.R. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience.* **2003**, *119*, 481 - 496.
- [174] Tornqvist, H.; Belfrage, P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 813 - 819.

- [175] Hogestatt, E.D.; Jonsson, B.A.; Ermund, A.; Andersson, D.A.; Bjork, H.; Alexander, J.P.; Cravatt, B.F.; Basbaum, A.I.; Zygmunt, P.M. Conversion of acetaminophen to the bioactive *N*-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31405 - 31412.
- [176] Long, J.Z.; Nomura, D.K.; Cravatt, B.F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 744 - 753.
- [177] Dinh, T.P.; Carpenter, D.; Leslie, F.M.; Freund, T.F.; Katona, I.; Sensi, S.L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 10819 - 10824.
- [178] Saario, S.M.; Laitinen, J.T. Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 1903 - 1913.
- [179] Selley, D.E.; Stark, S.; Sim, L.J.; Childers, S.R. Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding in rat brain membranes. *Life Sci.* **1996**, *59*, 659 - 668.
- [180] Kawamura, Y.; Fukaya, M.; Maejima, T.; Yoshida, T.; Miura, E.; Watanabe, M.; Ohno-Shosaku, T.; Kano, M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2991 - 3001.
- [181] Chemin, J.; Monteil, A.; Perez-Reyes, E.; Nargeot, J.; Lory, P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7033 - 7040.
- [182] Wilson, R.I.; Nicoll, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* **2002**, *296*, 678 - 682.
- [183] Demuth, D.G.; Molleman, A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* **2006**, *78*, 549 - 563.
- [184] Bonhaus, D.W.; Chang, L.K.; Kwan, J.; Martin, G.R. Dual activation and inhibition of adenylate cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *287*, 884 - 888.
- [185] Deadwyler, S. A.; Hampson, R. E.; Mu, J.; Whyte, A.; Childers, S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *273*, 734 - 743.
- [186] Gebremedhin, D.; Lange, A.R.; Campbell, W.B.; Hillard, C.J.; Harder, D.R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, 2085 - 2093.
- [187] Brown, S.P.; Safo, P.K.; Regehr, W.G. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 5623 - 5631.
- [188] Hampson, A.J.; Bornheim, L.M.; Scanziani, M.; Yost, C.S.; Gray, A.T.; Hansen, B.M.; Leonoudakis, D.J.; Bickler, P.E. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 671 - 676.
- [189] Mackie, K.; Hille, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 3825 - 3829.
- [190] Derkinderen, P.; Toutant, M.; Burgaya, F.; Le Bert, M.; Siciliano, J.C.; De Franciscis, V.; Gelman, M.; Girault, J.A. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science.* **1996**, *273*, 1719 - 1722.

- [191] Graham, E.S.; Ball, N.; Scotter, E.L.; Narayan, P.; Dragunow, M.; Glass, M. Induction of Krox-24 by endogenous cannabinoid type 1 receptors in Neuro2A cells is mediated by the MEK-ERK MAPK pathway and is suppressed by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29085 - 29095.
- [192] Paradisi, A.; Pasquariello, N.; Barcaroli, D.; Maccarrone, M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6005 - 6012.
- [193] Sánchez, C.; Galve-Roperh, I.; Rueda, D.; Guzmán, M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 834 - 843.
- [194] Fonseca, B.M.; Correia-da-Silva, G.; Teixeira, N.A. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis*, **2013**, *18*, 1526 - 1535.
- [195] Radin, N.S. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem. J.* **2003**, *15*, 243 - 256.
- [196] Derkinderen, P.; Valjent, E.; Toutant, M.; Corvol, J.C.; Enslen, H.; Ledent, C.; Trzaskos, J.; Caboche, J.; Girault, J.A. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2371 - 2382.
- [197] Patel, N.A.; Moldow, R.L.; Patel, J.A.; Wu, G.; Chang, S.L. Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* **1998**, *797*, 225 - 233.
- [198] Melck, D.; Rueda, D.; Galve-Roperh, I.; De Petrocellis, L.; Guzmán, M.; Di Marzo, V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 235 - 240.
- [199] Thèse du Dr. Virginie Lucas-Andrzejak, soutenue le 9 décembre 2010, 39.
- [200] Felder, C.C.; Joyce, K.E.; Briley, E.M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O.; Lai, Y.; Ma, A.L.; Mitchell, R.L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443 - 450.
- [201] Slipetz, D.M.; O'Neill, G.P.; Favreau, L.; Dufresne, C.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Guay, D.; Labelle, M.; Metters, K.M. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 352 - 361.
- [202] Calandra, B.; Portier, M.; Kerneis, A.; Delpech, M.; Carillon, C.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Shire, D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *374*, 445 - 455.
- [203] Kaminski, N.E. Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and altered gene expression. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1133 - 1140.
- [204] Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Marchand, J.; Canat, X.; Bourrie, B.; Rinaldi-Carmona, M.; Calandra, B.; Fur, G.; Casellas, P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Euro. J. Biochem.* **1996**, *237*, 704 - 711.
- [205] Kaplan, F.B.L.; Kaminski, N.E. Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/IO-stimulated mouse splenocytes. *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1503 - 1510.

- [206] Zoratti, C.; Kipmen-Korgun, D.; Osibow, K.; Malli, R.; Graier, W.F. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 1351 - 1362.
- [207] Mukhopadhyay, S.; Das, S.; Williams, E.A.; Moore, D.; Jones, J.D.; Zahm, D.S.; Ndengele, M.M.; Lechner, A.J.; Howlett, A.C. Lipopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB2 cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *181*, 82 - 92.
- [208] Klegeris, A.; Bissonnette, C.J.; McGeer, P.L. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 775 - 786.
- [209] Jordà, M.A.; Verbakel, S.E.; Valk, P.J.M.; Vankan-Berkhoudt, Y.V.; Maccarrone, M.; Finazzi-Agro, A.; Lowenberg, B.; Delwel, R. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*, **2002**, *99*, 2786 - 2793.
- [210] Benito, C.; Tolon, R.M.; Pazos, M.R.; Nunez, E.; Castillo, A.I.; Romero, J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 277 - 285.
- [211] Koppel, J.; Vingtdeux, V.; Marambaud, P.; d'Abramo, C.; Jimenez, H.; Stauber, M.; Friedman, R.; Davies, P. CB2 Receptor Deficiency Increases Amyloid Pathology and Alters Tau Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol. Med.* **2014**, *20*, 29 - 36.
- [212] Maresz, K.; Pryce, G.; Ponomarev, E.D.; Marsicano, G.; Croxford, J.L.; Shriver, L.P.; Ledent, C.; Cheng, X.; Carrier, E.J.; Mann, M.K.; Giovannoni, G.; Pertwee, R.G.; Yamamura, T.; Buckley, N.E.; Hillard, C.J.; Lutz, B.; Baker, D.; Dittel, B.N. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 492 - 497.
- [213] Ihenetu, K.; Molleman, A.; Parsons, M.E.; Whelan, C.J. Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *458*, 207 - 215.
- [214] Kimball, E.S.; Schneider, C.R.; Wallace, N.H.; Hornby, P.J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *291*, 364 - 371.
- [215] Steffens, S.; Veillard, N.R.; Arnaud, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Staub, C.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Frossard, J.L.; Mach, F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*, **2005**, *434*, 782 - 786.
- [216] Mimura, T.; Oka, S.; Koshimoto, H.; Ueda, Y.; Watanabe, Y.; Sugiura, T. Involvement of the endogenous cannabinoid 2 ligand 2-arachidonyl glycerol in allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2012**, *159*, 149 - 156.
- [217] Mimuraa, T.; Uedab, Y.; Watanabea, Y.; Sugiurac, T. The cannabinoid receptor-2 is involved in allergic inflammation. *Life Sci.* **2012**, *90*, 862 - 866.
- [218] Karsak, M.; Gaffal, E.; Date, R.; Wang-Eckhardt, L.; Rehnelt, J.; Petrosino, S.; Starowicz, K.; Steuder, R.; Schlicker, E.; Cravatt, B.; Mechoulam, R.; Buettner, R.; Werner, S.; Di Marzo, V.; Tüting, T.; Zimmer, A. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*, **2007**, *316*, 1494 - 1497.
- [219] Toguri, J.T.; Lehmann, C.; Laprairie, R.B.; Szczesniak, A.M.; Zhou, J.; Denovan-Wright E.M.; Kelly M.E.M. Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB2 receptor activation in endotoxin-induced uveitis. *Brit. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1448 - 1461.

- [220] Pharmacologie de la douleur, Par Pierre Beaulieu Publié par PUM, **2005**, ISBN 2760619516, 9782760619517.
- [221] Sanson, M.; Bueno, L.; Fioramonti, J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* **2006**, *18*, 949 - 956.
- [222] Rousseaux, C.; Thuru, X.; Gelot, A.; Barnich, N.; Neut, C.; Dubuquoy, L.; Dubuquoy, C.; Merour, E.; Geboes, K.; Chamaillard, M.; Ouwehand, A.; Leyer, G.; Carcano, D.; Colombel, J.F.; Ardid, D.; Desreumaux, P. Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 35 - 37.
- [223] Nackley, A.G.; Makriyannis, A.; Hohmann, A.G. Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience.* **2003**, *119*, 747 - 757.
- [224] Valenzano, K.J.; Tafesse, L.; Lee, G.; Harrison, J.E.; Boulet, J.M.; Gottshall, S.L.; Mark, L.; Pearson, M.S.; Miller, W.; Shan, S.; Rabadi, L.; Rotshteyn, Y.; Chaffer, S.M.; Turchin, P.I.; Elsemore, D.A.; Toth, M.; Koetzner, L.; Whiteside, G.T. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology.* **2005**, *48*, 658 - 672.
- [225] Kinsey, S.G.; Mahadevan, A.; Zhao, B.; Sun, H.; Naidu, P.S.; Razdan, R.K.; Selley, D.E.; Imad Damaj, M.; Lichtman, A.H. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology.* **2011**, *60*, 244 - 251.
- [226] Whiteside, G.T.; Gottshall, S.L.; Boulet, J.M.; Chaffer, S.M.; Harrison, J.E.; Pearson, M.S.; Turchin, P.I.; Mark, L.; Garrison, A.E.; Valenzano, K.J. A role for cannabinoid receptors, but not endogenous opioids, in the antinociceptive activity of the CB2-selective agonist, GW405833. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *528*, 65 - 72.
- [227] Ofek, O.; Karsak, M.; Leclerc, N.; Fogel, M.; Frenkel, B.; Wright, K.; Tam, J.; Attar-Namdar, M.; Kram, V.; Shohami, E.; Mechoulam, R.; Zimmer, A.; Bab, I. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2006**, *103*, 696 - 701.
- [228] Idris, A.I.; van 't Hof, R.J.; Greig, I.R.; Ridge, S.A.; Baker, D.; Ross, R.A.; Ralston, S.H. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 774 - 779.
- [229] Munson, A.E.; Harris, L.S.; Friedman, M.A.; Dewey, W.L.; Carchman, R.A. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 597 - 602.
- [230] Gómez Del Pulgar, T.; De Ceballos, M.L.; Guzmán, M.; Velasco, G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36527 - 36533.
- [231] Sánchez, C.; De Ceballos, M.L.; Gomez del Pulgar, T.; Rueda, D.; Corbacho, C.; Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Huffman, J.W.; Ramón y Cajal, S.; Guzmán, M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5784 - 5789.
- [232] Gómez del Pulgar, T.; Velasco, G.; Sánchez, C.; Haro, A.; Guzmán, M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 183 - 188.
- [233] Velasco, L.; Ruiz, L.; Sánchez, M.G.; Díaz-Laviada, I. Delta(9)-Tetrahydrocannabinol increases nerve growth factor production by prostate PC-3 cells. Involvement of CB1 cannabinoid receptor and Raf-1. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 531 - 535.

- [234] Ruiz, L.; Miguel, A.; Díaz-Laviada, I. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Letters*. **1999**, *458*, 400 – 404.
- [235] Blázquez, C.; González-Feria, L.; Álvarez, L.; Haro, A.M.; Casanova, L.; Guzmán, M. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas. *Cancer Res*. **2004**, *64*, 5617 – 5623.
- [236] Lotersztajn, S.; Teixeira-Clerc, F.; Julien, B.; Deveaux, V.; Ichigotani, Y.; Manin, S.; Tran-Van-Nhieu, J.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A. CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *Br. J. Pharmacol*. **2008**, *153*, 286 - 289.
- [237] Julien, B.; Grenard, P.; Teixeira-Clerc, F.; Van Nhieu, J.T.; Li, L.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A.; Lotersztajn, S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*. **2005**, *128*, 742 - 755.
- [238] Avraham, Y.; Israeli, E.; Gabbay, E.; Okun, A.; Zolotarev, O.; Silberman, I.; Ganzburg, V.; Dagon, Y.; Magen, I.; Vorobia, L.; Pappo, O.; Mechoulam, R.; Ilan, Y.; Berry, E.M. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol. Dis*. **2006**, *21*, 237 - 245.
- [239] Bátakai, S.; Osei-Hyiaman, D.; Pan, H.; El-Assal, O.; Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Hong, F.; Harvey-White, J.; Jafri, A.; Haskó, G.; Huffman, J.W.; Gao, B.; Kunos, G.; Pacher, P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J*. **2007**, *21*, 1788 - 1800.
- [240] Ortega-Alvaro, A.; Ternianov, A.; Aracil-Fernandez, A.; Navarrete, F.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Manzanares, J. Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict. Biol*. **2013**, *20*, 43 – 55.
- [241] Al Mansouri, S.; Ojha, S.; Al Maamari, E.; Al Ameri, M.; Nurulain, S.M.; Bahi, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol. Biochem. Be*. **2014**, *124*, 260 – 268.
- [242] Purohit, V.; Rapaka, R.S.; Rutter, J. Cannabinoid Receptor-2 and HIV-Associated Neurocognitive Disorders. *J. Neuroimmune Pharmacol*. **2014**, *9*, 447 – 453.
- [243] Williams, J.C.; Appelberg, S.; Goldberger, B.A.; Klein, T.W.; Sleasman, J.W.; Goodenow, M.M. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Treatment During Human Monocyte Differentiation Reduces Macrophage Susceptibility to HIV-1 Infection. *J. Neuroimmune Pharmacol*. **2014**, *9*, 369 – 379.
- [244] Greco, R.; Mangione, A.S.; Sandrini, G.; Nappi, G.; Tassorelli, C. Activation of CB2 receptors as a potential therapeutic target for migraine: evaluation in an animal model. *J. Headache Pain*, **2014**, *15*, 14.
- [245] Sardinha, J.; Kelly, M.E.M.; Zhou, J.; Lehmann, C. Experimental Cannabinoid 2 Receptor-Mediated Immune Modulation in Sepsis. *Mediat. Inflamm*. **2014**, *2014*, Article ID 978678, 7 pages.
- [246] Izzo, A.A.; Camilleri, M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut*, **2008**, *5*, 1140 – 1155.
- [247] Mathison, R.; Ho, W.; Pittman, Q.J. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br. J. Pharmacol*. **2004**, *142*, 1247 – 1254.
- [248] Stern, E.; Muccioli, G.G.; Bosier, B.; Hamtiaux, L.; Millet, R.; Poupaert, J.H.; Hénichart, J.P.; Depreux, P.; Goossens, J.F.; Lambert, D.M. Pharmacomodulations around the 4-Oxo-1,4-

dihydroquinoline-3-carboxamides, a Class of Potent CB2-Selective Cannabinoid Receptor Ligands: Consequences in Receptor Affinity and Functionality. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5471 – 5484.

[249] Boger, D.L.; Miyauchi, H.; Du, W.; Hardouin, C.; Fecik, R.A; Cheng, H.; Hwang, I.; Hedrick, M.P.; Leung, D.; Acevedo, O.; Guimarães, C.R.W.; Jorgensen, W. L.; Cravatt, B.F. Discovery of a Potent, Selective, and Efficacious Class of Reversible α -Ketoheterocycle Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Effective as Analgesics. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1849 – 1856.

[250] Spencer, J.; Patel, H.; Amin, J.; Callear, S.K.; Coles, S.J.; Deadman, J.J.; Furman, C.; Mansouri, R.; Chavatte, P.; Millet, R. Microwave-mediated synthesis and manipulation of a 2-substituted-5-aminoxazole-4-carbonitrile library. *Tet. Lett.* **2012**, *53*, 1656 – 1659.

[251] Ouklia, N.; Comesse, S.; Chafib, N.; Oulyadic, H.; Daïch, A. Unexpected reversible nitrogen atom transfer in the synthesis of polysubstituted imides and 7-aza-hexahydroindolones via enaminonitrile γ -lactams. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1459 – 1462.

[252] Pilipecz, M.V.; Varga, T.R.; Mucsi, Z.; Scheiber, P.; Nemes, P. [3+3] Cyclization reactions of β -nitroenamines and β -enaminonitriles with α,β -unsaturated carboxylic acid chlorides. *Tetrahedron.* **2008**, *64*, 5545 – 5550.

[253] Zenga, L.F.; Zhanga, H.S.; Wangb, Y.H.; Sanchezc, T.; Zhengb, Y.T.; Neamatic, N.; Long, Y.Q. Efficient synthesis and utilization of phenyl-substituted heteroaromatic carboxylic acids as aryl diketo acid isosteres in the design of novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4521 – 4524.

[254] Albuschata, R.; Löwea, W.; Weberb, M.; Lugerb, P.; Jendrosseck, V. 4-Anilinoquinazolines with Lavendustin A subunit as inhibitors of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase: syntheses, chemical and pharmacological properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 1001 – 1011.

[255] Foucourt, A.; Dubouilh-Benard, C.; Chosson, E.; Corbière, C.; Buquet, C.; Iannelli, M.; Leblond, B.; Marsais, F.; Besson, T. Microwave-accelerated Dimroth rearrangement for the synthesis of 4-anilino-6-nitroquinazolines. Application to an efficient synthesis of a microtubule destabilizing agent. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 4495 – 4502.

[256] Barchéchath, S.D.; Tawatao, R.I.; Corr, M.; Carson, D.A; Cottam, H.B. Inhibitors of Apoptosis in Lymphocytes: Synthesis and Biological Evaluation of Compounds Related to Pifithrin- α . *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409 – 6422.

[257] Al-Afaleq, E.I.; Abubshait, S.A. Heterocyclic o-Aminonitriles: Preparation of Pyrazolo[3,4-d]-pyrimidines with Modification of the Substituents at the 1- Position. *Molecules*, **2001**, *6*, 621 - 638.

[258] Lampe, T.; Becker, E.; Kast, R.; Beck, H.; Jeske, M.; Schuhmacher, J.; Stoll, F.; Klein, M.; Akbaba, M.; Knorr, A.; Stasch, J.; Bärfacker, L.; Hillisch, A.; Karig, G.; Meininghaus, M.; Schlemmer, K.; Schohe-Loop, R. U.S. Patent 0,124,665 A1, 2011.

[259] Strazzolini, P.; Giljmanmi, A.G.; Cauci, S. Acetic formic anhydride: a review. *Tetrahedron.* **1990**, *46*, 1081 – 1118.

[260] Gibson, H.W. Chemistry of formic acid and its simple derivatives. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 673 – 692.

[261] Lopez, C.; Claramunt, R.M.; Alkorta, I.; Elguero J. Solution and solid state (CPMAS) NMR studies of the tautomerism of six-membered heterocyclic compounds related to 2-pyridones. *Spectroscopy*, **2000**, *14*, 121 - 126.

- [262] Colominas, C.; Luque, F.J.; Orozco, M. Tautomerism and Protonation of Guanine and Cytosine. Implications in the Formation of Hydrogen-Bonded Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6811 – 6821.
- [263] Scavo, F.; Helquist, P. Preparation of α,β -dehydro- β -amino acid derivatives by tin-promoted addition of malonates to simple nitriles. *Tet. Lett.* **1985**, *26*, 2603 – 2606.
- [264] Forlani, L.; Cristoni, G.; Boga, C.; Todesco, P.E.; Del Vecchio, E.; Selva, S.; Monari. Reinvestigation of the tautomerism of some substituted 2-hydroxypyridines. *ARKIVOC.* **2002**, *11*, 198 - 215.
- [265] North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 1013 - 1067.
- [266] Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R.A.; Buell, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* **1996**, *272*, 735 - 738.
- [267] Gunosewoyo, H.; Coster, M.J.; Kassiou, M. Molecular Probes for P2X7 Receptor Studies. *Cur. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1505 - 1523.
- [268] Stagg, J.; Smyth, M.J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, **2010**, *29*, 5346 - 5358.
- [269] Steinberg, T.H.; Silverstein, S.C. Extracellular ATP4 promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3118 - 3122.
- [270] Guile, S.D.; Alcaraz, L.; Birkinshaw, T.N.; Bowers, K.C.; Ebdon, M.R.; Furber, M.; Stocks, M.J. Antagonists of the P2X7 Receptor. From Lead Identification to Drug Development. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3123 - 3140.
- [271] Lopez-Castejon, G.; Theaker, J.; Pelegrin, P.; Clifton, A.D.; Braddock, M.; Surprenant, A. P2X7 Receptor-Mediated Release of Cathepsins from Macrophages Is a Cytokine-Independent Mechanism Potentially Involved in Joint Diseases. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 2611 - 2619.
- [272] 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. Structure–Activity Relationship Studies on N'-Aryl Carbohydrazide P2X7 Antagonists. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3030 – 3034.

PUBLICATIONS