

UNIVERSITE DE LILLE
Faculté de Pharmacie de Lille
Centre Lille Neurosciences & Cognition INSERM UMR-S1172

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Présentée et soutenue publiquement le 02 Octobre 2020

Par

Raphaël BOLTEAU

**Conception, synthèse et évaluation pharmacologique
d'antagonistes des récepteurs A_{2A}
et de ligands duaux
ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅**

Membres du Jury

Rapporteurs : **Pr. Christophe Rochais**, Professeur – Université de Caen Normandie

Pr. Sandrine Ongeri, Professeur – Université Paris-Saclay

Examineurs : **Pr. Sylvain Routier**, Professeur – Université d'Orléans

Pr. Patricia Melnyk, Professeur – Université de Lille

Président du jury : **Pr. Jean-Luc Decout**, Professeur – Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse : **Dr. Saïd Yous**, Maître de Conférences – Université de Lille

UNIVERSITE DE LILLE

Faculté de Pharmacie de Lille

Laboratoire de Chimie Thérapeutique - 3, rue du Professeur Laguesse BP83 59006 Lille Cedex

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Présentée et soutenue publiquement le 02 Octobre 2020

Par

Raphaël BOLTEAU

**Conception, synthèse et évaluation pharmacologique
d'antagonistes des récepteurs A_{2A}
et de ligands duaux
ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅**

Membres du Jury

Rapporteurs : **Pr. Christophe Rochais**, Professeur – Université de Caen Normandie

Pr. Sandrine Onger, Professeur – Université Paris-Saclay

Examineurs : **Pr. Sylvain Routier**, Professeur – Université d'Orléans

Pr. Patricia Melnyk, Professeur – Université de Lille

Président du jury : **Pr. Jean-Luc Decout**, Professeur – Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse : **Dr. Saïd Yous**, Maître de Conférences – Université de Lille

*À ma sœur, mes parents et à mes proches,
Je vous aime*

« Alohomora ! »

*« Le succès n'est pas la clé du bonheur. Le bonheur est la clé du succès. Si vous aimez ce que
vous faites, vous réussirez »*

Albert Schweitzer, Théologien (1875-1965)

Ce manuscrit de thèse signe la fin de mes études universitaires, c'est un fait... mais je préfère avant tout dire que c'est le début de nouvelles aventures !!! Avant d'entamer la rédaction de ce manuscrit, il m'a semblé nécessaire de vous présenter les principales étapes de mon parcours universitaire... ce serait, je pense, un bon début à mon histoire.

En tout premier lieu, après l'obtention de mon Baccalauréat Scientifique, j'ai effectué une Licence de Chimie à l'Université de Bordeaux. Pourquoi ? J'ai toujours été drôlement attiré par la Chimie et ce, dès mon enfance. En effet, elle s'est principalement résumée à jouer le petit scientifique à la maison ! Diverses expériences en tout genre ont été menées... et je ne saurais pas par où commencer en toute honnêteté mais mes parents et ma sœur pourront en attester. Quoiqu'il en soit, la Chimie s'est avérée comme étant une évidence ! Un choix que je ne regrette absolument pas.

Par la suite, j'ai décidé de changer d'horizon. En effet, j'ai toujours eu envie d'effectuer une année d'études à l'étranger. La fin de la Licence s'est avérée comme étant une bonne occasion, pour le Bordelais que je suis de partir. La question qui s'est posée naturellement est : je vais où ? Je souhaitais vraiment partir « loin » pour pouvoir profiter pleinement de cette aventure. C'est le Canada qui a retenu mon attention ! Moi qui n'avais jamais pris l'avion, c'était l'occasion...Ainsi, grâce à l'Université de Bordeaux et au programme d'échange CREPUQ que je remercie, j'ai pu effectuer la première année du Master Chimie Moléculaire et Macromoléculaire à l'Université de Montréal. J'ai passé une année des plus enrichissantes tant d'un point de vue professionnel que personnel, en toute honnêteté, la plus belle année de ma vie jusqu'à présent ! Certes, il y a eu des moments difficiles (très brefs) mais cela en valait largement la peine. Quelle aventure !! Partir à l'étranger est quelque chose que je souhaite à tous les étudiants ! Foncez !!

À mon retour en France, j'ai intégré le Master 2 Chimie Médicinale et Innovation Pharmacologique de l'Université Grenoble Alpes. J'ai voulu par ce Master acquérir les connaissances nécessaires pour la conception et la synthèse de potentiels candidats-médicaments. En effet, c'est un domaine de la Chimie qui m'a toujours passionné. C'est pourquoi, j'ai intégré l'équipe lilloise « Brain Biology & Chemistry » (ex - Onco and NeuroChemistry) du Pr. Patricia Melnyk, lors de mon stage de Master 2. Ce stage a porté sur

la conception et la synthèse d'antagonistes des récepteurs A_{2A}. Ensuite, j'ai eu la chance de poursuivre ces travaux dans le cadre de ma thèse.

Voici donc les principales étapes qui m'ont conduit, aujourd'hui, à la rédaction de ce manuscrit. Je vous en souhaite une bonne lecture. Celui-ci a été rédigé pendant la pandémie de COVID-19, ce qui en fait un manuscrit assez unique...

Ces trois années de thèse touchent à leur fin et pourtant j'ai l'impression que tout a commencé hier. Bien entendu, il y a eu des hauts et des bas mais c'est ce qui fait qu'une thèse ne s'oublie pas je pense car elle nous fait grandir ! J'ai eu la chance de la réaliser au sein d'un laboratoire où il fait bon vivre, quel plaisir ! Maintenant, c'est l'heure pour moi de vous remercier mais surtout pas de vous dire au revoir. J'aime bien le Ch'Nord mais une chocolatine restera toujours une chocolatine !

Mes premiers remerciements s'adressent naturellement à mon directeur de thèse, le **Dr. Saïd Yous**. Je te remercie de la confiance que tu as pu m'accorder durant ces trois années. J'ai pu bénéficier d'une très grande liberté ce qui m'a permis de découvrir, d'apprendre et de m'épanouir dans des domaines multidisciplinaires, un grand merci !! Je tiens également à te remercier d'avoir toujours été à l'écoute et notamment dans les moments où je n'avais pas forcément le moral, tu as su trouver les bons mots ! Encore une fois merci.

Je tiens également à remercier le **Pr. Patricia Melnyk**. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'équipe. Je souhaite également vous exprimer ma gratitude pour m'avoir choisi avec Saïd pour me présenter au concours de l'Ecole Doctorale. Je vous remercie également d'avoir été à l'écoute durant la période de rédaction de ce manuscrit, j'ai réussi à trouver du plaisir à l'écrire. Sachez que cela a toujours été un réel plaisir de venir au laboratoire, on s'y sent bien !

Je remercie sincèrement l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse. Je suis très reconnaissant envers le **Pr. Christophe Rochais** du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie de l'Université de Caen et le **Pr. Sandrine Onger** de l'Université Paris-Saclay d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie également le **Pr. Sylvain Routier** de l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans et le **Pr. Jean-Luc Decout** du Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je souhaite remercier une seconde fois le **Pr. Sandrine Onger** et le **Pr. Sylvain Routier** de m'avoir suivi tout au long de mes travaux lors des comités de suivi individuel.

Ma thèse n'aurait pas été la même chose sans toi, **Maxime Liberelle**. J'ai eu la chance de pouvoir cohabiter avec toi en chimie thérapeutique 1 et pour mon plus grand bonheur. De par nos échanges, scientifiques ou non, tu as toujours été d'un grand appui. Tu as joué un très grand rôle dans ces travaux de thèse et je t'ai toujours considéré comme mon second directeur de thèse vois-tu ! Toujours plein de conseils et un regard très avisé sur le projet. Un très grand merci, mon ami ! Merci également de m'avoir fait découvrir le Trucmuche et pour ces moments de vie autour du fameux petit café de 10h30. Bien évidemment tes talents de voir l'avenir dans les résultats de binding resteront gravés ! Merci à toi et au **Dr. Nicolas Renault** pour votre aide concernant les études de modélisation moléculaire.

Paul-Emmanuel Larchanché alias **Polo** et **Alice Thiry** (je ne me suis pas trompé ! bon j'ai vérifié je dois t'avouer...) mes coéquipiers d'aventures ! **Polo**, je souhaite t'adresser mes remerciements les plus sincères. Tu as toujours, toujours, toujours été là et disponible au moindre de mes soucis...et il y en a eu ! Toujours avec gentillesse, bonne humeur et bonne volonté ! On a eu l'occasion également de travailler ensemble, un réel plaisir et donc encore une fois merci ! **Alice**, je ne pensais pas te voir un jour travailler dans le même bureau que moi, quel plaisir ! Je suis très content de t'avoir rencontré. On a toujours été d'un soutien mutuel l'un pour l'autre et j'espère que cela continuera. On a quand même partagé de sacrés bons moments avec la bande, quelle aventure ! Bon il va falloir le faire ce 5 km...on se l'est promis. Merci également à **Alexandre Gobert**, la nouvelle recrue de l'équipe, bon courage à toi jeune padawan !

Un très grand merci au **Pr. Nicolas Lebègue** de m'avoir ~~fourni en tubes RMN durant ces trois années~~ accompagné également durant ces trois années. Tu as toujours été disponible pour me donner des conseils avisés en chimie ou lors des réunions, présentations...etc. Un sacré bon joueur de belote aussi, c'est important de le notifier, tout comme la personne qui ambiance nos repas de Noël !

Tu pensais que je t'avais oublié ? Certainement pas, **Djamila Amini** ! Merci d'avoir apporté ton (sacré) dynamisme à l'équipe, je l'ai beaucoup apprécié. Un réel plaisir d'avoir pu partager des moments avec toi. Un nouvel horizon s'ouvre à toi maintenant et je te souhaite une très bonne continuation !

Remerciements

Je souhaite exprimer mes remerciements les plus chaleureux et les plus sincères au **Dr. Séverine Ravez**. Je ne sais pas par où commencer tellement tu m'as apporté de choses durant ces trois années. Tu as toujours été à l'écoute et j'ai su trouver en toi une personne réconfortante et d'une gentillesse sans mesure. Tu m'as transmis ta passion pour le binding et ta rigueur et ça, je les emporte avec moi ! Mes plus belles journées de thèse resteront celles où j'étais à la plateforme pour tester mes molécules. Je me revois encore venir te voir dans ton bureau pour t'annoncer les résultats ! Merci également de m'avoir aidé à mettre en forme ce manuscrit et de m'avoir fait découvrir l'enseignement ! Merci à toi et à **Amélie Barczyk** de m'avoir aidé dans l'élaboration des protocoles de binding. **Amélie Barczyk**, merci de m'avoir formé à la radioactivité... on aura quand même passé de très bons moments ! Je ne les oublierai pas. **Mathilde Coevoet**, merci de m'avoir formé à la culture cellulaire ! C'était fun !

Mon aventure lilloise a commencé avec le **Dr. Laurence Agouridas**. Merci à toi de m'avoir encadré durant mon stage de Master 2, un réel plaisir d'avoir pu travailler à tes côtés ainsi qu'avec **Rajaa Boulahjar**. Je suis passé du statut d'étudiant en stage de Master 2 au statut de manager de ton compte Instagram. Quelle évolution fulgurante ! Je te souhaite un bon succès @hyaliste ! Merci également à **Romain Duroux** pour ton encadrement.

Merci au **Dr. Jamal El Bakali** pour ta bonne humeur au quotidien, tes conseils avisés et réfléchis. Cela a toujours été un plaisir de parler (longuement avec toi) sur bien des sujets. Merci également de m'avoir initié à Kicktipp, TeamChocolatine sera toujours partant !

Merci au **Pr. Philippe Cotelle** et au **Dr. Fabrice Bailly**, cela a toujours été un plaisir de discuter avec vous. Merci également de m'avoir appris les principales expressions du Ch'Nord. J'ai quand même encore du mal avec certaines...

Merci au **Dr. Jérôme Berthet** ainsi qu'au **Pr. Stéphanie Delbaere**, pour leur bonne humeur au quotidien et leur aide pour la RMN, vous avez toujours le sourire et la pêche, gardez-les ! Merci à vous ainsi qu'au **Pr. Nathalie Azaroual** de m'avoir fait partager avec vous les enseignements de physique !

Merci au **Dr. Céline Legros** pour sa gentillesse et son aide précieuse lors de la mise en place du test de radiobinding pour le récepteur mGlu₅. Merci une nouvelle fois de m'avoir permis de visiter les laboratoires Servier de Croissy-sur-Seine.

Merci aux membres de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » et plus particulièrement aux **Dr. David Blum, Dr. Emilie Faivre, Dr. Victoria Gomez-Murcia** et au **Dr. Kévin Carvalho** pour les manip *in vivo* qui ont pu être réalisées. J'associe également **Catherine Pivetau** et **Céline Lenglard** pour les protocoles d'extraction et d'analyse LC-MS.

Je souhaite également remercier **Brandon Vreulz**. J'ai eu la chance de t'encadrer pour les quelques mois de ton stage de Master 2. Je tiens à te remercier pour ton implication et ton sérieux dont tu as su faire preuve. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi et j'espère que tu en garderas de bons souvenirs. Je te souhaite sincèrement de trouver quelque chose qui te plaise et dans lequel tu t'épanouiras, tu le mérites.

Ces trois années de thèse ont été rythmées par différentes rencontres et de véritables amitiés se sont créées. Je souhaite donc remercier **Floriane, Manon, Mélanie, Florine, Florian, Guillaume, Tarak, Eva, Baptiste** et **Raph'** pour leur présence et les moments que nous avons passés ensemble. À très vite pour de nouvelles aventures ! Mention spéciale pour **Priscilla**, tonton **David** et **Audrey** sans qui cette aventure n'aurait pas été la même.

Le meilleur est pour la fin. Je tiens à remercier ma sœur **Madeline**, qui a été d'un soutien sans faille depuis le début et notamment ces dernières semaines. Merci pour tout, je t'aime ! Merci à mes parents **Bettina** et **Jean-Marie** qui m'ont toujours soutenu et accompagné dans mes choix, je vous aime.

Publications, communications et enseignements

Le travail réalisé au cours de cette thèse a donné lieu, pour l'instant, aux travaux suivants :

Publications :

Boulahjar R., Rincon Arias A., Bolteau R., Renault N., Coevoet M., Barczyk A., Duroux R., Yous S., Melnyk P. and Agouridas L.

Design and synthesis of 2,6-disubstituted-8-amino imidazo[1,2a]pyridines, a promising privileged structure.

Bioorg. Med. Chem., **2018**, 26 (12), 3296-3307

Bolteau R., Descamps F., Ettaoussi M., Caignard D.H., Delagrance P., Melnyk P. and Yous S.
Quinazoline and Phthalazine Derivatives as Novel Melatonin Receptor Ligands Analogues of Agomelatine.

Eur. J. Med. Chem., **2020**, 189, 112078

Communications par affiches :

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

From design to pharmacological evaluation of potent quinazoline derivatives as A_{2A} receptor antagonists for neurodegenerative diseases.

Drug Discovery Day, Lille, 2017, December 7th

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel quinazoline derivatives as potential antagonists of A_{2A} receptor for the treatment of neurodegenerative diseases.

9th PhD student day, Lille, 2018, March 12th

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

Quinazoline derivatives: from design to pharmacological evaluation as A_{2A} receptor antagonists in the field of neurodegenerative diseases.

Advances in Alzheimer Therapy (AAT) - AD/PD, Torino, 2018, March 15-18th

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel quinazoline derivatives as potential antagonists of A_{2A} receptor for the treatment of neurodegenerative diseases.

17^{ème} Rencontres de Chimie Biologique, Aussois, 2018, March 18th-22nd

Bolteau R., Liberelle M., Melnyk P., Yous S.

Dual ligands targeting A_{2A} and mGlu₅ receptor: a novel approach for the treatment of neurodegenerative diseases.

Journée André Verbert, Lille, 2019, September 10th

Bolteau R., Liberelle M., Melnyk P., Yous S.

Dual ligands targeting A_{2A} and mGlu₅ receptor: a novel approach for the treatment of neurodegenerative diseases.

Drug Discovery Day, Lille, 2019, December 17th - **Prix de la meilleure présentation poster**

Communications orales :

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

From design to pharmacological evaluation of potent quinazoline derivatives as A_{2A} receptor antagonists for neurodegenerative diseases. (Flash Poster)

2^{ème} Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie, Lille, 2018, July 11th

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

A_{2A} receptor antagonists for the treatment of neurodegenerative diseases: design, synthesis and biological evaluation.

Drug Discovery Day, Lille, 2019, January 18th - **Prix de la meilleure communication orale**

Bolteau R., Duroux R., Agouridas L., Renault N., Gosselet F., Melnyk P., Yous S.

A_{2A} receptor antagonists for the treatment of neurodegenerative diseases: design, synthesis and biological evaluation. (Flash Poster)

26th Young Research Fellows Meeting, Paris, 2019, February 20th-22nd & 3rd CA15135 MuTaLig WG meeting, Paris, February 23rd-24th

Bolteau R., Liberelle M., Melnyk P., Yous S.

Design, synthesis and pharmacological evaluation of promising A_{2A} receptor antagonists based on the quinazoline scaffold.

27th Young Research Fellows Meeting, Caen, 2020, January 29th-31st

Enseignements :

2017-2018 :

- **Encadrement des travaux pratiques (64 h)** « Essais physico-chimiques de médicaments » avec le Dr. Séverine Ravez et le Dr. Saïd Yous, 4^{ème} année de Pharmacie, Lille, 2018

- **Encadrement de deux étudiants** (Victor Gautier & Emeline Gernez - 1 semaine en décembre et avril) participant à une UE « Initiation à la recherche », Faculté de Pharmacie, Lille, 2018

- **Encadrement d'un stagiaire écossais** (Sebastian Balch), partenariat avec l'Université de St-Andrews, Faculté de Pharmacie, Lille, 2018, Juillet et Août

2018-2019 :

- **Encadrement des travaux pratiques (64 h)** « Vision et Audition » avec le Pr. Stéphanie Delbaere, Pr. Nathalie Azaroual et le Dr. Jérôme Berthet, 2^{ème} année de Pharmacie, Lille, 2019

- **Encadrement d'une étudiante** (Eva Sénéchal - 1 semaine en décembre) participant à une UE « Initiation à la recherche », Faculté de Pharmacie, Lille, 2018

- **Encadrement d'un stagiaire écossais** (Lukas Rossmanith), partenariat avec l'Université de St-Andrews, Faculté de Pharmacie, Lille, 2019, Juillet et Août

Formations créditées (ECTS) de l'Ecole Doctorale Biologie et Santé (EDBSL) :

- Conférence débat sur l'intégrité scientifique avec le Dr. Hervé Maisonneuve (2 h)

- Formation en éthique pour une conduite responsable en recherche (1 journée)

- Propriété intellectuelle au service des doctorants (2 journées)

- Formation d'entrée à l'animalerie de type EOPS (1 journée)

Certaines dénominations sont données sous leur forme anglo-saxonne.

AC	Adénylate cyclase
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADA	Adénosine désaminase
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et élimination
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP
AlMe ₃	Triméthylaluminium
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
APP	Amyloid protein precursor
ATP	Adénosine triphosphate
A β	Bêta-amyloïde
A _{2A} R	Récepteur à l'adénosine A _{2A}
BACE1	Bêta sécrétase 1
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BINAP	2,2'-Bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle
Boc ₂ O	Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
CCM	Chromatographie sur couche mince
DAG	Diacylglycérol
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EHPAD	Établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes
EOPS	Exempt d'organisme pathogène spécifique
Et ₃ N	Triéthylamine
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Éthanol
FDA	Food and Drug Administration
HAS	Haute autorité de santé
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High-performance liquid chromatography
IC ₅₀	Concentration inhibant à 50 % un phénomène
IP ₃	Inositol trisphosphate

IRM	Imagerie par résonance magnétique
K_i	Constante d'inhibition
LC-MS	Liquid chromatography – Mass spectrometry
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO	Monoamine-oxydase
MeOH	Méthanol
mGluR ₅	Récepteur métabotrope au glutamate de type 5
MNDs	Maladies neurodégénératives
MP	Maladie de Parkinson
MsCl	Chlorure de méthanesulfonyle
NaOt-Bu	Sodium <i>tert</i> -butoxide
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NMDAR	Récepteur du <i>N</i> -méthyl-D-aspartate
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDB	Protein data bank
Pd/C	Palladium sur charbon
PE	Petroleum ether
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
RSA	Relation structure-affinité
sAPP α	APP-alpha sécrétée
sAPP β	APP-bêta sécrétée
SNC	Système nerveux central
TCT	2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine
TEP	Tomographie par émission de positons
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
δ (ppm)	Déplacement chimique exprimé en partie par million

Figures

Figure 1. Dr. Aloïs Alzheimer (gauche) et sa patiente Auguste Deter (droite) ^(1,3,4)	2
Figure 2. Dessins originaux d'Aloïs Alzheimer représentant les dégénérescences neurofibrillaires d'Auguste Deter ⁽⁴⁾	3
Figure 3. Les deux principales lésions conduisant à la mort neuronale.....	6
Figure 4. Deux voies de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP).....	7
Figure 5. Hyperphosphorylation de la protéine Tau conduisant aux dégénérescences neurofibrillaires ⁽²⁴⁾	9
Figure 6. L'hypothèse de la cascade amyloïde ^(19,25)	10
Figure 7. Coupe d'un cerveau humain	11
Figure 8. La synapse cholinergique ⁽²⁹⁾	12
Figure 9. Les différents inhibiteurs de l'AChE commercialisés	13
Figure 10. La synapse glutamatergique chez un individu atteint de la MA ⁽³⁹⁾	15
Figure 11. Structure chimique de la mémantine	16
Figure 12. Structure chimique de l'adénosine	19
Figure 13. Synthèse et catabolisme de l'adénosine ⁽⁵⁵⁾	20
Figure 14. Structure chimique de la caféine	24
Figure 15. Action d'un agoniste ou d'un antagoniste du A _{2A} R sur le signal dopaminergique ⁽⁵⁶⁾	25
Figure 16. Exemples d'antagonistes du A _{2A} R de type « xanthines-like »	26
Figure 17. Exemples d'antagonistes du A _{2A} R de type « non xanthines-like ».....	27
Figure 18. Exemples d'antagonistes du A _{2A} R présentés en phases cliniques pour la MP.....	28
Figure 19. Structure co-cristallisée de l'adénosine au sein du récepteur hA _{2A} ⁽⁷²⁾	29
Figure 20. Comparaison des volumes des poches de liaison occupées par le ZM-241385 (A) et le ligand triazine (B).....	31
Figure 21. Mode de liaison du ZM-241385 au sein du récepteur hA _{2A} ^(72,79)	32
Figure 22. Identification d'un cluster acide au sein du récepteur A _{2A} ⁽⁵⁶⁾	33
Figure 23. Modèle pharmacophorique des antagonistes du récepteur A _{2A} basé sur la structure du ZM-241385.....	34
Figure 24. Criblage virtuel conduisant à l'identification de deux composés « hit »	35
Figure 25. Structures des composés « hit » identifiés par criblage virtuel.....	35
Figure 26. Modulations envisagées autour du « hit » benzofuranique	37
Figure 27. Modulations envisagées autour du « hit » quinazolinique.....	38
Figure 28. Exemples d'antagonistes du A _{2A} R développés autour d'un cycle tenseur polyazoté.....	40
Figure 29. Structure du « hit » benzofuranique et sa pose docking sélectionnée au sein du récepteur hA _{2A} (PDB : 3UZC)	41
Figure 30. Modulations envisagées autour du « hit » benzofuranique	42
Figure 31. Exemples d'antagonistes du A _{2A} R présentant une fonction amine primaire aromatique... ..	43
Figure 32. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'une fonction amine primaire aromatique en position 3	44
Figure 33. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'un « linker » cétonique en position 2.....	45
Figure 34. Exemples d'antagonistes sélectifs et de haute affinité des récepteurs A _{2A} et A ₁ présentant un « linker » cétonique.....	45
Figure 35. Exemples d'antagonistes des récepteurs A _{2A} et A ₁ développés dans le cadre des travaux d'Helena D. Janse van Rensburg <i>et al.</i> ⁽⁸⁴⁾	46
Figure 36. Exemples d'antagonistes sélectifs des récepteurs A _{2A} présentant un « linker » amide.....	46
Figure 37. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'une chaîne alkyle amine. 47	

Figure 38. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'un groupement aromatique en position 7	48
Figure 39. Représentation des séries benzofuraniques I et II.....	49
Figure 40. Structure des composés benzofuraniques de la série I	57
Figure 41. Structure des composés de la série II.....	67
Figure 42. Structure co-cristallisée du ligand triazine T4E (A) et de la pose docking sélectionnée pour le hit quinazolinique (B).....	74
Figure 43. Modulations effectuées autour du hit quinazolinique	75
Figure 44. Modulations effectuées en position 4	75
Figure 45. Mode de liaison envisagé pour le composé chef de file au sein du récepteur hA_{2A}	77
Figure 46. Pose docking du composé chef de file (gauche) et d'un composé modulé en position 2 (droite) au sein du récepteur hA_{2A}	78
Figure 47. Principe de rigidification	80
Figure 48. Stratégie et rationnel du projet autour du composé chef de file	82
Figure 49. Poses docking des composés 50 (A) et 55 (B) dans $hA_{2A}R$ (PDB : 3UZC).....	92
Figure 50. Invalidation de la première hypothèse du mode de liaison du composé 50.....	92
Figure 51. Seconde hypothèse basée sur la pose de docking du composé 64 (A) et sur la structure co-cristallisée du ZM-241385 (B) (PDB : 3EML).....	94
Figure 52. Pharmacomodulations autour du composé 64.....	96
Figure 53. Structures des composés des séries II et III	97
Figure 54. Structure co-cristallisée du récepteur hA_{2A} avec le composé 79 (A) et son mode de liaison (B)	112
Figure 55. Superposition de la pose docking (PDB : 3EML) de 79 (violet) et de sa pose co-cristallisée (bleue) au sein du récepteur hA_{2A}	113
Figure 56. Validation de la deuxième hypothèse.....	114
Figure 57. La maladie d'Alzheimer : une maladie multifactorielle	117
Figure 58. Développement de SAM selon le paradigme traditionnel.....	119
Figure 59. Approche « mono-cible » vs « multi-cibles » ^(126,129)	120
Figure 60. Stratégies de développement de ligands multifonctionnels	123
Figure 61. Différentes stratégies pour concevoir des ligands duaux.....	124
Figure 62. Développement du ladostigil ⁽¹⁴⁰⁾	127
Figure 63. Développement de la mémoquine	128
Figure 64. Développement du mémagal.....	129
Figure 65. Structure chimique de l'acide glutamique	130
Figure 66. Synapse glutamatergique ⁽¹⁴⁸⁾	132
Figure 67. Stratégie de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et $mGlu_5$	133
Figure 68. Structure du composé chef de file 50	134
Figure 69. Composés C et D co-cristallisés au sein du site allostérique du récepteur $hmGluR_5$	135
Figure 70. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé 50 (rose) à la structure co-cristallisée du composé C (beige) au sein du site allostérique du récepteur $hmGluR_5$	136
Figure 71. Première stratégie de conception de ligands à visée mixte $A_{2A}R/mGluR_5$	137
Figure 72. Deuxième stratégie de conception de ligands à visée mixte $A_{2A}R/mGluR_5$	140
Figure 73. Identification d'un nouveau composé « hit » 134	155
Figure 74. Loi d'action de masse	158
Figure 75. Représentation théorique d'un test de saturation	162
Figure 76. Exemple d'une courbe de saturation des récepteurs GABA exprimés sur des tissus humains post-mortem par le [³ H]-Flumazenil ⁽¹⁷⁴⁾	162

Figure 77. Courbe dose-réponse théorique d'une expérience de compétition entre un radioligand et un ligand non radiomarqué..... 163

Figure 78. Équation de Cheng et Prusoff⁽¹⁶⁵⁾ 163

Figure 79. Détermination des liaisons totales et non spécifiques du [³H]-ZM241385 sur des membranes *hA_{2A}* de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6)..... 165

Figure 80. Détermination des liaisons spécifiques du [³H]-ZM241385 sur des membranes *hA_{2A}* de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6) 166

Figure 81. Courbe dose-réponse du ZM241385 pour le récepteur *hA_{2A}* (GraphPad Prism v6) 167

Figure 82. Courbe dose-réponse du composé 79 pour le récepteur *hA_{2A}* 168

Figure 83. Représentation graphique du signal de radioactivité mesuré du [³H]-MPEP lié à la surface de membranes surexprimant le récepteur *hmGlu_{5A}* en fonction du temps d'incubation à 27 °C..... 173

Figure 84. Représentation graphique du signal de radioactivité mesuré du [³H]-MPEP lié à la surface de membranes surexprimant le récepteur *hmGlu_{5A}* en fonction de la concentration de membranes 174

Figure 85. Détermination des liaisons totales et non spécifiques du [³H]-MPEP sur des membranes *hmGlu_{5A}* de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6)..... 175

Figure 86. Détermination des liaisons spécifiques du [³H]-MPEP sur des membranes *hmGlu_{5A}* de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6) 176

Figure 87. Courbe dose-réponse du MPEP pour le récepteur *hmGlu_{5A}* (GraphPad Prism v6)..... 177

Figure 88. Courbe dose-réponse du composé 134 pour le récepteur *hmGlu_{5A}* (GraphPad Prism v6) 178

Figure 89. Récepteur couplé à une protéine G_s et synthèse de l'AMPc 179

Figure 90. Dégradation de l'AMPc en 5'-AMP par action d'une phosphodiesterase 180

Figure 91. Principe du test fonctionnel pour le dosage de l'AMPc par TR-FRET 181

Figure 92. Courbes dose-réponse théoriques du ZM-241385 (A) et du CGS-21680 (B) 182

Figure 93. Structure chimique du composé étudié, $K_i(hA_{2A}R) = 223 \pm 54$ nM 183

Figure 94. Concentration du composé étudié dans le cerveau en fonction du temps pour une administration unique par voie intrapéritonéale (1, 10 et 20 mpk) 184

Figure 95. Courbes dose-réponse du composé d'étude : *in vitro* (A) et *in vivo* (B) 185

Figure 25. Structures des composés « hit » identifiés par criblage virtuel 186

Figure 26. Modulations envisagées autour du « hit » benzofuranique 187

Figure 96. Modulations effectuées autour du composé chef de file 50 188

Figure 97. Exemples de pharmacomodulations autour du composé co-cristallisé 79 189

Figure 98. Stratégie de développement de composés mixtes *A_{2A}R/mGlu₅* 191

Figure 99. Structure du composé « hit » multifonctionnel 119b 191

Figure 100. Poses docking sélectionnées du composé 119b (vert) au sein du récepteur *hA_{2A}* (A) et *hmGlu₅* (B). 192

Figure 101. Nouvelle stratégie de ligands duaux ciblant les récepteurs *A_{2A}* et *mGlu₅*..... 193

Tableaux

Tableau 1. Distribution, effets et affinité des récepteurs à l'adénosine⁽⁵⁶⁾ 21

Tableau 2. Intérêts thérapeutiques d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine⁽⁵⁵⁾ .. 23

Tableau 3. Exemples des techniques de cristallisation employées pour le récepteur *hA_{2A}* 30

Tableau 4. Travaux d'optimisation réalisés pour la synthèse du composé 13 63

Tableau 5. Résultats pharmacologiques d'intermédiaires réactionnels des séries I et II pour *hA_{2A}R* .. 73

Tableau 6. Résultats pharmacologiques des modulations effectuées en position 2..... 79

Tableau 7. Composés synthétisés dans le cadre de la série I 83

Tableau 8. Résultats pharmacologiques et clogP des modulations précédemment effectuées en position 4.....	87
Tableau 9. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série I pour $hA_{2A}R$	89
Tableau 10. Modulations envisagées dans le cadre de la série II	97
Tableau 11. Composés synthétisés dans le cadre de la série III	98
Tableau 12. Essais d'optimisation de la réaction de cyclisation	104
Tableau 13. Essais d'optimisation de la réaction de déprotection	108
Tableau 14. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série II pour $hA_{2A}R$	109
Tableau 15. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série III pour $hA_{2A}R$	110
Tableau 16. Autres avantages thérapeutiques de la stratégie multifonctionnelle	121
Tableau 17. Les différents récepteurs métabotropiques du glutamate	131
Tableau 18. Molécules de la série I.....	138
Tableau 19. Molécules de la série II.....	139
Tableau 20. Molécules de la série III.....	141
Tableau 21. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série I	148
Tableau 22. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série II	149
Tableau 23. Résultats pharmacologiques des composés de la série I (Chapitre 2)	151
Tableau 24. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série III	153
Tableau 25. Résultats pharmacologiques des modulations effectuées en position 2.....	154
Tableau 26. Résumé des conditions pour un test de saturation du récepteur hA_{2A}	165
Tableau 27. Résumé des conditions pour un test de compétition sur le récepteur hA_{2A}	166
Tableau 28. Résumé des conditions pour un test de saturation du récepteur $hmGlu_{5A}$	175
Tableau 29. Résumé des conditions pour un test de compétition sur le récepteur $hmGlu_{5A}$	176

Schémas

Schéma 1. Voies rétrosynthétiques élaborées dans le cadre des séries I et II	50
Schéma 2. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse des synthons clés 6 et 7	52
Schéma 3. Essais de protection de l'amine primaire aromatique	55
Schéma 4. Synthèse du composé 9.....	56
Schéma 5. Essais de synthèse d'un composé de la série I ($X = CO$) par la première voie de synthèse	58
Schéma 6. Exemples de composés quinoléiques synthétisés dans le cadre des travaux de William J. Hoekstra <i>et al.</i> ⁽⁹⁶⁾	59
Schéma 7. Synthèse du composé 14 et essai de synthèse d'un composé de la série I ($X = CO$)	60
Schéma 8. Essais de synthèse d'un composé de la série I ($X = CO$) et de son bioisostère par des réactions pallado-catalysées de type Buchwald-Hartwig ou Sonogashira.....	61
Schéma 9. Exemple d'un composé synthétisé dans le cadre des travaux d'Éric Marsault <i>et al.</i> ⁽⁹⁷⁾	62
Schéma 10. Exemple d'un composé synthétisé dans le cadre des travaux de Jin Han <i>et al.</i> ⁽⁹⁸⁾	62
Schéma 11. Essais de synthèse d'un composé de la série I ($X = CH_2$) par la deuxième voie de synthèse	64
Schéma 12. Essais de déprotection du composé 17	66
Schéma 13. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse du synthon clé 25	68
Schéma 14. Essais de synthèse d'un composé de la série II ($X = CO$)	70
Schéma 15. Synthèse de la 2,4-dichloroquinazoline.....	84
Schéma 16. Synthèse des composés 33-49	85
Schéma 17. Synthèse des composés finaux de la série I	86

Schéma 18. Synthèse des composés de la série II	99
Schéma 19. Voies rétrosynthétiques envisagées pour l'obtention des composés de la série III	101
Schéma 20. Synthèse du composé 84.....	102
Schéma 21. Mécanisme réactionnel conduisant au composé 84 ⁽¹²²⁾	103
Schéma 22. Synthèse du synthon trihalogéné clé 87	104
Schéma 23. Essai de fonctionnalisation du composé 88 par réaction de Buchwald-Hartwig	105
Schéma 24. Synthèse des molécules de la série III	106
Schéma 25. Synthèse du composé 92.....	107
Schéma 26. Synthèses des analogues azaquinazoliques 109 et 110	115
Schéma 27. Réaction de désamination oxydative	126
Schéma 28. Synthèse des molécules de la série I	142
Schéma 29. Synthèse des composé 119a et 119b de la série II.....	143
Schéma 30. Synthèse des composés 121 et 122 de la série II	144
Schéma 31. Synthèse du composé 123.....	145
Schéma 32. Synthèse des composés de la série III	146
Schéma 33. Synthèse du composé 134.....	156

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. La maladie d'Alzheimer	2
1. Historique	2
2. Épidémiologie	3
3. Symptômes cliniques et diagnostic	4
3.1 Symptômes cliniques	4
3.2 Ses différentes formes	5
3.3 Diagnostic	5
4. Physiopathologie	6
4.1 Les plaques amyloïdes	7
4.2 Les dégénérescences neurofibrillaires	9
4.3 L'hypothèse de la cascade amyloïde	10
II. Les traitements médicamenteux	11
1. Les anticholinestérasiques	11
2. Les anti-glutamates	14
III. Les nouvelles stratégies thérapeutiques	16
1. La pathologie amyloïde (inhibiteurs de β - et γ - sécrétases)	17
2. La pathologie Tau	17
3. Autres stratégies thérapeutiques.....	18
IV. Les récepteurs à l'adénosine	19
1. L'adénosine.....	19
2. Classification des récepteurs à l'adénosine	20
3. Intérêts thérapeutiques des antagonistes du récepteur A_{2A}	24
3.1 Maladie de Parkinson	24
3.2 Maladie d'Alzheimer.....	25
4. Des antagonistes du récepteur A_{2A} en phases cliniques	26
5. Structures co-cristallisées du récepteur A_{2A}	29
6. Pharmacophore des antagonistes du récepteur A_{2A}	31
V. Travaux antérieurs et objectifs des travaux de thèse	34
1. Travaux antérieurs.....	34
2. Objectifs des travaux de thèse	36
CONCEPTION PAR MODÉLISATION MOLÉCULAIRE	39
CHAPITRE 1 : LA FAMILLE DES BENZOFURANES	40
I. Conception par modélisation moléculaire	40
II. Synthèse des synthons clés de la série I	52
III. Voies de synthèse des molécules de la série I	57
1. Première voie de synthèse	57
2. Deuxième voie de synthèse.....	63
IV. Voie de synthèse des molécules de la série II :	66
1. Synthèse du synthon clé.....	67
2. Essais d'obtention des molécules de la série II	69
V. Évaluation pharmacologique :	71

CHAPITRE 2 : LA FAMILLE DES QUINAZOLINES	74
I. Travaux antérieurs	74
II. Travaux personnels : stratégie de synthèse des molécules de la série I.....	83
1. Synthèse de l'intermédiaire clé : 2,4-dichloroquinazoline.....	84
2. Synthèse des intermédiaires réactionnels 33-49	85
3. Synthèse des molécules cibles de la série I.....	86
III. Évaluation pharmacologique des molécules de la série I	87
1. Relations structure-affinité	87
2. Un nouveau mode de liaison envisagé.....	93
IV. Synthèse des molécules cibles des séries II et III	99
1. Synthèse des molécules de la série II	99
2. Synthèse des molécules de la série III	100
2.1 Approche rétrosynthétique	100
2.2 Essais d'obtention des molécules de la série III – Voie 1	102
2.3 Synthèse des molécules de la série III – Voie 2	104
V. Évaluation pharmacologique des molécules des séries II et III.....	108
1. Relations structure-affinité	108
2. Nouvelle structure co-cristallisée du récepteur A _{2A}	111
3. Nouvelles modulations envisagées	114
CHAPITRE 3 : LIGANDS DUAUX CIBLANT LES RECEPTEURS A_{2A} ET mGLU₅.....	116
I. La maladie d'Alzheimer : une maladie aux multiples facettes.....	117
II. Qu'est-ce que la stratégie multifonctionnelle ?.....	119
1. Définition	119
2. Concrètement, comment cela fonctionne ?.....	120
3. Stratégie multifonctionnelle : autres avantages thérapeutiques.....	121
4. Stratégies de développement de ligands multifonctionnels.....	122
5. Conception de ligands duaux par réunion des pharmacophores	124
III. Des composés multifonctionnels dans le cadre de la maladie d'Alzheimer	125
1. Le ladostigil, un composé bifonctionnel ciblant la MAO et l'AChE	126
2. La mémoquine, un composé aux multiples activités	127
3. Le mémagal, un composé bifonctionnel ciblant l'AChE et NMDAR	129
IV. Stratégie du projet de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅.....	130
1. Pourquoi cibler le récepteur mGlu ₅	130
2. par des modulateurs allostériques négatifs ?	132
V. Mise en place du test d'affinité pour le récepteur mGlu₅	134
VI. Conception de ligands à visée mixte A_{2A}R/mGluR₅.....	134
1. Le squelette quinazolinique : notre point de départ.....	134
2. Première stratégie de conception de ligands à visée mixte.....	135
3. Deuxième stratégie de conception de ligands à visée mixte	140
VII. Synthèse des molécules à visée mixte A_{2A}R/mGluR₅	142
1. Synthèse des molécules issues de la première stratégie	142
2. Synthèse des molécules issues de la deuxième stratégie	145
VIII. Résultats pharmacologiques préliminaires	147
1. Première stratégie de conception de ligands à visée mixte.....	147
2. Deuxième stratégie de conception de ligands à visée mixte	152
VI. Un nouveau point de départ pour la conception de ligands duaux ?.....	155

CHAPITRE 4 : ÉVALUATION PHARMACOLOGIQUE	157
I. Mesure de l'affinité par « radiobinding »	158
1. Principe	158
1.1. Quantification des paramètres de liaison d'un ligand : K_D et B_{max} (expérience de saturation)	160
1.2. Mesure de l'affinité d'un ligand non radiomarké (expérience de compétition).....	163
2. Mesure de l'affinité pour le récepteur A_{2A}	164
2.1. Expérience de saturation.....	165
2.2. Expérience de compétition.....	166
3. Mesure de l'affinité pour le récepteur $mGlu_5$	169
3.1. Travaux d'optimisation	169
3.2. Expérience de saturation.....	175
3.3. Expérience de compétition.....	176
II. Étude fonctionnelle du récepteur A_{2A}	179
III. Étude <i>in vivo</i> d'un composé quinazolinique	182
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	186
PARTIE EXPÉRIMENTALE	194
I. Chemistry.....	15894
1. Synthesis of benzofurans (Chapter 1)	1585
2. Synthesis of quinazolines (Chapter 2)	213
3. Synthesis of dual ligands (Chapter 3)	260
II. Displacement binding assays (<i>in vitro</i> testing)	279
RÉFÉRENCES	281

Introduction

Les maladies neurodégénératives (MNDs) telles que la maladie de Parkinson (MP) ou d'Alzheimer (MA) sont actuellement incurables. De plus, les traitements disponibles sur le marché sont uniquement symptomatiques. Malheureusement, ils présentent une très faible efficacité et sont associés à des effets secondaires importants. Ainsi, depuis le 1^{er} août 2018, ces traitements ne sont plus remboursés par l'Assurance maladie. Face à l'augmentation de l'espérance de vie et aux prévisions alarmantes du nombre de cas dans les prochaines décennies, les efforts de la recherche s'intensifient pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de développer de nouveaux candidats-médicaments à visée curative.

C'est dans ce but que le récepteur à l'adénosine A_{2A} (A_{2A}R) a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. En effet, ses antagonistes ont montré des effets bénéfiques *in vivo* dans des modèles animaux mimant la MP et la MA. Plus précisément, le blocage de ces récepteurs a été décrit pour réduire les déficits comportementaux, réduire les agrégats protéiques associés et exercer des effets neuroprotecteurs dans des modèles animaux de ces deux pathologies. Bien que certains antagonistes du récepteur A_{2A} aient atteint les phases cliniques pour la MP, il reste toujours d'actualité de développer de nouvelles structures exemptes des problèmes ADME des structures existantes.

Après une première partie consacrée à la maladie d'Alzheimer, l'intérêt des antagonistes du récepteur A_{2A} dans le cadre des maladies d'Alzheimer et de Parkinson sera détaillé. Dans le but de concevoir et de synthétiser des antagonistes originaux exemptes des problèmes ADME rencontrés en phases cliniques, un criblage virtuel a été réalisé et sera présenté. Celui-ci a permis d'identifier deux composés « hit » avec une affinité micromolaire. Il s'agit d'une structure quinazolinique particulièrement intéressante et d'une structure benzofuranique.

I. La maladie d'Alzheimer

1. Historique

En novembre 1901, une allemande de 51 ans du nom d'Auguste Deter est admise au sein de l'asile municipal d'aliénés et d'épileptiques de Francfort-sur-le-Main.⁽¹⁾ Elle est examinée par un neurologue, le Dr. Aloïs Alzheimer (**Figure 1**), car elle présente des symptômes de démence : troubles de la mémoire, du langage et autres troubles psychologiques (désorientation et hallucinations notamment).⁽²⁾ C'est la première fois qu'Aloïs Alzheimer rencontre de tels symptômes.

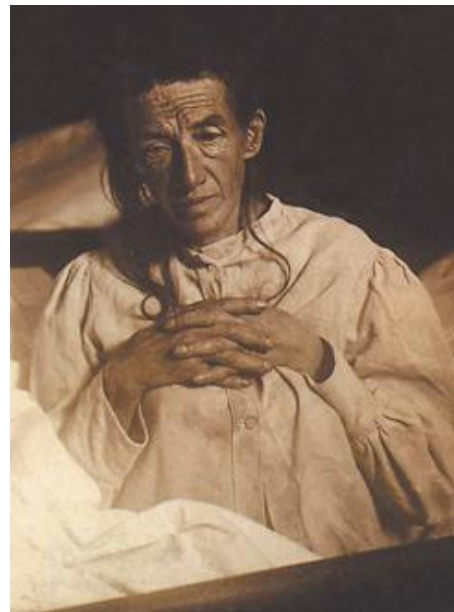


Figure 1. Dr. Aloïs Alzheimer (gauche) et sa patiente Auguste Deter (droite)^(1,3,4)

En avril 1906, à la suite du décès d'Auguste Deter et avec la permission de sa famille, une autopsie de son cerveau est réalisée par Aloïs Alzheimer. L'étude histopathologique du cerveau de sa patiente montre une grande atrophie de ce dernier, plus particulièrement au niveau du cortex cérébral.⁽³⁾ De plus, il met en évidence la présence de dépôts à l'intérieur et à l'extérieur des cellules nerveuses (**Figure 2**). Il diagnostique donc à Auguste Deter une

maladie singulière du cortex cérébral. C'est en 1910 que le nom de « maladie d'Alzheimer » fut donné à cette pathologie par Emil Kraepelin.⁽²⁾



Figure 2. Dessins originaux d'Aloïs Alzheimer représentant les dégénérescences neurofibrillaires d'Auguste Deter⁽⁴⁾

2. Épidémiologie

La MA est la maladie neurodégénérative la plus fréquente et constitue également la première cause de démence dans le monde.⁽⁵⁻⁷⁾ Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 50 millions de personnes sont atteintes de cette pathologie.⁽⁸⁾ En France, selon les derniers chiffres communiqués par l'association « France Alzheimer & maladies apparentées », on recense près de 1,2 million de personnes atteintes.⁽⁹⁾ Plus précisément, un nouveau cas est diagnostiqué toutes les 3 minutes soit près de 225 000 nouveaux cas chaque année en France.⁽¹⁰⁾ Aujourd'hui, la MA constitue un réel enjeu socio-économique. En effet, en raison de l'augmentation de l'espérance de vie, on estime à près de 1,8 million le nombre de cas en France et à 141 millions dans le monde d'ici 2050.⁽⁹⁾

3. Symptômes cliniques et diagnostic

3.1 Symptômes cliniques

La MA est caractérisée par une perte progressive des neurones.⁽¹¹⁾ Évolutive et à ce jour irréversible, elle s'accompagne d'un déclin des capacités cognitives et intellectuelles, d'une détérioration de la mémoire, de troubles du langage et de perturbations des fonctions exécutives.⁽¹²⁾ À mesure que progresse la maladie, il devient de plus en plus difficile pour les patients concernés de gérer leur vie quotidienne.

En effet, des activités comme le simple fait de faire des courses, cuisiner ou s'habiller ne peuvent plus être réalisées de façon autonome. Les malades ont des difficultés à suivre une conversation car leur mémoire à court terme est atteinte. Ils perdent également leurs repères spatio-temporels comme la date, l'heure et l'endroit dans lequel ils se trouvent. Pour les cas les plus avancés, les patients ne reconnaissent plus leur entourage.

Cette maladie a des retentissements sur les proches de la famille appelés « aidants ». À cause de la dépendance physique et psychique qu'elle crée, l'entourage familial supporte la charge physique et émotionnelle de l'accompagnement de ces personnes. Une prise en charge médicalisée avec mise en place d'aides doit rapidement se mettre en place. Aujourd'hui, des structures médico-sociales de type EHPAD (Établissement d'Hébergement pour Personnes Âgées Dépendantes) sont spécialisées dans la prise en charge de cette pathologie et troubles apparentés. D'ici octobre 2020, les aidants d'une personne en perte d'autonomie auront la possibilité de se voir accorder un congé indemnisé d'une durée pouvant aller jusqu'à trois mois pour l'ensemble d'une carrière (loi n° 2019-1446 du 24 décembre 2019 de financement de la Sécurité sociale pour 2020).⁽¹³⁾

3.2 Ses différentes formes

À ce jour, la maladie d'Alzheimer existe sous deux formes :⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

- **La forme sporadique :**

Il s'agit de la forme la plus commune de la maladie. Elle concerne près de 98 % des patients et apparaît généralement après l'âge de 65 ans. Cependant, certains facteurs peuvent être favorables à l'apparition de cette forme : obésité, diabète, manque d'activité physique, facteurs environnementaux, troubles du sommeil, faible niveau d'éducation ou faible activité intellectuelle...

- **La forme génétique ou forme familiale :**

C'est la forme la plus rare de la maladie car elle concerne que 2 % des cas. Il s'agit d'une forme précoce, souvent agressive, survenant avant 65 ans.

3.3 Diagnostic

Le diagnostic de la MA constitue un réel enjeu. Malheureusement, ce dernier est souvent tardif en raison d'une longue période asymptomatique pouvant s'étaler sur plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes. C'est pourquoi, à l'apparition de ceux-ci, il est important de se rapprocher d'un médecin ou d'un neurologue pour qu'un diagnostic soit établi. En effet, un diagnostic précoce permettra aux patients et à leurs proches d'élaborer un plan de suivi et une prise en charge adaptée. Pour cela, différents tests existent et peuvent être proposés aux patients comme par exemple :⁽⁹⁾

- Bilan neuropsychologique : évaluation des performances cognitives (mémoire, langage, raisonnement...etc.)
- Tests physiques : évaluation de diverses capacités physiques comme les réflexes ou encore la coordination des mouvements.
- Des techniques d'imagerie médicale peuvent être également utilisées. On citera l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet d'observer ou non une

atrophie de certaines parties du cerveau comme l'hippocampe. La Tomographie par Émission de Positons (TEP) permet, quant à elle, de visualiser la présence ou non d'un métabolisme cérébral anormal du glucose induit par cette pathologie.

L'ensemble de ces tests et de leurs résultats permettent un diagnostic de la MA ou d'une maladie apparentée.

4. Physiopathologie

La MA fait encore l'objet de nombreuses études car son origine exacte reste encore méconnue. Les efforts de la recherche ont tout de même permis d'améliorer considérablement les connaissances sur la physiopathologie de cette dernière. Ainsi, la mort neuronale observée chez les patients résulte de deux principales lésions au sein du système nerveux central (SNC) :^(17,18) les plaques amyloïdes (à l'extérieur des neurones) et les dégénérescences neurofibrillaires (à l'intérieur des neurones) comme représentées en **figure 3**.

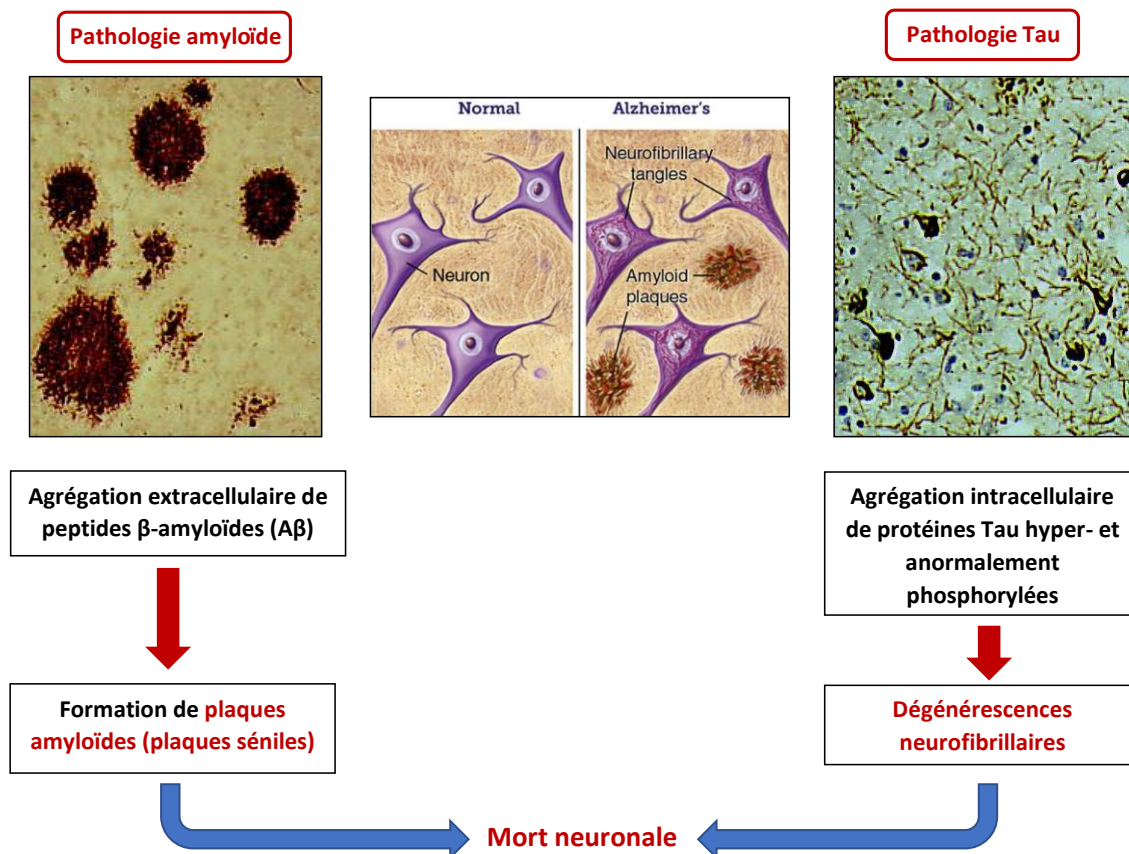


Figure 3. Les deux principales lésions conduisant à la mort neuronale

4.1 Les plaques amyloïdes

Comme illustrées en **figure 3**, les plaques amyloïdes sont issues de l'agrégation extracellulaire de peptides β -amyloïdes ($A\beta$). Ces derniers sont généralement constitués de 39 à 43 acides aminés et résultent du clivage d'une protéine membranaire, appelée protéine précurseur de l'amyloïde ou « Amyloid Protein Precursor » (APP).⁽¹⁹⁾ L'APP est une glycoprotéine transmembranaire qui constitue la membrane des neurones. Elle possède une longue partie *N*-terminale (extracellulaire) et une petite partie *C*-terminale (intracellulaire). Cette protéine présente deux voies de clivage représentées en **figure 4** ci-dessous :

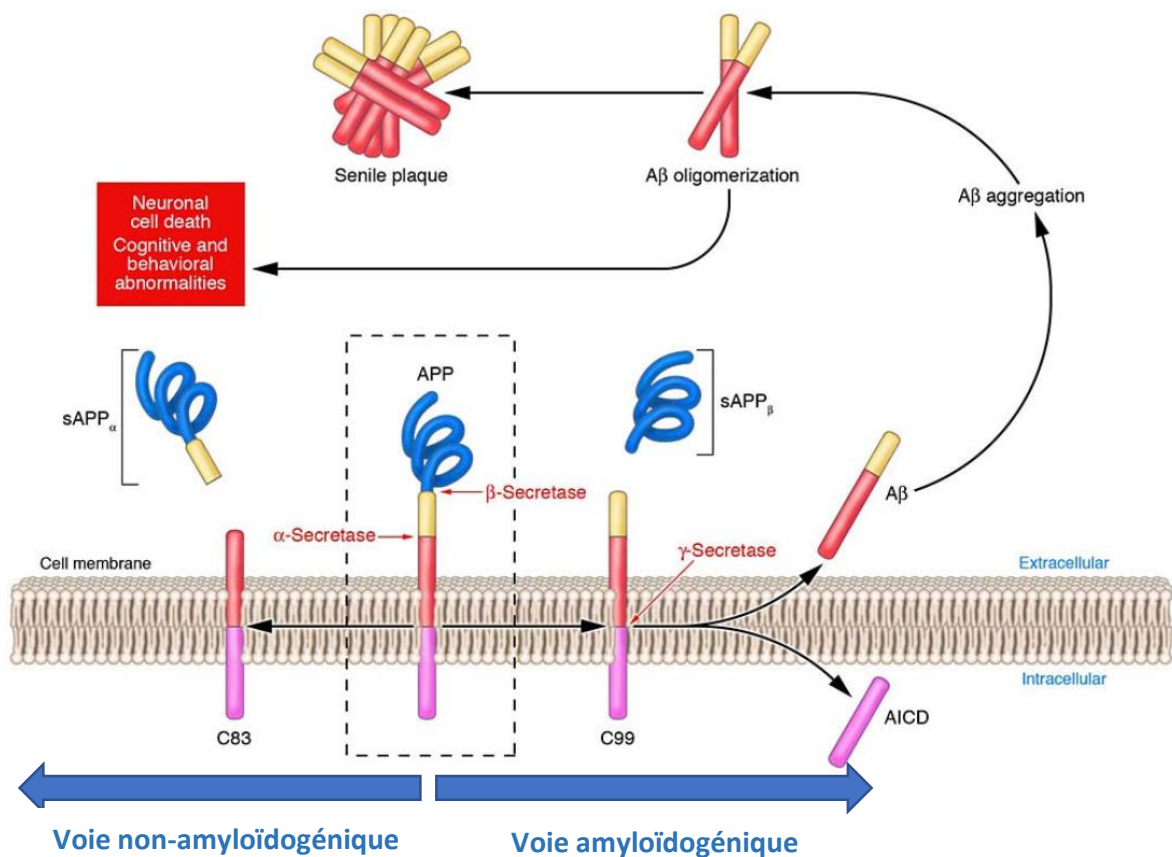


Figure 4. Deux voies de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

Figure adaptée de Petra E. Spies *et al.*⁽²⁰⁾

À la lecture de la **figure 4**, on observe :

- La voie non-amyloïdogénique :

Dans un premier temps, l' α -sécrétase assure le clivage de l'APP conduisant à la formation de deux fragments : l'APP-alpha sécrétée (sAPP α), fragment soluble et un fragment C-terminal de 83 acides aminés, lié à la membrane, appelé CT83 (C83) ou CTF α . Des études ont pu montrer que le fragment sAPP α possède des propriétés neuroprotectrices et jouerait un rôle dans la plasticité neuronale.⁽²¹⁾

Dans un second temps, le fragment C83 est à son tour clivé par la γ -sécrétase donnant lieu à la formation d'un fragment p3 et à un domaine intracellulaire de l'APP appelé AICD « Amyloid Intracellular Cytoplasmic Domain » (non représentés sur la **figure 4**).

- La voie amyloïdogénique :

Dans un premier temps, la β -sécrétase (BACE1) assure le clivage de l'APP conduisant à la formation de deux fragments : l'APP-bêta sécrétée (sAPP β), fragment soluble et un fragment C-terminal de 99 acides aminés, lié à la membrane, appelé CT99 (C99) ou CTF β .

Dans un second temps, le fragment CTF β est clivé par la γ -sécrétase pour conduire à la formation d'un domaine intracellulaire de l'APP (AICD) et d'un peptide A β . La longueur de ce peptide est variable mais les deux isoformes principales sont constituées de 40 à 42 acides aminés. Le peptide A β ₄₂ est, quant à lui, peu soluble et son accumulation semble constituer majoritairement les plaques amyloïdes.⁽²²⁾

4.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires constituent la deuxième lésion (*cf.* **Figure 3, p6**). Elles se traduisent par la formation d'amas neurofibrillaires à l'intérieur des neurones. Ces amas sont constitués de protéines Tau (Tubulin associated unit) hyper- et anormalement phosphorylées. La protéine Tau a pour principales fonctions d'organiser, de stabiliser et de réguler la dynamique des microtubules à l'intérieur des neurones (**Figure 5**).⁽²³⁾ Les microtubules sont des « rails moléculaires » dans lesquels sont transportés des neurotransmetteurs. Ces derniers sont ensuite libérés au niveau des synapses et permettent aux neurones de communiquer entre eux. Dans les conditions physiopathologiques de la MA, les protéines Tau sont hyper- et anormalement phosphorylées par l'action de diverses kinases (GSK-3 β et Cdk5 notamment).⁽¹⁹⁾ De ce fait, elles se détachent des microtubules auxquels elles sont associées, forment des amas neurofibrillaires, et conduisent à une désintégration des microtubules. Sans squelette, les neurones dégèrent et les connexions entre les neurones se perdent : c'est la mort neuronale.

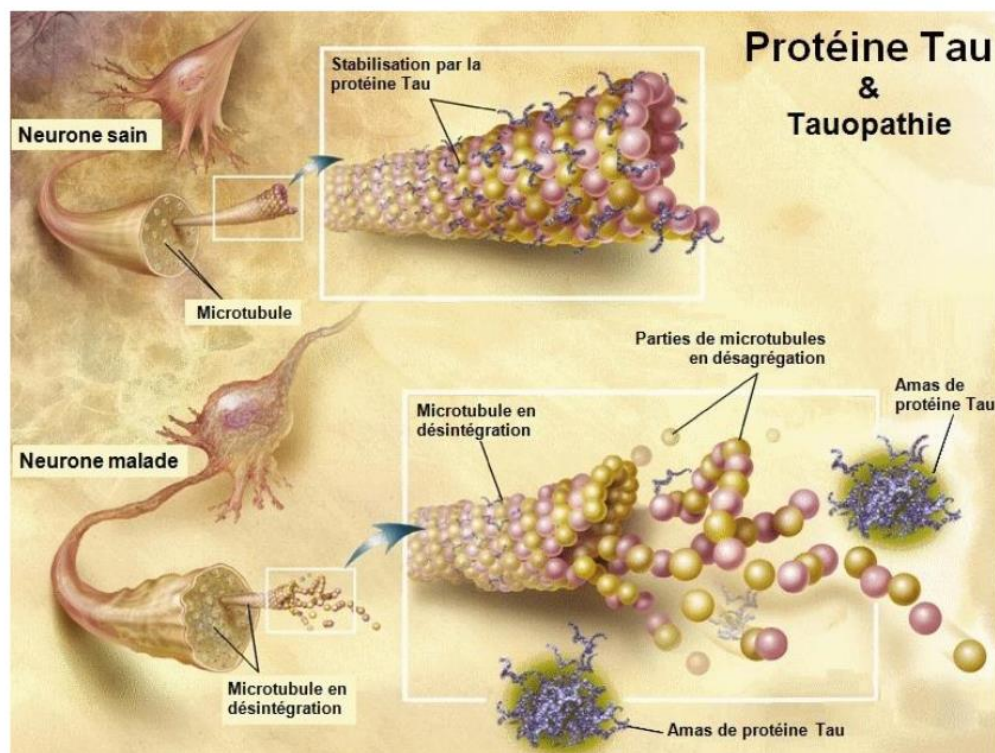


Figure 5. Hyperphosphorylation de la protéine Tau conduisant aux dégénérescences neurofibrillaires⁽²⁴⁾

4.3 L'hypothèse de la cascade amyloïde

La formation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires constituent les principaux marqueurs de la MA. Elles apparaissent comme deux phénomènes interconnectés et sont à l'origine de l'hypothèse de la cascade amyloïde.^(19,25)

Cette hypothèse, présentée pour la première fois par J. Hardy et J.A. Higgins en 1992,⁽²⁶⁾ repose sur le fait que la formation des plaques amyloïdes est la première cause de la MA. En effet, cette dernière serait à l'origine des dégénérescences neurofibrillaires conduisant à la mort neuronale et au syndrome de démence (**Figure 6**).

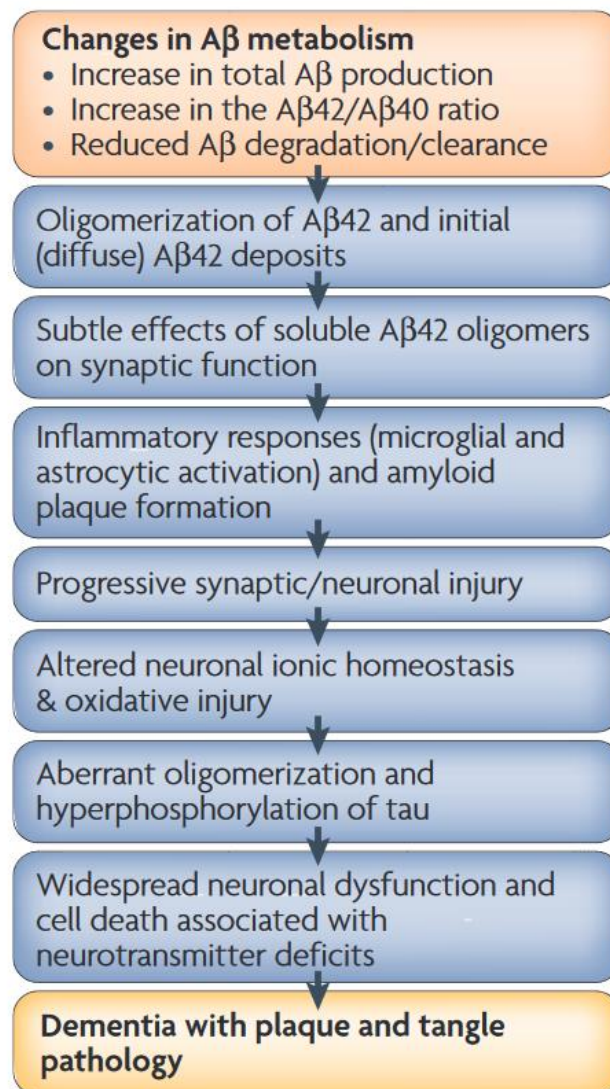


Figure 6. L'hypothèse de la cascade amyloïde^(19,25)

II. Les traitements médicamenteux

Les médicaments actuellement commercialisés dans le cadre de la MA ont été conçus pour agir sur les symptômes de la maladie. Il s'agit donc de traitements symptomatiques qui visent à moduler les systèmes cholinergique et glutamatergique. Ces derniers sont prescrits aux patients dans le but de stabiliser ou, au moins, ralentir la progression de la maladie. Ils ont pour but également d'améliorer les troubles psycho-comportementaux associés. Malheureusement, ils présentent une très faible efficacité et sont accompagnés d'effets secondaires importants pouvant très lourdement handicaper le mode de vie des patients. Aujourd'hui, on distingue deux classes de substances médicamenteuses modulant les systèmes de neurotransmission cholinergique et glutamatergique.

1. Les anticholinestérasiques

La MA est caractérisée par une perte de neurones cholinergiques particulièrement dans le néocortex et l'hippocampe (**Figure 7**).⁽²⁷⁾ L'acétylcholine (ACh), produite dans ces neurones, est un neurotransmetteur jouant un rôle important dans la mémoire et l'apprentissage.⁽²⁸⁾

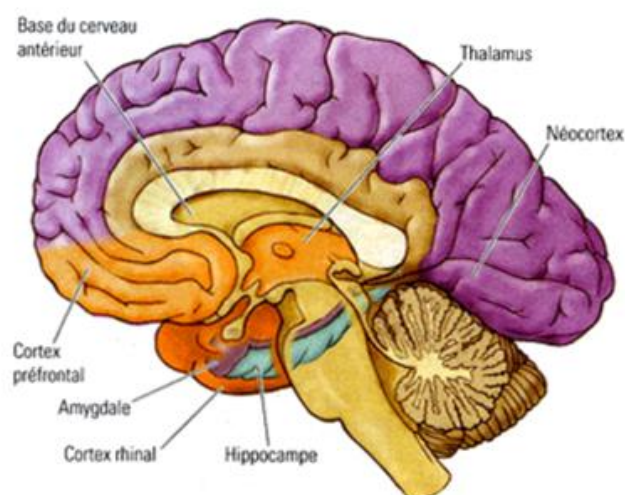


Figure 7. Coupe d'un cerveau humain

Le système cholinergique est un mécanisme à plusieurs étapes (**Figure 8**) :

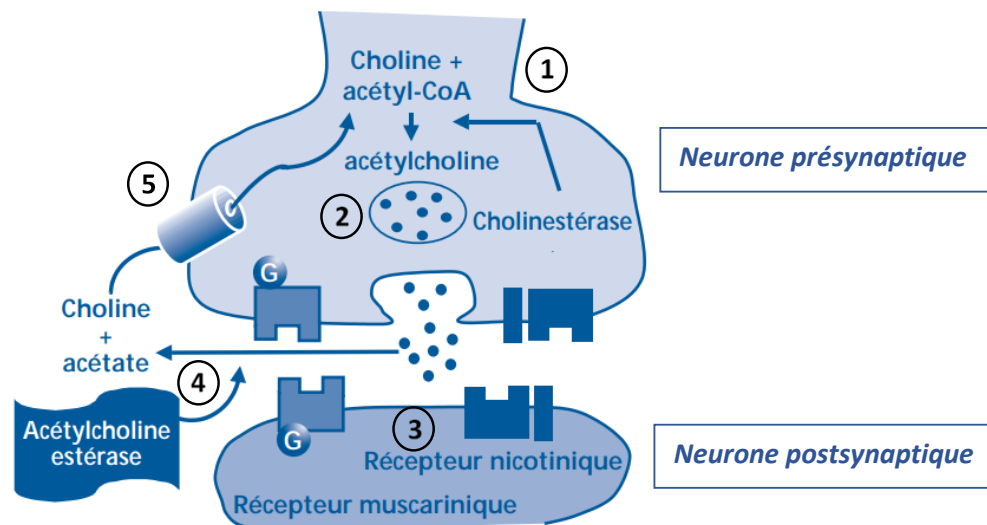


Figure 8. La synapse cholinergique⁽²⁹⁾

La première étape est la synthèse d'acétylcholine dans le neurone présynaptique. Sa synthèse est réalisée à partir de choline et d'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) et par action d'une cholinestérase, la choline acétyltransférase (CAT) (**Figure 8, 1**). L'acétylcholine synthétisée est alors libérée dans la fente synaptique grâce à un phénomène d'exocytose (**Figure 8, 2**). Une fois libérée dans la fente synaptique, l'acétylcholine se fixe aux récepteurs présents à la surface du neurone postsynaptique (nicotiniques et muscariniques). La fixation de l'acétylcholine à ces récepteurs (**Figure 8, 3**) induit la transmission du signal nerveux. Ensuite, l'acétylcholine est rapidement hydrolysée (**Figure 8, 4**) par action de l'acétylcholinestérase (AChE), donnant lieu à la formation de choline et d'acétate. Enfin, une partie de la choline nouvellement formée est recaptée par la terminaison présynaptique (**Figure 8, 5**) permettant ainsi de réinitialiser le cycle de synthèse de l'acétylcholine.

Du fait que le système cholinergique soit impliqué dans les mécanismes de la mémoire et de la cognition, son dysfonctionnement peut être également à l'origine des symptômes observés de la MA : c'est l'hypothèse cholinergique.⁽²⁹⁾ De plus, dans des cerveaux de patients âgés atteints de la MA, une diminution significative de l'expression de la CAT est observée,⁽²⁹⁻³¹⁾ impactant ainsi la synthèse d'acétylcholine. Par conséquent, des agonistes des récepteurs cholinergiques (nicotiniques et muscariniques) ont été développés. Malheureusement, ils se

sont révélés être inefficaces.⁽²⁷⁾ C'est pourquoi, aujourd'hui, la seule stratégie thérapeutique étudiée dans le cadre de l'hypothèse cholinergique est le développement d'inhibiteurs d'acétylcholinestérase (AChE) appelés également anticholinestérasiques.

Aujourd'hui, il existe trois médicaments commercialisés (Donépézil, Rivastigmine et Galantamine) représentés en **figure 9** et qui sont utilisés dans les formes légères à modérées de la maladie.⁽¹⁸⁾ Ils ont pour rôle de maintenir la quantité d'acétylcholine à un taux artificiellement élevé dans la synapse en bloquant l'acétylcholinestérase responsable de sa dégradation dans la fente synaptique.

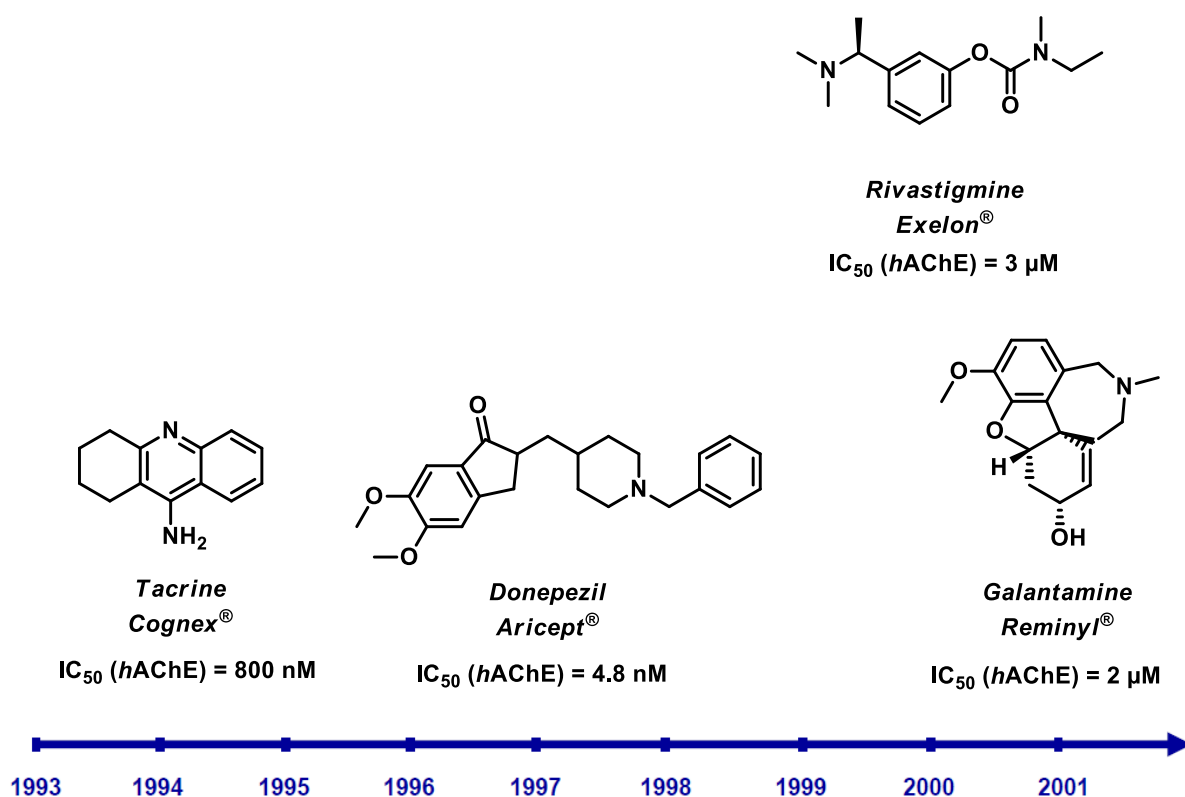


Figure 9. Les différents inhibiteurs de l'AChE commercialisés

Historiquement, le premier anticholinestérasique disponible sur le marché est la tacrine (tétrahydroaminacrine). Il s'agit d'un inhibiteur non sélectif et réversible de l'AChE. Ce médicament a été commercialisé en France à partir de 1994. Cependant, en raison de sa toxicité hépatique, sa commercialisation a été arrêtée en 2004.⁽³²⁾

Le donépézil a été commercialisé en France à partir de 1997. Il s'agit d'un inhibiteur sélectif et réversible de l'AChE. La rivastigmine est, quant à elle, un inhibiteur de l'AChE

pseudo-irréversible et non sélectif, commercialisée en France à partir de 2000. Elle peut être prescrite sous une forme orale (une prise) ou sous la forme d'un patch permettant ainsi une libération prolongée du principe actif sur une période de 24 h.⁽³³⁾ Enfin, la galantamine est un inhibiteur réversible et compétitif de l'AChE commercialisée en 2001. Elle montre également une stimulation des récepteurs nicotiques présynaptiques.⁽³⁴⁾

Il est important de mentionner que les anticholinestérasiques, actuellement disponibles sur le marché, sont associés à des effets secondaires importants (nausées, vomissements, diarrhées, agitation, confusion) et à une efficacité très faible chez le patient.⁽³⁵⁾ Par conséquent, l'hypothèse cholinergique ne semble pas être la seule cause dans la physiopathologie des désordres cognitifs observés dans la MA.

2. Les anti-glutamates

Les récepteurs du *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) appartiennent à la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate. Ils interviennent dans la plupart des transmissions synaptiques excitatrices du cerveau. Ils jouent un rôle important dans l'apprentissage et la formation de la mémoire.⁽³⁶⁾ Chez les patients atteints de la MA, des études ont montré un lien entre la formation des plaques amyloïdes et un niveau anormal de glutamate extrasynaptique (**Figure 10**).^(37,38) Ce niveau anormal de glutamate serait dû à une diminution de son absorption au niveau des astrocytes.

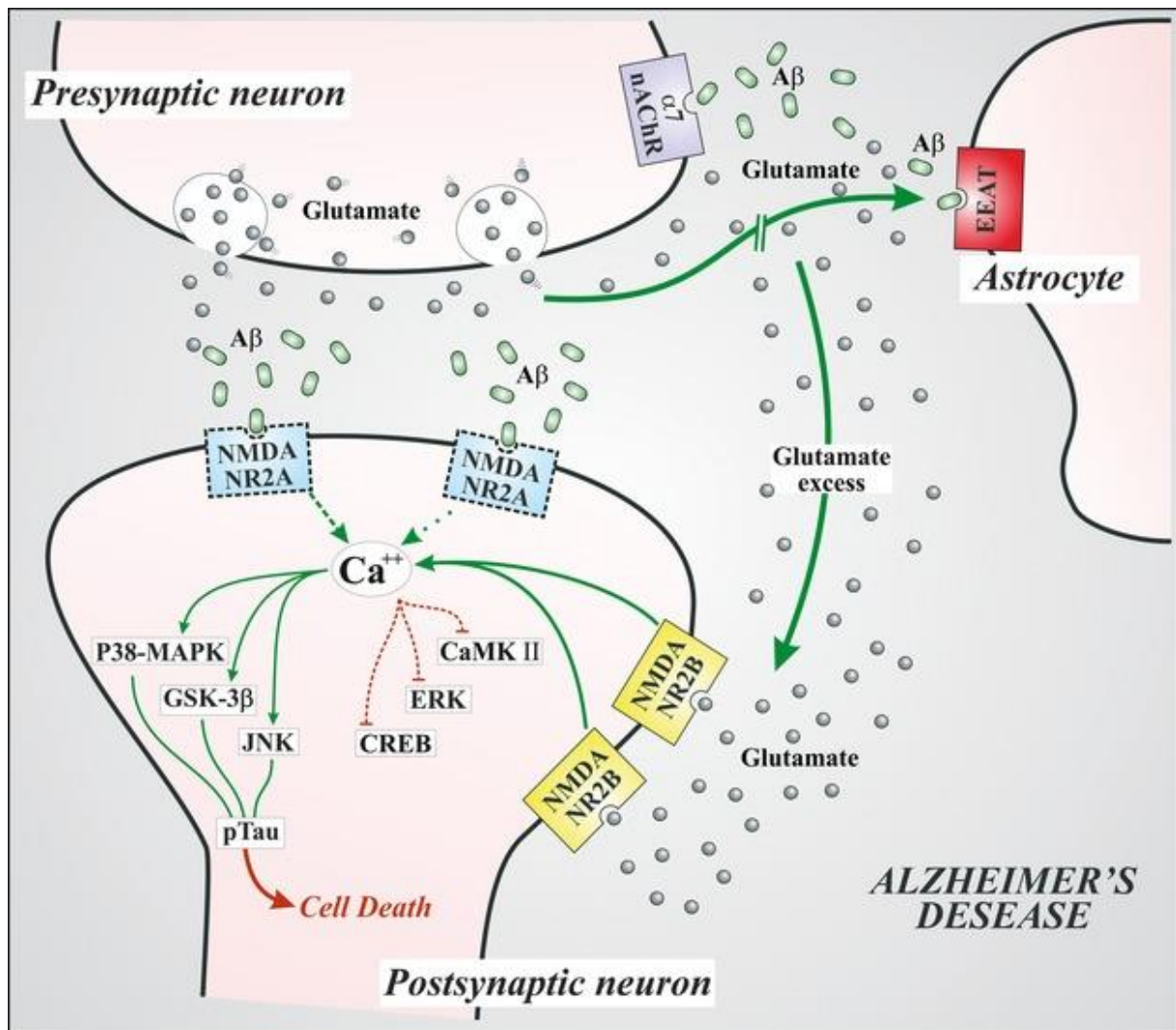
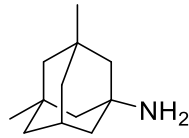


Figure 10. La synapse glutamatergique chez un individu atteint de la MA⁽³⁹⁾

Chez un individu sain, la liaison du glutamate aux récepteurs NMDA entraîne un influx de calcium extracellulaire, qui contrôle l'excitabilité des membranes et la transmission synaptique. Chez un individu atteint de la MA, les niveaux de glutamate deviennent anormalement élevés. Par conséquent, une surstimulation des récepteurs NMDA est engendrée, provoquant un influx extracellulaire excessif de calcium entraînant la mort cellulaire (**Figure 10**).⁽⁴⁰⁾ Pour contrebalancer ces effets, une deuxième stratégie thérapeutique visant à utiliser des antagonistes des récepteurs NMDA a donc été développée.

Jusqu'à ce jour, un seul médicament exploitant la piste glutamatergique a été commercialisé. Il s'agit de la mémantine (**Figure 11**), un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA prescrit pour des cas modérés à sévères de la MA.⁽⁴⁰⁾

**Mémantine****Ebixa®**IC₅₀ = 0.5 µM**Figure 11. Structure chimique de la mémantine**

Elle agit donc en bloquant ces récepteurs et limite ainsi l'influx extracellulaire de calcium dans le neurone. Cet anti-glutamate protège également les cellules contre la toxicité induite par le peptide Aβ et le stress oxydatif. De la même façon que les anticholinestérasiques, la prise de mémantine est associée à des effets secondaires importants : diarrhées, maux de tête et insomnies. Des études récentes ont montré l'impact synergique bénéfique de la mémantine et du chlorhydrate de donépézil (IChE).⁽⁴¹⁾ Cette bithérapie, appelée Namzaric, a ainsi été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en 2014. Elle est plus efficace sur l'amélioration des fonctions cognitives que le donépézil en monothérapie.

En somme, les traitements médicamenteux disponibles sur le marché sont uniquement symptomatiques et sont associés à des effets secondaires importants. De plus, ces médicaments présentent une faible efficacité ne permettant pas une amélioration significative des troubles psycho-comportementaux et du taux de mortalité. C'est pourquoi la Haute Autorité de Santé (HAS) a donné un avis favorable au déremboursement de ces médicaments le 1^{er} août 2018.⁽⁴²⁾ Par conséquent, il est urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes à visée curative.

III. Les nouvelles stratégies thérapeutiques

Face à la faible efficacité et aux effets secondaires importants des traitements actuels, de nouvelles stratégies thérapeutiques à visée curative sont en cours de développement. Ces stratégies visent principalement la pathologie amyloïde et la pathologie Tau (**cf. Figure 3, p6**).

1. La pathologie amyloïde (inhibiteurs de β - et γ - sécrétases)

L'une des principales stratégies thérapeutiques vise à empêcher ou, au moins, ralentir la formation des plaques amyloïdes (**cf. Figure 3, p6**). En effet, les efforts actuels se concentrent sur le développement d'agents qui pourraient empêcher les peptides A β de s'agréger et ainsi former ces plaques.

Plus précisément, cette stratégie repose sur le développement d'inhibiteurs des β - et γ - sécrétases, enzymes responsables d'une mauvaise métabolisation de l'APP (**cf. Figure 4, p7**) et conduisant à la formation des peptides A β_{40-42} . Concernant la β -sécrétase (BACE1), de nombreux inhibiteurs basés sur des structures hydroxyéthylènes, hydroxyéthylamines ou macrocycles ont été développés.⁽⁴³⁾ Cependant, peu d'inhibiteurs ont atteint les phases cliniques en raison de problèmes de sélectivité et d'une faible efficacité *in vivo*. Un inhibiteur développé par les laboratoires Merck, le Verubecestat (MK-8931), a réussi à atteindre la phase III des essais cliniques mais en a été rejeté en février 2018.⁽⁴⁴⁾ De la même façon que les inhibiteurs de la β -sécrétase, des inhibiteurs de la γ - sécrétase ont également suscité un vif intérêt. En effet, des études ont pu montrer le rôle bénéfique de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (l'ibuprofène par exemple) dans la diminution de la synthèse des peptides A β_{42} en agissant par le biais de la γ - sécrétase.⁽⁴⁵⁾ Le développement de ces inhibiteurs a été fortement réduit notamment en raison d'un manque de sélectivité.

2. La pathologie Tau

La deuxième stratégie thérapeutique en cours de développement cible la protéine Tau. De la même manière que pour les plaques amyloïdes, cette stratégie consiste à empêcher ou, au moins, réduire la formation d'amas neurofibrillaires engendrée par une hyperphosphorylation de cette protéine (**cf. Figure 5, p9**).

Premièrement, des inhibiteurs de certaines kinases (GSK-3 β et Cdk5 notamment), suractivées dans les conditions pathologiques, sont en cours de développement.⁽⁴⁶⁾ Par exemple, des travaux ont pu montrer l'action inhibitrice du valproate de sodium (un antiépileptique) sur la GSK-3 β .⁽⁴⁷⁾ Le Tideglusib, un autre inhibiteur de la GSK-3 β , a atteint la

phase clinique II mais en a été rejeté pour un manque d'efficacité. Cependant, son utilisation dans le domaine dentaire suscite un certain intérêt. En effet, des essais cliniques ont pu montrer son action « anti-carie » en permettant de stimuler les cellules souches présentes dans la pulpe centrale des dents facilitant ainsi leur régénération.⁽⁴⁸⁾ Deuxièmement, des stabilisateurs de microtubules sont en cours de développement tout comme des composés pouvant empêcher l'agrégation de la protéine Tau ou ayant un impact sur la dissociation des agrégats existants.⁽⁴⁹⁾

3. Autres stratégies thérapeutiques

Il est important de noter que d'autres stratégies thérapeutiques sont en cours de développement. En effet, on rapporte dans la littérature le développement de composés agissant en tant qu'antiagrégants des peptides A β ₄₂ ou encore de composés antioxydants pour diminuer le stress oxydant induit par la MA.^(50,51) L'immunothérapie fait également l'objet de nombreux travaux. Nous aborderons au cours de ce manuscrit (**cf. Chapitre 3**) une nouvelle stratégie thérapeutique dite « multicible », une stratégie qui s'avère être prometteuse dans le cadre de pathologies multifactorielles telles que la MA.⁽⁵²⁾

Ces dernières années, le récepteur à l'adénosine A_{2A} a fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la MP et de la MA. En effet, le blocage de ce récepteur induit notamment une diminution des plaques amyloïdes, de la phosphorylation de la protéine Tau et remodèle favorablement les fonctions motrices altérées par la perte de dopamine.

IV. Les récepteurs à l'adénosine

Les récepteurs à l'adénosine appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et ont pour ligand endogène l'adénosine.

1. L'adénosine

L'adénosine est un nucléoside présent dans toutes les cellules de notre organisme.⁽⁵³⁾ Elle est composée d'une base azotée, l'adénine, sur laquelle est attaché un ribose (ribofuranose) (**Figure 12**).

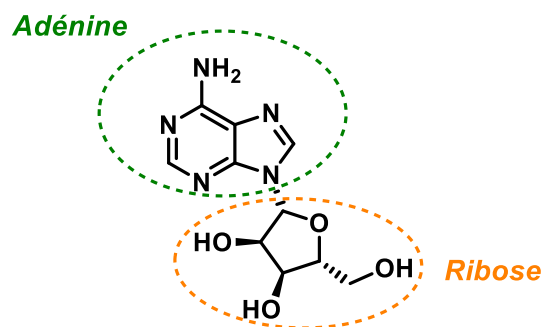


Figure 12. Structure chimique de l'adénosine

L'adénosine est un neuromodulateur important du SNC. En effet, elle régule la libération d'un certain nombre de neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine ou encore la dopamine.⁽⁵⁴⁾ Elle joue donc un rôle important en tant que modulateur de l'activité neuronale.

Concernant sa synthèse, elle peut être formée des deux côtés de la membrane cellulaire (intra- et extracellulaire). À la lecture de la **figure 13**, ci-après, elle est synthétisée par deux voies distinctes qui impliquent deux substrats différents : l'adénosine monophosphate (AMP) et la S-adenosyl-L-homocystéine. L'adénosine circule de part et d'autre de la membrane cellulaire par le biais de transporteurs de nucléosides.

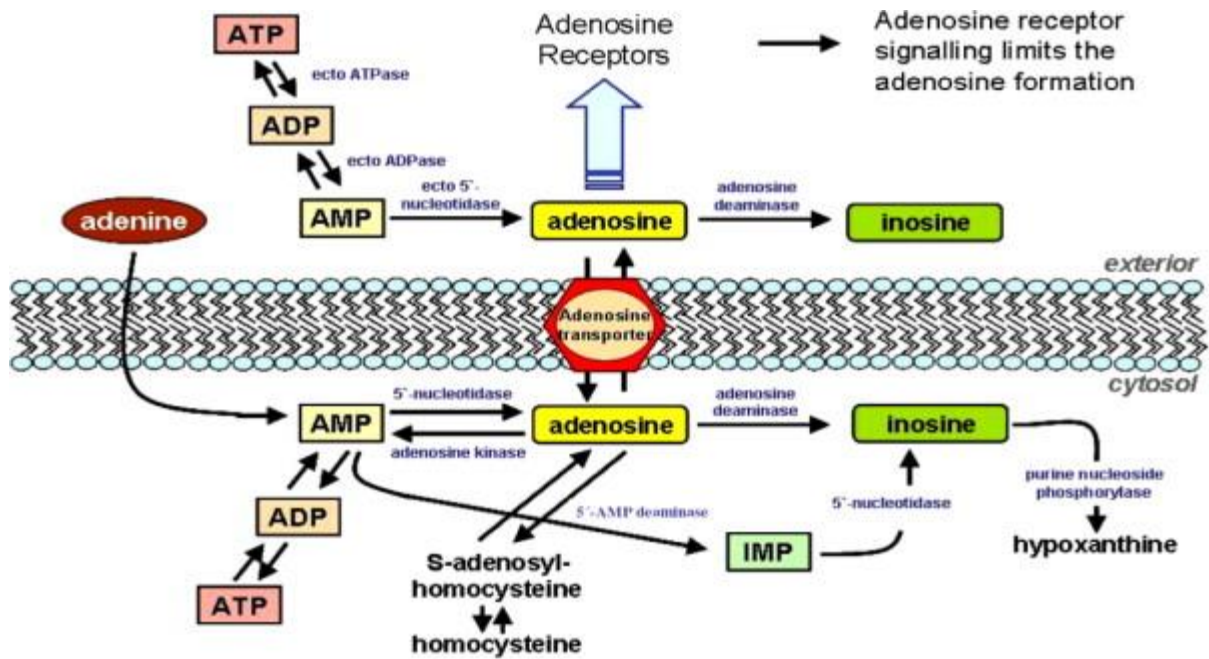


Figure 13. Synthèse et catabolisme de l'adénosine⁽⁵⁵⁾

L'adénosine recapturée dans le milieu intracellulaire est rapidement phosphorylée en AMP par l'adénosine kinase ou désaminée en inosine par l'adénosine désaminase (ADA). Ces transformations permettent d'assurer un maintien de la concentration intracellulaire d'adénosine. De plus, en étant impliquée dans la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) par l'ajout de trois groupements phosphates, l'adénosine joue également un rôle vital dans de nombreux fonctionnements physiologiques.

2. Classification des récepteurs à l'adénosine

L'adénosine exerce ses effets par l'intermédiaire de récepteurs membranaires appartenant à la famille des RCPGs. Quatre récepteurs variant par leur affinité, leurs localisations et leurs fonctions ont été identifiés et clonés : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ (**Tableau 1**).

Récepteur	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Distribution (SNC)	Cortex cérébral, hippocampe, thalamus, moelle épinière	Striatum	Uniforme (faiblement abondant)	Hippocampe (faiblement abondant)
Autres principaux sites	Yeux, glandes surrénales, foie, reins	Thymus, leucocytes, plaquettes sanguines	Colon, vessie, poumons	Testicules, mastocytes
Protéine G	G _{i/o}	G _s , G _{olf}	G _s , G _q	G _i , G _q
Effets	↓ AMPc ↑ IP ₃ ↑ K ⁺ ↓ Ca ²⁺	↑ AMPc	↑ AMPc ↑ IP ₃	↓ AMPc ↑ IP ₃
K_i (nM) adénosine	70	1500	5100	6500

Tableau 1. Distribution, effets et affinité des récepteurs à l'adénosine⁽⁵⁶⁾

À la lecture du **tableau 1**, on constate que :

- Le **récepteur A₁** est le récepteur le plus affiné à l'adénosine ($K_i h(A_1R) = 70$ nM). Il est fortement exprimé dans le SNC et plus précisément au niveau du cortex et de l'hippocampe. On retrouve également ce récepteur dans d'autres d'organes tels que le foie et les reins. La stimulation de ce récepteur provoque une inhibition de l'adénylate cyclase entraînant une diminution de la production intracellulaire d'AMPc. Elle va favoriser également l'ouverture des canaux potassiques, ce qui induit indirectement une diminution de l'influx intracellulaire de calcium.
- Le **récepteur A₃** est le récepteur le moins affiné pour l'adénosine ($K_i h(A_3R) = 6500$ nM). Dans le SNC, on le retrouve au sein de l'hippocampe où il est faiblement abondant. Comme le

récepteur A_1 , sa stimulation entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase entraînant ainsi une diminution de la production intracellulaire d'AMPc.

Les récepteurs A_2 sont subdivisés en deux sous-types, les récepteurs A_{2A} et A_{2B} , en fonction de leur affinité respective pour l'adénosine.

○ Le **récepteur A_{2A}** , tout comme le récepteur A_1 , est majoritairement exprimé dans le SNC, particulièrement au niveau du striatum, tant au niveau des neurones que des cellules gliales. Le **récepteur A_{2B}** est, quant à lui, faiblement présent au sein du SNC mais fortement exprimé dans le tractus gastro-intestinal, la vessie et les poumons. À la différence des récepteurs A_1 , la stimulation des récepteurs A_{2A} et A_{2B} conduit à l'activation de l'adénylate cyclase entraînant ainsi une augmentation de la production intracellulaire d'AMPc.

À ce jour, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence les effets thérapeutiques de ces récepteurs à l'adénosine, que cela soit par l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes. Les différents effets thérapeutiques recensés sont rapportés dans le **tableau 2**, ci-après.

Ligands	Récepteurs	Intérêts thérapeutiques
Agonistes	A ₁	Blocage du nœud auriculo-ventriculaire et tachyarythmie supraventriculaire
	A _{2A}	Troubles respiratoires, thrombose, hypertension, troubles inflammatoires
	A _{2B}	Réaction allergique
	A ₃	Ischémie cardiaque, arythmie
Antagonistes	A ₁	Infarctus du myocarde inférieur, arrêt cardiaque, rejet de greffe cardiaque
	A _{2A}	Maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, neurodégénérescences
	A _{2B}	Asthme, inflammation pulmonaire
	A ₃	Glaucome, asthme

Tableau 2. Intérêts thérapeutiques d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine⁽⁵⁵⁾

Pour rappel et comme rapportés dans le **tableau 2**, les antagonistes du récepteur A_{2A} se sont révélés être des cibles thérapeutiques d'intérêt, notamment pour le traitement de maladies neurodégénératives telles que la MP et la MA. En effet, le blocage de ces récepteurs a été décrit pour réduire les déficits comportementaux, réduire les agrégats protéiques associés et exercer des effets neuroprotecteurs dans des modèles animaux de ces pathologies.

3. Intérêts thérapeutiques des antagonistes du récepteur A_{2A}

Les antagonistes du A_{2A}R se sont révélés être des composés d'intérêt,⁽⁵⁷⁾ notamment dans le contexte de la MP et de la MA.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾ En effet, sur le plan épidémiologique, il a été démontré un effet bénéfique de la caféine (**Figure 14**), un antagoniste non sélectif du A_{2A}R, vis-à-vis du risque de développer ces deux pathologies. Ces observations chez les patients ont été confirmées dans des modèles animaux de ces deux pathologies.⁽⁵⁹⁻⁶²⁾

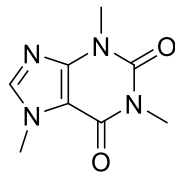


Figure 14. Structure chimique de la caféine

3.1 Maladie de Parkinson

Dans le contexte de la MP, il a été montré que le blocage des A_{2A}R exerçait des effets bénéfiques en remodelant favorablement les fonctions motrices altérées par la perte de dopamine mais également en promouvant la survie des neurones dopaminergiques. L'effet moteur qui apparaît est lié à l'existence d'une hétérodimérisation du A_{2A}R avec le récepteur D₂ à la dopamine dont il antagonise l'effet.⁽⁶³⁾ Ainsi, les antagonistes du A_{2A}R induiraient une augmentation du signal dopaminergique D₂, constituant ainsi une stratégie thérapeutique pour la MP (**Figure 15**). L'effet protecteur serait lié à une modification de la neuroinflammation de la substance noire via le blocage des récepteurs gliaux.⁽⁶⁴⁾

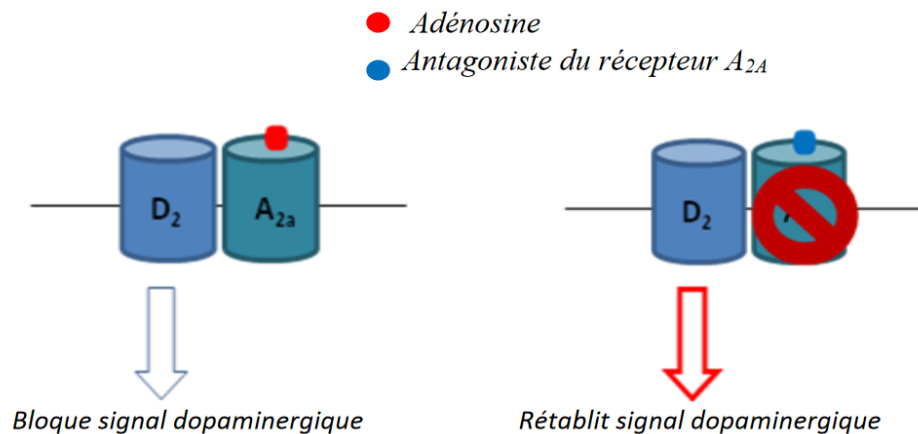


Figure 15. Action d'un agoniste ou d'un antagoniste du $A_{2A}R$ sur le signal dopaminergique⁽⁵⁶⁾

3.2 Maladie d'Alzheimer

En ce qui concerne la MA, les travaux réalisés par le Dr. David Blum au sein du Centre Lille Neurosciences & Cognition démontrent que le blocage sélectif du $A_{2A}R$ réduit les troubles mnésiques dans des modèles transgéniques mimant la pathologie amyloïde ou la pathologie Tau⁽⁶¹⁾. Les améliorations semblent être associées à une réduction de la charge lésionnelle (plaques amyloïdes et hyperphosphorylation de Tau) et à la neuroinflammation associée. Il a été montré également une diminution de la phosphorylation de la protéine Tau dans des modèles cellulaires et animaux traités à la caféine. ^(61,65)

Ces études soutiennent non seulement que $A_{2A}R$ est une cible thérapeutique d'intérêt dans le cadre de la MA, mais suggèrent également que les récepteurs A_{2A} sont impliqués dans le développement physiopathologique de la maladie. Les effets bénéfiques de la caféine et des antagonistes du $A_{2A}R$ semblent être attribués à une diminution de l'activité d' $A_{2A}R$ dérégulée. En effet, les cerveaux de patients atteints de la MA mais aussi les modèles mimant cette pathologie sont caractérisés par une surexpression de ces récepteurs au niveau des neurones ou des astrocytes. ⁽⁶⁶⁾

Pour conclure, le blocage du A_{2A}R dans les modèles de la MP et de la MA semble donc avoir des effets plurimodaux ciblant différents processus conduisant aux troubles moteurs et cognitifs associés à ces pathologies.

4. Des antagonistes du récepteur A_{2A} en phases cliniques

Historiquement, les antagonistes du récepteur A_{2A} peuvent être subdivisés en deux familles : les dérivés dits « xanthines-like » et les dérivés dits « non xanthines-like ». Les dérivés « xanthines-like » sont issus de la caféine et ont conduit au développement des premiers antagonistes du A_{2A}R (**Figure 16**).

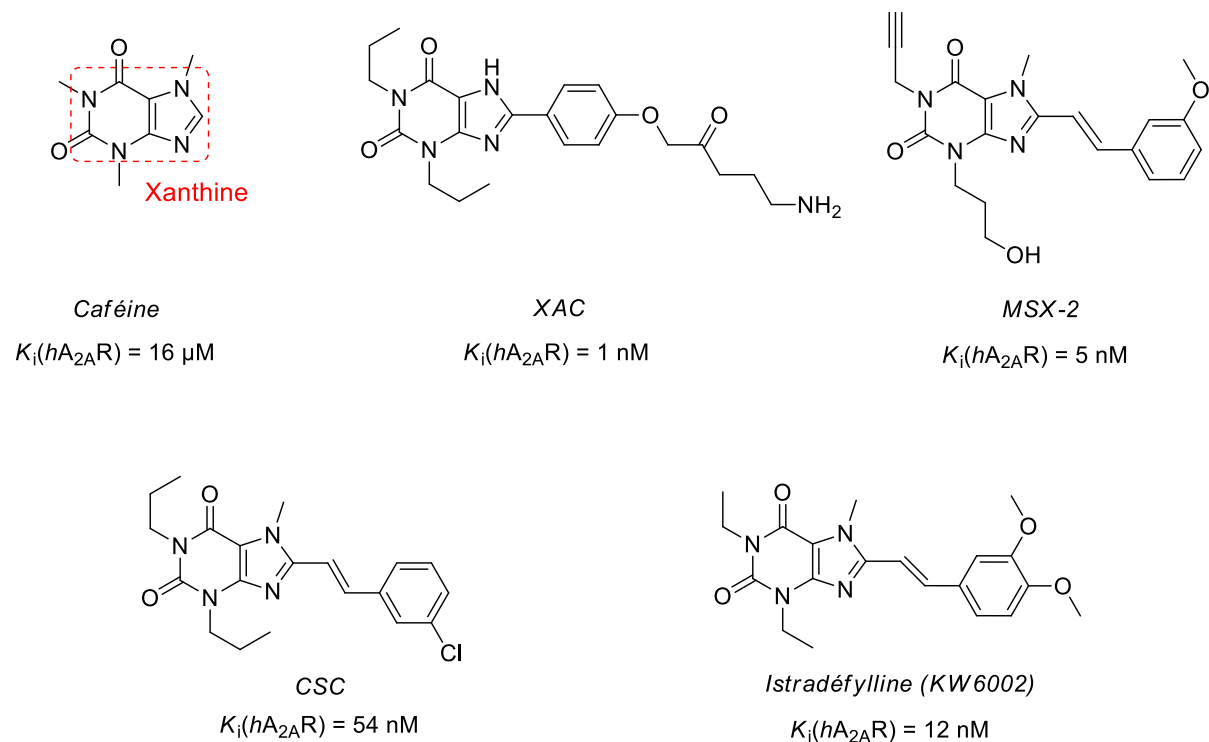


Figure 16. Exemples d'antagonistes du A_{2A}R de type « xanthines-like »

Figure adaptée de Romain Duroux⁽⁵⁶⁾

Pendant, ils ont montré des limites communes en termes de propriétés pharmacocinétiques et notamment en termes de solubilité.⁽⁶⁷⁾

Par conséquent, les efforts de la recherche se concentrent actuellement autour du développement d'autres structures qui constituent les dérivés « non xanthines-like ». Ces derniers s'articulent, de manière générale, autour de divers hétérocycliques polyazotés (purines, thiénoypyrimidines, benzothiazoles, pyridines, pyrazines...etc.) comme illustrés en **figure 17**.

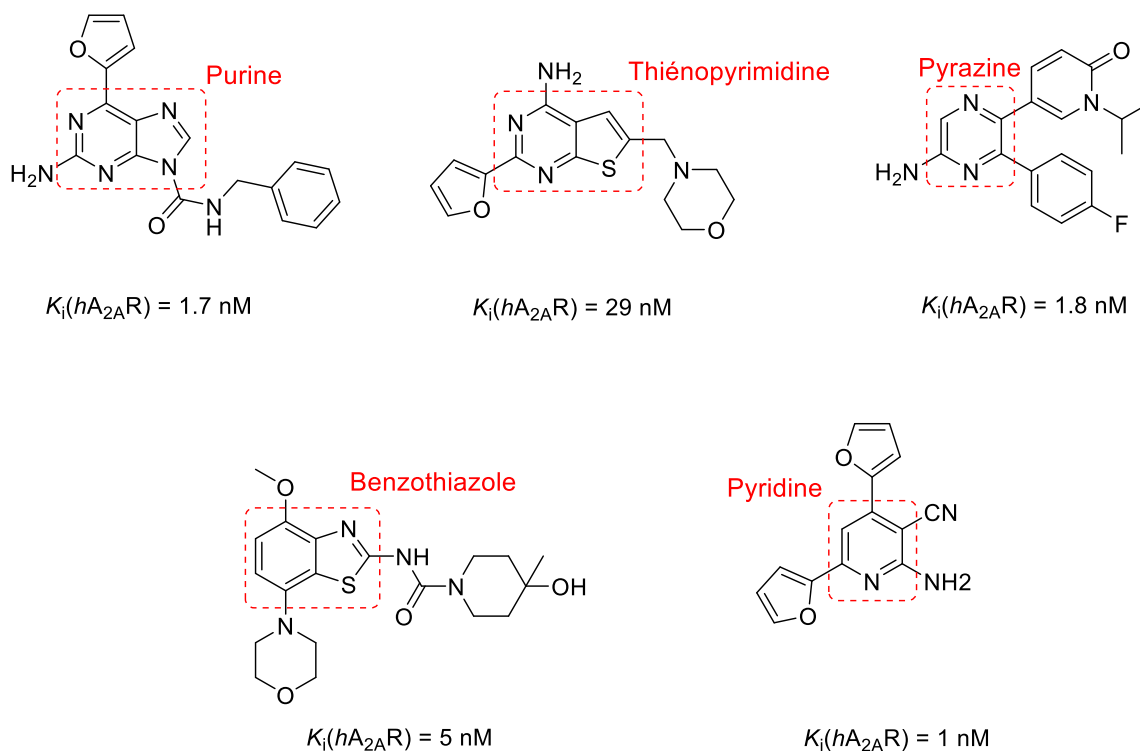


Figure 17. Exemples d'antagonistes du $A_{2A}R$ de type « non xanthines-like »

À ce jour, et dans le cadre de la MP, les résultats prometteurs obtenus pour certains antagonistes du $A_{2A}R$ dans des modèles animaux ont conduit certains d'entre eux jusqu'aux phases cliniques. Certains de ces composés sont rapportés dans la **figure 18**, ci-après. Si certains de ces composés (Istradéfylline, Préladenant, Tozadénant, Vipadénant et ST-1535) ont atteint les phases cliniques, des problèmes d'efficacité (Préladenant) voire de toxicité (Vipadénant et Tozadénant) ont été soulevés.^(68,69) Concernant l'Istradéfylline, ce dernier est commercialisé au Japon depuis 2012 et a été approuvé récemment en août 2019 par la FDA.⁽⁷⁰⁾ Il permet d'atténuer les périodes « off », c'est-à-dire des périodes de blocage ou de mouvements involontaires chez les patients sous L-DOPA.⁽⁷¹⁾

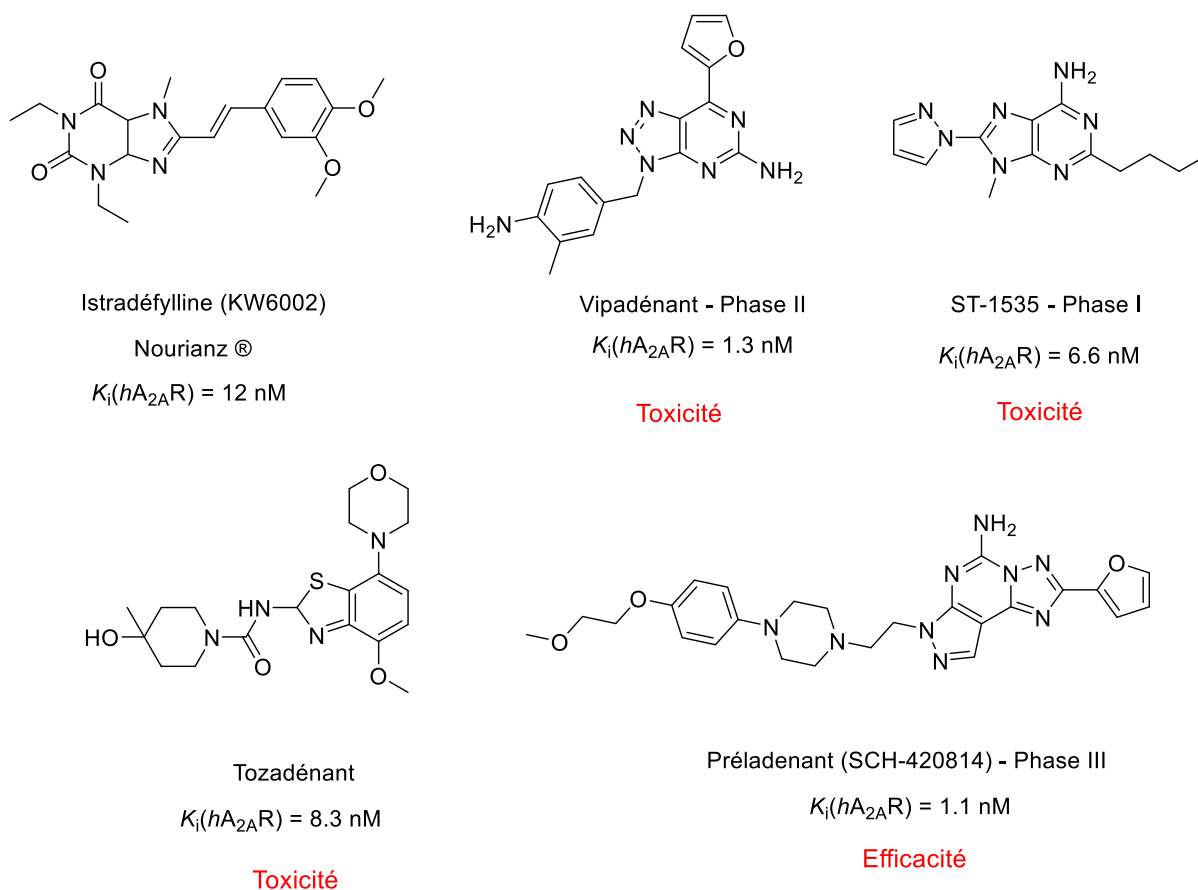


Figure 18. Exemples d'antagonistes du $A_{2A}R$ présentés en phases cliniques pour la MP

Les composés « xanthines-like » et « non xanthines-like » nous montrent ainsi le besoin de concevoir de nouvelles structures chimiques capables de combiner affinité et propriétés pharmacocinétiques satisfaisantes. C'est dans cette optique que le laboratoire s'intéresse à la conception de nouveaux ligands antagonistes du $A_{2A}R$, en se basant sur des squelettes innovants susceptibles d'induire des propriétés pharmacocinétiques intéressantes, tout en conservant une bonne affinité pour le récepteur. Différentes équipes de recherche ont publié la structure cristalline du $A_{2A}R$ co-cristallisée en présence d'un antagoniste contribuant ainsi largement au développement de nouveaux ligands antagonistes.

5. Structures co-cristallisées du récepteur A_{2A}

Pour rappel, le récepteur A_{2A} appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Par conséquent, il est constitué de 7 domaines transmembranaires (TM1-7), un domaine *N*-terminal (extracellulaire) et un domaine *C*-terminal (intracellulaire) (**Figure 19**).

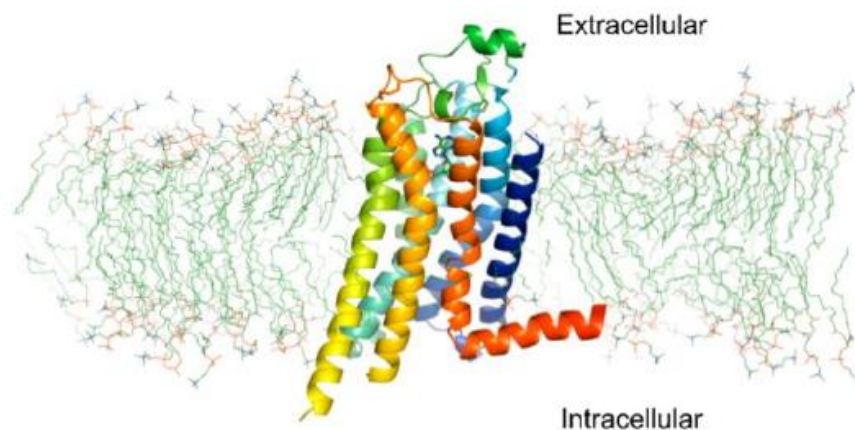


Figure 19. Structure co-cristallisée de l'adénosine au sein du récepteur hA_{2A}⁽⁷²⁾

Les domaines transmembranaires sont constitués d'hélices α , chacune composée de 20 à 27 acides aminés. Ces domaines transmembranaires sont également liés entre eux par 6 boucles (3 intracellulaires et 3 extracellulaires). Le site de liaison orthostérique se trouve entre les domaines transmembranaires 5 et 7. Enfin, la longueur des domaines *N*-terminal, *C*-terminal et des boucles qui lient les domaines transmembranaires permettent de distinguer structurellement les différents récepteurs à l'adénosine.⁽⁷²⁾

Aujourd'hui, on recense près d'une cinquantaine de structures co-cristallisées du A_{2A}R référencées dans la PDB (Protein Data Bank) avec près de 20 ligands différents. En raison de leurs multiples conformations et de leur grande flexibilité, il existe différentes techniques pour améliorer la stabilité des RCPGs tout en gardant leur structure tridimensionnelle lors d'études cristallographiques. On retrouve principalement l'utilisation de mutations ponctuelles et dirigées dans le but de stabiliser thermodynamiquement le récepteur ou des stratégies de fusion au lysozyme T4 (T4L)⁽⁷³⁾ (**Tableau 3**). Cette dernière technique, très largement utilisée, consiste en l'insertion d'un domaine structuré au niveau des domaines transmembranaires 5

et 6, et plus particulièrement au niveau de la boucle intracellulaire 3. Ce domaine permet d'augmenter la surface hydrophile du récepteur mais aussi de réduire sa flexibilité, facilitant ainsi la cristallisation du complexe.

Ligand	Nature	Technique utilisée	Code PDB
ZM-241385	Antagoniste	Fusion lysozyme T4 ⁽⁷⁴⁾	3EML
Caféine	Antagoniste	Mutations thermostabilisantes (8) ⁽⁷⁴⁾	3RFM
Adénosine	Agoniste	Mutations thermostabilisantes (5) ⁽⁷⁴⁾	2YDO
CGS-21680	Agoniste	Mutations thermostabilisantes (5) ⁽⁷⁴⁾	4UG2

Tableau 3. Exemples des techniques de cristallisation employées pour le récepteur hA_{2A}

À l'aide de cette stratégie de fusion au lysozyme T4 (**Tableau 3**), Jaakola *et al.*⁽⁷⁵⁾ ont publié la structure co-cristallisée du récepteur A_{2A} (résolution de 2.6 Å) avec le ZM-241385 (PDB : 3EML), un antagoniste de haute affinité. Par la suite, les travaux de Congreve *et al.*⁽⁷⁶⁾ ont conduit à l'obtention d'une autre structure co-cristallisée (PDB : 3UZC) avec un ligand de type triazine (T4E) d'une résolution de 3.3 Å (**cf. Figure 20, p31**).

À partir de ces deux structures cristallographiques et dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme de modélisation moléculaire de la Faculté de Pharmacie de Lille, des études ont été réalisées par le Dr. Nicolas Renault (LIRIC UMR 995 – Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol). Il s'est avéré que le ligand triazine T4E, plus volumineux que le ZM-241385 qui est de forme linéaire, se positionne dans une poche de liaison plus large (**Figure 20**). La structure cristallographique du récepteur A_{2A} avec le ligand de type triazine est donc capable d'accommoder des ligands d'une plus grande diversité chimique. De surcroît, des études de docking ont pu montrer que l'on retrouvait la pose du ZM-241385, tout comme

celle d'autres antagonistes co-cristallisés, au sein de cette structure. Par conséquent, c'est cette structure cristallographique qui a été utilisée au sein du laboratoire pour la conception de nouveaux antagonistes du récepteur A_{2A}.

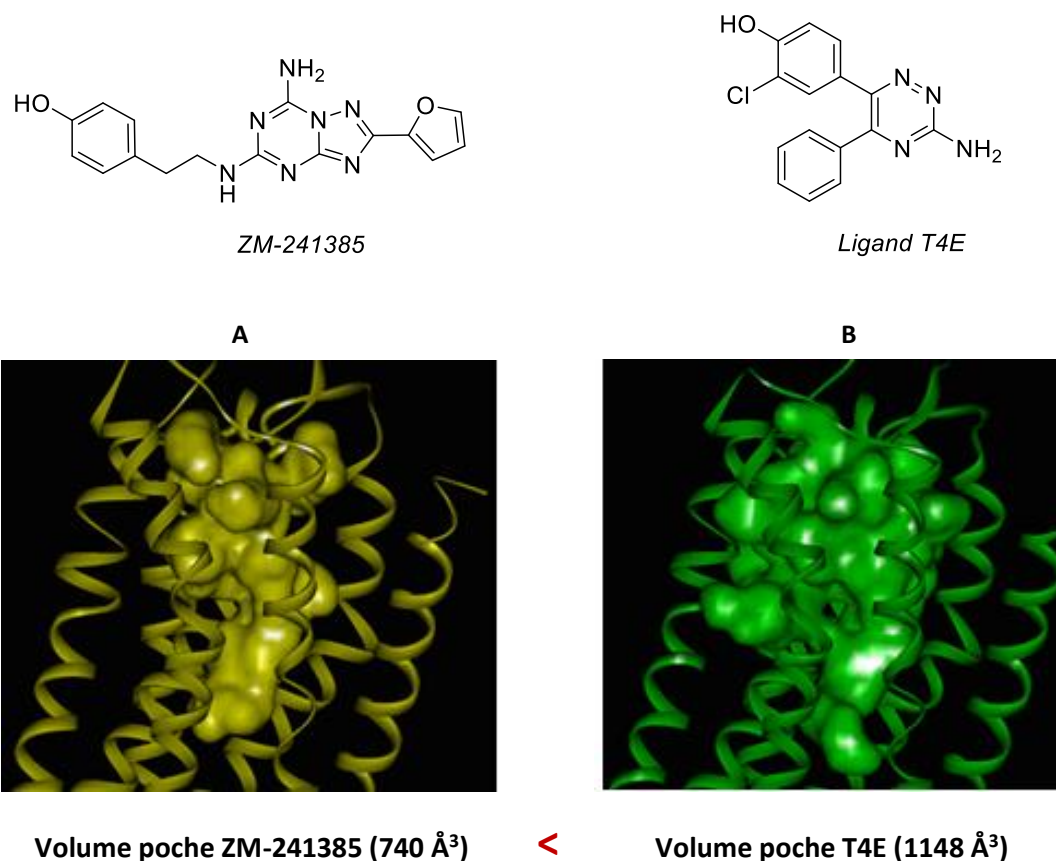


Figure 20. Comparaison des volumes des poches de liaison occupées par le ZM-241385 (A) et le ligand triazine (B)

Figure adaptée de Valeria Moas Heloïre⁽⁷⁷⁾

6. Pharmacophore des antagonistes du récepteur A_{2A}

La structure co-cristallisée du ZM-241385, associée à des études de mutagenèse dirigée⁽⁷⁸⁾, a permis de mettre en évidence les différents acides aminés clés dans le cadre de son interaction avec le récepteur A_{2A} (**Figure 21**).

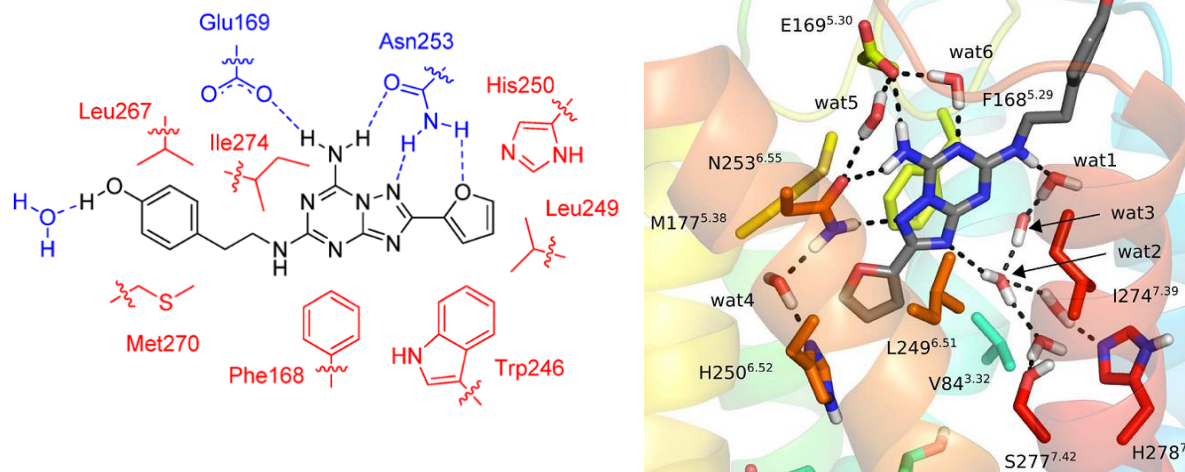


Figure 21. Mode de liaison du ZM-241385 au sein du récepteur hA_{2A} ^(72,79)

À la lecture de la **figure 21**, l'hétérocycle tenseur triazolotriazine présente un panel d'interactions avec de nombreux acides aminés :

- Des interactions de type liaison hydrogène avec les acides aminés Asn²⁵³ et Glu¹⁶⁹, que cela soit par l'amine primaire aromatique ou l'hétérocycle polyazoté.
- Des interactions de type π -stacking entre l'hétérocycle et la Phe¹⁶⁸.
- Des interactions de type hydrophobe avec Ile²⁷⁴.

On observe également que le furane, présent au fond de la poche, exerce plusieurs interactions : de type liaison hydrogène avec l'Asn²⁵³ et de type hydrophobe avec le Trp²⁴⁶. Le rôle de l'Asn²⁵³ apparaît comme prépondérant dans la mesure où une perte totale de l'affinité est observée lorsque celui-ci est remplacé par une alanine.⁽⁷²⁾

Enfin, la partie phénolique du ZM-241385 vient se positionner dans la région extracellulaire du récepteur. Elle interagit de manière hydrophobe avec les acides aminés Leu²⁶⁷ et Met²⁷⁰ ainsi que par liaison hydrogène avec une molécule d'eau. Il est à noter que cette région extracellulaire n'est pas explorée par tous les antagonistes rapportés du récepteur A_{2A} . C'est pourquoi interagir avec des acides aminés présents dans cette région peut

s'avérer être la source de nouveaux ligands innovants en termes d'affinité mais également en termes de sélectivité.

En effet, il est à noter que les récepteurs à l'adénosine présentent une séquence d'acides aminés relativement bien conservée. Le récepteur A_{2A} présente près de 50 % d'acides aminés communs avec A_{1R}, 60 % avec A_{2B}R et 40 % avec A_{3R}.⁽⁷²⁾ La plupart des acides aminés, qui ont été cités précédemment, sont conservés pour les quatre récepteurs à l'adénosine. Cependant, les travaux de modélisation moléculaire effectués lors de la thèse de Romain Duroux (2014-2017) ont permis l'identification d'un cluster acide présent uniquement au sein du A_{2A}R.⁽⁵⁶⁾ Ce dernier est situé dans la région extracellulaire et est caractérisé par la présence des acides aminés Glu¹⁶⁹ et Asp¹⁷⁰ (**Figure 22**). Ainsi, des ligands interagissant avec ces acides aminés pourraient être bénéfiques pour acquérir une potentielle sélectivité vis-à-vis des autres récepteurs à l'adénosine.

Cluster acide (Glu¹⁶⁹ et Asp¹⁷⁰)

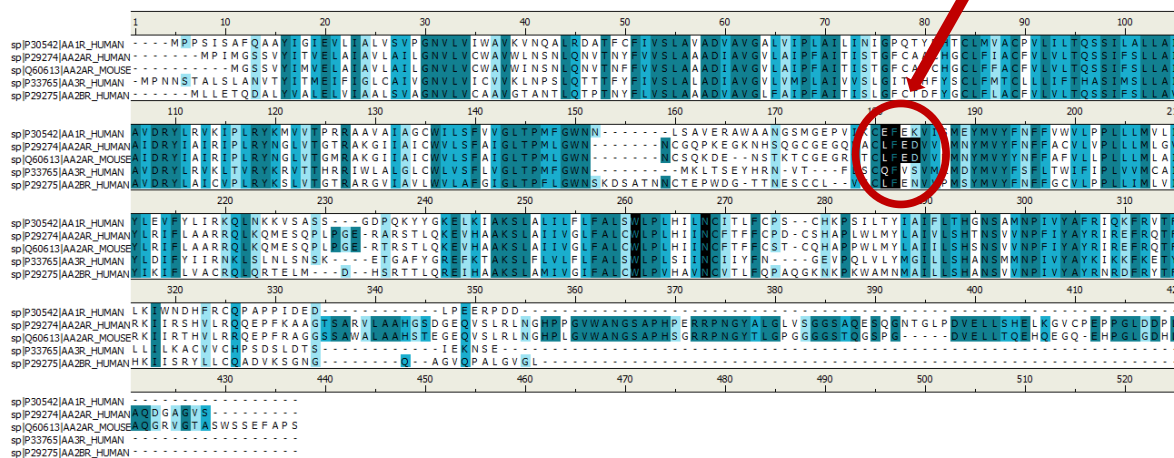


Figure 22. Identification d'un cluster acide au sein du récepteur A_{2A}⁽⁵⁶⁾

L'ensemble des structures co-cristallisées existantes du A_{2A}R et leurs superpositions par des études de « docking » ont permis d'identifier différents éléments pharmacophoriques. Ceux-ci ont permis la constitution d'un modèle pharmacophorique rapporté en **figure 23** ci-après. Ainsi, la plupart des antagonistes du récepteur A_{2A} possèdent 4 régions pharmacophoriques distinctes.

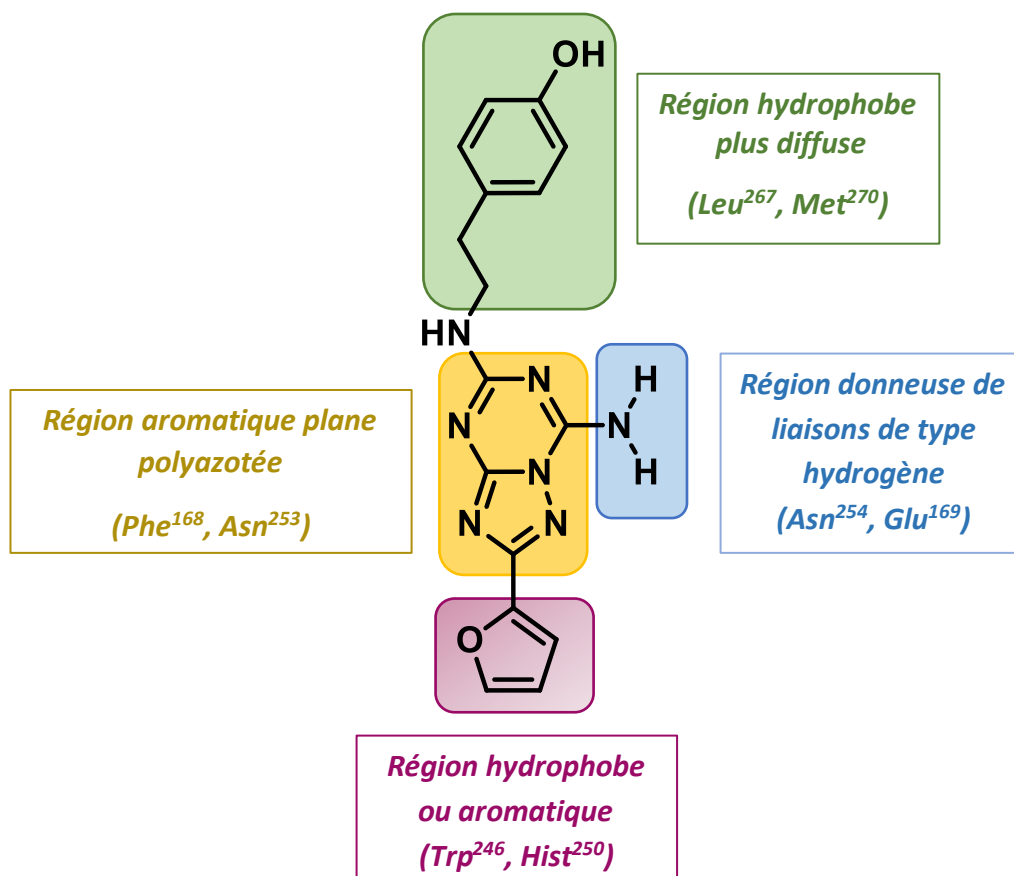


Figure 23. Modèle pharmacophorique des antagonistes du récepteur A_{2A} basé sur la structure du ZM-241385

V. Travaux antérieurs et objectifs des travaux de thèse

1. Travaux antérieurs

Dans le but de concevoir et de synthétiser des antagonistes originaux du A_{2A}R exempts des problèmes ADME rencontrés pour certains composés en phases cliniques (*cf.* **Figure 18, p28**), un criblage virtuel a été effectué. Ce criblage a été réalisé par le Dr. Nicolas Renault lors des travaux de thèse de Romain Duroux (2014-2017). Pour rappel, c'est la structure co-cristallisée du ligand triazine T4E (PDB: 3UZC) qui a servi de base à la conception car elle présente une poche de liaison pouvant s'accommoder d'une plus grande diversité chimique par rapport à celle du ZM-241385 (*cf.* **Figure 20, p31**).

Ce criblage virtuel a été réalisé à partir de 60 000 composés issus de la Chimiothèque Nationale. L'application de différents filtres, préalablement établis et rapportés en **figure 24**, comme la présence d'au moins un cycle aromatique, d'éléments structuraux communs avec des antagonistes du A_{2A}R ou encore un faible poids moléculaire a permis d'identifier deux molécules « hit ».

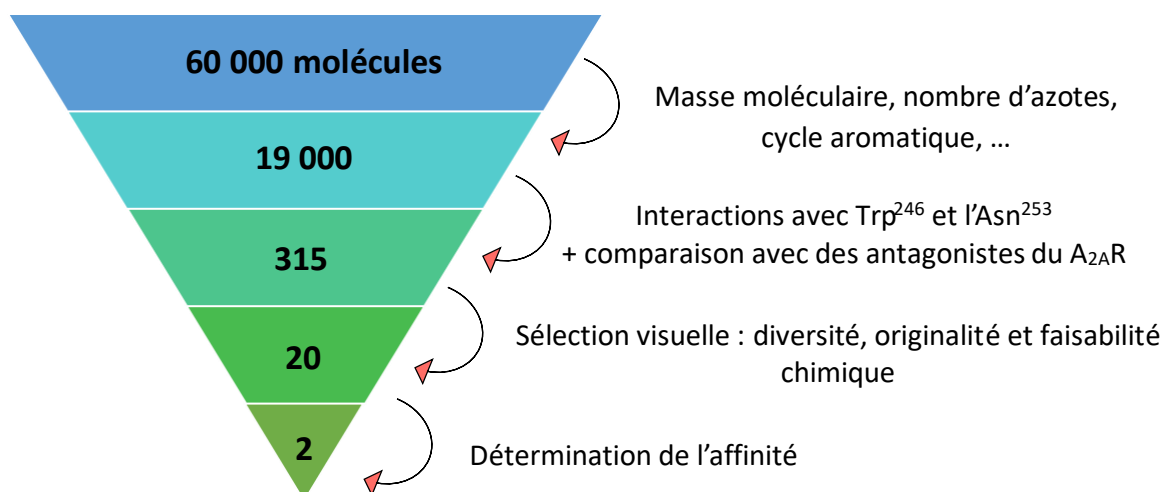


Figure 24. Criblage virtuel conduisant à l'identification de deux composés « hit »

Ces molécules (**A** et **B**, **Figure 25**), après évaluation *in vitro*, ont montré une affinité micromolaire pour le récepteur hA_{2A}. Elles s'articulent respectivement autour d'un cycle tenseur quinazolinique (**A**, **Figure 25**) et benzofuranique (**B**, **Figure 25**).

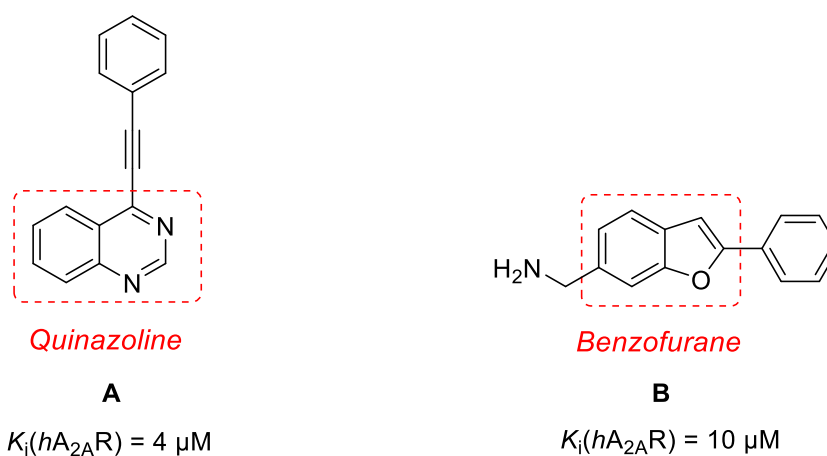


Figure 25. Structures des composés « hit » identifiés par criblage virtuel

2. Objectifs des travaux de thèse

Le premier volet de mes travaux de thèse a consisté à développer et à étudier les relations structure-affinité (RSA) autour des deux squelettes identifiés : quinazolinique et benzofuranique (**cf. Figure 25, p35**). Par la suite et basé sur les RSA obtenues autour du squelette quinazolinique, le deuxième volet de mes travaux a consisté à développer une stratégie de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅.

Une fois conçues grâce à la modélisation moléculaire, les molécules synthétisées ont été évaluées vis-à-vis de ces deux récepteurs. Pour cela, la mise au point et la validation de différents tests pharmacologiques ont été nécessaires.

Un cahier des charges a été établi dans le cadre de ces travaux de thèse. Concernant le récepteur A_{2A}, le premier objectif est d'obtenir des composés antagonistes d'affinité nanomolaire. Le second objectif est d'apporter à ces ligands de bonnes propriétés pharmacocinétiques (notamment la solubilité). En effet, la solubilité est une propriété qui est déficiente dans un grand nombre d'antagonistes du A_{2A}R (**cf. Figure 16, p26**). Enfin, la sélectivité de nos ligands devra également être évaluée. Cependant, elle ne constitue pas actuellement un obstacle à nos travaux dans la mesure où on rapporte de nombreux effets bénéfiques *in vivo* de ligands mixtes A_{2A}/A₁. L'objectif à terme est donc d'obtenir des composés suffisamment intéressants en termes d'affinité et de propriétés ADME pour pouvoir être évalués *in vivo* (passage de la BHE et tests comportementaux). L'équipe du Dr. David Blum possède une expertise reconnue mondialement dans le domaine des récepteurs adénosinergiques et des MNDs. De plus, plusieurs modèles animaux permettant de valider les molécules d'intérêt obtenues sont disponibles.

La stratégie de ligands mixtes ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅ est pour la toute première fois étudiée au sein de notre laboratoire et, à ce jour, cette stratégie n'est pas encore rapportée dans la littérature. Par conséquent, et dans un premier temps, notre objectif est d'identifier des composés « hit » présentant une affinité duale intéressante pour ces deux récepteurs.

Ainsi, le manuscrit de thèse qui vous est présenté est composé de quatre chapitres :

- Le **chapitre 1** sera consacré à l'étude du composé « hit » benzofuranique. La première partie de ce chapitre abordera les études de modélisation moléculaire qui m'ont permis d'identifier les positions et la nature des pharmacomodulations pouvant être effectuées autour de cet hétérocycle (**Figure 26**). La deuxième partie de ce chapitre sera dédiée aux travaux de synthèse et à l'évaluation pharmacologique de certains composés.

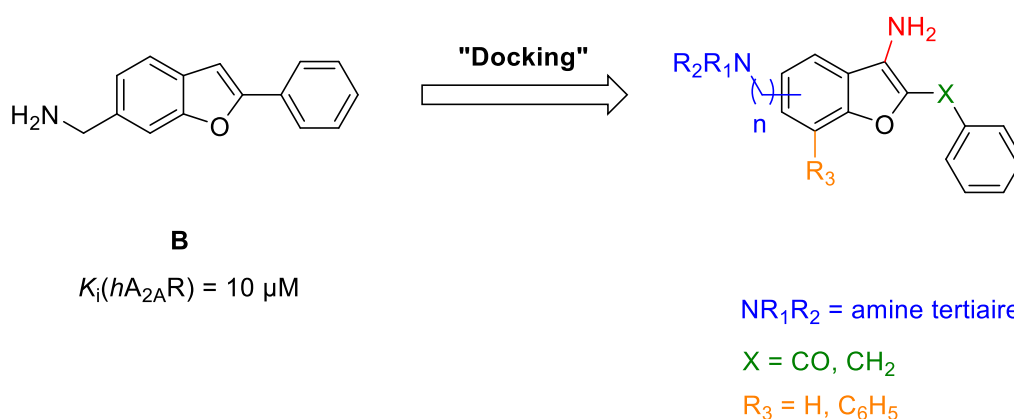


Figure 26. Modulations envisagées autour du « hit » benzofuranique

- Le **chapitre 2** sera, quant à lui, consacré à l'étude du composé « hit » quinazolinique. Les travaux antérieurs effectués par Romain Duroux et auxquels j'ai participé durant mon stage de Master 2 seront présentés. À la suite de l'identification d'un composé chef de file, les travaux réalisés autour de celui-ci seront détaillés (**Figure 27**). De la même manière que pour le chapitre 1, les études de modélisation moléculaire ainsi que l'évaluation pharmacologique des composés synthétisés vous seront présentées.

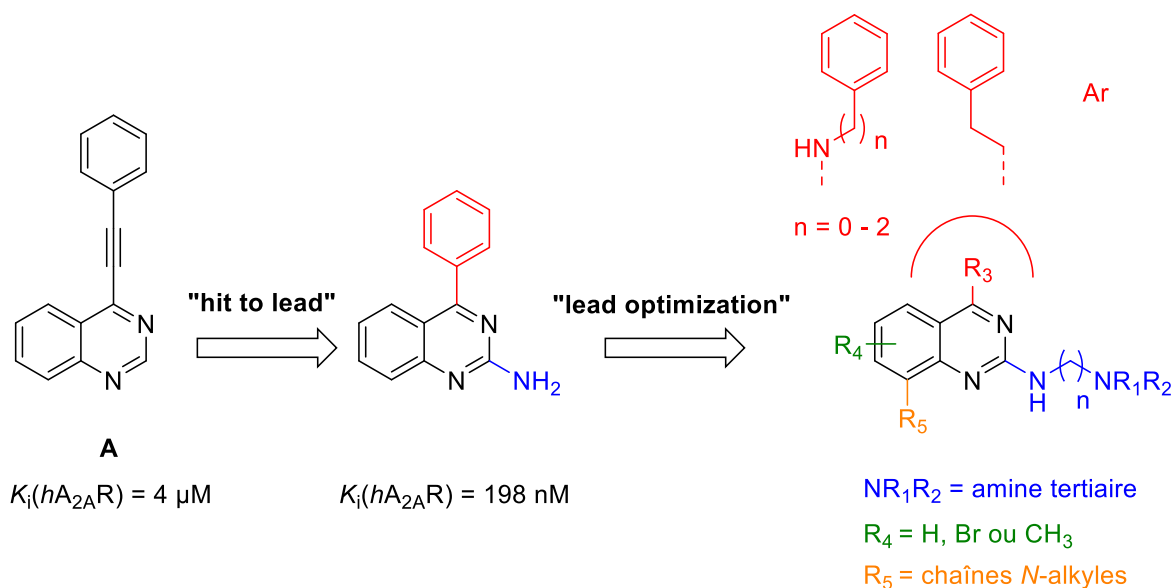


Figure 27. Modulations envisagées autour du « hit » quinazolinique

- Le **chapitre 3** abordera le développement de la stratégie multifonctionnelle visant les récepteurs A_{2A} et $m\text{Glu}_5$. Pour rappel et comme énoncée précédemment dans le cadre de l'introduction de ce manuscrit (**cf. p18**), la stratégie multifonctionnelle est une nouvelle stratégie thérapeutique actuellement développée dans le cadre des MNDs. Ainsi, son principe, le rationnel du projet ainsi que la synthèse et l'évaluation pharmacologique de premières molécules à visée mixte seront décrits.
- Enfin, ce manuscrit de thèse se clôturera par le **chapitre 4**. Ce chapitre présentera les tests d'affinité des composés que j'ai dû mettre en place, pour tester les composés développés pour les récepteurs A_{2A} et $m\text{Glu}_5$. La mise en place du test de fonctionnalité du $A_{2A}R$ ainsi que ma participation à l'évaluation *in vivo* d'un composé quinazolinique précédemment synthétisé seront détaillées.

Conception par modélisation moléculaire

Durant les premiers mois de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'être formé à la modélisation moléculaire. Cette formation s'est effectuée sous la direction des Drs. Nicolas Renault et Maxime Liberelle. Elle a consisté en la maîtrise des logiciels suivants : *AutoDock*, *Chimera*, *Vina* et *Discovery Studio*. Elle m'a permis d'être rapidement autonome et efficace dans le but de concevoir de potentiels ligands des récepteurs A_{2A} et mGlu₅.

Ces premiers pas dans le domaine de la modélisation moléculaire m'ont permis de me familiariser avec les différentes structures co-cristallisées préexistantes de ces récepteurs. Ainsi, j'ai pu étudier le mode de liaison de plusieurs de leurs ligands cristallisés et la superposition de différentes structures m'a également permis de visualiser les différents acides aminés clés nécessaires à l'interaction. Pour concevoir de nouveaux ligands de ces récepteurs, j'ai pu réaliser différentes études *in silico* par « docking ». Plus précisément, pour chaque composé étudié, ces études m'ont permis d'établir une liste des modes de liaison probables au sein de ces récepteurs et d'évaluer leur relevance selon une fonction de « scoring ». De plus, la valeur RMSD (Root-Mean-Square Deviation) a été considérée afin d'avoir une idée de l'écart moyen entre les différentes poses. Concernant le récepteur A_{2A}, les travaux de conception autour du cycle tenseur benzofuranique et quinazolinique ont été menés sur la structure co-cristallisée du ligand triazine T4E. Pour rappel, cette dernière permet d'accommoder une plus grande diversité structurale comparée à la structure co-cristallisée du ZM-241385. Au cours de mes travaux, les poses « docking » sélectionnées et qui vous sont présentées dans ce manuscrit sont celles pour lesquelles les fonctions de scores étaient les plus élevées ou qui avaient une pose similaire à un ligand cristallisé.

Cette capacité à pouvoir effectuer tout au long de ma thèse mes propres études de modélisation moléculaire de façon régulière et autonome m'a permis de concevoir de potentiels ligands des récepteurs A_{2A} et mGlu₅. De plus, la mise en place des tests d'affinité des composés pour ces récepteurs (**cf. Chapitre 4**) m'a donné la possibilité d'infirmier ou non certains modes de liaison.

Chapitre 1 :

La famille des benzofuranes

I. Conception par modélisation moléculaire

Aujourd'hui, on recense de nombreux antagonistes du A_{2A}R développés autour d'un cycle tenseur polyazoté (**Figure 28**).

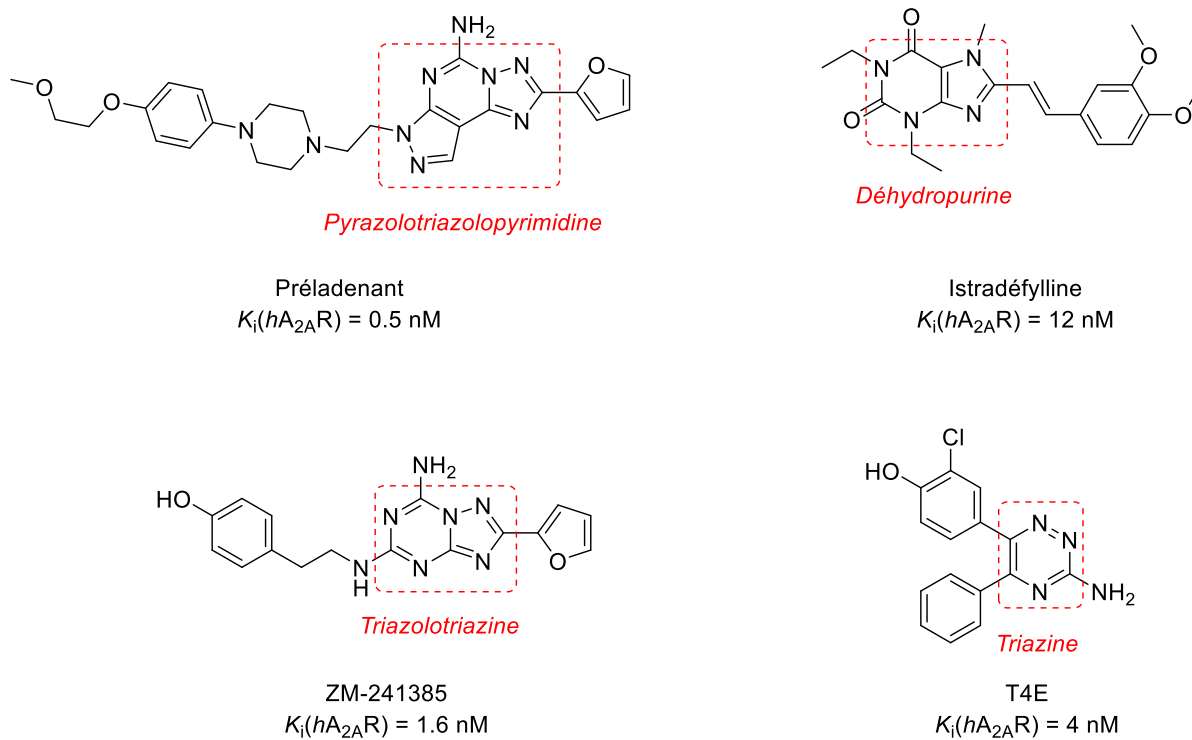


Figure 28. Exemples d'antagonistes du A_{2A}R développés autour d'un cycle tenseur polyazoté

Figure adaptée de Romain Duroux *et al.*⁽⁸⁰⁾

Dans le but de concevoir et de synthétiser des antagonistes originaux, nous nous sommes intéressés à la famille des benzofuranes dont un « hit » a récemment été identifié au sein de notre laboratoire (*cf.* **Figure 25, p35**).

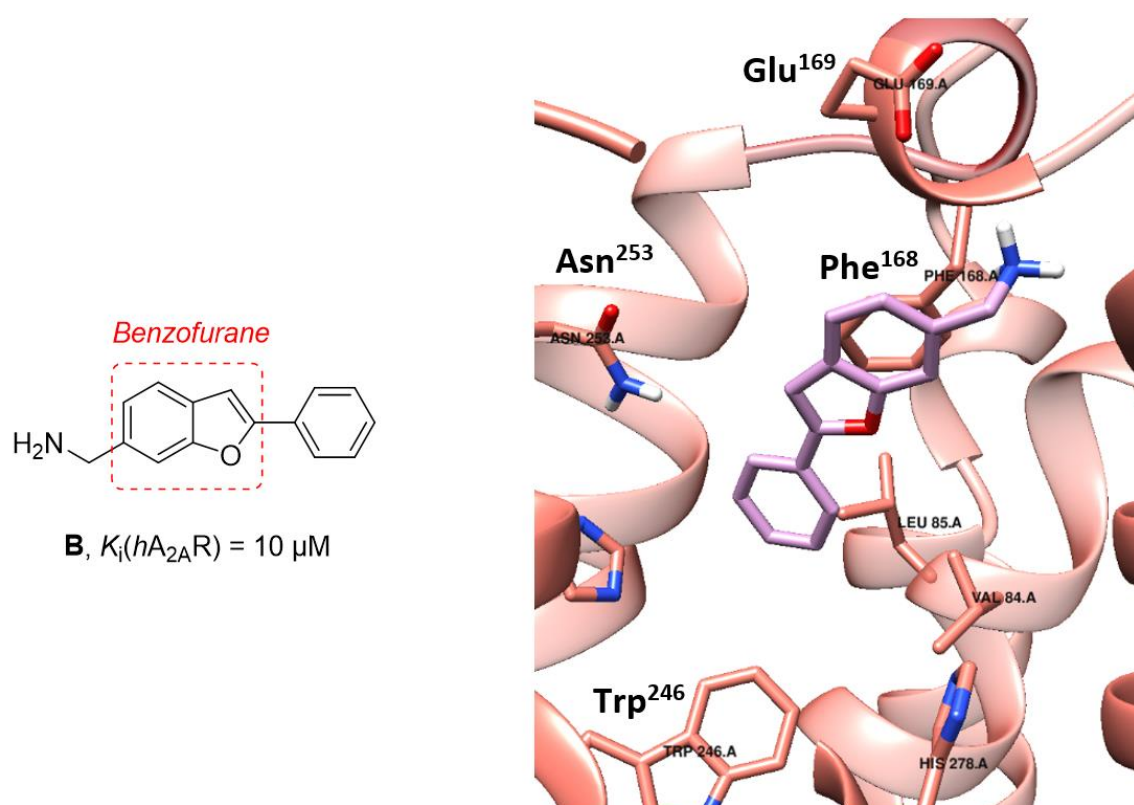


Figure 29. Structure du « hit » benzofuranique et sa pose docking sélectionnée au sein du récepteur hA_{2A} (PDB : 3UZC)

D'après la **figure 29**, notre composé « hit » interagirait au sein du récepteur avec plusieurs acides aminés : la Phe¹⁶⁸ par des interactions de type π -stacking avec le cycle tenseur benzofuranique et le Trp²⁴⁶ par interaction hydrophobe avec le groupement phényle. Les études de docking réalisées ne m'ont pas permis d'identifier d'interactions particulières avec l'amine aliphatique.

Guidé par ce mode de liaison pour notre composé « hit », nous avons envisagé de moduler sa structure afin d'une part, d'améliorer les interactions entre ce ligand et le récepteur et d'autre part, de moduler ses caractéristiques pharmacocinétiques.

Par conséquent, une première partie de mon travail a consisté à effectuer des études de modélisation moléculaire plus approfondies autour de cette structure benzofuranique. Les travaux réalisés ont été guidés par le modèle pharmacophorique des antagonistes des récepteurs A_{2A} (**cf. Figure 23, p34**) et par la structure co-cristallisée du ligand triazine T4E

(PDB : 3UZC). Pour rappel, cette structure présente un site de liaison pouvant s'accommoder d'une plus grande diversité structurale par rapport à la structure co-cristallisée du ZM-241385 (cf. Figure 20, p31).

Ces travaux m'ont permis d'identifier les positions et la nature des pharmacomodulations pouvant être effectuées autour du composé « hit ». Elles sont rapportées dans la figure 30, ci-dessous, et conduisent à des structures benzofuraniques tri- ou tétra-substituées.

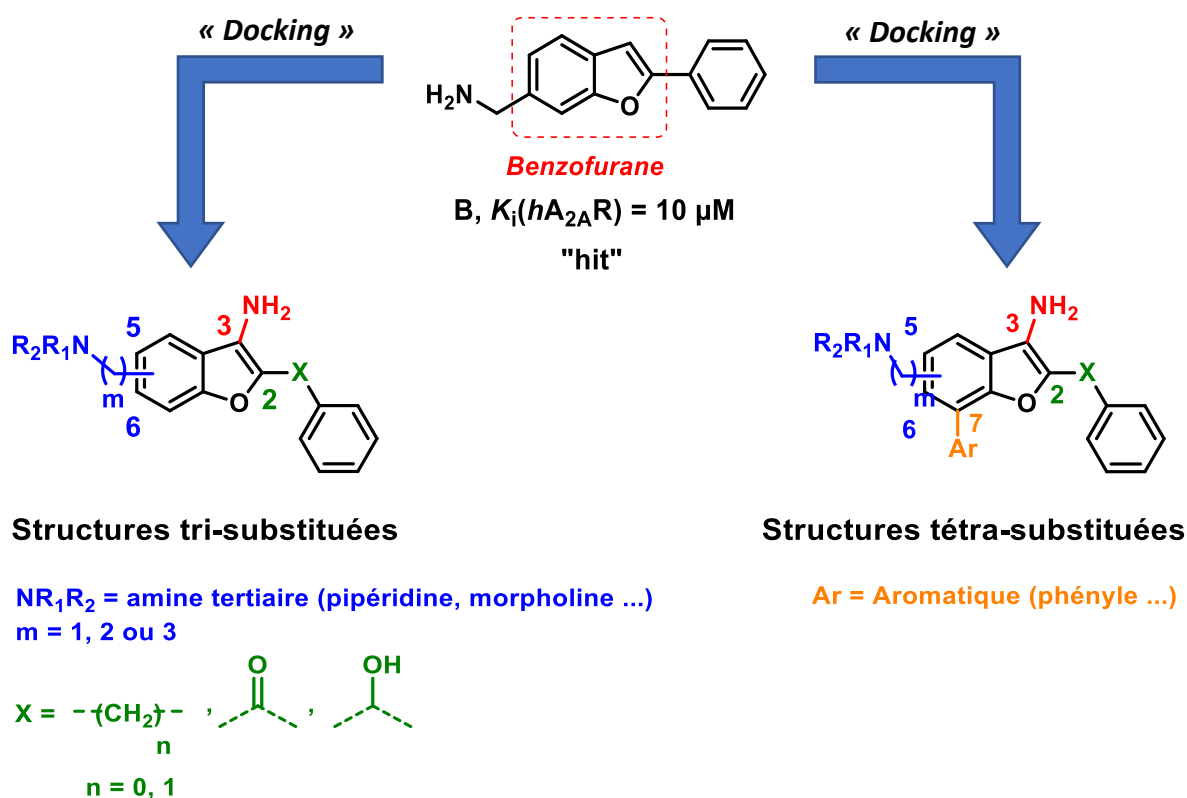


Figure 30. Modulations envisagées autour du « hit » benzofuranique

À la lecture de la figure 30, les études de modélisation moléculaire que j'ai pu réaliser m'ont permis de montrer l'importance des éléments suivants :

- **Une fonction amine primaire aromatique en position 3**

Cette modulation a été guidée par le fait que cette fonction amine est largement retrouvée dans de nombreux antagonistes du $A_{2A}R$ (Figure 31).

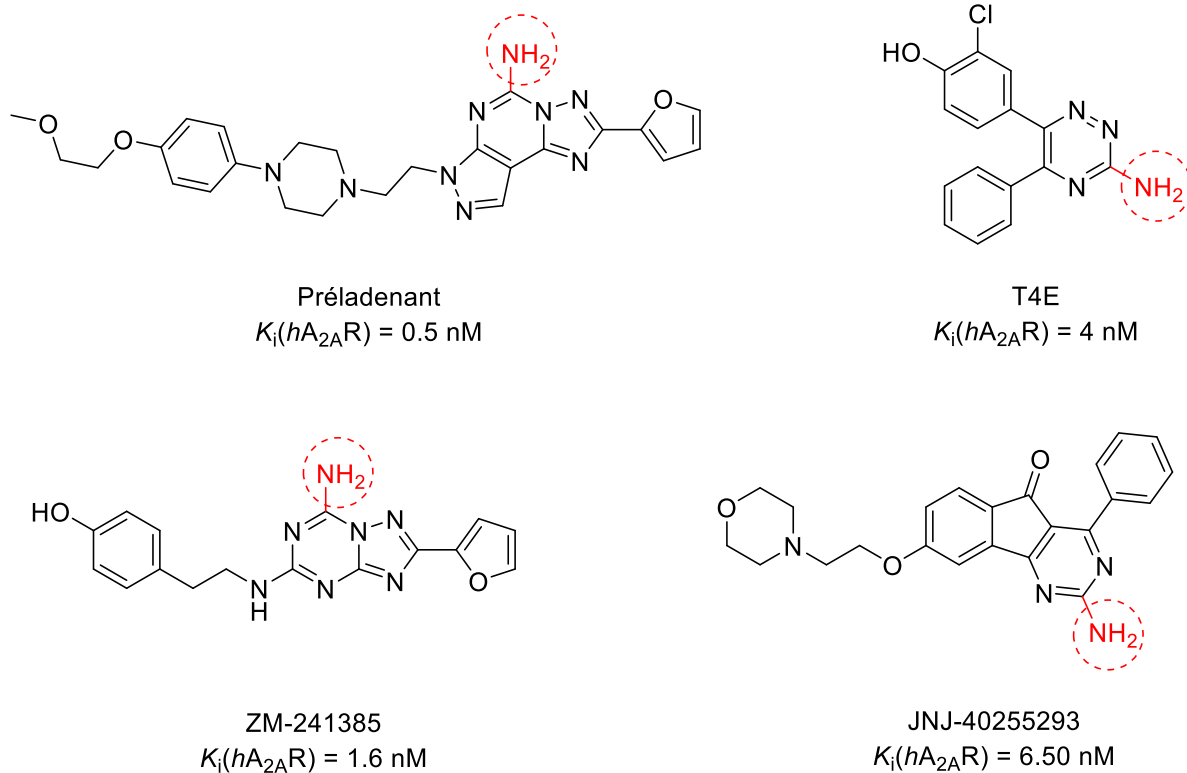


Figure 31. Exemples d'antagonistes du A_{2A}R présentant une fonction amine primaire aromatique

En effet, elle joue un rôle clé dans l'interaction ligand-récepteur dans la mesure où elle permet une interaction avec un acide aminé clé, à savoir l'Asn²⁵³, par liaison hydrogène (*cf. Introduction, p32*). La position optimale de cette fonction amine, d'après la modélisation moléculaire, serait la position 3 du cycle benzofurannique (**Figure 32**).

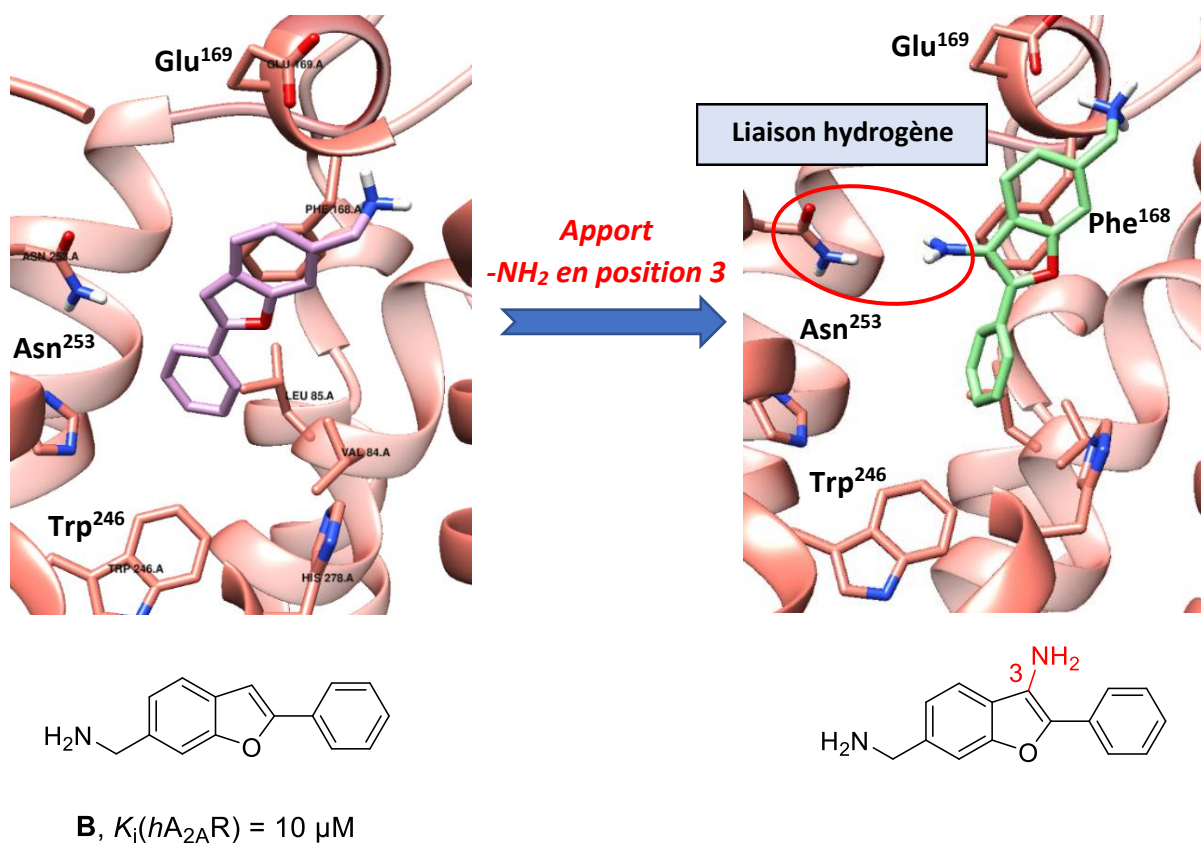


Figure 32. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'une fonction amine primaire aromatique en position 3

Ceci est d'autant plus intéressant, que chimiquement, la synthèse des 3-amino benzofuranes est beaucoup plus accessible que les analogues substitués en 2 par une amine primaire. En effet, ces derniers sont très instables et sont généralement retrouvés sous forme de carbamates.⁽⁸¹⁾

○ La nature du « linker » entre le phényle et l'hétérocycle benzofurane en position 2

Plusieurs types de « linker » ont été étudiés : alcane ($n = 0, 1$), cétone ou alcool secondaire. Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur un « linker » cétonique pour les raisons suivantes :

- Son accessibilité chimique et le fait qu'il puisse renforcer potentiellement l'interaction avec l'Asn²⁵³ en jouant le rôle d'accepteur de liaison hydrogène (**Figure 33**).

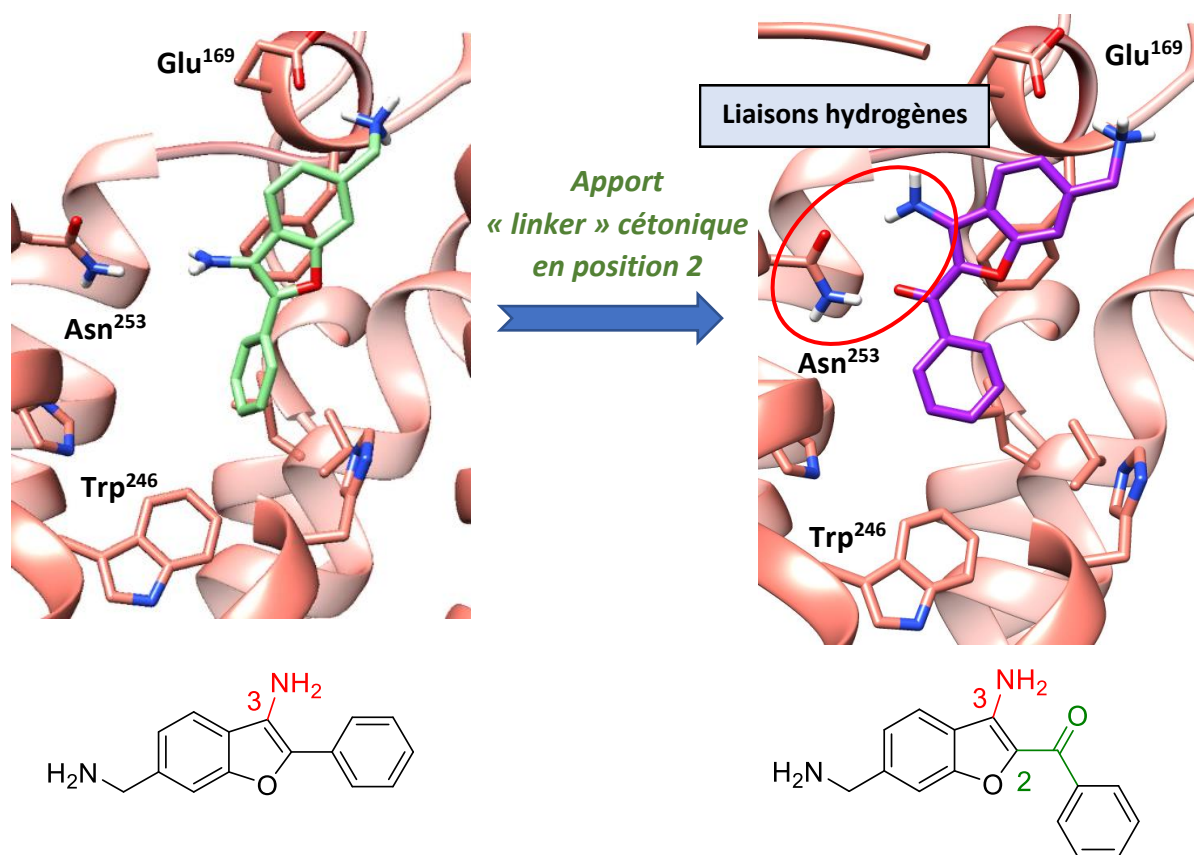


Figure 33. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'un « linker » cétonique en position 2

- Sa présence dans certains antagonistes sélectifs et de haute affinité des récepteurs A_{2A} et A₁ (**Figure 34**).^(82,83)

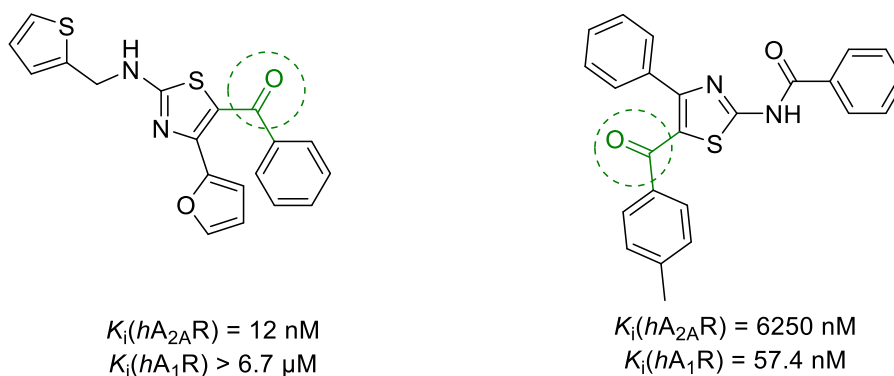


Figure 34. Exemples d'antagonistes sélectifs et de haute affinité des récepteurs A_{2A} et A₁ présentant un « linker » cétonique

➤ **Remarques :**

- En janvier 2020, les travaux d'Helena D. Janse van Rensburg et *al.*⁽⁸⁴⁾ ont mis en valeur la nature de ce « linker » cétonique sur des structures benzofuraniques. De façon similaire à notre approche, ces travaux ont consisté en la synthèse d'antagonistes sélectifs ou non des récepteurs A_{2A} et A₁. Les composés développés présentent un « linker » cétonique en position 2 (**Figure 35**). Cependant, ils présentent une affinité micromolaire pour A_{2A}R qui est probablement due à l'absence de la fonction amine primaire aromatique (*cf.* **Figure 31, p43**).

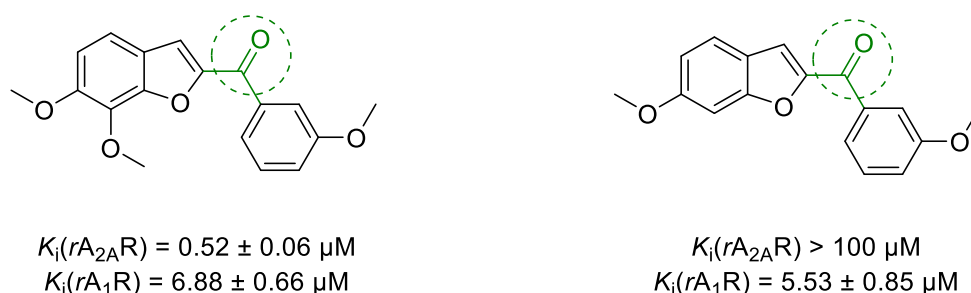


Figure 35. Exemples d'antagonistes des récepteurs A_{2A} et A₁ développés dans le cadre des travaux d'Helena D. Janse van Rensburg *et al.*⁽⁸⁴⁾

- En 2010, des composés benzofuraniques ont également été développés par la compagnie japonaise Kyowa Hakko Kirin en tant qu'antagonistes sélectifs des récepteurs A_{2A}. Ces composés présentent des effets prometteurs dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson.^(85,86) À la différence des travaux précédents, ils présentent un « linker » amide en position 2 (**Figure 36**). En revanche, ils ne présentent pas d'amine primaire aromatique.

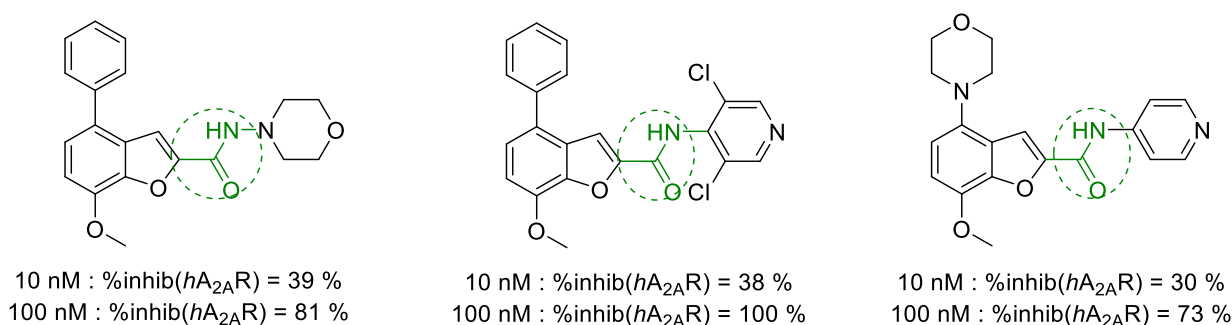


Figure 36. Exemples d'antagonistes sélectifs des récepteurs A_{2A} présentant un « linker » amide

○ Une chaîne alkyle amine (3 méthylènes)

La longueur, la nature et la position de la chaîne alkyle amine présente dans la structure de notre « hit » ont également été étudiées. La présence d'une amine tertiaire associée à une chaîne carbonée de 3 méthylènes en position 5 est apparue comme étant une modulation intéressante :

○ D'une part, pour pouvoir potentiellement interagir avec un acide aminé supplémentaire, le Glu¹⁶⁹, par interaction ionique (**Figure 37**). Comme rapporté dans l'introduction de ce manuscrit (**cf. p33**), le Glu¹⁶⁹ fait partie d'un cluster acide que l'on retrouve uniquement chez le récepteur A_{2A}. Par conséquent, interagir avec cet acide aminé pourrait être bénéfique pour améliorer la sélectivité de nos ligands par rapport aux autres récepteurs à l'adénosine.

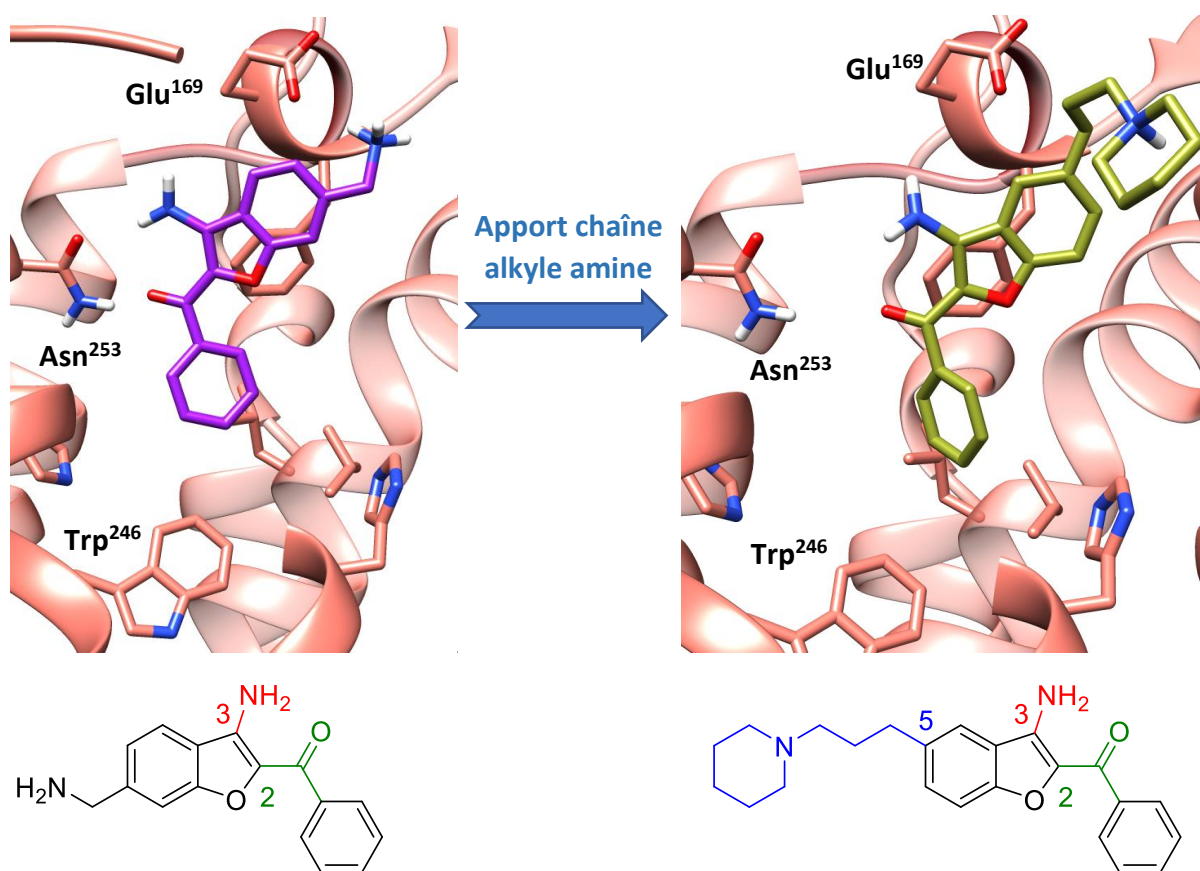


Figure 37. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'une chaîne alkyle amine

○ D'autre part, pour moduler les propriétés pharmacocinétiques et notamment la solubilité du fait de la présence d'une amine tertiaire salifiable. Pour rappel, des problèmes de solubilité ont été rencontrés pour un certain nombre d'antagonistes du récepteur A_{2A} (cf. Figure 16, p26).

○ Un groupement aromatique en position 7

L'apport d'un groupement aromatique, comme un phényle par exemple, m'a permis d'observer une meilleure disposition de nos ligands au sein du récepteur (Figure 38). En effet, on observe un meilleur ancrage de ces derniers en bas de la poche, ce qui permettrait de renforcer potentiellement l'interaction avec le Trp²⁴⁶ par interaction hydrophobe.

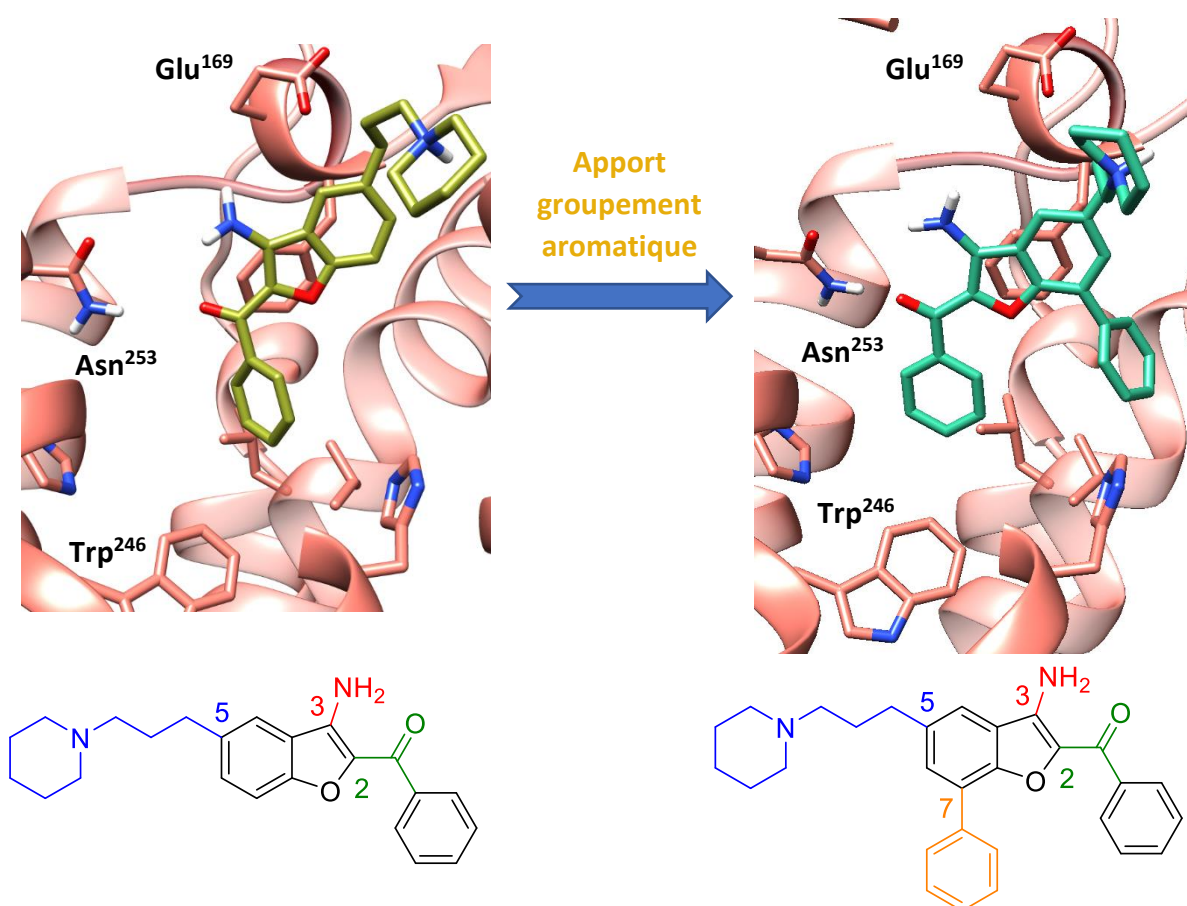
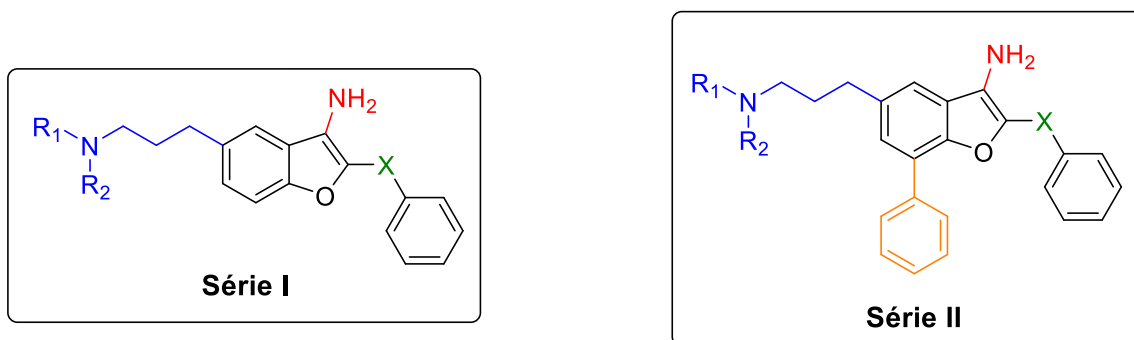


Figure 38. Poses docking sélectionnées de composés montrant l'impact d'un groupement aromatique en position 7

Le groupement phényle pourrait être à son tour diversement substitué pour pouvoir interagir avec certains acides aminés (His²⁷⁸, Ala⁶³, Ile²⁷⁴ et Val⁸⁴).

À la suite de mes travaux en modélisation moléculaire, une deuxième partie de mon travail a donc consisté à développer deux séries chimiques, représentées ci-dessous :



X = CO, CH₂

NR₁R₂ = amine tertiaire (pipéridine, morpholine, ...)

Figure 39. Représentation des séries benzofuraniques I et II

Les travaux de synthèse ont fait l'objet de nombreuses difficultés et à ce jour, les composés finaux de ces deux séries n'ont pas pu être synthétisés. Par conséquent, les différentes voies de synthèses envisagées, les problèmes chimiques rencontrés ainsi que les travaux d'optimisations menés seront décrits.

Dans un premier temps, pour parvenir aux composés de la **série I** et de la **série II**, un schéma rétrosynthétique a été établi et a permis d'identifier deux voies d'accès (**Schéma 1**).

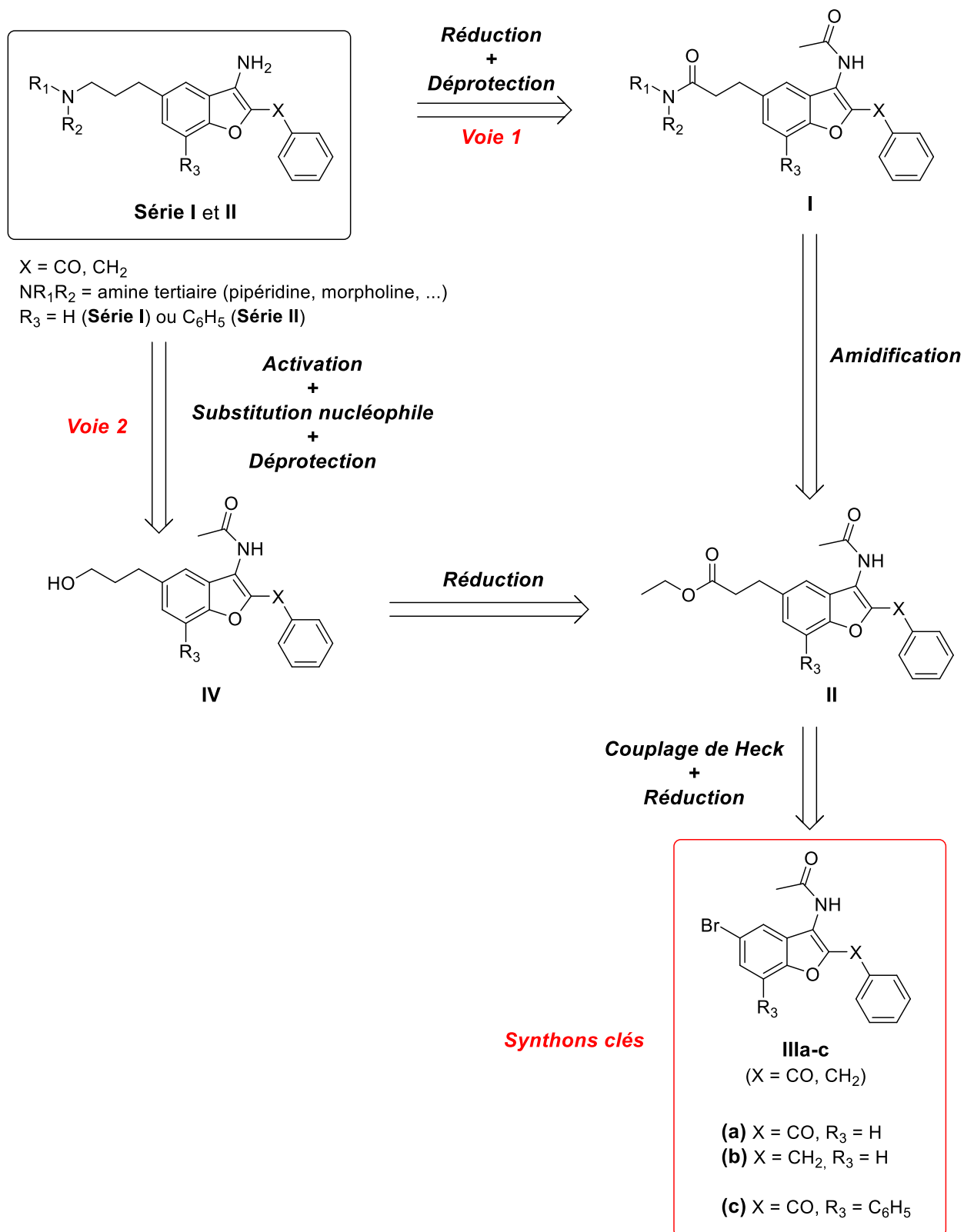


Schéma 1. Voies rétrosynthétiques élaborées dans le cadre des séries I et II

À la lecture du **schéma 1**, les composés des **séries I et II** peuvent être obtenus selon deux voies rétrosynthétiques :

○ **Voie 1**

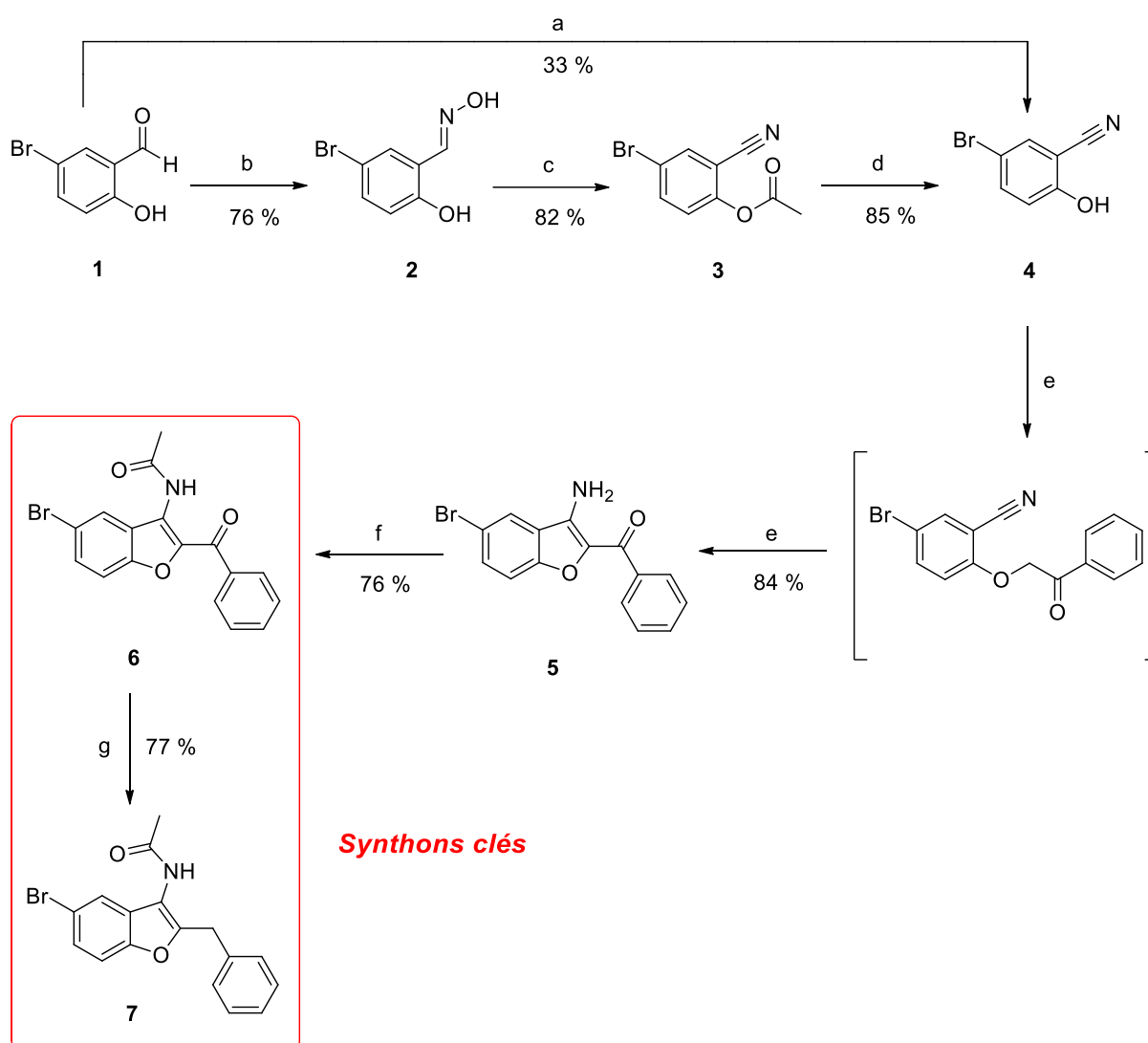
Cette voie permet l'obtention des composés des **séries I et II** à la suite d'une réduction de l'amide tertiaire (**I**). Ce dernier peut être obtenu par amidification de l'ester (**II**). L'ester (**II**) peut, quant à lui, être obtenu par une réaction pallado-catalysée de type Heck suivie d'une réduction à partir des synthons bromés clés (**IIIa-c**).

○ **Voie 2**

Cette voie permet l'obtention des composés cibles par activation de l'alcool (**IV**) suivie d'une réaction de substitution nucléophile. L'alcool (**IV**) peut, quant à lui, être obtenu par réduction de l'ester (**II**).

II. Synthèse des synthons clés de la série I

Les voies rétrosynthétiques précédemment établies pour parvenir aux composés de la **série I** (*cf.* **Schéma 1, p50**) nécessitent la synthèse de deux synthons clés **6** et **7**. Un schéma réactionnel permettant de les synthétiser a donc été mis au point (**Schéma 2**).



Réactifs et conditions : a) chlorhydrate d'hydroxylamine (2.0 éq.), acétate de sodium (2.0 éq.), acide acétique anhydre, reflux ; b) chlorhydrate d'hydroxylamine (1.2 éq.), K_2CO_3 (0.5 éq.), EtOH, reflux ; c) anhydride acétique, reflux ; d) i) NaOH (2.5 éq.), H_2O , 60 °C ii) HCl ; e) 2-bromoacétophénone (1.2 éq.), K_2CO_3 (2.0 éq.), acétone, reflux ; f) chlorure d'acétyle (3.0 éq.), pyridine (1.5 éq.), DCM, reflux ; g) triéthylsilane (2.0 éq.), TFA.

Schéma 2. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse des synthons clés 6 et 7

À partir du 5-bromo-2-hydroxybenzaldéhyde **1**, l'aldoxime correspondante **2** est formée par action du chlorhydrate d'hydroxylamine dans l'éthanol au reflux avec un rendement de 76 % après recristallisation dans le toluène.⁽⁸⁷⁾ La déshydratation de cette aldoxime est effectuée au reflux de l'anhydride acétique conduisant à la formation du composé **3**, *O*-acétylé.⁽⁸⁸⁾ Le composé **4** est obtenu par réaction de saponification avec un rendement de 85 %. Une réaction d'*O*-alkylation est effectuée avec la 2-bromoacétophénone dans l'acétone au reflux conduisant à l'intermédiaire réactionnel *O*-alkylé.⁽⁸⁹⁾ Cet intermédiaire n'est pas isolé puisque dans ces conditions, il conduit par cyclisation intramoléculaire au composé benzofuranique **5** avec un rendement de 84 %. L'amine primaire aromatique, en position 3, est protégée sous forme d'acétamide par action du chlorure d'acétyle dans le dichlorométhane au reflux conduisant au synthon clé **6** avec un rendement de 76 %.⁽⁹⁰⁾ Le synthon clé **7** est obtenu après réduction chimique dans un mélange triéthylsilane / TFA.

➤ **Remarques sur le schéma 2 :**

- Étape a : Synthèse « one-pot » du composé 4

Dans les conditions expérimentales décrites par Frédéric H. Jung *et al.*⁽⁹¹⁾ concernant la synthèse, en une seule étape, de benzonitriles diversement substitués à partir des dérivés benzaldéhydes correspondants, nous avons envisagé de synthétiser directement le composé **4** à partir du 5-bromo-2-hydroxybenzaldéhyde **1**. Il s'agit d'une réaction « one-pot » qui consiste à former dans un premier temps l'aldoxime correspondante, qui se déshydrate par la suite *in situ*. Nous avons observé par CCM et LC-MS une conversion totale du composé **1** en aldoxime. Cependant, et malgré un temps de réaction long (48h), la déshydratation de l'aldoxime en nitrile n'est pas totale. Le composé **4** est obtenu après purification par colonne chromatographique avec un faible rendement de 33 %.

D'autres essais « one-pot » utilisant le nitroéthane ont également été effectués et ont conduit de la même façon à des réactions non totales et nécessitant une séparation par colonne chromatographique.⁽⁹²⁾ De ce fait, nous avons choisi de synthétiser de manière indépendante l'aldoxime **2** et de la déshydrater par la suite. Les temps de réactions sont courts

et associés à de très bons rendements. De plus, les réactions ne nécessitent pas d'étapes de purification par colonne chromatographique.

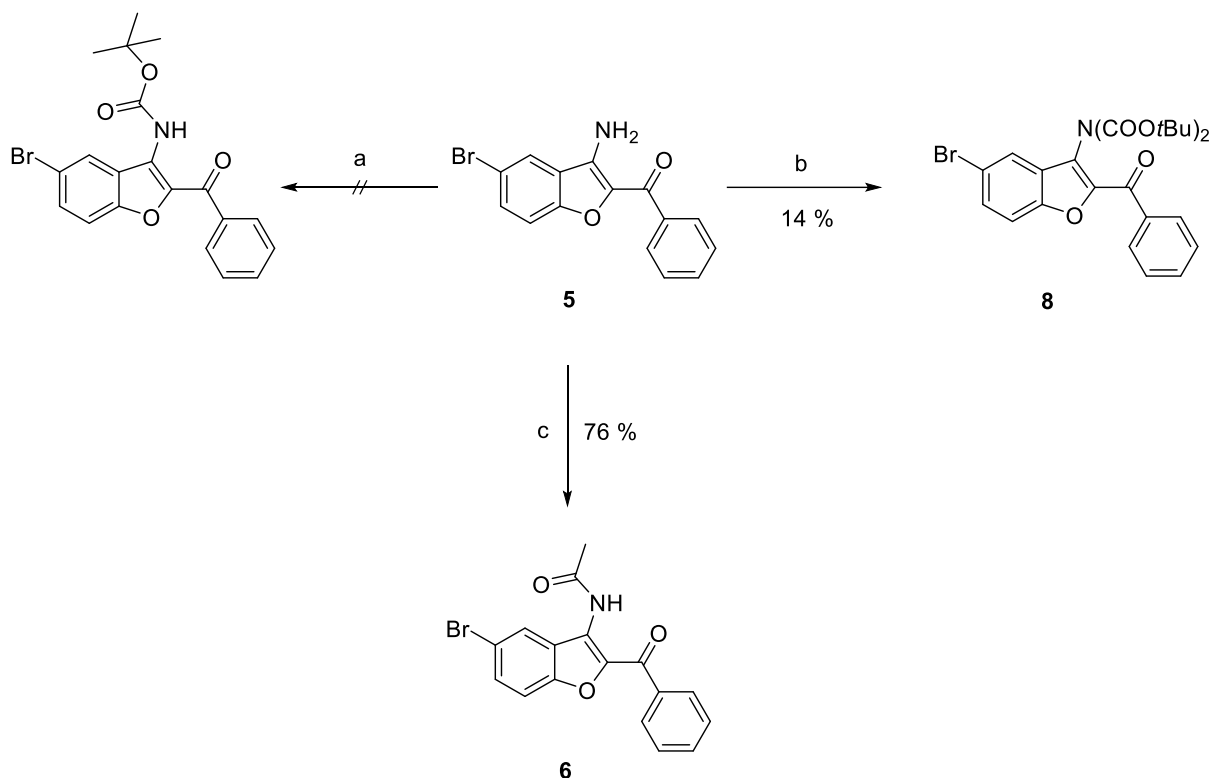
- Étape c : Méthodes de déshydratation de l'aldoxime

Avant de trouver les conditions de déshydratation de l'aldoxime **2** utilisant l'anhydride acétique, nous avons réalisé quelques essais de déshydratation en utilisant soit le diéthyle chlorophosphate (ou son analogue diphényle),⁽⁹³⁾ soit la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (TCT) dans le DMF.⁽⁹⁴⁾ Ces essais nous ont permis d'obtenir le composé **4** mais n'ont pas été retenus. En effet, les réactions n'étaient pas totales et aboutissaient à des rendements de l'ordre de 30 %. De plus, elles nécessitaient une purification par colonne chromatographique.

- Étape f : Protection de l'amine primaire aromatique

Pour la suite des travaux, il nous est apparu nécessaire de protéger l'amine primaire aromatique en position 3 en vue d'effectuer des réactions pallado-catalysées. Dans un premier temps, l'utilisation du groupement protecteur *tert*-butoxycarbone (Boc) a été envisagée.

À température ambiante, l'utilisation du dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc₂O) associée à la DMAP et dans divers solvants organiques (DCM, THF ou dioxane) n'ont pas conduit au produit désiré. Cependant, dans des conditions expérimentales plus drastiques à savoir dans le dioxane à reflux, on forme le produit disubstitué **8** (**Schéma 3**) mais avec un faible rendement (14 %). À la suite de ces difficultés, notre choix s'est donc porté sur la fonction acétamide pour protéger l'amine primaire aromatique.



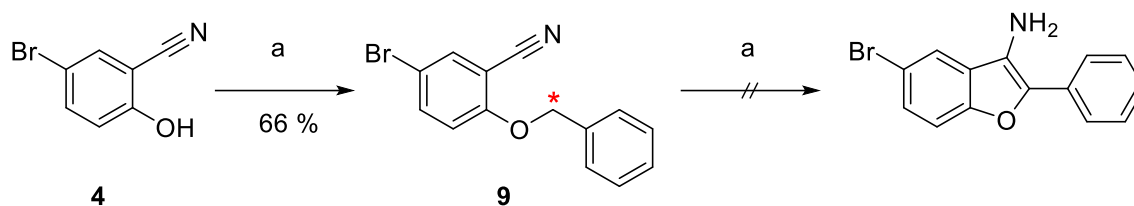
Réactifs et conditions : a) Boc_2O (1.5 éq.), DMAP (1.0 éq.), Et_3N (2.0 éq.), DCM ; b) Boc_2O (1.5 éq.), DMAP (1.0 éq.), Et_3N (2.0 éq.), dioxane, reflux ; c) chlorure d'acétyle (3.0 éq.), pyridine (1.5 éq.), DCM, reflux.

Schéma 3. Essais de protection de l'amine primaire aromatique

- Formation d'un « linker » alcane ($n=0$)

À la suite de mes travaux en modélisation moléculaire, un groupement aromatique directement relié à l'hétérocyclique benzofuranique en position 2 a également été envisagé (cf. Figure 30, p42).

Dans ce but, un autre composé *O*-alkylé **9** a donc été synthétisé à partir du composé **4** (Schéma 4).



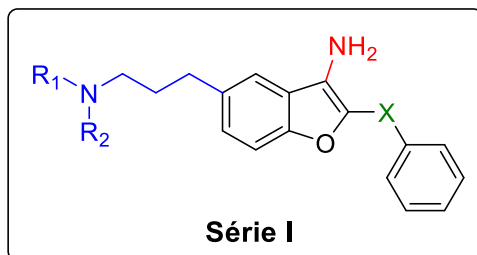
Réactifs et conditions : a) bromure de benzyle (1.5 éq.), K₂CO₃ (2.0 éq.), acétone, reflux.

Schéma 4. Synthèse du composé 9

Une réaction d'*O*-alkylation est effectuée avec le bromure de benzyle dans l'acétone au reflux conduisant au composé *O*-alkylé **9** avec un rendement de 66 %. Cependant, dans ces conditions expérimentales, une cyclisation intramoléculaire n'est pas observée en raison de la très faible acidité des hydrogènes benzyliques (*). Plusieurs essais de cyclisation ont donc été réalisés en utilisant des bases fortes comme l'hydrure de sodium mais ceux-ci n'ont pas fonctionné.

Nous avons très rapidement abandonné la synthèse de ce composé puisqu'en modélisation moléculaire il manquait l'interaction supplémentaire avec l'Asn²⁵³ (cf. Figure 33, p45).

III. Voies de synthèse des molécules de la série I



X = CO, CH₂

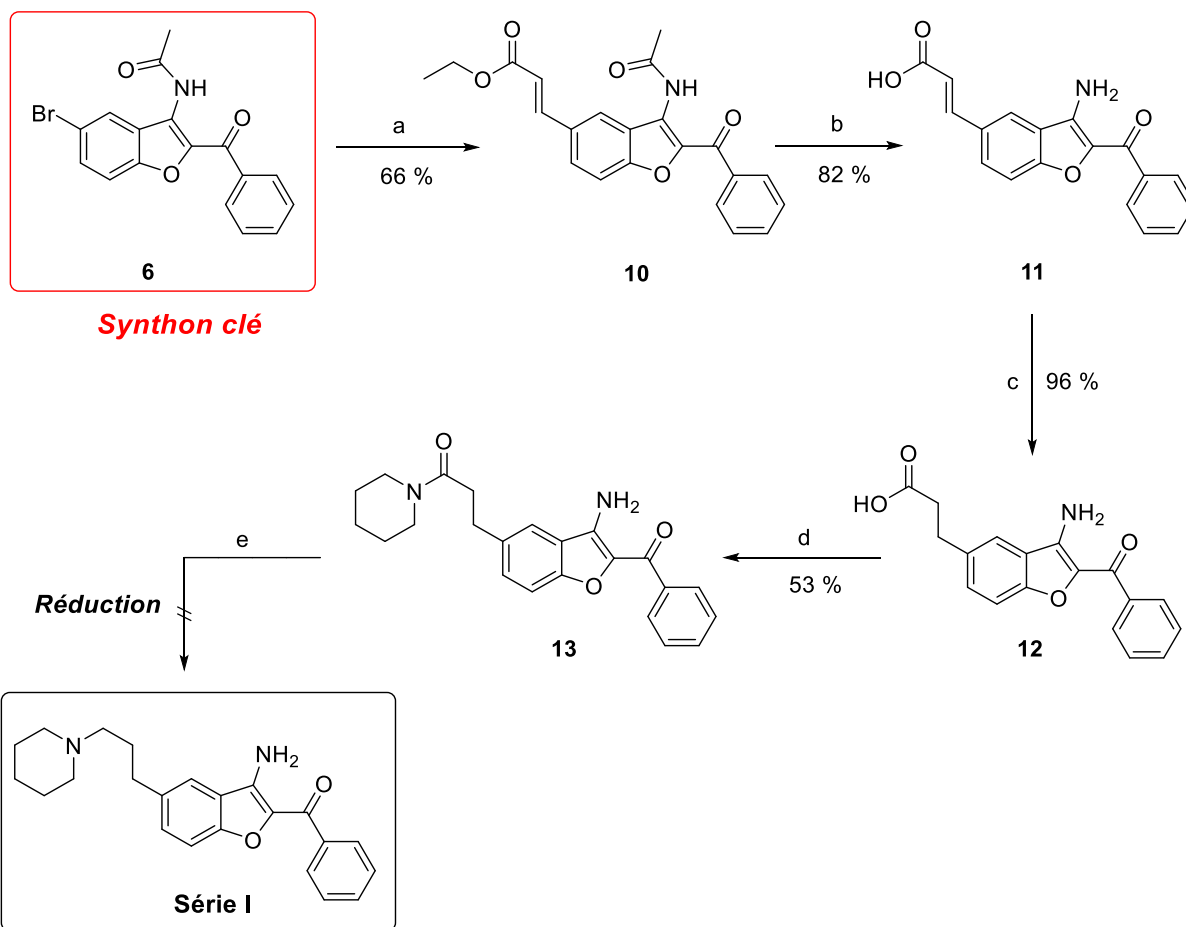
NR₁R₂ = amine tertiaire (pipéridine, morpholine, ...)

Figure 40. Structure des composés benzofuraniques de la série I

Pour rappel, deux voies rétrosynthétiques ont été établies pour l'obtention des composés de la **série I** (*cf.* **Schéma 1, p50**) et requièrent l'utilisation des synthons clés **6** et **7**, précédemment synthétisés.

1. Première voie de synthèse

Une première voie de synthèse (*cf.* **Schéma 1, p50, voie 1**) a été envisagée pour les composés de la **série I** présentant un « linker » cétonique en position 2 (X = CO). Le schéma réactionnel correspondant est rapporté ci-après.



Réactifs et conditions : a) acrylate d'éthyle (1.5 éq.), Et₃N (1.5 éq.), tris(*o*-tolyl)phosphine (0.2 éq.), Pd(OAc)₂ (0.1 éq.), acétonitrile, 120 °C, tube scellé ; b) i) NaOH (2.5 éq.), MeOH/H₂O, 60 °C ii) HCl ; c) H₂, Pd/C (5 %), THF ; d) BOP (1.5 éq.), Et₃N (2.0 éq.), pipéridine (1.0 éq.), DMF ; e) LiAlH₄ (3.0 éq.), THF anhydre.

Schéma 5. Essais de synthèse d'un composé de la série I (X = CO) par la première voie de synthèse

Une réaction pallado-catalysée de type Heck est effectuée en présence d'acrylate d'éthyle dans un tube scellé conduisant au composé **10** avec un rendement de 66 %. La fonction ester du composé **10** est saponifiée pour conduire à l'acide **11**. La réduction catalytique de la double liaison du composé **11** est réalisée par l'hydrogène en présence de palladium sur charbon (5%) dans le THF et conduit au composé **12** avec un rendement quantitatif. Le composé **13** est obtenu à la suite d'un couplage de type peptidique effectué

avec la pipéridine dans le DMF, en présence de BOP.⁽⁹⁵⁾ Des essais de réduction sélective de l'amide tertiaire ont été testés sans succès.

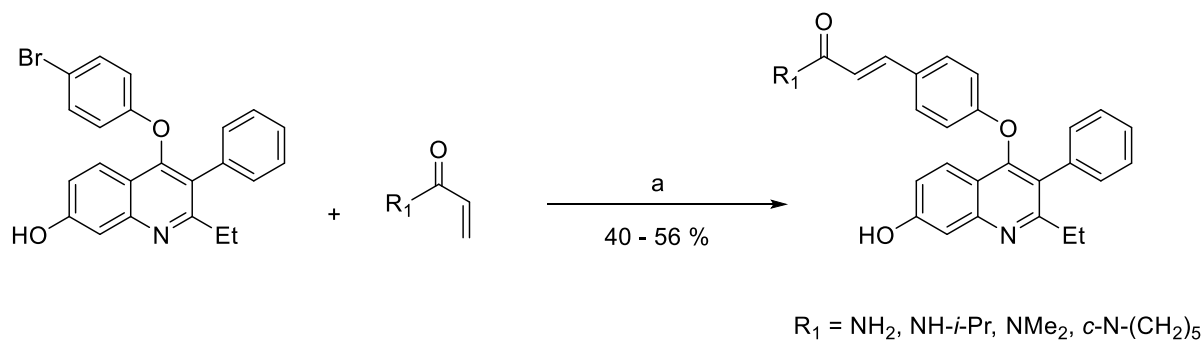
➤ **Remarques sur le schéma 5 :**

- **Étape a : Couplages pallado-catalysés**

Pour parvenir aux composés de la **série I** (X = CO), d'autres couplages pallado-catalysés ont été envisagés :

○ **Couplage pallado-catalysé de type Heck (acrylate d'amide)**

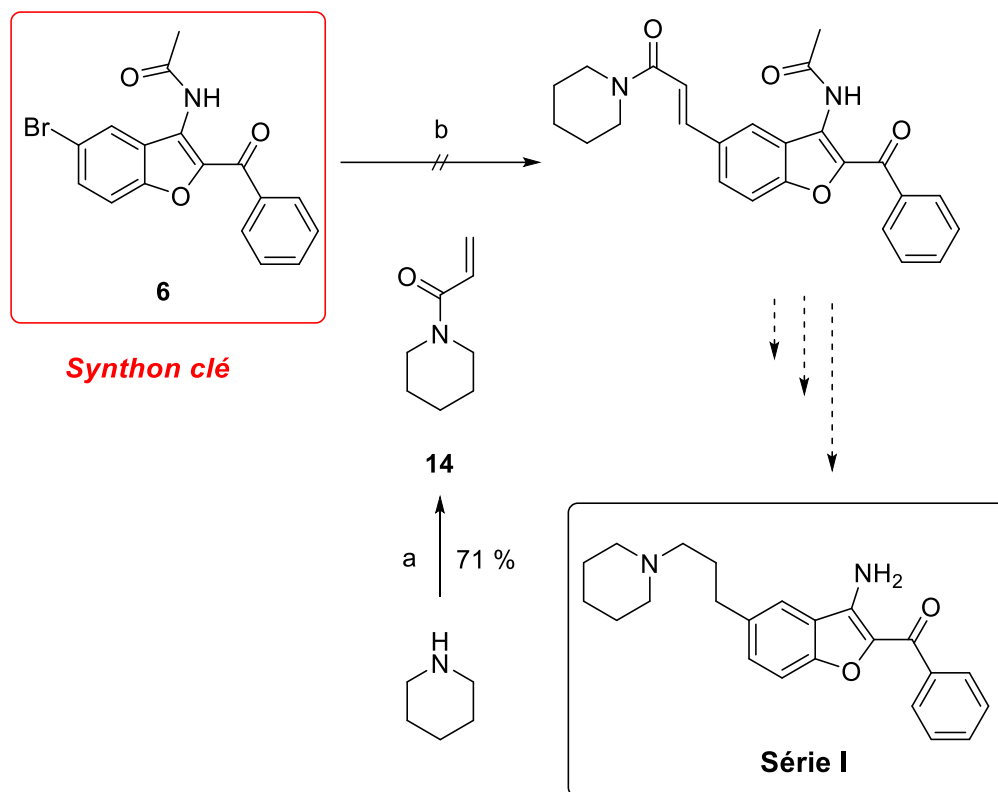
Les travaux réalisés par William J. Hoekstra *et al.*⁽⁹⁶⁾ ont conduit à la synthèse de composés quinoléiques diversement substitués en utilisant notamment des couplages pallado-catalysés de type Heck avec des acrylates d'amide (**Schéma 6**).



Réactifs et conditions : a) acrylate d'amide (5.0 éq.), Et₃N (3.0 éq.), PPh₃ (0.5 éq.), Pd(OAc)₂ (0.3 éq.), acétonitrile, 175 °C, 30 minutes, micro-ondes.

Schéma 6. Exemples de composés quinoléiques synthétisés dans le cadre des travaux de William J. Hoekstra *et al.*⁽⁹⁶⁾

De la même manière, nous avons envisagé d'utiliser l'acrylate d'amide **14** au cours de notre synthèse (**Schéma 7**).



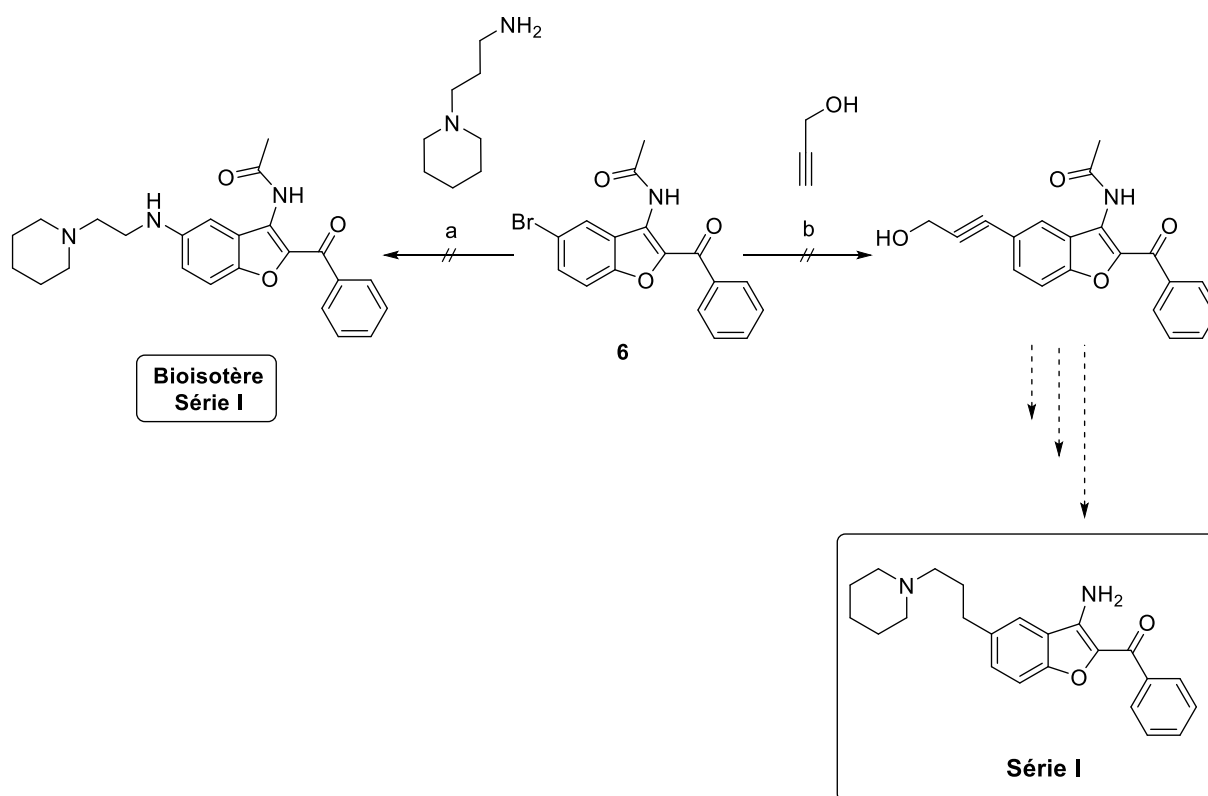
Réactifs et conditions : a) chlorure d'acryloyle (1.5 éq.), K_2CO_3 (2.0 éq.), acétone ; b) acrylate d'amide (5.0 éq.), Et_3N (3.0 éq.), PPh_3 (0.5 éq.), $Pd(OAc)_2$ (0.3 éq.), acétonitrile, 175 °C, 30 minutes, micro-ondes.

Schéma 7. Synthèse du composé **14 et essai de synthèse d'un composé de la série I (X=CO)**

L'acrylate d'amide **14** est obtenu par réaction d'amidification entre la pipéridine et le chlorure d'acryloyle dans l'acétone. Par la suite et dans les conditions expérimentales décrites dans le schéma 6, aucune réaction n'a pu être constatée entre l'acrylate d'amide **14** et notre synthon clé **6**. Cette voie de synthèse n'a donc pas été privilégiée.

○ Couplages pallado-catalysés de type Buchwald-Hartwig et Sonogashira

D'autres voies alternatives ont été testées pour l'obtention des composés de la **série I** (X = CO) ou pour celle de leur bioisostère (CH₂ = NH). Ces essais sont rapportés sur le schéma réactionnel ci-dessous :

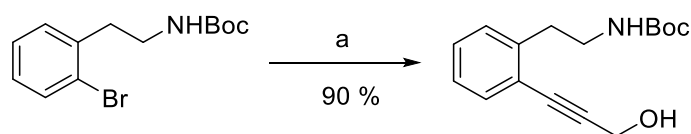


Réactifs et conditions : a) Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), BINAP (0.04 éq.), Cs₂CO₃ (2.00 éq.), dioxane, tube scellé, 110 °C ; b) Et₃N (1.20 éq.), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.03 éq.), CuI (0.02 éq.), dioxane, tube scellé, 80 °C.

Schéma 8. Essais de synthèse d'un composé de la série I (X = CO) et de son bioisostère par des réactions pallado-catalysées de type Buchwald-Hartwig ou Sonogashira

- Dans un premier temps, une réaction pallado-catalysée de type Sonogashira a été effectuée sur le synthon clé **6** avec l'alcool propargylique. Les conditions expérimentales utilisées ont donné lieu à la formation de plusieurs produits secondaires dont le composé désiré. Malheureusement, une purification sur colonne chromatographique n'a pas permis d'isoler le produit. Cette réaction de Sonogashira a été inspirée des travaux d'Éric Marsault et

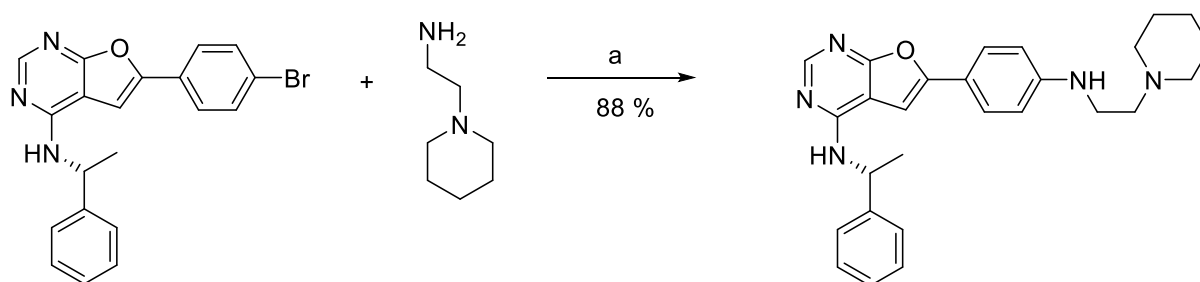
al.⁽⁹⁷⁾ portant sur la synthèse de macrocycles en tant qu'antagonistes des récepteurs de la motiline (**Schéma 9**).



Réactifs et conditions : a) alcool propargylique (1.05 éq.), iodure de cuivre (0.02 éq.), PdCl₂(PhCN)₂ (0.03 éq.), tri-*tert*-butylphosphine (0.06 éq.), diisopropylamine (1.20 éq.), dioxane.

Schéma 9. Exemple d'un composé synthétisé dans le cadre des travaux d'Éric Marsault *et al.*⁽⁹⁷⁾

• Dans un deuxième temps, une réaction pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig a été effectuée sur le synthon clé **6** avec une chaîne *N*-alkyle amine commercialisée. Dans les conditions expérimentales utilisées, aucune réaction n'a pu être constatée. Cette réaction de Buchwald-Hartwig a été inspirée des travaux de Jin Han *et al.*⁽⁹⁸⁾ portant sur la synthèse d'inhibiteurs chiraux du facteur de croissance épidermique humain EGFR (**Schéma 10**).

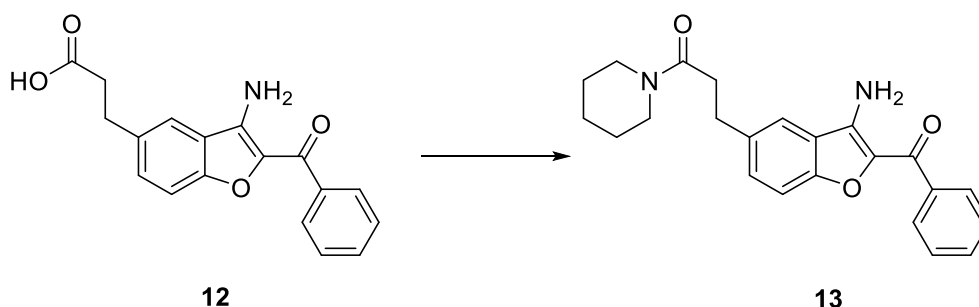


Réactifs et conditions : a) BrettPhos Pd G1 (0.02 éq.), BrettPhos (0.02 éq.), NaOt-Bu (2.00 éq.), dioxane, 100 °C.

Schéma 10. Exemple d'un composé synthétisé dans le cadre des travaux de Jin Han *et al.*⁽⁹⁸⁾

- Étape d : Couplage peptidique

Des travaux d'optimisation concernant la synthèse du composé **13** ont été réalisés. En effet, différentes conditions expérimentales ont été étudiées et sont rapportées ci-dessous :



Essai	Conditions	Rendement
1	Pipéridine (1.0 éq.), EDCI (1.0 éq.), HOBT (1.0 éq.), DMAP (1.0 éq.), DCM ⁽⁵⁶⁾	26 %
2	Pipéridine (3.0 éq.), AlMe ₃ (3.0 éq.), Toluène anhydre ⁽⁹⁹⁾	32 %
3	Pipéridine (1.0 éq.), BOP (1.5 éq.), Et ₃ N (2.0 éq.), DMF ⁽⁹⁵⁾	53 %

Conditions expérimentales utilisées

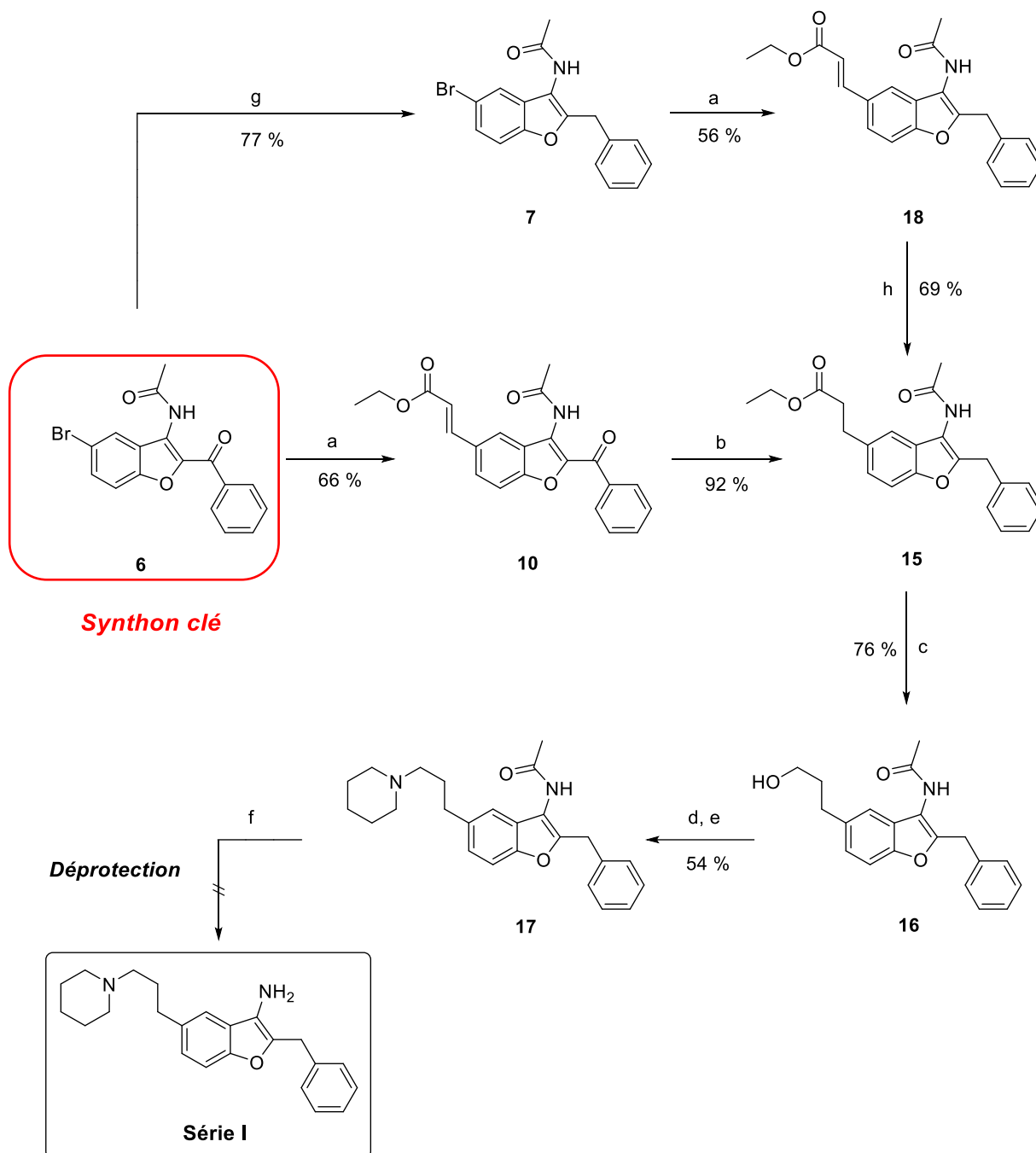
Tableau 4. Travaux d'optimisation réalisés pour la synthèse du composé 13

- Étape e : Réduction de l'amide

Plusieurs essais de réduction de l'amide tertiaire ont été menés en présence d'aluminohydrure de lithium (LiAlH₄) dans le THF. Ces essais ont été réalisés soit à température ambiante, soit en chauffant le milieu réactionnel (60 °C) et en variant les équivalents de LiAlH₄. Dans ces conditions, c'est le produit de départ qui est récupéré. Par conséquent, les molécules cibles à savoir les amines correspondantes n'ont pas pu être synthétisées. D'autres agents de réduction devront être essayés comme l'utilisation conjointe de chlorure d'aluminium (AlCl₃) et de LiAlH₄ ou l'utilisation de borane.⁽¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾

2. Deuxième voie de synthèse

Pour rappel, une deuxième voie de synthèse (*cf.* Schéma 1, p50, **voie 2**) a été envisagée pour les composés de la **série I**. Le schéma réactionnel correspondant est rapporté ci-après.



Réactifs et conditions : a) acrylate d'éthyle (1.5 éq.), Et₃N (1.5 éq.), tris(*o*-tolyl)phosphine (0.2 éq.), Pd(OAc)₂ (0.1 éq.), acétonitrile, 120 °C, tube scellé ; b) H₂, Pd/C (5%), THF ; c) LiAlH₄ (2.5 éq.), THF anhydre ; d) MsCl (2.0 éq.), Et₃N (2.0 éq.), DCM ; e) pipéridine (1.5 éq.), Et₃N (2.0 éq.), acétone, reflux ; f) NaOH (2.5 éq.), MeOH/H₂O, 60 °C ; g) triéthylsilane (2.0 éq.), TFA ; h) formiate d'ammonium (6.0 éq.), Pd/C (10 %), MeOH/THF, 60 °C.

Schéma 11. Essais de synthèse d'un composé de la série I (X = CH₂) par la deuxième voie de synthèse

De manière identique au **schéma 5 (cf. p58)**, une réaction pallado-catalysée de type Heck est effectuée en présence d'acrylate d'éthyle dans un tube scellé conduisant au composé **10** avec un rendement de 66 %. L'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (5%) dans le THF conduit par double réduction au composé **15**. Une réduction de l'ester **15** est effectuée en présence d'aluminohydruure de lithium dans le THF anhydre conduisant à l'alcool **16** avec un rendement de 76 %. L'alcool **16** est par la suite activé en utilisant le chlorure de mésyle.⁽¹⁰²⁾ Cet intermédiaire n'est pas isolé et une réaction de substitution nucléophile avec la pipéridine est effectuée dans l'acétone au reflux conduisant au composé **17** avec un rendement de 54 %.

➤ **Remarques sur le schéma 11 :**

- Étape b : Hydrogénation catalytique

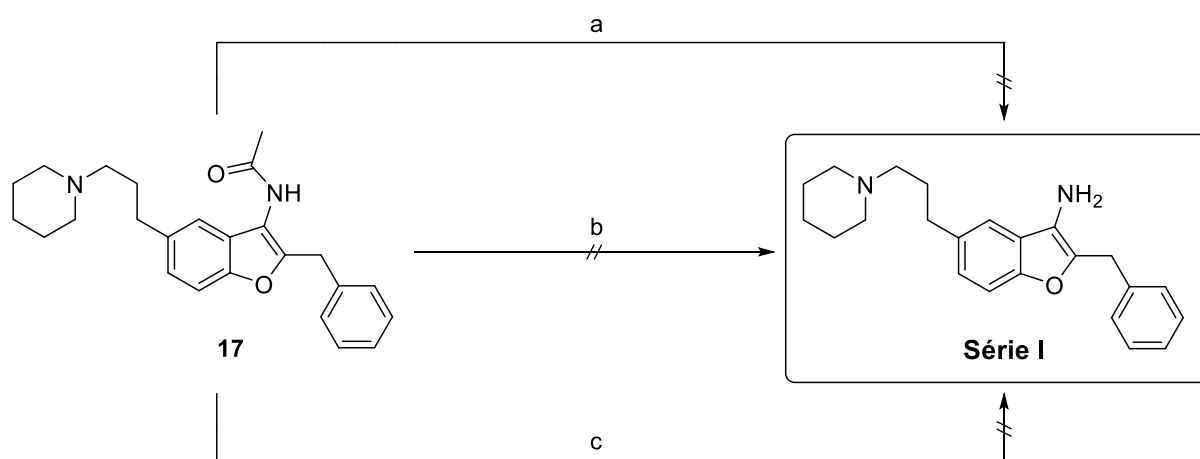
Au cours de mes travaux, les réactions d'hydrogénation catalytique ont été effectuées dans un autre laboratoire de la Faculté de Pharmacie. Par conséquent, il s'est avéré plus difficile de pouvoir effectuer ces réactions et d'en assurer un suivi réactionnel régulier.

À la différence de l'hydrogénation catalytique réalisée sur l'acide **11 (cf. Schéma 5, p58)**, celle réalisée sur le composé **10** conduit par double réduction à la formation du produit **15** avec des rendements quasi-quantitatifs. Cependant, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés en fonction de la quantité de matière engagée.

C'est pourquoi, pour remédier à ces différents problèmes, nous avons privilégié une autre voie de synthèse pour accéder au composé **15**. Ce composé est intéressant dans la mesure où il nous permet d'accéder aux composés de la **série I** ($X = CH_2$). Ainsi, à partir du synthon clé **7** précédemment synthétisé et de la même manière que décrite précédemment (**cf. Schéma 5, p58**), une réaction pallado-catalysée de type Heck est réalisée pour conduire au composé **18**. Le composé **15** est obtenu à la suite d'une réduction de la double liaison par le formiate d'ammonium en présence de palladium sur charbon (10 %) avec un rendement de 69 %.

- **Étape d** : Déprotection de la fonction acétamide

Une fois la synthèse du composé **17** effectuée, des essais de déprotection ont été réalisés. De manière surprenante, les conditions de déprotection utilisées dans le **schéma 5** (*cf.* p58) n'ont pas permis d'obtenir le composé désiré. Un schéma réactionnel récapitulant les différents essais de déprotection est rapporté ci-dessous :



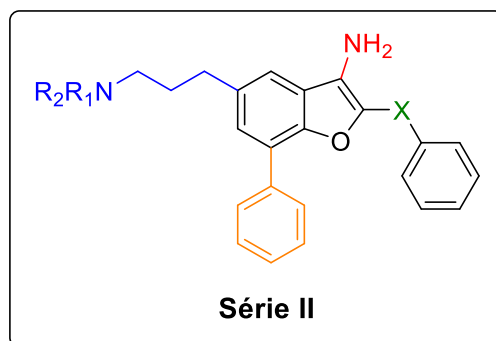
Réactifs et conditions : a) NaOH (2.0 équ.), H₂O, reflux ; b) HCl (2 M), reflux ; c) NaOH (2.5 équ.), MeOH/H₂O, 60 °C.

Schéma 12. Essais de déprotection du composé 17

Tous les essais réalisés ne se sont pas révélés concluants dans la mesure où aucune formation du produit désiré n'a pu être constatée. Cependant, une dégradation du milieu réactionnel a été observée lors des essais réalisés en milieu acide.

IV. Voie de synthèse des molécules de la série II

Comme rapporté dans la partie conception (*cf.* Figure 30, p42), l'apport d'un groupement aromatique en position 7 a été envisagé. Notre choix s'est porté dans un premier temps sur le groupement phényle.



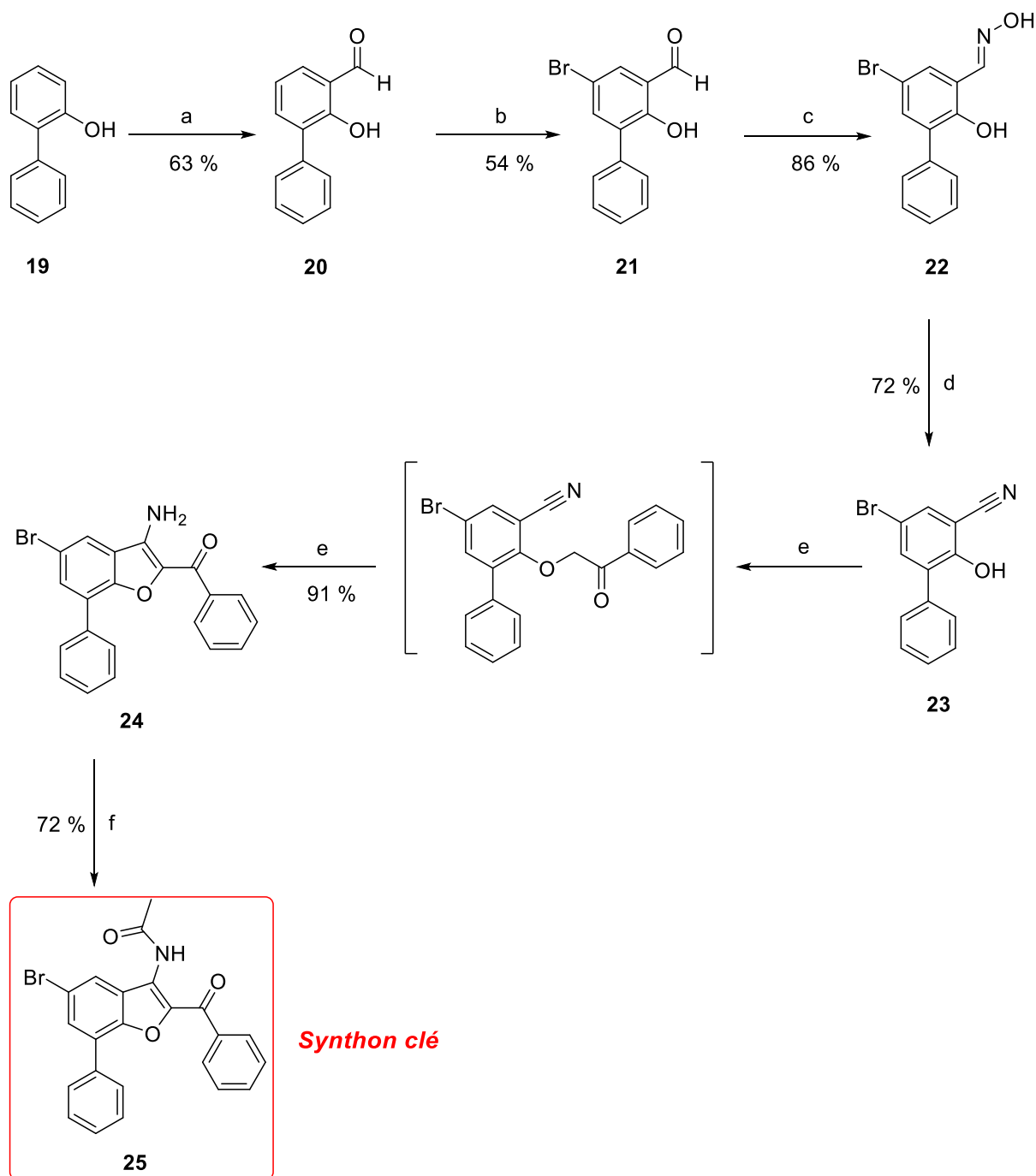
NR₁R₂ = amine tertiaire (pipéridine, morpholine, ...)

Figure 41. Structure des composés de la série II

Basés sur le schéma rétrosynthétique précédemment établi (*cf.* **Schéma 1, p50**), les essais de synthèse des composés de la **série II** ont été réalisés selon la première voie de synthèse développée pour les composés de la **série I**. De la même façon que pour la **série I**, la synthèse d'un synthon clé a été nécessaire.

1. Synthèse du synthon clé

Afin d'accéder à ce synthon clé, le composé benzofuranique **25**, nous avons adopté le schéma réactionnel rapporté ci-après.



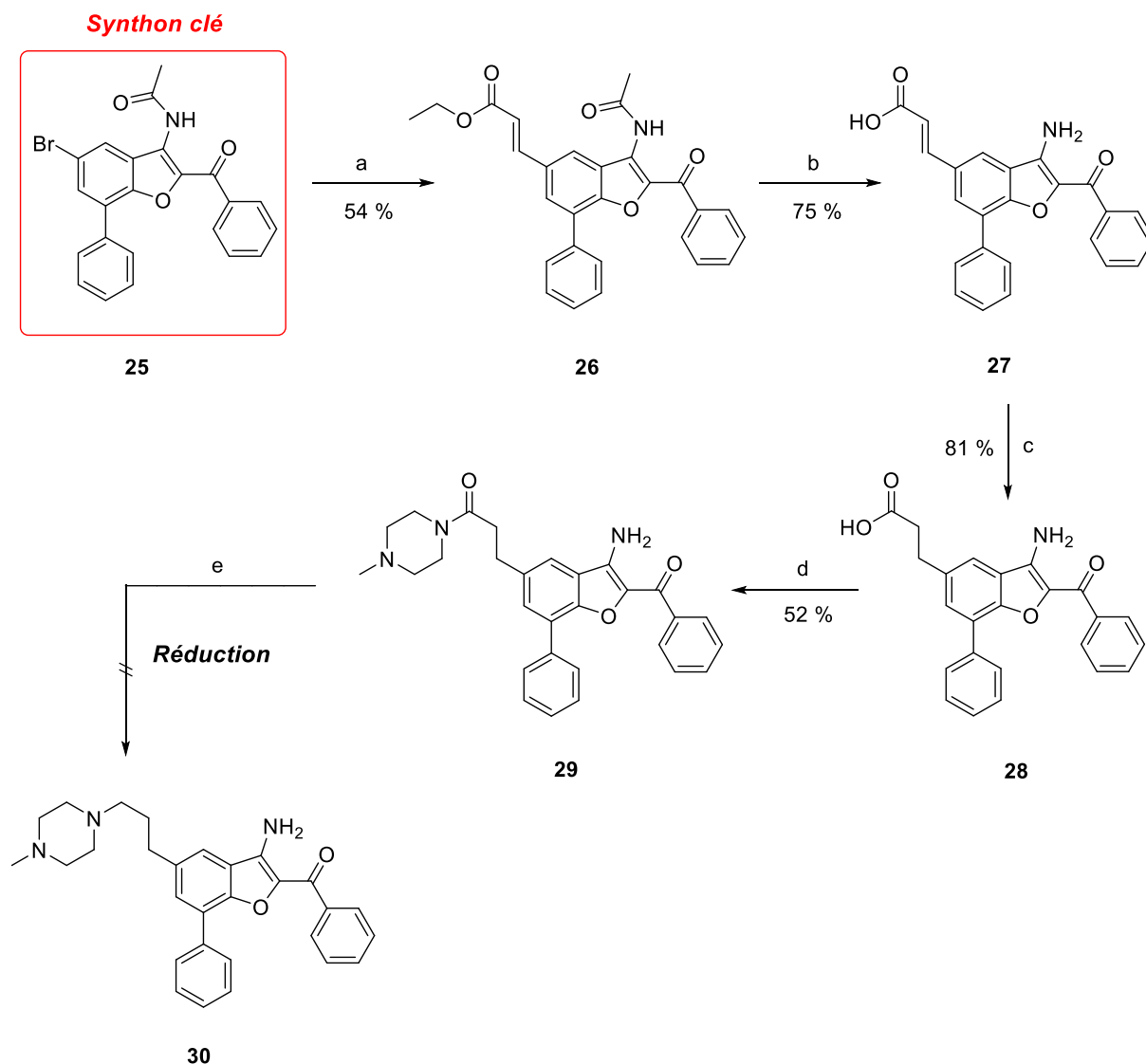
Réactifs et conditions : a) paraformaldéhyde (5.0 éq.), Et₃N (2.0 éq.), MgCl₂ (2.0 éq.), THF, reflux ; b) Br₂ (2.0 éq.), acide acétique ; c) chlorhydrate d'hydroxylamine (1.5 éq.), K₂CO₃ (0.5 éq.), EtOH, reflux ; d) i) anhydride acétique, reflux ii) NaOH (2.5 éq.), MeOH/H₂O, 60 °C iii) HCl ; e) 2-bromoacétophénone (1.2 éq.), K₂CO₃ (2.0 éq.), acétone, reflux ; f) chlorure d'acétyle (3.0 éq.), pyridine (1.5 éq.), DCM, reflux.

Schéma 13. Schéma réactionnel conduisant à la synthèse du synthon clé 25

La formylation du 2-phénylphénol **19** est réalisée en ortho de la fonction hydroxy par action du paraformaldéhyde dans le THF, en présence de chlorure de magnésium et de triéthylamine.⁽¹⁰³⁾ La combinaison du chlorure de magnésium et de la triéthylamine est rapportée comme étant une base plus forte que la triéthylamine seule.⁽¹⁰⁴⁾ Une réaction de bromation est effectuée dans l'acide acétique pour conduire au composé **21** avec un rendement de 54 %.⁽¹⁰⁵⁾ Le composé **21** subit la suite réactionnelle décrite pour l'obtention du synthon clé **6** (cf. Schéma 2, p52), à savoir la formation de l'aldoxime correspondante **22** par action du chlorhydrate d'hydroxylamine. La déshydratation de cette dernière en nitrile par chauffage dans l'anhydride acétique s'accompagne de l'acétylation du phénol. L'ester ainsi obtenu est saponifié par chauffage en présence d'hydroxyde de sodium. L'hydroxy benzonitrile **23** est *O*-alkylé par action de la 2-bromoacétophénone. Le dérivé *O*-alkylé se cyclise spontanément par chauffage au reflux de l'acétone. Enfin, la protection de l'amine primaire est réalisée par le chlorure d'acétyle dans le dichlorométhane et en présence de pyridine.

2. Essais d'obtention des molécules de la série II

Pour rappel, les essais de synthèse des composés de la **série II** ont été basés sur la première voie de synthèse développée pour les composés de la **série I**. Le schéma réactionnel qui a été mis en place est représenté ci-après.



Réactifs et conditions : a) acrylate d'éthyle (1.5 éq.), Et₃N (1.5 éq.), tris(*o*-tolyl)phosphine (0.2 éq.), Pd(OAc)₂ (0.1 éq.), acétonitrile, 120 °C, tube scellé ; b) *i*) NaOH (2.5 éq.), MeOH/H₂O, 60 °C *ii*) HCl ; c) H₂, Pd/C (5 %), THF ; d) BOP (1.5 éq.), Et₃N (2.0 éq.), 1-méthylpipérazine (1.0 éq.), DMF ; e) LiAlH₄ (3.0 éq.), THF anhydre.

Schéma 14. Essais de synthèse d'un composé de la série II (X = CO)

Les composés **26** et **27** sont obtenus respectivement par une réaction pallado-catalysée de type Heck utilisant l'acrylate d'éthyle, puis par une réaction de saponification. L'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (5%) dans le THF conduit au composé **28** avec un rendement de 81 %. Un couplage de type peptidique avec la 1-

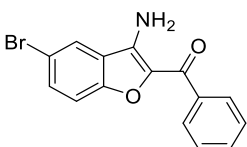
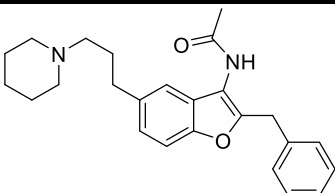
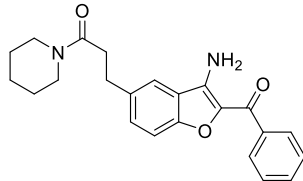
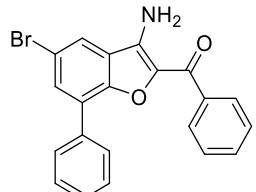
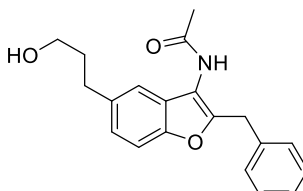
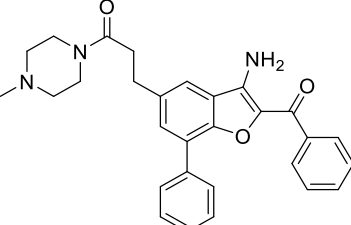
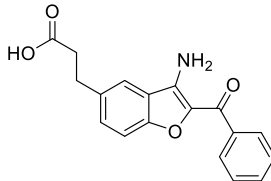
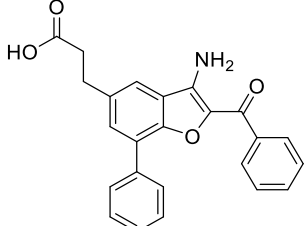
méthylpipérazine est effectué dans le DMF, en présence de BOP, conduisant à l'amide correspondante **29**. De la même façon que décrits précédemment, des essais de réduction de l'amide avec LiAlH_4 ont été effectués mais n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré.

➤ **Remarque sur le schéma réactionnel 14**

Dans le but d'anticiper un éventuel problème de solubilité lors de l'évaluation pharmacologique des composés de la **série II**, nous avons voulu travailler dans un premier temps avec une amine tertiaire salifiable. Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de la 1-méthylpipérazine.

V. Évaluation pharmacologique

À la suite des difficultés chimiques rencontrées jusqu'à ce jour, les produits cibles des **séries I et II** n'ont pas pu être synthétisés. Je compte reprendre cette synthèse durant le mois de septembre. Toutefois, grâce au test de « radiobinding » pour le récepteur hA_{2A} que j'ai mis en place (**cf. Chapitre 4**), certains intermédiaires réactionnels ont été d'ores et déjà évalués pour leur affinité lors d'un criblage à 10 μM (**Tableau 5**).

Structure	<i>hA_{2A}</i> (% inhib) ^a	Structure	<i>hA_{2A}</i> (% inhib) ^a
	N.D		23 %
	13 %		N.D
	9 %		14 %
	11 %		8 %

a) Pourcentage de déplacement spécifique du [³H]-ZM241385 à 10 μM

Tableau 5. Résultats pharmacologiques d'intermédiaires réactionnels des séries I et II pour *hA_{2A}R*

Malheureusement, ces premiers résultats préliminaires se sont avérés décevants ($K_i(hA_{2A}R) > 10 \mu M$). De plus, nous avons été confrontés à des problèmes de solubilité pour certains composés (N.D) lors de l'évaluation pharmacologique. L'incorporation d'une chaîne *N*-alkyle amine salifiable semble être judicieuse et améliorerait potentiellement la solubilité des composés.

Chapitre 2 :

La famille des quinazolines

I. Travaux antérieurs

Une partie des travaux de la thèse de Romain Duroux a consisté à travailler autour du hit quinazolinique identifié lors du criblage virtuel (*cf.* **Figure 25, p35**).⁽⁵⁶⁾ Les modulations effectuées ont été guidées par la structure co-cristallisée du ligand triazine (**Figure 42, A**) et par la pose de docking sélectionnée pour le hit quinazolinique (**Figure 42, B**). En effet, en comparant ces deux poses (**A** et **B**), la pose docking sélectionnée pour le hit quinazolinique (**B**) est proche de la pose du ligand triazine (**A**).

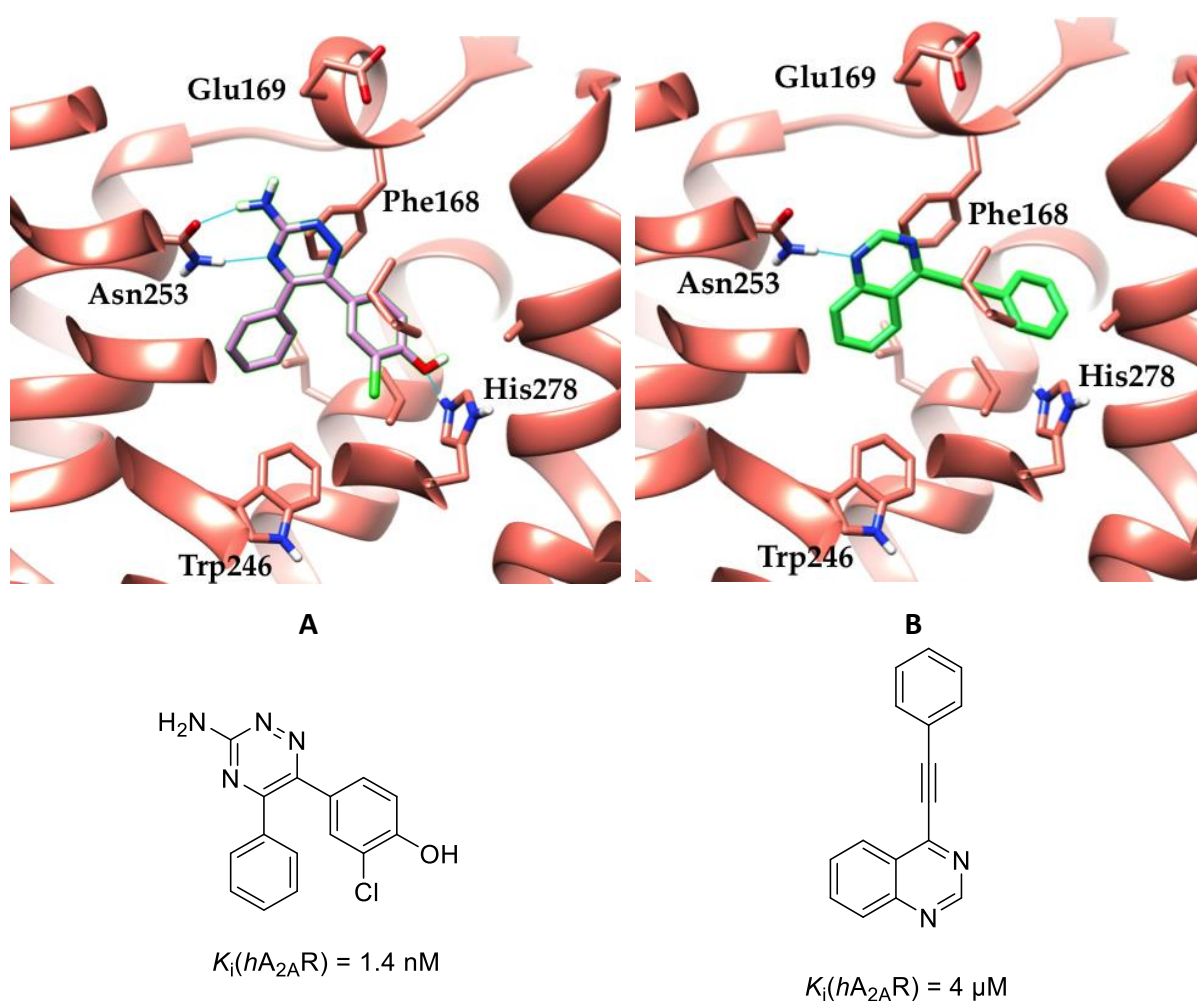


Figure 42. Structure co-cristallisée du ligand triazine T4E (A) et de la pose docking sélectionnée pour le hit quinazolinique (B)

Comme rapporté sur la **figure 42**, le hit quinazolinique interagirait avec plusieurs acides aminés clés du récepteur. L'hétérocycle quinazoline interagirait par interaction de type π -stacking avec la Phe¹⁶⁸ et par liaison hydrogène avec l'Asn²⁵³. Il semblerait que l'hétérocycle quinazoline interagisse également avec le Trp²⁴⁶ par interaction hydrophobe. Le groupement phénylacétylène vient, quant à lui, se mettre au sein d'une poche hydrophobe délimitée par les acides aminés Ala⁶³, Val⁸⁴, Ile²⁷⁴ et His²⁷⁸. Basées sur cette hypothèse de docking, différentes pharmacomodulations autour du hit ont été entreprises.

Plus précisément, elles ont consisté en 3 étapes et ont permis d'identifier un composé chef de file (« lead ») d'affinité submicromolaire (**Figure 43**).

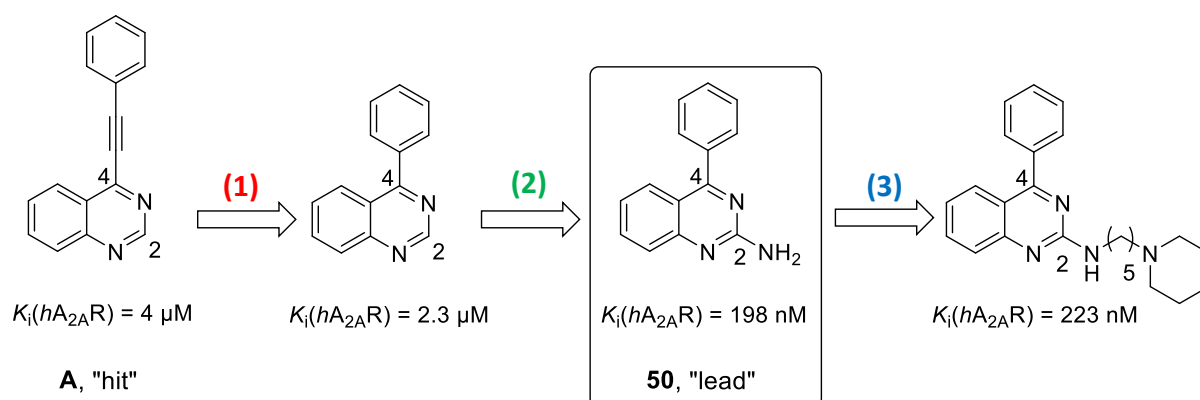


Figure 43. Modulations effectuées autour du hit quinazolinique

○ La **première étape (1)** a consisté à s'affranchir du groupement phénylacétylène en position 4. En effet, ce groupement présente une instabilité chimique importante et c'est dans ce but que différentes modulations ont été effectuées (**Figure 44**).

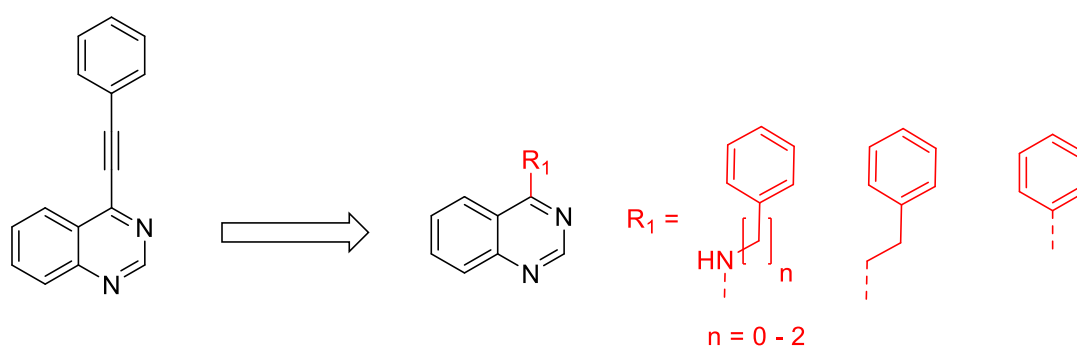


Figure 44. Modulations effectuées en position 4

L'apport de groupements aminoalkylphényles et alkylphényles ont conduit à une perte d'affinité pour le récepteur A_{2A} ($K_i(hA_{2A}R) > 10 \mu M$). En revanche, l'apport d'un groupement phényle a conduit à un léger gain d'affinité ($K_i(hA_{2A}R) = 2.3 \mu M$). Par conséquent, il semble donc que la poche hydrophobe occupée par le groupement phénylacétylène soit de taille relativement restreinte.

○ La **deuxième étape (2)** a consisté en l'incorporation d'une amine primaire en position 2. En effet, cette amine pourrait venir interagir par liaison hydrogène avec l'Asn²⁵³. Comme décrite précédemment (**cf. Introduction, p32**), l'interaction avec cet acide aminé est primordiale pour l'affinité ligand-récepteur. C'est pourquoi cette fonction est largement retrouvée dans de nombreux antagonistes du A_{2A}R. Il est à noter que c'est cette position qui a été privilégiée du fait de la similitude entre la structure co-cristallisée du ligand triazine et le mode de liaison envisagé pour notre composé hit (**cf. Figure 42, p74**).

Il est intéressant de noter que ces deux premières étapes ont conduit à l'identification d'un composé chef de file (**cf. Figure 43, p75**) qui présente un gain d'affinité important par rapport au hit de départ ($K_i(hA_{2A}R) = 198 \text{ nM}$). Ce composé est d'autant plus intéressant puisqu'il passe la barrière hémato-encéphalique (BHE) sur un modèle *in vitro* (Pr. Fabien Gosselet, LBHE – Lens). Ensuite, des études de docking sur ce composé ont permis de proposer un premier mode de liaison potentiel (**Figure 45**).

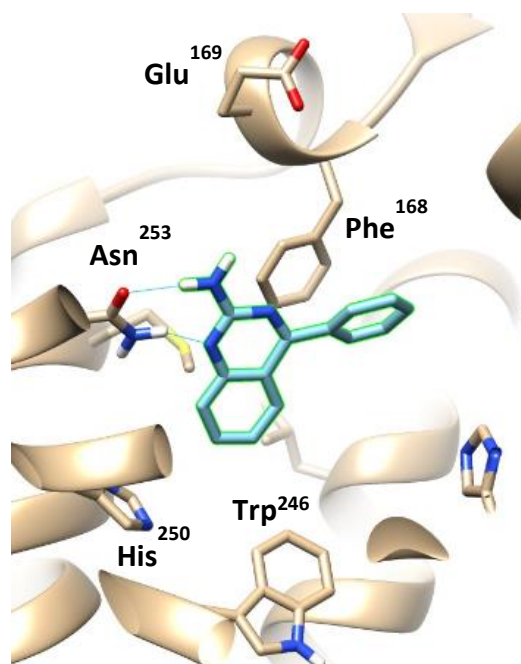
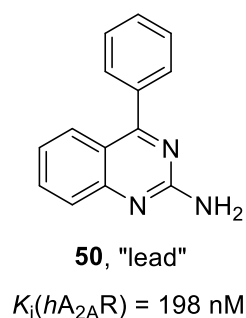


Figure 45. Mode de liaison envisagé pour le composé chef de file au sein du récepteur hA_{2A}

Comme illustré sur la **figure 45**, le groupement phényle interagirait par interaction de type π -stacking avec la Phe¹⁶⁸. L'amine primaire en position 2 interagirait, et comme attendu, avec l'Asn²⁵³ par liaison hydrogène. Enfin, l'hétérocycle quinazoline interagirait de la même manière que précédemment, à savoir par interaction hydrophobe avec le Trp²⁶⁴.

Enfin, la **troisième étape (3)** a consisté à moduler le composé chef de file en position 2. Ces modulations ont consisté en l'ajout de chaînes *N*-alkyles amines de longueur et de nature variables. Elles ont été effectuées dans le cadre de mon stage de Master 2 dans le but de moduler les propriétés pharmacocinétiques et notamment la solubilité, du fait de la présence d'une amine tertiaire salifiable. Pour rappel, la solubilité est un facteur important et qui fait défaut à un certain nombre d'antagonistes du $A_{2A}R$ (*cf.* **Figure 16**, p26). La présence d'une amine salifiable a également été étudiée dans la mesure où une possible interaction ionique avec le Glu¹⁶⁹ a été identifiée par modélisation moléculaire (*cf.* **Figure 22**, p33 & **Figure 46**).

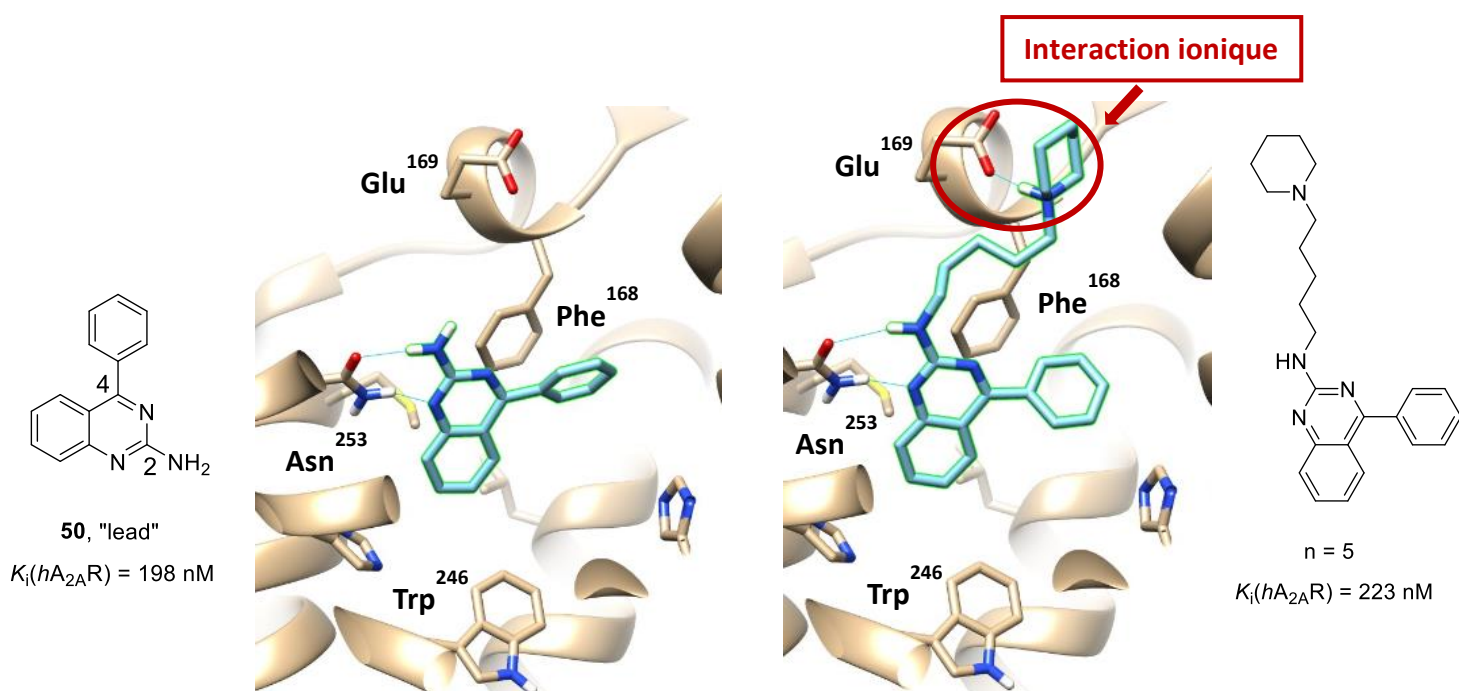
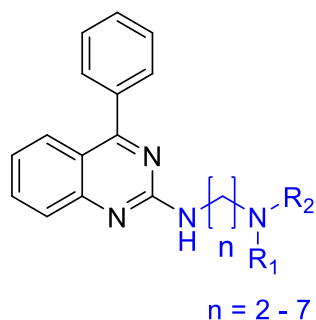


Figure 46. Pose docking du composé chef de file (gauche) et d'un composé modulé en position 2 (droite) au sein du récepteur hA_{2A}

Après avoir déterminé la longueur de chaîne optimale, des modulations autour de l'amine ont été effectuées (Tableau 6).



NR ₁ R ₂	n	hA _{2A} (K _i nM) ^a	n	NR ₁ R ₂	hA _{2A} (K _i nM) ^a
	2	3900 ± 220	5		421 ± 48
	3	1800 ± 132	5		365 ± 72
	4	811 ± 83	5		415 ± 36
	5	223 ± 54	5		573 ± 63
	6	396 ± 62	5		2100 ± 162
	7	745 ± 82	5	NH ₂	> 10 000

- a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » (N=3) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence (K_{ih}(A_{2A}R) = 2.8 ± 0.6 nM).

Tableau 6. Résultats pharmacologiques des modulations effectuées en position 2

À la lecture des résultats du **tableau 6**, on observe que l'allongement de la chaîne carbonée jusqu'à 5 méthylènes conduit en un gain d'affinité pour le A_{2A}R. C'est donc cette chaîne qui a été retenue comme étant la chaîne optimale. L'apport de cette dernière a permis d'améliorer la solubilité tout en conservant une affinité similaire à notre composé chef de file.

Concernant les modulations autour de l'amine, la pipéridine apparaît comme étant l'amine de choix dans la mesure où une perte d'affinité est observée pour les autres amines étudiées. Il sera décrit dans ce manuscrit (**cf. Chapitre 4**) les études *in vivo* qui ont été effectuées sur ce composé et durant lesquelles j'ai été fortement impliqué lors de mes travaux de thèse.

À la suite de ces résultats, une rigidification de la chaîne pentane par un benzyle a été envisagée (**Figure 47**). Le composé rigidifié permet de maintenir une affinité similaire pour le récepteur A_{2A} ($K_i(hA_{2A}R) = 272 \text{ nM}$). Cette stratégie de rigidification a eu pour objectif de limiter le nombre de conformères possibles et, par conséquent, d'améliorer potentiellement la sélectivité et de diminuer les effets secondaires.⁽¹⁰⁶⁾

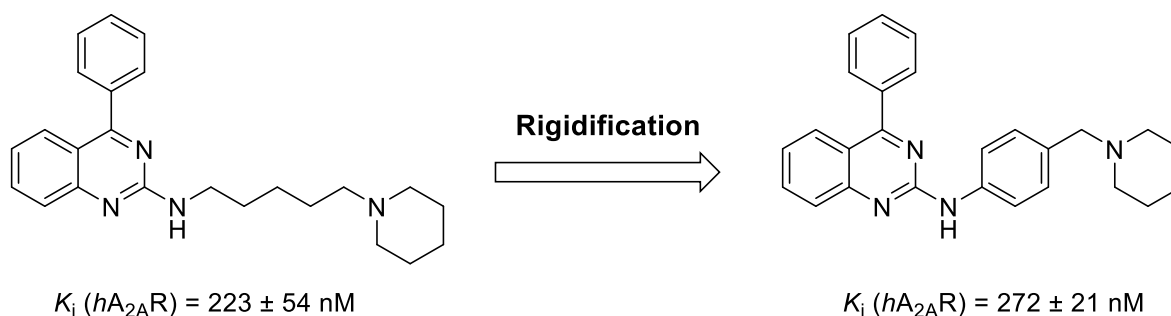


Figure 47. Principe de rigidification

Pour résumer les travaux antérieurs, à l'issue du criblage virtuel réalisé sur la structure co-cristallisée du ligand triazine, un hit quinazolinique présentant une affinité micromolaire a été identifié ($K_i(hA_{2A}R) = 4 \mu\text{M}$, **cf. Figure 43, p75**). Premièrement, un travail de modulation a été réalisé en position 4 afin de remplacer le groupement phénylacétylène, peu stable chimiquement. Un léger gain d'affinité a été constaté lorsque celui-ci est substitué par un phényle ($K_i(hA_{2A}R) = 2.3 \mu\text{M}$, **cf. Figure 43, p75**). Cependant, une perte d'affinité a été observée pour des groupements plus volumineux, ce qui laisse à penser que la poche hydrophobe occupée par le groupement phénylacétylène est de taille relativement restreinte. Ensuite, l'introduction d'une amine primaire en position 2 a été étudiée et a conduit à l'identification d'un composé chef de file avec une affinité submicromolaire pour le $A_{2A}R$ ($K_i(hA_{2A}R) = 198 \text{ nM}$, **cf. Figure 43, p75**). Enfin, dans le but de moduler les propriétés pharmacocinétiques et notamment la solubilité, l'introduction de diverses chaînes *N*-alkyles amines a été étudiée.

Concernant la famille des quinazolines, l'un de mes premiers objectifs a été de poursuivre le travail de modulation effectué en position 4. En effet, à la suite des résultats

précédemment obtenus, ce sont des modulations de plus faible impact stérique qui ont été étudiées dans le but d'explorer la poche hydrophobe. Elles ont surtout concerné des groupements aromatiques directement rattachés à l'hétérocycle quinazoline et sont à l'origine du développement de la **série I**. La stratégie et le rationnel entourant notre composé chef de file sont présentés sur la **figure 48** ci-après.

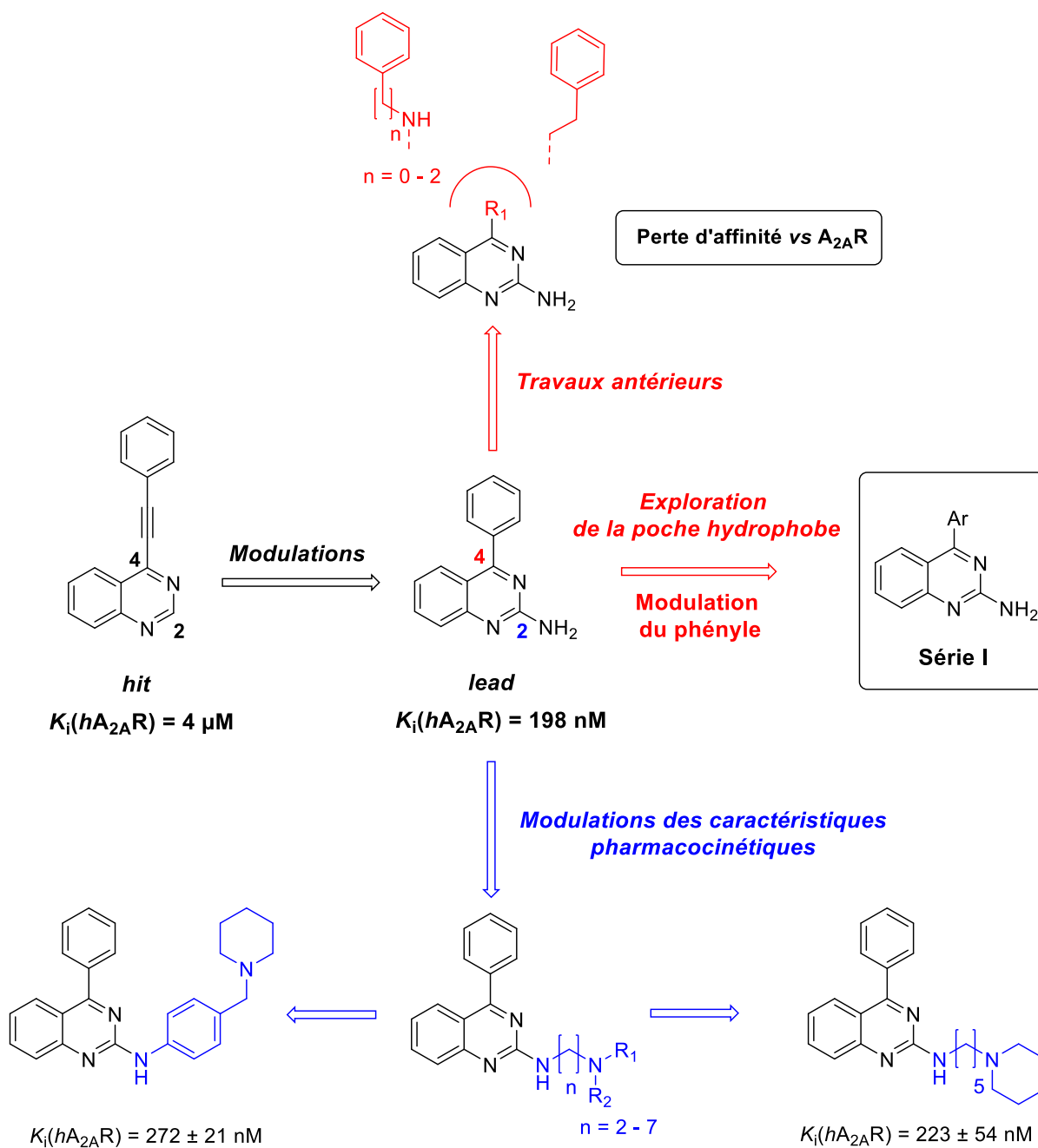
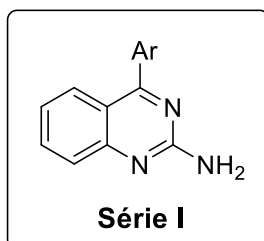


Figure 48. Stratégie et rationnel du projet autour du composé chef de file

II. Travaux personnels : stratégie de synthèse des molécules de la série I

Les molécules synthétisées dans le cadre de la **série I** sont rapportées dans le **tableau 7** ci-dessous :

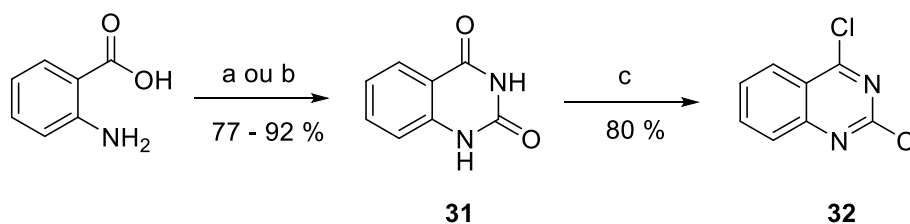


N°	Ar	N°	Ar	N°	Ar
50		56		62	
51		57		63	
52		58		64	
53		59		65	
54		60		66	
55		61			

Tableau 7. Composés synthétisés dans le cadre de la série I

1. Synthèse de l'intermédiaire clé : 2,4-dichloroquinazoline

La synthèse des composés quinazoliniques de la **série I** nécessite la préparation d'un intermédiaire clé : la 2,4-dichloroquinazoline **32** (**Schéma 15**).



Réactifs et conditions : a) urée (10.0 éq.), 160 °C ; b) i) KNCO (1.3 éq.), AcOH (1.0 éq.), eau, 35 °C ii) NaOH (33.0 éq.), 0 – 25 °C iii) HCl ; c) POCl₃ (7.0 éq.), 2,6-lutidine (0.7 éq.), reflux.

Schéma 15. Synthèse de la 2,4-dichloroquinazoline

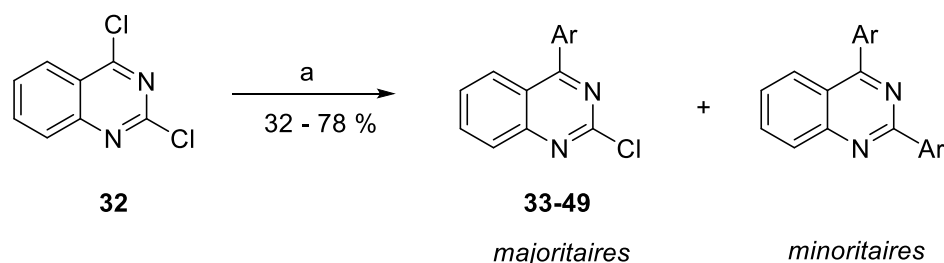
Le chauffage à fusion de l'urée en présence de l'acide anthranilique conduit de manière quantitative à la formation de la quinazolinédione correspondante **31**.⁽¹⁰⁷⁾ Elle peut également être synthétisée par action du cyanate de potassium avec un rendement de 77 %.⁽¹⁰⁸⁾ La réaction de chloration de la quinazolinédione **31** est réalisée par chauffage au reflux du POCl₃.⁽¹⁰⁹⁾ On obtient dans ces conditions de faibles rendements. L'ajout d'une amine telle que la 2,6-lutidine ou la DIPEA permet, d'une part, de réduire le temps de réaction et, d'autre part, d'améliorer le rendement.^(110,111)

➤ Remarques :

Afin de limiter l'utilisation et la quantité de POCl₃, décrit comme étant fortement toxique, mutagène et cancérigène,⁽¹¹²⁾ nous avons utilisé le toluène comme solvant en réduisant la quantité de POCl₃. Cet essai n'a pas été concluant car en plus du temps de réaction qui augmente, le rendement est faible. Un essai de chloration avec SOCl₂ a été effectué mais celui-ci n'a pas fonctionné.

2. Synthèse des intermédiaires réactionnels 33-49

Dans un second temps, l'intermédiaire clé **32** a été fonctionnalisé en position 4 par une réaction pallado-catalysée de type Suzuki (**Schéma 16**).^(113,114) Il est intéressant de constater qu'il existe une différence de réactivité notable entre le chlore en position 2 et en position 4. En effet, la position 4 est la plus réactive du fait d'un encombrement électronique important en position 2. Celui-ci est dû à la présence des doublets non-liants des atomes d'azote en position 1 et 3. Cette étape de synthèse nous a donc permis d'apporter une diversité structurale importante en position 4, suivant les acides boroniques disponibles au laboratoire ou ceux commercialement disponibles.



Réactifs et conditions : a) ArB(OH)_2 (1.00 éq.), K_2CO_3 (2.00 éq.), Pd(OAc)_2 (0.02 éq.), PPh_3 (0.04 éq.), dioxane/eau, 40 °C.

Schéma 16. Synthèse des composés 33-49

Les composés **33-49** ont été synthétisés dans des conditions douces de réaction de Suzuki, à savoir 40 °C dans un mélange dioxane/eau. Ces conditions nous ont permis de limiter la formation des dérivés disubstitués en position 2 et 4. Les composés **33-49** ont été obtenus après purification sur colonne chromatographique. Les dérivés disubstitués observés au cours des réactions par CCM et analyses LC-MS n'ont pas été isolés car il s'agissait de produits très minoritaires.

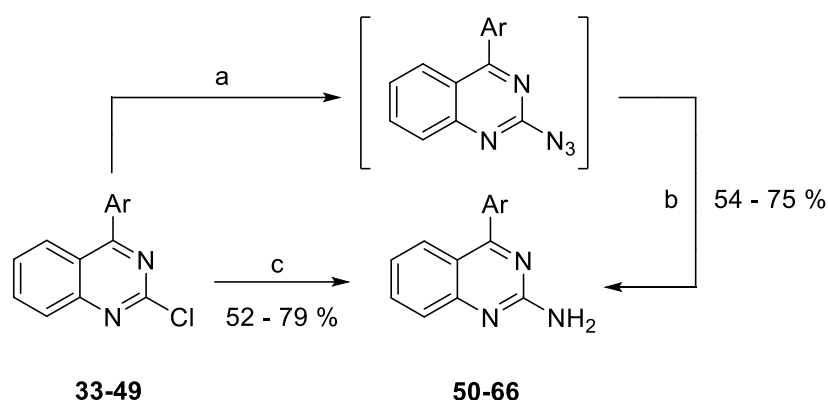
➤ Remarques :

D'autres modulations en position 4 ont été envisagées mais n'ont pas été concluantes. Des essais ont été réalisés avec des acides cycloalkyles boroniques dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites. Ceux-ci n'ont pas abouti car aucune réactivité n'a été

observée pour ces acides boroniques. On suppose que l'aromaticité de l'acide boronique doit jouer un rôle important dans la réaction de Suzuki.

3. Synthèse des molécules cibles de la série I

La synthèse des composés finaux de la **série I** a été effectuée selon les conditions décrites dans le **schéma 17**.



Réactifs et conditions : a) NaN_3 (1.2 éq.), EtOH, AcOH, reflux ; (b) $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.5 éq.), Pd/C (5 %), 70 °C ; c) éthanol saturé en ammoniac, tube scellé, 110 °C.

Schéma 17. Synthèse des composés finaux de la série I

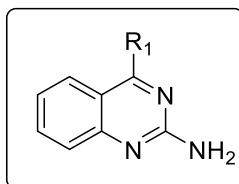
Les composés finaux peuvent être synthétisés selon deux voies de synthèse. La première voie comporte deux étapes. La première étape consiste en une réaction de substitution nucléophile, dans l'éthanol au reflux, des dérivés monosubstitués **33-49** par l'azoture de sodium.⁽¹¹⁵⁾ Dans un second temps, les intermédiaires azides sont réduits *in situ* par action d'hydrazine monohydrate et de palladium sur charbon pour obtenir les amines primaires correspondantes.⁽¹¹⁶⁾ La seconde voie de synthèse a permis l'obtention des composés cibles directement par chauffage en tube scellé dans une solution d'éthanol saturée en ammoniac. C'est cette seconde voie qui a été privilégiée pour l'accès à une majeure partie de nos composés. L'utilisation de cette dernière permet l'obtention des composés cibles avec des rendements similaires à ceux obtenus par la première voie de synthèse.

III. Évaluation pharmacologique des molécules de la série I

1. Relations structure-affinité

- **Objectifs :** Les pharmacomodulations effectuées en position 4 (**cf. Tableau 7, p83**) ont eu pour objectif d'explorer la poche hydrophobe préalablement identifiée en modélisation moléculaire (**cf. Figure 42, p74**).

Pour plus de clarté et pour avoir une vision d'ensemble des relations structure-affinité, nous avons rapporté dans le **tableau 8**, ci-dessous, les résultats pharmacologiques et les clogP obtenus dans le cadre des modulations effectuées en position 4 lors de la thèse de Romain Duroux.

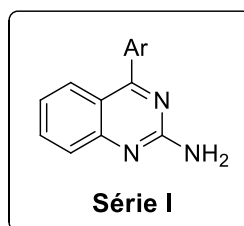


R ₁	<i>hA</i> _{2A} (K _i nM) ^a	clogP ^b
	198 ± 42	3.1
	> 10000	3.7
	> 10000	3.3
	> 10000	3.9
	> 10000	3.5

- a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » (*N*=3) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence (*K_{ih}*(A_{2A}R) = 2.8 ± 0.6 nM). b) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel *ChemDraw Professional v16.0*.

Tableau 8. Résultats pharmacologiques et clogP des modulations précédemment effectuées en position 4

Il est à noter que ces modulations ont montré que la substitution en position 4 par des groupements de type aminophényle, aminoalkylphényle ou alkylphényle conduit à une perte de l'affinité pour le A_{2A}R ($K_i(hA_{2A}R) > 10 \mu\text{M}$). C'est pourquoi les modulations en position 4 qui ont été effectuées au cours de ma thèse se sont limitées à des cycles aromatiques directement liés à l'hétérocycle quinazoline. Les résultats pharmacologiques de la **série I** sont rapportés ci-après.



N°	Ar	hA_{2A} (K_i nM) ^a	clogP ^b	N°	Ar	hA_{2A} (K_i nM) ^a	clogP ^b
50		198 ± 71	3.1	59		> 10000	2.9
51		> 10000	4.9	60		2000 ± 200	2.1
52		1500 ± 100	3.6	61		80 ± 5	3.3
53		3300 ± 435	3.3	62		174 ± 21	3.3
54		> 10000	3.5	63		456 ± 46	3.3
55		586 ± 121	2.6	64		89 ± 13	2.5
56		736 ± 42	3.2	65		696 ± 35	2.3
57		708 ± 54	3.2	66		171 ± 15	3.0
58		651 ± 71	2.6				

a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(hA_{2A}R) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel *ChemDraw Professional v16.0*.

Tableau 9. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série I pour $hA_{2A}R$

À la lecture des résultats rapportés dans le **tableau 9**, on peut tirer les conclusions suivantes :

o Substitution du phényle par des groupements encombrants

La substitution du phényle par des groupements encombrants (**51, 54, 59**) conduit à une perte d'affinité de près de 2log pour le A_{2A}R ($K_i(hA_{2A}R) > 10 \mu\text{M}$) et ce, par rapport à notre composé chef de file (**50**, $K_i(hA_{2A}R) = 198 \text{ nM}$). Un encombrement stérique important sur le phényle est donc défavorable. Ces résultats sont en accord avec les travaux effectués par Romain Duroux (*cf. Tableau 8, p87*) qui viennent renforcer le fait que la poche hydrophobe observée en modélisation moléculaire est de dimensions relativement restreintes.

o Autres modulations

Néanmoins, d'autres modulations qui ont pu être effectuées conduisent à un gain notable d'affinité pour le A_{2A}R. C'est le cas du composé **64** ($K_i(hA_{2A}R) = 89 \text{ nM}$) qui présente un groupement furane. Son isomère de position **65** et son analogue souffré **66** ont également été synthétisés et évalués, mais une perte d'affinité a été observée ($K_i(hA_{2A}R) = 696 \text{ nM}$ et $K_i(hA_{2A}R) = 171 \text{ nM}$). Bien que de nombreux antagonistes de haute affinité rapportés dans la littérature présentent un groupement furane dans leur structure, celui-ci est à l'origine d'une instabilité métabolique importante.⁽¹¹⁷⁾

Cependant, d'autres modulations qui ont été effectuées semblent être intéressantes pour pouvoir remplacer le groupement furane. En effet, des groupements de plus faible impact stérique ont été étudiés (fluorophényles **61-63** ou méthoxyphényles **56-58**). Les positions *para*, *ortho* et *méta* de ces substituants ont alors été évaluées. Il en résulte une légère baisse de l'affinité en fonction de la position du fluor et un impact un peu plus conséquent pour le groupement méthoxy où des affinités de l'ordre de 700 nM sont observées. Cependant, en comparant les résultats obtenus pour **64** et **61** (*para*-fluorophényle, $K_i(hA_{2A}R) = 80 \text{ nM}$), on peut observer qu'ils présentent une affinité similaire pour le A_{2A}R. Par conséquent, ces travaux de modulation autour du composé **64** nous ont permis d'identifier

un groupement subsidiaire au furane et potentiellement bénéfique d'un point de vue métabolique.

- o clogP

Pour déterminer la lipophilie (théorique) de nos composés, nous avons choisi d'utiliser le logiciel *ChemDraw Professional v16.0*. Concernant les composés modulés en position 4 (**Tableaux 8 & 9**), ils présentent des clogP compris entre 2 et 5. Ce sont des valeurs qui sont encourageantes pour un éventuel passage des composés les plus affins sur un modèle *in vitro* ou *in vivo* de la BHE.

- **Conclusion générale des relations structure-affinité**

La perte d'affinité globalement observée pour certains composés n'est pas en accord avec la capacité stérique de la poche hydrophobe identifiée en modélisation moléculaire. Les relations structure-affinité qui ont été obtenues sont en contradiction avec l'hypothèse du mode de liaison de notre composé chef de file (**cf. Figure 45, p77**). En effet, les études de modélisation moléculaire effectuées sur les composés de la **série I** ont montré une poche hydrophobe pouvant s'accommoder de groupements stériquement volumineux. À titre d'exemple, le composé **55** a été « docké » au sein du A_{2A}R et présente un mode de liaison identique à notre composé chef de file (**Figure 49**).

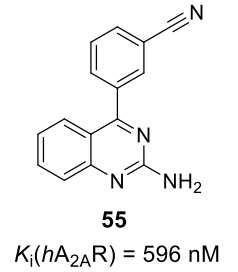
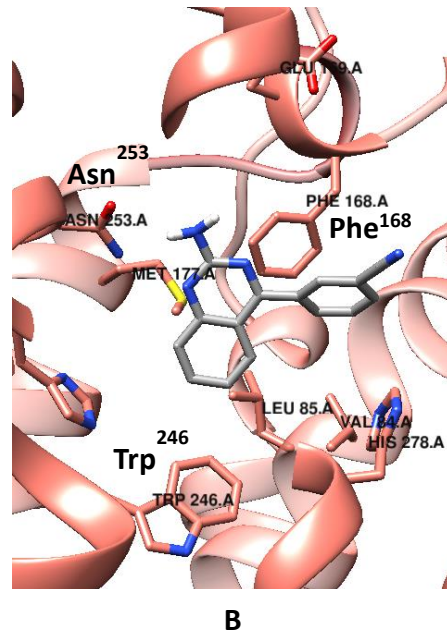
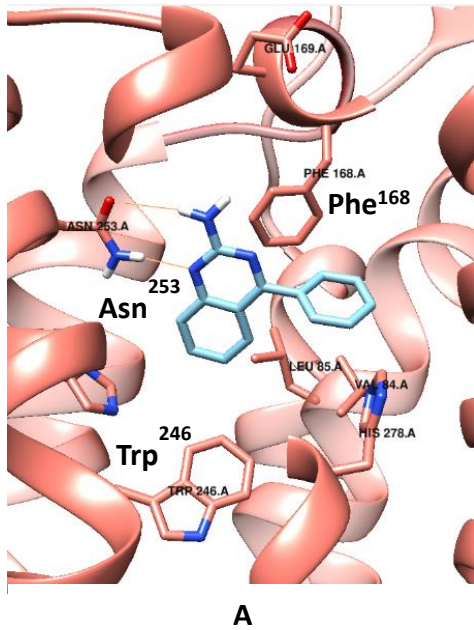
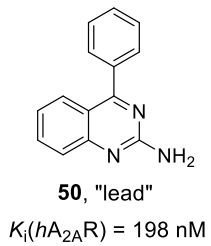


Figure 49. Poses docking des composés 50 (A) et 55 (B) dans $hA_{2A}R$ (PDB : 3UZC)

Première hypothèse du mode de liaison : INVALIDÉE

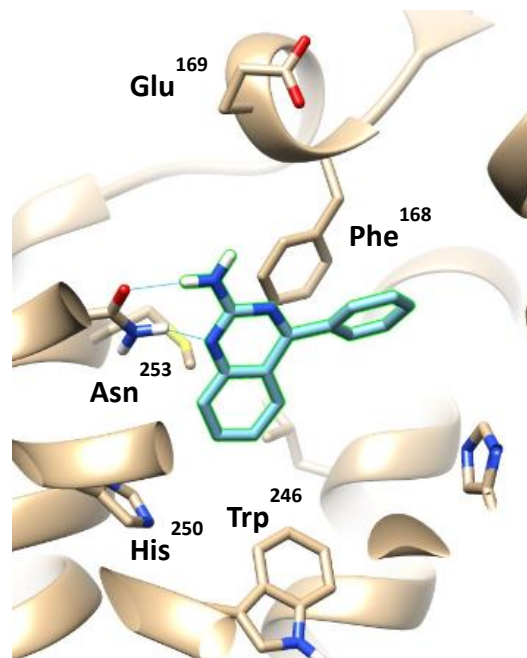
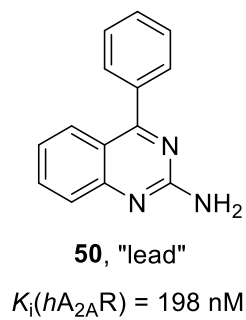


Figure 50. Invalidation de la première hypothèse du mode de liaison du composé 50

D'une manière inattendue, l'identification du composé **64** a été à l'origine d'une seconde hypothèse concernant le mode de liaison de nos composés quinazoliniques. En effet, une autre hypothèse pouvant justifier les relations structure-affinité précédemment obtenues a été émise.

2. Un nouveau mode de liaison envisagé

À la suite des relations structure-affinité précédemment obtenues (*cf.* **Tableau 9, p89**), un retour à la modélisation moléculaire a été nécessaire. Le gain d'affinité observé pour le composé **64** ($K_i h(A_{2A}R) = 89$ nM) a été à l'origine d'une seconde hypothèse concernant le mode de liaison de nos composés quinazoliniques. En effet, des études de docking supplémentaires ont été effectuées sur ce composé. Elles ont montré un mode de liaison très similaire à celui de l'antagoniste de référence, le ZM-241385 (**Figure 51**). La ressemblance entre ces deux modes de liaison (**Figure 51, A et B**) a été à l'origine de notre seconde hypothèse.

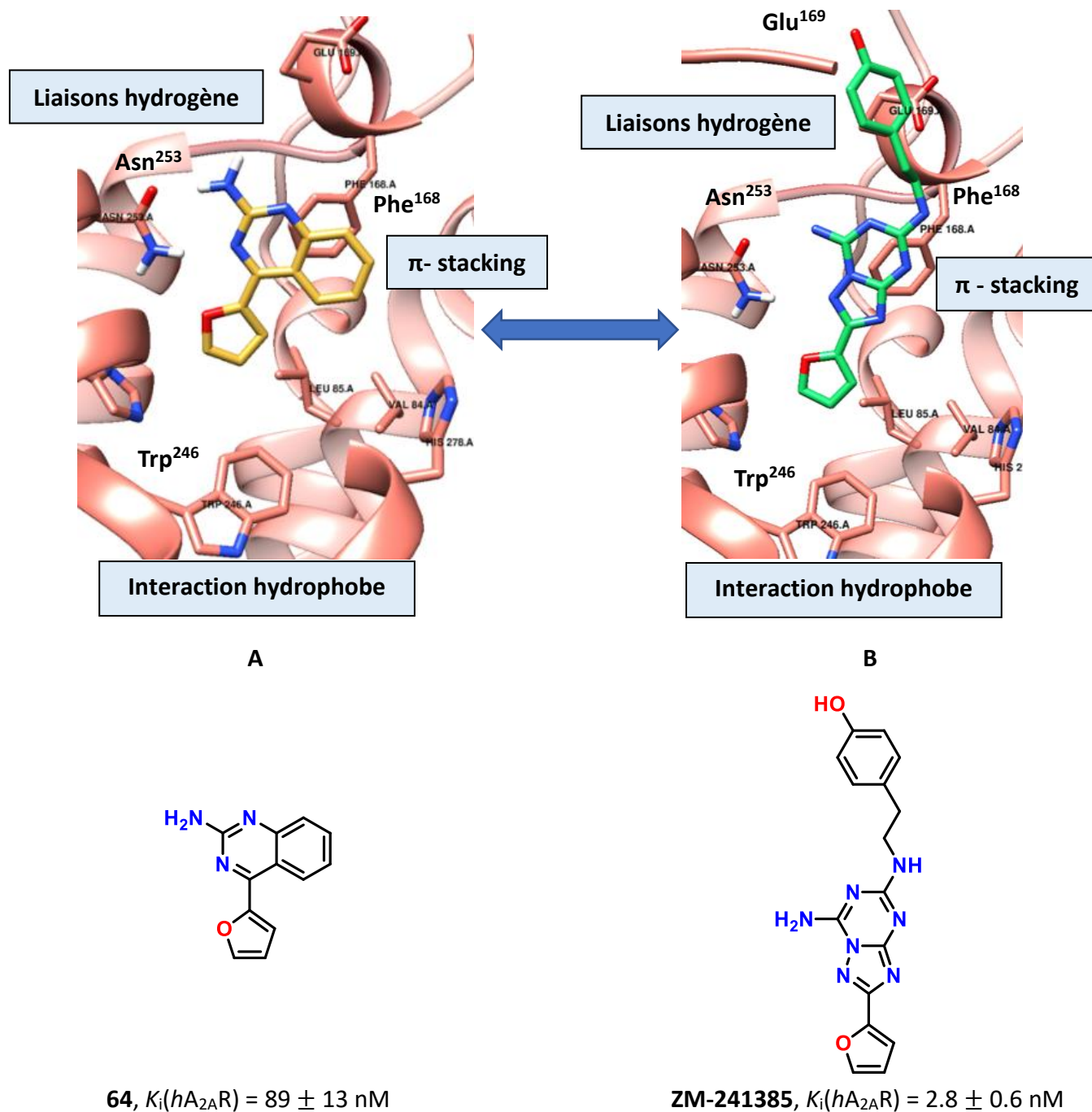


Figure 51. Seconde hypothèse basée sur la pose de docking du composé 64 (A) et sur la structure co-cristallisée du ZM-241385 (B) (PDB : 3EML)

Cette deuxième hypothèse repose donc sur le fait que nos composés quinazoliniques interagiraient au sein du récepteur dans une « position inversée » par rapport à notre première hypothèse (*cf.* **Figure 45, p77**). Cette nouvelle hypothèse est basée sur la structure co-cristallisée du ZM-2431385 (PDB : 3EML) qui présente une poche de liaison plus restreinte que la structure co-cristallisée du ligand triazine utilisée jusqu'à présent. À la suite des relations structure-affinité précédemment obtenues, il est apparu que cette structure co-cristallisée était peut-être plus pertinente que la structure co-cristallisée avec le ligand triazine pour prédire et comprendre le mode de liaison de nos composés quinazoliniques. En effet, dans cette « position inversée », le substituant en position 4 est orienté vers le bas de la poche du récepteur. Or, les dimensions de cette poche sont relativement restreintes. Par conséquent, les groupements volumineux étudiés dans le cadre des modulations en position 4 (*cf.* **Tableaux 8 & 9, p87 et p89**) ont pu engendrer des « clashes stériques » importants conduisant à une perte de l'affinité.

Dans cette seconde hypothèse (**Figure 51, A**), on retrouverait donc le groupement aromatique en position 4 qui interagirait non plus avec la Phe¹⁶⁸ par π -stacking mais avec le Trp²⁴⁶ se situant en bas de la poche et ce, par interaction hydrophobe. L'amine primaire aromatique interagirait toujours avec l'Asn²⁴⁶ par liaison hydrogène. L'hétérocycle quinazoline interagirait, quant à lui, par interaction π -stacking avec la Phe¹⁶⁸.

Cette nouvelle approche nous a permis d'identifier de nouvelles positions pouvant être modulées. Ainsi, les positions 6, 7 et 8 ont été fonctionnalisées de différentes façons (**Figure 52**).

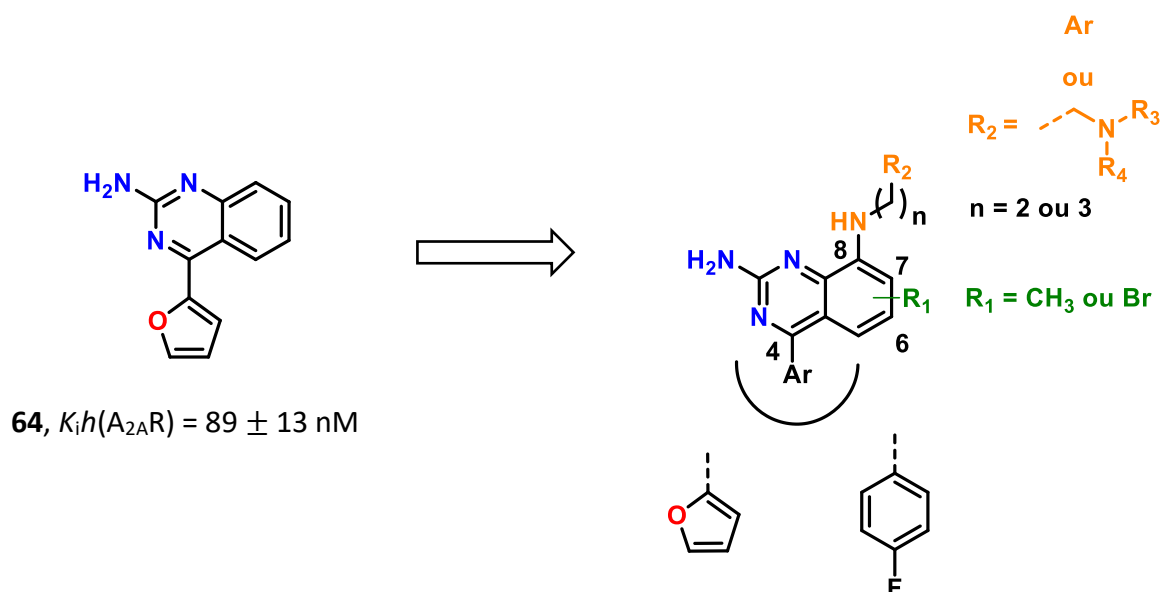


Figure 52. Pharmacomodulations autour du composé 64

- Les modulations effectuées en **position 6 et 7** avaient pour objectif d'explorer la poche hydrophobe précédemment identifiée et non explorée par le ZM-241385. Dans un premier temps, ce sont des groupements de faible impact stérique qui ont été étudiés (méthyle et brome).
- Les modulations effectuées en **position 8** ont consisté essentiellement en l'ajout de différentes chaînes *N*-alkyles amines. Ces dernières ont un double objectif. D'une part, elles permettent de moduler les propriétés pharmacocinétiques et notamment la solubilité du fait de la présence d'une amine tertiaire salifiable. D'autre part, elles permettraient d'améliorer l'affinité et la sélectivité en explorant le haut de la poche orthostérique du récepteur en interagissant potentiellement avec certains acides aminés clés, dont le Glu¹⁶⁹ par interaction ionique. Les études de modélisation moléculaire ont montré que pour le composé **64** une chaîne de longueur $n=3$ était optimale. Les modulations effectuées en position 8 font écho au travail de modulation effectué par Romain Duroux sur le composé chef de file (**cf. Tableau 6, p79**). C'est donc dans cette direction que se sont poursuivis mes travaux de recherche. Les résultats précédemment obtenus ainsi que cette nouvelle stratégie de modulation m'ont permis d'obtenir le prix de la meilleure communication orale lors de la *Drug Discovery Day*, à Lille.

La nouvelle hypothèse de liaison (cf. Figure 51, p94) nous a donc permis de concevoir deux autres séries de composés : série II et III (Figure 53).

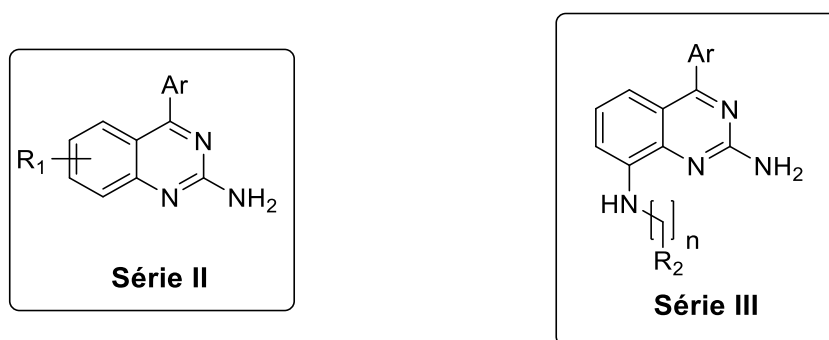
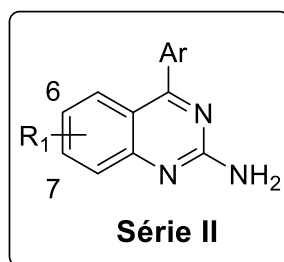


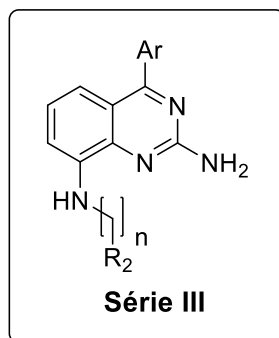
Figure 53. Structures des composés des séries II et III

Les différentes modulations envisagées sont rapportées dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 10 & 11) :



N°	Ar	R ₁	N°	Ar	R ₁
-		6-Br	-		6-CH ₃
79		6-Br	80		6-CH ₃
-		7-Br	81		7-CH ₃
-		7-Br	-		7-CH ₃

Tableau 10. Modulations envisagées dans le cadre de la série II



N°	Ar	n	R ₂
96		2	
97		3	
98		-	

Tableau 11. Composés synthétisés dans le cadre de la série III

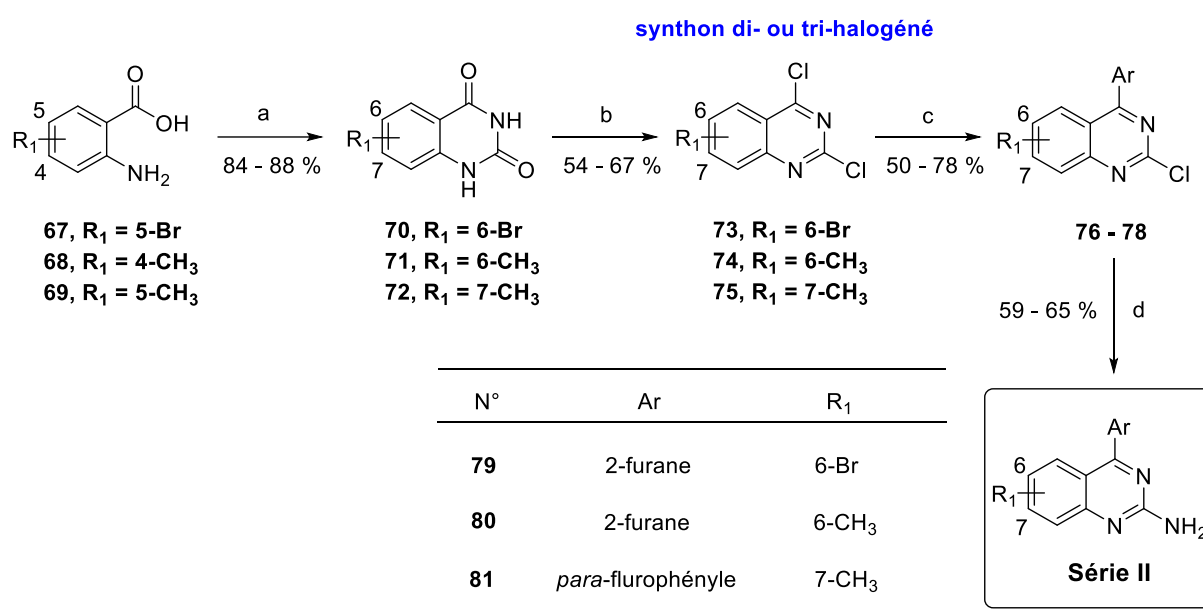
➤ **Remarques :**

En raison de la crise sanitaire due à la pandémie de COVID-19, l'ensemble des composés envisagés dans le cadre de la **série II** n'a pas pu être synthétisé lors de la rédaction de ce manuscrit.

IV. Synthèse des molécules cibles des séries II et III

1. Synthèse des molécules de la série II

La stratégie de synthèse qui a été utilisée pour les molécules de la **série II** est similaire à celle précédemment développée pour les modulations effectuées en position 4 (**série I**). Elle permet d'obtenir en quatre étapes les composés de la **série II (Schéma 18)** :



Réactifs et conditions : a) urée (10.0 éq.), 160 °C ; b) POCl₃ (7.0 éq.), reflux ; c) ArB(OH)₂ (1.10 éq.), K₂CO₃ (2.00 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/eau, 40 °C ; d) éthanol saturé en ammoniac, tube scellé, 110 °C.

Schéma 18. Synthèse des composés de la série II

À partir des acides anthraniliques commerciaux et convenablement substitués **67-69**, un chauffage à fusion de l'urée permet d'obtenir avec de bons rendements les quinazolinédiones correspondantes **70-72**.^(118,119) Une réaction de chloration de ces quinazolinédiones est réalisée par chauffage au reflux du POCl₃ pour conduire aux plateformes di- et tri- halogénées **73-75**.⁽¹²⁰⁾ Contrairement à la réaction de chloration précédemment décrite (*cf.* **Schéma 15, p84**), l'ajout d'une base n'a pas été nécessaire car le temps de réaction est court et est associé à de bons rendements. Une réaction pallado-catalysée de type Suzuki,

dans les conditions décrites précédemment (*cf.* **Schéma 16, p85**), est effectuée en position 4 pour conduire après purification sur colonne chromatographique aux dérivés monosubstitués **76-78**. De plus, pour limiter la formation de composés di- ou tri- substitués, un goutte-à-goutte d'une solution d'acide boronique dans le dioxane est réalisé. L'amine primaire en position 2 est formée par action d'une solution d'éthanol saturée en ammoniac en tube scellé. Les molécules cibles **79-81** (*cf.* **Tableau 10, p97**) sont obtenues avec des rendements compris entre 59 et 65 %.

2. Synthèse des molécules de la série III

2.1 Approche rétrosynthétique

Pour préparer les composés de la **série III**, une analyse rétrosynthétique a été effectuée à partir de l'acide 2-amino-3-bromobenzoïque. Elle est rapportée sur le **schéma 19**.

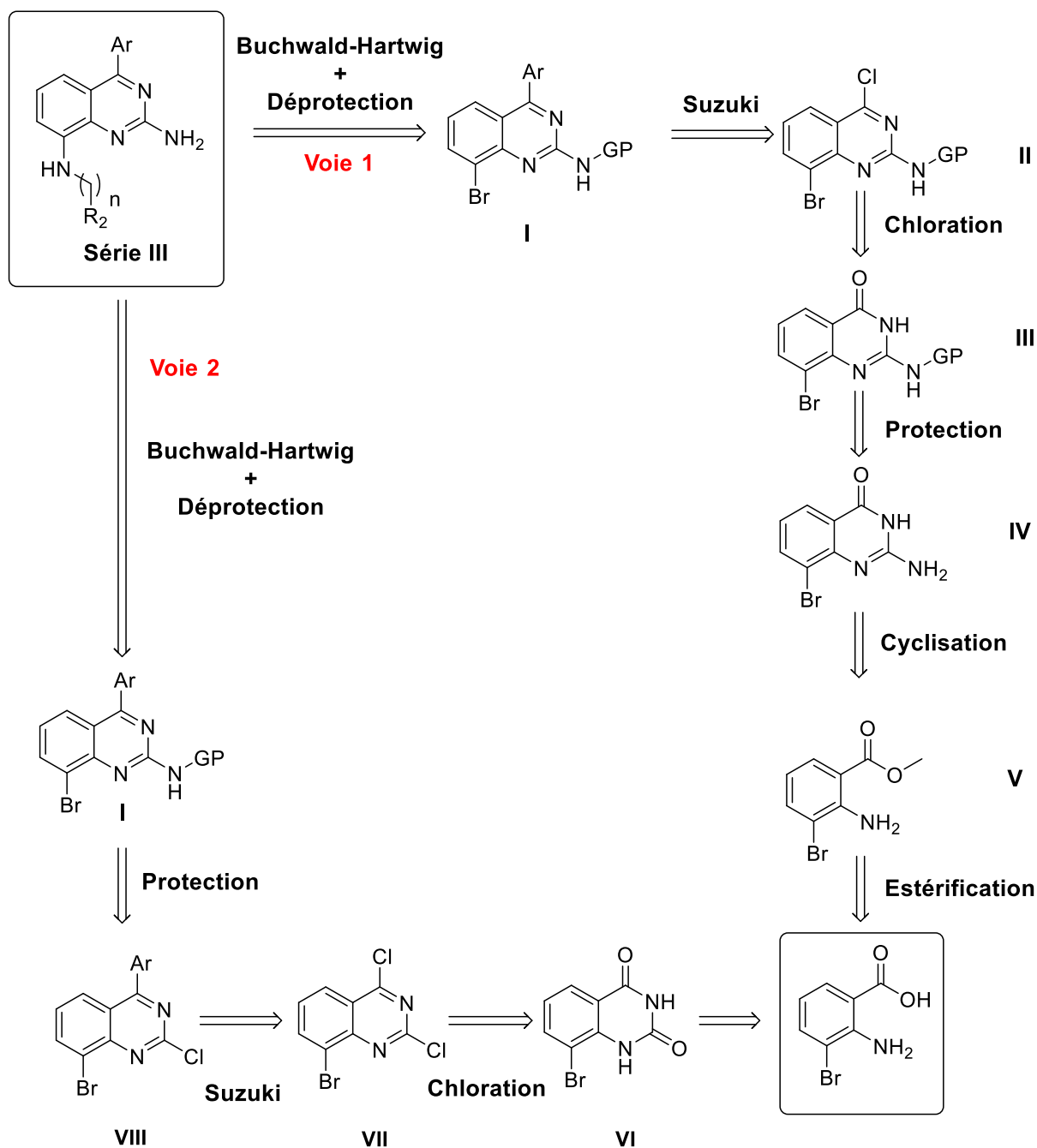


Schéma 19. Voies rétrosynthétiques pour l'obtention des composés de la série III

À la lecture du **schéma 19**, les composés de la **série III** peuvent être obtenus selon deux voies rétrosynthétiques :

○ **Voie 1**

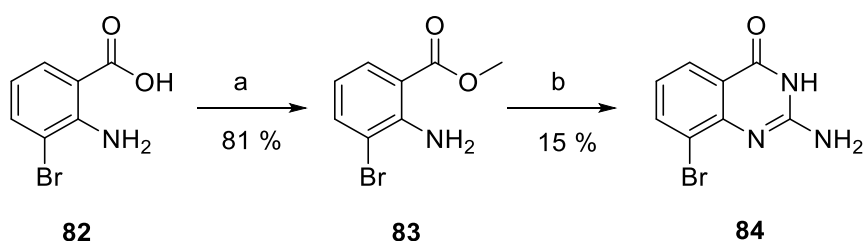
Cette voie permet l'obtention des composés de la **série III** à la suite d'une réaction pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig et de déprotection sur le composé **(I)**. Ce dernier peut être obtenu par une réaction pallado-catalysée de type Suzuki sur le composé **(II)**. Le dérivé dihalogéné **(II)** peut, quant à lui, être obtenu à la suite d'une réaction de protection et de chloration du composé **(IV)**. Enfin, le composé **(IV)** peut être obtenu après une réaction de cyclisation de l'ester **(V)**, lui-même obtenu après estérification de l'acide 2-amino-3-bromo benzoïque.

○ **Voie 2**

Cette voie permet l'obtention des composés cibles de la **série III**. De manière similaire à la voie 1, l'utilisation du composé **(I)** est requise. En revanche, ce dernier peut être obtenu à partir de la plateforme trihalogénée **(VIII)**. La synthèse de cette plateforme fait appel à la chimie précédemment mise au point et peut être effectuée à partir de l'acide 2-amino-3-bromo benzoïque.

2.2 Essais d'obtention des molécules de la série III – Voie 1

D'après le **schéma 19**, les composés de la **série III** peuvent être préparés par réaction d'estérification de l'acide 2-amino-3-bromobenzoïque **82** suivie d'une réaction de cyclisation en présence de cyanamide d'hydrogène. Ces deux réactions sont décrites dans le **schéma 20**.



Réactifs et conditions : a) *i*) SOCl₂ (15.0 éq.), *ii*) MeOH ; b) H₂NCN (3.0 éq.), HCl (12 M), dioxane, 90 °C.

Schéma 20. Synthèse du composé 84

Le composé **83** est synthétisé en une étape. L'acide 2-amino-3-bromobenzoïque **82** commercialement disponible est activé sous la forme d'un chlorure d'acide par action du chlorure de thionyle à température ambiante.⁽¹²¹⁾ Après évaporation, l'ajout de méthanol permet d'obtenir l'ester correspondant **83** avec un rendement de 81 %. La 2-amino-8-bromoquinazolinone **84** est obtenue avec un faible rendement de 15 % par une réaction de cyclisation en présence de cyanamide d'hydrogène et en milieu acide.⁽¹²²⁾ Le mécanisme réactionnel proposé de cette cyclisation est décrit dans le **schéma 21** ci-dessous :

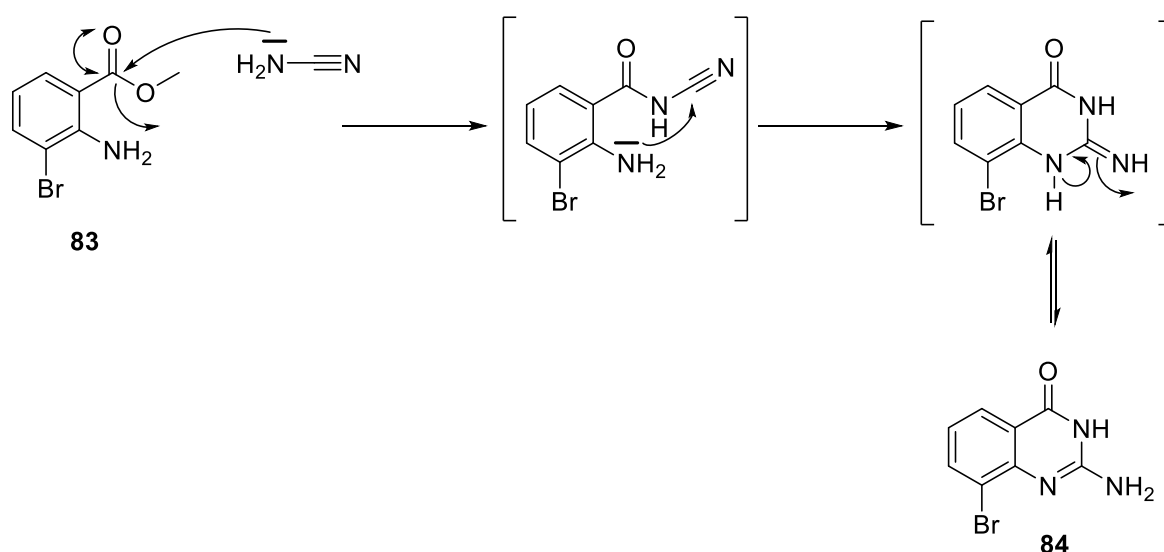


Schéma 21. Mécanisme réactionnel conduisant au composé 84⁽¹²²⁾

Cette étape de cyclisation effectuée dans les conditions du **schéma 20** est basée sur les travaux de thèse de Séverine Ravez.⁽¹²²⁾ En effet, elle a montré que dans ces conditions, la cyclisation du 2-amino-4,5-diméthoxybenzoate de méthyle conduit à la 2-amino-4,5-diméthoxyquinazolinone correspondante avec un rendement de 96 %. Par conséquent, la nature des substituants doit jouer un rôle important dans la réaction de cyclisation.

Face au faible rendement de cette étape de cyclisation sur notre dérivé, des travaux d'optimisation ont été entrepris (**Tableau 12**).

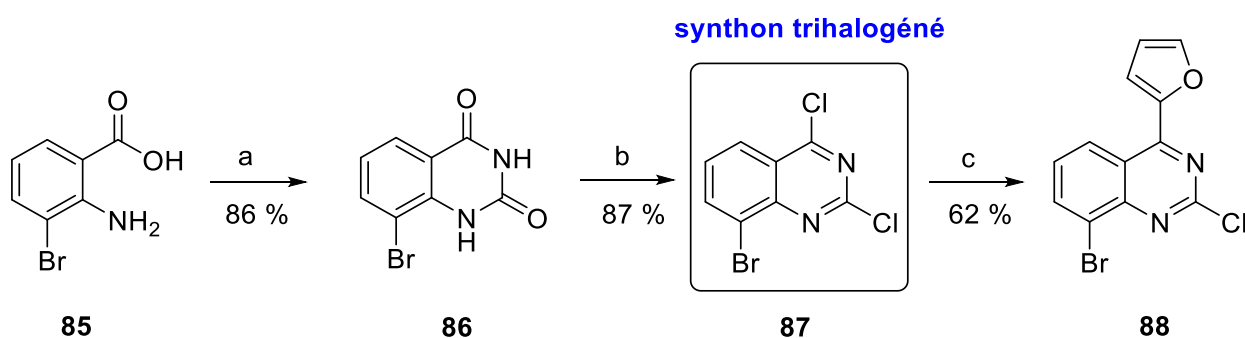
Essai	Conditions	Observation
1	Cyanamide (3.0 éq.), quelques gouttes HCl (12 M) Réaction de fusion (60 °C)	Dégradation du milieu réactionnel
2	Cyanamide (3.0 éq.), quelques gouttes HCl 12 M, toluène, reflux	Matière première

Tableau 12. Essais d'optimisation de la réaction de cyclisation

Ces essais n'ont pas permis d'identifier des conditions de synthèse optimales. C'est pourquoi nous avons choisi de développer la deuxième voie de synthèse (*cf.* Schéma 19, p101). Il est à noter que nous n'avons pas étudié la nature de l'ester tout comme d'autres méthodes de synthèse pour parvenir dans de meilleurs rendements au composé **84**.

2.3 Synthèse des molécules de la série III – Voie 2

Les premières étapes de synthèse rapportées dans le schéma 22 conduisent à la formation d'un synthon trihalogéné clé **87**.



Réactifs et conditions : a) urée (10.0 éq.), 160 °C ; b) POCl₃ (7.0 éq.), reflux ; c) acide 2-furanboronique (1.20 éq.), K₂CO₃ (2.00 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/eau, 40 °C.

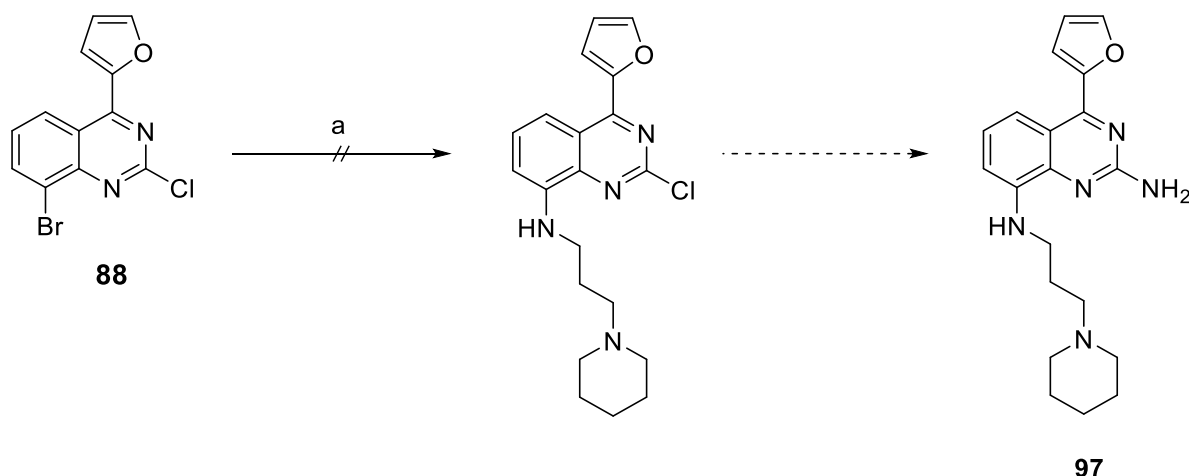
Schéma 22. Synthèse du synthon trihalogéné clé **87**

Pour cette deuxième voie de synthèse et de façon identique à la synthèse des composés **79-81** (*cf.* p99), un chauffage à fusion de l'urée en présence de l'acide 2-amino-3-bromobenzoïque **85** permet d'obtenir de manière quantitative la quinazolinedione correspondante **86**.⁽¹²³⁾ Une réaction de chloration du composé **86** est réalisée par chauffage

au reflux du POCl_3 pour conduire au synthon trihalogéné clé **87**.⁽¹²⁴⁾ Enfin, une réaction pallado-catalysée de type Suzuki est réalisée en position 4, selon les conditions décrites précédemment (cf. **Schéma 18**, p99), pour conduire majoritairement au composé monosubstitué **88**.

➤ **Remarques :**

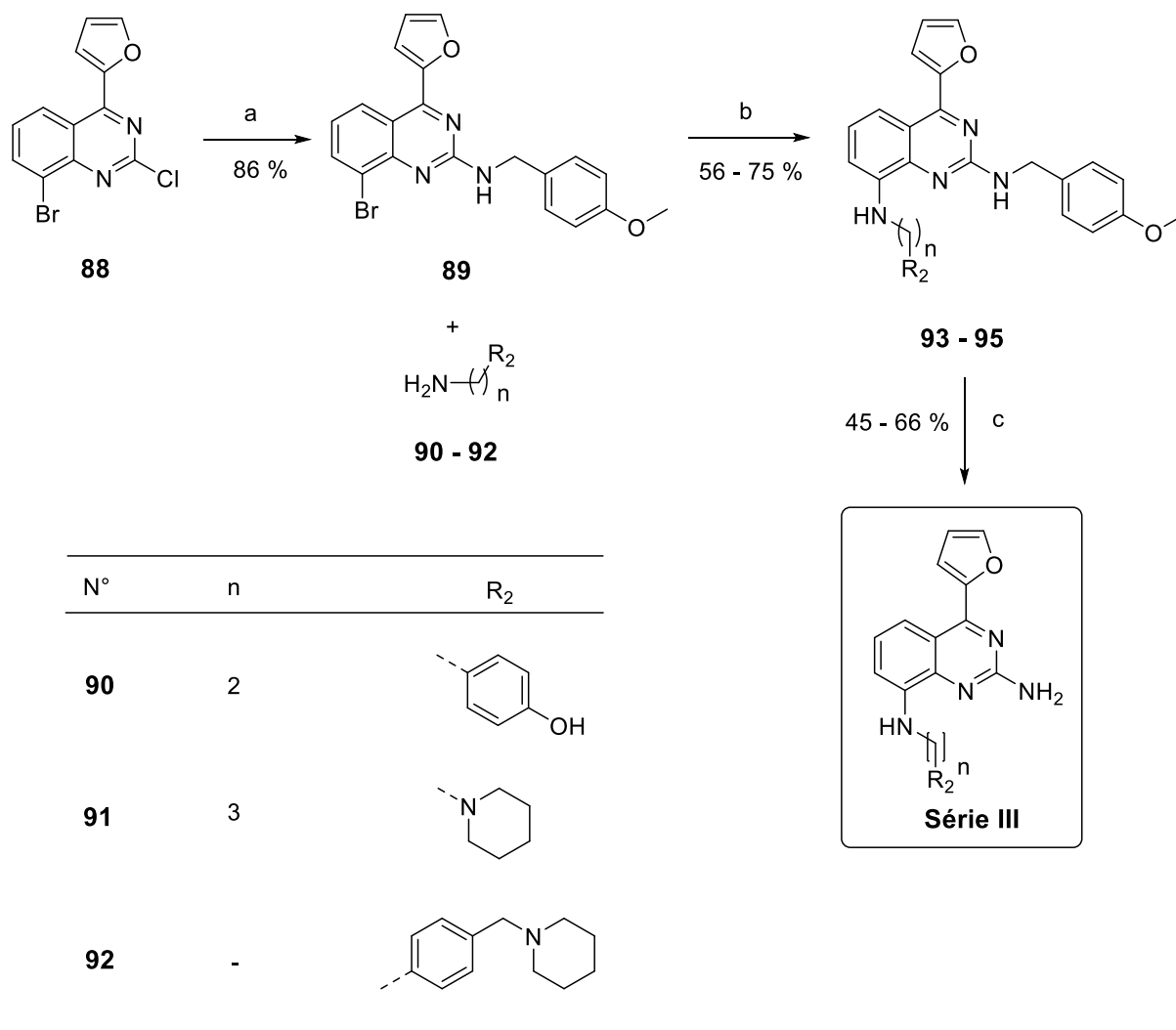
- Pour les composés de la **série III** : seul le groupement furane en position 4 a été étudié. Cependant, il est à souligner que pour les meilleurs composés de cette série, qui est toujours en cours de développement, la modulation du furane par le *para*-fluorophényle sera envisagée.
- Des essais de fonctionnalisation en position 8 ont été menés directement sur le composé dihalogéné **88** mais sans succès. Ces derniers ont consisté en une réaction pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig avec une chaîne *N*-alkyle pipéridine commercialisée (**Schéma 23**). L'objectif était de venir fonctionnaliser de manière sélective la position 8. Un mélange de plusieurs produits a été obtenu mais en raison des difficultés pour le purifier, les composés formés n'ont pas pu être isolés et caractérisés.



Réactifs et conditions : a) NaOtBu (3.0 éq.), BINAP (0.2 éq.), 3-(1-pipéridinyl)-1-propanamine (1.0 éq.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.2 éq.), dioxane, 120 °C, tube scellé.

Schéma 23. Essai de fonctionnalisation du composé **88** par réaction de Buchwald-Hartwig

Face à cette difficulté, nous sommes passés par une étape de protection de l'amine primaire en position 2 (**Schéma 24**).



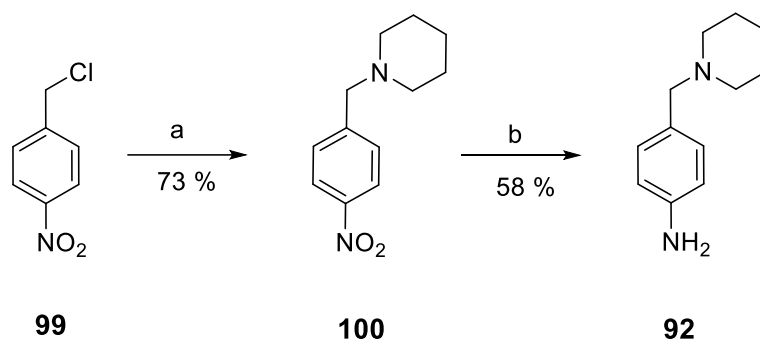
Réactifs et conditions : a) 4-méthoxybenzylamine (2.0 éq.), DIPEA (2.5 éq.), dioxane, 110 °C, tube scellé ; b) $H_2N(CH_2)_nR_2$ (1.2 éq.), $Pd(OAc)_2$ (0.2 éq.), BINAP (0.2 éq.), NaOtBu (3.0 éq.), dioxane, 120 °C, tube scellé ; c) TFA.

Schéma 24. Synthèse des molécules de la série III

Une réaction de substitution nucléophile régiosélective est effectuée en position 2 par action de la *para*-méthoxybenzylamine conduisant au composé **89** avec un rendement de 86 %.⁽¹²⁵⁾ Cette réaction présente un réel avantage dans la mesure où elle nous permet d'apporter directement l'amine sous forme protégée. Une réaction pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig est effectuée en utilisant principalement des chaînes *N*-alkyles amines

commercialisées (**90** et **91**). La synthèse de la chaîne **92** est décrite dans le **schéma 25**. Les composés de la **série III** sont obtenus à la suite d'une réaction de déprotection de la *para*-métoxybenzylamine dans le TFA à température ambiante.

- **Synthèse du composé 92**



Réactifs et conditions : a) pipéridine (1.2 éq.), Et₃N (1.2 éq.), acétone, reflux ; b) H₂NNH₂.H₂O (1.5 éq.), Nickel de Raney, éthanol, 25 °C.

Schéma 25. Synthèse du composé 92

Une réaction de substitution nucléophile est effectuée entre le 1-(chlorométhyl)-4-nitrobenzène commercialisé et la pipéridine pour conduire au composé **100** avec un rendement de 73 %. Ce dernier est ensuite réduit par action de l'hydrazine monohydrate, en présence de Nickel de Raney pour conduire au composé **92** avec un rendement de 58 %.

➤ **Remarques :**

Dans le but de diminuer le temps de réaction de la déprotection de la *para*-métoxybenzylamine (72h), des essais d'optimisation ont été envisagés. Ceux-ci n'ont pas permis d'identifier de conditions de déprotection optimales (**Tableau 13**).

Essai	Conditions	Observation
1	TFA (5.0 éq.), Dichlorométhane, température ambiante, 72 h	Matière première
2	TFA (5.0 éq.), 80 °C, 1 h et 2 h	Dégradation
3	Hydrogénation catalytique Pd/C (10 %), MeOH/THF	Matière première

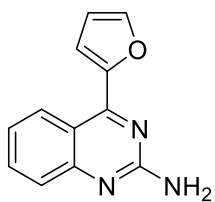
Tableau 13. Essais d'optimisation de la réaction de déprotection

V. Évaluation pharmacologique des molécules des séries II et III

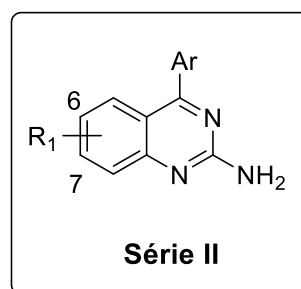
1. Relations structure-affinité

- **Objectifs :** Pour rappel, deux autres séries quinazoliniques ont été étudiées et sont basées sur les relations structure-affinité de la **série I**. La **série II** a pour objectif d'explorer la poche hydrophobe en modulant les positions 6 et 7 (faible impact stérique). La **série III** a un double objectif : améliorer l'affinité et moduler les propriétés pharmacocinétiques de nos composés, en particulier la solubilité avec la présence d'une amine tertiaire salifiable.

Nous avons choisi de rapporter successivement, dans les **tableaux 14** et **15**, les résultats pharmacologiques des composés actuellement synthétisés.



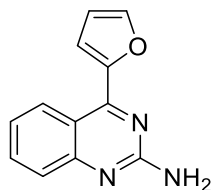
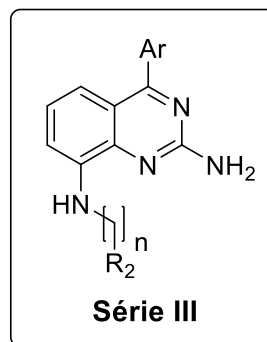
64, $K_i(hA_{2A}R) = 89 \pm 13$ nM



N°	R ₁	Ar	hA_{2A} (K_i nM) ^a	clogP ^b
79	6-Br		20 ± 5	3.4
80	6-CH ₃		22 ± 7	3.0
81	7-CH ₃		141 ± 12	3.8

a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(hA_{2A}R) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel *ChemDraw Professional v16.0*.

Tableau 14. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série II pour $hA_{2A}R$


64, $K_i(hA_{2A}R) = 89 \pm 13$ nM


N°	Ar	n	R ₂	hA_{2A} (K_i nM) ^a	clogP ^b
96		2		2200 ± 350	4.4
97		3		1400 ± 235	4.7
98		-		4700 ± 265	5.8

a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(hA_{2A}R) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel *ChemDraw Professional v16.0*.

Tableau 15. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série III pour $hA_{2A}R$

o [Résultats préliminaires de la série II \(Tableau 14\)](#)

À la différence des modulations qui ont été entreprises précédemment en position 4 (cf. **Tableau 9, p89**), des modulations de plus faible impact stérique ont été effectuées en position 6 et 7. On peut observer que les premières modulations qui ont été entreprises n'affectent pas de façon significative l'affinité pour le $A_{2A}R$. En effet, ces composés conservent une affinité nanomolaire proche de l'affinité du composé **64**. À l'avenir, nous pouvons donc envisager de moduler ces positions par des groupements plus volumineux et pouvant interagir avec des acides aminés de la poche hydrophobe.

o Résultats préliminaires de la série III (Tableau 15)

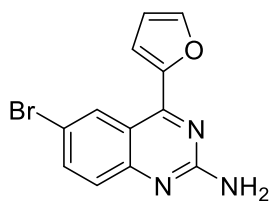
Des modulations avec des chaînes *N*-alkyles amines qui ont déjà fait leurs preuves lors des modulations effectuées par Romain Duroux en position 2 ont été effectuées. À ce jour, les premiers composés de cette série **96-98** ont conduit à une baisse significative de l'affinité pour le A_{2A}R. Il en est de même pour l'analogue structural du ZM-241385 **96**. Cependant, il est à noter que cette série reste à exemplifier pour pouvoir établir des relations structure-affinité plus pertinentes.

o clogP

Comme vu précédemment, la lipophilie théorique de nos composés a été calculée en utilisant le logiciel *ChemDraw Professional v16.0*. Les composés de la **série II** et **III** ont des clogP compris entre 3 et 6. Ce sont des valeurs qui sont légèrement supérieures à celles observées pour les composés modulés en position 4 (**cf. p91**). Toutefois, elles restent encourageantes pour une étude de passage de la BHE sur un modèle *in vitro* ou *in vivo*.

2. Nouvelle structure co-cristallisée du récepteur A_{2A}

Des études cristallographiques ont été menées grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Vadim Cherezov (Département de Chimie – The Bridge Institute) de l'Université de Californie du Sud à Los Angeles. Cette équipe étudie le rôle des lipides dans la structure et la fonction des protéines constituant les membranes biologiques. De plus, ils ont une expertise de renommée mondiale dans le domaine des récepteurs adrénergiques, adénosinergiques et mélatoninergiques notamment. Les travaux conduits par le Dr. Benjamin Stauch et Anna Shiriaeva ont donné lieu à l'obtention d'une nouvelle structure co-cristallisée du A_{2A}R avec le composé **79** et dont la résolution est de 2.5 Å (**Figure 54**).



79, $K_i(hA_{2A}R) = 20 \pm 5$ nM

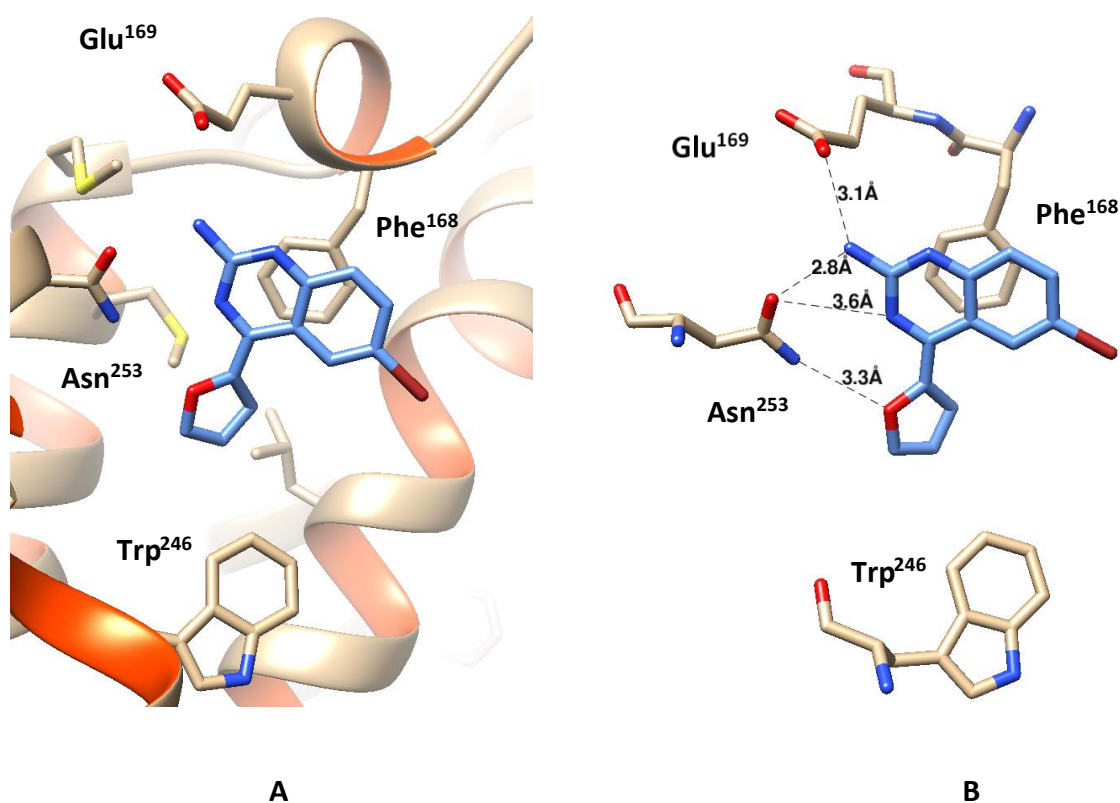


Figure 54. Structure co-cristallisée du récepteur hA_{2A} avec le composé 79 (A) et son mode de liaison (B)

À la lecture de la **figure 54**, l'amine primaire en position 2 interagit par liaisons hydrogènes avec l'Asn²⁵³ et le Glu²⁵⁶. Le furane interagit par liaison hydrogène avec l'Asn²⁵³ et par interaction hydrophobe avec le Trp²⁴⁶. Enfin, l'hétérocycle quinazoline interagit d'une part, avec la Phe¹⁶⁸ par interaction π -stacking et d'autre part, avec l'Asn²⁵³ par liaison hydrogène avec son atome d'azote intracyclique en position 3.

Cette nouvelle structure co-cristallisée nous a donc permis de confirmer le mode de liaison de nos composés quinazoliniques. En effet, ils interagissent bien au sein du récepteur

dans une « position inversée » par rapport à notre première hypothèse (cf. **Figure 45, p77**). De plus, la pose docking sélectionnée pour le composé **79** se superpose de manière quasi-parfaite à sa structure co-cristallisée avec un RMSD de 0.602 Å (**Figure 55**). Par conséquent, notre seconde hypothèse est validée (**Figure 56**).

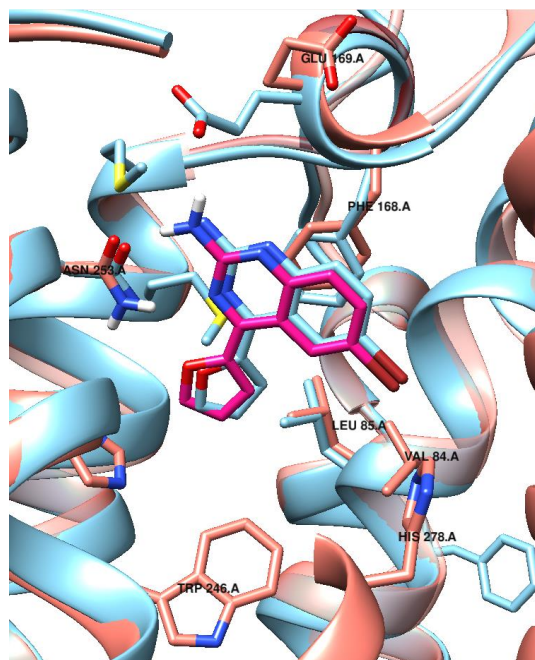


Figure 55. Superposition de la pose docking (PDB : 3EML) de **79** (violet) et de sa pose co-cristallisée (bleue) au sein du récepteur *hA_{2A}*

Deuxième hypothèse du mode de liaison : VALIDÉE

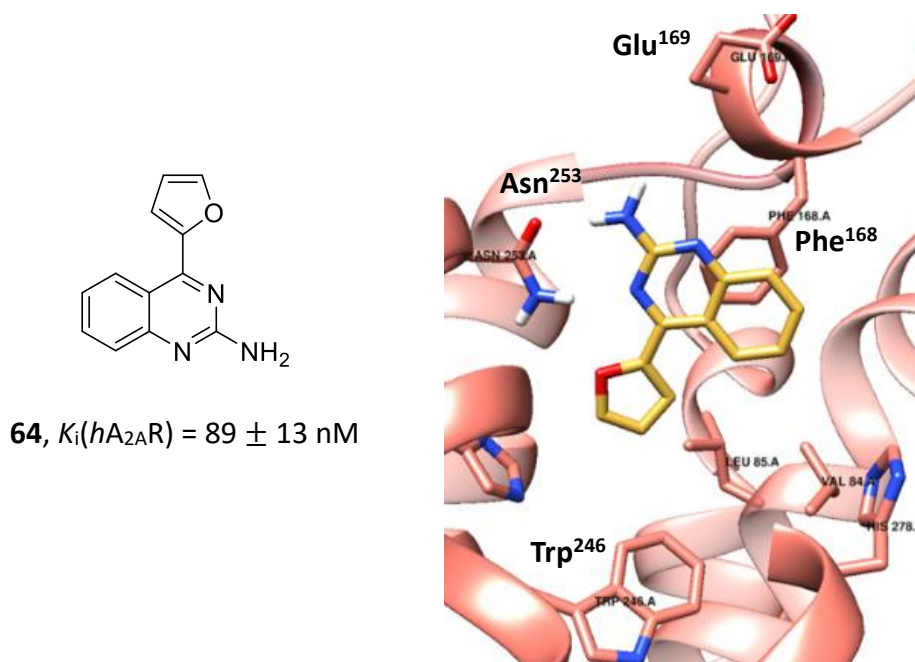


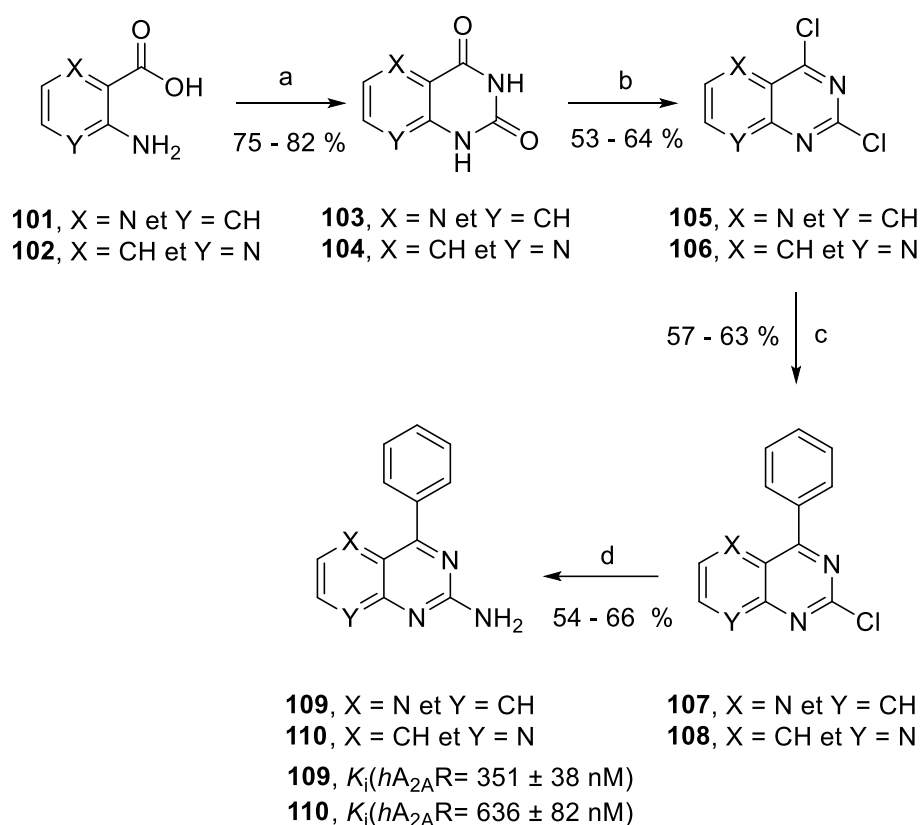
Figure 56. Validation de la deuxième hypothèse

Cette structure cristallographique vient justifier la perte d'affinité observée dans le cadre des modulations effectuées en position 4 (*cf.* **Tableaux 8 & 9, p87 et p89**). En effet, les dimensions de la poche inférieure du récepteur sont relativement restreintes. Par conséquent, des groupements volumineux entraînent des « clashes stériques » importants. Cette structure ouvre également sur de nouvelles perspectives de pharmacomodulations.

3. Nouvelles modulations envisagées

Dans un premier temps, et afin de donner suite à l'obtention de cette nouvelle structure co-cristallisée du $A_{2A}R$, d'autres modulations nous ont été suggérées par l'équipe du Pr. Vadim Cherezov dans le but d'améliorer l'affinité de nos composés et potentiellement leurs sélectivités (*vs* hA_1R notamment). Ces modulations seront présentées dans la conclusion et les perspectives de ce manuscrit.

Dans un deuxième temps et toujours dans l'objectif de moduler les propriétés pharmacocinétiques (notamment la solubilité) de nos composés, d'autres modulations ont été envisagées autour de notre composé chef de file **50**. Ces modulations ont consisté en la synthèse des analogues azaquinazoliques correspondants. À ce jour, deux isomères ont été synthétisés grâce à la chimie précédemment mise au point (**Schéma 26**).



Réactifs et conditions : a) urée (10 éq.), 160 °C ; b) PCl_5 (4 éq.), $POCl_3$ (10 éq.), reflux ; c) $PhB(OH)_2$ (1.00 éq.), $Pd(OAc)_2$ (0.02 éq.), PPh_3 (0.04 éq.), K_2CO_3 (2.00 éq.), dioxane/eau, 40 °C ; d) éthanol saturé en ammoniac, tube scellé, 110 °C.

Schéma 26. Synthèses des analogues azaquinazoliques **109** et **110**

Le composé chef de file **50**, en plus d'avoir une affinité submicromolaire pour le $A_{2A}R$, est une molécule de petite taille et qui a la capacité d'être facilement modulable. Mes derniers travaux ont porté sur la conception et la synthèse de ligands multifonctionnels.

Chapitre 3 :
Ligands duaux ciblant les
récepteurs A_{2A} et mGlu₅

Mon dernier objectif de thèse a consisté à développer une stratégie multifonctionnelle visant à cibler de manière conjointe les récepteurs A_{2A} et mGlu₅ (mGluR₅). Il est aujourd'hui admis qu'une approche multicible présente un avantage thérapeutique majeur dans des pathologies multifactorielles telles que les MNDs. En effet, il n'existe actuellement pas de stratégies médicamenteuses pour la MA et la MP visant à réduire de manière conjointe : les troubles comportementaux, les lésions sous-tendant ces pathologies (synucléinopathie, amyloïdogenèse et tauopathie), la neuroinflammation et la mort neuronale.

Partant d'antagonistes du récepteur A_{2A} développés jusqu'à présent au laboratoire, nous avons évolué dans ce travail vers une stratégie de ligands mixtes. Les récepteurs mGlu₅, et plus particulièrement leurs modulateurs allostériques négatifs, ont suscité notre attention pour plusieurs raisons. Premièrement, ils font l'objet de nombreuses études pour leurs effets bénéfiques dans le cadre des MNDs. Deuxièmement, il existe une ressemblance structurale entre certains modulateurs allostériques négatifs rapportés dans la littérature et les composés quinazoliniques développés durant ces travaux de thèse. La comparaison et la superposition des pharmacophores de ces structures nous ont permis de concevoir et de synthétiser de nouveaux ligands à visée mixte. C'est pourquoi, en plus de l'hétérodimérisation existante entre ces deux récepteurs, nous avons choisi de cibler le récepteur mGlu₅ en plus du récepteur A_{2A}.

Cette stratégie de ligands duaux vise donc à développer des composés agissant en tant qu'antagonistes des récepteurs A_{2A} et en tant que modulateurs allostériques négatifs des récepteurs mGlu₅. Cette approche thérapeutique est d'autant plus innovante qu'elle n'est pas encore rapportée dans la littérature. De plus, c'est la première fois au sein de notre laboratoire que cette stratégie est étudiée.

Le squelette quinazolinique a servi de première base à la conception et à la synthèse de ces ligands mixtes. Ces travaux ont notamment fait appel à la chimie précédemment mise au point au laboratoire (**cf. Chapitre 2**). Dans un second temps, grâce aux relations structure-affinité précédemment obtenues autour de l'hétérocycle quinazolinique, des composés pyrimidiques rassemblant des éléments pharmacophoriques pour les récepteurs A_{2A} et mGlu₅ ont été synthétisés et évalués.

I. La maladie d'Alzheimer : une maladie aux multiples facettes

Comme déjà énoncé dans l'introduction, la MA a été décrite pour la première fois en 1906 par Aloïs Alzheimer. Aujourd'hui, plus de 100 ans après sa découverte et malgré les efforts intenses de la recherche, il n'existe pas de traitements curatifs.

À ce jour, son étiologie n'est pas encore clairement identifiée mais les progrès constants dans la physiopathologie de cette dernière ont permis de mettre en évidence plusieurs hypothèses. En plus des deux lésions principales abordées dans l'introduction (**cf. Figure 3, p6**), la MA résulterait d'un enchevêtrement de plusieurs événements complexes et interconnectés, comme illustrés en **figure 57**, faisant d'elle une maladie neurodégénérative multifactorielle.

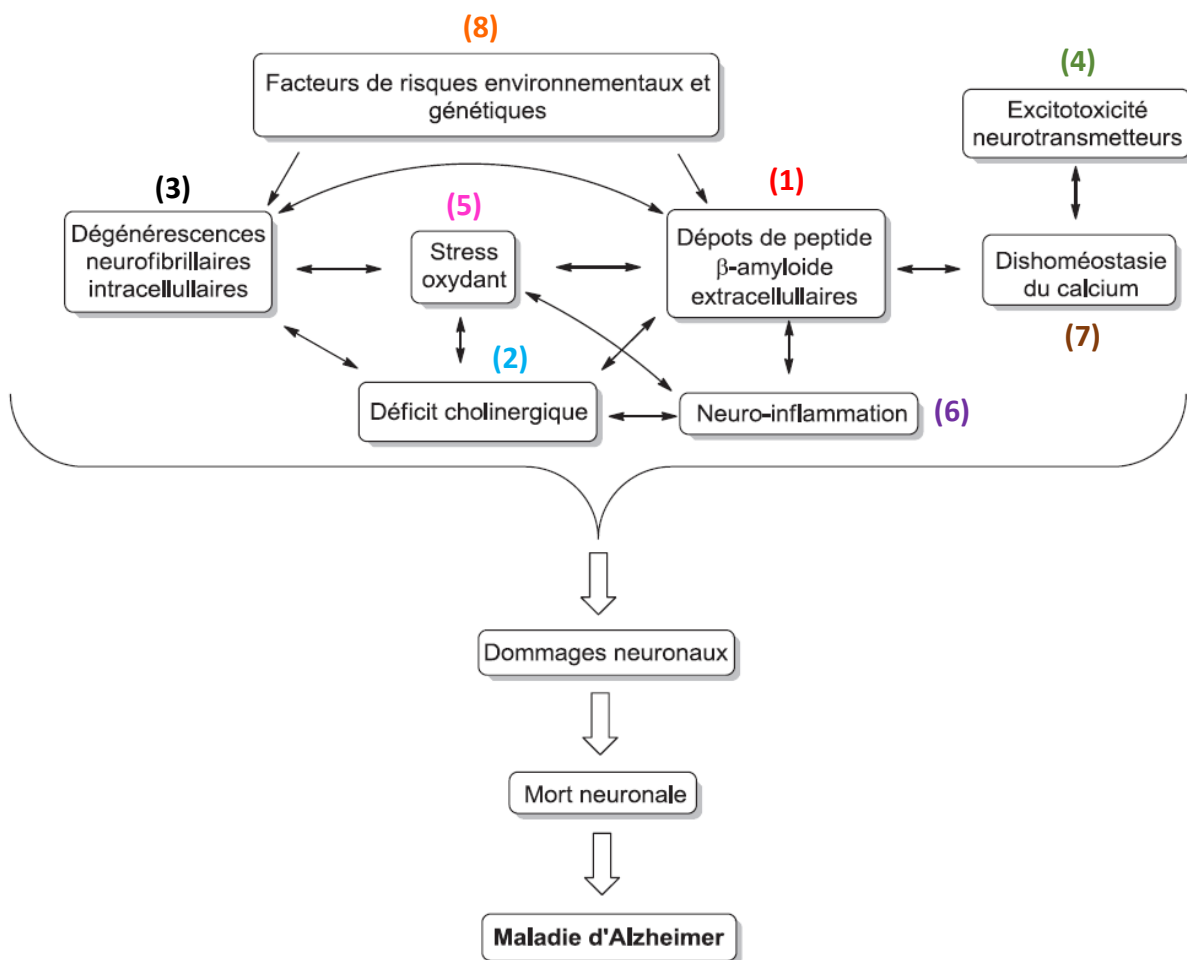


Figure 57. La maladie d'Alzheimer : une maladie multifactorielle

Figure adaptée de Mohamed Benchekroun⁽¹²⁶⁾

Parmi ces événements, nous pouvons citer :

- **La formation de plaques amyloïdes (1)** qui résulte de l'agrégation extracellulaire du peptide β -amyloïde (A β_{40-42}).
- **Un déficit cholinergique (2)** se traduisant par une diminution du taux d'acétylcholine.
- **Les dégénérescences neurofibrillaires (3)** qui résultent de l'agrégation intracellulaire de la protéine Tau hyper- et anormalement phosphorylée.
- **L'excitotoxicité de certains neurotransmetteurs (4)** comme le glutamate.
- **Le stress oxydatif (5)** qui est une perturbation de l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres et peroxydes) et les défenses antioxydantes.⁽¹²⁷⁾ Ce phénomène fait l'objet de nombreux travaux et semble jouer un rôle majeur dans la mort neuronale.^(128,129)
- **La neuroinflammation (6)** qui provoque une inflammation du SNC.
- **L'altération de l'homéostasie calcique (7)** du réticulum endoplasmique.
- **Facteurs environnementaux et génétiques (8) (cf. p5)**

Comme abordé dans l'introduction de ce manuscrit, il existe à ce jour uniquement des traitements symptomatiques face à cette maladie. En effet, ces traitements à visée « **mono-cible** » visent soit le déficit cholinergique (2) par des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, soit l'excitotoxicité du glutamate (4) par un antagoniste des récepteurs NMDA (mémantine). Malheureusement, ils présentent une faible efficacité et sont associés à des effets secondaires importants.

Par conséquent, face à ces difficultés, une nouvelle stratégie thérapeutique appelée stratégie multifonctionnelle ou « **multi-cibles** » suscite un intérêt de plus en plus grandissant.

II. Qu'est-ce que la stratégie multifonctionnelle ?

1. Définition

Jusqu'à la fin du XX^{ème} siècle, la découverte et le développement de substances actives médicamenteuses (SAM) reposaient exclusivement sur le paradigme suivant : « une pathologie est associée à une cible thérapeutique unique » (**Figure 58**).

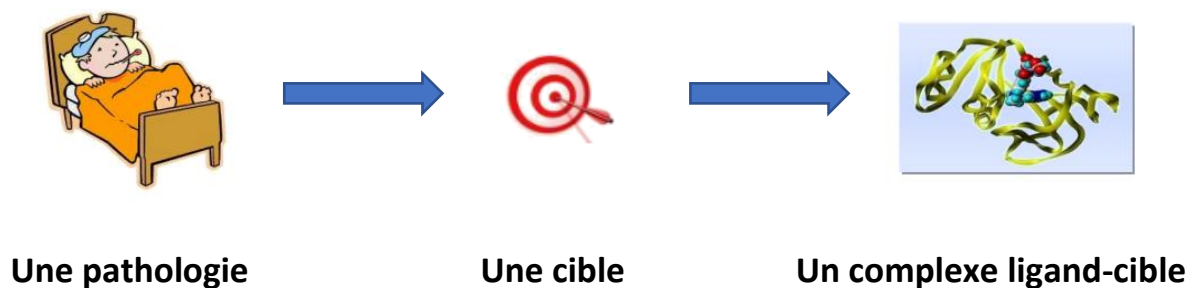


Figure 58. Développement de SAM selon le paradigme traditionnel

Cependant, le manque d'efficacité et les effets indésirables de certains médicaments actuels ainsi qu'une meilleure connaissance de la physiopathologie de certaines maladies ont amené le domaine de la pharmacologie à évoluer et à nuancer ce paradigme. En effet, les progrès dans la connaissance de la pharmacologie permettent de relier certaines pathologies à des mécanismes complexes. De plus, beaucoup de maladies dont l'incidence est élevée, comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer, l'asthme ou encore les MNDs sont le résultat de mécanismes physiopathologiques multiples (*cf. Figure 57, p117*).⁽¹³⁰⁾ Depuis quelques années, il existe donc un intérêt grandissant pour un nouveau concept thérapeutique : la thérapie multifonctionnelle ou « multi-cibles ».

Par définition, une substance active agissant via plusieurs cibles thérapeutiques est dite multifonctionnelle.⁽¹³¹⁾ Une substance active agissant en partie via des mécanismes impliquant des cibles inconnues est aussi appelée multifonctionnelle. Plusieurs termes anglo-saxons sont actuellement rapportés dans la littérature pour décrire de telles substances :

« multi-target drug », « multi-target-directed ligands (MTDLs) », « hybrid drug » ou encore « dual compounds ».

2. Concrètement, comment cela fonctionne ?

Une substance active médicamenteuse multifonctionnelle interagit via différentes cibles thérapeutiques et, comme illustré en **figure 59**, conduit à un effet thérapeutique plus important et potentiellement à des effets synergiques.⁽¹³²⁾

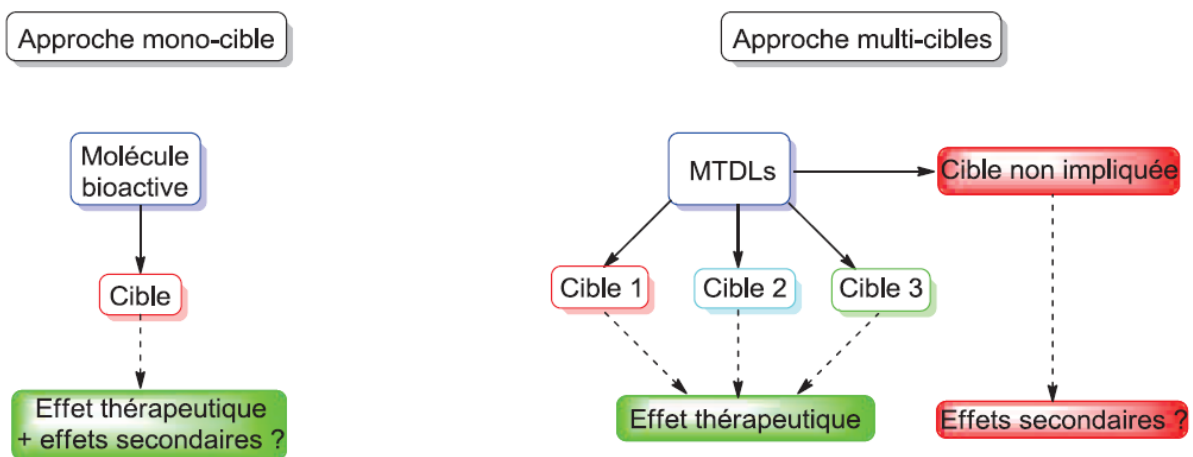


Figure 59. Approche « mono-cible » vs « multi-cibles »^(126,129)

Cependant, comme toutes les substances actives médicamenteuses, l'approche « multi-cibles » peut également être la source d'effets secondaires potentiels en interagissant avec une ou plusieurs cibles non impliquées.^(129,133)

Aujourd'hui, face aux MNDs, l'approche multi-cible est une stratégie thérapeutique alternative reconnue pour ses effets thérapeutiques potentiels et constitue une plus-value dans le développement de candidats-médicaments. De plus, cette approche présente également d'autres avantages thérapeutiques.

3. Stratégie multifonctionnelle : autres avantages thérapeutiques

L'utilisation de composés multifonctionnels présente également d'autres avantages thérapeutiques auprès du patient et qui sont répertoriés ci-dessous (**Tableau 16**) :⁽¹²⁷⁾




Approches médicamenteuses	Observance du patient	Pharmacocinétique	Interactions médicamenteuses
<p>Cocktail de médicaments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs comprimés - Un principe actif par comprimé 	<p>Faible</p>	<p>Complexe</p>	<p>À risque</p>
<p>Médicament multicomposants</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un comprimé - Plusieurs principes actifs par comprimé 	<p>Améliorée</p>	<p>Complexe</p>	<p>À risque élevé</p>
<p>Médicament multifonctionnel</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un comprimé - Un principe actif multifonctionnel 	<p>Améliorée</p>	<p>Prédictible</p>	<p>Risque faible</p>

Tableau 16. Autres avantages thérapeutiques de la stratégie multifonctionnelle

Un médicament multifonctionnel présente de nombreux avantages comme une observance améliorée chez le patient et un risque d'interactions médicamenteuses moindre (**Tableau 16**). Cependant, son développement peut engendrer certaines difficultés comme le

fait d'obtenir une activité suffisamment importante pour chaque cible. De plus, il est nécessaire au préalable d'identifier les cibles thérapeutiques appropriées.

4. Stratégies de développement de ligands multifonctionnels

Le processus de développement de composés multifonctionnels commence par l'identification et la sélection des cibles thérapeutiques appropriées. Ensuite, il existe deux approches principales pour concevoir des ligands multifonctionnels (**Figure 60**) : une approche rationnelle basée sur la connaissance de la cible, qui a été utilisée dans le cadre de mes travaux, ou à l'inverse, une approche indirecte reposant sur une étape de criblage (phénotypique ou moléculaire par exemple)^(134,135) de banques de données ou de diverses chimiothèques.

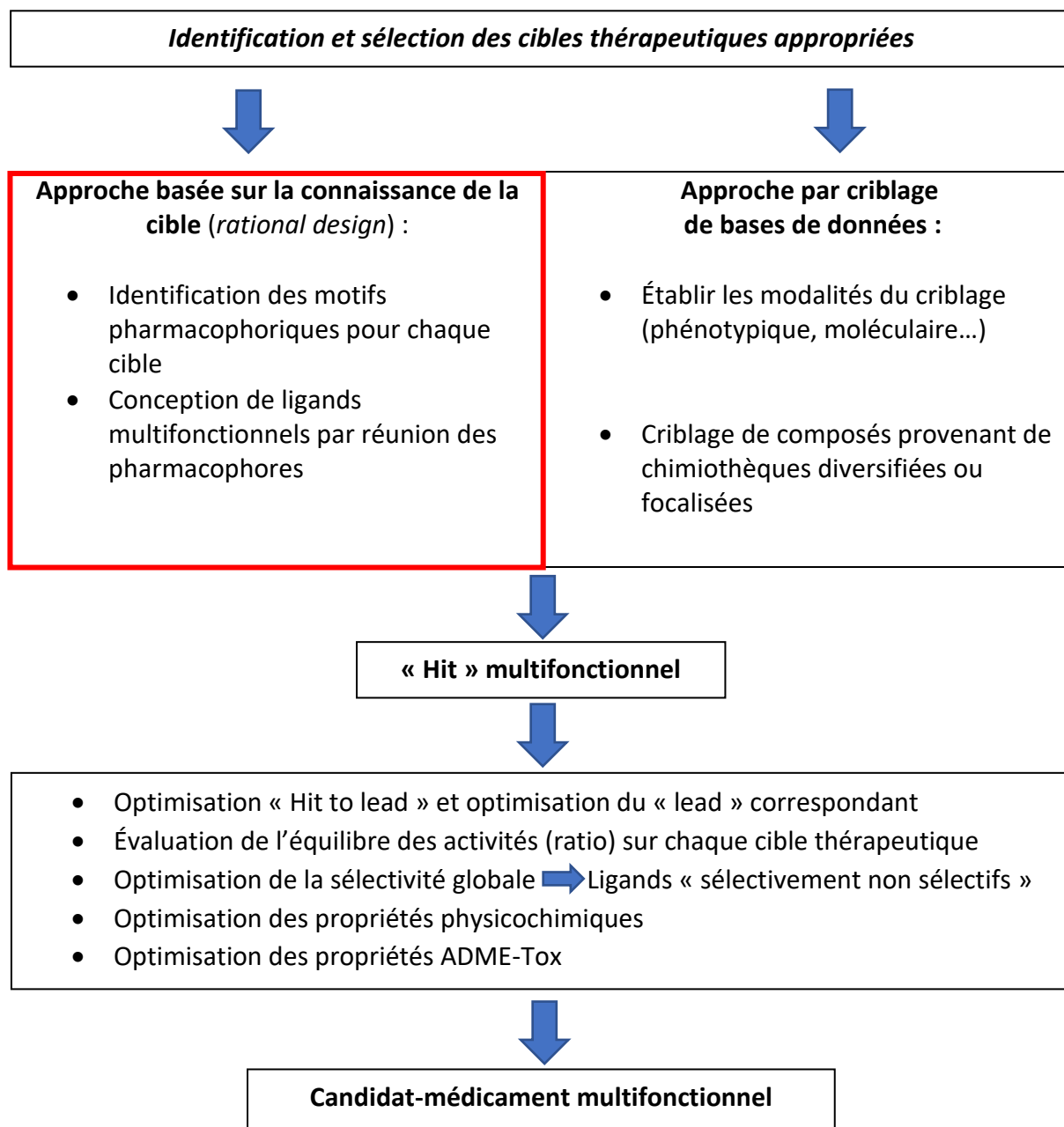
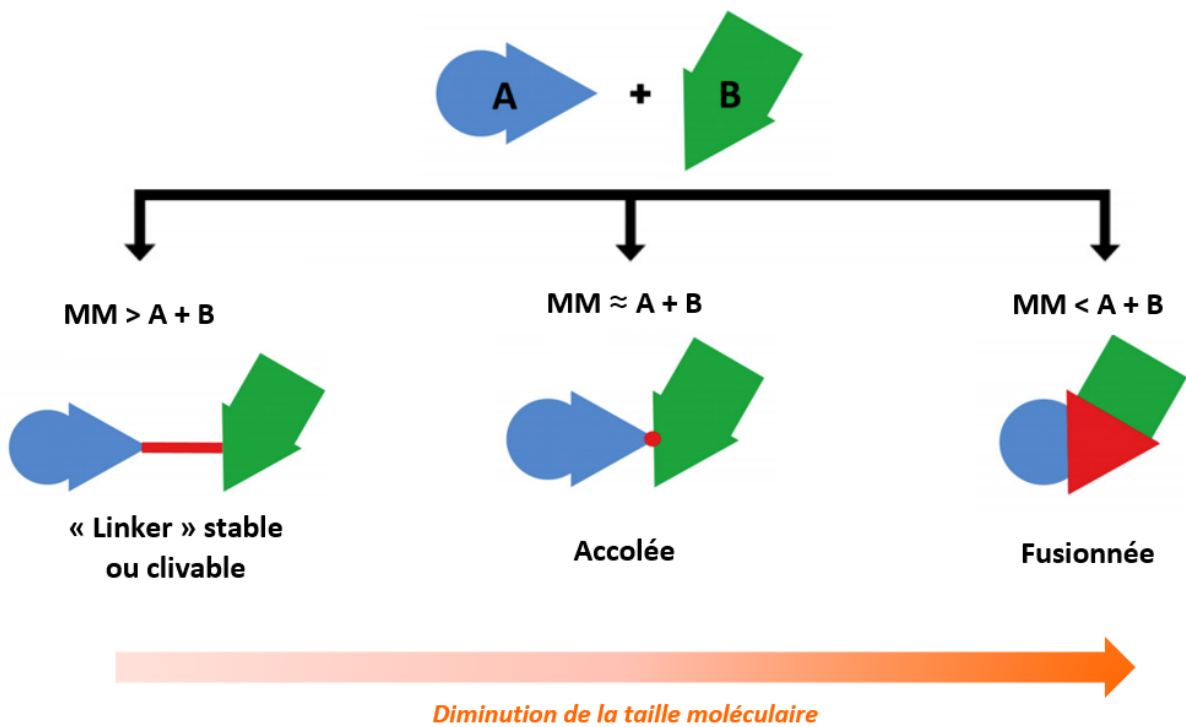


Figure 60. Stratégies de développement de ligands multifonctionnels

5. Conception de ligands duaux par réunion des pharmacophores

Pour concevoir des ligands interagissant potentiellement avec deux cibles thérapeutiques (appelés ligands duaux ou bifonctionnels), il faut réunir dans une seule structure leurs éléments pharmacophoriques respectifs. Pour cela, il existe plusieurs stratégies à partir de deux composés ayant déjà une activité pour chacune de ces cibles (**Figure 61**).



Plus le degré de recouvrement des structures augmente, plus la taille de la molécule et sa complexité diminuent.

Figure 61. Différentes stratégies pour concevoir des ligands duaux

Figure adaptée de Ondrej Benek *et al.*⁽¹²⁷⁾

Trois stratégies principales sont représentées dans la **figure 61** :

- La **première stratégie** utilise un « linker » stable ou clivable entre les deux composés. C'est la stratégie la plus facile à adopter pour des composés qui sont structurellement incompatibles. Cependant, elle conduit à des composés de poids moléculaire élevé. À ce jour, elle a donné naissance à plusieurs composés multifonctionnels mais aucun d'entre eux n'a atteint les phases cliniques.⁽¹²⁷⁾
- La **deuxième stratégie** dite « accolée » est assez similaire à la première stratégie. La principale différence réside dans le fait que les deux composés ne sont pas reliés par un « linker » mais directement liés l'un à l'autre par un seul atome.
- La **troisième stratégie** dite « fusionnée » repose sur un chevauchement des structures plus ou moins important. Elle présente l'avantage de conduire à des composés de plus petite taille (faible poids moléculaire) comparée aux stratégies précédentes. En revanche, elle peut entraîner une modification de l'activité biologique à cause des modifications importantes apportées aux structures d'origine.⁽¹²⁷⁾

III. Des composés multifonctionnels dans le cadre de la maladie d'Alzheimer

Depuis quelques années, cette nouvelle stratégie thérapeutique fondée sur le développement de candidats-médicaments multifonctionnels se révèle être prometteuse pour la MA notamment. À ce jour, on dénombre deux composés (ladostigil et NP-61) ayant été en phases cliniques mais qui en ont été écartés.⁽¹²⁷⁾ Cependant, de nombreuses preuves cliniques sont actuellement en cours d'obtention pour de nombreux autres composés.^(127,136,137)

1. Le ladostigil, un composé bifonctionnel ciblant la MAO et l'ACHÉ

Les monoamine-oxydases (MAO) A et B sont des enzymes à FAD (co-facteur) situées sur la membrane mitochondriale. Elles régulent les niveaux d'amines biogènes comme les catécholamines (noradrénaline, sérotonine, la dopamine...) dans le cerveau et les tissus périphériques en les inactivant par **désamination oxydative** (Schéma 27).⁽¹³⁸⁾

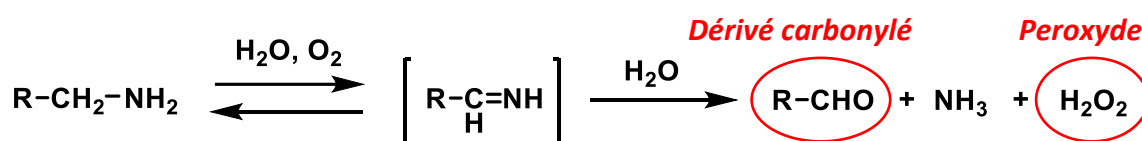


Schéma 27. Réaction de désamination oxydative

Les MAO existent sous deux isoformes (MAO A et MAO B). Elles catalysent la même réaction mais ses isoformes sont sélectives de certains substrats. Par exemple, la MAO B catabolise préférentiellement la dopamine (mais aussi la phényléthylamine, la tryptamine ou la tyramine). Par conséquent, l'inhibition des MAO pourrait stimuler la neurotransmission en limitant le déficit de ces neurotransmetteurs et réduire le stress oxydatif en diminuant la formation de peroxydes.⁽¹³⁹⁾

Le ladostigil a été développé par les laboratoires Avraham Pharmaceuticals et résulte de l'association de la **rivastigmine**, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (IACHÉ) et de la **rasagiline**, un inhibiteur sélectif de la monoamine-oxydase B (IMAO B). Comme illustré en **figure 62**, le ladostigil est issu de la réunion de ces structures selon une stratégie de type « fusionné » (cf. **Figure 61, p124 & Figure 62**).

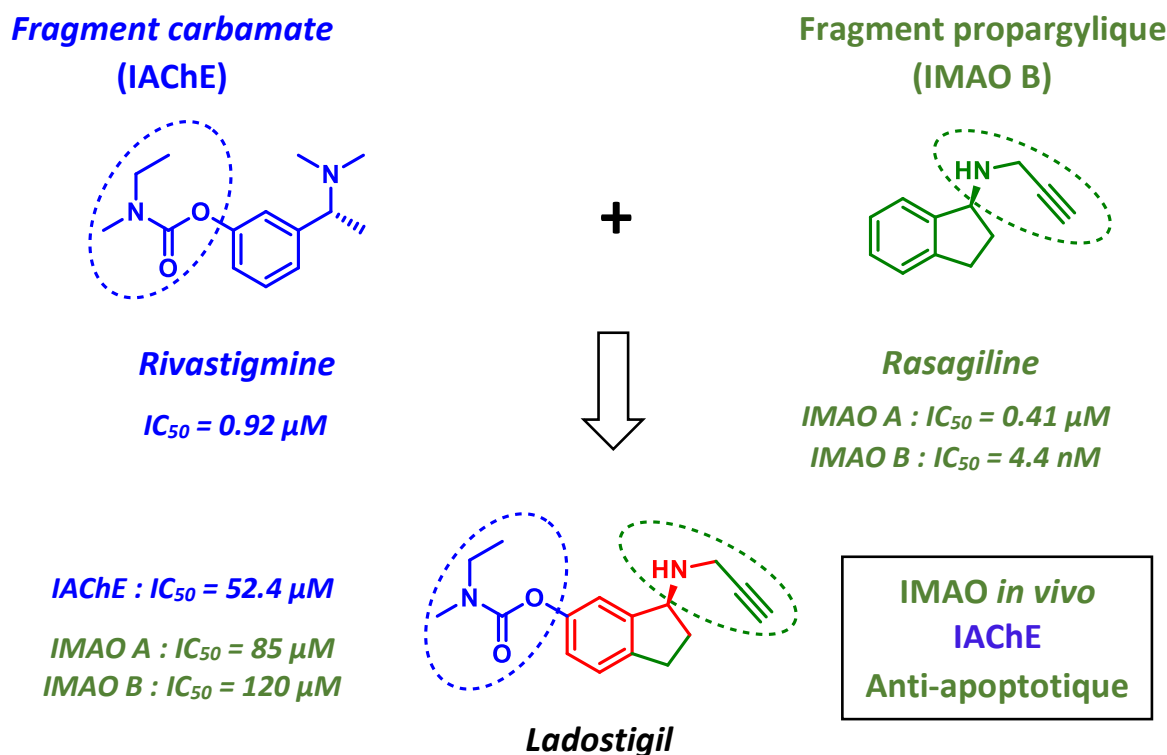


Figure 62. Développement du ladostigil⁽¹⁴⁰⁾

Le ladostigil agit en tant qu'inhibiteur de l'acétylcholinestérase et des monoamine-oxydases A et B.⁽¹⁴¹⁾ De plus, il présente des effets neuroprotecteurs et antidépresseurs. Cependant, il a été écarté de la phase IIb dans le cadre de la MA pour un manque d'efficacité.⁽¹⁴²⁾ Le ladostigil a été repositionné par les laboratoires Avraham Pharmaceuticals pour son action sur des troubles cognitifs légers.

2. La mémoquine, un composé aux multiples activités

La mémoquine résulte de l'association de la **caproctamine**, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, et de l'**idébénone**, un puissant antioxydant mitochondrial (**Figure 63**).⁽¹⁴³⁾ L'idébénone est un dérivé du coenzyme Q10 qui a montré une amélioration cognitive au cours d'essais cliniques.⁽¹⁴³⁾ Les pharmacophores de ces deux composés ont été couplés suivant une stratégie de type « accolé » (*cf. Figure 61, p124 & Figure 63*).

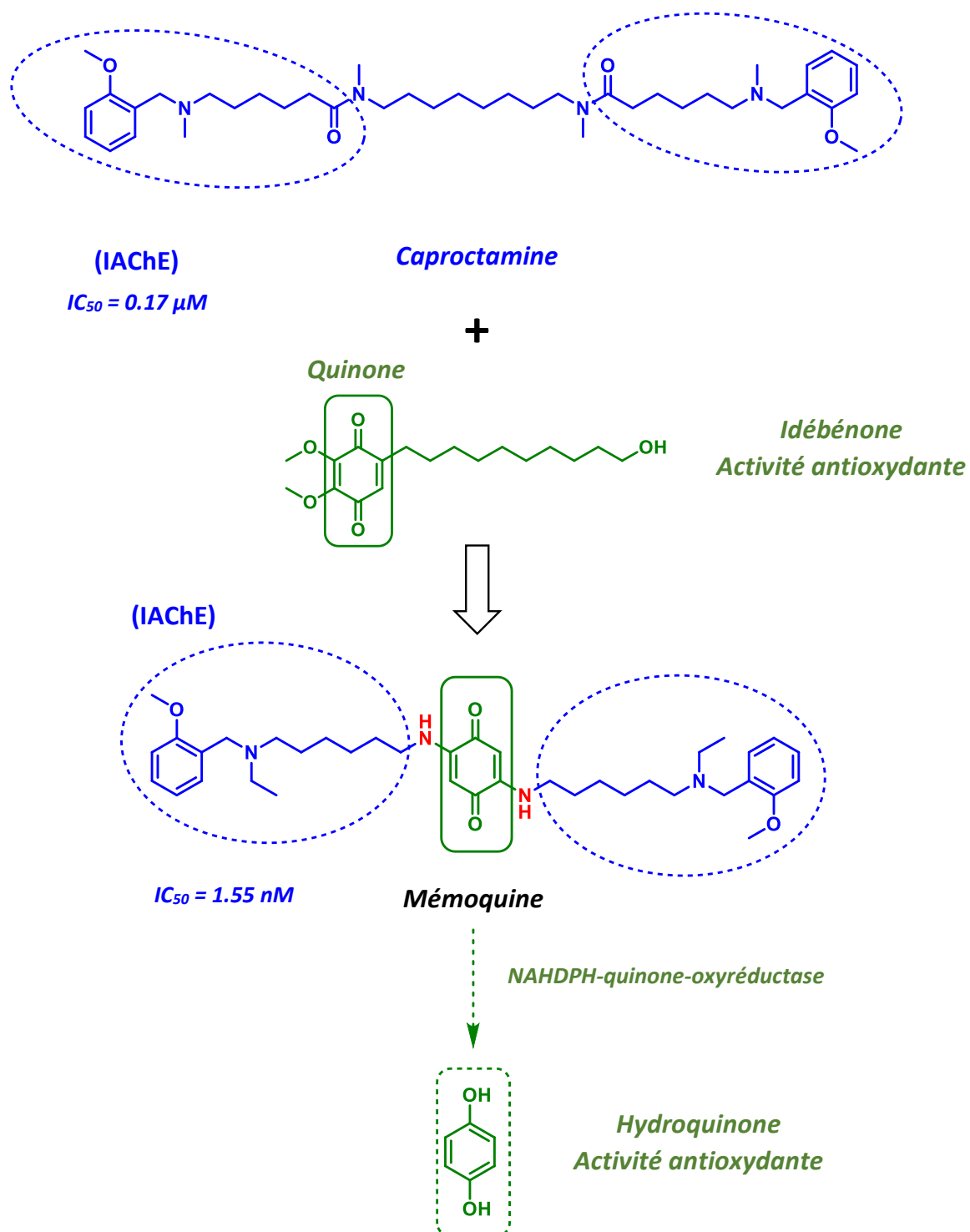


Figure 63. Développement de la mémoquine

L'activité antioxydante de la mémoquine est portée par le motif pharmacophorique hydroquinone, obtenu après réduction de la quinone par la NAHDPH-quinone-oxyréductase.⁽¹⁴³⁾ Le motif hydroquinone est également un piègeur de radicaux libres. En plus

d'une activité IACHe et antioxydante, la mémoquine a la capacité *in vivo* de réduire les dépôts amyloïdes, la phosphorylation de la protéine Tau et d'améliorer les troubles comportementaux.⁽¹⁴³⁾

3. Le mémagal, un composé bifonctionnel ciblant l'AChE et NMDAR

Le mémagal résulte de l'association de la **galantamine**, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, et de la **mémantine**, un antagoniste des récepteurs NMDA (**Figure 64**).^(144,145) Le mémagal est le premier composé réunissant deux principes actifs actuellement commercialisés dans le cadre de la MA. Le mémagal est issu de l'association de ces deux structures selon une stratégie de type « linker » (*cf.* **Figure 61, p124 & Figure 64**). Il possède une activité IACHe, des effets neuroprotecteurs et conduit à une diminution de la neurotoxicité induite par les récepteurs NMDA *in vitro*.⁽¹⁴⁴⁾

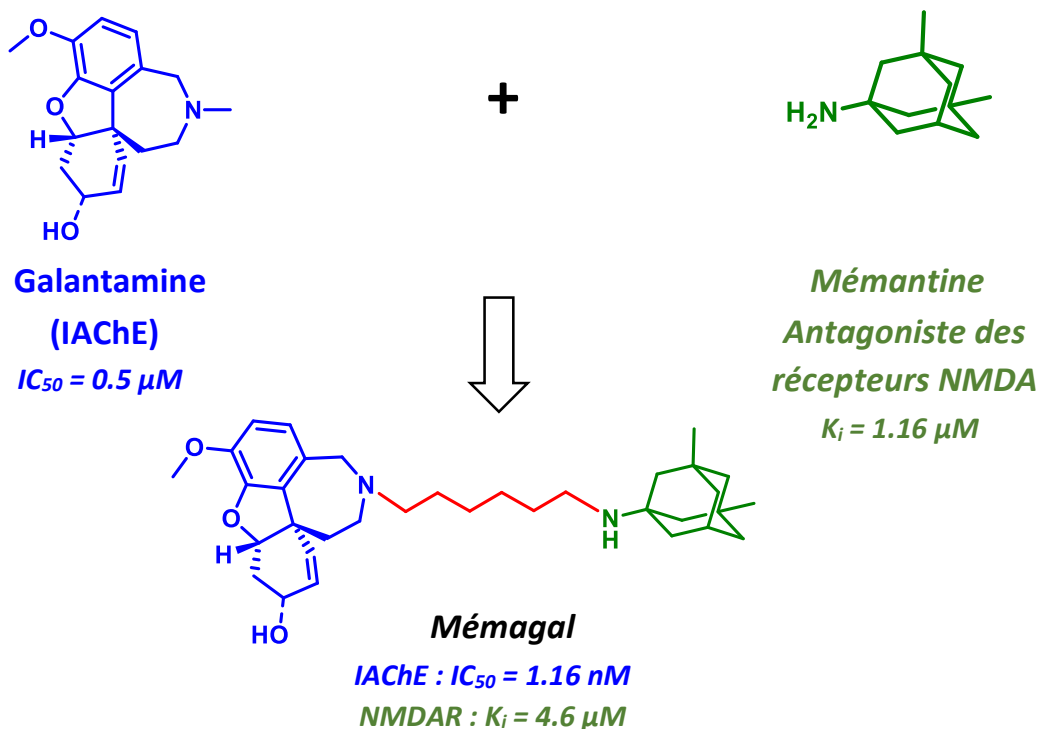


Figure 64. Développement du mémagal

IV. Stratégie du projet de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅

En partant d'antagonistes du A_{2A}R développés dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons choisi de cibler le récepteur mGlu₅ par des modulateurs allostériques négatifs.

1. Pourquoi cibler le récepteur mGlu₅ ...

Le récepteur mGlu₅ appartient à la famille des récepteurs métabotropiques répondant au glutamate, le neurotransmetteur exciteur le plus répandu dans le SNC (**Figure 65**).⁽¹⁴⁶⁾ Les récepteurs métabotropiques sont capables de provoquer, à la suite de leur activation, une cascade métabolique modifiant le métabolisme cellulaire.

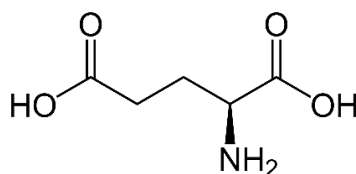


Figure 65. Structure chimique de l'acide glutamique

Les récepteurs métabotropiques du glutamate appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. À ce jour, ils sont au nombre de huit et sont classés en 3 groupes. Ils diffèrent selon leur homologie de séquence, leurs localisations (pré- et/ou post-synaptique) et selon les voies de signalisation auxquelles ils sont associés (**Tableau 17**).⁽¹⁴⁷⁾

Famille	Récepteur	Signalisation	Localisation synaptique majoritaire	Pathologies associées
Groupe I	mGluR ₁	G _q Activation	Postsynaptique	Schizophrénie, dépression et troubles bipolaires
	mGluR ₅	PLC	Postsynaptique	Schizophrénie, anxiété, maladie d'Alzheimer
Groupe II	mGluR ₂	G _i Inhibition	Présynaptique	Anxiété, maladie de Parkinson, l'addiction, dépression, épilepsie
	mGluR ₃	AC	Pré- et postsynaptique	
Groupe III	mGluR ₄	G _i Inhibition AC	Pré- et postsynaptique	Maladie de Parkinson
	mGluR ₆		Postsynaptique	
	mGluR ₇		Pré- et postsynaptique	Schizophrénie, anxiété
	mGluR ₈		Présynaptique	Maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson

Tableau 17. Les différents récepteurs métabotropiques du glutamate

Tableau adapté de Régis Bordet *et al.*⁽¹⁴⁷⁾

Le récepteur mGlu₅ est l'un des récepteurs appartenant au groupe I des récepteurs métabotropiques du glutamate. Il est fortement exprimé au niveau du SNC (en particulier au niveau du cortex, de l'hippocampe et du striatum), et notamment dans les régions impliquées dans la cognition, le contrôle moteur et l'émotivité.⁽¹⁴⁶⁾

À la suite de sa stimulation par l'arrivée du glutamate (**Figure 66**), mGlu₅ (actif sous forme dimérique) conduit à la formation intracellulaire de deux seconds messagers. D'une part, l'inositol trisphosphate (IP₃) qui provoque une libération intracellulaire d'ions Ca²⁺. D'autre part, le diacylglycérol (DAG) qui stimule l'activité de la protéine kinase C (PKC). La

stimulation de ce récepteur permet également d'augmenter l'excitabilité via la modulation de canaux ioniques (NMDA, AMPA notamment).

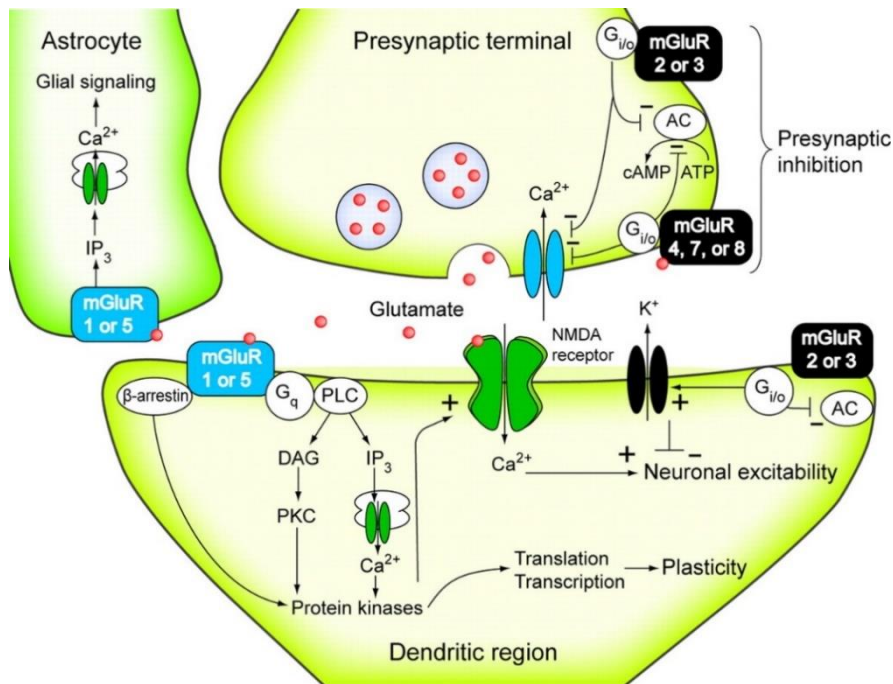


Figure 66. Synapse glutamatergique⁽¹⁴⁸⁾

Chaque récepteur métabotrope du glutamate a un profil pharmacologique unique (**cf. Tableau 17, p131**) et leur potentiel thérapeutique en tant que cible médicamenteuse est prédit principalement en fonction de leur localisation respective dans le système nerveux central et périphérique.⁽¹⁴⁹⁾ Au-delà de l'approche classique ciblant le site de liaison orthostérique de ces récepteurs, le développement de modulateurs allostériques représente une classe émergente de petites molécules à visée thérapeutique.

2. ...par des modulateurs allostériques négatifs ?

On recense de plus en plus dans la littérature des modulateurs allostériques négatifs (NAMs) d' $mGluR_5$ qui sont en cours d'évaluation clinique dans diverses applications thérapeutiques comme : l'anxiété, la dépression, la schizophrénie, les troubles neuropsychiatriques, la douleur, les problèmes cognitifs, le syndrome de l'X-fragile ainsi que l'addiction.^(146,149)

De plus, la suractivation du récepteur mGlu₅ semble également jouer un rôle important dans les conditions pathologiques associées à la MA. En effet, le blocage de son activité par des modulateurs allostériques négatifs réduit la neurotoxicité et la synaptotoxicité du peptide amyloïde *in vitro*^(150,151) et *in vivo* ainsi que les troubles mnésiques associés.^(152,153) Par ailleurs, mGlu₅ interagit avec la principale phosphatase de Tau, PP2A, empêchant son activation par phosphorylation et conduisant ainsi à l'hyperphosphorylation de Tau.⁽¹⁵⁴⁾ L'hétérodimérisation avec le récepteur A_{2A} a également été décrite.⁽¹⁵⁵⁾ Il semble que ces deux récepteurs agissent de façon synergique : bloquer mGlu₅ améliore le blocage d'A_{2A}R.⁽¹⁵⁵⁾

Le blocage de mGlu₅ pourrait donc apporter une plus-value au développement de composés ciblant la MA. C'est pourquoi nous avons choisi de cibler mGlu₅ en plus d'A_{2A}R dans une optique de ligands duaux (**Figure 67**).

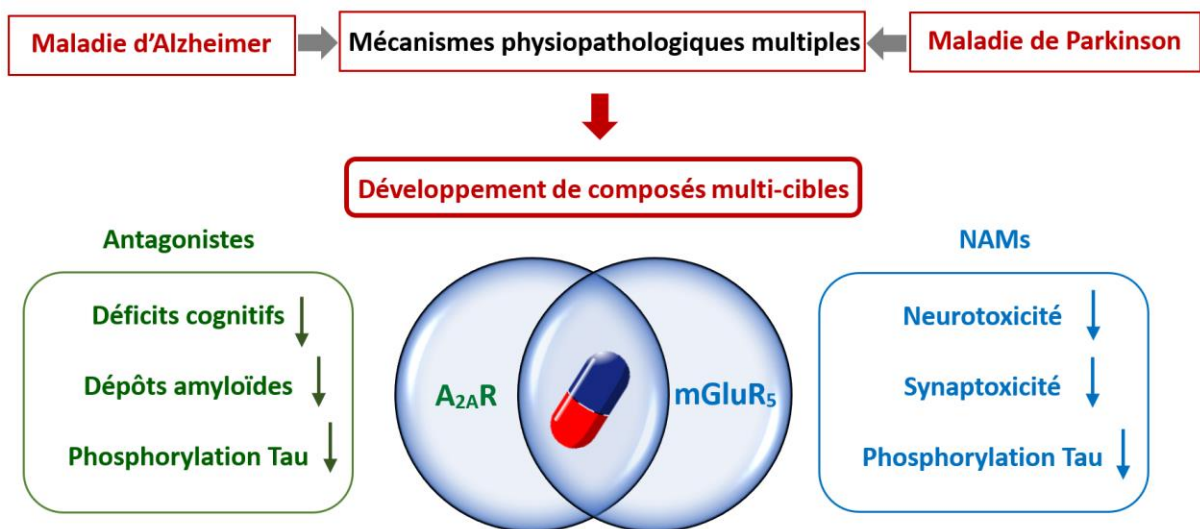


Figure 67. Stratégie de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅

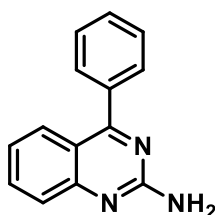
V. Mise en place du test d'affinité pour le récepteur mGlu₅

Avant de concevoir et de synthétiser des ligands à visée mixte A_{2A}R/mGlu₅, un de mes premiers objectifs a été de mettre en place le test d'affinité des composés pour le récepteur mGlu₅. Ce dernier a nécessité des travaux d'optimisation importants et durant lesquels j'ai eu l'occasion de faire appel à différents acteurs nationaux et internationaux travaillant sur le récepteur mGlu₅ ou sur la technique de « radiobinding ». À la suite de mes échanges avec le Dr. Céline Legros (*Project Manager*), j'ai eu la chance de visiter le laboratoire Servier de Croissy-sur-Seine. Pour rappel, le **chapitre 4** de ce manuscrit est consacré aux tests d'affinité des composés que j'ai mis en place pour les récepteurs A_{2A} et mGlu₅.

VI. Conception de ligands à visée mixte A_{2A}R/mGlu₅

1. Le squelette quinazolinique : notre point de départ

Le squelette quinazolinique s'est avéré être un point de départ intéressant pour la conception de nos ligands duaux. Plus précisément, c'est le composé chef de file **50** précédemment identifié au laboratoire (*cf. Chapitre 2*) et dont la structure est reprise en **figure 68** qui a suscité notre attention.



$$K_i(hA_{2A}R) = 198 \text{ nM}$$

Figure 68. Structure du composé chef de file 50

- **Pour quelles raisons ?**

En plus d'avoir une affinité submicromolaire pour le récepteur A_{2A}, il s'agit d'une molécule de petite taille qui a, de plus, la capacité d'être facilement modulable. De plus, il

existe une ressemblance structurale avec certains modulateurs allostériques négatifs du récepteur $mGlu_5$. Cette ressemblance est à l'origine de deux stratégies de conception de ligands à visée mixte.

2. Première stratégie de conception de ligands à visée mixte

La première stratégie de conception repose sur les travaux récents de John A. Christopher et *al.*⁽¹⁵⁶⁾ qui ont conduit à la co-cristallisation au sein du site allostérique d' $mGluR_5$ de deux composés pyrimidiques en tant que modulateurs allostériques négatifs (**C** et **D**, **Figure 69**).

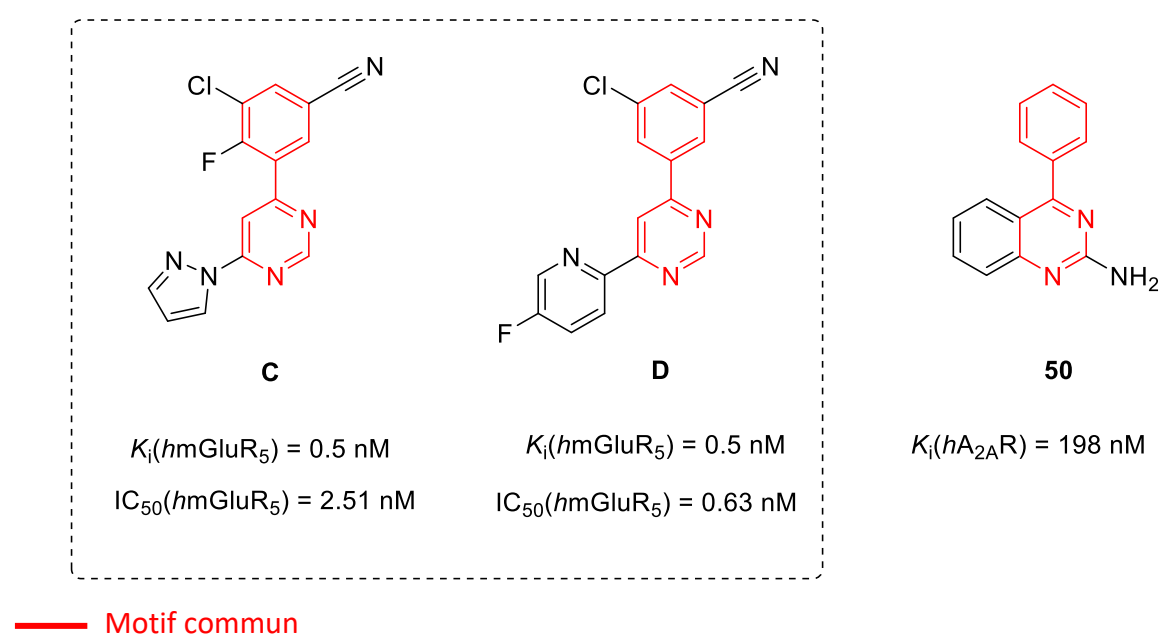


Figure 69. Composés C et D co-cristallisés au sein du site allostérique du récepteur $hmGluR_5$

En plus de la ressemblance structurale existante entre les composés pyrimidiques (**C** et **D**) et le composé **50**, les études de modélisation moléculaire que j'ai pu effectuer ont pu montrer que le composé **50** présentait un mode de liaison quasi-similaire aux composés **C** et **D** (**Figure 70**).

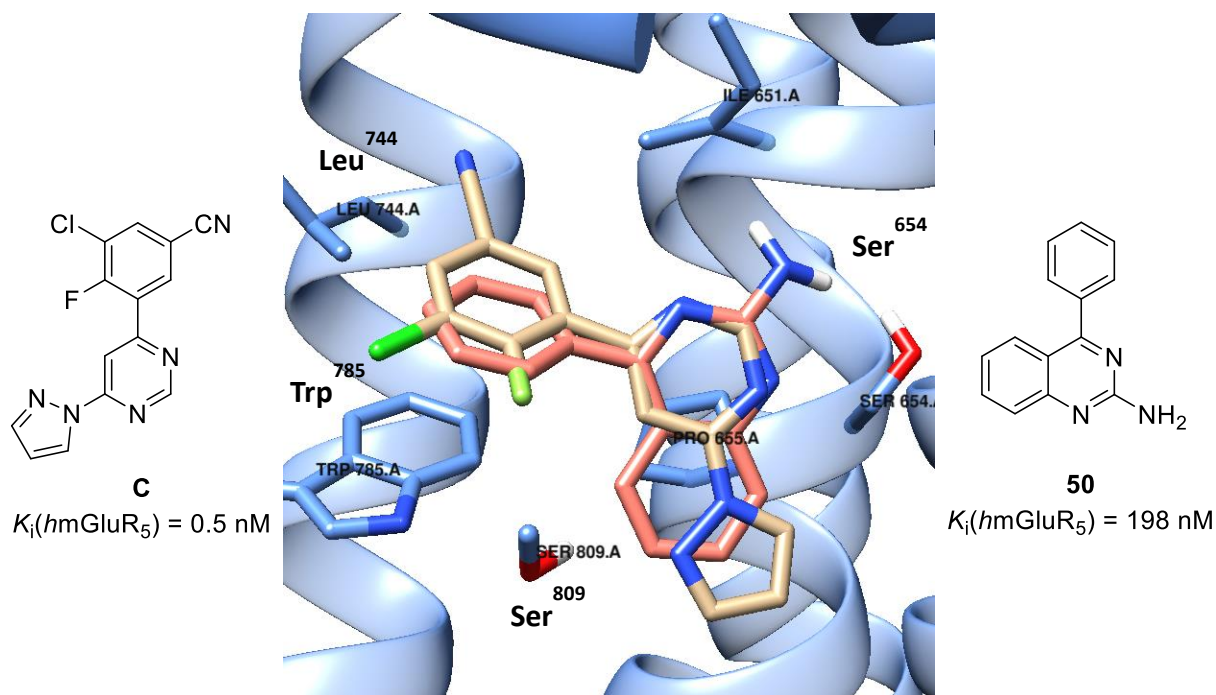


Figure 70. Superposition de la pose docking sélectionnée du composé **50** (rose) à la structure co-cristallisée du composé **C** (beige) au sein du site allostérique du récepteur $hGluR_5$

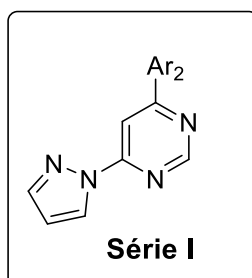
À la lecture de la **figure 70**, le composé **50** interagirait principalement par interaction π -stacking avec le Trp⁷⁸⁵ et par liaisons hydrogènes avec la Ser⁶⁵⁴.

La comparaison des structures **C** et **D** avec le composé **50** nous a permis de proposer des fonctionnalisations possibles pour les deux squelettes. Elles conduisent à une stratégie « double voie » menant à de potentiels ligands mixtes de type « fusionné » (*cf.* **Figure 61, p124** et **Figure 71**).

À la lecture de la **figure 71**, deux voies d'accès ont été envisagées :

o Première voie : mGluR₅ vers A_{2A}R

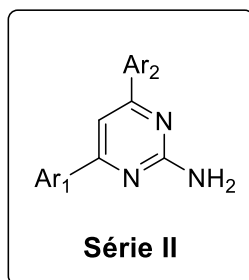
Elle repose sur les composés **C** et **D** qui sont des modulateurs allostériques négatifs d'mGluR₅ (**cf. Figure 69, p135**). L'objectif de cette voie consiste à apporter successivement à ces composés des éléments pharmacophoriques pour A_{2A}R. Ceux-ci consistent essentiellement en l'apport d'une fonction amine primaire aromatique en position 2 et du bicyclic conduisant au squelette quinazolinique. Les molécules **C** et **D** n'ont pas pu être synthétisées au cours de mes travaux en raison du coût onéreux des acides boroniques. Ces dernières auraient pu nous servir d'une part, pour valider notre test pharmacologique (**cf. Chapitre 4**) et d'autre part, pour évaluer leur affinité potentielle pour le A_{2A}R. C'est pourquoi nous avons privilégié la synthèse du composé **113** décrit dans les travaux de John A. Christopher et *al.*⁽¹⁵⁶⁾ avec une affinité de 794 nM ainsi que de composés analogues. Ces composés constituent la **série I** et sont rapportés dans le **tableau 18** ci-dessous :



N°	Ar ₂	N°	Ar ₂
112		114	
113		115	

Tableau 18. Molécules de la série I

Une fois la synthèse des composés de la **série I** réalisée, des premiers composés pyrimidiques présentant une fonction amine primaire aromatique en position 2 ont été synthétisés. Pour rappel, la fonction amine est très largement retrouvée dans de nombreux antagonistes du récepteur A_{2A} où elle apparaît nécessaire pour obtenir une forte affinité (**cf. Figure 31, p43**). Ces composés constituent la **série II** et sont rapportés dans le **tableau 19** ci-dessous :



N°	Ar ₁	Ar ₂	N°	Ar ₁	Ar ₂
119a			121		
119b			122		

Tableau 19. Molécules de la série II

o [Deuxième voie : A_{2A}R vers mGlu₅](#)

À l'inverse, la seconde voie repose sur notre composé chef de file **50** d'affinité submicromolaire pour le récepteur A_{2A} et dont l'activité fonctionnelle est en cours d'évaluation (**cf. Chapitre 4**). L'objectif de cette voie consiste à apporter successivement à ce composé des éléments pharmacophoriques pour mGlu₅. Ces derniers consistent essentiellement en l'apport d'un groupement aromatique convenablement substitué en position 4 ou 7.

Étant donné la ressemblance structurale avec les molécules **C** et **D** et grâce à la mise en place du test pharmacologique des composés pour le récepteur mGlu₅, nous avons dans

un premier temps privilégié l'évaluation de l'affinité des composés quinazoliniques précédemment synthétisés (**cf. Chapitre 2, série I**). Pour rappel, cette série chimique a eu pour objectif de moduler la position 4 du composé **50** par divers groupements aromatiques.

3. Deuxième stratégie de conception de ligands à visée mixte

Les modulateurs allostériques négatifs développés par la compagnie japonaise Nippon Shinyaku en 2013 ont été à l'origine de notre deuxième stratégie de conception.⁽¹⁵⁷⁾ En effet, ces composés s'articulent autour d'un cycle tenseur tetrahydroquinoline et cyclopenta[b]pyridine et nous ont guidés à concevoir de potentiels ligands mixtes de type « fusionné » (**cf. Figure 61, p124 et Figure 72**).

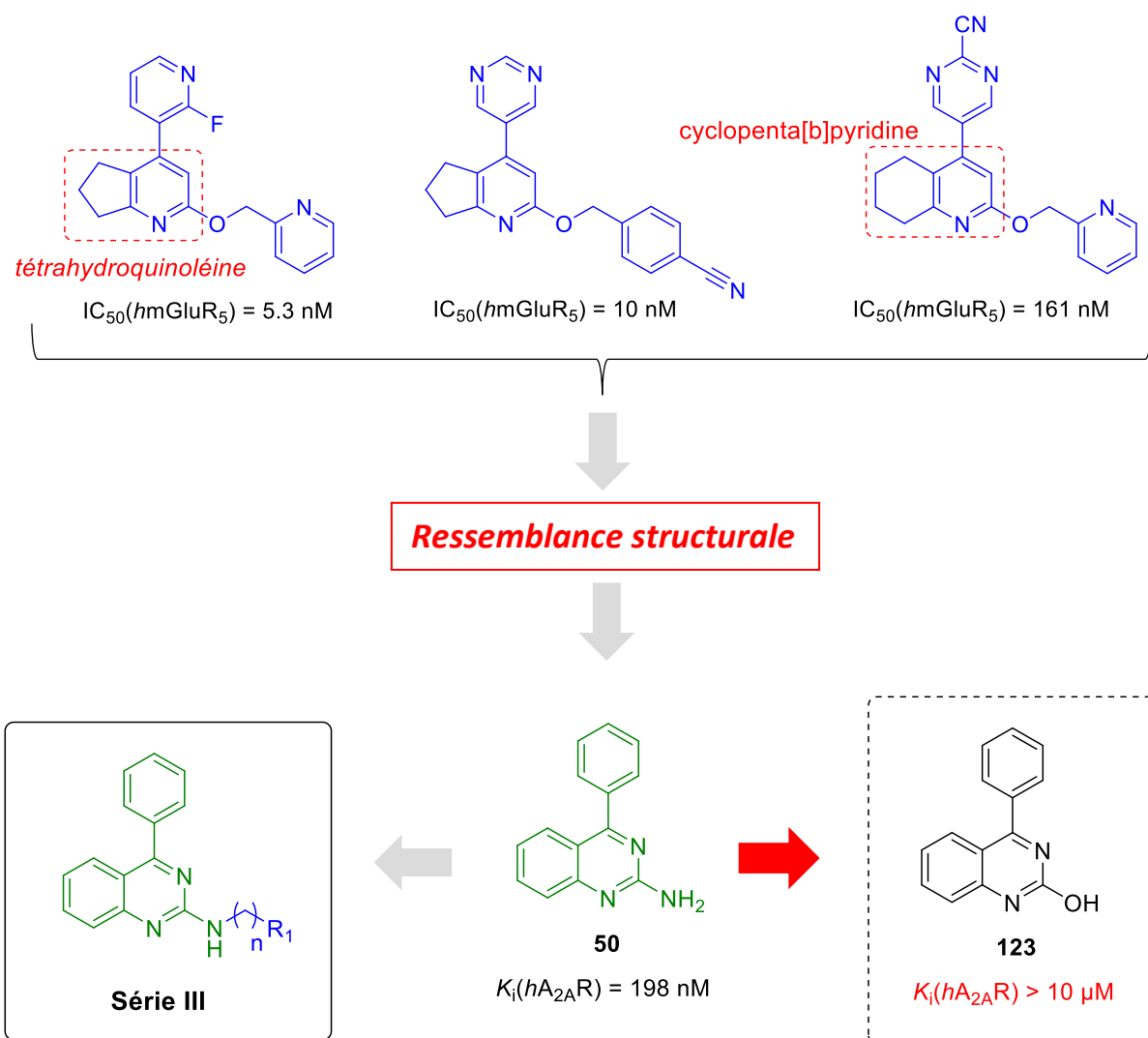
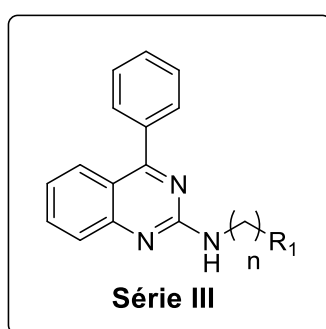


Figure 72. Deuxième stratégie de conception de ligands à visée mixte A_{2A}R/mGluR₅

De la même façon que précédemment, la ressemblance structurale entre les structures nous a permis d'envisager diverses modulations sur le composé **50**, notamment en position 2. Plus précisément, celles-ci ont constitué en l'ajout de différentes chaînes *N*-benzyles ou *N*-alkyles de longueurs et de natures variables. En effet, et dans un premier temps, nous avons privilégié un linker azoté en raison de la perte d'affinité observée pour le dérivé hydroxylé correspondant **123** (cf. Figure 72, p140).

Les composés synthétisés dans le cadre de la **série III** sont rapportés dans le **tableau 20** ci-dessous :



N°	n	R ₁	N°	n	R ₁
124	0		128	2	
125	1		129	0	
126	1		130	1	
127	1				

Tableau 20. Molécules de la série III

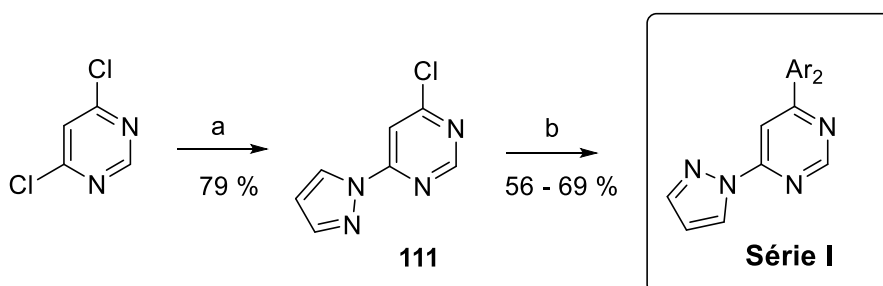
VII. Synthèse des molécules à visée mixte A_{2A}R/mGluR₅

Une fois que le test d'affinité des composés pour le récepteur mGlu₅ a été mis en place au sein de la plateforme de « binding » de la Faculté de Pharmacie de Lille, la synthèse des premières molécules à visée mixte a pu débuter.

1. Synthèse des molécules issues de la première stratégie

o Première voie : mGluR₅ vers A_{2A}R

• Série I

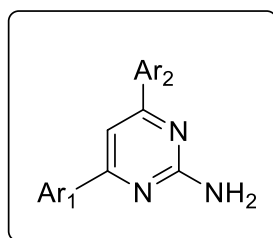


Réactifs et conditions : a) pyrazole (1.1 éq.), K₂CO₃ (2.0 éq.), DMF ; b) Ar₂B(OH)₂ (1.30 éq.), K₂CO₃ (2.00 éq.), Pd(OAc)₂ (0.05 éq.), PPh₃ (0.10 éq.), dioxane/H₂O, 80 °C.

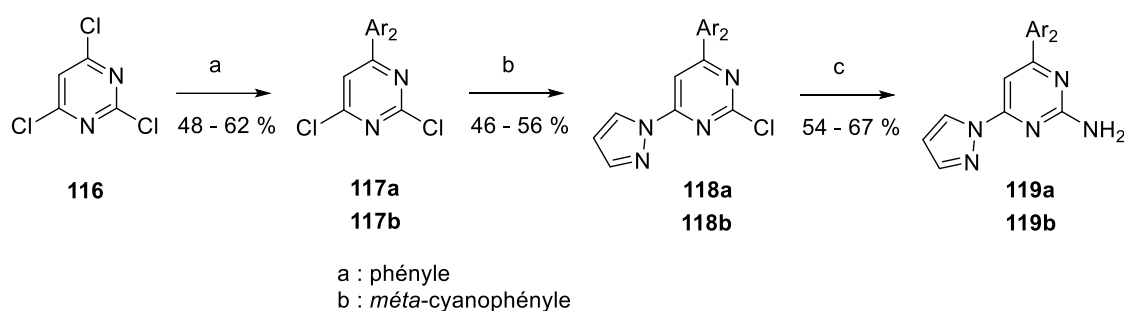
Schéma 28. Synthèse des molécules de la série I

À partir de la 4,6-dichloropyrimidine commercialisée, une réaction de substitution nucléophile est effectuée avec le pyrazole conduisant au composé **111** avec un rendement de 79 %.⁽¹⁵⁸⁾ Les composés de la **série I** sont obtenus à la suite d'une réaction pallado-catalysée de type Suzuki sur le composé **111** avec divers acides boroniques commercialisés ou disponibles au laboratoire (*cf.* **Tableau 18, p138**).

• **Série II**



Les composés **119a** et **119b** de cette série ont été synthétisés de la manière suivante :

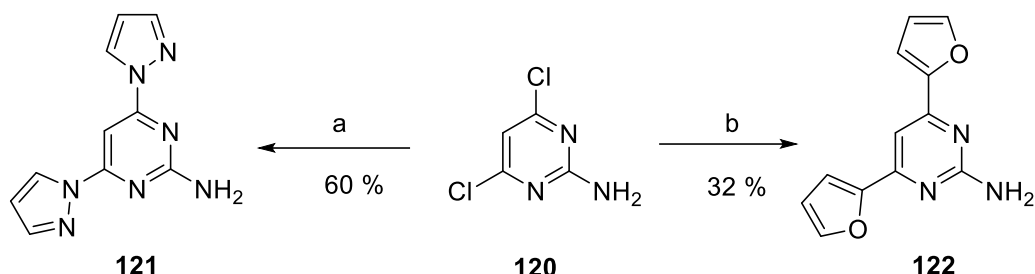


Réactifs et conditions : a) Ar₂B(OH)₂ (1.00 éq.), Na₂CO₃ (2.00 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), THF/H₂O, 60 °C ; b) pyrazole (1.0 éq.), K₂CO₃ (1.5 éq.), DMF ; c) éthanol saturé en ammoniac, tube scellé, 110 °C.

Schéma 29. Synthèse des composés 119a et 119b de la série II

À partir de la 2,4,6-trichloropyrimidine commercialisée **116**, une réaction pallado-catalysée de type Suzuki est effectuée en utilisant les acides boroniques correspondants pour conduire majoritairement aux composés **117a** et **117b** avec des rendements compris entre 48 et 62 %.⁽¹⁵⁹⁾ En effet, et de la même façon que pour la 2,4-dichloroquinazoline (*cf.* **Chapitre 2, p85**), la position 2 de la 2,4,6-trichloropyrimidine est moins réactive du fait d'un encombrement électronique plus important. Les composés **118a** et **118b** sont, quant à eux, obtenus à la suite d'une réaction de substitution nucléophile avec le pyrazole dans le DMF à température ambiante.⁽¹⁶⁰⁾ Les amines correspondantes **119a** et **119b** sont synthétisées de la même manière que les 2-aminoquinazolines à savoir dans une solution d'éthanol saturée en ammoniac (*cf.* **Schéma 17, p86**).

Par la suite, les composés **121** et **122** ont été synthétisés selon le schéma réactionnel rapporté ci-dessous :



Réactifs et conditions : a) pyrazole (2.1 éq.), K₂CO₃ (2.5 éq.), CuI (cat.), DMF, 110 °C ; b) acide 2-furane boronique (2.00 éq.), K₂CO₃ (2.00 éq.), Pd(OAc)₂ (0.05 éq.), PPh₃ (0.10 éq.), dioxane/H₂O, 80 °C.

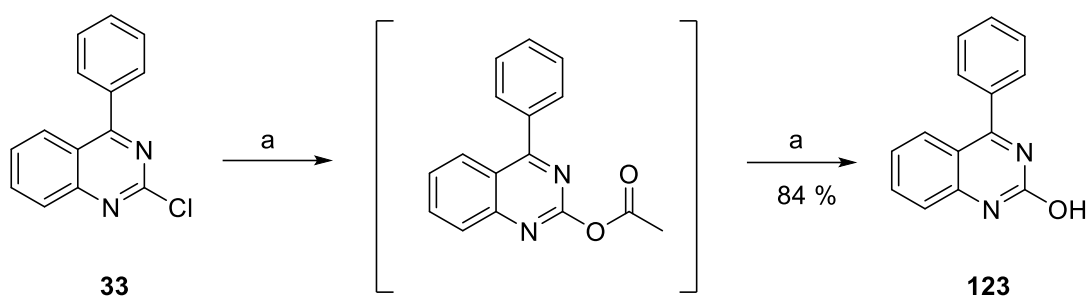
Schéma 30. Synthèse des composés **121** et **122** de la série II

À partir de la 2-amino-4,6-dichloropyrimidine commercialisée **120**, le composé **121** est synthétisé par une double réaction de substitution nucléophile avec le pyrazole. Cette réaction s'effectue en présence d'iodure de cuivre qui joue le rôle de catalyseur.⁽¹⁶¹⁾ Ce dernier permet d'accroître la polarisation des liaisons C-Cl et donc leur réactivité. En effet, du fait de sa présence, il permet d'obtenir un temps de réaction beaucoup plus court (4h vs 16h). D'un autre côté, le composé **122** est obtenu avec un rendement de 32 % à la suite d'une réaction pallado-catalysée de type Suzuki dans un mélange dioxane/eau à 80 °C.

2. Synthèse des molécules issues de la deuxième stratégie

- **Série III (cf. figure 72, p140)**

Dans un premier temps, la synthèse du composé hydroxylé **123** a été réalisée selon les conditions du schéma **31**.

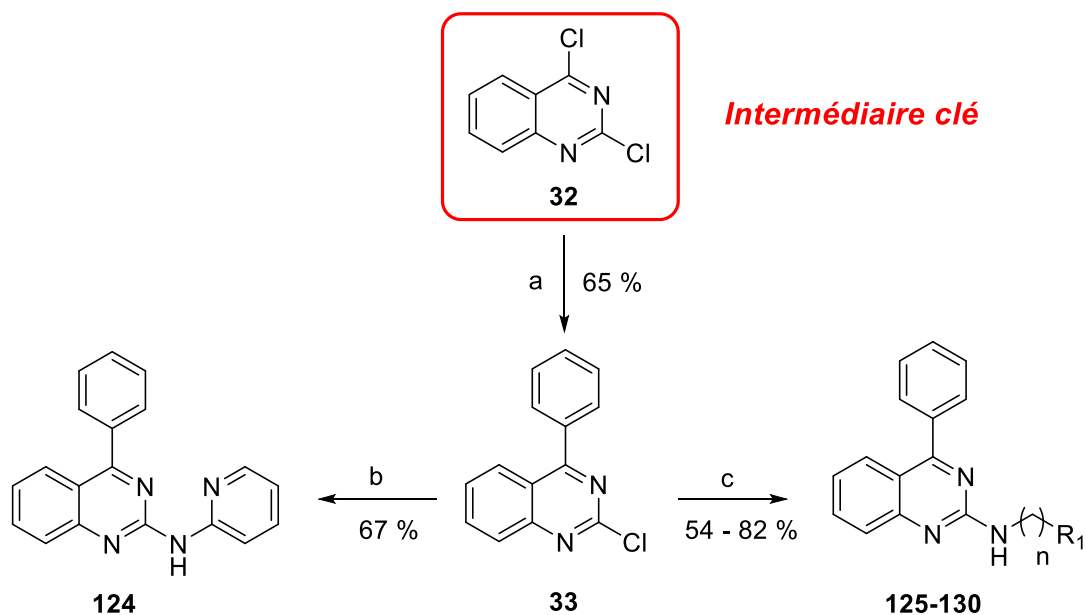


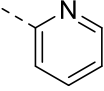
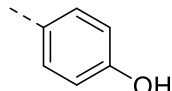
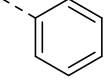
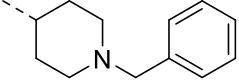
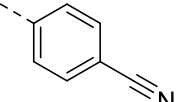
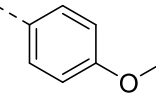
Réactifs et conditions : a) acétate de sodium (2.0 eq), acide acétique, 80 °C.

Schéma 31. Synthèse du composé **123**

Le composé **123** est obtenu par action de l'acétate de sodium conduisant à l'intermédiaire réactionnel O-acétylé non isolé. Ce dernier est hydrolysé *in situ*.

Par la suite, les composés de la **série III** ont été synthétisés grâce à la chimie précédemment mise au point (cf. **Chapitre 2**). En effet, l'intermédiaire clé **32** et le composé **33** ont permis leur synthèse selon le réactionnel rapporté ci-après.



N°	n	R ₁	N°	n	R ₁
125	1		128	2	
126	1		129	0	
127	1		130	1	

Réactifs et conditions : a) acide phénylboronique (1.0 éq.), K₂CO₃ (2.0 éq.), Pd(OAc)₂ (0.02 éq.), PPh₃ (0.04 éq.), dioxane/H₂O, 40 °C ; b) 2-aminopyridine (1.5 éq.), Cs₂CO₃ (3 éq.), Pd(OAc)₂ (0.05 éq.), BINAP (0.1 éq.), dioxane, 130 °C, tube scellé ; c) chaînes N-benzyles ou N-alkyles, 80 °C, tube scellé.

Schéma 32. Synthèse des composés de la série III

À partir du composé **33**, une réaction pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig est effectuée en présence de la 2-aminopyridine pour conduire au composé **124** avec un rendement de 67 %. Les composés **125-130** sont obtenus à la suite d'une réaction de substitution nucléophile avec différentes chaînes N-benzyles ou N-alkyles commercialisées ou disponibles au laboratoire. Il est intéressant de remarquer que ces réactions s'effectuent sans

solvant. En effet, ce sont les chaînes *N*-benzyles ou *N*-alkyles qui jouent le rôle de solvant de la réaction.⁽⁵⁶⁾

VIII. Résultats pharmacologiques préliminaires

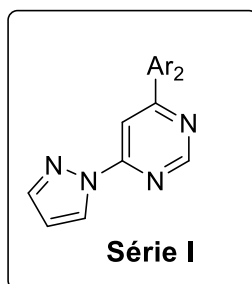
Dans cette partie seront décrits successivement les résultats pharmacologiques associés à nos deux stratégies de conception de ligands à visée mixte A_{2A}R/mGluR₅.

1. Première stratégie de conception de ligands à visée mixte

Une stratégie convergente à « double voie » a été envisagée en partant des molécules **C** et **D**, décrites comme étant des modulateurs allostériques négatifs d'mGluR₅, et de notre composé chef de file **50** (*cf.* **Figure 71, p137**).

o Première voie : mGluR₅ vers A_{2A}R

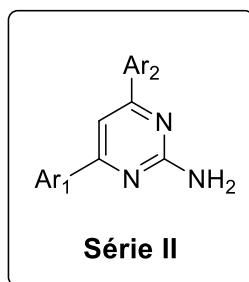
Cette première voie a conduit au développement de deux séries chimiques (**série I** et **II**). La **série I** a eu pour objectif de synthétiser des composés analogues des molécules **C** et **D**. La **série II** a permis d'étudier l'impact d'un premier élément pharmacophorique pour A_{2A}R, à savoir une amine primaire aromatique en position 2. L'affinité des composés synthétisés dans le cadre des **séries I** et **II** pour les récepteurs hA_{2A} et hmGlu_{5A} est rapportée dans les **tableaux 21** et **22** ci-après.



N°	Ar ₂	hA _{2A} (K _i μM) ^a	hmGlu _{5A} (% inhib) ^b	clogP ^c
112		2.9 ± 0.35	42	2.2
113		8.2 ± 1.5	86	2.4
114		6.5 ± 2.3	72	2.4
115		4.3 ± 1.6	55	1.7

a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » (*N*=3) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(h(A_{2A}R)) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Pourcentage de déplacement spécifique du [³H]-MPEP à 10 μM. c) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel *ChemDraw Professional* v16.0.

Tableau 21. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série I



N°	Ar ₁	Ar ₂	hA_{2A} (K_i nM) ^a	$hmGlu_{5A}$ (% inhib) ^b	clogP ^c
119a			249 ± 12	23	2.2
119b			774 ± 59	45	1.7
121			943 ± 135	2	0.6
122			42 ± 3	5	2.6

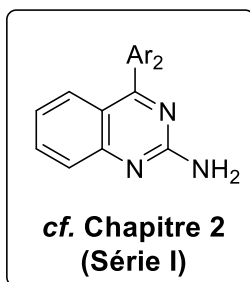
a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(hA_{2A}R) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Pourcentage de déplacement spécifique du [3H]-MPEP à 10 μ M. c) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel *ChemDraw Professional* v16.0.

Tableau 22. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série II

À la lecture des résultats pharmacologiques obtenus pour les premiers composés synthétisés des **séries I et II (Tableaux 21 & 22)**, on constate que l'apport de la fonction amine primaire aromatique résulte en un gain significatif de l'affinité pour $A_{2A}R$ (**112**, $K_i(hA_{2A}R) = 2.9$ μ M vs **119a**, $K_i(hA_{2A}R) = 249$ nM). En revanche, ce dernier semble entraîner une perte d'affinité pour $mGluR_5$ au regard des pourcentages d'inhibition obtenus. À ce jour, le composé **119b** a été identifié comme étant un « hit » multifonctionnel intéressant dans la mesure où il présente la meilleure affinité duale pour ces deux récepteurs. De plus, il présente un mode de liaison similaire au composé **79** ayant co-cristallisé au sein du $A_{2A}R$ (*cf. Conclusion et perspectives*).

o Deuxième voie : $A_{2A}R$ vers $mGluR_5$

Cette deuxième voie a conduit à l'évaluation pharmacologique d'une partie des composés quinazoliniques précédemment synthétisée (*cf.* **Chapitre 2, série I**). En effet, cette série chimique rentre dans le cadre du développement de composés à visée mixte $A_{2A}R/mGluR_5$ dans la mesure où des modulations par divers groupements aromatiques en position 4 ont été effectuées. L'affinité des composés synthétisés dans le cadre de cette série pour les récepteurs hA_{2A} et $hmGlu_{5A}$ est rapportée dans le **tableau 23** ci-après.



N°	Ar ₂	hA_{2A} (K_i nM) ^a	$hmGlu_{5A}$ (% inhib) ^b	N°	Ar ₂	hA_{2A} (K_i nM) ^a	$hmGlu_{5A}$ (% inhib) ^b
50		198 ± 71	32	59		> 10000	13
51		> 10000	0	60		2000 ± 200	15
52		1500 ± 100	12	61		80 ± 5	0
53		3300 ± 435	26	62		174 ± 21	21
54		> 10000	5	63		456 ± 46	0
55		586 ± 121	0	64		89 ± 13	26
56		736 ± 42	10	65		696 ± 35	32
57		708 ± 54	34	66		171 ± 15	18
58		651 ± 71	32				

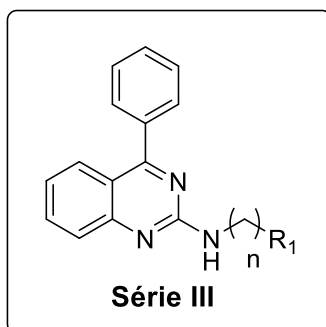
a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(hA_{2A}R) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Pourcentage de déplacement spécifique du [³H]-MPEP à 10 μ M.

Tableau 23. Résultats pharmacologiques des composés de la série I (Chapitre 2)

À la lecture des résultats pharmacologiques du **tableau 23**, l'ensemble des composés synthétisés présente des affinités supérieures à 10 μ M pour $mGluR_5$.

2. Deuxième stratégie de conception de ligands à visée mixte

Une deuxième stratégie de conception de ligands mixtes a été envisagée (*cf.* **Figure 72, p140**). Cette dernière a consisté à moduler notre composé chef de file **50** en position 2 par diverses chaînes *N*-benzyles ou *N*-alkyles. L'affinité des composés synthétisés dans le cadre de la **série III** pour les récepteurs hA_{2A} et $hmGlu_{5A}$ est rapportée dans le **tableau 24** ci-après.

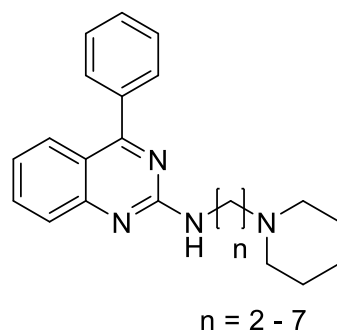


N°	n	R ₁	hA_{2A} (K_i μ M) ^a	$hmGlu_{5A}$ (K_i μ M) ^b	clogP ^c
124	0		> 10 μ M	> 10 μ M	4.4
125	1		> 10 μ M	> 10 μ M	3.9
126	1		> 10 μ M	> 10 μ M	5.4
127	1		> 10 μ M	> 10 μ M	4.8
128	2		6.25 \pm 1.5	> 10 μ M	5.4
129	0		6 \pm 2.4	> 10 μ M	5.8
130	1		> 10 μ M	> 10 μ M	5.3

a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(h(A_{2A}R)) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le MPEP comme composé de référence ($K_i(h(mGlu_{5A})) = 13.4 \pm 2.3$ nM). c) Coefficient de partage des composés (octanol/eau) calculé par le logiciel ChemDraw Professional v16.0.

Tableau 24. Résultats pharmacologiques et clogP des composés de la série III

Grâce à la mise en place du test d'affinité pour le récepteur $mGlu_5$, les composés quinoxaliques présentant une chaîne N -alkyle amine en position 2 (*cf.* Chapitre 2) ont également été évalués vis-à-vis du récepteur $mGlu_5$ (Tableau 25). En effet, ces composés présentent une ressemblance structurale avec les composés de la série III.



n	hA_{2A} (K_i nM) ^a	$hmGlu_{5A}$ (% inhib) ^b	n	hA_{2A} (K_i nM) ^a	$hmGlu_{5A}$ (% inhib) ^b
2	3900 ± 220	34	5	223 ± 54	0
3	1800 ± 132	23	6	396 ± 62	19
4	811 ± 83	6	7	745 ± 82	22

a) Affinités des composés mesurées lors d'un test de « radiobinding » ($N=3$) et en utilisant le ZM-241385 comme composé de référence ($K_i(hA_{2A}R) = 2.8 \pm 0.6$ nM). b) Pourcentage de déplacement spécifique du [3H]-MPEP à 10 μ M.

Tableau 25. Résultats pharmacologiques des modulations effectuées en position 2

D'après les résultats pharmacologiques, les composés modulés en position 2 (composés de la **série III (Tableau 24)** et ceux du **tableau 25**) ne présentent pas d'affinité particulière pour le récepteur $mGlu_5$.

Pour conclure et selon les premiers résultats pharmacologiques de ces premiers composés à visée mixte, il apparaît que la première stratégie de conception, et plus particulièrement les **séries I et II**, révèlent des premiers composés intéressants en termes d'affinité pour les deux récepteurs.

VI. Un nouveau point de départ pour la conception de ligands duaux ?

La mise en place du test d'affinité pour le récepteur mGlu₅ m'a permis d'élargir l'évaluation pharmacologique à d'autres composés précédemment synthétisés au laboratoire et appartenant à notre chimiothèque locale. Ainsi, plusieurs criblages ont été effectués et m'ont permis d'identifier un composé présentant une ressemblance structurale avec le composé **D** (cf. Figure 69, p135 & Figure 73).

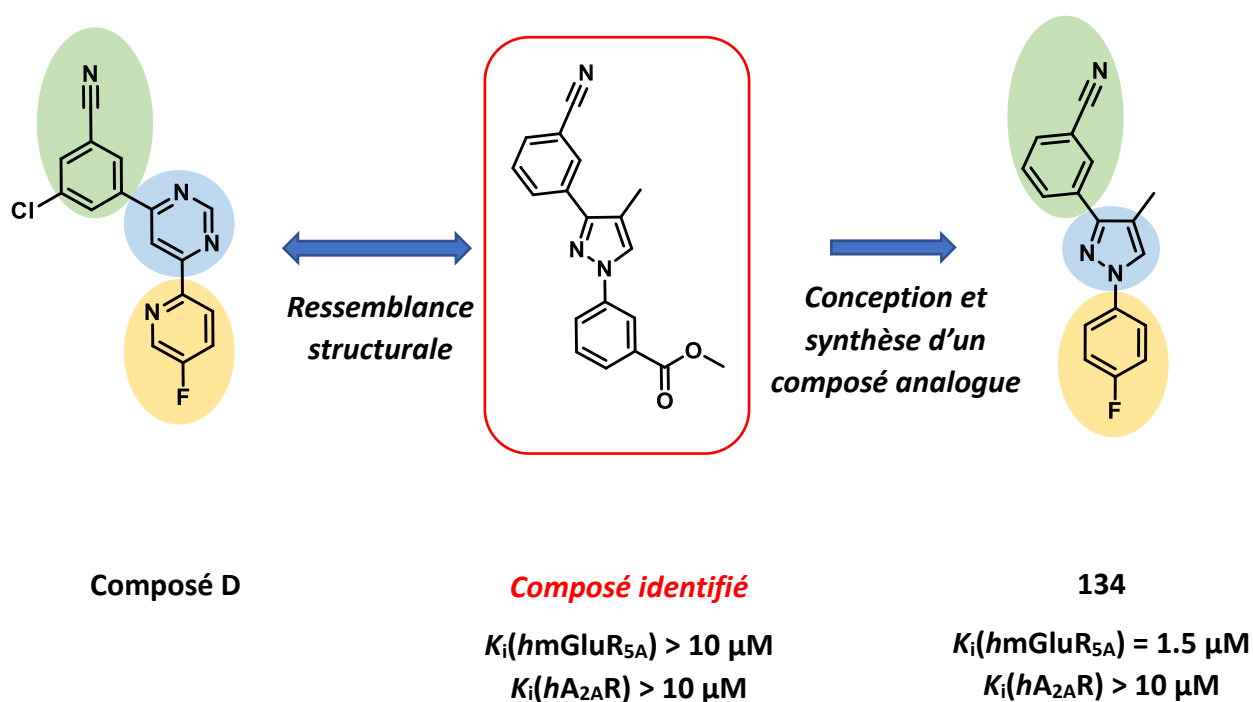
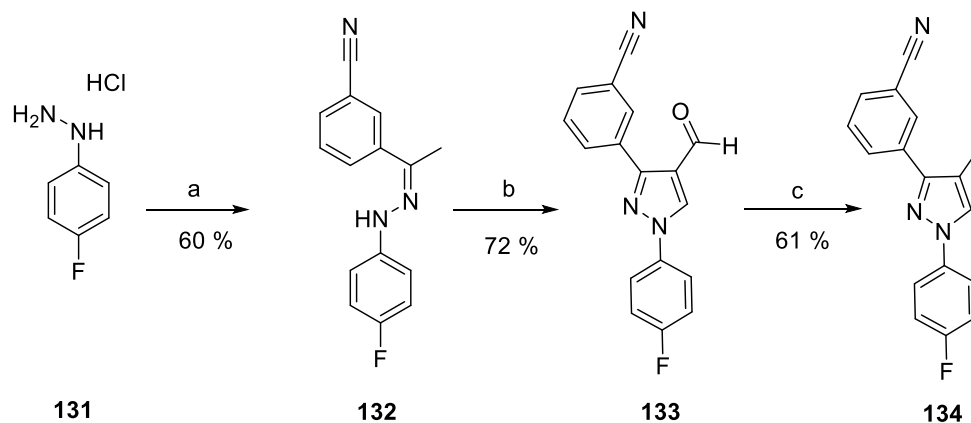


Figure 73. Identification d'un nouveau composé « hit » 134

Dans le but d'améliorer son affinité pour le récepteur mGlu₅, des études de modélisation moléculaire basées sur la structure co-cristallisée du composé **D** m'ont permis de concevoir un composé analogue **134** et dont la synthèse est rapportée ci-après.



Réactifs et conditions : a) 3'-cyanoacétophénone (1.0 équ.), MeOH, reflux ; b) $POCl_3$ (4 équ.), DMF (15 équ.) ; c) triéthylsilane (2.5 équ.), TFA.

Schéma 33. Synthèse du composé 134

À partir de l'hydrazine **131** et par action du 3'-cyanoacétophénone au reflux du méthanol, le composé **132** est obtenu avec un rendement de 60 %. Le composé **133** est synthétisé par une réaction de Vilsmeier-Haack avec un rendement de 72 %. Une réduction chimique de l'aldéhyde est effectuée dans un mélange triéthylsilane / TFA pour conduire au composé **134**.

À la lecture de la **figure 73**, un gain d'affinité est observé pour le composé **134** vis-à-vis du récepteur $mGlu_5$ ($K_i(hmGluR_{5A}) = 1.5 \mu M$). Il apparaît donc comme étant un composé « hit » intéressant pour ce récepteur. Cependant, bien qu'il ne présente pas une bonne affinité pour le récepteur A_{2A} ($K_i(hA_{2AR}) > 10 \mu M$), il pourrait être pour la suite de ce projet un nouveau point de départ pour la conception et la synthèse de ligands mixtes $A_{2AR}/mGluR_5$. En effet, et comme il sera rapporté dans la partie conclusion et perspectives de ce manuscrit, le composé **134** présente une ressemblance structurale avec un antagoniste co-cristallisé du A_{2AR} . Ce dernier s'articule autour d'un cycle tenseur triazolique.⁽¹⁶²⁾

Chapitre 4 :

Évaluation pharmacologique

Durant ces trois années de thèse, en plus d'avoir été formé à la modélisation moléculaire (Dr. Nicolas Renault & Dr. Maxime Liberelle), j'ai eu la chance de pouvoir mettre en place les tests d'affinité des composés pour les récepteurs A_{2A} et mGlu₅. La mise en place du test d'affinité pour le récepteur mGlu₅ a nécessité des étapes d'optimisation importantes. J'ai donc été en mesure d'évaluer par moi-même l'affinité des composés synthétisés de manière rapide et efficace. Ainsi, tout au long de ma thèse, j'ai pu allier la conception par modélisation moléculaire et l'évaluation pharmacologique me permettant d'établir les relations structure-affinité. L'ensemble de ces tests a été réalisé au sein de la plateforme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille, dirigée par le Dr. Christophe Furman et Amélie Barczyk.

En dernière année de thèse, j'ai également eu l'opportunité de travailler sur la mise en place d'un test de fonctionnalité pour le récepteur A_{2A} dans le but d'étudier la nature fonctionnelle des composés synthétisés. Ce test m'a aussi permis d'être formé à la culture cellulaire.

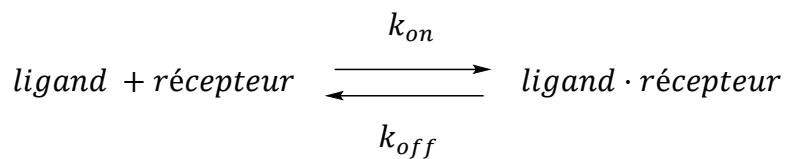
La mise en place de l'ensemble de ces tests a fait partie intégrante de mes travaux de thèse. Ainsi, j'ai eu l'opportunité d'acquérir de nombreuses connaissances et compétences transdisciplinaires tout au long de ce projet de recherche. Cela m'a particulièrement tenu à cœur et je souhaite encore une fois remercier vivement tous les acteurs qui ont pu y contribuer.

I. Mesure de l'affinité par « radiobinding »

1. Principe

Le terme ligand est un dérivé du mot latin « ligo » qui signifie « lier » ou « attacher ».⁽¹⁶³⁾ Un ligand est donc défini comme étant une molécule formant un complexe avec une protéine.⁽¹⁶⁴⁾ Le « radiobinding » est une technique biochimique permettant de déterminer l'affinité, c'est-à-dire la force avec laquelle un ligand va se lier à un récepteur.⁽¹⁶⁵⁾ C'est une technique qui requiert l'utilisation de molécules appelées radioligands.⁽¹⁶⁶⁾ Par définition, un radioligand est une molécule marquée radioactivement et qui a la capacité de se lier à un récepteur, un transporteur, une enzyme ou tout autre site d'intérêt.⁽¹⁶⁷⁾

L'interaction d'un ligand, radiomarqué ou non, avec un récepteur est régie par la loi d'action de masse (**Figure 74**).^(166,168)



- À l'équilibre thermodynamique :

$$\frac{[\text{ligand}] \times [\text{récepteur}]}{[\text{ligand} \cdot \text{récepteur}]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D$$

k_{on}	Constante d'association
k_{off}	Constante de dissociation
K_D	Constante de dissociation à l'équilibre

Figure 74. Loi d'action de masse

Lorsqu'une préparation membranaire exprimant le récepteur d'intérêt est incubée, dans des conditions expérimentales appropriées, le radioligand va se lier au récepteur pour former un complexe radioactif. Ce complexe radioactif est alors mesuré et quantifié.

Le « radiobinding » est une méthode de choix, très largement utilisée dans le cadre d'études d'interaction de ligands avec des RCPGs, en raison de sa robustesse et de sa sensibilité.⁽¹⁶³⁾ En effet, celle-ci permet une mesure directe de l'interaction entre un récepteur et son ligand endogène ou de toute autre molécule conçue et synthétisée pour des applications thérapeutiques par exemple. Cependant, elle ne permet pas de déterminer la nature fonctionnelle des ligands identifiés (agonistes, agonistes partiels, agonistes inverses ou antagonistes).

Le radioligand utilisé dans le cadre d'études de « radiobinding » doit répondre à certains critères. En effet, il doit être hautement sélectif pour le site d'action (orthostérique ou allostérique) du récepteur étudié, chimiquement stable dans les conditions expérimentales, avoir une activité spécifique suffisamment importante pour être détecté par l'instrument de mesure et être pur. Dans le cadre de mes travaux de thèse, les radioligands qui ont été utilisés sont le [³H]-ZM241385 pour le récepteur A_{2A} et le [³H]-MPEP pour le récepteur mGlu₅. Ces radioligands ont été choisis du fait de leur accessibilité commerciale et sur la base d'études de « radiobinding » précédemment publiées dans la littérature pour ces deux récepteurs.^(169–172) En raison du coût onéreux des radioligands et dans le but de limiter notre exposition à ces derniers, il est toujours préférable d'utiliser des radioligands relativement affins pour le récepteur étudié.

En somme, le « radiobinding » est une technique biochimique qui est fréquemment utilisée dans le milieu académique et industriel. En plus de pouvoir déterminer l'affinité entre un ligand et un récepteur, celle-ci permet également de :⁽¹⁶³⁾

- Caractériser le site de liaison d'une molécule à un récepteur cible (orthostérique ou allostérique).
- Étudier l'expression ou la surexpression de certains récepteurs sur des tissus sains, en cours de développement ou malades.

- Identifier des composés « hits » (issus d'une chimiothèque par exemple) interagissant avec un récepteur d'intérêt et ce, par technique de criblage ou de compétition avec un radioligand adéquat.
- Localiser certains récepteurs dans différents organes ou régions en utilisant l'autoradiographie.
- Catégoriser différents sous-types de récepteurs.

Il existe trois expériences de « radiobinding » : des expériences de saturation, de compétition et de cinétique. Durant mes travaux de thèse, essentiellement des tests de saturation et de compétition ont été conduits. Une cinétique d'association sera abordée dans le cadre du récepteur mGlu₅.

1.1. Quantification des paramètres de liaison d'un ligand : K_D et B_{max} (expérience de saturation)

Une expérience de saturation permet de déterminer la constante de dissociation à l'équilibre (K_D , nM) du radioligand sur une préparation membranaire. Cette constante traduit l'affinité du radioligand pour les récepteurs. D'autre part, la saturation permet de déterminer la densité de sites spécifiques dans la préparation étudiée (B_{max} , fmol/mg). Par conséquent, le test de saturation doit être renouvelé de manière systématique sur chaque lot de préparation membranaire utilisé ou lors d'un changement de radioligand.

L'expérience est donc réalisée avec une concentration fixe de récepteurs, exprimés à la surface des membranes, et avec des concentrations croissantes de radioligand. Chaque expérience nécessite trois étapes :

- (1) **Incubation** : C'est une étape qui consiste à mettre en présence le radioligand et le récepteur dans un tampon adapté durant un temps déterminé et avec des conditions précises de température. Cette étape est nécessaire pour que le système atteigne l'équilibre (*cf. Figure 74, p158 & Figure 75*).

- (2) **Séparation** : Cette étape permet d'éliminer les molécules de radioligand restées libres. Ces dernières sont séparées des molécules de radioligand liées au récepteur par filtration.
- (3) **Mesure** : Lors de cette dernière étape, la radioactivité retenue sur le filtre est révélée avec un liquide scintillant puis comptée avec un compteur de radioactivité.

Lors de l'incubation, le radioligand se lie à des sites spécifiques et à des sites non spécifiques (autres protéines présentes dans le milieu d'incubation). La somme des liaisons spécifiques et non spécifiques constitue la **liaison totale (Figure 75)**.

Les **liaisons non spécifiques** augmentent avec la concentration en radioligand et, parce qu'elles ont généralement une faible affinité et une capacité élevée,⁽¹⁷³⁾ continuent d'augmenter après que les liaisons spécifiques soient saturées (**Figure 75**). Ces liaisons non spécifiques sont déterminées en parallèle de la liaison totale en présence d'un excès de ligand non radiomarqué dit « froid ». Le ligand froid se lie sur tous les sites spécifiques présents à la surface des membranes et par conséquent, la radioactivité mesurée dans ces conditions expérimentales est uniquement représentative des liaisons non spécifiques du radioligand. Dans le cadre de mes travaux de thèse, elles ont été déterminées avec une forte concentration (10 μM) d'une molécule de forte affinité pour le récepteur étudié (ZM241385 pour $hA_{2A}R$ et MPEP pour $hmGlu_5R$).

Lorsque la concentration en radioligand augmente, les **liaisons spécifiques** augmentent jusqu'à ce que tous les récepteurs soient occupés par celui-ci (**Figure 75 & Figure 76**). La saturation du milieu est donc atteinte lorsque l'ensemble des sites spécifiques est occupé. La constante de dissociation (K_D) est donc définie comme étant la concentration de radioligand pour laquelle 50 % des sites spécifiques sont occupés par le radioligand. Notons que plus le K_D est faible, meilleure est l'affinité du radioligand pour les récepteurs.

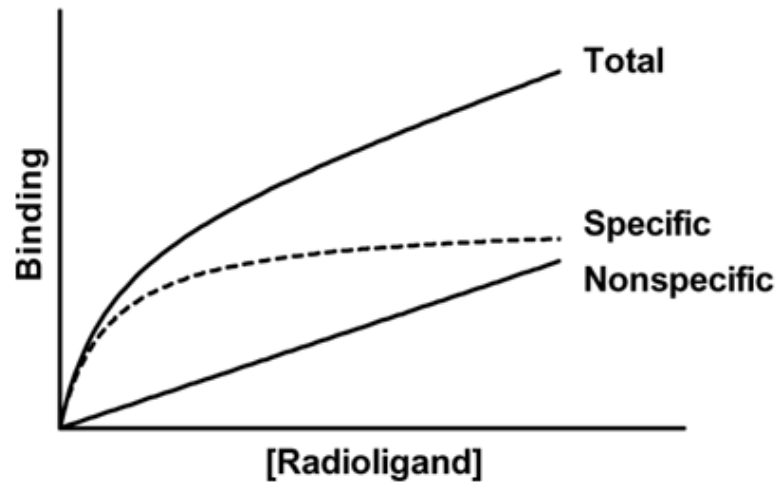


Figure 75. Représentation théorique d'un test de saturation

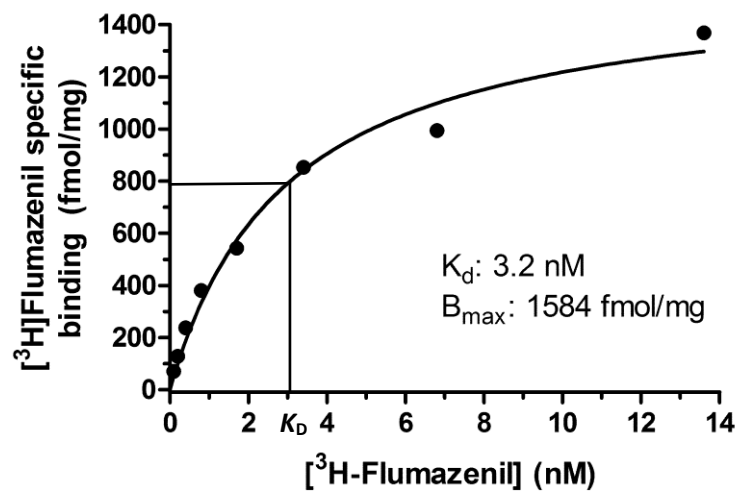


Figure 76. Exemple d'une courbe de saturation des récepteurs GABA exprimés sur des tissus humains post-mortem par le [³H]-Flumazenil⁽¹⁷⁴⁾

1.2. Mesure de l'affinité d'un ligand non radiomarqué (expérience de compétition)

Une expérience de compétition permet de déterminer l'affinité de composés non marqués pour le récepteur d'étude. Cette expérience se réalise en présence de concentrations croissantes de ligand « froid » et de concentrations fixes de radioligand et de récepteurs. Ainsi, par effet de compétition avec le radioligand, une diminution du complexe radioligand-récepteur sera observée aux dépens d'une augmentation du complexe ligand-récepteur, se traduisant par une diminution progressive de la radioactivité (**Figure 77**). La constante d'inhibition (K_i) est la concentration pour laquelle la liaison spécifique du radioligand est diminuée de 50 %. Celle-ci est calculée d'après l'équation de Cheng et Prusoff (**Figure 78**). Plus le K_i est petit, meilleure est l'affinité du ligand testé pour le récepteur.

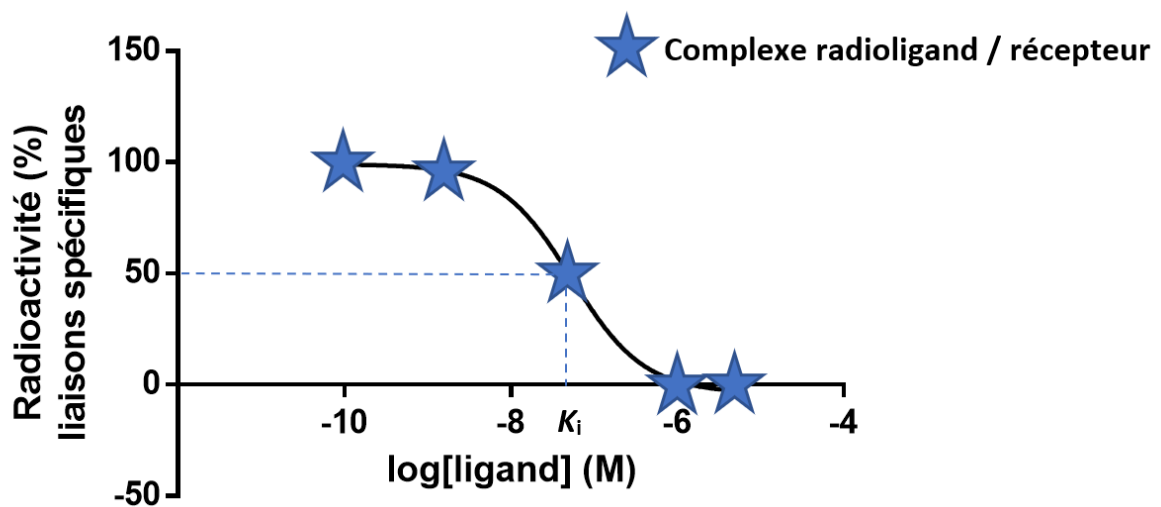


Figure 77. Courbe dose-réponse théorique d'une expérience de compétition entre un radioligand et un ligand non radiomarqué

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[\text{radioligand libre}]}{K_D}}$$

Figure 78. Équation de Cheng et Prusoff⁽¹⁶⁵⁾

La détermination de la constante d'inhibition nécessite au préalable de connaître la constante de dissociation (K_D) du radioligand pour le récepteur. Par conséquent, une expérience de saturation doit être réalisée au préalable sur chaque préparation membranaire utilisée et lors d'un changement de radioligand.

2. Mesure de l'affinité pour le récepteur A_{2A}

Une partie de ma première année de thèse a consisté à la mise au point et à la validation du test de « radiobinding » pour le récepteur A_{2A} . L'élaboration du protocole de « radiobinding » a été effectuée avec l'aide d'Amélie Barczyk (LIRIC UMR 995 – Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, Faculté de Pharmacie de Lille) et du Dr. Séverine Ravez (INSERM UMR-S1172 - Brain Biology & Chemistry – Lille Neuroscience & Cognition). La maîtrise de ce premier test pharmacologique m'a permis d'évaluer rapidement l'affinité des composés synthétisés tout au long de ma thèse. De plus, l'évaluation d'un certain nombre de composés précédemment synthétisés au laboratoire m'a amené à être associé à une publication, en tant que co-auteur.⁽¹⁷⁵⁾

Dans un aspect pratique et pour un gain de temps, des membranes purifiées et surexprimant le récepteur humain A_{2A} ont été achetées chez PerkinElmer (référence commerciale : RBHA2AM400UA). Ce sont des préparations membranaires produites à partir de cellules HEK293.

Comme décrit précédemment et ce, pour chaque lot de membranes utilisé, un test de saturation a été préalablement effectué permettant ainsi de déterminer le K_D et le B_{max} correspondants. Le radioligand utilisé est le [3H]-ZM241385 commercialisé chez American Radiolabeled Chemicals (ART 0884 : 1 mCi/ml - 50 Ci/mmol).

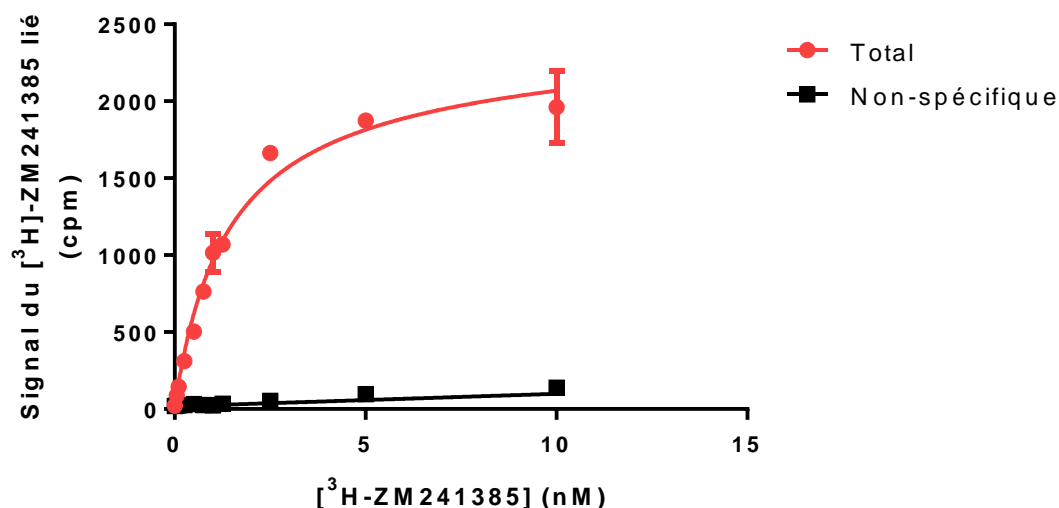
2.1. Expérience de saturation

Conditions :

Type de récepteur	Membranes $hA_{2A}R$ (HEK293) – PerkinElmer Conservation à - 80 °C	
Radioligand	$[^3H]$ -ZM241385 : 0 à 10 nM (11 points)	
Ligand froid	ZM241385 : 10 μ M	
Concentration de membranes par puits	4 μ g	
Concentration en ADA par puits	0.4 μ g	
Température et temps d'incubation	27 °C, 1 heure	
Composition du tampon de « binding »	Tris-Base	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	pH	7.4

Tableau 26. Résumé des conditions pour un test de saturation du récepteur hA_{2A}

➤ **Remarques :** Pour rappel (cf. Figure 13, p20), l'adénosine désaminase (ADA) est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse de l'adénosine en inosine. Sa présence dans la solution de membranes est nécessaire pour assurer le métabolisme d'adénosine éventuellement restante au niveau du site orthostérique du récepteur.

Résultats :Figure 79. Détermination des liaisons totales et non spécifiques du $[^3H]$ -ZM241385 sur des membranes hA_{2A} de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6)

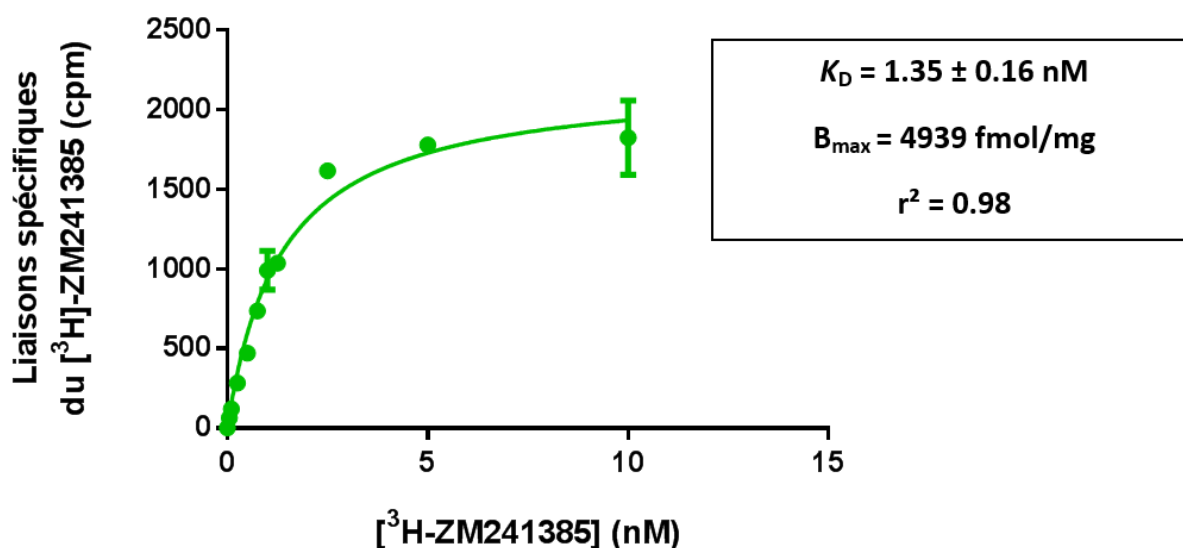


Figure 80. Détermination des liaisons spécifiques du $[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$ sur des membranes hA_{2A} de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6)

Le test de saturation réalisé sur le récepteur hA_{2A} a permis de quantifier la liaison totale et non spécifique du $[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$ à différentes concentrations (Figure 79). La différence des deux signaux a permis de déterminer la liaison spécifique du $[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$ ainsi que le K_D et le B_{max} associés au lot de membranes (Figure 80).

2.2. Expérience de compétition

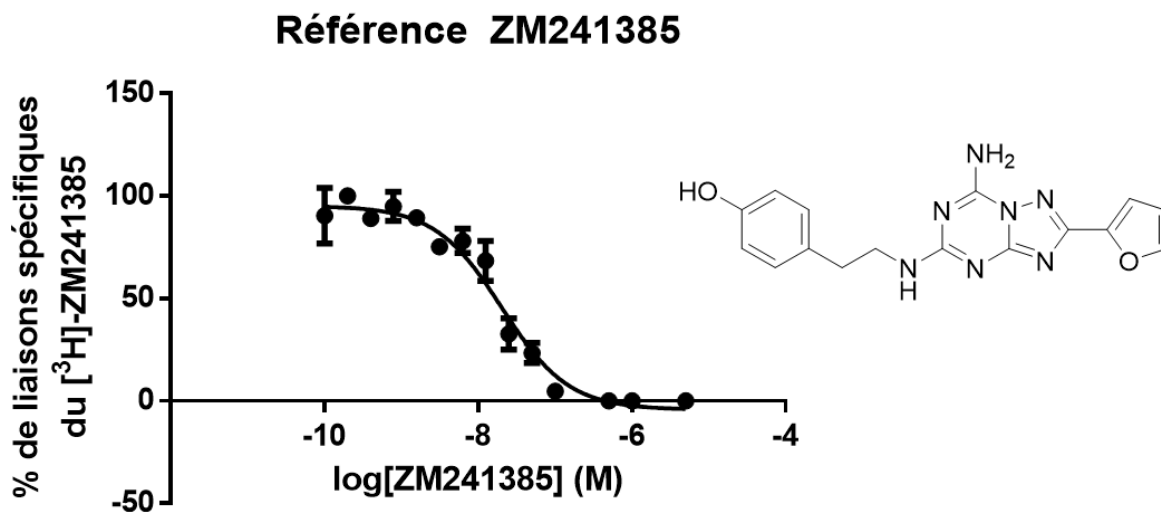
Conditions :

Type de récepteur	Membranes $hA_{2A}R$ (HEK293) – PerkinElmer Conservation à -80°C	
Radioligand	$[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$: 2 nM ($\approx K_D$)	
Ligand froid	ZM241385 : 10 μM	
Concentration du composé à tester	10 μM (screening) ou Gamme (K_i)	
Concentration de membranes par puits	4 μg	
Concentration en ADA	0.4 μg	
Température et temps d'incubation	27 $^\circ\text{C}$, 1 heure	
Composition du tampon de « binding »	Tris-Base	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	pH	7.4

Tableau 27. Résumé des conditions pour un test de compétition sur le récepteur hA_{2A}

Résultats :

o [Validation du test pharmacologique](#)



[³ H-ZM241385] / puits	K_D	r^2	K_i expérimental	K_i théorique
2 nM	1.35 nM	0.99	2.36 nM	1.4 nM

Figure 81. Courbe dose-réponse du ZM241385 pour le récepteur hA_{2A} (GraphPad Prism v6)

Le test de compétition avec le ZM241385, utilisé en tant que molécule de référence, m'a permis de valider ce test pharmacologique avec une affinité similaire à la valeur décrite dans la littérature.⁽¹⁷⁶⁾

o Exemple de dose-réponse pour le composé 79

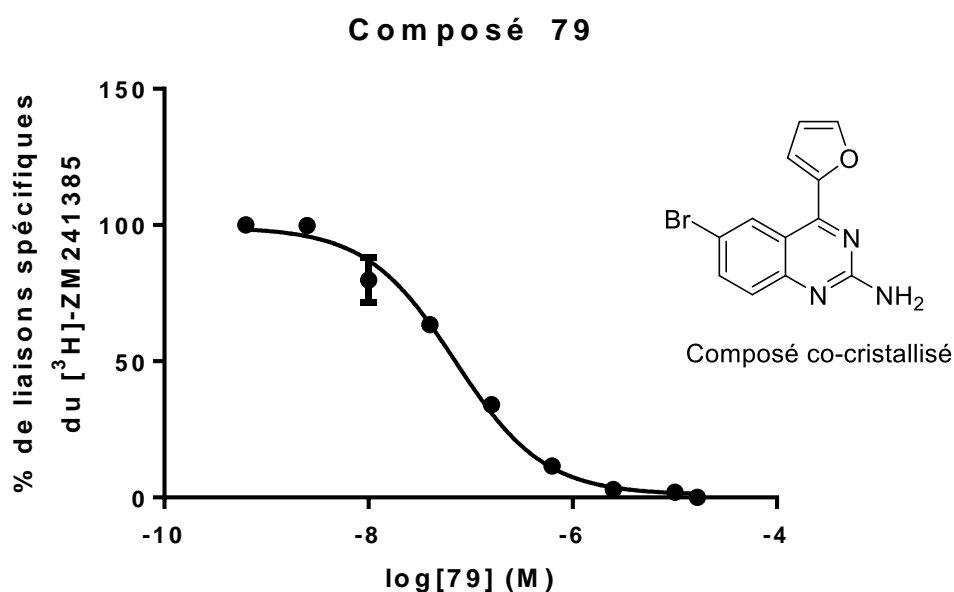


Figure 82. Courbe dose-réponse du composé 79 pour le récepteur hA_{2A} (GraphPad Prism v6)

La maîtrise théorique et pratique du test de « radiobinding » pour le récepteur A_{2A} acquises en première année de thèse m'ont permis de travailler autour de l'élaboration du test de « radiobinding » pour le récepteur $mGlu_5$. Ce travail a été l'un des objectifs principaux de ma deuxième année et ce, avant d'entamer la synthèse de composés à visée mixte. Bien que les connaissances acquises en matière de « radiobinding » aient été importantes en première année, j'ai dû faire face à de nombreuses difficultés concernant la mise en place du test de « radiobinding » pour le récepteur $mGlu_5$. Par conséquent, un réel travail d'approfondissement et d'optimisation ont été menés, conduisant à la mise en place de ce dernier au sein de notre équipe de recherche.

3. Mesure de l'affinité pour le récepteur mGlu₅

Tout comme le récepteur A_{2A}, les préparations membranaires sont produites et achetées chez PerkinElmer (référence commerciale : ES-555-M400UA). Ce sont des préparations membranaires produites à partir de cellules CHO. Il est à noter que ce sont des préparations membranaires purifiées et surexprimant le récepteur *hmGlu_{5A}*, une isoforme du récepteur mGlu₅. Le radioligand utilisé est le [³H]-MPEP commercialisé chez American Radiolabeled Chemicals (ART 1209A: 1 mCi/ml - 60 Ci/mmol).

Nous nous sommes intéressés à la conception et la synthèse de modulateurs allostériques négatifs du récepteur mGlu₅ (**cf. Chapitre 3**). Par conséquent, les expériences de « radiobinding » qui ont été menées sont basées sur le site allostérique de ce récepteur. Bien que le « radiobinding » sur le site allostérique du récepteur mGlu₅ soit décrit dans la littérature,⁽¹⁷¹⁾ plusieurs travaux d'optimisation ont dû être réalisés lors de sa mise en place au sein du laboratoire.

3.1. Travaux d'optimisation

Comme pour le récepteur *hA_{2A}*, la première étape a consisté à effectuer un test de saturation dans le but de déterminer le K_D et le B_{max} de la préparation membranaire utilisée. Pour cela, une gamme du radioligand [³H]-MPEP a été réalisée (0 – 200 nM) en présence ou en absence de MPEP à 10 μ M (détermination des liaisons non spécifiques). Les premiers tests de saturation se sont avérés infructueux en raison d'un très faible signal de radioactivité mesuré pour les liaisons spécifiques. En effet, le signal de radioactivité représentant les liaisons totales obtenu lors des premiers tests de saturation n'était que très légèrement supérieur au signal des liaisons non spécifiques. En raison de ce faible écart, il m'a été impossible de poursuivre mes travaux dans la mesure où les premières courbes de compétition, en l'occurrence celles du MPEP (molécule de référence), n'étaient pas exploitables.

Face à ce problème, et voulant acquérir une certaine rigueur sur la mise en place de ce second test, je me suis rapproché de différents acteurs locaux (Dr. Xavier Dezitter, Amélie

Barczyk et le Dr. Christophe Furman). D'autre part, j'ai pu contacter différentes équipes de recherche internationales (États-Unis, Espagne et Belgique notamment) travaillant sur le récepteur mGlu₅.⁽¹⁷¹⁾ Ces prises de contact m'ont permis de découvrir de nouveaux aspects à la fois théoriques et pratiques, renforçant ainsi mes compétences acquises sur cette technique biochimique. De plus, elles m'ont permis d'établir de potentielles futures collaborations sur un aspect plus fonctionnel du récepteur.

J'ai eu également l'opportunité de me rapprocher du Dr. Céline Legros, pharmacologue chez les laboratoires Servier (Project Manager). Lors de nos différents échanges, elle a su me guider dans les différentes manipulations que je pouvais effectuer pour améliorer la qualité de mes résultats. Ainsi, différents travaux d'optimisation portant sur différents paramètres ont été entrepris dans le but d'augmenter la radioactivité du signal spécifique.

- Tampons

Le tampon de « binding » joue un rôle déterminant lors d'une expérience de « radiobinding ». En effet, il est utilisé dans le but de mimer les conditions physiologiques de liaison *in vivo*.⁽¹⁷³⁾ Il permet également de maximiser les liaisons spécifiques de ligands avec le récepteur et de réduire de surcroît les liaisons non spécifiques associées. Le tampon de « binding » consiste essentiellement en une solution physiologique saline. Dans la littérature, on retrouve essentiellement des tampons de « binding » constitués d'HEPES ou de Tris.⁽¹⁶⁶⁾ Cependant, il est à noter que l'utilisation d'HEPES est recommandée par rapport à celle du Tris dans la mesure où son pK est moins variable avec les changements de température. De plus, le Tris a la capacité de chélater les cations métalliques pouvant ainsi perturber la structure membranaire.⁽¹⁶⁶⁾ Les ligands des RCPGs peuvent contenir dans leur structure des groupements ionisables. Par conséquent, ils peuvent être affectés par le pH et la force ionique du tampon utilisé pouvant ainsi altérer la capacité de liaison de ces derniers.^(166,177) Le pH et la force ionique du tampon sont donc deux paramètres clés à étudier et pouvant être optimisés. Enfin, la présence de cations (mono ou divalents) permet de décroître ou d'augmenter les liaisons spécifiques.⁽¹⁷⁸⁾ En effet, il est maintenant établi que certains cations sont des modulateurs allostériques pouvant stabiliser la conformation de certains RCPGs. De la même façon, l'albumine ou la gélatine peuvent être utilisées pour stabiliser la structure du

récepteur.⁽¹⁷³⁾ Cependant, il est à noter que des conditions qui s'éloigneraient d'un milieu physiologique peuvent entraîner une déstructuration importante du récepteur.

Dans un premier temps, je me suis intéressé à différentes compositions de tampons me permettant d'évaluer leur impact potentiel sur le signal de radioactivité mesuré.

Cas n°1 : 25 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4 (tampon préconisé de chez PerkinElmer)

Cas n°2 : 50 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, pH 7.4.⁽¹⁷⁹⁾

Malheureusement, ces travaux d'optimisation basés sur la composition du tampon n'ont pas permis d'augmenter de manière significative le signal de radioactivité mesuré.

- **Lavages**

J'ai pu étudier l'impact des lavages lors de l'étape de filtration sur le signal de radioactivité mesuré. Pour rappel, les lavages permettent de séparer les fractions liées et non liées à la membrane. Des lavages nombreux et avec un volume important de tampon peuvent favoriser une dissociation du radioligand avec le récepteur (*cf. Figure 74, p158*) et donc entraîner une perte du signal de radioactivité mesuré. C'est pourquoi il est recommandé d'effectuer des lavages réduits avec un tampon froid (4 °C). Différents essais ont donc été menés (3, 5 et 10 lavages) avec en moyenne 300 µL de tampon de lavage (préconisé par PerkinElmer) par puits. La diminution du nombre de lavages n'a pas permis d'augmenter de manière significative le signal de radioactivité mesuré.

- Nature des filtres

Lors de l'étape de filtration, les filtres utilisés sont généralement constitués de fibres de verre pour permettre une filtration rapide avec une rétention maximale de la membrane cellulaire.⁽¹¹⁾ Cependant, il existe des filtres plus épais qui retiennent plus efficacement les membranes, ralentissant ainsi le passage du tampon de lavage. C'est donc dans cette optique que deux types de filtre ont été étudiés : « Unifilter-96 GF/B » ou « Unifilter-96 GF/C » commercialisés chez PerkinElmer. Les filtres « Unifilter-96 GF/B » ont une taille de pore de 1 μm (680 μm d'épaisseur) tandis que les filtres « Unifilter-96 GF/C » ont une taille de pore de 1.2 μm (260 μm d'épaisseur). Les filtres utilisés, associés à des lavages plus ou moins importants, n'ont pas permis également d'augmenter de manière significative le signal de radioactivité mesuré.

- Cinétique d'association

Un temps d'incubation insuffisant peut entraîner une sous-estimation des liaisons spécifiques.⁽¹¹⁾ De ce fait, nous avons envisagé une cinétique d'association entre le radioligand [³H]-MPEP et le site allostérique du récepteur *hmGlu_{5A}* pour définir le temps d'incubation optimal. Le temps d'incubation permet d'atteindre l'équilibre thermodynamique entre ces deux espèces (**cf. Figure 74, p158**).

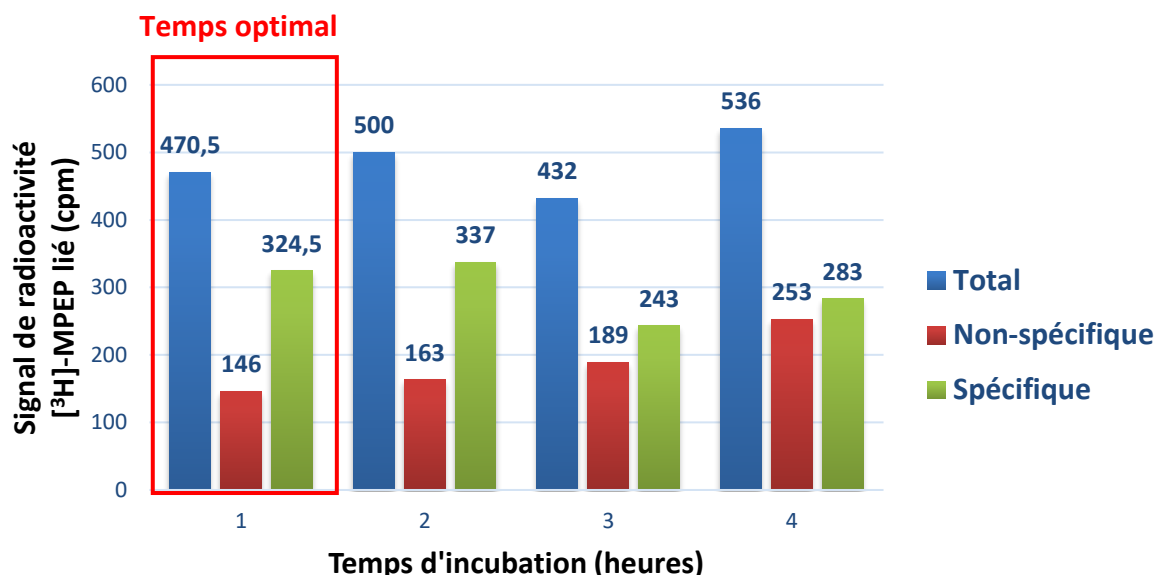


Figure 83. Représentation graphique du signal de radioactivité mesuré du $[^3\text{H}]$ -MPEP lié à la surface de membranes surexprimant le récepteur $hm\text{Glu}_{5A}$ en fonction du temps d'incubation à 27 °C

D'après la **Figure 83**, on observe que pour les différents temps d'incubation, le signal de radioactivité correspondant aux liaisons totales reste constant (≈ 485 cpm). Concernant celui des liaisons spécifiques, il reste faible et constant pour un temps d'incubation de 1 à 2 heures (≈ 300 cpm). Cependant, on peut noter une légère baisse du signal pour des temps d'incubation plus importants (3 et 4 heures). En effet, cette diminution est corrélée avec une augmentation progressive des liaisons non spécifiques en fonction du temps d'incubation. En conclusion, dans le cadre du récepteur $hm\text{Glu}_{5A}$, une augmentation du temps d'incubation ne permet pas d'augmenter le signal spécifique de la préparation membranaire cellulaire utilisée (7.5 μg /puits). Par conséquent, nous avons choisi de rester sur un temps d'incubation de 1 heure à 27 °C qui semble être le plus optimal.

- Concentration de membranes cellulaires

Mes derniers travaux d'optimisation ont porté sur l'étude de la concentration de membranes utilisées dans le cadre de l'expérimentation (7.5 μg /puits). En effet, celle-ci a un impact majeur dans la mesure où plus la concentration de membranes est importante, plus le nombre de sites de liaison accessibles au radioligand est important (B_{max}). Pour cela, une étude a été menée avec une concentration fixe de $[^3\text{H}]$ -MPEP (5 nM) et avec différentes

concentrations de membranes (**Figure 84**). Cette piste d'optimisation n'a pas été envisagée au départ car elle nécessite une consommation très importante de membranes commerciales.

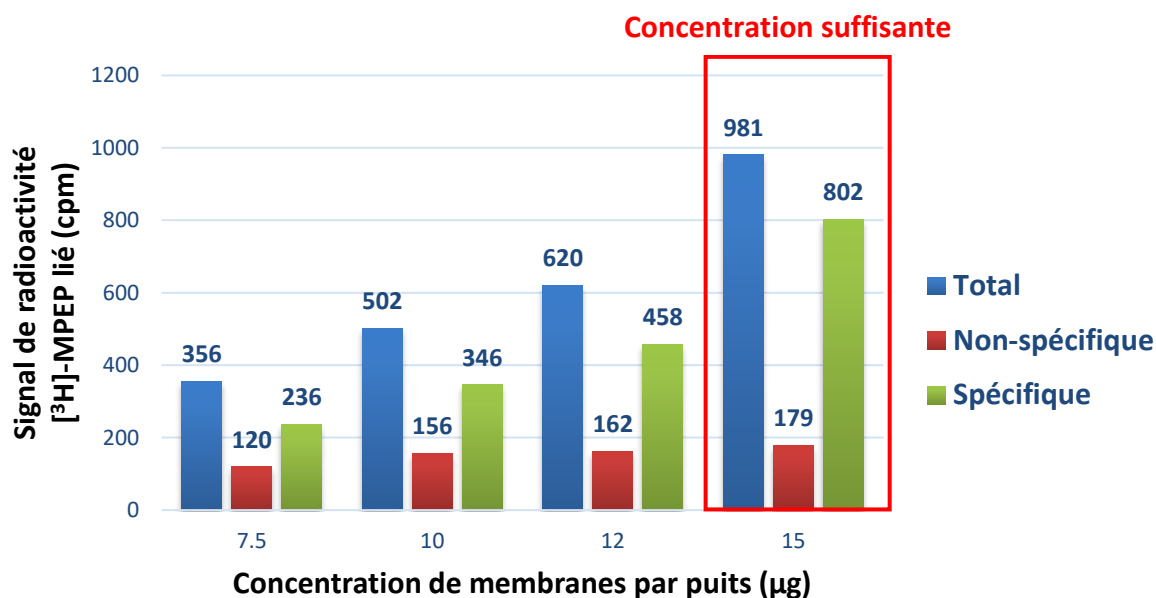


Figure 84. Représentation graphique du signal de radioactivité mesuré du $[^3\text{H}]\text{-MPEP}$ lié à la surface de membranes surexprimant le récepteur $hm\text{Glu}_{5A}$ en fonction de la concentration de membranes

D'après la **Figure 84**, on observe une forte augmentation du signal de radioactivité correspondant aux liaisons totales en fonction de la concentration de membranes par puits (356 cpm pour 7.5 μg /puits vs 981 cpm pour 15 μg /puits). En effet, cette augmentation du signal se traduit essentiellement par une augmentation du signal de radioactivité correspondant aux liaisons spécifiques (236 cpm pour 7.5 μg /puits vs 802 cpm pour 15 μg /puits). D'autre part, le signal de radioactivité correspondant aux liaisons non spécifiques est similaire entre les différentes concentrations de membranes utilisées (≈ 150 cpm). Par conséquent, la concentration de membranes utilisée jusqu'à présent (7.5 μg /puits) a été jugée insuffisante pour avoir un signal de radioactivité de bonne qualité. Ainsi, une concentration de membranes de 15 μg /puits a été identifiée comme étant suffisante pour la poursuite des travaux de « radiobinding ».

3.2. Expérience de saturation

Conditions :

Type de récepteur	Membranes <i>hmGlu_{5A}</i> R (CHO) – PerkinElmer Conservation à - 80 °C	
Radioligand	³ H]-MPEP : 0 à 20 nM (10 points)	
Ligand froid	MPEP : 10 µM	
Concentration de membranes par puits	15 µg	
Température et temps d'incubation	27 °C, 1 heure	
Composition du tampon de « binding »	HEPES	25 mM
	MgCl ₂	1 mM
	CaCl ₂	2.5 mM
	pH	7.4

Tableau 28. Résumé des conditions pour un test de saturation du récepteur *hmGlu_{5A}*

Résultats :

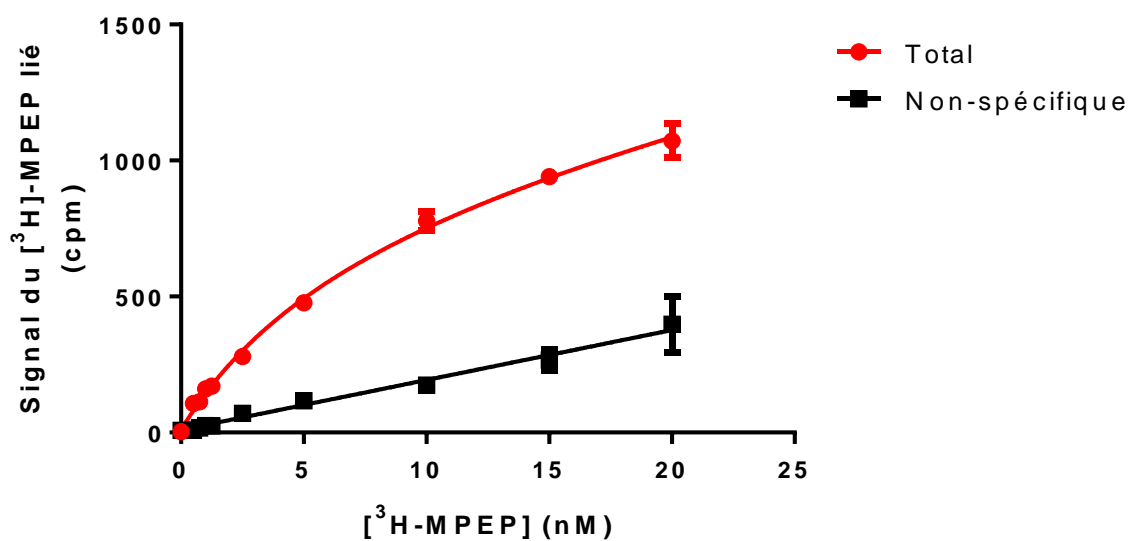


Figure 85. Détermination des liaisons totales et non spécifiques du [³H]-MPEP sur des membranes *hmGlu_{5A}* de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6)

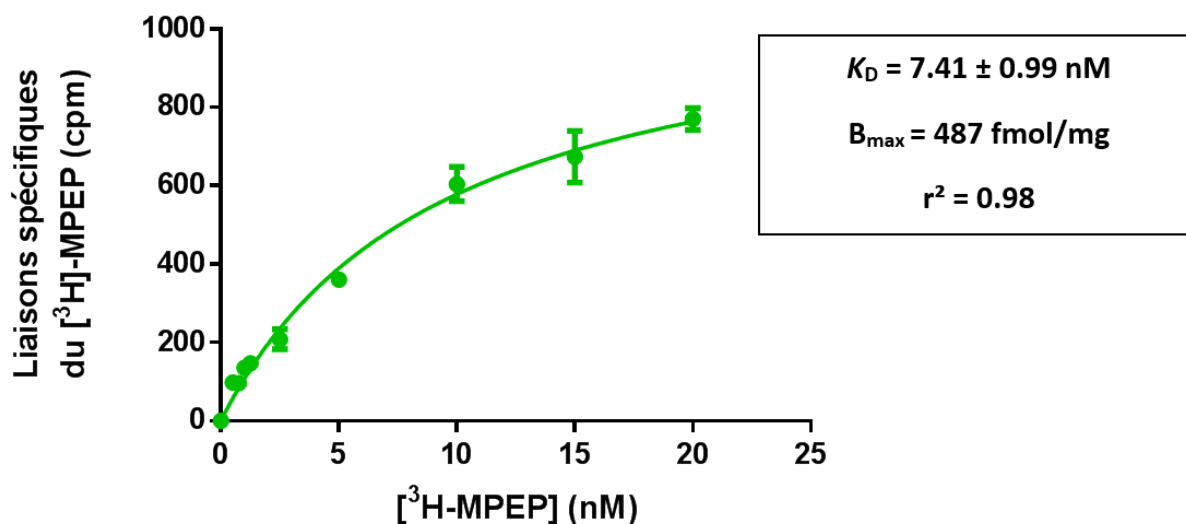


Figure 86. Détermination des liaisons spécifiques du [³H]-MPEP sur des membranes *hmGlu_{5A}* de chez PerkinElmer (GraphPad Prism v6)

Le test de saturation réalisé sur le récepteur *hmGlu_{5A}* a permis de quantifier la liaison totale et non spécifique du [³H]-MPEP à différentes concentrations (Figure 85). La différence des deux signaux a permis de déterminer la liaison spécifique du [³H]-MPEP ainsi que le K_D et le B_{max} associés au lot de membranes (Figure 86).

3.3. Expérience de compétition

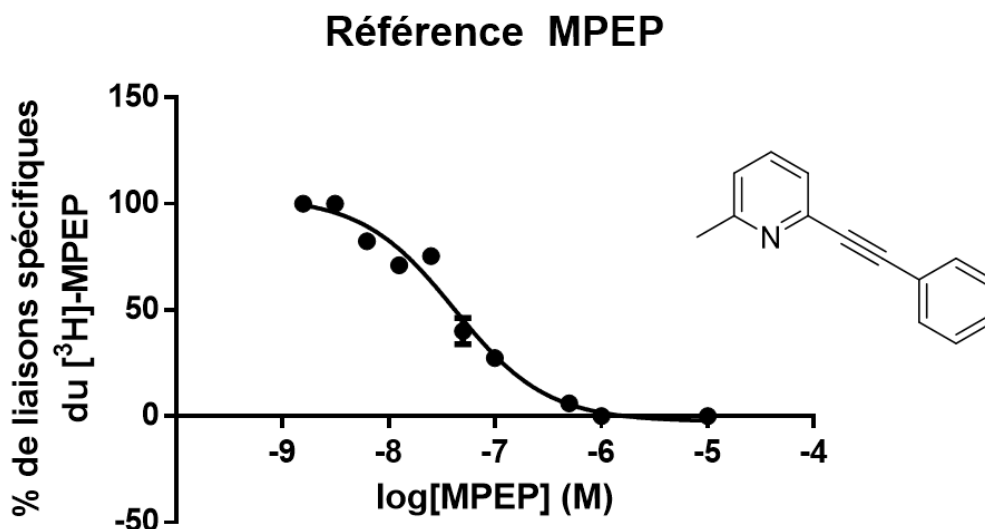
Conditions :

Type de récepteur	Membranes <i>hmGlu_{5A}</i> R (CHO) – PerkinElmer	
	Conservation à - 80 °C	
Radioligand	[³ H]-MPEP : 7 nM ($\approx K_D$)	
Ligand froid	MPEP : 10 μ M	
Concentration du ou des composés	10 μ M (screening) ou Gamme (K_i)	
Température et temps d'incubation	27 °C, 1 heure	
Composition du tampon de « binding »	HEPES	25 mM
	MgCl ₂	1 mM
	CaCl ₂	2.5 mM
	pH	7.4

Tableau 29. Résumé des conditions pour un test de compétition sur le récepteur *hmGlu_{5A}*

Résultats :

- o [Validation du test pharmacologique](#)

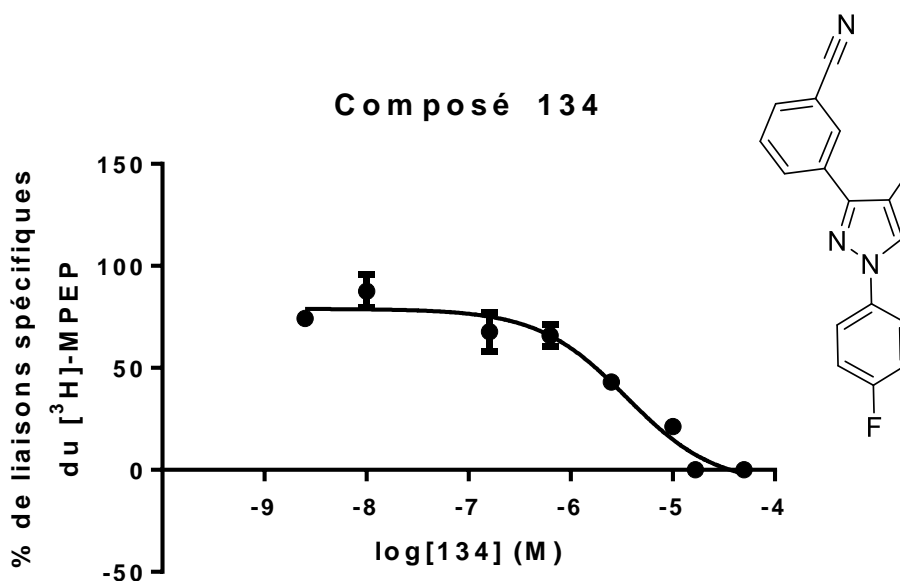


[³ H-MPEP] / puits	K_D	r^2	K_i expérimental ($hmGlu_{5A}$)	K_i théorique ($hmGlu_5$)
5 nM	7 nM	0.98	13.4 nM	6.7 nM

Figure 87. Courbe dose-réponse du MPEP pour le récepteur $hmGlu_{5A}$ (GraphPad Prism v6)

Le test de compétition avec le MPEP, utilisé en tant que molécule de référence, m'a permis de valider ce test pharmacologique avec une affinité similaire à la valeur décrite dans la littérature pour le récepteur $mGlu_5$.⁽¹⁸⁰⁾ Le MPEP est un modulateur allostérique négatif sélectif du récepteur $mGlu_5$.

o Exemple de dose-réponse pour le composé 134



[³ H-MPEP] / puits	K_D	r^2	K_i expérimental
5 nM	3.66	0.96	1.2 μ M

Figure 88. Courbe dose-réponse du composé 134 pour le récepteur *hmGlu_{5A}* (GraphPad Prism v6)

En conclusion, les tests d'affinité pour les récepteurs *hA_{2A}* et *hmGlu_{5A}* ont été mis en place au sein du laboratoire durant mes travaux de thèse. Ces deux tests sont basés sur le principe de « radiobinding » et ont été effectués à la plateforme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille. Pour rappel, de nombreuses étapes d'optimisation ont été nécessaires pour mettre en place le test de « radiobinding » pour le récepteur *mGlu₅*. En effet, il a été déterminé qu'une grande quantité de membranes était nécessaire (15 μ g/puits) pour obtenir un signal exploitable. Cette concentration a sévèrement limité le nombre de composés ayant pu être testé par lot de membranes commerciales (3 composés/lot) et augmente par conséquent le coût du test. C'est pour cela que des étapes de « screening » à 10 μ M ont été privilégiées afin de sélectionner les composés les plus prometteurs. Ainsi, pour la suite de ce projet de recherche, il sera nécessaire de travailler sur la production de membranes cellulaires surexprimant le récepteur *hmGlu₅*. Une lignée cellulaire CHO exprimant stablement le récepteur *mGlu₅* pourra être effectuée (Addgene, GRM5-Tango, référence commerciale 66390). Pour rappel, ces études ne permettent pas d'obtenir d'informations sur la nature

fonctionnelle des ligands étudiés (agonistes, agonistes partiels, agonistes inverses ou antagonistes). Dans le cadre de ma troisième année de thèse, je me suis donc intéressé à mettre en place un test de fonctionnalité pour le $A_{2A}R$. Ce dernier test est toujours en cours de mise en place au sein de notre laboratoire. C'est pourquoi seul son principe sera décrit.

II. Étude fonctionnelle du récepteur A_{2A}

L'activation des récepteurs aux protéines G conduit à une cascade d'événements biologiques produite par la fixation d'un ligand. Cette cascade d'événements induit une modulation de la concentration intracellulaire de certaines molécules, appelées messagers secondaires, conduisant à une réponse biologique. En effet, l'AMP cyclique (AMPc) est l'un des messagers secondaires les plus importants intervenant dans les réponses physiologiques de neurotransmetteurs, hormones ou de médicaments par exemple.

Pour rappel, certains récepteurs couplés aux protéines G ont la capacité de contrôler la production d'AMPc intracellulaire en agissant via l'activation de protéines G spécifiques : capables de stimuler (G_s) ou capables d'inhiber (G_i) la production d'AMPc (**Figure 89**).

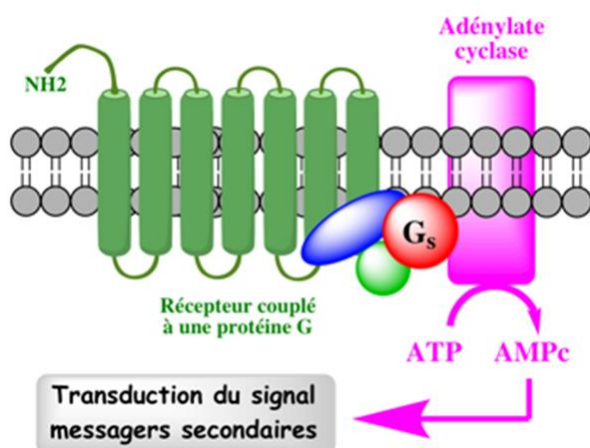


Figure 89. Récepteur couplé à une protéine G_s et synthèse de l'AMPc

D'après la **Figure 89**, la synthèse d'AMPc est induite par la présence d'adénylate cyclase membranaire et d'ATP. Sa régulation intracellulaire est contrôlée par l'équilibre entre

sa synthèse à partir d'ATP et sa dégradation rapide en 5'-AMP par une phosphodiesterase (Figure 90).

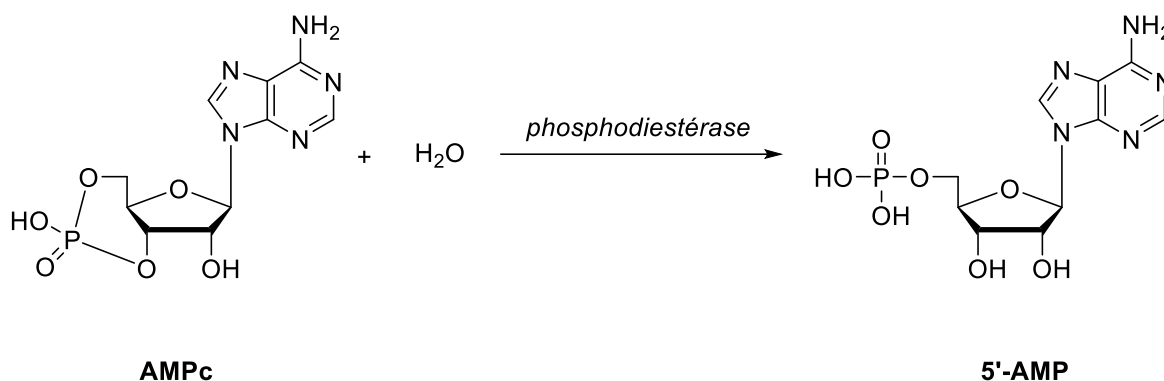


Figure 90. Dégradation de l'AMPc en 5'-AMP par action d'une phosphodiesterase

Les récepteurs A_{2A} modulent la production d'AMPc via leur couplage à une protéine stimulatrice G_s (cf. Figure 89, p179). Ainsi, un agoniste a la capacité d'augmenter l'activité de l'adénylate cyclase entraînant une augmentation de la production intracellulaire d'AMPc. À l'inverse, un antagoniste a la capacité d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase entraînant ainsi une non-production d'AMPc intracellulaire. La quantification de l'AMPc intracellulaire apparaît comme une méthode idéale pour déterminer l'effet fonctionnel de divers ligands.

Pour la mise au point de ce test fonctionnel, la première étape a consisté à générer une lignée cellulaire stable surexprimant le récepteur hA_{2A} . J'ai eu l'opportunité d'être formé à la culture cellulaire (Mathilde Coevoet, INSERM UMR-S1172 - Brain Biology & Chemistry – Lille Neuroscience & Cognition) pour pouvoir la réaliser. Pour cela, une transfection a été réalisée à l'aide du plasmide $hA_{2A}R$ (Addgene, ADORA2A-Tango, référence commerciale 66210) sur les cellules HEK293. Les cellules transfectées sont ensuite sélectionnées par pression de sélection grâce au gène de résistance à la généticine du plasmide. Pour éviter la variabilité d'expression, nous procédons à une dilution limite clonale afin d'obtenir une lignée homogène et stable.

Pour une question d'homogénéité des résultats, nous avons voulu garder le même type cellulaire que pour la préparation membranaire du récepteur hA_{2A} utilisée dans le cadre des études de « radiobinding ».

Dans un second temps, grâce à un kit commercialisé chez PerkinElmer (LANCE cAMP 384 Kit, référence commerciale : AD0262E), un dosage de l'AMPc intracellulaire pourra être effectué dans le but d'évaluer l'effet fonctionnel de nos composés. Cette technique de dosage est extrêmement sensible et robuste. Ce test fonctionnel est basé sur un principe de compétition entre de l'AMPc marquée avec de l'euporium et de l'AMPc non marquée vis-à-vis d'anticorps anti-AMPc marqués avec un fluorophore. À la lecture de la **Figure 91**, en l'absence d'AMPc libre (antagonistes), les anticorps anti-AMPc marqués avec un fluorophore vont interagir uniquement avec l'AMPc marquée à l'euporium présente dans le milieu. Grâce à la technique biophysique TR-FRET, l'énergie émise par l'euporium excité à 340 nm est transférée aux fluorophores des anticorps anti-AMPc qui émettent à 665 nm. À l'inverse, en présence d'AMPc libre (agonistes), il y a une compétition entre l'AMPc libre et l'AMPc marquée à l'euporium. En effet, plus la concentration d'AMPc libre est importante, plus le signal mesuré en TR-FRET sera faible. Il est à noter que l'étude d'un composé antagoniste devra être réalisée en présence d'une concentration fixe d'agoniste (généralement autour de l' EC_{80} de celui-ci).

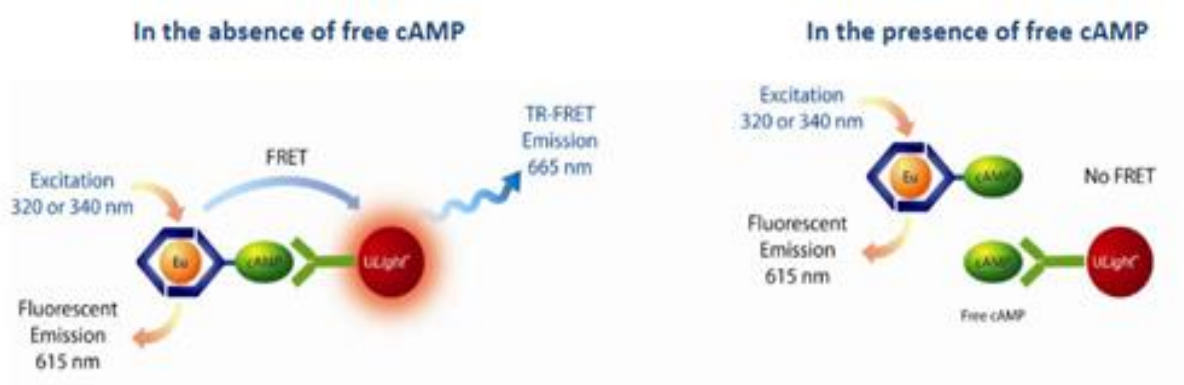


Figure 91. Principe du test fonctionnel pour le dosage de l'AMPc par TR-FRET

Ce test de fonctionnalité fera appel, comme pour les tests d'affinité précédemment décrits, à des molécules de référence pour en assurer sa viabilité. Les molécules de référence qui pourront être utilisées ainsi que leurs IC_{50} respectives sont représentées ci-dessous (**Figure 92**) :

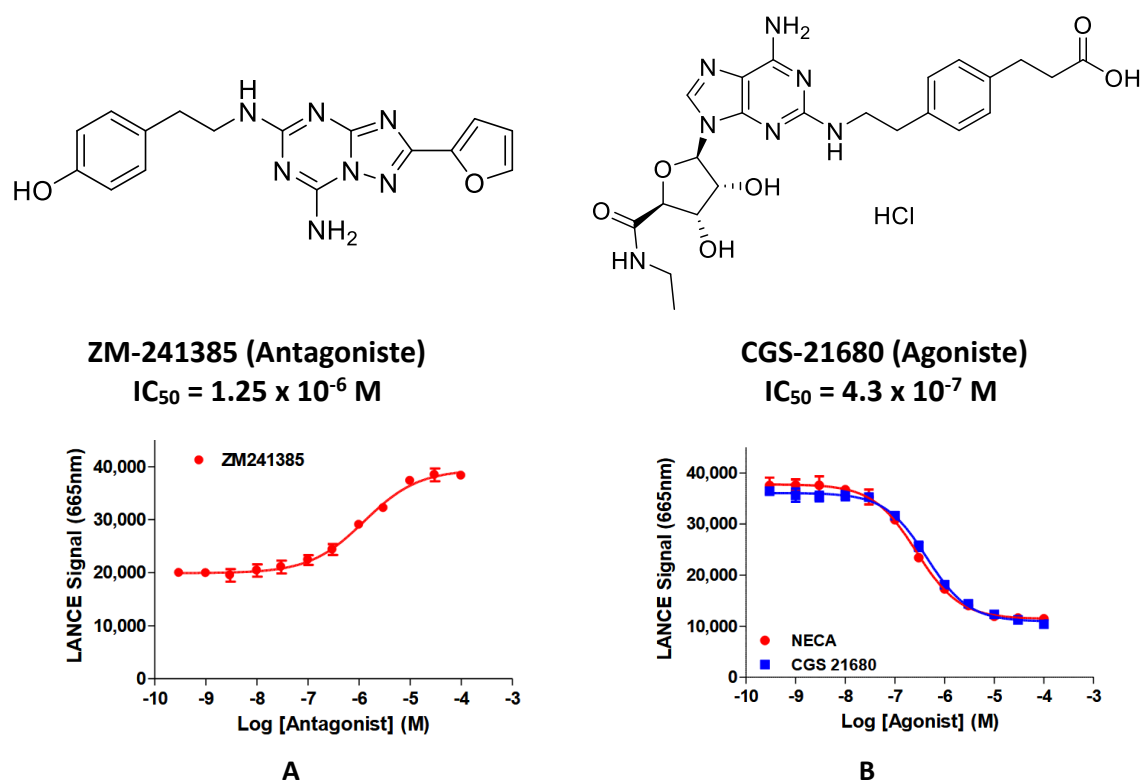


Figure 92. Courbes dose-réponse théoriques du ZM-241385 (A) et du CGS-21680 (B)

➤ **Remarques :** Jusqu'à ce jour, les antagonistes des récepteurs A_{2A} décrits dans la littérature ne présentent pas de sucres dans leur structure. En effet, c'est la différence structurale majeure qui existe entre les agonistes et antagonistes de ce récepteur (**Figure 92**).

III. Étude *in vivo* d'un composé quinazolinique

Durant mes travaux de thèse, j'ai participé de manière active à l'évaluation *in vivo* d'un composé quinazolinique (**Figure 93**). Ce composé a été synthétisé dans le cadre des travaux de thèse de Romain Duroux (*cf.* **Figure 43, p75**). J'ai eu l'opportunité d'être en étroite collaboration avec plusieurs membres de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » (Lille

Neuroscience & Cognition) et plus particulièrement avec le Dr. David Blum, le Dr. Emilie Faivre et le Dr. Victoria Gomez.

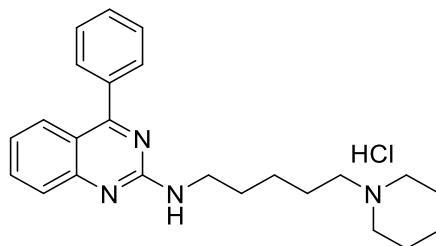


Figure 93. Structure chimique du composé étudié, $K_i(hA_{2A}R) = 223 \pm 54$ nM

Plus précisément, ce travail a consisté à évaluer le passage *in vivo* du composé au travers de la BHE. Faisant partie de ce travail, j'ai pu assister aux différentes réunions d'organisation et prendre connaissance de l'aspect réglementaire de ce projet, qui a fait l'objet de la constitution d'un dossier éthique. Dans un second temps, j'ai été entièrement impliqué dans l'aspect expérimental de celui-ci. En effet, j'ai eu la chance de bénéficier d'une formation animale me permettant d'entrer dans une animalerie de type EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) et d'observer l'ensemble des manipulations qui a pu y être effectué. Plus précisément, trois doses ont été étudiées : 1, 10 et 20 mg/kg. Les souris ont reçu une injection par voie intrapéritonéale et ont été sacrifiées à différents temps d'étude : $t = 15$ min, 30 min, 1h et 4h. Les cerveaux ont été récupérés et ont subi un protocole d'extraction spécifique pour pouvoir quantifier le composé par LC-MS (Céline Lenghart et Catherine Piveteau – Drugs and molecules for Living Systems U1177). Au préalable, une méthode analytique a donc dû être mise en place pour pouvoir connaître les limites de détection du composé dans la matrice étudiée.

Les résultats qui en découlent (**Figure 94**) nous ont permis de valider le passage *in vivo* du composé au travers de la BHE. En effet, les concentrations maximales atteintes sont de 1094, 1707 et 4155 ng/g de cerveau pour 1, 10 et 20 mpk respectivement.

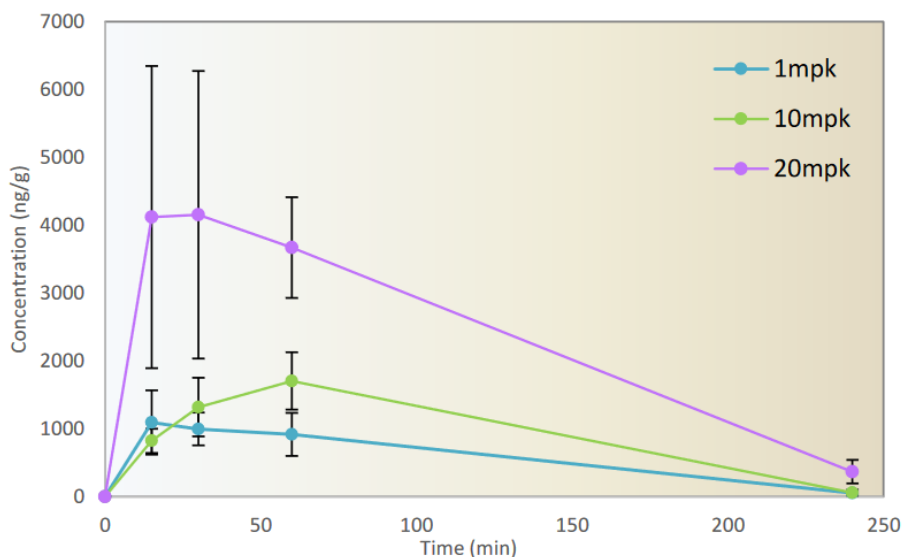


Figure 94. Concentration du composé étudié dans le cerveau en fonction du temps pour une administration unique par voie intrapéritonéale (1, 10 et 20 mpk)

Grâce à mes compétences acquises en « radiobinding », j'ai pu évaluer l'affinité du composé *in vivo* sur des membranes striatales de souris (Dr. Kévin Carvalho – Lille Neuroscience & Cognition) exprimant le récepteur A_{2A} . Ces études de « radiobinding » ont pu montrer que le composé conserve une bonne affinité pour le récepteur de l'ordre du nanomolaire. Cependant, une perte d'affinité est observée par rapport aux études *in vitro* effectuées sur les membranes commerciales (**Figure 95**). Le composé de référence qui a été utilisé, à savoir le ZM241385, présente quant à lui une affinité identique pour $hA_{2A}R$ (*in vitro*) et $A_{2A}R$ dans le striatum de souris, montrant ainsi une bonne analogie entre ces deux récepteurs.

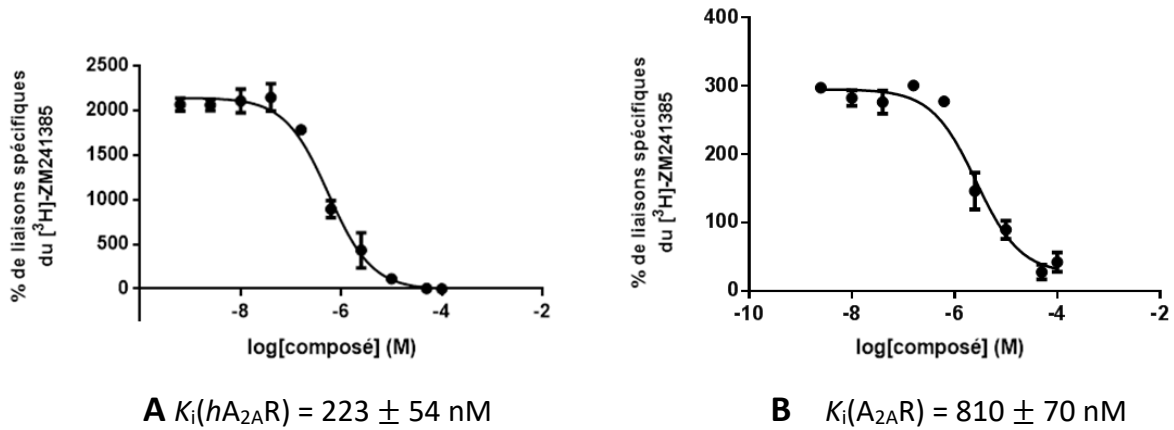


Figure 95. Courbes dose-réponse du composé d'étude : *in vitro* (A) et *in vivo* (B)

Des études de comportement sont actuellement en cours chez la souris. Elles comprennent des études de motricité ainsi que la capacité de notre composé à réverser la catalepsie induite par l'halopéridol, un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D₂.

Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont traité de la conception, de la synthèse et de l'évaluation pharmacologique d'antagonistes des récepteurs A_{2A} et de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅.

- **Antagonistes des récepteurs A_{2A}**

À la suite d'un criblage virtuel réalisé en collaboration avec la plateforme de modélisation moléculaire de la Faculté de Pharmacie de Lille (Dr. Nicolas Renault), deux composés « hit » présentant des affinités micromolaires pour le A_{2A}R ont été identifiés. Pour rappel, ils s'articulent respectivement autour de deux cycles tenseurs : benzofuranique et quinazolinique (**Figure 25**).

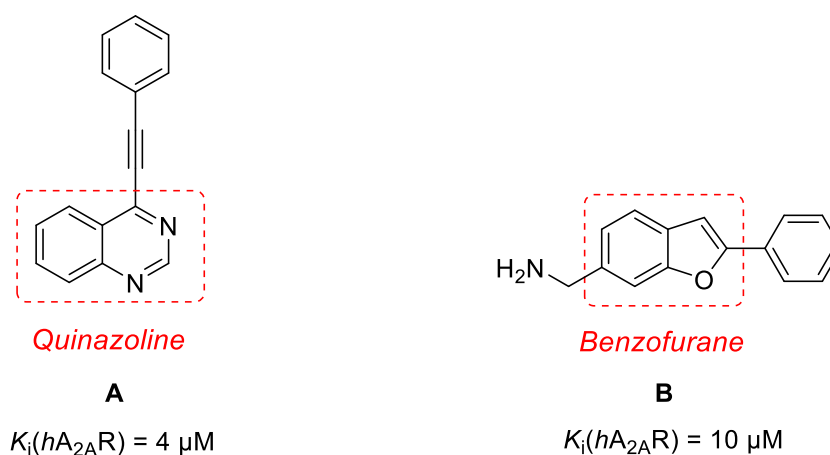


Figure 25. Structures des composés « hit » identifiés par criblage virtuel

- **La famille des benzofuranes**

Dans un premier temps, et grâce à ma formation en modélisation moléculaire (Drs. Nicolas Renault & Maxime Liberelle), j'ai été en mesure d'identifier les positions et la nature des pharmacomodulations pouvant être effectuées autour de cet hétérocycle. Ces travaux ont conduit à des structures benzofuraniques pouvant être tri- ou tétra- substituées (**Figure 26**).

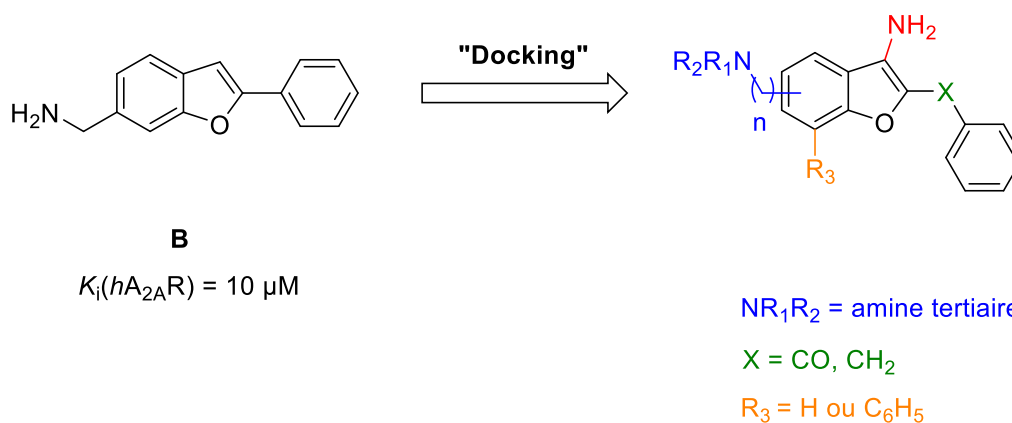


Figure 26. Modulations envisagées autour du « hit » benzofuranique

Les travaux de synthèse réalisés n'ont malheureusement pas permis d'obtenir les composés finaux désirés. Ils se sont arrêtés à la dernière étape. C'est pourquoi d'autres méthodes de réduction des amides tertiaires obtenus ou voies de synthèse pour parvenir à ces composés seront à étudier.

- La famille des quinazolines

Ces travaux font suite aux travaux antérieurs réalisés lors de la thèse de Romain Duroux et dont j'ai activement participé durant mon stage de Master 2. Ils ont conduit à l'identification du composé chef de file **50** d'affinité submicromolaire ($K_i(hA_{2A}R) = 198 \text{ nM}$). Dans le but d'améliorer son affinité pour le $A_{2A}R$ et de moduler ses propriétés pharmacocinétiques, différentes modulations autour de ce composé ont été effectuées (**Figure 96**).

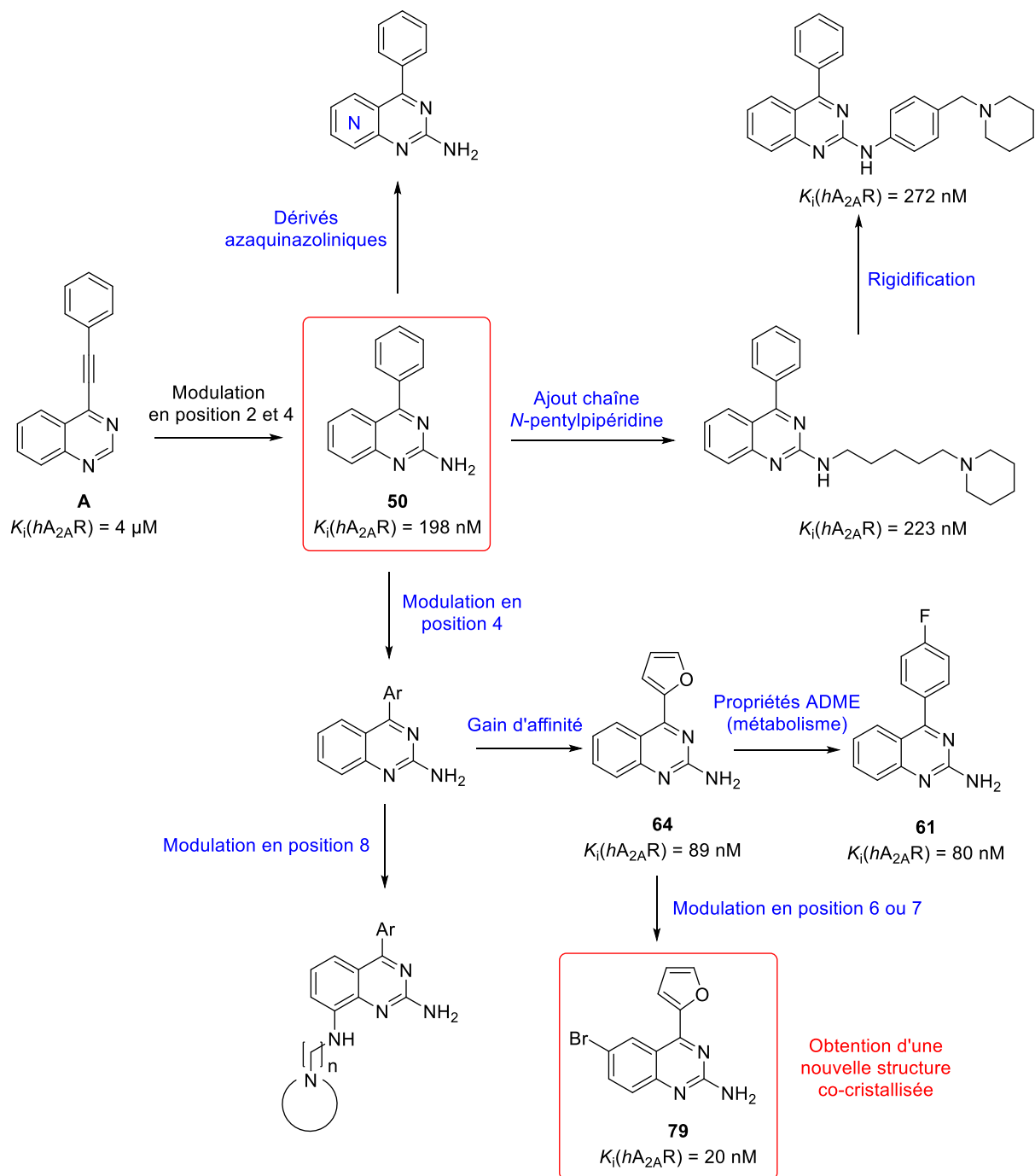


Figure 96. Modulations effectuées autour du composé chef de file 50

Dans le cadre de mes travaux de thèse, ces modulations ont consisté en l'ajout de groupements aromatiques directement attachés à l'hétérocycle en position 4. Ces modulations ont eu pour objectif d'explorer la capacité stérique d'une poche hydrophobe préalablement identifiée en modélisation moléculaire. Elles ont conduit, pour la plupart, à une perte d'affinité pour le A_{2A}R. Cependant, l'identification du composé **64** m'a conduit à émettre une deuxième hypothèse concernant le mode de liaison de nos composés quinazoliniques. Ainsi, d'autres modulations ont été effectuées en position 6, 7 et 8.

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Vadim Cherezov de l'Université de Californie du Sud (Département de Chimie - The Bridge Institute), des études cristallographiques ont été menées et ont permis de valider cette deuxième hypothèse.

Basées sur la nouvelle structure co-cristallisée du A_{2A}R obtenue avec le composé **79**, d'autres pharmacomodulations nous ont été suggérées. Elles ont pour objectifs d'améliorer l'affinité et la sélectivité de nos ligands vis-à-vis des autres récepteurs à l'adénosine (**Figure 97**).

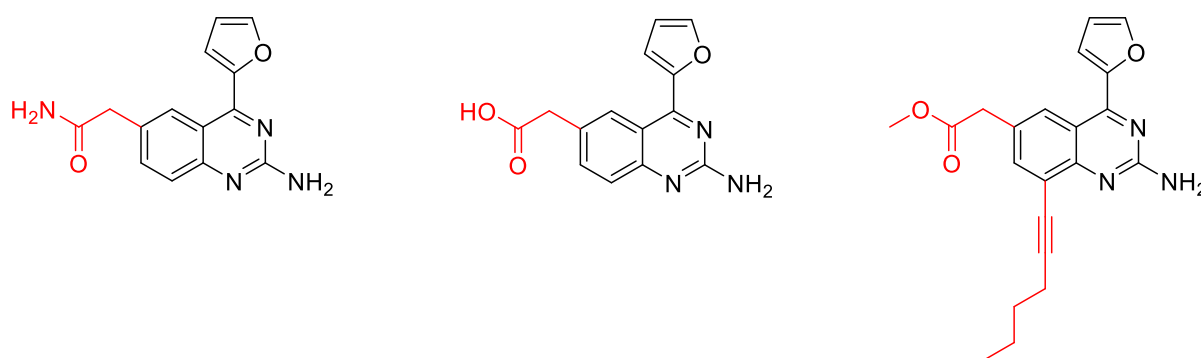
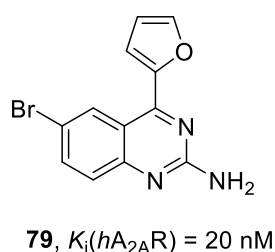


Figure 97. Exemples de pharmacomodulations autour du composé co-cristallisé 79

Les composés quinazoliniques qui ont été conçus et synthétisés sont très intéressants. En effet, l'hétérocyclique quinazolinique est très peu utilisé à notre connaissance dans le développement d'antagonistes du A_{2A}R. De plus, ce sont des composés de petites tailles et qui ont la capacité d'être facilement modulables. Ils font l'objet actuellement d'une publication qui est en cours de rédaction. La fonctionnalité et la sélectivité de nos composés pour les autres récepteurs à l'adénosine sont en cours d'évaluation. De plus, des études de passage de la BHE et des tests comportementaux sont actuellement envisagés en collaboration avec le Dr. David Blum (Lille Neuroscience & Cognition).

- **Ligands duaux A_{2A}R/mGlu₅**

Concernant le deuxième volet de mes travaux, mon premier objectif a été comme pour le projet des antagonistes du A_{2A}R de mettre en place le test d'affinité pour le récepteur mGlu₅. Ce dernier a dû faire l'objet d'importants travaux d'optimisation. Aujourd'hui, du fait de mes travaux, les tests d'affinité des composés pour les récepteurs A_{2A} et mGlu₅ sont mis en place et permettent une évaluation rapide et en continu des composés synthétisés.

La stratégie de ligands mixtes repose sur la ressemblance structurale entre le composé chef de file **50** et certains modulateurs allostériques négatifs pyrimidiques du récepteur mGlu₅. Ce concept nous a amené à développer une stratégie convergente donnant lieu à des composés mixtes (**Figure 98**).

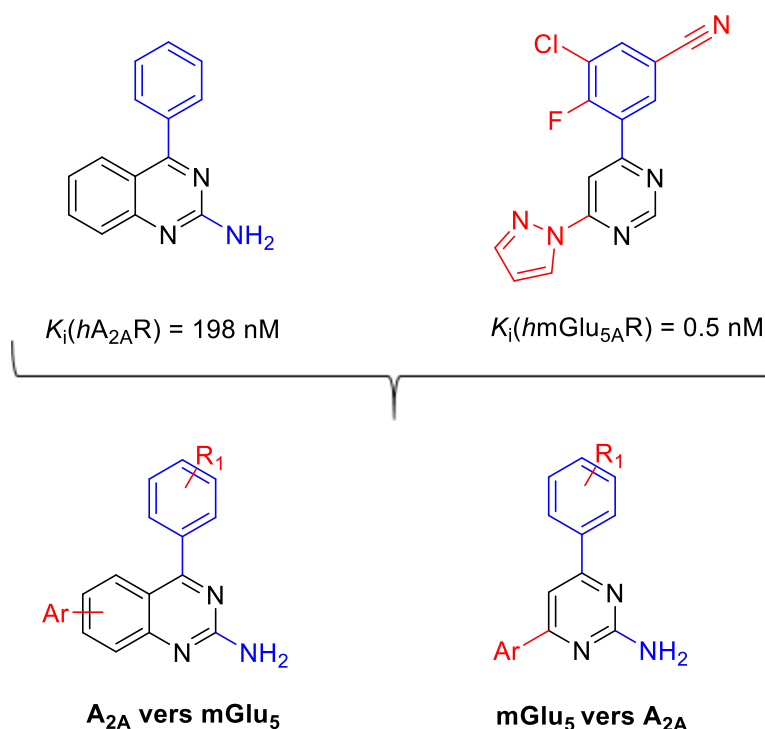


Figure 98. Stratégie de développement de composés mixtes A_{2A}R/mGlu₅R

Cette stratégie de ligands mixtes a donné lieu à la synthèse d'un « hit » multifonctionnel **119b** intéressant pour la suite du projet (**Figure 99**). Des études de docking ont été effectuées sur ce composé et au sein des deux récepteurs. Elles ont montré un mode de liaison similaire avec des ligands de référence (**79** pour hA_{2A}R et la molécule **C** pour hmGlu₅) et ce, au sein des deux récepteurs (**Figure 100**).

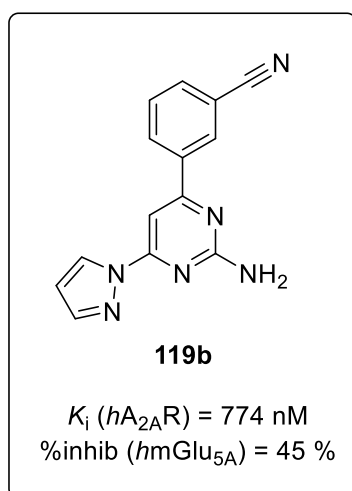


Figure 99. Structure du composé « hit » multifonctionnel 119b

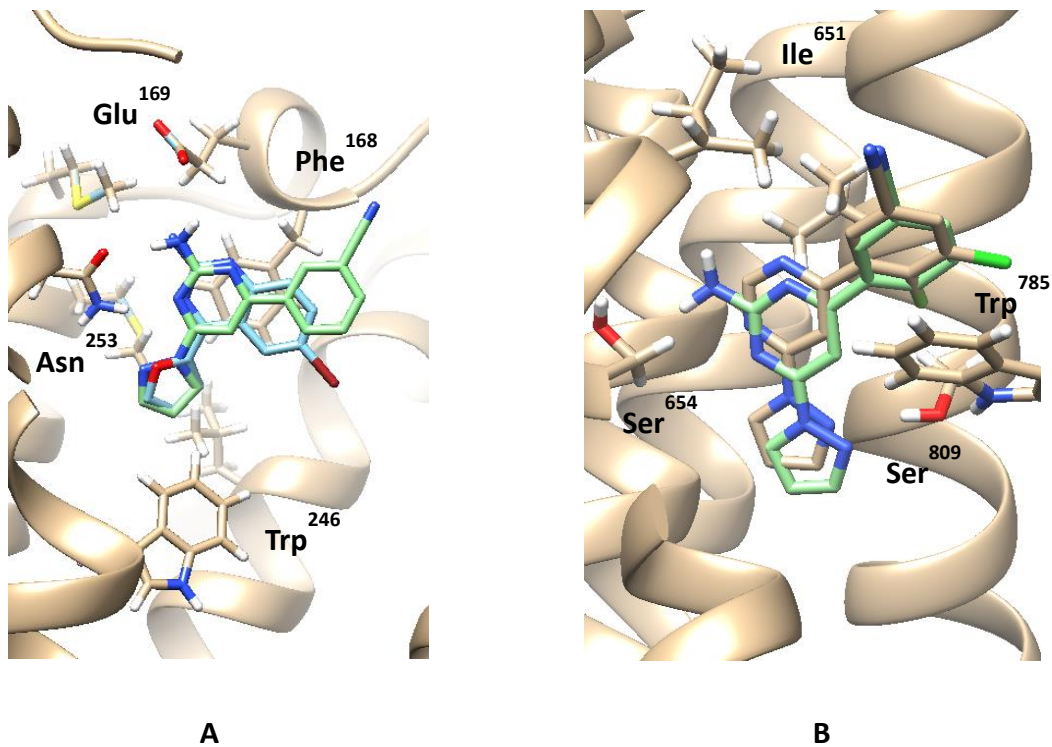


Figure 100. Poses docking sélectionnées du composé 119b (vert) au sein du récepteur *hA_{2A}* (A) et *hmGlu₅* (B).

La mise en place du test d'affinité pour le récepteur mGlu₅ m'a permis, à la suite d'un criblage d'une partie de notre chimiothèque, d'identifier un second «hit» multifonctionnel pour la suite de ce projet. Il s'agit du composé **134** qui s'articule autour d'un cycle tenseur pyrazolique. De plus, il est intéressant de noter que ce composé **134** présente une ressemblance structurale avec un ligand aminotriazole de haute affinité et co-cristallisé au sein du A_{2A}R.⁽¹⁶²⁾ Par conséquent, de nouvelles pharmacomodulations peuvent être envisagées (**Figure 101**).

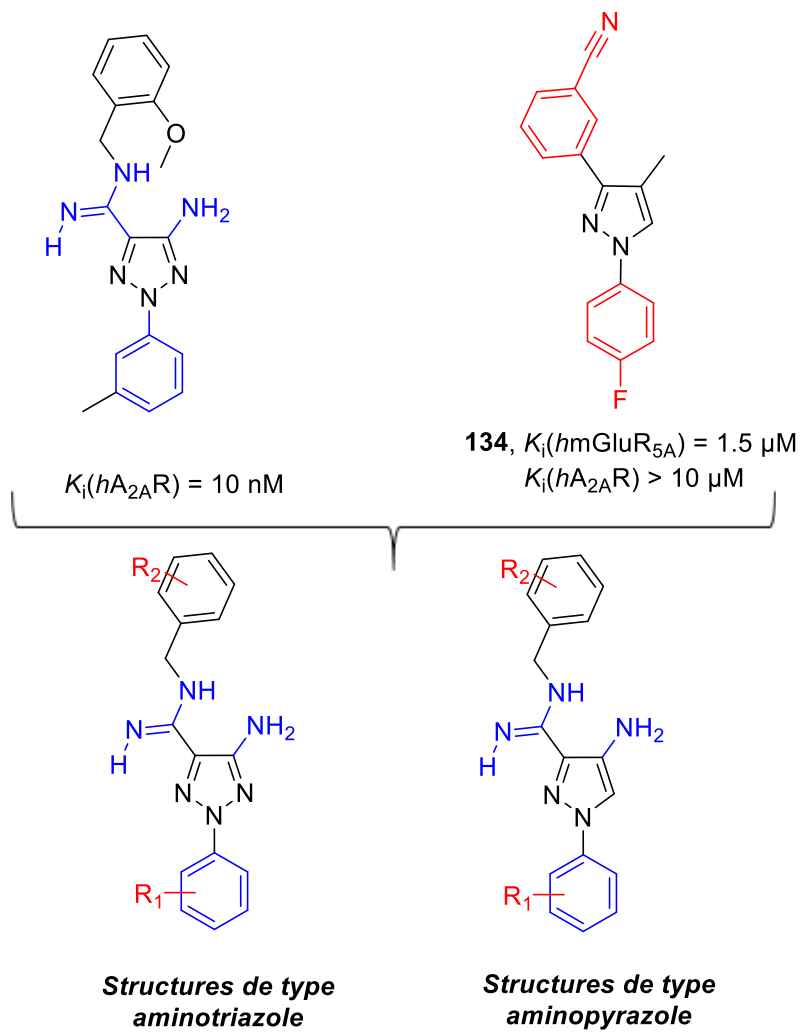


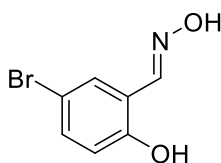
Figure 101. Nouvelle stratégie de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et $mGlu_5$

Partie expérimentale

I. Chemistry

Material and instrumentation

All reagents and solvents were obtained from commercial sources and used without further purification. Reactions were monitored by TLC performed on Macherey-Nagel Alugram® Sil 60/UV254 sheets (thickness 0.2 mm). Purification of products was carried out by Reveleris® X2 Flash Chromatography System from BUCHI. Melting points were determined on a BUCHI B-540 device and are uncorrected. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz (¹H) or 75 MHz (¹³C). Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to either tetramethylsilane (TMS) or to residual proton signal in deuterated solvents. Chemical shifts are reported as position (δ in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, dd = double of doublet, and m = multiplet), relative integral and coupling constant (J in Hz). Mass spectra were recorded with a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) on a Waters Alliance Micromass ZQ 2000 system. LC-MS analyses were performed using a Waters XBridge C18 column (5 μ m particle size column, dimensions 50 mm x 4.6 mm) with an electrospray ionization (ESI) coupled to an UV detector (diode array). A gradient starting from 98% H₂O/formate buffer 5 mM (pH 3.8) and reaching 100% CH₃CN/formate buffer 5 mM (pH 3.8) within 4 min at a flow rate of 2 mL/min was used followed by a return to the starting conditions within 1 min. The purity of final compounds was verified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) column: C18 Interchrom UPTISPHERE. Analytical HPLC was performed on a Shimadzu LC-2010AHT system equipped with a UV detector set at 215 nm and 254 nm. Compounds were dissolved in 100 μ L of acetonitrile and 900 μ L of buffer A, and injected into the system. The following eluent systems were used: buffer A (H₂O/TFA, 100:0.1) and buffer B (CH₃CN/H₂O/TFA, 80:20:0.1). HPLC retention times (t_R) were obtained at a flow rate of 0.2 mL/min for 35 min using the following conditions: a gradient run from 100% of buffer A over 1 min, then to 100% of buffer B over the next 30 min.

1- Synthesis of benzofurans (Chapter 1)**(E)-5-Bromo-2-hydroxybenzaldehyde oxime (2)****Procedure:**

To a solution of 5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde (1.0 eq., 10.0 g, 49.75 mmol) in EtOH (70 mL) was added hydroxylamine hydrochloride (1.2 eq., 4.3 g, 61.36 mmol) and K_2CO_3 (0.5 eq., 3.6 g, 25.72 mmol). Reaction mixture was stirred and heated at reflux for 2 hours. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Solid was filtered and recrystallized from toluene to afford **2** (8.2 g, 76%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.48 (s, 1H), 10.30 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.63 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 7.35 (dd, 1H, $J = 2.6$ Hz and $J = 8.8$ Hz), 6.85 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 155.5 (C), 145.9 (CH), 133.2 (CH), 129.6 (CH), 121.2 (C), 118.8 (CH), 110.9 (C).

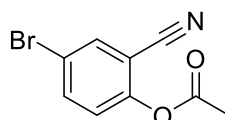
LC-MS (ESI) m/z found: 216, 218 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_7H_6BrNO_2$

Molecular weight: 216.03 g/mol

Melting point: 128 °C

Aspect: White solid

4-Bromo-2-cyanophenyl acetate (3)**Procedure:**

A solution of **2** (1 eq., 5 g, 23.14 mmol) in acetic anhydride (40 mL) was heated at reflux for 4 hours. Mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **3** (4.6 g, 82%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 7.82-7.78 (m, 1H), 7.77-7.71 (m, 1H), 7.19 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 2.40 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ ppm): 167.9 (C), 151.4 (C), 137.2 (CH), 135.6 (CH), 124.8 (CH), 119.0 (C), 113.7 (C), 108.9 (C), 20.8 (CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 240, 242 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

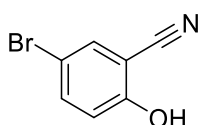
Molecular formula: $\text{C}_9\text{H}_6\text{BrNO}_2$

Molecular weight: 240.06 g/mol

Melting point: 133 °C

Aspect: White solid

5-Bromo-2-hydroxybenzonitrile (4)



Procedure:

To a mixture of **3** (1.0 eq., 5 g, 20.83 mmol) in water (30 mL) was added NaOH (2.5 eq., 2 g, 52.07 mmol). Reaction mixture was stirred and heated at 60 °C until complete dissolution of **3**. Solution was filtered and the filtrate was acidified with a 2 M HCl solution up to acid pH. Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **4** (3.5 g, 85%).

^1H NMR (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 11.41 (s, 1H), 7.88-7.81 (m, 1H), 7.69-7.58 (m, 1H), 7.02-6.91 (m, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ ppm): 160.1 (C), 137.9 (CH), 135.4 (CH), 118.7 (CH), 116.0 (C), 110.2 (C), 101.4 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 198, 200 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

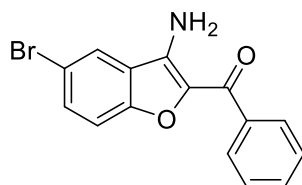
Molecular formula: $\text{C}_7\text{H}_4\text{BrNO}$

Molecular weight: 198.02 g/mol

Melting point: 157 °C

Aspect: White solid

(3-Amino-5-bromobenzofuran-2-yl)(phenyl)methanone (5)



Procedure:

To a solution of **4** (1.0 eq., 12 g, 60.60 mmol) in acetone (100 mL) was added 2-bromoacetophenone (1.2 eq, 15 g, 72.72 mmol) and K_2CO_3 (2.0 eq., 17 g, 121.20 mmol). Reaction mixture was heated at reflux overnight. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **5** (16.1 g, 84%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.33-8.30 (m, 1H), 8.11-8.05 (m, 2H), 7.69 (dd, 1H, $J = 2.2$ Hz and $J = 8.9$ Hz), 7.64-7.51 (m, 4H), 7.42 (br s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 181.5 (C), 153.1 (C), 142.5 (C), 138.0 (C), 134.6 (C), 133.1 (CH), 132.2 (CH), 129.1 (2 CH), 128.9 (2 CH), 125.1 (CH), 123.3 (C), 115.0 (CH), 114.7 (C).

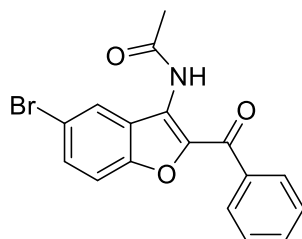
LC-MS (ESI) m/z found: 316, 318 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{15}H_{10}BrNO_2$

Molecular weight: 316.15 g/mol

Melting point: 174 °C

Aspect: Yellow solid

***N*-(2-Benzoyl-5-bromobenzofuran-3-yl)acetamide (6)****Procedure:**

To a solution of **5** (1.0 eq., 5.0 g, 15.82 mmol) in DCM (80 mL) was added acetyl chloride (3.0 eq., 3.4 mL, 47.45 mmol) and pyridine (1.5 eq., 1.9 mL, 23.72 mmol). Reaction mixture was stirred and heated at reflux for 2 hours. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times DCM. Combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated in *vacuo*. Solid was suspended in a small volume of diethyl ether and filtered. Solid was washed with PE and dried to afford **6** (4.3 g, 76%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 10.38 (s, 1H), 8.21-8.17 (m, 1H), 8.00-7.85 (m, 2H), 7.74-7.66 (m, 3H), 7.63-7.55 (m, 2H), 2.11 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 184.8 (C), 168.8 (C), 152.5 (C), 141.4 (C), 137.1 (C), 133.6 (CH), 131.9 (CH), 129.6 (2 CH), 129.0 (2 CH), 126.9 (CH), 126.7 (C), 125.1 (C), 115.9 (C), 115.1 (CH), 23.5 (CH_3).

LC-MS (ESI) m/z found: 358, 360 $[M+H]^+$.

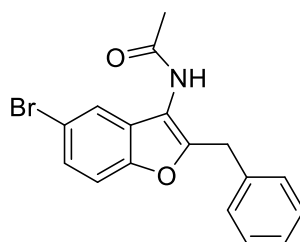
Molecular formula: C₁₇H₁₂BrNO₃

Molecular weight: 358.19 g/mol

Melting point: 163 °C

Aspect: Beige solid

***N*-(2-Benzyl-5-bromobenzofuran-3-yl)acetamide (7)**



Procedure:

To a solution of **6** (1 eq., 5.2 g, 14.52 mmol) in TFA (17 mL) was added triethylsilane (2 eq., 4.7 mL, 29.04 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature until completion by TLC. Thereafter, reaction mixture was hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was suspended in PE and stirred. Solid was filtered and dried to afford **7** (3.9 g, 77%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.72 (s, 1H), 7.64-7.61 (m, 1H), 7.46 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.35-7.23 (m, 5H), 4.12 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 169.5 (C), 151.8 (C), 151.4 (C), 137.5 (C), 129.1 (2 CH), 128.9 (2 CH), 128.4 (C), 127.0 (CH), 126.9 (CH), 122.8 (CH), 115.7 (C), 115.2 (C), 113.6 (CH), 32.2 (CH₂), 23.2 (CH₃).

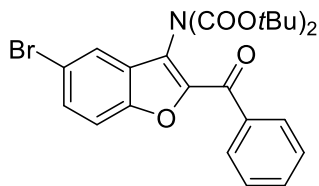
LC-MS (ESI) *m/z* found: 344, 346 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₇H₁₄BrNO₂

Molecular weight: 344.21 g/mol

Melting point: 189 °C

Aspect: White solid

Bis tert-butyl (2-benzoyl-5-bromobenzofuran-3-yl)carbamate (8)**Procedure:**

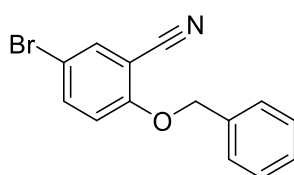
To a solution of **5** (1.0 eq., 100 mg, 0.32 mmol) in dioxane (5 mL) was added Boc₂O (1.5 eq., 104 mg, 0.47 mmol), DMAP (1.0 eq., 39 mg, 0.32 mmol) and Et₃N (2.0 eq., 0.1 mL, 0.63 mmol). Reaction mixture was stirred and heated at reflux few hours. Thereafter, reaction mixture was allowed to room temperature and hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using filtration through silica gel (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 2/8) to afford **8** (19 mg, 14%).

¹H NMR (acetone-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.09-8.04 (m, 2H), 7.86 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 1.8 Hz), 7.77-7.68 (m, 3H), 7.64-7.56 (m, 2H), 1.40 (s, 18H).

Molecular formula: C₂₅H₂₆BrNO₆

Molecular weight: 516.39 g/mol

Aspect: Brown solid

2-(Benzyloxy)-5-bromobenzonitrile (9)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **5** was used starting from **4** (1.0 eq., 0.5 g, 2.53 mmol), benzyl bromide (1.5 eq., 0.5 mL, 3.79 mmol) and K₂CO₃ (2.0 eq., 0.5 g, 5.05 mmol) in acetone (10 mL). Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **9** (0.48 g, 66%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.02 (d, 1H, J = 2.5 Hz), 7.84 (dd, 1H, J = 2.5 Hz and J = 9.1 Hz), 7.51-7.26 (m, 6H), 5.29 (s, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 288, 290 [M+H]⁺.

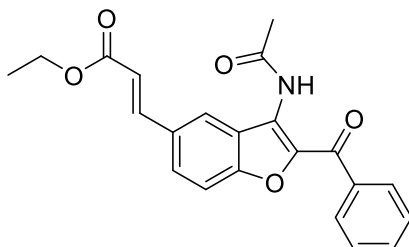
Molecular formula: C₁₄H₁₀BrNO

Molecular weight: 288.14 g/mol

Melting point: 162 °C

Aspect: White solid

Ethyl (*E*)-3-(3-acetamido-2-benzoylbenzofuran-5-yl)acrylate (10**)**



Procedure:

In a sealed tube was added **6** (1.0 eq., 2.00 g, 5.58 mmol), ethyl acrylate (1.5 eq., 0.91 mL, 8.38 mmol), Et₃N (1.5 eq., 1.16 mL, 8.38 mmol), tri(*o*-tolyl)phosphine (0.2 eq., 0.37 g, 1.23 mmol), palladium diacetate (0.1 eq., 0.14 g, 0.61 mmol) and ACN (14 mL). Reaction mixture was stirred, degassed under nitrogen and then heated at 120 °C in an oil bath overnight. Thereafter, reaction mixture was filtered at hot temperature and the filtrate was cooled to room temperature. Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **10** (1.4 g, 66%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.36 (s, 1H), 8.27-8.22 (m, 1H), 8.01-7.94 (m, 3H), 7.78 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz), 7.75-7.66 (m, 2H), 7.62-7.55 (m, 2H), 6.65 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 4.21 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.09 (s, 3H), 1.27 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 378 [M+H]⁺.

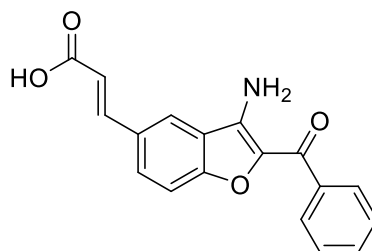
Molecular formula: C₂₂H₁₉NO₅

Molecular weight: 377.40 g/mol

Melting point: 172 °C

Aspect: White solid

(*E*)-3-(3-Amino-2-benzoylbenzofuran-5-yl)acrylic acid (11**)**



Procedure:

To a solution of **10** (1.0 eq., 1 g, 2.65 mmol) in MeOH (20 mL) was added NaOH (2.5 eq., 265 mg, 6.62 mmol) dissolved in water (3 mL). Solution was heated at 60 °C for 1 hour. Thereafter, solution was cooled to room temperature and acidified a 2 M HCl solution up to acid pH. Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **11** (668 mg, 82%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.41-8.36 (m, 1H), 8.11-8.05 (m, 2H), 7.90 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 8.8 Hz), 7.66 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.61-7.52 (m, 4H), 7.46 (br s, 2H), 6.50 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 308 [M+H]⁺.

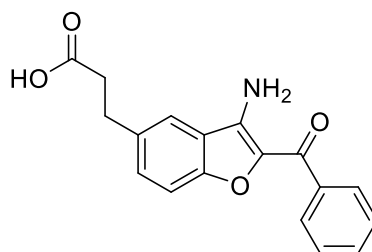
Molecular formula: C₁₈H₁₃NO₄

Molecular weight: 307.31 g/mol

Melting point: 171 °C

Aspect: White solid

3-(3-Amino-2-benzoylbenzofuran-5-yl)propanoic acid (**12**)

**Procedure:**

To a solution of **11** (1 eq., 1 g, 3.25 mmol) in THF (60 mL) was added 100 mg of palladium on carbon (5%). Solution was stirred under H₂ atmosphere until completion by LC-MS. Thereafter, solution was filtered through celite. Filtrate was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was suspended in PE and stirred. Solid was filtered and dried to afford **12** (966 mg, 96%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 12.17 (s, 1H), 8.11-8.05 (m, 2H), 7.90-7.87 (m, 1H), 7.60-7.51 (m, 3H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.40 (br s, 2H), 2.93 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 181.1 (C), 174.1 (C), 153.3 (C), 143.8 (C), 138.3 (C), 135.4 (C), 134.3 (C), 131.9 (CH), 131.5 (CH), 129.0 (2 CH), 128.7 (2 CH), 121.5 (CH), 121.1 (C), 112.6 (CH), 36.0 (CH₂), 30.8 (CH₂).

LC-MS (ESI) m/z found: 310 [M+H]⁺.

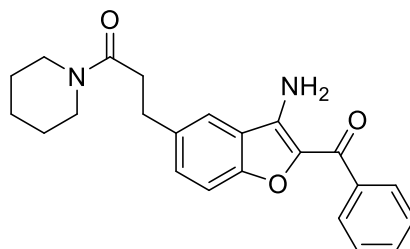
Molecular formula: C₁₈H₁₅NO₄

Molecular weight: 309.32 g/mol

Melting point: 171 °C

Aspect: White solid

3-(3-Amino-2-benzoylbenzofuran-5-yl)-1-(piperidin-1-yl)propan-1-one (13)



Procedure:

To a solution of **12** (1.0 eq., 0.30 g, 0.97 mmol) in DMF (20 mL) was added BOP (1.5 eq., 643 mg, 1.45 mmol), Et₃N (2.0 eq., 0.27 mL, 1.94 mmol) and piperidine (1.0 eq., 0.09 mL, 0.97 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, reaction mixture was hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **13** (194 mg, 53%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.11-8.05 (m, 2H), 7.90-7.86 (m, 1H), 7.63-7.50 (m, 3H), 7.47-7.43 (m, 2H), 7.40 (br s, 2H), 3.45-3.35 (m, 4H), 2.91 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 2.65 (t, 2H, *J* = 8.2 Hz), 1.59-1.48 (m, 2H), 1.45-1.34 (m, 4H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 181.0 (C), 169.8 (C), 153.3 (C), 143.9 (C), 138.3 (C), 136.0 (C), 134.2 (C), 131.9 (CH), 131.7 (CH), 129.0 (2 CH), 128.8 (2 CH), 121.6 (CH), 121.1 (C), 112.5 (CH), 46.3 (CH₂), 42.4 (CH₂), 34.7 (CH₂), 31.2 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (CH₂), 24.5 (CH₂).

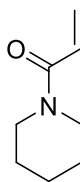
LC-MS (ESI) m/z found: 377 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₃H₂₄N₂O₃

Molecular weight: 376.46 g/mol

Melting point: 198 °C

Aspect: Orange solid

1-(Piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one (14)**Procedure:**

To a solution of piperidine (1.0 eq., 1.00 g, 11.74 mmol) in acetone (10 mL) was added acryloyl chloride (1.5 eq., 1.42 mL, 17.62 mmol) and K_2CO_3 (2.0 eq., 3.25 g, 23.49 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, reaction mixture was hydrolyzed with water and aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **14** (1.2 g, 71%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 6.54-6.48 (m, 1H), 6.20-6.14 (m, 1H), 5.60-5.54 (m, 1H), 3.52-3.44 (m, 4H), 1.57-1.50 (m, 6H).

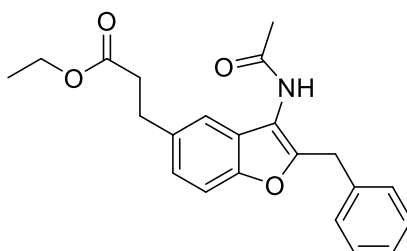
^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ ppm): 165.3 (C), 128.2 (CH), 127.0 (CH_2), 46.9 (CH_2), 43.0 (CH_2), 26.6 (CH_2), 25.5 (CH_2), 24.5 (CH_2).

LC-MS (ESI) m/z found: 140 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_8H_{13}NO$

Molecular weight: 139.20 g/mol

Aspect: Colourless oil

Ethyl 3-(3-acetamido-2-benzylbenzofuran-5-yl)propanoate (15)**Procedure:**

To a solution of **18** (1 eq., 1 g, 2.75 mmol) in THF (29 mL) and MeOH (14 mL) was added ammonium formate (6 eq., 1 g, 16.51 mmol) and palladium on carbon 10% (75 mg). Solution was stirred and heated at 60 °C for 4 hours. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and filtered through celite. Filtrate was hydrolyzed with water and aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over $MgSO_4$,

filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was suspended in PE and stirred. Solid was filtered and dried to afford **15** (694 mg, 69%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.61 (s, 1H), 7.37-7.18 (m, 7H), 7.10 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 8.4 Hz), 4.11-3.99 (m, 4H), 2.92 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.62 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.11 (s, 3H), 1.16 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 172.6 (C), 169.3 (C), 151.8 (C), 150.5 (C), 137.9 (C), 135.2 (C), 129.1 (2 CH), 128.9 (2 CH), 126.9 (CH), 126.5 (C), 124.8 (CH), 119.3 (CH), 115.8 (C), 111.2 (CH), 60.3 (CH₂), 36.3 (CH₂), 32.3 (CH₂), 30.7 (CH₂), 23.2 (CH₃), 14.5 (CH₃).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 366 [M+H]⁺.

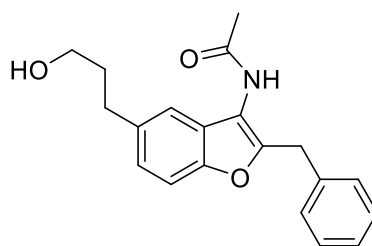
Molecular formula: C₂₂H₂₃NO₄

Molecular weight: 365.43 g/mol

Melting point: 159 °C

Aspect: White solid

***N*-(2-Benzyl-5-(3-hydroxypropyl)benzofuran-3-yl)acetamide (16)**



Procedure:

To a solution of **15** (1.0 eq., 1 g, 2.74 mmol) in dry THF (60 mL) was added LiAlH₄ (2.5 eq., 260 mg, 6.84 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. Thereafter, reaction mixture was hydrolyzed slowly with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was suspended in PE and stirred. Solid was filtered and dried to afford **16** (673 mg, 76%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.61 (s, 1H), 7.37-7.17 (m, 7H), 7.07 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.4 Hz), 4.46 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 4.08 (s, 2H), 3.42 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz), 2.68 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 2.11 (s, 3H), 1.79-1.67 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 169.3 (C), 151.6 (C), 150.3 (C), 137.9 (C), 136.8 (C), 129.1 (2 CH), 128.9 (2 CH), 126.9 (CH), 126.4 (C), 124.9 (CH), 119.2 (CH), 115.8 (C), 111.0 (CH), 60.5 (CH₂), 35.5 (CH₂), 32.3 (CH₂), 32.0 (CH₂), 23.2 (CH₃).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 324 [M+H]⁺.

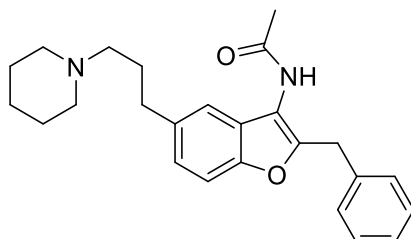
Molecular formula: C₂₀H₂₁NO₃

Molecular weight: 323.39 g/mol

Melting point: 144 °C

Aspect: White solid

***N*-(2-Benzyl-5-(3-(piperidin-1-yl)propyl)benzofuran-3-yl)acetamide (17)**



Procedure:

To a solution of **16** (1.0 eq., 0.50 g, 1.55 mmol) in DCM (40 mL) was added methanesulfonyl chloride (2.0 eq., 0.24 mL, 3.09 mmol) and Et₃N (2.0 eq., 0.43 mL, 3.09 mmol). Solution was stirred at room temperature for 2 hours. Thereafter, solution was concentrated *in vacuo*. Crude product was solubilized in acetone (40 mL) and piperidine (1.5 eq., 0.23 mL, 2.32 mmol) with Et₃N (2.0 eq., 0.43 mL, 3.09 mmol) were added. Solution was stirred and heated at reflux for 72 hours. Then, reaction mixture was concentrated *in vacuo* and suspended in a 2 M HCl solution. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Aqueous layer was alkalinized using a 2 M NaOH solution up to basic pH and then extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **17** (326 mg, 54%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.59 (s, 1H), 7.35-7.19 (m, 7H), 7.07 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 8.4 Hz), 4.07 (s, 2H), 2.64 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.33-2.26 (m, 4H), 2.23 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.11 (s, 3H), 1.72 (p, 2H, *J* = 15.1 Hz), 1.54-1.44 (m, 4H), 1.42-1.32 (m, 2H).

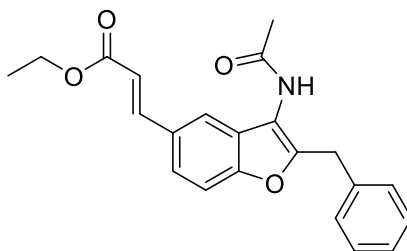
LC-MS (ESI) m/z found: 391 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₅H₃₀N₂O₂

Molecular weight: 390.53 g/mol

Melting point: 182 °C

Aspect: White solid

Ethyl (*E*)-3-(3-acetamido-2-benzylbenzofuran-5-yl)acrylate (**18**)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **10** was used starting from **7** (1.0 eq., 1 g, 2.91 mmol), ethyl acrylate (1.5 eq., 0.5 mL, 4.36 mmol), Et₃N (1.5 eq., 0.6 mL, 4.36 mmol), tri(*o*-tolyl)phosphine (0.2 eq., 0.2 g, 0.64 mmol), palladium diacetate (0.1 eq., 0.1 g, 0.32 mmol) in ACN (14 mL) to afford **18** (591 mg, 56%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.69 (s, 1H), 7.83-7.76 (m, 1H), 7.75-7.69 (m, 1H), 7.65 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.54-7.46 (m, 1H), 7.36-7.19 (m, 5H), 6.60 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 4.20 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz), 4.12 (s, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.28 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 169.5 (C), 166.7 (C), 154.2 (C), 151.3 (C), 145.2 (C), 137.6 (C), 129.3 (C), 129.2 (2 CH), 128.9 (2 CH), 127.0 (CH), 124.9 (CH), 122.8 (C), 120.8 (CH), 117.4 (CH), 116.3 (CH), 112.0 (CH), 60.4 (CH₂), 32.2 (CH₂), 23.2 (CH₃), 14.7 (CH₃).

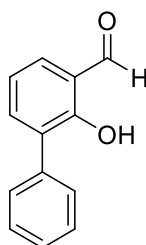
LC-MS (ESI) *m/z* found: 364 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₂H₂₁NO₄

Molecular weight: 363.41 g/mol

Melting point: 157 °C

Aspect: White solid

2-Hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyde (**20**)**Procedure:**

To a solution of 2-phenylphenol (1 eq., 5 g, 29.39 mmol) in THF (60 mL) was added Et₃N (2 eq., 8 mL, 58.75 mmol) followed by MgCl₂ (2 eq., 6 g, 58.75 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes and then paraformaldehyde (5 eq., 16 g, 146.88 mmol)

was added. Reaction mixture was stirred and heated at reflux until completion by TLC. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were washed with a 1 M HCl solution, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to afford **20** (3.67 g, 63%).

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, δ ppm, J Hz): 11.36 (br s, 1H), 10.09 (s, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.69-7.64 (m, 1H), 7.60-7.54 (m, 2H), 7.48-7.35 (m, 4H).

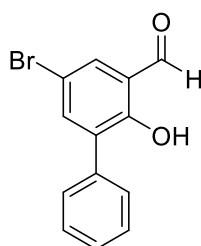
LC-MS (ESI) m/z found: 199 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$

Molecular weight: 198.22 g/mol

Aspect: Yellow oil

5-Bromo-2-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyde (**21**)



Procedure:

To a solution of **20** (1 eq., 5.0 g, 25.22 mmol) in AcOH (70 mL) was added dropwise bromine (2 eq., 2.6 mL, 50.45 mmol). Solution was stirred at room temperature until completion by TLC. Thereafter, solution was hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with DCM. Combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **21** (3.8 g, 54%).

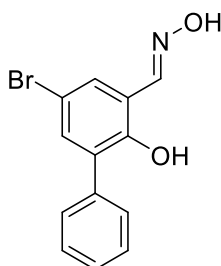
$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, δ ppm, J Hz): 11.22 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 7.98 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 7.77 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 7.59-7.53 (m, 2H), 7.47-7.38 (m, 3H).

LC-MS (ESI) m/z found: 277, 279 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrO}_2$

Molecular weight: 277.12 g/mol

Aspect: Yellow oil

(E)-5-Bromo-2-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyde oxime (22)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **2** was used starting from **21** (1 eq., 4 g, 14.43 mmol), hydroxylamine hydrochloride (1.5 eq., 1.5 g, 21.65 mmol) and K_2CO_3 (0.5 eq., 1 g, 7.22 mmol) in EtOH (100 mL). Solid was filtered and recrystallized from toluene to afford **22** (3.6 g, 86%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.84 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.64 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.57-7.52 (m, 2H), 7.46-7.34 (m, 4H).

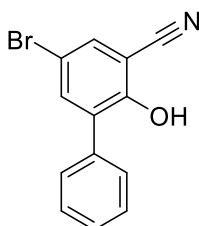
LC-MS (ESI) m/z found: 292, 294 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{13}H_{10}BrNO_2$

Molecular weight: 292.13 g/mol

Melting point: 155 °C

Aspect: White solid

5-Bromo-2-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carbonitrile (23)**Procedure:**

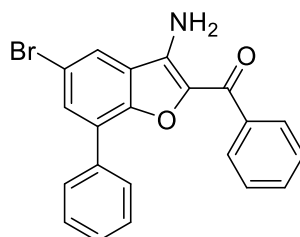
Same procedures as described for compounds **3** and **4** were used starting from **22** (1 eq., 3 g, 10.27 mmol) to afford **23** (2 g, 72%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 10.26 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.72-6.64 (m, 6H).

LC-MS (ESI) m/z found: 274, 276 $[M+H]^+$.

Molecular formula: C₁₃H₈BrNO
Molecular weight: 274.12 g/mol
Melting point: 183 °C
Aspect: White solid

(3-Amino-5-bromo-7-phenylbenzofuran-2-yl)(phenyl)methanone (24)



Procedure:

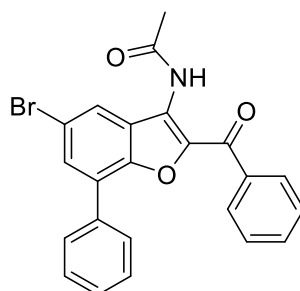
Same procedure to compound **5** was used starting from **23** (1.0 eq., 2.0 g, 7.30 mmol), 2-bromoacetophenone (1.2 eq., 1.7 g, 8.76 mmol) and K₂CO₃ (2.0 eq., 2.0 g, 14.59 mmol) in acetone (70 mL). Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **24** (2.6 g, 91%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.32 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 8.12-8.06 (m, 2H), 7.94-7.88 (m, 3H), 7.60-7.50 (m, 6H), 7.43 (br s, 2H).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 392, 394 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₁H₁₄BrNO₂
Molecular weight: 392.25 g/mol
Melting point: 202 °C
Aspect: Yellow solid

***N*-(2-Benzoyl-5-bromo-7-phenylbenzofuran-3-yl)acetamide (25)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **6** was used starting from **24** (1.0 eq., 3.0 g, 7.65 mmol), acetyl chloride (3.0 eq., 1.6 mL, 22.94 mmol) and pyridine (1.5 eq., 0.9 mL, 11.47 mmol) in DCM (90 mL) to afford **25** (2.4 g, 72%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.41 (s, 1H), 8.15 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.04-7.98 (m, 2H), 7.92-7.87 (m, 3H), 7.71-7.64 (m, 1H), 7.61-7.44 (m, 5H), 2.14 (s, 3H).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 434, 436 [M+H]⁺.

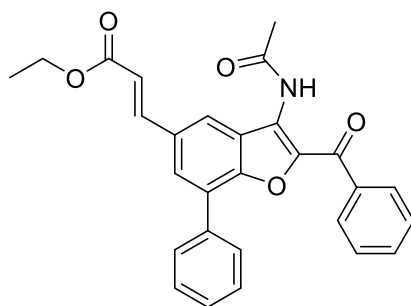
Molecular formula: C₂₃H₁₆BrNO₃

Molecular weight: 434.29 g/mol

Melting point: 254 °C

Aspect: Beige solid

Ethyl (*E*)-3-(3-acetamido-2-benzoyl-7-phenylbenzofuran-5-yl)acrylate (**26**)



Procedure:

Same procedure for compound **10** was used starting from **25** (1 eq, 1.5 g, 3.45 mmol), ethyl acrylate (1.5 eq., 0.6 mL, 5.18 mmol), Et₃N (1.5 eq., 0.7 mL, 5.18 mmol), tri(*o*-tolyl)phosphine (0.2 eq., 0.21 g, 0.69 mmol) and palladium diacetate (0.1 eq., 0.08 g, 0.69 mmol) in ACN (14 mL). Solid was filtered, washed with PE and dried to afford **26** (846 mg, 54%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 10.34 (s, 1H), 7.86-7.80 (m, 4H), 7.79-7.76 (m, 1H), 7.74-7.69 (m, 8H), 6.53 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 4.18 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.06 (s, 3H), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz).

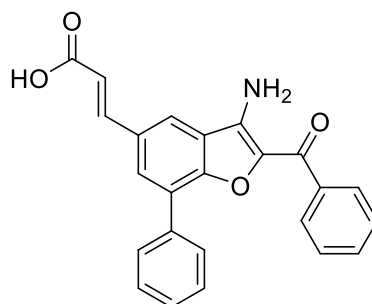
LC-MS (ESI) *m/z* found: 454 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₈H₂₃NO₅

Molecular weight: 453.49 g/mol

Melting point: 236 °C

Aspect: White solid

(E)-3-(3-Amino-2-benzoyl-7-phenylbenzofuran-5-yl)acrylic acid (27)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **11** was used starting from **26** (1 eq., 500 mg, 1.10 mmol) to afford **27** (317 mg, 75%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 7.87-7.81 (m, 4H), 7.58-7.41 (m, 9H), 7.37 (d, 1H, *J* = 17 Hz), 7.35 (br s, 2H).

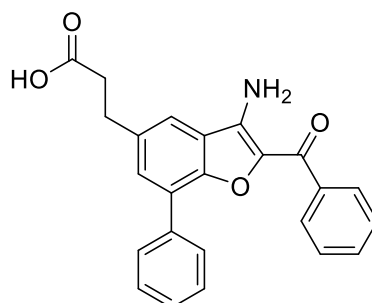
LC-MS (ESI) m/z found: 384 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₄H₁₇NO₄

Molecular weight: 383.40 g/mol

Melting point: 227 °C

Aspect: White solid

3-(3-Amino-2-benzoyl-7-phenylbenzofuran-5-yl)propanoic acid (28)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **12** was used starting from **27** (1 eq., 500 mg, 1.30 mmol) to afford **28** (407 mg, 81%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 12.15 (s, 1H), 7.98-8.7.95 (m, 2H), 7.94-7.51 (m, 10H), 7.40 (br s, 2H), 2.96 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 2.57 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 386 $[M+H]^+$.

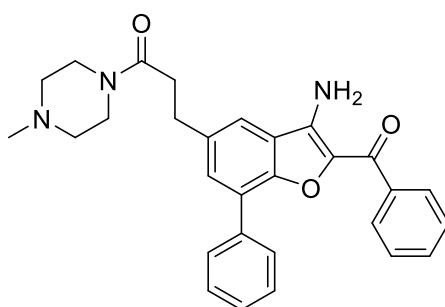
Molecular formula: $C_{24}H_{19}NO_4$

Molecular weight: 385.42 g/mol

Melting point: 232 °C

Aspect: White solid

**3-(3-Amino-2-benzoyl-7-phenylbenzofuran-5-yl)-1-(4-methylpiperazin-1-yl)propan-1-one
(29)**



Procedure:

Same procedure for compound **13** was used starting from **28** (1 eq., 0.12 g, 0.31 mmol), BOP (1.5 eq., 0.21 mg, 0.47 mmol), Et_3N (2 eq., 0.09 mL, 0.62 mmol) and 1-methylpiperazine (1 eq., 0.04 mL, 0.31 mmol) in DMF (10 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/ $EtOAc$: 10/0 to 7/3) to afford **29** (76 mg, 52%). For biological evaluation, oil was suspended in diethyl ether with HCl gas and concentrated *in vacuo*. Residue was solubilized in water and dried in a freeze-dryer.

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 8.33-8.23 (m, 2H), 7.93-7.85 (m, 2H), 7.60-7.40 (m, 8H), 6.03 (br s, 2H), 3.71-3.63 (m, 2H), 3.46-3.39 (m, 2H), 3.22-3.13 (m, 2H), 2.78-2.69 (m, 2H), 2.39-2.32 (m, 2H), 2.29-2.20 (m, 2H), 1.44 (s, 3H).

LC-MS (ESI) m/z found: 468 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{29}H_{29}N_3O_3$

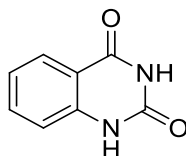
Molecular weight: 467.57 g/mol

Melting point: 267 °C

Aspect: Yellow oil

2- Synthesis of quinazolines (Chapter 2)

Quinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione (**31**)



This compound was synthesized following two synthetic routes:

Procedure A:

A mixture of anthranilic acid (1 eq., 15 g, 109 mmol) and urea (10 eq., 66 g, 1094 mmol) was heated at 160 °C overnight. Solid formed was allowed to room temperature and water was added. Solid was crushed using a sonic bath and filtered. Solid was washed again with water and then DCM. Solid was dried in the oven to afford **31** (16.3 g, 92%).

Procedure B:

To a suspension of anthranilic acid (1.0 eq., 15 g, 109 mmol) in water (690 mL) and AcOH (7 mL) heated at 35 °C was added slowly potassium cyanate (1.3 eq., 12 g, 141 mmol) diluted in water (50 mL). After 2 hours stirring, the reaction mixture was cooled at 0 °C, NaOH (33 eq., 144 g, 3600 mmol) was added portionwise and the mixture was stirred for a night at room temperature. Solid formed was then filtered, suspended in water (400 mL) and acidified with a 6 M HCl solution up to acid pH and filtered again. Solid was dried in the oven to afford **31** (13.7 g, 77%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.27 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 7.88 (dd, 1H, *J* = 1.4 Hz and *J* = 8.1 Hz), 7.62 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.1 Hz and *J* = 8.1 Hz), 7.19-7.14 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.6 (C), 153.1 (C), 141.7 (C), 135.8 (CH), 127.8 (CH), 123.2 (CH), 116.1 (C), 115.2 (CH).

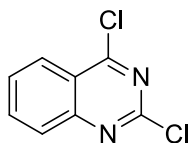
Molecular formula: C₈H₆N₂O₂

Molecular weight: 162.15 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2,4-Dichloroquinazoline (32)

**Procedure:**

To a suspension of **31** (1.0 eq., 4.0 g, 24.7 mmol) in POCl₃ (7.0 eq., 16.1 mL, 172.7 mmol) under stirring was added 2,6-lutidine (0.7 eq., 2.0 mL, 17.3 mmol). The reaction mixture was heated at reflux overnight, cooled to room temperature and then concentrated *in vacuo*. Residue was solubilized in chloroform. Crushed ice with water were added carefully and the mixture was stirred for 10 minutes below 5 °C. Thereafter, aqueous layer was extracted three times with chloroform. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE and filtered to afford **32** (3.9 g, 80%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.30 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.4 Hz and *J* = 0.6 Hz), 8.17 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.0 Hz and *J* = 8.4 Hz), 8.04 (ddd, 1H, *J* = 0.7 Hz, *J* = 1.1 Hz and *J* = 8.5 Hz), 8.17 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.0 Hz and *J* = 8.3 Hz).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 199, 201 [M+H]⁺.

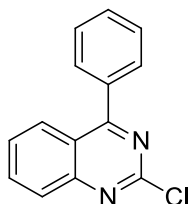
Molecular formula: C₈H₄Cl₂N₂

Molecular weight: 199.04 g/mol

Melting point: 119 °C

Aspect: White solid

2-Chloro-4-phenylquinazoline (33)

**Procedure:**

A mixture of **32** (1.00 eq., 1.0 g, 5.0 mmol), K₂CO₃ (2.00 eq., 1.4 g, 10.0 mmol), phenylboronic acid (1.00 eq., 0.6 g, 5.0 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.2 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 22.6 mg, 0.1 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL) was degassed for 5 minutes with nitrogen. Reaction mixture was heated at 40 °C overnight and then cooled to room temperature. Thereafter, reaction mixture was hydrolyzed with water and aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried

over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to give an oil which was purified using flash chromatography (PE/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **33** (785 mg, 65%).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.16 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz and $J = 8.4$ Hz), 8.10-8.04 (m, 1H), 7.96 (ddd, 1H, $J = 1.4$ Hz, $J = 6.9$ Hz and $J = 8.4$ Hz), 7.86-7.76 (m, 2H), 7.69-7.55 (m, 4H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 171.2 (C), 157.0 (C), 153.0 (C), 135.9 (C), 134.9 (CH), 130.7 (CH), 130.1 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 121.6 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 241, 243 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

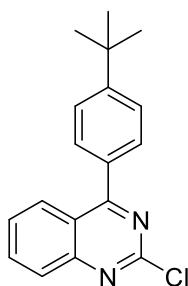
Molecular formula: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2$

Molecular weight: 240.69 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: Beige solid

4-(4-(*Tert*-butyl)phenyl)-2-chloroquinazoline (**34**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 600 mg, 3.02 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 833 mg, 6.04 mmol), 4-*tert*-butylbenzeneboronic acid (1.00 eq., 537 mg, 3.0 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 32 mg, 0.12 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 14 mg, 0.06 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **34** (700 mg, 78%).

^1H NMR (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8.27-8.18 (m, 1H), 8.04-7.99 (m, 1H), 7.94-7.89 (m, 1H), 7.76-7.73 (m, 2H), 7.63-7.58 (m, 3H), 1.40 (s, 9H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ ppm): 171.7 (C), 154.3 (C), 153.0 (C), 134.8 (CH), 133.1 (C), 130.1 (2 CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 126.1 (C), 125.8 (2 CH), 121.6 (C), 35.0 (C), 31.2 (3 CH_3).

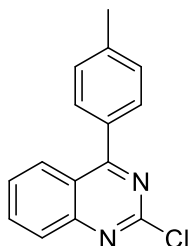
LC-MS (ESI) m/z found: 297, 299 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_2$

Molecular weight: 296.79 g/mol

Melting point: 154 °C

Aspect: Yellow solid

2-Chloro-4-(*p*-tolyl)quinazoline (35)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 4-tolylboronic acid (1.00 eq., 342 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **35** (270 mg, 42%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.16-8.02 (m, 3H), 7.80-7.71 (m, 3H), 7.47-7.44 (m, 2H), 2.45 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 171.8 (C), 156.6 (C), 156.3 (C), 152.8 (C), 141.3 (CH), 136.0 (CH), 133.1 (C), 130.6 (2 CH), 129.8 (2 CH), 129.2 (CH), 127.9 (CH), 121.7 (C), 21.5 (CH₃).

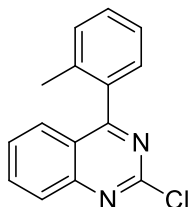
LC-MS (ESI) m/z found: 255, 257 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₅H₁₁ClN₂

Molecular weight: 254.72 g/mol

Melting point: 145 °C

Aspect: Pale brown solid

2-Chloro-4-(*o*-tolyl)quinazoline (36)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 1.0 g, 5.02 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 1.4 g, 10.05 mmol), 2-tolylboronic acid (1.00 eq., 0.7 g, 5.02 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.20 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 22.6 mg, 0.10 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **36** (794 mg, 62%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.08-8.06 (m, 1H), 7.98-7.92 (m, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 1H), 7.49-7.43 (m, 1H), 7.39-7.33 (m, 3H), 2.59 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 173.3 (C), 157.0 (C), 152.5 (C), 136.2 (C), 135.3 (C), 135.1 (CH), 130.8 (CH), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.5 (CH), 125.8 (CH), 122.6 (C), 19.9 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 255, 257 [M+H]⁺.

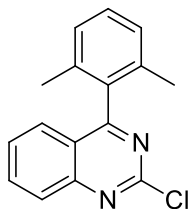
Molecular formula: C₁₅H₁₁ClN

Molecular weight: 254.71 g/mol

Melting point: 86 °C

Aspect: Beige solid

2-Chloro-4-(2,6-dimethylphenyl)quinazoline (37)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 1.0 g, 5.02 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 1.4 g, 10.05 mmol), 2,6-dimethylphenylboronic acid (1.00 eq., 0.8 g, 5.02 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.20 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 22.6 mg, 0.10 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **37** (891 mg, 66%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.10-8.07 (m, 1H), 7.99-7.94 (m, 1H), 7.58-7.55 (m, 2H), 7.37-7.32 (m, 1H), 7.21-7.18 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 1.97 (s, 6H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 174.0 (C), 157.5 (C), 152.3 (C), 135.6 (2 C), 135.3 (CH), 135.0 (C), 129.3 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (2 CH), 126.7 (CH), 122.8 (C), 19.9 (2 CH₃).

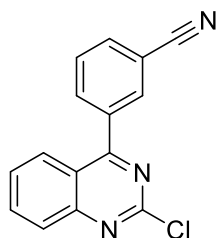
LC-MS (ESI) m/z found: 269, 271 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₆H₁₃ClN₂

Molecular weight: 268.74 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: Beige solid

3-(2-Chloroquinazolin-4-yl)benzonitrile (38)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 400 mg, 2.01 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 555 mg, 4.02 mmol), 3-cyanophenylboronic acid (1.00 eq., 295 mg, 2.01 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 21.1 mg, 0.08 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 9 mg, 0.04 mmol) in dioxane (8 mL) and water (2 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **38** (180 mg, 34%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.27-8.26 (m, 1H), 8.17-8.06 (m, 5H), 7.88-7.78 (m, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 170.0 (C), 156.2 (C), 152.8 (C), 137.0 (C), 136.5 (CH), 135.1 (CH), 134.7 (CH), 134.0 (CH), 130.5 (CH), 129.7 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 121.7 (C), 118.7 (C), 112.4 (C).

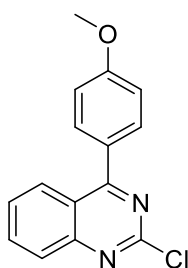
LC-MS (ESI) m/z found: 266, 268 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{15}H_8ClN_3$

Molecular weight: 265.70 g/mol

Melting point: 204 °C

Aspect: White solid

2-Chloro-4-(4-methoxyphenyl)quinazoline (39)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 4-methoxyphenylboronic acid (1.00 eq., 382 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq, 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate

(0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **39** (314 mg, 46%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.19 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.3 Hz and *J* = 0.7 Hz), 8.09 (ddd, 1H, *J* = 1.3 Hz, *J* = 6.7 Hz and *J* = 8.4 Hz), 8.02 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.4 Hz and *J* = 0.5 Hz), 7.85-7.75 (m, 3H), 7.23-7.18 (m, 2H), 3.90 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 171.2 (C), 162.0 (C), 156.4 (C), 152.9 (C), 135.9 (CH), 132.6 (2 CH), 129.1 (CH), 128.2 (C), 127.9 (CH), 128.2 (CH), 121.5 (C), 114.8 (2 CH), 56.0 (OCH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 271, 273 [M+H]⁺.

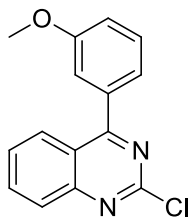
Molecular formula: C₁₅H₁₁ClN₂O

Molecular weight: 270.72 g/mol

Melting point: 172 °C

Aspect: Pale brown solid

2-Chloro-4-(3-methoxyphenyl)quinazoline (**40**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 3-methoxyphenylboronic acid (1.00 eq., 382 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **40** (300 mg, 44%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.15-8.07 (m, 2H), 8.07-8.00 (m, 1H), 7.83-7.73 (m, 1H), 7.59-7.51 (m, 1H), 7.37-7.30 (m, 2H), 7.23 (ddd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.6 Hz and *J* = 0.8 Hz), 3.85 (s, 3H).

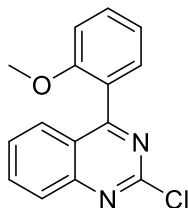
LC-MS (ESI) m/z found: 271, 273 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₅H₁₁ClN₂O

Molecular weight: 270.71 g/mol

Melting point: 152 °C

Aspect: Pale brown solid

2-Chloro-4-(2-methoxyphenyl)quinazoline (41)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 2-methoxyphenylboronic acid (1.00 eq., 382 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26.4 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **41** (530 mg, 78%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.10-7.99 (m, 2H), 7.75-7.67 (m, 2H), 7.65-7.58 (m, 2H), 7.47-7.42 (m, 1H), 7.21-7.14 (m, 1H), 3.70 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 171.5 (C), 156.9 (C), 156.5 (C), 151.9 (C), 136.2 (CH), 132.4 (CH), 131.1 (CH), 129.1 (CH), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 124.9 (C), 122.9 (C), 121.3 (CH), 112.4 (CH), 56.0 (OCH₃).

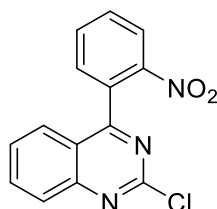
LC-MS (ESI) m/z found: 271, 273 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₅H₁₁ClN₂O

Molecular weight: 270.72 g/mol

Melting point: 160 °C

Aspect: Brown solid

2-Chloro-4-(2-nitrophenyl)quinazoline (42)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 1.0 g, 5.02 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 1.4 g, 10.05 mmol), 2-nitrophenylboronic acid (1.00 eq., 0.84 g, 5.02 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.20 mmol) and palladium diacetate (0.02

eq., 22.6 mg, 0.10 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **42** (600 mg, 42%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.35-8.30 (m, 1H), 8.11-8.06 (m, 1H), 8.04-7.97 (m, 1H), 7.93-7.87 (m, 1H), 7.85-7.79 (m, 1H), 7.65-7.64 (m, 1H), 7.64-7.61 (m, 1H), 7.60-7.59 (m, 1H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 170.3 (C), 155.9 (C), 152.0 (C), 148.1 (C), 136.7 (CH), 134.9 (CH), 132.3 (CH), 132.2 (CH), 130.7 (C), 129.9 (CH), 128.0 (CH), 126.8 (CH), 125.7 (CH), 122.2 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 286, 288 [M+H]⁺.

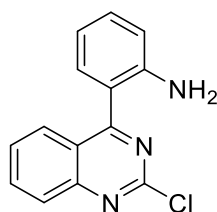
Molecular formula: C₁₄H₈ClN₃O₂

Molecular weight: 285.69 g/mol

Melting point: 154 °C

Aspect: Yellow solid

2-Chloro-4-(2-nitrophenyl)quinazoline (43)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 1.0 g, 5.02 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 1.4 g, 10.05 mmol), 2-aminophenylboronic acid (1.00 eq., 0.69 g, 5.02 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.20 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 22.6 mg, 0.10 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **43** (848 mg, 66%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.31-8.28 (m, 1H), 8.12-8.06 (m, 1H), 8.04-7.99 (m, 1H), 7.92-7.86 (m, 1H), 7.85-7.79 (m, 1H), 7.63-7.67 (m, 1H), 7.64-7.59 (m, 2H), 5.82 (br s, 2H).

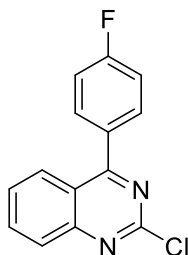
LC-MS (ESI) m/z found: 256, 258 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₄H₁₀ClN₃

Molecular weight: 255.71 g/mol

Melting point: 173 °C

Aspect: Yellow solid

2-Chloro-4-(4-fluorophenyl)quinazoline (44)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 4-fluorophenylboronic acid (1.00 eq., 352 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **44** (490 mg, 75%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.14-8.04 (m, 3H), 7.92-7.86 (m, 2H), 7.82 (ddd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 6.6$ Hz and $J = 8.5$ Hz), 7.53-7.46 (m, 2H).

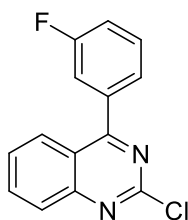
LC-MS (ESI) m/z found: 259, 261 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{14}H_8ClFN_2$

Molecular weight: 258.68 g/mol

Melting point: 143 °C

Aspect: Pale pink solid

2-Chloro-4-(3-fluorophenyl)quinazoline (45)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 3-fluorophenylboronic acid (1.00 eq., 352 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **45** (455 mg, 70%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.15-8.04 (m, 3H), 7.80 (ddd, 1H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 6.7 Hz and *J* = 8.2 Hz), 7.73-7.62 (m, 3H), 7.56-7.49 (m, 1H).

LC-MS (ESI) m/z found: 259, 261 [M+H]⁺.

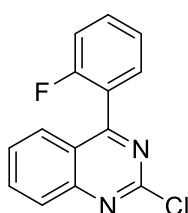
Molecular formula: C₁₄H₈ClFN₂

Molecular weight: 258.68 g/mol

Melting point: 158 °C

Aspect: White solid

2-Chloro-4-(2-fluorophenyl)quinazoline (46)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 1.0 g, 5.02 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 1.4 g, 10.04 mmol), 2-fluorophenylboronic acid (1.00 eq., 703 mg, 5.02 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 52.7 mg, 0.20 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 22.6 mg, 0.10 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **46** (680 mg, 52%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 8.08-8.06 (m, 1H), 7.96 (ddd, 1H, *J* = 1.3 Hz, *J* = 6.7 Hz and *J* = 8.3 Hz), 7.87-7.83 (m, 1H), 7.66-7.56 (m, 3H), 7.38 (dd, 1H, *J* = 1.0 Hz and *J* = 7.5 Hz), 7.32-7.25 (m, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 167.7 (C), 161.4 (C), 158.0 (C), 156.9 (C), 152.4 (C), 135.2 (CH), 132.4 (CH), 131.7 (CH), 128.2 (CH), 127.3 (CH), 124.8 (CH), 124.0 (CH), 122.4 (C), 116.4 (CH).

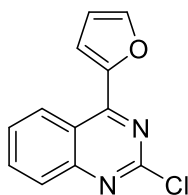
LC-MS (ESI) m/z found: 259, 261 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₄H₈ClFN₂

Molecular weight: 258.68 g/mol

Melting point: 146 °C

Aspect: Pale yellow solid

2-Chloro-4-(furan-2-yl)quinazoline (47)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 2-furanboronic acid (1.00 eq., 281 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **47** (365 mg, 63%).

1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.90 (ddd, 1H, $J = 8.6$ Hz, $J = 1.2$ Hz and $J = 0.6$ Hz), 8.25 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz and $J = 1.7$ Hz), 8.08 (ddd, 1H, $J = 1.3$ Hz, $J = 6.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz), 7.97 (ddd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.2$ Hz and $J = 0.6$ Hz), 7.84 (ddd, 1H, $J = 1.4$ Hz, $J = 6.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz), 7.75 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz and $J = 3.6$ Hz), 6.90 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 3.7$ Hz).

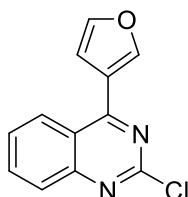
LC-MS (ESI) m/z found: 231, 233 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{12}H_7ClN_2O$

Molecular weight: 230.65 g/mol

Melting point: 134 °C

Aspect: Beige solid

2-Chloro-4-(furan-3-yl)quinazoline (48)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 400 mg, 2.01 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 556 mg, 4.02 mmol), 3-furanboronic acid (1.00 eq., 225 mg, 2.01 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 21 mg, 0.08 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 7 mg, 0.04 mmol) in dioxane (8 mL) and water (2 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **48** (300 mg, 65%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.72 (m, 1H), 8.48 (m, 1H), 8.09 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.0 Hz and *J* = 8.4 Hz), 8.00-7.97 (m, 2H), 7.80 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.0 Hz, *J* = 8.3 Hz), 7.17 (m, 1H).

LC-MS (ESI) m/z found: 231, 233 [M+H]⁺.

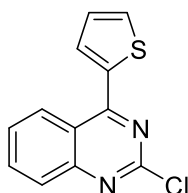
Molecular formula: C₁₂H₇ClN₂O

Molecular weight: 230.65 g/mol

Melting point: 115 °C

Aspect: Brown solid

2-Chloro-4-(thiophen-2-yl)quinazoline (49)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **32** (1.00 eq., 500 mg, 2.51 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 694 mg, 5.02 mmol), 2-thiopheneboronic acid (1.00 eq., 321 mg, 2.51 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 26 mg, 0.10 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 11 mg, 0.05 mmol) in dioxane (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **49** (200 mg, 32%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.63 (m, 1H), 8.17 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz and *J* = 3.8 Hz), 8.13-8.08 (m, 2H), 8.00 (m, 1H), 7.84 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.9 Hz and *J* = 8.4 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J* = 3.8 Hz and *J* = 5.0 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 247, 249 [M+H]⁺.

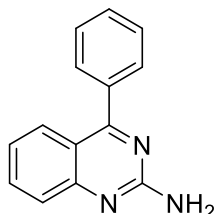
Molecular formula: C₁₂H₇ClN₂S

Molecular weight: 246.71 g/mol

Melting point: 109 °C

Aspect: Pale brown solid

4-Phenylquinazolin-2-amine (50)

**Procedure:**

To a mixture of **33** (1.0 eq., 1.00 g, 4.15 mmol) in EtOH (30 mL) and glacial acetic acid (9 mL) was added sodium azide (1.2 eq., 0.32 g, 5.00 mmol) and the reaction mixture was stirred and heated at reflux for 4 hours. After cooling to room temperature, 100 mg of palladium on activated carbon 5% was added followed by the addition of hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.19 mL, 6.23 mmol). Reaction mixture was stirred and heated at 70 °C overnight. Thereafter, reaction mixture was allowed to room temperature and catalyst was filtered off. Reaction mixture was concentrated *in vacuo* and suspended in water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to give an oil which was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **50** (690 mg, 75%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.87-7.79 (m, 1H), 7.76-7.61 (m, 4H), 7.58-7.48 (m, 3H), 7.29-7.15 (m, 1H), 5.59 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.7 (C), 159.7 (C), 153.2 (C), 137.2 (C), 134.0 (CH), 129.8 (CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.6 (CH), 125.8 (CH), 122.9 (CH), 118.6 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 222 [M+H]⁺.

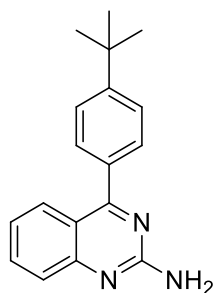
HPLC: C18 column: t_R = 20.9 min, purity > 99%

Molecular formula: C₁₄H₁₁N₃

Molecular weight: 221.26 g/mol

Melting point: 172 °C

Aspect: White solid

4-(4-(*Tert*-butyl)phenyl)quinazolin-2-amine (51)

Procedure:

Same procedure as described for compound **50** was used starting from **34** (1.0 eq., 400 mg, 1.35 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 105 mg, 1.62 mmol) in a 4:1 EtOH (10 mL) and glacial acetic acid (2.5 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (50 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.10 mL, 2.02 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **51** (240 mg, 64%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.95-7.86 (m, 1H), 7.74-7.61 (m, 4H), 7.60-7.54 (m, 2H), 7.22 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.6 Hz and *J* = 8.3 Hz), 5.55 (br s, 2H), 1.41 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.8 (C), 159.6 (C), 153.2 (C), 153.1 (C), 134.4 (C), 133.9 (CH), 129.3 (2 CH), 127.7 (CH), 125.8 (CH), 125.5 (2 CH), 122.9 (CH), 118.7 (C), 34.9 (C), 31.3 (3 CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 278 [M+H]⁺.

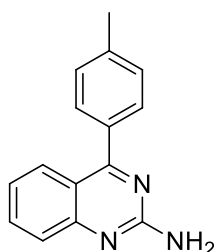
HPLC: C18 column: *t_R* = 29.1 min, purity > 99%

Molecular formula: C₁₈H₁₉N₃

Molecular weight: 277.36 g/mol

Melting point: 198 °C

Aspect: Pale yellow solid

4-(*p*-Tolyl)quinazolin-2-amine (52)**Procedure:**

A suspension of **35** (1 eq., 200 mg, 0.79 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL) was heated at 110 °C in a sealed tube overnight. After cooling to room temperature, water was added. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **52** (140 mg, 76%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 7.74-7.69 (m, 1H), 7.68-7.64 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.51-7.46 (m, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.17 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 6.9 Hz and *J* = 8.2 Hz), 6.84 (br s, 2H), 2.43 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 169.8 (C), 160.7 (C), 153.7 (C), 139.7 (C), 134.6 (C), 134.1 (CH), 129.9 (2 CH), 129.4 (2 CH), 127.4 (CH), 125.8 (CH), 122.4 (CH), 117.8 (C), 21.4 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 236 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t_R* = 21.4 min, purity > 97%

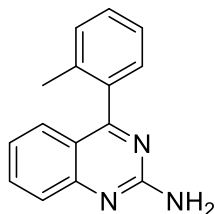
Molecular formula: C₁₅H₁₃N₃

Molecular weight: 235.28 g/mol

Melting point: 164 °C

Aspect: Pale brown solid

4-(*o*-Tolyl)quinazolin-2-amine (53)



Procedure:

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **36** (1 eq., 400 mg, 1.57 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **53** (229 mg, 62%).

¹H NMR (acetone-*d*₆, δ ppm, J Hz): 7.71-7.64 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.45-7.30 (m, 5H), 7.15-7.12 (m, 1H), 6.35 (br s, 2H), 2.10 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 171.3 (C), 162.2 (C), 153.5 (C), 137.2 (C), 135.6 (C), 134.2 (CH), 131.1 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 127.0 (CH), 124.4 (CH), 124.2 (CH), 122.2 (CH), 119.0 (C), 19.3 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 236 [M+H]⁺.

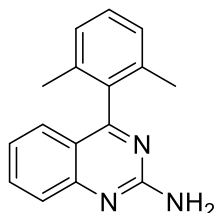
HPLC: C18 column: t_R = 22.1 min, purity > 99%

Molecular formula: C₁₅H₁₃N₃

Molecular weight: 235.28 g/mol

Melting point: 130 °C

Aspect: Beige solid

4-(2,6-Dimethylphenyl)quinazolin-2-amine (54)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **37** (1 eq., 120 mg, 0.45 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **54** (68 mg, 61%).

¹H NMR (acetone-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 7.69-7.64 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.35-7.29 (m, 1H), 7.18 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.14-7.06 (m, 2H), 6.90 (br s, 2H), 1.90 (s, 6H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 171.2 (C), 162.2 (C), 153.4 (C), 137.4 (C), 135.2 (CH), 134.3 (2 C), 128.6 (CH), 127.6 (2 CH), 126.2 (CH), 125.6 (CH), 122.7 (CH), 118.4 (C), 19.8 (2 CH₃).

LC-MS (ESI) *m/z* found: 250 [M+H]⁺.

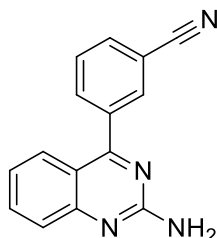
HPLC: C18 column: *t*_R = 23.1 min, purity > 99%

Molecular formula: C₁₆H₁₅N₃

Molecular weight: 249.31g/mol

Melting point: 154 °C

Aspect: Beige solid

3-(2-Aminoquinazolin-4-yl)benzonitrile (55)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **38** (1.0 eq., 120 mg, 0.45 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 35 mg, 0.54 mmol) in a 4:1 EtOH (4 mL) and glacial acetic acid (1 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (40 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.03 mL, 0.68 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **55** (71 mg, 64%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.06-8.03 (m, 1H), 8.0-7.95 (m, 1H), 7.88-7.83 (m, 1H), 7.79-7.75 (m, 1H), 7.74-7.66 (m, 3H), 7.32-7.28 (m, 1H), 5.30 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 168.1 (C), 159.3 (C), 153.4 (C), 138.5 (C), 134.5 (CH), 133.8 (CH), 133.2 (CH), 133.1 (CH), 129.5 (CH), 126.5 (CH), 126.3 (CH), 123.7 (CH), 118.2 (C), 118.1 (C), 113.0 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 247 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: t_R = 20.3 min, purity > 99%

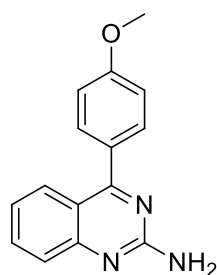
Molecular formula: C₁₅H₁₀N₄

Molecular weight: 246.27 g/mol

Melting point: 255 °C

Aspect: Yellow solid

4-(4-Methoxyphenyl)quinazolin-2-amine (56)



Procedure:

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **39** (1 eq., 200 mg, 0.74 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **56** (139 mg, 75%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.95-7.91 (m, 1H), 7.75-7.70 (m, 2H), 7.70-7.63 (m, 2H), 7.28-7.22 (m, 1H), 7.11-7.06 (m, 2H), 5.34 (br s, 2H), 3.93 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.2 (C), 161.1 (C), 159.5 (C), 153.2 (C), 133.8 (CH), 131.2 (2 CH), 129.7 (C), 127.6 (CH), 125.9 (CH), 122.9 (CH), 118.7 (C), 113.9 (2 CH), 55.5 (OCH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 252 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: t_R = 20.9 min, purity > 99%

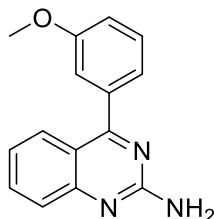
Molecular formula: C₁₅H₁₃N₃O

Molecular weight: 251.28 g/mol

Melting point: 164 °C

Aspect: Pale yellow solid

4-(3-Methoxyphenyl)quinazolin-2-amine (57)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **40** (1 eq., 200 mg, 0.74 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **57** (139 mg, 75%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.90-7.83 (m, 1H), 7.75-7.62 (m, 2H), 7.50-7.42 (m, 1H), 7.30-7.22 (m, 3H), 7.09 (ddd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 3.6 Hz and *J* = 0.9 Hz), 5.40 (br s, 2H), 3.89 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.6 (C), 159.7 (C), 159.5 (C), 153.2 (C), 138.5 (C), 134.0 (CH), 129.6 (CH), 127.5 (CH), 125.8 (CH), 123.0 (CH), 121.9 (CH), 118.6 (C), 115.7 (CH), 114.7 (CH), 55.4 (OCH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 252 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t_R* = 13.7 min, purity > 99%

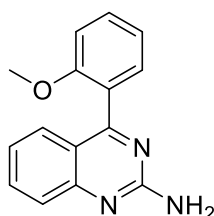
Molecular formula: C₁₅H₁₃N₃O

Molecular weight: 251.28 g/mol

Melting point: 170 °C

Aspect: White solid

4-(2-Methoxyphenyl)quinazolin-2-amine (58)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **41** (1 eq., 200 mg, 0.74 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **58** (103 mg, 56%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 7.63 (ddd, 1H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 6.8 Hz and *J* = 8.4 Hz), 7.56-7.48 (m, 1H), 7.47-7.42 (m, 1H), 7.33-7.18 (m, 3H), 7.14-7.06 (m, 2H), 6.84 (br s, 2H), 3.68 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 169.3 (C), 160.9 (C), 157.0 (C), 152.7 (C), 134.1 (CH), 131.2 (CH), 130.5 (CH), 127.7 (CH), 126.6 (C), 125.5 (CH), 122.2 (CH), 120.9 (CH), 119.1 (C), 112.3 (CH), 55.8 (OCH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 252 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t*_R = 12.6 min, purity > 99%

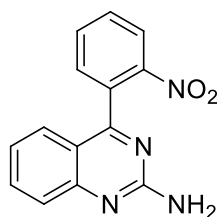
Molecular formula: C₁₅H₁₃N₃O

Molecular weight: 251.28 g/mol

Melting point: 168 °C

Aspect: White solid

4-(2-Nitrophenyl)quinazolin-2-amine (59)



Procedure:

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **42** (1 eq., 200 mg, 0.70 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **59** (108 mg, 58%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 7.82-7.77 (m, 1H), 7.74-7.67 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.33-7.26 (m, 2H), 7.21 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 6.7 Hz and *J* = 8.2 Hz), 6.91-6.83 (m, 2H), 5.45 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.3 (C), 159.3 (C), 153.6 (C), 145.2 (C), 134.3 (CH), 131.4 (CH), 130.8 (CH), 127.9 (CH), 125.8 (CH), 123.1 (CH), 120.9 (C), 119.0 (C), 117.8 (CH), 116.9 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 267 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t*_R = 29.3 min, purity > 98%

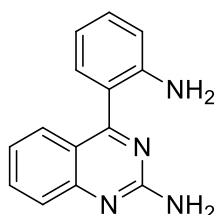
Molecular formula: C₁₄H₁₀N₄O₂

Molecular weight: 266.25 g/mol

Melting point: 228 °C

Aspect: Yellow solid

4-(2-Aminophenyl)quinazolin-2-amine (60)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **50** was used starting from **43** (1.0 eq., 400 mg, 1.40 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 109 mg, 1.68 mmol) in a 4:1 EtOH (10 mL) and glacial acetic acid (3 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (50 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.10 mL, 2.10 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **60** (179 mg, 54%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.80 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz and *J* = 8.3 Hz), 7.74-7.67 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.33-7.26 (m, 2H), 7.25-7.18 (m, 1H), 6.91-6.83 (m, 2H), 5.44 (br s, 2H), 4.26 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.3 (C), 159.3 (C), 153.6 (C), 145.2 (C), 134.3 (CH), 131.4 (CH), 130.8 (CH), 127.9 (CH), 125.8 (CH), 123.1 (CH), 120.9 (C), 119.0 (C), 117.8 (CH), 116.9 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 237 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t_R* = 20.3 min, purity > 96%

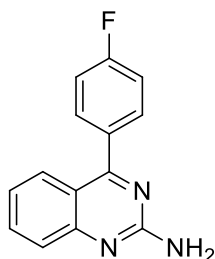
Molecular formula: C₁₄H₁₂N₄

Molecular weight: 236.27 g/mol

Melting point: 194 °C

Aspect: Yellow solid

4-(4-Fluorophenyl)quinazolin-2-amine (61)



Procedure:

Same procedure as described for compound **50** was used starting from **44** (1.0 eq., 400 mg, 1.55 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 121 mg, 1.86 mmol) in a 4:1 EtOH (11 mL) and glacial acetic acid (3 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (50 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.10 mL, 2.02 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **61** (160 mg, 43%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 7.79-7.72 (m, 2H), 7.71-7.66 (m, 2H), 7.53-7.48 (m, 1H), 7.45-7.37 (m, 2H), 7.19 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 6.8 Hz and *J* = 8.3 Hz), 6.89 (br s, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 168.8 (C), 164.9 (C), 161.7 (C), 160.6 (C), 153.7 (C), 134.2 (CH), 132.1 (2 CH), 127.3 (CH), 125.8 (CH), 122.6 (CH), 117.7 (C), 115.7 (2 CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 240 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t*_R = 4.8 min, purity > 97%

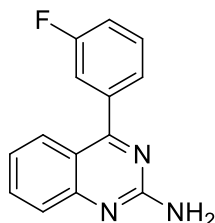
Molecular formula: C₁₄H₁₀FN₃

Molecular weight: 239.25 g/mol

Melting point: 155 °C

Aspect: Pale pink solid

4-(3-Fluorophenyl)quinazolin-2-amine (**62**)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **50** was used starting from **45** (1.0 eq., 400 mg, 1.55 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 121 mg, 1.86 mmol) in a 4:1 EtOH (11 mL) and glacial acetic acid (3 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (70 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.10 mL, 2.02 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **62** (222 mg, 60%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 7.73-7.65 (m, 2H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.53-7.48 (m, 3H), 7.46-7.38 (m, 1H), 7.19 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 6.8 Hz and *J* = 8.1 Hz), 6.93 (br s, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 168.5 (C), 164.0 (C), 160.9 (C), 160.6 (C), 153.8 (C), 139.8 (CH), 134.4 (CH), 131.0 (CH), 127.2 (CH), 126.1 (CH), 125.8 (CH), 122.7 (CH), 117.7 (C), 116.8 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 240 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t*_R = 21.2 min, purity > 98%

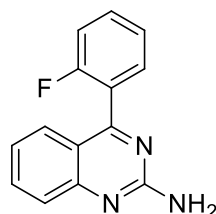
Molecular formula: C₁₄H₁₀FN₃

Molecular weight: 239.25 g/mol

Melting point: 147 °C

Aspect: White solid

4-(2-Fluorophenyl)quinazolin-2-amine (63)



Procedure:

Same procedure as described for compound **50** was used starting from **46** (1.0 eq., 400 mg, 1.55 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 121 mg, 1.86 mmol) in a 4:1 EtOH (11 mL) and glacial acetic acid (3 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (80 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.10 mL, 2.02 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **63** (240 mg, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.77-7.62 (m, 2H), 7.61-7.45 (m, 3H), 7.40-7.13 (m, 3H), 5.53 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 166.7 (C), 161.3 (C), 159.6 (C), 158.0 (C), 152.6 (C), 134.4 (CH), 131.6 (CH), 131.1 (CH), 127.2 (CH), 125.7 (CH), 124.5 (CH), 123.2 (CH), 119.2 (C), 116.0 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 240 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: t_R = 19.4 min, purity > 98%

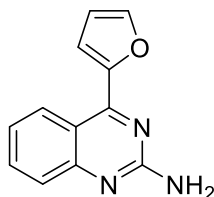
Molecular formula: C₁₄H₁₀FN₃

Molecular weight: 239.25 g/mol

Melting point: 180 °C

Aspect: Pale yellow solid

4-(Furan-2-yl)quinazolin-2-amine (64)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **47** (1 eq., 500 mg, 2.17 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **64** (327 mg, 71%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.66 (m, 1H), 7.79-7.76 (m, 1H), 7.75-7.78 (m, 1H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.43 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 7.33 (ddd, 1H, *J* = 1.3 Hz, *J* = 6.8 Hz and *J* = 8.5 Hz), 5.29 (br s, 2H), 6.67 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.6 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 157.6 (C), 152.2 (C), 146.7 (CH), 134.9 (CH), 132.2 (C), 128.7 (C), 127.3 (CH), 124.3 (CH), 124.0 (CH), 117.7 (CH), 116.6 (C), 112.6 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 222 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t_R* = 28.9 min, purity > 98%

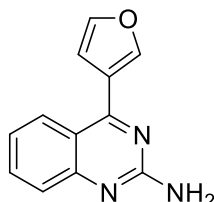
Molecular formula: C₁₂H₉N₃O

Molecular weight: 211.22 g/mol

Melting point: 154 °C

Aspect: Yellow solid

4-(Furan-3-yl)quinazolin-2-amine (65)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **48** (1 eq., 600 mg, 2.60 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (10 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **65** (436 mg, 79%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.12-8.06 (m, 2H), 7.75-7.69 (m, 1H), 7.66-7.61 (m, 2H), 7.32-7.26 (m, 1H), 6.98 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz and *J* = 2.1 Hz), 5.42 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 162.9 (C), 159.6 (C), 153.0 (C), 144.1 (CH), 143.6 (CH), 134.9 (C), 134.0 (CH), 126.3 (CH), 126.1 (CH), 123.2 (CH), 118.6 (C), 111.2 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 222 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: *t_R* = 26.3 min, purity > 97%

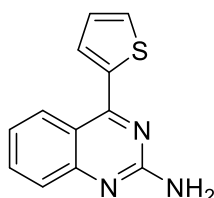
Molecular formula: C₁₂H₉N₃O

Molecular weight: 211.22 g/mol

Melting point: 175 °C

Aspect: Yellow solid

4-(Thiophen-2-yl)quinazolin-2-amine (66)



Procedure:

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **49** (1 eq., 140 mg, 0.57 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **66** (67 mg, 52%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.30-8.25 (m, 1H), 7.78 (dd, 1H, *J* = 1.0 Hz and *J* = 3.7 Hz), 7.72 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.8 Hz and *J* = 8.4 Hz), 7.66-7.59 (m, 2H), 7.30 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.7 Hz and *J* = 8.3 Hz), 7.26-7.22 (m, 1H), 5.36 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 162.7 (C), 159.4 (C), 153.7 (C), 140.6 (C), 134.0 (CH), 131.0 (CH), 129.9 (CH), 127.9 (CH), 126.6 (CH), 126.1 (CH), 123.4 (CH), 117.8 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 228 [M+H]⁺.

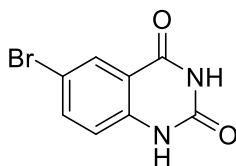
HPLC: C18 column: *t_R* = 25.3 min, purity > 98%

Molecular formula: C₁₂H₉N₃S

Molecular weight: 227.29 g/mol

Melting point: 186 °C

Aspect: Yellow solid

6-Bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione (70)**Procedure:**

A mixture of 2-amino-5-bromobenzoic acid (1 eq., 5 g, 23.1 mmol) and urea (10 eq., 14 g, 231.5 mmol) was heated at 160 °C overnight. Solid formed was allowed to room temperature and water was added. Solid was crushed using a sonic bath and filtered. Solid was solubilized in a 2 M NaOH solution and the solution was filtered. Filtrate was acidified with a 3 M HCl solution up to acid pH and filtered again. Solid was dried in the oven to afford **70** (4.7 g, 84%).

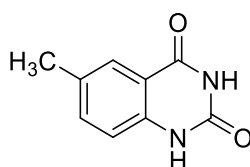
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.44 (s, 1H), 11.27 (s, 1H), 7.95 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.80 (dd, 1H, *J* = 2.4 and *J* = 8.7 Hz), 7.13 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz).

Molecular formula: C₈H₅BrN₂O₂

Molecular weight: 241.04 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

6-Methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione (71)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **70** was used starting from 2-amino-5-methylbenzoic acid (1 eq., 5 g, 33.1 mmol) and urea (10 eq., 20 g, 330.8 mmol) to afford **71** (5.1 g, 88%).

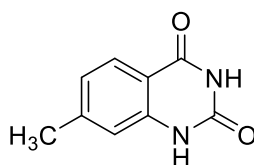
¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 11.19 (m, 2H), 7.71-7.67 (m, 1H), 7.48-7.43 (m, 1H), 7.10 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 2.33 (s, 3H).

Molecular formula: C₉H₈N₂O₂

Molecular weight: 176.18 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

Methylquinazoline-2,4(1H,3H)-dione (72)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **70** was used starting from 2-amino-4-methylbenzoic acid (1 eq., 5 g, 33.1 mmol) and urea (10 eq., 20 g, 330.8 mmol) to afford **72** (5.0 g, 86%).

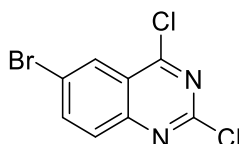
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.32 (m, 2H), 7.80-7.72 (m, 1H), 7.03-6.96 (m, 2H), 2.36 (s, 3H).

Molecular formula: $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 176.18 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

6-Bromo-2,4-dichloroquinazoline (73)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **32** was used starting from **70** (1 eq., 2.0 g, 8.3 mmol) and POCl_3 (7 eq., 5.4 mL, 58.1 mmol) to afford **73** (1.6 g, 67%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.48-8.46 (m, 1H), 8.31 (dd, 1H, $J = 2.2$ and $J = 8.9$ Hz), 8.02-7.98 (m, 1H).

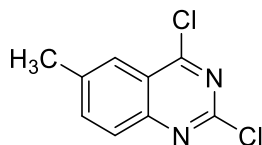
LC-MS (ESI) m/z found: 277, 279, 281 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: $\text{C}_8\text{H}_3\text{BrCl}_2\text{N}_2$

Molecular weight: 277.93 g/mol

Melting point: 153 °C

Aspect: White solid

2,4-Dichloro-6-methylquinazoline (74)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **32** was used starting from **71** (1 eq., 3 g, 17.0 mmol) and POCl₃ (7 eq., 11 mL, 119.2 mmol) to afford **74** (2.4 g, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.06-8.03 (m, 1H), 7.95-7.91 (m, 1H), 7.84 (dd, 1H, J = 1.8 and J = 8.7 Hz), 2.63 (s, 3H).

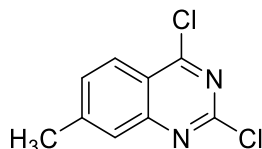
LC-MS (ESI) m/z found: 213, 215 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₉H₆Cl₂N₂

Molecular weight: 213.06 g/mol

Melting point: 137 °C

Aspect: White solid

2,4-Dichloro-7-methylquinazoline (75)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **32** was used starting from **72** (1 eq., 3 g, 17.0 mmol) and POCl₃ (7 eq., 11 mL, 119.2 mmol) to afford **75** (2.0 g, 54%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.15 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.80-7.77 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 1H), 2.64 (s, 3H).

LC-MS (ESI) m/z found: 213, 215 [M+H]⁺.

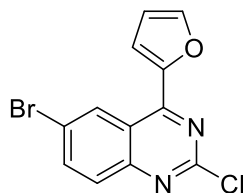
Molecular formula: C₉H₆Cl₂N₂

Molecular weight: 213.06 g/mol

Melting point: 142 °C

Aspect: White solid

6-Bromo-2-chloro-4-(furan-2-yl)quinazoline (76)

**Procedure:**

A mixture of **73** (1.00 eq., 250 mg, 0.90 mmol), K_2CO_3 (2.00 eq., 249 mg, 1.80 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 9 mg, 0.04 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq, 4 mg, 0.02 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL) was degassed for 5 min with nitrogen. Reaction mixture was stirred and heated at 40 °C. At the same time, a solution of 2-furanboronic acid (1.10 eq., 111 mg, 0.99 mmol) in dioxane (5 mL) was added dropwise. After completion by TLC, the reaction mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to give an oil which was purified by flash chromatography using (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 7/3) to afford **76** (140 mg, 50%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 9.16-9.14 (m, 1H), 8.00 (dd, 1H, $J = 2.09$ Hz and $J = 8.9$ Hz), 7.89 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz and $J = 1.7$ Hz), 7.86 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.43 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz and $J = 3.6$ Hz), 6.75 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz and $J = 3.7$ Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 309, 311 $[M+H]^+$.

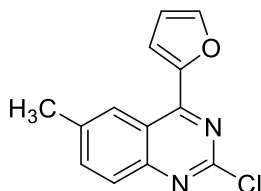
Molecular formula: $C_{12}H_6BrClN_2O$

Molecular weight: 309.55 g/mol

Melting point: 112 °C

Aspect: Yellow solid

2-Chloro-4-(furan-2-yl)-6-methylquinazoline (77)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **76** was used starting from **74** (1.00 eq., 250 mg, 1.17 mmol), K_2CO_3 (2.00 eq., 324 mg, 2.35 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 12 mg, 0.05 mmol), palladium diacetate (0.02 eq, 5 mg, 0.02 mmol) and 2-furanboronic acid (1.10 eq., 144

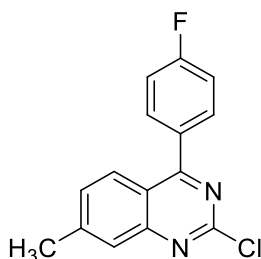
mg, 1.29 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **77** (200 mg, 70%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.70-8.67 (m, 1H), 7.91-7.86 (m, 1H), 7.85 (dd, 1H, *J* = 0.8 and *J* = 1.8 Hz), 7.76 (dd, 1H, *J* = 1.9 Hz and *J* = 8.7 Hz), 7.67 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz and *J* = 3.6 Hz), 6.72 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.6 Hz), 2.62 (s, 3H).

LC-MS (ESI) m/z found: 245, 247 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₃H₉ClN₂O
Molecular weight: 244.68 g/mol
Melting point: 124 °C
Aspect: White solid

2-Chloro-4-(4-fluorophenyl)-7-methylquinazoline (**78**)



Procedure:

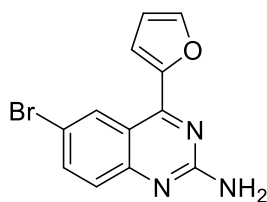
Same procedure as described for compound **76** was used starting from **75** (1.00 eq., 300 mg, 1.41 mmol), K₂CO₃ (2.00 eq., 389 mg, 2.82 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 15 mg, 0.06 mmol), palladium diacetate (0.02 eq, 6 mg, 0.03 mmol) and 4-fluorobenzeneboronic acid (1.10 eq., 217 mg, 1.55 mmol) in dioxane (12 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **78** (300 mg, 78%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.00 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.86-7.79 (m, 3H), 7.50-7.45 (m, 1H), 7.34-7.25 (m, 2H), 2.64 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 169.8 (C), 165.9 (C), 162.6 (C), 157.0 (C), 153.4 (C), 146.5 (C), 132.3 (CH), 132.2 (CH), 130.4 (CH), 127.2 (CH), 126.8 (CH), 119.7 (C), 116.0 (CH), 115.8 (CH), 22.2 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 273, 275 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₅H₁₀ClFN₂
Molecular weight: 272.71 g/mol
Melting point: 141 °C
Aspect: White solid

6-Bromo-4-(furan-2-yl)quinazolin-2-amine (79)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **76** (1 eq., 200 mg, 0.65 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **79** (111 mg, 59%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.85-8.81 (m, 1H), 7.81 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 1.5 Hz), 7.77 (dd, 1H, *J* = 2.2 Hz and *J* = 8.9 Hz), 7.53-7.44 (m, 2H), 6.69 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz), 5.22 (br s, 2H).

HPLC: C18 column: *t_R* = 20.5 min, purity > 98%

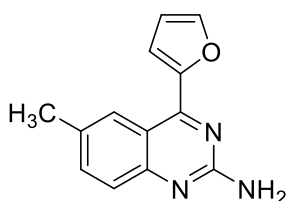
LC-MS (ESI) *m/z* found: 290, 292 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₂H₈BrN₃O

Molecular weight: 290.12 g/mol

Melting point: 153 °C

Aspect: Yellow solid

4-(Furan-2-yl)-6-methylquinazolin-2-amine (80)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **77** (1 eq., 250 mg, 1.02 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **80** (143 mg, 62%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.40-8.36 (m, 1H), 7.79 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz and *J* = 1.8 Hz), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.41 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 5.12 (br s, 2H), 2.52 (s, 3H).

HPLC: C18 column: $t_R = 13.7$ min, purity > 98%

LC-MS (ESI) m/z found: 226 $[M+H]^+$.

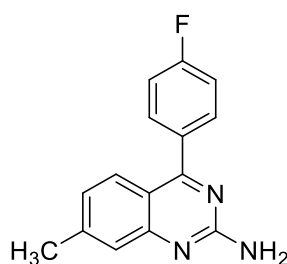
Molecular formula: $C_{13}H_{11}N_3O$

Molecular weight: 225.25 g/mol

Melting point: 146 °C

Aspect: White solid

4-(4-Fluorophenyl)-7-methylquinazolin-2-amine (81)



Procedure:

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **78** (1 eq., 200 mg, 0.73 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **81** (121 mg, 65%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.76-7.69 (m, 3H), 7.47-7.44 (m, 1H), 7.27-7.22 (m, 2H), 7.09 (dd, 1H, $J = 1.4$ Hz and $J = 8.5$ Hz), 5.22 (br s, 2H), 2.53 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 168.9 (C), 165.4 (C), 162.1 (C), 159.6 (C), 153.5 (C), 145.1 (C), 131.6 (CH), 131.5 (CH), 126.9 (CH), 125.5 (CH), 125.1 (CH), 116.7 (C), 115.8 (CH), 115.5 (CH), 22.2 (CH₃).

HPLC: C18 column: $t_R = 27.3$ min, purity > 98%

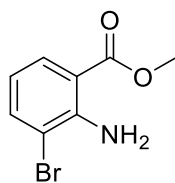
LC-MS (ESI) m/z found: 254 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{15}H_{12}FN_3$

Molecular weight: 253.28 g/mol

Melting point: 161 °C

Aspect: White solid

Methyl 2-amino-3-bromobenzoate (83)**Procedure:**

A mixture of 2-amino-3-bromobenzoic acid (1.0 eq., 500 mg, 2.31 mmol) in SOCl_2 (15.0 eq., 3 mL, 34.72 mmol) was stirred at room temperature until complete dissolution of the starting material. Thereafter, reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Methanol was added and the solution was stirred at room temperature few minutes. Then, water was added and aqueous layer was extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was suspended in PE and solid was filtered and dried to afford **83** (430 mg, 81%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 7.86 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz and $J = 8.0$ Hz), 7.58 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz and $J = 7.8$ Hz), 6.53 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.35 (br s, 2H), 3.90 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 168.0 (C), 147.5 (C), 137.2 (CH), 130.7 (CH), 116.3 (CH), 111.8 (C), 110.7 (C), 51.9 (CH_3).

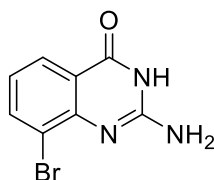
LC-MS (ESI) m/z found: 230, 232 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: $\text{C}_8\text{H}_8\text{BrNO}_2$

Molecular weight: 230.06 g/mol

Melting point: 183 °C

Aspect: Yellow solid

2-Amino-8-bromoquinazolin-4(3H)-one (84)**Procedure:**

To a solution of **83** (1 eq., 300 mg, 1.30 mmol) in dioxane (11 mL) was added cyanamide (3 eq., 165 mg, 3.91 mmol) and few drops of a 12 M HCl solution. Solution was stirred and heated at 90 °C overnight. After cooling to room temperature, basic water was added. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO_4 ,

filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using filtration through silica gel (DCM/MeOH: 10/0 to 8/2) to afford **84** (47 mg, 15%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.13 (br s, 1H), 7.88 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 6.99 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.68 (br s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 161.8 (C), 158.8 (C), 152.8 (C), 138.1 (CH), 126.3 (CH), 122.9 (CH), 119.0 (C), 117.6 (C).

LC-MS (ESI) m/z found: 240, 242 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

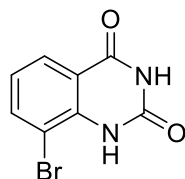
Molecular formula: $\text{C}_8\text{H}_6\text{BrN}_3\text{O}$

Molecular weight: 240.06 g/mol

Melting point: 241 °C

Aspect: Yellow solid

8-Bromoquinazoline-2,4(1H,3H)-dione (**86**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **70** was used starting from 2-amino-3-bromobenzoic acid (1 eq., 5 g, 23.1 mmol) and urea (10 eq., 14 g, 231.5 mmol) to afford **86** (4.8 g, 86%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.56 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.14 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz).

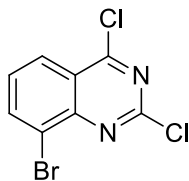
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 162.9 (C), 150.7 (C), 139.6 (C), 139.3 (CH), 127.7 (CH), 124.4 (CH), 117.4 (C), 109.0 (C).

Molecular formula: $\text{C}_8\text{H}_5\text{BrN}_2\text{O}_2$

Molecular weight: 241.04 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

8-Bromo-2,4-dichloroquinazoline (87)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **32** was used starting from **86** (1 eq., 4 g, 16.6 mmol) and POCl₃ (7 eq., 11 mL, 116.2 mmol) to afford **87** (4.0 g, 87%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.28 (ddd, 2H, J = 1.3 Hz, J = 7.5 Hz and J = 8.8 Hz), 7.61 (dd, 1H, J = 7.6 Hz and J = 8.3 Hz).

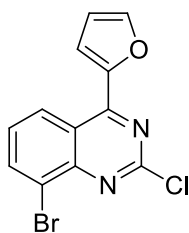
LC-MS (ESI) m/z found: 277, 279, 281 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₈H₃BrCl₂N₂

Molecular weight: 277.93 g/mol

Melting point: 148 °C

Aspect: Yellow solid

8-Bromo-2-chloro-4-(furan-2-yl)quinazoline (88)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **76** was used starting from **87** (1.00 eq., 2 g, 7.34 mmol), K₂CO₃ (2.00 eq., 2.14 g, 10.04 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 77 mg, 0.3 mmol), palladium diacetate (0.02 eq, 33 mg, 0.02 mmol) and 2-furanboronic acid (1.20 eq., 1 g, 8.81 mmol) in dioxane (70 mL) and water (16 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **88** (1.4 g, 62%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.95 (dd, 1H, J = 1.3 Hz and J = 8.6 Hz), 8.23 (dd, 1H, J = 1.3 Hz and J = 7.6 Hz), 7.84 (dd, 1H, J = 0.8 Hz and J = 1.7 Hz), 7.73 (dd, 1H, J = 0.8 Hz and J = 3.6 Hz), 7.53 (dd, 1H, J = 7.5 Hz and J = 8.6 Hz), 6.73 (dd, 1H, J = 1.8 Hz and J = 3.6 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 309, 311 [M+H]⁺.

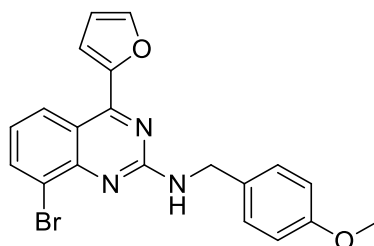
Molecular formula: C₁₂H₆BrClN₂O

Molecular weight: 309.55 g/mol

Melting point: 163 °C

Aspect: Yellow solid

8-Bromo-4-(furan-2-yl)-N-(4-methoxybenzyl)quinazolin-2-amine (89)



Procedure:

To a solution of **88** (1 eq., 2 g, 6.46 mmol) in dioxane (30 mL) in a sealed tube was added 4-methoxybenzylamine (2 eq., 1.69 mL, 12.92 mmol) and DIPEA (2.5 eq., 2.67 mL, 16.15 mmol). Solution was stirred and heated at 110°C overnight. Reaction mixture was cooled to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to afford a yellow oil. Crude product was suspended in PE and stirred. Solid was filtered to afford **89** (2.3 g, 86%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.55-8.48 (m, 1H), 8.26-8.18 (m, 1H), 8.13-8.11 (m, 1H), 8.08 (dd, 1H, *J* = 1.2 Hz and *J* = 7.5 Hz), 7.50-7.41 (m, 3H), 7.18 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 6.90-6.84 (m, 2H), 6.82 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 4.57 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.71 (s, 3H).

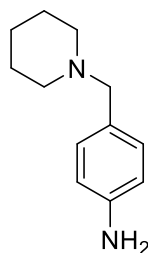
LC-MS (ESI) m/z found: 410, 412 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₀H₁₆BrN₃O₂

Molecular weight: 410.27 g/mol

Melting point: 129 °C

Aspect: Yellow solid

4-(Piperidin-1-ylmethyl)aniline (**92**)**Procedure:**

To a solution of **100** (1.0 eq., 1.00 g, 4.54 mmol) in EtOH (50 mL) under stirring was added Raney nickel (100 mg) and hydrazine monohydrate (1.5 eq., 0.33 mL, 6.81 mmol) dropwise. Reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, catalyst was filtered off and reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Residue was suspended in water and extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE and filtered to afford **92** (0.50 g, 58%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.11-7.08 (m, 2H), 6.66-6.63 (m, 2H), 3.61 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 2.36 (m, 4H), 1.61-1.53 (m, 4H), 1.46-1.38 (m, 2H).

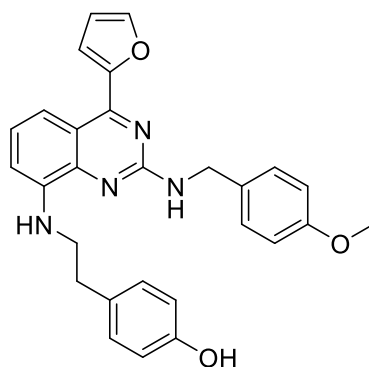
LC-MS (ESI) m/z found: 191 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₂H₁₈N₂

Molecular weight: 190.29 g/mol

Melting point: 188 °C

Aspect: Orange solid

4-(2-((4-(Furan-2-yl)-2-((4-methoxybenzyl)amino)quinazolin-8-yl)amino)ethyl)phenol (**93**)

Procedure:

To a solution of **89** (1.0 eq., 350 mg, 0.85 mmol) in dioxane (7 mL) in a sealed tube was added sodium *tert*-butoxide (3.0 eq., 246 mg, 2.56 mmol), BINAP (0.2 eq., 80 mg, 0.13 mmol), tyramine (1.2 eq., 140 mg, 1.02 mmol) and palladium diacetate (0.2 eq., 29 mg, 0.13 mmol). Reaction mixture was sealed, degassed with nitrogen, stirred and heated at 120 °C for 4 hours. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and filtered. Filtrat was hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **93** (300 mg, 75%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.78 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.31 (m, 4H), 7.15 (m, 3H), 6.86 (m, 2H), 6.74 (m, 3H), 6.62 (dd, 1H, J = 1.7 Hz and J = 3.5 Hz), 5.82 (m, 1H), 5.52 (m, 1H), 4.60 (d, 2H, J = 5.7 Hz), 3.81 (s, 3H), 3.49 (m, 2H), 2.98 (t, 2H, J = 6.9 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 171.3 (C), 158.7 (C), 157.3 (C), 156.7 (C), 154.3 (CH), 152.56 (C), 145.0 (CH), 143.8 (C), 142.4 (C), 131.6 (C), 131.3 (CH), 129.9 (2 CH), 128.9 (2 CH), 123.6 (CH), 116.3 (C), 115.5 (2 CH), 113.9 (2 CH), 112.7 (CH), 112.0 (CH), 108.1 (CH), 55.3 (CH₃), 45.3 (CH₂), 44.8 (CH₂), 34.5 (CH₂).

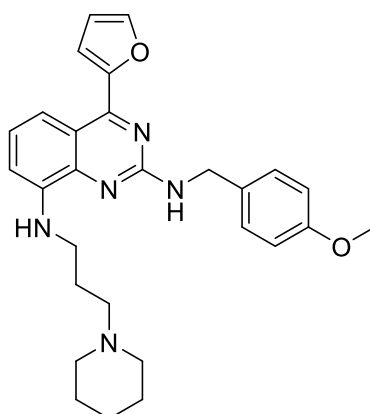
LC-MS (ESI) m/z found: 467 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₈H₂₆N₄O₃

Molecular weight: 466.54 g/mol

Aspect: Orange oil

**4-(Furan-2-yl)-N²-(4-methoxybenzyl)-N⁸-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinazoline-2,8-diamine
(94)**

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **93** was used starting from **89** (1.0 eq., 0.25 g, 0.61 mmol) and 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (1.2 eq., 0.12 mL 0.73 mmol). Reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Residue was suspended in water,

acidified with a 1 M HCl solution and extracted three times with diethyl ether. Aqueous layer was alkalized using a 1 M NaOH solution up to basic pH and then extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **94** (189 mg, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.79 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.37 (m, 3H), 7.15 (m, 1H), 6.89 (m, 2H), 6.71 (m, 1H), 6.63 (dd, 1H, J = 1.8 Hz and J = 3.5 Hz), 5.85-5.83 (m, 1H), 5.50 (m, 1H), 4.70 (d, 2H, J = 5.7 Hz, CH₂), 3.82 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 2.50-2.38 (m, 6H), 1.95 (q, 2H, J = 7.1 Hz), 1.66-1.59 (m, 4H), 1.46 (m, 2H).

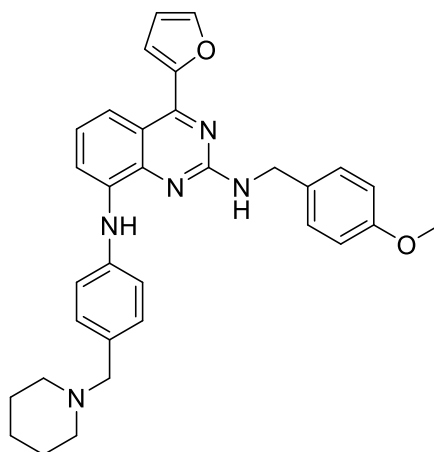
LC-MS (ESI) m/z found: 472 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₈H₃₃N₅O₂

Molecular weight: 471.61 g/mol

Aspect: Orange oil

4-(Furan-2-yl)-N²-(4-methoxybenzyl)-N⁸-(4-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl)quinazoline-2,8-diamine (95)



Procedure:

Same procedure as described for compound **93** was used starting from **89** (1.0 eq., 250 mg, 0.61 mmol) and **92** (1.2 eq., 139 mg, 0.73 mmol). Reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Residue was suspended in water, acidified with a 1 M HCl solution and extracted three times with diethyl ether. Aqueous layer was alkalized using a 1 M NaOH solution up to basic pH and then extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **95** (177 mg, 56%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.98-7.94 (m, 1H), 7.81-7.79 (m, 1H), 7.75 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz and *J* = 1.8 Hz), 7.52-7.46 (m, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 2H), 7.28-7.25 (m, 2H), 6.94-6.88 (m, 2H), 6.68-6.64 (m, 2H), 5.66-5.60 (m, 1H), 4.72 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.82 (s, 3H), 2.07 (s, 2H), 1.67-1.56 (m, 6H), 1.52-1.40 (m, 4H).

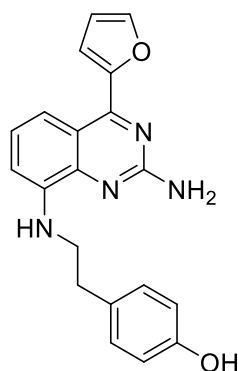
LC-MS (ESI) m/z found: 520 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₃₂H₃₃N₅O₂

Molecular weight: 519.65 g/mol

Aspect: Yellow oil

4-(2-((2-Amino-4-(furan-2-yl)quinazolin-8-yl)amino)ethyl)phenol (96)



Procedure:

A solution of **93** (1 eq., 300 mg, 0.64 mmol) in TFA (5 mL) was stirred at room temperature for 72 h. A saturated aqueous solution of sodium bicarbonate was added up to basic pH. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **96** (147 mg, 66%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 9.20 (m, 1H), 8.08 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.14-7.08 (m, 3H), 6.80 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 3.5 Hz), 6.76 (m, 1H), 6.74-6.69 (m, 3H), 5.92 (br s, 2H), 3.39 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 2.84 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz).

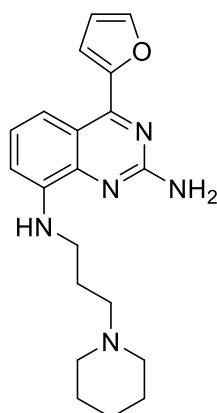
HPLC: C18 column: *t*_R = 26.4 min, purity > 97%

LC-MS (ESI) m/z found: 347 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₀H₁₈N₄O₂

Molecular weight: 346.39 g/mol

Aspect: Yellow oil

4-(Furan-2-yl)-N⁸-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinazoline-2,8-diamine (97)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **96** was used starting from **94** (1 eq., 120 mg, 0.25 mmol) in TFA (5 mL). Crude product was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **97** (54 mg, 60%). For biological evaluation, oil was suspended in diethyl ether with HCl gas and concentrated *in vacuo*. Residue was solubilized in water and dried in a freeze-dryer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.83 (dd, 1H, J = 0.9 Hz and J = 8.6 Hz), 7.75 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 1.8 Hz), 7.39 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 3.5 Hz), 7.17 (dd, 1H, J = 7.6 Hz and J = 8.5 Hz), 6.68 (dd, 1H, J = 0.7 Hz and J = 7.5 Hz), 6.65 (dd, 1H, J = 1.8 Hz and J = 3.5 Hz), 5.94 (m, 1H), 5.19 (br s, 2H), 3.39 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 3.08-2.81 (m, 6H), 2.22-2.12 (m, 2H), 1.91-1.85 (m, 4H), 1.61 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 158.2 (C), 157.0 (C), 152.5 (C), 145.2 (CH), 144.0 (C), 142.1 (C), 124.1 (CH), 116.5 (C), 115.7 (CH), 113.0 (CH), 112.1 (CH), 108.0 (CH), 56.0 (CH₂), 53.6 (CH₂), 41.1 (CH₂), 30.9 (2 CH₂), 24.2 (CH₂), 23.5 (CH₂), 22.7 (CH₂).

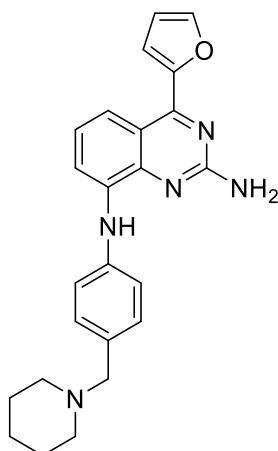
HPLC: C18 column: t_R = 21.7 min, purity > 98%

LC-MS (ESI) m/z found: 352 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₀H₂₅N₅O

Molecular weight: 351.45 g/mol

Aspect: Yellow oil

4-(Furan-2-yl)-N⁸-(4-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl)quinazoline-2,8-diamine (98)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **96** was used starting from **95** (1 eq., 170 mg, 0.33 mmol) in TFA (5 mL). Crude product was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **98** (59 mg, 45%). For biological evaluation, oil was suspended in diethyl ether with HCl gas and concentrated *in vacuo*. Residue was solubilized in water and dried in a freeze-dryer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.03 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz and *J* = 8.6 Hz), 7.90-7.87 (m, 1H), 7.78 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.55 (dd, 1H, *J* = 0.9 Hz and *J* = 7.7 Hz), 7.43 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz and *J* = 3.5 Hz), 7.38-7.29 (m, 4H), 7.25-7.18 (m, 1H), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.6 Hz), 5.17 (br s, 2H), 3.79 (s, 2H), 2.84-2.59 (m, 4H), 1.86-1.70 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 158.2 (C), 157.3 (C), 152.5 (C), 145.5 (CH), 144.5 (C), 142.1 (C), 137.2 (C), 136.2 (C), 131.3 (CH), 123.5 (CH), 119.1 (CH), 116.9 (C), 116.0 (2 CH), 115.9 (CH), 112.2 (2 CH), 112.0 (CH), 62.0 (CH₂), 53.4 (2 CH₂), 24.5 (2 CH₂), 23.4 (CH₂).

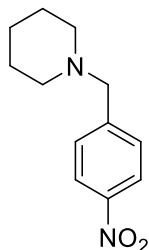
HPLC: C18 column: *t_R* = 21.8 min, purity > 97%

LC-MS (ESI) *m/z* found: 400 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₄H₂₅N₅O

Molecular weight: 399.50 g/mol

Aspect: Yellow oil

1-(4-Nitrobenzyl)piperidine (100)**Procedure:**

To a solution of 1-(chloromethyl)-4-nitrobenzene (1.0 eq., 1.00 g, 5.8 mmol) in acetone (50 mL) was added Et₃N (1.2 eq., 0.97 mL, 7.0 mmol) and piperidine (1.2 eq., 0.69 mL, 7.0 mmol). Reaction mixture was stirred and heated at reflux overnight. Thereafter, reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. Residue was suspended in water, acidified with a 1 M HCl solution and extracted three times with diethyl ether. Aqueous layer was alkalinized using a 1 M NaOH solution up to basic pH and then extracted three times with diethyl ether. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to afford **100** (0.94 g, 73%). This material was sufficiently pure to be carried on the next step without any further purification.

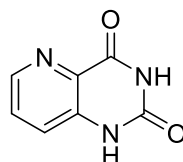
¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.18-8.15 (m, 2H), 7.52-7.49 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.40-2.36 (m, 4H), 1.59 (m, 4H), 1.49-1.45 (m, 2H).

LC-MS (ESI) m/z found: 221 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₂H₁₆N₂O₂

Molecular weight: 220.27 g/mol

Aspect: Brown oil

Pyrido[3,2-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (103)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **31** was used starting from 3-aminopicolinic acid (1 eq., 1 g, 7.24 mmol) and urea (10 eq., 4 g, 72.4 mmol) to afford **103** (886 mg, 75%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.47 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 8.60-8.33 (m, 1H), 7.74-7.42 (m, 2H).

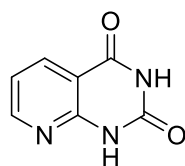
Molecular formula: $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$

Molecular weight: 163.14 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (104)



Procedure:

Same procedure as described for compound **31** was used starting from 2-aminonicotinic acid (1 eq., 1 g, 7.24 mmol) and urea (10 eq., 4 g, 72.4 mmol) to afford **104** (969 mg, 75%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 11.60 (br s, 2H), 8.58 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 4.8$ Hz), 8.24 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 7.6$ Hz), 7.26-7.20 (m, 1H).

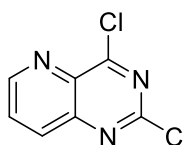
Molecular formula: $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$

Molecular weight: 163.14 g/mol

Melting point: > 300 °C

Aspect: White solid

2,4-Dichloropyrido[3,2-*d*]pyrimidine (105)



Procedure:

A mixture of **103** (1 eq., 0.30 g, 1.84 mmol) in POCl_3 (10 eq., 1.70 mL, 18.39 mmol) was stirred and PCl_5 (4 eq., 1.53 g, 7.36 mmol) was added portionwise. Reaction mixture was stirred and heated at reflux overnight. Thereafter, reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Residue was solubilized in chloroform. Crushed ice with water were added carefully and the mixture was stirred for 10 minutes below 5 °C. Thereafter, aqueous layer was extracted three times

with chloroform. Combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in PE and filtered to afford **105** (195 mg, 53%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 9.19-9.12 (m, 1H), 8.37-8.29 (m, 1H), 7.97-7.88 (m, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 166.0 (C), 155.7 (C), 153.1 (CH), 148.9 (C), 137.0 (C), 136.2 (CH), 130.1 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 200, 202 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

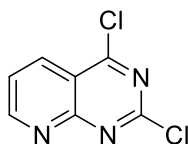
Molecular formula: $\text{C}_7\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}_3$

Molecular weight: 200.02 g/mol

Melting point: 133 °C

Aspect: Yellow solid

2,4-Dichloropyrido[2,3-*d*]pyrimidine (106)



Procedure:

Same procedure as described for compound **105** was used starting from **104** (1 eq., 0.50 g, 3.07 mmol) in POCl_3 (10 eq., 2.90 mL, 30.65 mmol) with PCl_5 (4 eq., 2.55 g, 12.26 mmol) to afford **106** (392 mg, 64%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 9.35-9.31 (m, 1H), 8.67-8.62 (m, 1H), 7.76-7.70 (m, 1H).

LC-MS (ESI) m/z found: 200, 202 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

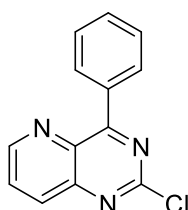
Molecular formula: $\text{C}_7\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}_3$

Molecular weight: 200.02 g/mol

Melting point: 133 °C

Aspect: Pale yellow solid

2-Chloro-4-phenylpyrido[3,2-*d*]pyrimidine (107)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **105** (1.00 eq., 400 mg, 2.00 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 553 mg, 4.00 mmol), phenylboronic acid (1.00 eq., 244 mg, 2.00 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 21 mg, 0.08 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 9 mg, 0.04 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **107** (276 mg, 57%).

1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 9.14-9.06 (m, 1H), 8.44-8.37 (m, 2H), 8.36-8.29 (m, 1H), 7.87-7.79 (m, 1H), 7.64-7.53 (m, 3H).

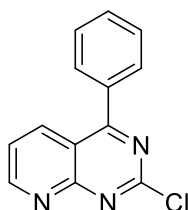
LC-MS (ESI) m/z found: 242, 244 $[M+H]^+$.

Molecular formula: $C_{13}H_8ClN_3$

Molecular weight: 241.68 g/mol

Melting point: 126 °C

Aspect: White solid

2-Chloro-4-phenylpyrido[2,3-d]pyrimidine (108)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **33** was used starting from **106** (1.00 eq., 400 mg, 2.00 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 553 mg, 4.00 mmol), phenylboronic acid (1.00 eq., 244 mg, 2.00 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 21 mg, 0.08 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 9 mg, 0.04 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **107** (305 mg, 63%).

1H NMR ($DMSO-d_6$, δ ppm, J Hz): 9.32 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz and $J = 4.3$ Hz), 8.56 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz and $J = 8.5$ Hz), 7.85-7.78 (m, 3H), 7.72-7.62 (m, 3H).

LC-MS (ESI) m/z found: 242, 244 $[M+H]^+$.

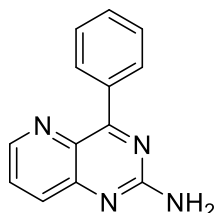
Molecular formula: $C_{13}H_8ClN_3$

Molecular weight: 241.68 g/mol

Melting point: 129 °C

Aspect: White solid

4-Phenylpyrido[3,2-d]pyrimidin-2-amine (109)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **50** was used starting from **107** (1.0 eq., 350 mg, 1.45 mmol) and sodium azide (1.2 eq., 113 mg, 1.74 mmol) in a 4:1 EtOH (10 mL) and glacial acetic acid (2.5 mL) mixture followed by the addition of palladium on activated carbon 5% (80 mg) and hydrazine hydrate (1.5 eq., 0.11 mL, 2.17 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **109** (174 mg, 54%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8.73 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz and $J = 4.0$ Hz), 8.23-8.18 (m, 2H), 7.94 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz and $J = 8.5$ Hz), 7.62-7.58 (m, 1H), 7.57-7.53 (m, 3H), 5.38 (br s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 169.3 (C), 159.6 (C), 149.4 (C), 146.9 (CH), 136.1 (C), 135.5 (C), 133.8 (CH), 131.1 (2 CH), 130.6 (CH), 128.1 (2 CH), 127.9 (CH).

HPLC: C18 column: $t_R = 12.3$ min, purity > 96%

LC-MS (ESI) m/z found: 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

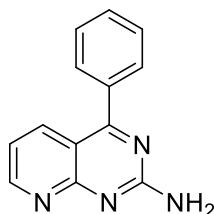
Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4$

Molecular weight: 222.25 g/mol

Melting point: 153 °C

Aspect: Yellow solid

4-Phenylpyrido[2,3-d]pyrimidin-2-amine (110)

**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **108** (1 eq., 300 mg, 1.24 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 4/6) to afford **110** (182 mg, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 9.03 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 4.5 Hz), 8.25 (dd, 1H, *J* = 2.0 Hz and *J* = 8.3 Hz), 7.75-7.69 (m, 2H), 7.63-7.55 (m, 3H), 7.26-7.22 (m, 1H), 6.36 (br s, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 172.5 (C), 161.6 (C), 160.6 (C), 157.4 (CH), 136.9 (CH), 136.1 (C), 134.2 (C), 130.5 (CH), 129.6 (2 CH), 128.8 (2 CH), 118.9 (CH).

HPLC: C18 column: *t_R* = 16.8 min, purity > 98%

LC-MS (ESI) m/z found: 223 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₃H₁₀N₄

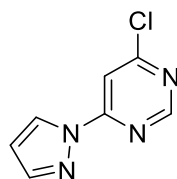
Molecular weight: 222.25 g/mol

Melting point: 156 °C

Aspect: Yellow solid

3- Synthesis of dual ligands (Chapter 3)

4-Chloro-6-(1*H*-pyrazol-1-yl)pyrimidine (111)



Procedure:

A mixture of 4,6-dichloropyrimidine (1.0 eq., 1.00 g, 6.71 mmol) with K₂CO₃ (2.0 eq., 1.86 g, 13.42 mmol) in DMF (20 mL) was stirred at room temperature. A solution of pyrazole (1.1 éq., 0.50 g, 7.38 mmol) in DMF (10 mL) was added dropwise. After completion by TLC, reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. Residue was suspended in PE and stirred. Solid was filtered, washed with a small volume of ACN and dried to afford **111** (958 mg, 79%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.82-8.79 (m, 1H), 8.58 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 8.00-7.98 (m, 1H), 7.84-7.81 (m, 1H), 6.55 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 2.8 Hz).

LC-MS (ESI) m/z found: 181,183 [M+H]⁺.

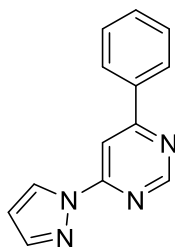
Molecular formula: C₇H₅ClN₄

Molecular weight: 180.60 g/mol

Melting point: 142 °C

Aspect: Beige solid

4-Phenyl-6-(1*H*-pyrazol-1-yl)pyrimidine (112)

**Procedure:**

A mixture of **111** (1.00 eq., 300 mg, 1.66 mmol), K₂CO₃ (2.00 eq., 459 mg, 3.32 mmol), phenylboronic acid (1.30 eq., 263 mg, 2.16 mmol), triphenylphosphine (0.10 eq., 44 mg, 0.17 mmol) and palladium diacetate (0.05 eq., 14 mg, 0.08 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL) was degassed for 5 minutes with nitrogen. Reaction mixture was heated at 80 °C for 4 hours and then cooled to room temperature. Thereafter, the reaction mixture was hydrolyzed with water and aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 6/4) to afford **112** (207 mg, 56%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 9.15-3.13 (m, 1H), 8.75 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 2.6 Hz), 8.38-8.36 (m, 1H), 8.29-8.23 (m, 2H), 8.00-7.99 (m, 1H), 7.62-7.55 (m, 3H), 6.70 (dd, 1H, *J* = 1.4 Hz and *J* = 2.6 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 165.7 (C), 159.2 (CH), 158.0 (C), 144.6 (CH), 136.2 (C), 132.0 (CH), 129.6 (2 CH), 128.6 (CH), 127.7 (2 CH), 110.2 (CH), 103.9 (CH).

HPLC: C18 column: t_R = 26.7 min, purity > 99%

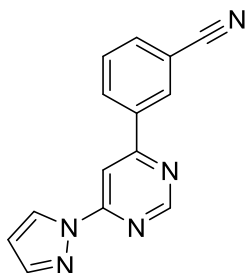
LC-MS (ESI) m/z found: 223 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₃H₁₀N₄

Molecular weight: 222.25 g/mol

Melting point: 236 °C

Aspect: White solid

3-(6-(1H-Pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-yl)benzonitrile (113)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **112** was used starting from **111** (1.00 eq., 600 mg, 3.32 mmol), K₂CO₃ (2.00 eq., 918 mg, 6.64 mmol), 3-cyanophenylboronic acid (1.30 eq., 635 mg, 4.32 mmol), triphenylphosphine (0.10 eq., 87 mg, 0.33 mmol) and palladium diacetate (0.05 eq., 37 mg, 0.17 mmol) in dioxane (20 mL) and water (5 mL) to afford **113** (501 mg, 61%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.19 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 8.76-8.73 (m, 2H), 8.65-8.60 (m, 1H), 8.51 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 8.11-8.00 (m, 2H), 7.76 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz and *J* = 3.2 Hz).

HPLC: C18 column: *t*_R = 18.5 min, purity > 99%

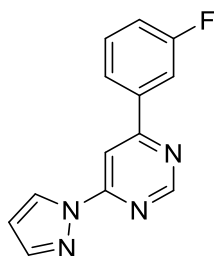
LC-MS (ESI) *m/z* found: 248 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₄H₉N₅

Molecular weight: 247.26 g/mol

Melting point: 252 °C

Aspect: White solid

4-(3-Fluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidine (114)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **112** was used starting from **111** (1.00 eq., 500 mg, 2.77 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 765 mg, 5.54 mmol), 3-fluorophenylboronic acid (1.30 eq., 504 mg, 3.60 mmol), triphenylphosphine (0.10 eq., 73 mg, 0.28 mmol) and palladium

diacetate (0.05 eq., 31 mg, 0.14 mmol) in dioxane (30 mL) and water (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 9/1) to afford **114** (459 mg, 69%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.16-9.09 (m, 1H), 8.74 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 2.7 Hz), 8.38-8.36 (m, 1H), 8.09 (ddd, 1H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.4 Hz and *J* = 1.0 Hz), 8.04 (ddd, 1H, *J* = 10.5 Hz, *J* = 2.6 Hz and *J* = 1.6 Hz), 7.99 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 1.6 Hz), 7.65-7.56 (m, 1H), 7.46-7.38 (m, 1H), 6.69 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 2.7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164.7 (C), 161.5 (C), 159.1 (CH), 158.1 (C), 144.7 (CH), 138.6 (C), 131.6 (CH), 128.6 (CH), 123.6 (CH), 118.6 (CH), 114.2 (CH), 110.2 (CH), 104.4 (CH).

HPLC: C18 column: *t*_R = 24.6 min, purity > 97%

LC-MS (ESI) *m/z* found: 241 [M+H]⁺.

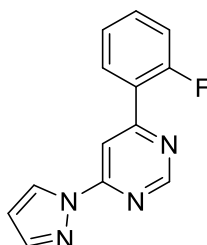
Molecular formula: C₁₃H₉FN₄

Molecular weight: 240.24 g/mol

Melting point: 246 °C

Aspect: White solid

4-(2-Fluorophenyl)-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidine (**115**)



Procedure:

Same procedure as described for compound **112** was used starting from **111** (1.00 eq., 1.00 g, 5.54 mmol) with K₂CO₃ (2.00 eq., 1.53 g, 11.08 mmol), 2-fluorophenylboronic acid (1.30 eq., 1.00 g, 7.20 mmol), triphenylphosphine (0.10 eq., 0.15 g, 0.55 mmol) and palladium diacetate (0.05 eq., 0.06 g, 0.28 mmol) in dioxane (50 mL) and water (12 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 6/4) to afford **115** (865 mg, 65%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 9.17-9.15 (m, 1H), 8.74-8.71 (m, 1H), 8.32-8.29 (m, 1H), 8.20-8.13 (m, 1H), 7.98-7.96 (m, 1H), 7.66-7.58 (m, 1H), 7.46-7.41 (m, 1H), 7.41-7.37 (m, 1H), 6.68 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz and *J* = 2.7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 162.9 (C), 161.8 (C), 159.6 (C), 159.1 (CH), 157.6 (C), 144.8 (CH), 133.7 (CH), 131.1 (CH), 128.6 (CH), 125.6 (CH), 117.1 (CH), 110.2 (CH), 107.8 (CH).

HPLC: C18 column: *t*_R = 27.9 min, purity > 99%

LC-MS (ESI) m/z found: 241 [M+H]⁺.

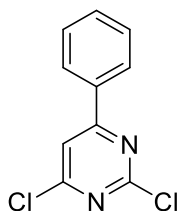
Molecular formula: C₁₃H₉FN₄

Molecular weight: 240.24 g/mol

Melting point: 232 °C

Aspect: White solid

2,4-Dichloro-6-phenylpyrimidine (117a)



Procedure:

A mixture of 2,4,6-trichloropyrimidine (1.50 eq., 2 g, 12.30 mmol) with Na₂CO₃ (2.00 eq., 2 g, 16.40 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 86 mg, 0.33 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 37 mg, 0.16 mmol) in THF (10 mL) and water (3 mL) was stirred and degassed with nitrogen. Reaction mixture was stirred and heated at 60 °C. At the same time, a solution of phenylboronic acid (1.00 eq., 1 g, 8.20 mmol) in THF (5 mL) was added dropwise. After completion by TLC, the reaction mixture was cooled to room temperature and filtered on celite. Filtrate was hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **117a** (886 mg, 48%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.40 (s, 1H), 8.26-8.19 (m, 2H), 7.68-7.53 (m, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 168.2 (C), 162.9 (C), 159.8 (C), 134.1 (C), 133.1 (CH), 129.7 (2 CH), 128.2 (2 CH), 116.8 (CH).

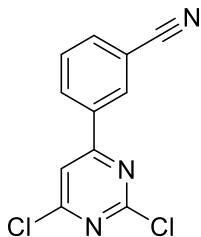
LC-MS (ESI) m/z found: 225, 227 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₀H₆Cl₂N₂

Molecular weight: 225.07 g/mol

Melting point: 163 °C

Aspect: White solid

3-(2,6-Dichloropyrimidin-4-yl)benzonitrile (117b)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **117a** was used starting from 2,4,6-trichloropyrimidine (1.50 eq., 749 mg, 4.08 mmol), Na₂CO₃ (2.00 eq., 577 mg, 5.44 mmol), 3-cyanophenylboronic acid (1.00 eq., 400 mg, 2.72 mmol), triphenylphosphine (0.04 eq., 29 mg, 0.05 mmol) and palladium diacetate (0.02 eq., 12 mg, 0.05 mmol) in THF (10 mL) and water (3 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **117b** (630 mg, 62%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.56 (s, 1H), 8.12-8.04 (m, 2H), 7.98-7.91 (m, 2H).

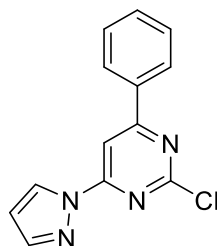
LC-MS (ESI) m/z found: 250, 252 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₁H₅Cl₂N₃

Molecular weight: 250.08 g/mol

Melting point: 192 °C

Aspect: White solid

2-Chloro-4-phenyl-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidine (118a)**Procedure:**

To a solution of **117a** (1.0 eq., 300 mg, 1.33 mmol) in DMF (10 mL) was added pyrazole (1.0 eq., 91 mg, 1.33 mmol) and K₂CO₃ (1.5 eq., 273 mg, 2 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, reaction mixture was hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **118a** (192 mg, 56%).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.69 (dd, 1H, $J = 0.6$ Hz and $J = 2.8$ Hz), 8.34 (s, 1H), 8.26-8.20 (m, 2H), 8.04 (dd, 1H, $J = 0.6$ Hz and $J = 1.6$ Hz), 7.67-7.55 (m, 3H), 6.72 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz and $J = 2.8$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 168.4 (C), 160.2 (C), 159.6 (C), 145.3 (CH), 135.0 (C), 132.7 (CH), 129.7 (2 CH), 129.1 (CH), 128.0 (2 CH), 110.8 (CH), 103.0 (CH).

LC-MS (ESI) m/z found: 257, 259 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

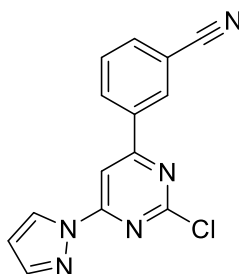
Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClN}_4$

Molecular weight: 256.69 g/mol

Melting point: 232 °C

Aspect: White solid

3-(2-Chloro-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-yl)benzonitrile (118b)



Procedure:

Same procedure as described for compound **118a** was used starting from **117b** (1.0 eq., 600 mg, 2.4 mmol), pyrazole (1.0 eq., 163 mg, 2.4 mmol), K_2CO_3 (1.5 eq., 497 mg, 3.6 mmol) in DMF (10 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **118b** (310 mg, 46%).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 8.74-8.70 (m, 2H), 8.56 (ddd, 1H, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.9$ Hz and $J = 1.1$ Hz), 8.51 (s, 1H), 8.11-8.07 (m, 1H), 8.06-8.05 (m, 1H), 7.84-7.76 (m, 1H), 6.74 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz and $J = 2.6$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 166.4 (C), 160.2 (C), 160.0 (C), 145.5 (CH), 136.2 (C), 135.8 (CH), 132.5 (CH), 131.8 (CH), 130.9 (CH), 129.3 (CH), 118.7 (C), 112.9 (C), 111.0 (CH), 104.01 (CH).

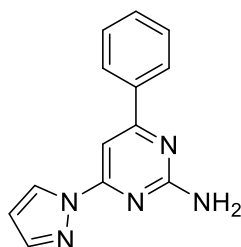
LC-MS (ESI) m/z found: 282, 284 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular formula: $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{ClN}_5$

Molecular weight: 281.70 g/mol

Melting point: 256 °C

Aspect: White solid

4-Phenyl-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (119a)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **118a** (1 eq., 300 mg, 1.17 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **119a** (184 mg, 67%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 8.54 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 2.7 Hz), 8.15-8.06 (m, 2H), 7.89 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 1.7 Hz), 7.56-7.49 (m, 4H), 7.00 (br s, 2H), 6.62 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 2.7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 166.8 (C), 163.9 (C), 158.9 (C), 143.6 (CH), 137.3 (C), 131.2 (CH), 129.2 (2 CH), 127.6 (CH), 127.3 (2 CH), 109.2 (CH), 92.9 (CH).

HPLC: column: *t*_R = 20.6 min, purity > 98%

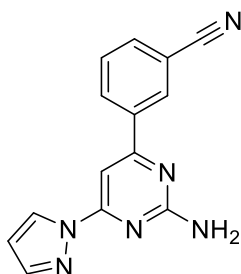
LC-MS (ESI) m/z found: 238 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₃H₁₁N₅

Molecular weight: 237.27 g/mol

Melting point: 243 °C

Aspect: White solid

3-(2-Amino-6-(1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-yl)benzonitrile (119b)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **52** was used starting from **118b** (1 eq., 200 mg, 0.71 mmol) in a saturated solution of ammonia in EtOH (7 mL). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **119b** (100 mg, 54%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.58-8.56 (m, 1H), 8.55 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 2.7 Hz), 8.44 (ddd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.7 Hz and *J* = 1.2 Hz), 8.00 (ddd, 1H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.6 Hz and *J* = 1.1 Hz), 7.91 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 1.5 Hz), 7.77-7.70 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.12 (br s, 2H), 6.63 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 2.7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 164.6 (C), 163.9 (C), 159.3 (C), 143.7 (CH), 138.4 (C), 134.6 (CH), 132.0 (CH), 131.1 (CH), 130.6 (CH), 127.8 (CH), 118.9 (C), 112.5 (C), 109.4 (CH), 93.4 (CH).

HPLC: C18 column: *t*_R = 18.5 min, purity > 98%

LC-MS (ESI) m/z found: 263 [M+H]⁺.

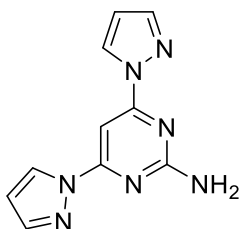
Molecular formula: C₁₄H₁₀N₆

Molecular weight: 262.28 g/mol

Melting point: 282 °C

Aspect: White solid

4,6-Di(1*H*-pyrazol-1-yl)pyrimidin-2-amine (**121**)



Procedure:

To a solution of 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (1.0 eq., 300 mg, 1.83 mmol) in DMF (5 mL) was added pyrazole (2.1 eq., 262 mg, 3.84 mmol), K₂CO₃ (2.5 eq., 632 mg, 4.57 mmol) and CuI (0.01 eq., 4 mg, 0.02 mmol). Reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature and heated at 110 °C for 4 hours. Thereafter, reaction mixture was allowed to room temperature, hydrolyzed with water and extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 6/4) to afford **121** (250 mg, 60%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 8.52 (dd, 2H, *J* = 0.7 Hz and *J* = 2.7 Hz), 7.92 (dd, 2H, *J* = 0.6 Hz and *J* = 1.6 Hz), 7.52 (s, 1H), 7.22 (br s, 2H), 6.63 (dd, 2H, *J* = 1.7 Hz and *J* = 2.7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 163.5 (C), 160.0 (2 C), 143.9 (2 CH), 127.8 (2 CH), 109.4 (2 CH), 84.1 (CH).

HPLC: C18 column: *t*_R = 11.5 min, purity > 97%

LC-MS (ESI) m/z found: 228 [M+H]⁺.

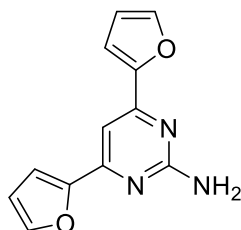
Molecular formula: C₁₀H₉N₇

Molecular weight: 227.23 g/mol

Melting point: 201 °C

Aspect: White solid

4,6-Di(furan-2-yl)pyrimidin-2-amine (122)



Procedure:

Same procedure as described for compound **33** was used starting from 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (1.00 eq., 300 mg, 1.83 mmol) with K_2CO_3 (2.00 eq., 506 mg, 3.66 mmol), 2-furanboronic acid (2 eq., 409 mg, 3.66 mmol), PPh_3 (0.10 eq., 48 mg, 0.18 mmol) and palladium diacetate (0.05 eq., 21 mg, 0.09 mmol) in dioxane (18 mL) and water (5 mL). Reaction mixture was stirred and heated at 80 °C. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **122** (133 mg, 32%).

1H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.62-7.59 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.21-7.18 (m, 2H), 6.60-6.55 (m, 2H), 5.28 (br s, 2H).

^{13}C NMR (CDCl₃, δ ppm): 163.6 (C), 157.3 (2 CH), 153.4 (2 C), 144.2 (2 CH), 118.8 (2 CH), 105.4 (2 CH), 92.8 (CH).

HPLC: C18 column: t_R = 15.9 min, purity > 96%

LC-MS (ESI) m/z found: 228 [M+H]⁺.

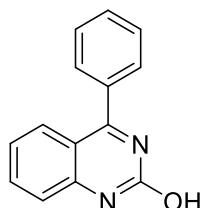
Molecular formula: C₁₂H₉N₃O₂

Molecular weight: 227.22 g/mol

Melting point: 213 °C

Aspect: Beige solid

4-Phenylquinazolin-2-ol (123)

**Procedure:**

A mixture of **33** (1 eq., 500 mg, 2.08 mmol) and sodium acetate (2 eq., 341 mg, 4.15 mmol) in acetic acid (10 mL) was stirred and heated at 80 °C for 6 hours. Reaction mixture was cooled to 0 °C in an ice bath. Solid was filtered and washed with water, cyclohexane and dried to afford **123** (388 mg, 84%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 13.12 (br s, 1H), 7.91 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz, *J* = 8.2 Hz), 7.87-7.80 (m, 2H), 7.75 (ddd, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.1 Hz and *J* = 8.4 Hz), 7.68-7.54 (m, 4H), 7.28 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.0 Hz and *J* = 8.2 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 171.9 (C), 153.5 (C), 138.7 (C), 131.7 (C), 130.7 (CH), 126.1 (CH), 125.1 (2 CH), 124.1 (CH), 123.7 (2 CH), 118.4 (CH), 112.2 (CH), 110.7 (C).

HPLC: C18 column: *t_R* = 15.1 min, purity > 98%

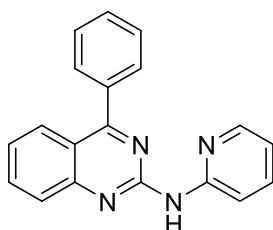
LC-MS (ESI) m/z found: 223 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₄H₁₀N₂O

Molecular weight: 222.25 g/mol

Melting point: 183 °C

Aspect: White solid

4-Phenyl-*N*-(pyridin-2-yl)quinazolin-2-amine (124)**Procedure:**

In a sealed tube was added **33** (1.00 eq., 300 mg, 1.25 mmol), BINAP (0.10 eq., 78 mg, 0.12 mmol), 2-pyridinamine (1.50 eq., 176 mg, 1.87 mmol), Cs₂CO₃ (3.00 eq., 1 g, 3.74 mmol) and palladium diacetate (0.05, 14 mg, 0.06 mmol) in dioxane (10 mL). Reaction mixture was

degassed under nitrogen and then heated at 130 °C for 2 hours. Reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **124** (249 mg, 67%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 10.00 (br s, 1H), 8.68-8.63 (m, 1H), 8.34 (ddd, 1H, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.9 Hz and *J* = 0.8 Hz), 7.92-7.76 (m, 6H), 7.68-7.61 (m, 3H), 7.47-7.40 (m, 1H), 7.04 (ddd, 1H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 4.9 Hz and *J* = 6.5 Hz).

HPLC: C18 column: *t*_R = 30.3 min, purity > 99%

LC-MS (ESI) *m/z* found: 299 [M+H]⁺.

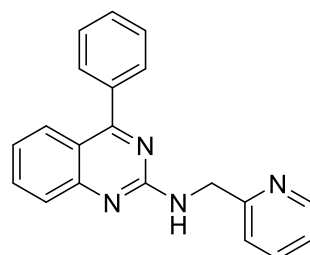
Molecular formula: C₁₉H₁₄N₄

Molecular weight: 298.35 g/mol

Melting point: 287 °C

Aspect: Brown solid

4-Phenyl-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)quinazolin-2-amine (**125**)



Procedure:

In a sealed tube, a mixture of **33** (1 eq., 0.30 g, 1.25 mmol) and 2-picolylamine (2 eq., 0.26 mL, 2.49 mmol) was stirred at 80 °C overnight. Reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **125** (320 mg, 82%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.63-8.58 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.77-7.63 (m, 5H), 7.59-7.53 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.23-7.17 (m, 2H), 6.42 (br s, 1H), 4.96 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 165.5 (C), 153.9 (C), 153.4 (C), 148.3 (C), 144.3 (CH), 132.7 (CH), 131.9 (CH), 129.0 (CH), 125.0 (CH), 124.8 (2 CH), 123.7 (2 CH), 122.8 (CH), 121.4 (C), 117.8 (CH), 117.4 (CH), 116.7 (CH), 113.9 (C), 42.1 (CH₂).

HPLC: C18 column: *t*_R = 28.7 min, purity > 98%

LC-MS (ESI) *m/z* found: 313 [M+H]⁺.

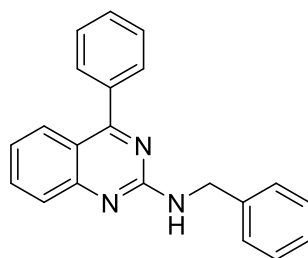
Molecular formula: C₂₀H₁₆N₄

Molecular weight: 312.38 g/mol

Melting point: 245 °C

Aspect: White solid

***N*-Benzyl-4-phenylquinazolin-2-amine (126)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **125** was used starting from **33** (1 eq., 300 mg, 1.25 mmol) and benzylamine (2 eq., 0.3 mL, 2.49 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **126** (210 mg, 54%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.88-7.82 (m, 1H), 7.76-7.68 (m, 4H), 7.60-7.52 (m, 3H), 7.51-7.43 (m, 2H), 7.41-7.26 (m, 3H), 7.24-7.17 (m, 1H), 5.68 (m, 1H), 4.85 (d, 2H, J = 5.8 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.1 (C), 158.9 (C), 153.4 (C), 139.4 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.7 (CH), 129.6 (2 CH), 128.6 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.7 (2 CH), 127.5 (CH), 127.2 (CH), 126.2 (CH), 122.5 (CH), 118.7 (C), 45.7 (CH₂).

HPLC: C18 column: t_R = 32.6 min, purity > 97%

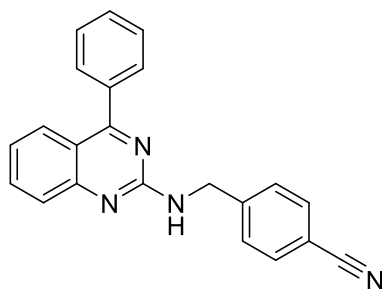
LC-MS (ESI) m/z found: 312 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₁H₁₇N₃

Molecular weight: 311.39 g/mol

Melting point: 254 °C

Aspect: Yellow solid

4-(((4-Phenylquinazolin-2-yl)amino)methyl)benzonitrile (**127**)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **125** was used starting from **33** (1.0 eq., 300 mg, 1.25 mmol) and 4-(aminomethyl)benzonitrile (1.5 eq., 315 mg, 1.87 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **127** (302 mg, 72%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.83 (m, 1H), 7.75-7.60 (m, 6H), 7.59-7.51 (m, 5H), 7.23 (ddd, 1H, *J* = 1.9 Hz, *J* = 6.2 Hz and *J* = 8.2 Hz), 5.87 (br s, 1H), 4.88 (d, 2H, *J* = 6.2 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 165.9 (C), 153.8 (C), 140.7 (C), 132.4 (C), 129.3 (C), 127.6 (2 CH), 125.5 (CH), 125.4 (CH), 124.9 (2 CH), 123.9 (2 CH), 123.4 (2 CH), 122.9 (CH), 121.3 (C), 118.3 (CH), 114.3 (CH), 114.0 (C), 106.1 (C), 40.2 (CH₂).

HPLC: C18 column: *t_R* = 22.3 min, purity > 99%

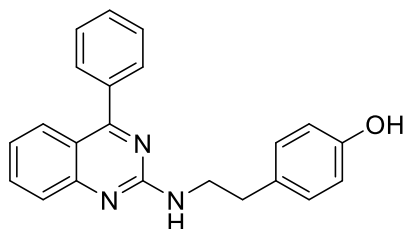
LC-MS (ESI) m/z found: 337 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₂H₁₆N₄

Molecular weight: 336.40 g/mol

Melting point: 273 °C

Aspect: White solid

4-(2-((4-Phenylquinazolin-2-yl)amino)ethyl)phenol (**128**)**Procedure:**

Same procedure as described for compound **125** was used starting from **33** (1 eq., 300 mg, 1.25 mmol) and tyramine (2 eq., 342 mg, 2.49 mmol). Reaction mixture was stirred and heated

at 170 °C overnight. Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **128** (323 mg, 76%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.86-7.80 (m, 1H), 7.76-7.64 (m, 4H), 7.59-7.53 (m, 3H), 7.19 (ddd, 1H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 6.1 Hz and *J* = 8.1 Hz), 7.10-7.05 (m, 2H), 6.76-6.70 (m, 2H), 5.45 (br s, 1H), 3.84 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz), 2.93 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.4 (C), 158.7 (C), 154.8 (C), 153.0 (C), 137.2 (C), 134.1 (CH), 130.5 (CH), 129.89 (2 CH), 129.8 (CH), 129.6 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.6 (CH), 125.6 (C), 122.5 (CH), 118.4 (C), 115.5 (2 CH), 43.2 (CH₂), 34.9 (CH₂).

HPLC: C18 column: *t_R* = 26.1 min, purity > 97%

LC-MS (ESI) m/z found: 342 [M+H]⁺.

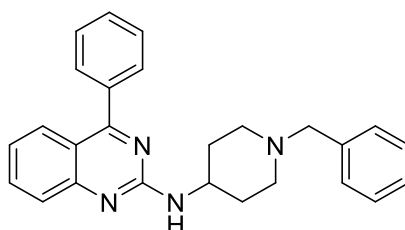
Molecular formula: C₂₂H₁₉N₃O

Molecular weight: 341.41 g/mol

Melting point: 263 °C

Aspect: White solid

***N*-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-4-phenylquinazolin-2-amine (129)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **125** was used starting from **33** (1 eq., 0.3 g, 1.25 mmol) and 4-amino-1-benzylpiperidine (2 eq., 0.5 mL, 2.49 mmol). Crude product was purified using flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc : 10/0 to 4/6) to afford **129** (395 mg, 67%). For biological evaluation, oil was suspended in diethyl ether with HCl gas and concentrated *in vacuo*. Residue was solubilized in water and dried in a freeze-dryer.

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 7.82-7.80 (m, 1H), 7.76-7.64 (m, 4H), 7.59-7.53 (m, 3H), 7.41-7.25 (m, 5H), 7.22-7.12 (m, 1H), 5.32 (br s, 1H), 4.22-4.07 (m, 1H), 3.58 (s, 2H), 2.95-2.84 (m, 2H), 2.37-2.24 (m, 2H), 2.23-2.11 (m, 2H), 1.74-1.58 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.0 (C), 158.4 (C), 153.5 (C), 138.4 (C), 137.5 (C), 133.7 (CH), 129.6 (CH), 129.5 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.2 (2 CH), 127.5 (CH), 127.0 (CH), 126.1 (CH), 122.2 (CH), 118.5 (C), 63.3 (CH), 52.3 (2 CH₂), 47.8 (CH₂), 32.4 (2 CH₂).

HPLC: C18 column: *t_R* = 28.2 min, purity > 97%

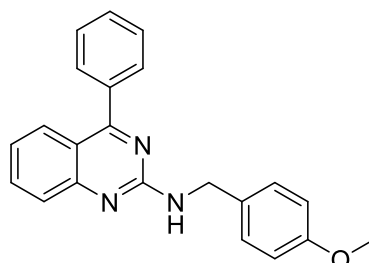
LC-MS (ESI) m/z found: 395 [M+H]⁺

Molecular formula: C₂₆H₂₆N₄

Molecular weight: 394.52 g/mol

Aspect: Orange oil

***N*-(4-Methoxybenzyl)-4-phenylquinazolin-2-amine (130)**



Procedure:

Same procedure as described for compound **125** was used starting from **33** (1 eq., 0.3 g, 1.25 mmol) and 4-methoxybenzylamine (2 eq., 0.3 mL, 2.49 mmol). Crude product was suspended in PE and stirred. Solid was filtered and dried to afford **130** (323 mg, 76%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz): 7.92 (br s, 1H), 7.74-7.63 (m, 4H), 7.62-7.49 (m, 4H), 7.38-7.29 (m, 2H), 7.18 (ddd, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 6.9 Hz and *J* = 8.2 Hz), 6.90-6.83 (m, 2H), 4.56 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.70 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 169.7 (C), 159.4 (C), 158.5 (CH), 153.4 (C), 137.5 (C), 134.3 (CH), 132.7 (C), 130.2 (2 CH), 129.9 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.9 (2 CH), 127.6 (CH), 126.2 (C), 122.6 (CH), 118.1 (C), 114.1 (CH), 55.6 (OCH₃), 44.1 (CH₂).

HPLC: C18 column: *t*_R = 13.8 min, purity > 98%

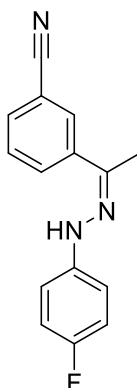
LC-MS (ESI) *m/z* found: 342 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₂₂H₁₉N₃O

Molecular weight: 341.41 g/mol

Melting point: 246 °C

Aspect: Pale yellow solid

(Z)-3-(1-(2-(4-Fluorophenyl)hydrazineylidene)ethyl)benzonitrile (132)**Procedure:**

To a solution of 4-fluorophenylhydrazine hydrochloride (1.2 eq., 2.0 g, 12.30 mmol) in MeOH (20 mL) was added 3'-cyanoacetophenone (1.0 eq., 1.5 g, 10.37 mmol). Reaction mixture was heated at reflux overnight. Reaction mixture was cooled to room temperature and filtered. Solid was washed with MeOH and dried to afford **132** (1.9 g, 60%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.09 (m, 1H), 8.01 (ddd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.9 Hz and *J* = 1.3 Hz), 7.61-7.57 (m, 1H), 7.52-7.47 (m, 1H), 7.42 (br s, 1H), 7.20-7.13 (m, 2H), 7.08-7.00 (m, 2H), 2.26 (s, 3H).

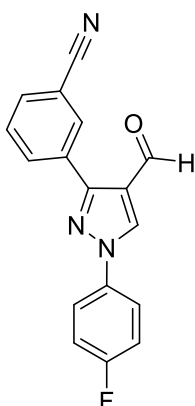
LC-MS (ESI) m/z found: 254 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₅H₁₂FN₃

Molecular weight: 253.28 g/mol

Melting point: 171 °C

Aspect: Yellow solid

3-(1-(4-Fluorophenyl)-4-formyl-1H-pyrazol-3-yl)benzotrile (133)**Procedure:**

A solution of DMF (9 mL) was cooled to 0 °C. Then, POCl₃ (3 mL) was added dropwise with the temperature maintained below 0 °C. The solution was stirred for 40 min at 0 °C. Thereafter, **132** (1 eq., 2 g, 7.9 mmol) was added by fraction and the reaction mixture was cooled to room temperature. After 2 hours, reaction mixture was heated at 50 °C until completion by TLC. Reaction mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with crushed ice and a 1 M NaOH solution up to basic pH. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Solid was suspended in a solution of methanol and diethyl ether (1/3), filtered and dried to afford **133** (1.7 g, 72%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz): 10.00 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.45-8.44 (m, 1H), 8.33-8.29 (m, 1H), 8.10-8.03 (m, 2H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.50-7.41 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm): 185.0 (C), 160.1 (C), 150.6 (C), 136.8 (CH), 135.5 (C), 133.7 (CH), 133.2 (CH), 132.9 (C), 132.5 (CH), 130.3 (CH), 122.7 (C), 122.2 (CH), 122.0 (CH), 119.0 (C), 117.2 (CH), 116.9 (CH), 112.2 (C).

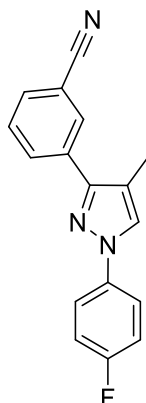
LC-MS (ESI) m/z found: 292 [M+H]⁺.

Molecular formula: C₁₇H₁₀FN₃O

Molecular weight: 291.29 g/mol

Melting point: 213 °C

Aspect: White solid

3-(1-(4-Fluorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-yl)benzonitrile (134)**Procedure:**

To a solution of **133** (1.0 eq., 0.2 g, 0.69 mmol) in TFA (2 mL) was added triethylsilane (2.4 eq., 0.3 mL, 1.65 mmol). The solution was vigorously stirred at room temperature overnight. Thereafter, solution was concentrated *in vacuo* and water was added. Aqueous layer was extracted three times with EtOAc. Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 10/0 to 7/3) to afford **134** (118 mg, 62%).

¹H NMR (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8.12-8.11 (m, 1H), 8.07-8.03 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.74-7.66 (m, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.59-7.54 (m, 1H), 7.22-7.14 (m, 2H), 2.36 (m, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, δ ppm): 162.7 (C), 159.5 (C), 149.2 (C), 136.2 (C), 135.0 (C), 131.5 (CH), 131.0 (CH), 130.9 (CH), 129.3 (CH), 127.7 (CH), 120.6 (CH), 120.5 (CH), 119.0 (C), 116.4 (CH), 116.1 (CH), 112.7 (C), 10.3 (CH₃).

LC-MS (ESI) m/z found: 278 [M+H]⁺.

HPLC: C18 column: t_R = 17.1 min, purity > 98%

Molecular formula: C₁₇H₁₂FN₃

Molecular weight: 277.30 g/mol

Melting point: 197 °C

Aspect: White solid

II. Displacement binding assays (*in vitro* testing)

1- A_{2A} receptor

Saturation binding assays (hA_{2A}R)

A suspension of cell membranes (4 µg/wells – Perkin Elmer RBHA2AM400UA) were incubated with increasing concentrations (0 – 10 nM) of [³H]-ZM241385 (ART 0884: 1 mCi/ml - 50 Ci/mmol) in 50 mM Tris, pH 7.4 buffer (containing 10 mM MgCl₂, 0.2 UI/mL of adenosine deaminase). After 1 h at 27 °C on a stirring plate, reaction was stopped by rapid filtration through UniFilter-96 GF/B or GF/C glass filters (PerkinElmer) presoaked with PEI 0.5% using a cell harvester (PerkinElmer). Filters were washed ten times with ice cold binding buffer. After addition of scintillation liquid (30 µL of MicroScint™ 40, PerkinElmer) and 5 min of incubation, the radioactivity was measured using a TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer). Non-specific binding was determined in the presence of 10 µM ZM-24135.

Competition binding assays (hA_{2A}R)

Each tested compound was dissolved in DMSO (10 mM) and diluted with assay buffer to the desired concentration, where the amount of DMSO never exceeded 3%. A suspension of cell membranes (4 µg/wells – Perkin Elmer RBHA2AM400UA) were incubated with 2 nM of [³H]-ZM241385 (ART 0884: 1 mCi/ml - 50 Ci/mmol) in 50 mM Tris, pH 7.4 buffer (containing 10 mM MgCl₂, 0.2 UI/mL of adenosine deaminase). Thereafter, an increasing concentration (0 – 100 µM) of unlabeled ligands were added. After 1 h at 27 °C on a stirring plate, reaction was stopped by rapid filtration through UniFilter-96 GF/B or GF/C glass filters (PerkinElmer) presoaked with PEI 0.5% using a cell harvester (PerkinElmer). Filters were washed ten times with ice cold binding buffer. After addition of scintillation liquid (30 µL of MicroScint™ 40, PerkinElmer) and 5 min of incubation, the radioactivity was measured using a TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer). Non-specific binding was determined in the presence of 10 µM ZM-24135. Data were analysed using Graph Pad Prism, version 6.01 (San Diego, CA). Inhibition constants (K_i) were calculated by non-linear regression analysis with the Cheng and Prusoff equation and a K_D value of 1.5 nM were used. Displacement reference curves were performed with ZM241385 in accordance with the literature.

2- mGlu₅ receptor

Saturation binding assays (hmGluR_{5A})

A suspension of cell membranes (15 µg/wells – Perkin Elmer ES-555-M400UA) were incubated with increasing concentrations (0 – 20 nM) of [³H]-MPEP (ART 1209A: 1 mCi/ml - 60 Ci/mmol) in 25 mM HEPES, pH 7.4 buffer (containing 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂). After 1 h at 27 °C on a stirring plate, reaction was stopped by rapid filtration through UniFilter-96 GF/B or GF/C glass filters (PerkinElmer) presoaked with PEI 0.5% using a cell harvester (PerkinElmer). Filters were washed ten times with ice cold binding buffer. After addition of scintillation liquid (30 µL of MicroScint™ 40, PerkinElmer) and 5 min of incubation, the radioactivity was measured using a TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer). Non-specific binding was determined in the presence of 10 µM MPEP.

Competition binding assays (hmGluR_{5A})

Each tested compound was dissolved in DMSO (10 mM) and diluted with assay buffer to the desired concentration, where the amount of DMSO never exceeded 3%. A suspension of cell membranes (15 µg/wells – Perkin Elmer ES-555-M400UA) were incubated with 7 nM of [³H]-MPEP (ART 1209A: 1 mCi/ml - 60 Ci/mmol) in 25 mM HEPES, pH 7.4 buffer (containing 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂). Thereafter, an increasing concentration (0 – 100 µM) of unlabeled ligands were added. After 1 h at 27 °C on a stirring plate, reaction was stopped by rapid filtration through UniFilter-96 GF/B or GF/C glass filters (PerkinElmer) presoaked with PEI 0.5% using a cell harvester (PerkinElmer). Filters were washed ten times with ice cold binding buffer. After addition of scintillation liquid (30 µL of MicroScint™ 40, PerkinElmer) and 5 min of incubation, the radioactivity was measured using a TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer). Non-specific binding was determined in the presence of 10 µM MPEP. Data were analysed using Graph Pad Prism, version 6.01 (San Diego, CA). Inhibition constants (K_i) were calculated by non-linear regression analysis with the Cheng and Prusoff equation and a K_D value of 7 nM were used. Displacement reference curves were performed with MPEP in accordance with the literature.

Références

1. H. Hippius, G. Neundörfer, **The discovery of Alzheimer's disease**, *Dialogues in clinical neuroscience*, **2003**, 5 (1), 101-108.
2. G. Cipriani, C. Dolciotti, L. Picchi, U. Bonuccelli, **Alzheimer and his disease: a brief history**, *Neurological Sciences*, **2011**, 32 (2), 275-279.
3. Capsule histoire : Les premiers cas du Dr. Alois Alzheimer [Internet]. Disponible sur : https://lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/histoire_jaune03.html (consulté le 25.06.2020).
4. K. Maurer, S. Volk , H. Gerbaldo, **Auguste D and Alzheimer's disease**, *The Lancet*, **1997**, 349 (9064), 1546-1549.
5. M. D. Sahab Uddin, G. Ashraf, **Introductory Chapter: Alzheimer's Disease - The Most Common Cause of Dementia**, *Advances in Dementia Research*, **2018**.
6. R. Tarawneh, D. M. Holtzman, **The Clinical Problem of Symptomatic Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment**, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2012**, 2 (5), a006148.
7. S. Duong, Patel T., F. Chang, **Dementia: What pharmacists need to know**, *Canadian Pharmacists Journal*, **2017**, 150 (2), 118-129.
8. La démence [Internet] Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (consulté le 25.06.2020).
9. Association France Alzheimer [Internet] Disponible sur : <https://www.francealzheimer.org/> (consulté le 25.06.2020).
10. Fondation pour la Recherche Médicale [Internet] Disponible sur : <https://www.frm.org/recherches-maladies-neurologiques/maladie-d-alzheimer/alzheimer-en-chiffres> (consulté le 25.06.2020).
11. V. N. Mukhin, K. I. Pavlov, V. M. Klimenko, **Mechanisms of Neuron Loss in Alzheimer's Disease**, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **2017**, 47 (5), 508-516.
12. J. Weller, A. Budson, **Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment**, *F1000Research*, **2018**, 7, 1161.
13. Loi n° 2019-1446 du 24 décembre 2019 de financement de la Sécurité sociale pour 2020, 2019-1446 décret 24, **2019**.
14. R. C. Barber, **The Genetics of Alzheimer's Disease**, *Scientifica*, **2012**, 1-14.

15. S. Chakrabarti, V. Kumar Khemka, A. Banerjee, G. Chatterjee, A. Ganguly, A. Biswas, **Metabolic Risk Factors of Sporadic Alzheimer's Disease: Implications in the Pathology, Pathogenesis and Treatment**, *Alzheimer's and Dementia*, **2015**, 6 (4), 282.
16. R. Mayeux, Y. Stern, **Epidemiology of Alzheimer Disease**, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2012**, 2, (8), a006239.
17. A. Hémar, C. Mülle, **Maladie d'Alzheimer, peptide β -amyloïde et synapses**, *Medical Sciences*, **2011**, 27 (8-9), 733-736.
18. D. Galimberti, E. Scarpini, **Treatment of Alzheimers Disease: Symptomatic and Disease-Modifying Approaches**, *Current Aging Science*, **2010**, 3 (1), 46-56.
19. S. H. Barage, K. D. Sonawane, **Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease**, *Neuropeptides*, **2015**, 52, 1-18.
20. P. E. Spies, **Reviewing reasons for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer**, *Frontiers in Bioscience*, **2012**, 17 (7), 2024-2034.
21. E. Kojro, F. Fahrenholz, **The Non-Amyloidogenic Pathway: Structure and Function of α -Secretases**. In: Harris J. R., Fahrenholz F. (eds) *Alzheimer's Disease*. Subcellular Biochemistry, 38, 105-127.
22. A. L. Lublin, C. D. Link, **Alzheimer's disease drug discovery: *in vivo* screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity**. *Drug Discovery Today: Technologies*, **2013**, 10 (1), 115-119.
23. L. Buée, T. Bussièrre, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, P. R. Hof, **Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders**, *Brain Research Reviews*, **2000**, 33 (1), 95-130.
24. National Institute on Aging [Internet] Disponible sur : <https://www.nia.nih.gov/node> (consulté le 27.06.2020).
25. C. Haass, D. J. Selkoe, **Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide**, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2007**, 8 (2), 101-112.
26. J. Hardy, G. Higgins, **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis**, *Science*, **1992**, 256 (5054), 184-185.
27. F. A. Holloway, J. M. Peirce, **Fundamental Psychopharmacology**, *Comprehensive Clinical Psychology*, **1998**, 1, 173-206.

28. J. Haam, J. L. Yakel, **Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function**, *Journal of Neurochemistry*, **2017**, *142*, 111-121.
29. R. Bordet, **Maladie d Alzheimer : au-delà de la seule hypothèse cholinergique - Autres systèmes de neurotransmission et modulation des récepteurs nicotiques**, **2003**, *La Lettre du Pharmacologue*, *17* (1), 23-30.
30. T. D. Bird, S. Stranahan, S. M. Sumi, M. Raskind, **Alzheimer's disease: Choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups**, *Annals of Neurology*, **1983**, *14* (3), 284-293.
31. R. Kumar, A. Kumar, B. Långström, T. Darreh-Shori, **Discovery of novel choline acetyltransferase inhibitors using structure-based virtual screening**, *Scientific Reports*, **2017**, *7* (1), 16287.
32. R. Anand, K. D. Gill, A. A. Mahdi, **Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future**, *Neuropharmacology*, **2014**, *76*, 27-50.
33. VIDAL [Internet] Disponible sur : <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-gp3381-EXELON-dispositif-transdermique.html> (consulté le 28.06.2020).
34. S. Shimohama, J. Kawamata, **Roles of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Pathology and Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases**, In: A. Akaike, S. Shimohama, Y. Misu (eds), *Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection*, 137-158.
35. D. A. Casey, D. Antimisiaris, J. O'Brien, **Drugs for Alzheimer's Disease: Are They Effective?**, *Physical Therapy*, **2010**, *35* (4), 208-211.
36. F. Li, J. Z. Tsien, **Memory and the NMDA Receptors**, *The New England Journal of Medicine*, **2009**, *361* (3), 302-303.
37. I. Bezprozvanny, M. P. Mattson, **Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease**, *Trends in Neurosciences*, **2008**, *31* (9), 454-463.
38. Y. Zhang, P. Li, J. Feng, M. Wu, **Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease**, *Neurological Sciences*, **2016**, *37* (7), 1039-1047.
39. Z. Esposito Z, L. Belli, S. Toniolo, G. Sancesario, C. Bianconi, A. Martorana, **Amyloid β , Glutamate, Excitotoxicity in Alzheimer's Disease: Are We on the Right Track?**, *CNS Neuroscience and Therapeutics*, **2013**, *19* (8), 549-555.

40. G. Silvestrelli, A. Lanari, L. Parnetti, D. Tomassoni, F. Amenta, **Treatment of Alzheimer's disease: From pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology**, *Mechanisms of Ageing and Development*, **2006**, *127* (2), 148-157.
41. A. Calhoun, C. King, R. Khoury, G. T. Grossberg, **An evaluation of memantine ER + donepezil for the treatment of Alzheimer's disease**, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2018**, *19* (15), 1711-1717.
42. Haute Autorité de Santé [Internet] Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2679466/fr/medicaments-de-la-maladie-d-alzheimer-un-interet-medical-insuffisant-pour-justifier-leur-prise-en-charge-par-la-solidarite-nationale (consulté le 24.06.2020).
43. A. K. Ghosh, M. Brindisi, J. Tang, **Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease: β -Secretase inhibitor drugs**, *Journal of Neurochemistry*, **2012**, *120*, 71-83.
44. Merck Announces Discontinuation of APECS Study Evaluating Verubecestat (MK-8931) for the Treatment of People with Prodromal Alzheimer's Disease [Internet] Disponible sur: <https://investors.merck.com/news/press-release-details/2018/Merck-Announces-Discontinuation-of-APECS-Study-Evaluating-Verubecestat-MK-8931-for-the-Treatment-of-People-with-Prodromal-Alzheimers-Disease/default.aspx> (consulté le 09.07.2020).
45. S. Weggen, J. L. Eriksen, S. A. Sagi, C. U. Pietrzik, A. Fauq, T. E. Golde, **Evidence that Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase Activity**, *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, *278* (34), 31831-31837.
46. J. Folch, D. Petrov, M. Ettcheto, S. Abad, E. Sánchez-López, M. L. García, **Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment**, *Neural Plasticity*, **2016**, *2016*, 501693, 1-15.
47. A. N. Azab, J. F. Ishak, J. Kaplanski, V. Delbar, M. L. Greenberg, **Mechanisms of action of the mood stabilizer valproate: a focus on GSK-3 inhibition**, *Future Neurology*, **2008**, *3* (4), 433-445.
48. S. Hostiuc, P. Perlea, M. Marinescu, C. Dogaroiu, E. Drima, **GSK-3 Inhibitors and Tooth Repair: An Ethical Analysis**, *Frontiers in Pharmacology*, **2019**, *9*, 1495.

49. A. Takashima, **Tau Aggregation is a Therapeutic Target for Alzheimers Disease**, *Current Alzheimer Research*, **2010**, 7 (8), 665-669.
50. K. A. DaSilva, Shaw J. E., J. McLaurin, **Amyloid- β fibrillogenesis: Structural insight and therapeutic intervention**, *Experimental Neurology*, **2010**, 223 (2), 311-321.
51. M. Grundman, P. Delaney, **Antioxidant strategies for Alzheimer's disease**, *Proceedings of the Nutrition Society*, **2002**, 61 (2), 191-202.
52. A. D. Smith, **Why are drug trials in Alzheimer's disease failing?**, *The Lancet*, **2010**, 376 (9751), 1466.
53. S. Sheth, R. Brito, D. Mukherjea, L. Rybak, V. Ramkumar, **Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation**, *International Journal of Molecular Sciences*, **2014**, 15 (2), 2024-2052.
54. J. M. Brundage, T. V. Dunwiddie, **Role of Adenosine as a Modulator of Synaptic Activity in the Central Nervous System**, *Advances in Pharmacology*, **1997**, 353-391.
55. S. Sachdeva, M. Gupta, **Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview**, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **2013**, 21 (3), 245-253.
56. R. Duroux, **Conception, synthèse et évaluation d'antagonistes des récepteurs A_{2A}**, Thèse de Doctorat - Université de Lille, **2017**.
57. K.A. Jacobson, Z-G Gao, **Adenosine receptors as therapeutic targets**, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2006**, 5 (3), 247-264.
58. R. D. S. Prediger, **Effects of Caffeine in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Non-Motor Symptoms**, *Journal of Alzheimer's Disease*, **2010**, 20 (s1), S205-S220.
59. G. W. Arendash, W. Schleif, K. Rezai-Zadeh, E. K. Jackson, L. C. Zacharia, J. R. Cracchiolo, **Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production**, *Neuroscience*, **2006**, 142 (4), 941-952.
60. G. W. Arendash, T. Mori, C. Cao, M. Mamcarz, M. Runfeldt, A. Dickson, **Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid- β Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice**, *Journal of Alzheimer's Disease*, **2009**, 17 (3), 661-680.
61. C. Laurent, S. Eddarkaoui, M. Derisbourg, A. Leboucher, D. Demeyer, S. Carrier, **Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology**, *Neurobiology of Aging*, **2014**, 35 (9), 2079-2090.

62. G. W. Arendash, C. Cao, **Caffeine and Coffee as Therapeutics Against Alzheimer's Disease**, *Journal of Alzheimer's Disease*, **2010**, *20* (s1), S117-S126.
63. B. B. Fredholm, A. P. IJzerman, K. A. Jacobson, J. Linden, C. E. Müller, **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors - An Update**, *Pharmacological Reviews*, **2011**, *63* (1), 1-34.
64. L. Yu, H-Y. Shen, J. E. Coelho, I. M. Araújo, Q-Y. Huang, Y-J. Day, **Adenosine A_{2A} receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms**, *Annals of Neurology*, **2008**, *63* (3), 338-346.
65. V. Flaten, C. Laurent, J. E. Coelho, U. Sandau, V. L. Batalha, S. Burnouf, **From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer's disease?**, *Biochemical Society Transactions*, **2014**, *42* (2), 587-592.
66. K. Carvalho, E. Faivre, M. J. Pietrowski, X. Marques, V. Gomez-Murcia, A. Deleau *et al.*, **Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in tau pathology linked to neuronal adenosine A_{2A} receptor**, *Brain*, **2019**, *142* (11), 3636-3654.
67. C. E. Müller, K. A. Jacobson, **Xanthines as Adenosine Receptor Antagonists**, *Handbook of Experimental Pharmacology*, **2011**, *200*, 151-99.
68. Home - ClinicalTrials.gov [Internet] Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/> (consulté le 10.07.2020).
69. B. C. Shook, P. F. Jackson, **Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists and Parkinson's Disease**, *ACS Chemical Neuroscience*, **2011**, *2* (10), 555-567.
70. Commissioner O of the. FDA approves new add-on drug to treat off episodes in adults with Parkinson's disease [Internet]. FDA. FDA; 2020 Disponible sur: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-add-drug-treat-episodes-adults-parkinsons-disease> (consulté le 10.07.2020).
71. Y. Mizuno, T. Kondo, **Adenosine A_{2A} receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease: Study of Istradefylline in PD**, *Movement Disorders*, **2013**, *28* (8), 1138-1141.
72. M. De Lera Ruiz, Y-H. Lim, J. Zheng, **Adenosine A_{2A} Receptor as a Drug Discovery Target**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *57* (9), 3623-3650.
73. Y. Zou, W. I. Weis, B. K. Kobilka, **N-Terminal T4 Lysozyme Fusion Facilitates Crystallization of a G Protein Coupled Receptor**, *PLOS ONE*, **2012**, *7* (10), e46039.

74. Bank RPD. RCSB PDB: Homepage [Internet] Disponible sur: <https://www.rcsb.org/> (consulté le 10.07.2020).
75. V-P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. T. Chien, J. R. Lane *et al.*, **The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A_{2A} Adenosine Receptor Bound to an Antagonist**, *Science*, **2008**, 322 (5905), 1211-1217.
76. M. Congreve, S. P. Andrews, A. S. Doré, K. Hollenstein, E. Hurrell, C. J. Langmead *et al.*, **Discovery of 1,2,4-Triazine Derivatives as Adenosine A_{2A} Antagonists using Structure Based Drug Design**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 55 (5), 1898-1903.
77. V. Moas Heloire, **Conception, synthèse et évaluation de nouveaux ligands antagonistes des récepteurs A_{2A}**, Thèse de Doctorat - Université de Lille, **2015**.
78. V-P. Jaakola, A. P. IJzerman, **The crystallographic structure of the human adenosine A_{2A} receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design**, *Current Opinion in Structural Biology*, **2010**, 20 (4), 401-414.
79. H. Keränen, H. Gutiérrez-de-Terán, J. Åqvist, **Structural and Energetic Effects of A_{2A} Adenosine Receptor Mutations on Agonist and Antagonist Binding**, *PLOS ONE*, **2014**, 9 (10), e108492.
80. R. Duroux, L. Agouridas, N. Renault, J. El Bakali, C. Furman, P. Melnyk P *et al.*, **Antagonists of the adenosine A_{2A} receptor based on a 2-arylbenzoxazole scaffold: Investigation of the C5- and C7-positions to enhance affinity**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, 144, 151-163.
81. M. Gerster, R. Wicki, **A Concise Route to 2-Amino-3-aryl-3 H -benzofurans and their Use as Precursors to 3-Aryl-3 H -benzofuran-2-one and 1 H -Benzofuro[2,3- b]pyridin-2-one Derivatives**, *Synthesis*, **2004**, (2), 249-254.
82. A. G. Cole, T. M. Stauffer, L. L. Rokosz, A. Metzger, L. W. Dillard, W. Zeng *et al.*, **Synthesis of 2-amino-5-benzoyl-4-(2-furyl)thiazoles as adenosine A_{2A} receptor antagonists**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19 (2), 378-381.
83. A. B. Scheiff, S. G. Yerande, A. El-Tayeb, W. Li, G. S. Inamdar, K. K. Vasu *et al.*, **2-Amino-5-benzoyl-4-phenylthiazoles: Development of potent and selective adenosine A₁ receptor antagonists**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 18 (6), 2195-2203.
84. H. D. Janse van Rensburg, L. J. Legoabe, G. Terre'Blanche, J. Aucamp, **Synthesis and evaluation of methoxy substituted 2-benzoyl-1-benzofuran derivatives as lead**

- compounds for the development adenosine A₁ and/or A_{2A} receptor antagonists, *Bioorganic Chemistry*, 2020, 94, 103459.**
85. O. Saku, M. Saki, M. Kurokawa, K. Ikeda, T. Takizawa, N. Uesaka, **Synthetic studies on selective adenosine A_{2A} receptor antagonists: Synthesis and structure–activity relationships of novel benzofuran derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20 (3), 1090-1093.**
86. O. Saku, M. Saki, M. Kurokawa, K. Ikeda, S. Uchida, T. Takizawa *et al.*, **Synthetic studies on selective adenosine A_{2A} receptor antagonists. Part II: Synthesis and structure–activity relationships of novel benzofuran derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20 (12), 3768-3771.**
87. S. Stotani, V. Gatta, F. Medda, M. Padmanaban, A. Karawajczyk, P. Tammela *et al.*, **A Versatile Strategy for the Synthesis of 4,5-Dihydroxy-2,3-Pentanedione (DPD) and Related Compounds as Potential Modulators of Bacterial Quorum Sensing, *Molecules*, 2018, 23 (10), 2545.**
88. R. Milcent, **Chimie organique: Stéréochimie, entités réactives et réactions, *EDP Sciences*, 2012, 828.**
89. C. A. James, P. DeRoy, M. Duplessis, P. J. Edwards, T. Halmos, J. Minville *et al.*, **Nucleotide competing reverse transcriptase inhibitors: Discovery of a series of non-basic benzofurano[3,2-d]pyrimidin-2-one derived inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23 (9), 2781-2786.**
90. M. A. Walker, T. Johnson, Z. Ma, Y. Zhang, J. Banville, R. Remillard *et al.*, **Exploration of the diketoacid integrase inhibitor chemotype leading to the discovery of the anilide-ketoacids chemotype, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16 (22), 5818-5821.**
91. F. H. Jung, G. Pasquet, C. Lambert-van der Brempt, J-JM. Lohmann, N. Warin, F. Renaud *et al.*, **Discovery of Novel and Potent Thiazoloquinazolines as Selective Aurora A and B Kinase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49 (3), 955-970.**
92. Y. Jin, D. B. Khadka, S. H. Yang, C. Zhao, W-J. Cho, **Synthesis of novel 5-oxaprotoberberines as bioisosteres of protoberberines, *Tetrahedron Letters*, 2014, 55 (7), 1366-1369.**

93. A. R. Sardarian, Z. Shahsavari-Fard, H. R. Shahsavari, Z. Ebrahimi, **Efficient Beckmann rearrangement and dehydration of oximes via phosphonate intermediates**, *Tetrahedron Letters.*, **2007**, *48* (14), 2639-2643.
94. L. De Luca, G. Giacomelli, A. Porcheddu, **Beckmann Rearrangement of Oximes under Very Mild Conditions**, *Journal of Organic Chemistry*, **2002**, *67* (17), 6272-6274.
95. J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, **Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals**, *Organic Process Research & Development*, **2016**, *20* (2), 140-177.
96. W. J. Hoekstra, H. S. Patel, X. Liang, J-BE. Blanc, D. O. Heyer, T. M. Willson *et al.*, **Discovery of Novel Quinoline-Based Estrogen Receptor Ligands Using Peptide Interaction Profiling**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *48* (6), 2243-2247.
97. E. Marsault, H. R. Hoveyda, M. L. Peterson, C. Saint-Louis, A. Landry, M. Vézina *et al.*, **Discovery of a New Class of Macrocyclic Antagonists to the Human Motilin Receptor**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, *49* (24), 7190-7197.
98. J. Han, S. J. Kaspersen, S. Nervik, K. G. Nørsett, E. Sundby, B. H. Hoff, **Chiral 6-aryl-furo[2,3-d]pyrimidin-4-amines as EGFR inhibitors**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *119*, 278-299.
99. J. Li, K. Subramaniam, D. Smith, J. X. Qiao, J. J. Li, J. Qian-Cutrone *et al.*, **AlMe₃ - Promoted Formation of Amides from Acids and Amines**, *Organic Letters*, **2012**, *14* (1), 214-217.
100. M. Caterina Viscomi, A. Liguori, F. Perri, A. Le Pera, M. Luisa Di Gioia, A. Leggio, **Reduction of N-Methoxy-N-Methylamides to the Corresponding Amines with AlCl₃/LiAlH₄**, *Letters in Organic Chemistry*, **2006**, *3* (6), 468-469.
101. S. P. Runyon, S. Peddi, J. E. Savage, B. L. Roth, R. A. Glennon, R. B. Westkaemper, **Geometry-Affinity Relationships of the Selective Serotonin Receptor Ligand 9-(Aminomethyl)-9,10-dihydroanthracene**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, *45* (8), 1656-1664.
102. M. Kahraman, S. P. Govek, J. Y. Nagasawa, A. Lai, C. Bonnefous, K. Douglas *et al.*, **Maximizing ER- α Degradation Maximizes Activity in a Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Model: Identification of GDC-0927**, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2019**, *10* (1), 50-55.

103. E. Verner, B. A. Katz, J. R. Spencer, D. Allen, J. Hataye, W. Hruzewicz *et al.*, **Development of Serine Protease Inhibitors Displaying a Multicentered Short (<2.3 Å) Hydrogen Bond Binding Mode: Inhibitors of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Factor Xa**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, 44 (17), 2753-2771.
104. H. Anwar, **The MgCl₂-Et₃N Base System: A Useful Reagent in Organic Synthesis**, *Synlett*, **2009**, 2009 (16), 2711-2712.
105. K. P. Bryliakov, E. P. Talsi, **Catalytic Enantioselective Oxidation of Bulky Alkyl Aryl Thioethers with H₂O₂ over Titanium-Salan Catalysts**, *European Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 2011 (24), 4693-4698.
106. An Introduction to Medicinal Chemistry - Paperback - Graham Patrick - Oxford University Press [Internet] Disponible sur: <https://global.oup.com/ukhe/product/an-introduction-to-medicinal-chemistry-9780198749691?cc=gb&lang=en> (consulté le 02.06.2020).
107. F. Samrin, A. Sharma, I. A. Khan, S. Puri, **Synthesis and Antibacterial Activity of New Diaryldiamines: Synthesis and Antibacterial Activity of New Diaryldiamines**, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2012**, 49 (6), 1391-1397.
108. M. L. de Barbosa, L. M. Lima, R. Tesch, C. M. R. Sant'Anna, F. Totzke, M. H. G. Kubbutat *et al.*, **Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 71, 1-14.
109. R. A. Smits, H. D. Lim, T. van der Meer, S. Kuhne, K. Bessembinder, O. P. Zuiderveld *et al.*, **Ligand based design of novel histamine H₄ receptor antagonists; fragment optimization and analysis of binding kinetics**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, 22 (1), 461-467.
110. E. Yoo, D. B. Salunke, D. Sil, X. Guo, A. C. D. Salyer, A. R. Hermanson *et al.*, **Determinants of Activity at Human Toll-like Receptors 7 and 8: Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) of Diverse Heterocyclic Scaffolds**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57 (19), 7955-7970.
111. K. S. Van Horn, X. Zhu, T. Pandharkar, S. Yang, B. Vesely, M. Vanaerschot *et al.*, **Antileishmanial Activity of a Series of N², N⁴ - Disubstituted Quinazoline-2,4-diamines**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57 (12), 5141-5156.
112. Lewis R. A., **Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 16th Edition**, John Wiley & Sons, **2016**, p1562.

113. Z. Zhang, J. Xie, H. Wang, B. Shen, J. Zhang, J. Hao *et al.*, **Synthesis, photophysical and optoelectronic properties of quinazoline-centered dyes and their applications in organic light-emitting diodes**, *Dyes and Pigments*, **2016**, *125*, 299-308.
114. Z. Wang, H. Wang, B. Shen, Z. Zhang, X. Zhao, H. Wang, **Quinazoline derivative, preparation method and application thereof** - CN106883187.
115. L. Y. Ukhin, G. I. Orlova, S. V. Lindeman, V. N. Khrustalyov, Yu T. Struchkov Yu, A. I. Prokofev, **Synthesis and properties of 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5-nitroindazole**, *Russian Chemical Bulletin*, **1994**, *43* (6), 1034-1036.
116. A. Von Vladimir, **Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations**, **2014**, *40a*, p953.
117. L.A. Peterson, **Reactive Metabolites in the Biotransformation of Molecules Containing a Furan Ring**, *Chemical Research in Toxicology*, **2013**, *26* (1), 6-25.
118. O. N. Volzhina, V. A. Azimov, B. A. Medvedev, A. A. Kazakov, G. P. Zhikhareva, V. A. Bondarenko *et al.*, **Synthesis and pharmacological study of prazosin**, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **1987**, *21* (7), 478-483.
119. A. Berndt, M. Gruner, A. Schmidt, H-J. Knölker, **Transition Metals in Organic Synthesis, Part 111: First Total Synthesis and Structural Revision of Antipathine A.**, *Synlett*, **2013**, *24* (16), 2102-2106.
120. T. Iwaki, Y. Nakamura, T. Tanaka, Y. Ogawa, O. Iwamoto, Y. Okamura *et al.*, **Discovery and SAR of a novel series of Natriuretic Peptide Receptor-A (NPR-A) agonists**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017**, *27* (21), 4904-4907.
121. E. Perspicace, S. Marchais-Oberwinkler, R. Hartmann, **Synthesis and Biological Evaluation of Thieno[3,2-d]- pyrimidinones, Thieno[3,2-d]pyrimidines and Quinazolinones: Conformationally Restricted 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (17 β -HSD2) Inhibitors**, *Molecules*, **2013**, *18* (4), 4487-4509.
122. S. Ravez, **Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'hétérocycles azotés à visée anticancéreuse**, Thèse de Doctorat - Université de Lille, **2014**.
123. H-L. Wang, K. L. Andrews, S. K. Booker, J. Canon, V. J. Cee, F. Chavez *et al.*, **Discovery of (R)-8-(6-Methyl-4-oxo-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-b]pyrrol-2-yl)-3-(1-methylcyclopropyl)-2-((1-methylcyclopropyl)amino)quinazolin-4(3H)-one, a Potent and Selective Pim-1/2 Kinase Inhibitor for Hematological Malignancies**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, *62* (3), 1523-40.

124. J. R. Abbott, P. A. Patel, J. E. Howes, D. T. Akan, J. P. Kennedy, M. C. Burns *et al.*, **Discovery of Quinazolines That Activate SOS1-Mediated Nucleotide Exchange on RAS**, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2018**, *9* (9), 941-946.
125. M. Okano, J. Mito, Y. Maruyama, H. Masuda, T. Niwa, S. Nakagawa *et al.*, **Discovery and structure–activity relationships of 4-aminoquinazoline derivatives, a novel class of opioid receptor like-1 (ORL1) antagonists**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17* (1), 119-132.
126. M. Benchekroun, **Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer**, Thèse de Doctorat - Université de Besançon, **2014**.
127. O. Benek, J. Korabecny, O. Soukup, **A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease**, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2020**, *41* (7), 434-445.
128. E. Tönnies, E. Trushina, **Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease**, *Journal of Alzheimer's Disease*, **2017**, *57* (4), 1105-1121.
129. A. Cavalli, M. L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini *et al.*, **Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51* (3), 347-372.
130. E. Demchuk, B. Yucesoy, V. J. Johnson, M. Andrew, A. Weston, D. R. Germolec *et al.*, **A Statistical Model for Assessing Genetic Susceptibility as a Risk Factor in Multifactorial Diseases: Lessons from Occupational Asthma**, *Environmental Health Perspectives*, **2007**, *115* (2), 231-234.
131. A. Petrelli, G. Valabrega, **Multitarget drugs: the present and the future of cancer therapy**, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2009**, *10* (4), 589-600.
132. D. Chen, X. Liu, Y. Yang, H. Yang, P. Lu, **Systematic synergy modeling: understanding drug synergy from a systems biology perspective**, *BMC Systems Biology*, **2015**, *9* (1), 56.
133. R. R. Ramsay, M. R. Popovic-Nikolic, K. Nikolic, E. Uliassi, M. L. Bolognesi, **A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases**, *Clinical and Translational Medicine*, **2018**.
134. A. Talevi, **Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective**, *Frontiers in Pharmacology*, **2015**.

135. X. H. Ma, Z. Shi, C. Tan, Y. Jiang, M. L. Go, B. C. Low *et al*, **In-Silico Approaches to Multi-target Drug Discovery: Computer Aided Multi-target Drug Design, Multi-target Virtual Screening**, *Pharmaceutical Research*, **2010**, 27 (5), 739-749.
136. C. Rochais, C. Lecoutey, F. Gaven, P. Giannoni, K. Hamidouche, D. Hedou D *et al.*, **Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, 58 (7), 3172-3187.
137. M. G. Katselou, A.N. Matralis, A. P. Kourounakis, **Multi-Target Drug Design Approaches for Multifactorial Diseases: From Neurodegenerative to Cardiovascular Applications**, *Current medicinal chemistry*, **2014**, 21 (24), 2743-2787.
138. A. M. Cesura, **Monoamine Oxidases**, *The Comprehensive Pharmacology Reference*, **2007**, 1-5.
139. C. R. Martin, V. R. Preedy, **Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases**, *Academic Press*, **2020**, 438.
140. N. Handler, **Drug Selectivity: An Evolving Concept in Medicinal Chemistry**, John Wiley & Sons, 2018, p538.
141. Ladostigil | ALZFORUM [Internet]
Disponible sur: <https://www.alzforum.org/therapeutics/ladostigil> (consulté le 10.07.2020).
142. L. S. Schneider, Y. Geffen, J. Rabinowitz, R. G. Thomas, R. Schmidt, S. Ropele *et al.*, **Low-dose ladostigil for mild cognitive impairment: A phase 2 placebo-controlled clinical trial**, *Neurology*, **2019**, 93 (15), e1474.
143. M. L. Bolognesi, A. Cavalli, C. Melchiorre, **Memoquin: A multi-target-directed ligand as an innovative therapeutic opportunity for Alzheimer's disease**, *Neurotherapeutics*, **2009**, 6 (1), 152-162.
144. K. Simone Tranches Dias, C. Viegas, **Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer's Disease**, *Current Neuropharmacology*, **2014**, 12 (3), 239-255.
145. P. Zhang, S. Xu, Z. Zhu, J. Xu, **Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, 176, 228-247.

146. M. Flajolet, H. Wang, P. Greengard, **mGluR₅ : un récepteur à la croisée des chemins thérapeutiques ?**, *Medical Sciences*, **2010**, 26 (8-9), 678-680.
147. Société française de pharmacologie et de thérapeutique, Collège national pharmacologie médicale, **Neuropsychopharmacologie**, Elsevier Masson, **2019**, p299.
148. E. E. Benarroch, **Metabotropic glutamate receptors: Synaptic modulators and therapeutic targets for neurologic disease**, *Neurology*, **2008**, 70 (12), 964-968.
149. S. Célanire, G. Duvey, S. Poli, J-P. Rocher, **mGluR₂ Activators and mGluR₅ Blockers Advancing in the Clinic for Major CNS Disorders**, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **2012**, 71-88.
150. V. Bruno, I. Ksiazek, G. Battaglia, S. Lukic, T. Leonhardt, D. Sauer *et al.*, **Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective**, *Neuropharmacology*, **2000**, 39 (12), 2223-2230.
151. J. W. Um, A. C. Kaufman, M. Kostylev, J. K. Heiss, M. Stagi, H. Takahashi *et al.*, **Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Coreceptor for Alzheimer A β Oligomer Bound to Cellular Prion Protein**, *Neuron*, **2013**, 79 (5), 887-902.
152. C. R. Overk, A. Cartier, G. Shaked, E. Rockenstein, K. Ubhi, B. Spencer *et al.*, **Hippocampal neuronal cells that accumulate α -synuclein fragments are more vulnerable to A β oligomer toxicity via mGluR₅ - implications for dementia with Lewy bodies**, *Molecular Neurodegeneration*, **2014**, 9 (1), 18.
153. A. Hamilton, M. Vasefi, C. Vander Tuin, R. J. McQuaid, H. Anisman, S. S. G. Ferguson, **Chronic Pharmacological mGluR₅ Inhibition Prevents Cognitive Impairment and Reduces Pathogenesis in an Alzheimer Disease Mouse Model**, *Cell Reports*, **2016**, 15 (9), 1859-1865.
154. M. Arif, S. F. Kazim, I. Grundke-Iqbal, R. M. Garruto, K. Iqbal *et al.*, **Tau pathology involves protein phosphatase 2A in Parkinsonism-dementia of Guam**, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2014**, 111 (3), 1144-1149.
155. S. Ferre, M. Karcz-Kubicha, B. T. Hope, P. Popoli, J. Burgueno, M. A. Gutierrez *et al.*, **Synergistic interaction between adenosine A_{2A} and glutamate mGlu₅ receptors: Implications for striatal neuronal function**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2002**, 99 (18), 11940-11945.
156. J. A. Christopher, S. J. Aves, K. A. Bennett, A. S. Doré, J. C. Errey, A. Jazayeri *et al.*, **Fragment and Structure-Based Drug Discovery for a Class C GPCR: Discovery of the**

- mGlu₅ Negative Allosteric Modulator HTL14242 (3-Chloro-5-[6-(5-fluoropyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzonitrile)**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *58* (16), 6653-6664.
157. K. A. Emmitte, **mGlu₅ negative allosteric modulators: a patent review (2013 - 2016)**, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2017**, *27* (6), 691-706.
158. X. Li, H. Wang, Z. Lu, X. Zheng, W. Ni, J. Zhu *et al.*, **Development of Multifunctional Pyrimidinylthiourea Derivatives as Potential Anti-Alzheimer Agents**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *59* (18), 8326-8344.
159. Z-H. Peng, M. Journet, G. Humphrey, **A Highly Regioselective Amination of 6-Aryl-2,4-dichloropyrimidine**, *Organic Letters*, **2006**, *8* (3), 395-398.
160. D. Bebbington, H. Binch, J-D. Charrier, S. Everitt, D. Fraysse, J. Golec *et al.*, **The discovery of the potent aurora inhibitor MK-0457 (VX-680)**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19* (13), 3586-3592.
161. P. Chen, X. Song, Y. Fan, W. Kong, H. Zhang, R. Sun, **Investigation of Novel Pesticides with Insecticidal and Antifungal Activities: Design, Synthesis and SAR Studies of Benzoylpyrimidinylurea Derivatives**, *Molecules*, **2018**, *23* (9), 2203.
162. B. Sun, P. Bachhawat, ML-H. Chu, M. Wood, T. Ceska, Z. A. Sands *et al.*, **Crystal structure of the adenosine A_{2A} receptor bound to an antagonist reveals a potential allosteric pocket**, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2017**, *114* (8), 2066-2071.
163. H. Motulsky, R. Neubig, **Analyzing Radioligand Binding Data**, *Current Protocols in Neuroscience*, **2002**.
164. A. Bellelli, J. Carey, **Reversible Ligand Binding: Theory and Experiment**, John Wiley & Sons, **2018**, p309.
165. C. G. Wermuth, **The practice of medicinal chemistry**, *Academic Press*, **2015**, 880.
166. E. C. Hulme, M. A. Trevethick, **Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation: Equilibrium binding assays**, *British Journal of Pharmacology*, **2010**, *161* (6), 1219-1237.
167. J. J. Maguire, R. E. Kuc, A. P. Davenport, **Radioligand Binding Assays and Their Analysis**, *Receptor Binding Techniques*, **2012**, *897*, 31-77.
168. T. Kenakin, **The mass action equation in pharmacology: Mass action applied to pharmacology**, *British Journal of Clinical Pharmacology*, **2016**, *81* (1), 41-51.

169. M. Falsini, C. Ceni, D. Catarzi, F. Varano, D. Dal Ben, G. Marucci *et al.*, **New 8-amino-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyrazin-3-one derivatives. Evaluation of different moieties on the 6-aryl ring to obtain potent and selective human A_{2A} adenosine receptor antagonists**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2020**, 127-126.
170. R. Duroux, N. Renault, J. E. Cuelho, L. Agouridas, D. Blum, L. V. Lopes *et al.*, **Design, synthesis and evaluation of 2-aryl benzoxazoles as promising hit for the A_{2A} receptor**, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2017**, 32 (1), 850-864.
171. D. Graziani, S. Caligari, E. Callegari, C. De Toma, M. Longhi, F. Frigerio *et al.*, **Evaluation of Amides, Carbamates, Sulfonamides, and Ureas of 4-Prop-2-ynylidenecycloalkylamine as Potent, Selective, and Bioavailable Negative Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptor 5**, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, 62 (3), 1246-1273.
172. A. Anighoro, D. Graziani, I. Bettinelli, A. Cilia, C. De Toma, M. Longhi *et al.*, **Insights into the interaction of negative allosteric modulators with the metabotropic glutamate receptor 5: Discovery and computational modeling of a new series of ligands with nanomolar affinity**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, 23 (13), 3040-3058.
173. C. A. Flanagan, **GPCR-radioligand binding assays**, *Methods in Cell Biology*, **2016**, 191-215.
174. D. Peričić, M. Jazvinščak Jembrek, D. Švob Štrac, I. R. Lazić J, Špoljarić, **Enhancement of benzodiazepine binding sites following chronic treatment with flumazenil**, *European Journal of Pharmacology*, **2005**, 507 (1-3), 7-13.
175. R. Boulahjar, A. Rincon Arias, R. Bolteau, N. Renault, M. Coevoet, A. Barczyk *et al.*, **Design and synthesis of 2,6-disubstituted-8-amino imidazo[1,2a]pyridines, a promising privileged structure**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2018**, 26 (12), 3296-3307.
176. J. Linden, T. Thai, H. Figler, X. Jin, A. S. Robeva, **Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells**, *Molecular Pharmacology*, **1999**, 56 (4), 705-713.
177. C. A. Flanagan, V. Rodic, K. Konvicka, T. Yuen, L. Chi, J. E. Rivier *et al.*, **Multiple Interactions of the Asp(2.61(98)) Side Chain of the Gonadotropin-Releasing Hormone**

- Receptor Contribute Differentially to Ligand Interaction**, *Biochemistry*, **2000**, 39 (28), 8133-8141.
178. D. B. Bylund, M. L. Toews, **Radioligand binding methods: practical guide and tips**, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **1993**, 265 (5), L421-429.
179. S. J. Bradley, C. J. Langmead, J. M. Watson, R. A. J. Challiss, **Quantitative Analysis Reveals Multiple Mechanisms of Allosteric Modulation of the mGlu₅ Receptor in Rat Astroglia**, *Molecular Pharmacology*, **2011**, 79 (5), 874-885.
180. B. S. Fulton, **Drug Discovery for the Treatment of Addiction: Medicinal Chemistry Strategies**, John Wiley & Sons, **2014**, p358.

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'antagonistes des récepteurs A_{2A} et de ligands duaux ciblant les récepteurs A_{2A} et mGlu₅

Ces cinquante dernières années ont été marquées par la percée des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. À ce jour, il existe uniquement des traitements symptomatiques. De plus, face à cette maladie multifactorielle, il apparaît donc nécessaire d'identifier et d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi elles, le récepteur à l'adénosine A_{2A} (A_{2A}R) a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. En effet, ses antagonistes tels que la caféine ont montré de nombreux effets bénéfiques en permettant d'améliorer les performances cognitives par une diminution des dépôts amyloïdes et de la phosphorylation de la protéine Tau. Bien que plusieurs antagonistes d'A_{2A}R aient atteint les phases cliniques, les efforts actuels sont maintenant dirigés vers le développement de nouveaux antagonistes avec de meilleures propriétés ADME. D'autre part, le récepteur métabotrope au glutamate 5 (mGluR₅) et ses modulateurs allostériques négatifs jouent un rôle important dans les conditions physiopathologiques associées à la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été montré que bloquer l'activité d'mGluR₅ entraîne une diminution de la neurotoxicité et de la synaptotoxicité du peptide amyloïde in vitro mais aussi in vivo. Basées sur des études de modélisation moléculaire, nous avons développé deux nouvelles familles d'antagonistes présentant un hétérocycle central quinazolinique et benzofuranique. Par la suite, nous avons mis en place une stratégie de ligands duaux ciblant de manière conjointe les récepteurs A_{2A} et mGlu₅. Les relations structure-affinité autour de ces deux hétérocycles nous ont permis d'identifier des composés d'affinité nanomolaire pour le récepteur A_{2A}. Les travaux ont également conduit à l'obtention d'une nouvelle structure co-cristallisée. Parmi les composés développés, certains présentent une affinité micromolaire pour le récepteur mGlu₅.

Design, synthesis and pharmacological evaluation of A_{2A} receptor antagonists and dual ligands targeting A_{2A} and mGlu₅ receptors

The past fifty years have been marked by the breakthrough of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. Unfortunately, only symptomatic treatments are available. Furthermore, facing this multifactorial disease, the search for new and innovative therapeutic targets becomes a major challenge. Among these targets, the adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) has been the subject of much research in recent years. Indeed, it has been shown that A_{2A}R antagonists such as caffeine improve memory performance as it reduces β -amyloid deposits and Tau-phosphorylation. Though several A_{2A}R antagonists have reached clinical trials, current research efforts are focused on developing new antagonists with relevant ADME properties. On the other hand, negative allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR₅) also play an important role in the pathological conditions associated with Alzheimer's disease. It has been found that blocking the activity of mGlu₅ reduces the neurotoxicity and synaptotoxicity of the amyloid peptide in vitro but also in vivo. Based on a molecular modeling-guided design, we developed new A_{2A}R antagonists with quinazoline and benzofuran as central scaffold and a dual ligands strategy targeting both A_{2A} and mGlu₅ receptors. Hit-to-lead optimization has led to nanomolar affinity compounds for A_{2A}R and a new co-crystallized structure. Among them, some hit compounds have been identified with micromolar affinities towards mGlu₅.