The 6 000 663

50376
1999
219

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline : Chimie Organique et Macromoléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Rébecca POULAIN

Le 30 septembre 1999

UTILISATION DE LA CHIMIE COMBINATOIRE POUR LA DECOUVERTE ET L'OPTIMISATION DE TETES DE SERIE PHARMACEUTIQUE.

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. LILLE
BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE

Pr. Jean LEVY	Rapporteur
Pr. Bernard ROQUES	Rapporteur
Pr. Christian SERGHERAERT	Directeur de thèse
Pr. André TARTAR	Examinateur
Dr. Frédéric REVAH	Examinateur
Pr. Francis WALLART	Examinateur

A mes parents, merci de m'avoir permis de faire ces études passionnantes,
et de m'avoir donné l'opportunité de partir un an aux Etats-Unis.
Merci de m'avoir encouragée dans la voie de la recherche
et de m'avoir fait confiance.

A Catherine, merci d'avoir été présente pendant toutes ces années et
d'avoir su partager l'appartement avec moi.

A Myriam.

REMERCIEMENTS

La première partie de ce travail a été réalisée au Service de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille, URA CNRS 1309, dirigé par le Professeur André Tartar. La seconde partie a été réalisée au sein du laboratoire de chimie de la société CEREP dirigé par Benoît Déprez.

Il a été réalisé grâce dans un premier temps à une Bourse de Docteur-Ingénieur offerte par le CNRS, puis grâce au financement de la société CEREP dont je remercie la Direction en la personne de Thierry Jean.

Monsieur le Professeur André Tartar, je vous remercie de m'avoir accueillie, encadrée, encouragée. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet.

Monsieur le Professeur Bernard Roques, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Professeur Jean Lévy, je suis sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ces travaux en acceptant d'en être rapporteur.

Monsieur le Professeur Christian Sergheraert, je vous remercie de bien vouloir juger ces travaux.

Monsieur Frédéric Revah, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Monsieur le Professeur Francis Wallart, je vous remercie d'avoir accepté de juger ces travaux.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Benoît Déprez** qui m'a suivie pendant ces trois années de thèse. *J'ai beaucoup apprécié ton soutien et tes précieux conseils, ton dynamisme, ton efficacité et tes idées. J'ai énormément appris en travaillant avec toi. Je te suis très reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée.*

Je remercie chaleureusement **Romuald Baudelle** avec qui j'ai partagé la condition de thésard pendant près de trois ans, et accessoirement un bureau ! *Les nombreuses discussions que nous avons eues étaient toujours très plaisantes et enrichissantes. Je me souviendrai longtemps des « manips pirates » et de la « manip du siècle » !*

Je tiens à adresser toute ma sympathie à **Dragos Horvath**. *Je te remercie pour le travail de modélisation qui a permis de faire avancer le Proof of Concept.* Je remercie **Isabelle Mouly-Daffix** et **Iuliana Pop-Botez** pour leur amitié et les discussions agréables que nous avons eues au sujet de la gestion de projet, du HTS et des activateurs pour la synthèse d'amides ! *J'ai toujours admiré votre efficacité discrète.* Merci également à **Xavier Williard**.

Merci aux personnes **de CEREP Poitiers** pour les expériences de biologie : **Gervais Néliat, Béatrice Chapelain, Valérie Hamon.** Un grand merci en particulier à **Delphine Tassan** : *je te remercie d'avoir toujours été disponible pour les questions cruciales de planning et d'avoir si bien géré la communication des résultats.*

Merci aux personnes de **CEREP Inc.** : **Marie-Christine Bodinier, Christian Eckoff, Peter Bullock**...

Merci également aux personnes de **CEREP Paris**.

Un très, très grand merci à l'équipe de synthèse de monomères de **Béatrice Bonnet : Pierre Georges, Frédéric Dezitter, David Hamelin**. *Vous avez tous à un moment ou à un autre donné toute votre énergie à la synthèse urgente de monomères. Le Proof of Concept vous doit beaucoup et moi aussi ! ! Merci tout particulièrement à Béatrice. J'ai apprécié ta disponibilité et ta sensibilité. Tu as toujours été prête à répondre à mes interrogations en chimie, même les plus bêtes.*

Je souhaite exprimer ma très sincère reconnaissance aux roboticiens **Luc Bael et Guillaume Guesquière** avec qui j'ai partagé les bons moments (bien qu'un peu stressants parfois) que sont les productions de chimiothèques. *Merci tout particulièrement à Guillaume. Ta bonne humeur dans le travail est très agréable et tes connaissances techniques impressionnantes.*

Je remercie chaleureusement **Marie-Isabelle Parent** et **Carole Desruelle** pour leur amitié et les moments de confidence. *Vous m'avez soutenue dès mon arrivée, merci.*

Je souhaite remercier **Valérie Dureux-Thorel** pour les resynthèses de la chimiothèque primaire. Egalement,un grand merci à **Corinne Jarousseau** pour les expériences d'HTS. *A toutes les deux merci pour les bons moments passés ensemble et les confidences échangées.*

Merci également à **Gérard Montagne** pour l'acquisition des nombreux spectres RMN, toujours dans l'urgence.

Je n'oublie pas les autres membres de l'équipe de **CEREP à Lille** : **Valérie, Christophe, Kathy, Brian, Patricia, Catherine, Maxime, Véronique** (merci pour toutes les commandes de publications), et à ceux qui n'ont fait que passer : **Stéphanie, Frédéric, John, Nathalie, Fabrice, Christelle, Manu, Grégory,** ...

Merci à tout l'ensemble de **l'URA 1309**, en particulier **Christophe Boutillon, Sandrine Vendeville, Annick Lemaire, Valérie Landry, Hervé Drobecq,**...

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance au **Docteur Ruth Reed** qui m'a fait découvrir et aimer la recherche. Un grand merci à **Madame Prime** grâce à qui j'ai pu effectuer deux stages très enrichissants chez Rhône-Poulenc Rorer. Merci également au **Docteur Dominique Barbelat-Damour** qui m'a encadrée durant mon stage de recherche et qui a été la première à me parler de chimie combinatoire. *Vous êtes toutes les trois à l'origine de ma décision de faire une thèse.*

Je souhaite terminer en remerciant mes proches : mes parents, Catherine, Myriam, Christophe (et toute la petite famille), Joëlle et Jean-Marie, Anne-Marie et Francis, Bénédicte, Valerie,... Merci à tous profondément de votre soutien, de votre amour et de votre amitié.

TRAVAUX ET PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

Publication Générale :

« Premier Symposium français sur la chimie combinatoire, Rennes, 29-30 octobre 1996 », Romuald Baudelle, Line Bourel, Rébecca Poulain, Sandrine Vendeville, André Tartar, L'Act. Chim. (H) 1997, 1, 13-19.

Publication Scientifique :
2 publications en cours de rédaction.

COMMUNICATIONS PAR POSTER

« Etude critique des résultats du criblage d'une chimiothèque combinatoire sur un récepteur 7TM », Journée des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Rébecca Poulain, Béatrice Chapelain, André Tartar, Paris 16 janvier 1998.

COMMUNICATIONS ORALES

« Pharmacologie in-vitro et synthèse automatisées : découverte et optimisation rapide de ligands du récepteur aux opiacés de type μ », Journée des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Rébecca Poulain, Xavier Williard, Dragos Horvath, Benoît Déprez, Paris 15 janvier 1999.

« Utilisation de la synthèse parallèle, du criblage et de la pharmacologie à hauts débits pour la découverte et l'optimisation de nouvelles têtes de série pharmaceutique. », XXXVèmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Rébecca Poulain, Xavier Williard, Dragos Horvath, Benoît Déprez, Rouen, 7-9 juillet 1999.

UTILISATION DE LA CHIMIE COMBINATOIRE POUR LA DECOUVERTE ET L'OPTIMISATION DE TETES DE SERIE PHARMACEUTIQUE

Dédicace. 1
Remerciements. 2
Communications orales ou écrites. 6
Sommaire. 7
Introduction. 12
CHAPITRE 1 CRIBLAGE A HAUT DEBIT, CHIMIE COMBINATOIRE, MODELISATION MOLECULAIRE : LES NOUVEAUX OUTILS DE LA DECOUVERTE DE MEDICAMENTS. 13
1.I LE CRIBLAGE A HAUT DEBIT. 13
1.I.1 Principe et avantages du criblage systématique. 13
1.I.2 Les composés qui alimentent le criblage systématique. 14
1.II LA CHIMIE COMBINATOIRE. 15
1.II.1 Principe de la chimie combinatoire. 15
1.II.2 Application des chimiothèques combinatoires à la découverte de médicaments. 16
1.III IDENTIFICATION D'UNE MOLECULE ACTIVE AU SEIN D'UNE CHIMIOTHEQUE COMBINATOIRE. 16
1.III.1 Principes généraux. 16
1.III.1.1 Etiquetage moléculaire ou « molecular tagging ». 17
1.III.1.2 Les méthodes de déconvolution. 18
1.III.1.3 Evolution vers la synthèse en parallèle. 19
1.IV L'INTERACTION LIGAND-RECEPTEUR ET LA NOTION DE PHARMACOPHORE. 21
1.IV.1 Les forces en jeu dans l'interaction ligand récepteur. 21
1.IV.1.1 Les interactions électrostatiques. 21
1.IV.1.2 Les forces de répulsion. 22
1.IV.2 La notion de pharmacophore. 22
1.IV.3 Les descripteurs utilisés. 23
Bibliographie du Chapitre 1. 24
CHAPITRE 2 ROLES DES TENSEURS DANS LA CONCEPTION ET LA SYNTHESE DE CHIMIOTHEQUES. 25
2.I LA NOTION DE TENSEUR. 25
2.I.1 Le tenseur du point de vue structural et biologique. 25
2.I.1.1 Définition. 25
2.I.1.2 Le rôle biologique du tenseur. 25
2.I.2 Approches chimiques de la conception de tenseurs. 30
2.I.2.1 Introduction 30
2.I.2.2 Utilisation de tenseurs pour générer la diversité. 33
2.I.2.3 Utilisation des tenseurs pour orienter dans l'espace les éléments de pharmacophore. 34

2.I.2.4 Utilisation des tenseurs pour la conception de chimiothèques focalisées destinées aux étapes d'optimisation. 36
2.I.2.5 Stratégies de synthèse des chimiothèques autour d'un tenseur pré-existant : « transformeur » et tenseur. 37
Bibliographie Chapitre 2.I 40
2.II CHIMIOTHÈQUES DE N,N'-BENZÈNEDISULFONAMIDES. 41
2.II.1 Introduction. 41
2.II.1.1 Intérêt des benzènedisulfonamides du point de vue de la synthèse chimique. 41
2.II.1.2 Intérêt des benzènedisulfonamides du point de vue biologique. 42
2.II.2 Chimiothèque de N,N'-1,3-benzènedisulfonamides. 43
2.II.2.1 Evaluation de la synthèse en solution de N,N'-1,3-benzènedisulfonamides. 43
2.II.2.2 Résultats expérimentaux de la synthèse en mélange des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides. 48
2.II.3 Chimiothèque de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides. 53
2.II.3.1 Etude de diversité comparative des chimiothèques de N,N'-1,3- et N,N'-1,2-benzènedisulfonamides. 53
2.II.3.2 Synthèse en mélange des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides: cas des amines primaires. 55
2.II.3.3 Synthèse en mélange des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides: cas des amines secondaires. 59
2.II.4 Extension des chimiothèques de N,N'-benzènedisulfonamides. 60
2.II.4.1 Nouveaux tenseurs "benzènedisulfochlorures". 60
2.II.4.2 Etude de la cyclisation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides. 60
Bibliographie du Chapitre 2.II. 63
2.III CHIMIOTHÈQUES DE 4-AMINO,3-NITRO-BENZYLAMIDES. 64
2.III.1 Introduction. 64
2.III.2 Conception d'une chimiothèque autour de la réaction de Substitution Nucléophile Aromatique. 64
2.III.2.1 Le mécanisme de la SNAr, les effets de groupes partants, les effets de groupes activateurs. 64
2.III.2.2 Rappel sur les conditions réactionnelles "classiques" pour une SNAr. 65
2.III.3 Mise au point des conditions expérimentales de la SNAr et comparaison des tenseurs. 67
2.III.3.1 Choix de l'ordre des réactions. 67
2.III.3.2 Expériences prémiminaires. 67
2.III.3.3 Mini-matrice pour l'étude de l'étendue d'application de la SNAr. 69
2.III.4 Sélection et validation des N-nucléophiles pour la SNAr. 71
2.III.5 Synthèse de la chimiothèque et Analyse du Contrôle Qualité. 73
2.III.5.1 Synthèse de la chimiothèque. 73
2.III.5.2 Résultats du contrôle qualité. 73
2.III.5.3 Synthèse d'une sélection représentative de la chimiothèque. 75

2.III.6 Extension de la chimiothèque. 78
2.III.6.1 Choix de la base et du solvant. 78
2.III.6.2 Chimiothèques basées sur des isomères du tenseur. 78
2.III.6.3 Extension des la SNAr aux thiols et aux phénols. 79
2.III.6.4 Synthèse de trimères. 79
2.III.6.5 Synthèses d'hétérocycles en phase solide. 80
2.III.6.6 Schéma récapitulatif des ouvertures possibles. 81
Bibliographie du Chapitre 2.III. 83
CHAPITRE 3 UTILISATION DE LA SYNTHÈSE ORGANIQUE EN PARALLÈLE, DU CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE À HAUT DÉBIT ET DE LA MODÉLISATION MOLÉCULAIRE POUR LA DÉCOUVERTE ET L'OPTIMISATION DE TÊTES DE SÉRIE PHARMACEUTIQUE. 84
3.I INTRODUCTION. 84
3.II LE CRIBLAGE PRIMAIRE 85
3.II.1 Introduction. 85
3.II.1.1 Mise en évidence de composés actifs lors d'un criblage biologique primaire HTS (High Troughput Screening). 85
3.II.1.2 Propriétés physico-chimiques des chimiothèques primaires. 88
3.II.2 La chimiothèque testée. 90
3.II.2.1 Les sous-librairies. 90
3.II.2.2 La diversité structurale et la flexibilité. 90
3.II.2.3 Les caractéristiques essentielles selon Lipinski. 91
3.II.3 Les résultats du criblage primaire sur les récepteurs μ opiacé et BZR. 92
3.II.3.1 Les récepteurs choisis. 92
3.II.3.2 Les pourcentages de produits actifs. 92
3.III DÉCOUVERTE ET OPTIMISATION DE LIGANDS DU RÉCEPTEUR BZR. 94
3.III.1 Les résultats du criblage primaire. 94
3.III.1.1 Resynthèse des produits actifs et caractérisation biologique. 94
3.III.1.2 Mise en évidence de phénomènes d'oxydation dans le DMF et/ou le DMSO. 97
3.III.2 Conception, Synthèse et criblage d'une chimiothèque focalisée basée sur le modèle tri-aromatique, sur le récepteur BZR. 99
3.III.2.1 Conception et synthèse de la chimiothèque. 99
3.III.2.2 Résultats du criblage biologique et des reconfirmations. 101
3.III.2.3 Identification de deux séries d'analogues actifs. 102
3.III.3 Conception et évaluation de la faisabilité chimique d'une chimiothèque focalisée basée sur des "amino-alcools" et active sur BZR. 104
3.III.3.1 Conception de la chimiothèque. 104
3.III.3.2 Choix de la stratégie chimique à utiliser. 106
3.III.4 Comparaison des structures trouvées avec celles de la litttérature. 109
3.III.4.1 Les classes de ligands connus. 109

3.III.4.2 Discussion et comparaison. 113
Bibliographie Chapitre 3.II. et 3.III. 115
3.IV DÉCOUVERTE DE TÊTES DE SÉRIE ET OPTIMISATION UTILISANT UNE PROCÉDURE INTÉGRÉE "CONCEPTION ET SÉLECTION" IMPLIQUANT LA MODÉLISATION MOLÉCULAIRE, LA SYNTHÈSE ORGANIQUE ET LE PROFIL PHARMACOLOGIQUE EFFECTUÉS À HAUT DÉBIT. 116
Etude de cas sur le récepteur μ opiacé.
3.IV.1 Choix de la stratégie. 116
3.IV.2 Méthodes de conception d'analogues et synthèse des analogues. 117
3.IV.2.1 Introduction. 117
3.IV.2.2 Analogues du produit spécifique (95). 118
3.IV.2.3 Analogues du produit non spécifique (96). 126
3.IV.3 Criblage biologique. 129
3.IV.4 Tables SAR (obtenues sur produits purifiés) et Modèle QSAR. 131
3.IV.4.1 Analogues du produit non spécifique (96). 131
3.IV.4.2 Analogues du produit spécifique (95). 133
3.IV.4.3 Modèle QSAR et activité des références commerciales. 143
3.IV.5 Profil pharmacologique. 148
3.IV.5.1 Comparaison profil pharmacophorique et profil pharmacologique. 148
3.IV.5.2 Etudes de relations structure_profil pharmacologique pour le produit non-spécifique (96) et ses analogues. 153
3.IV.5.3 Etudes de relations structure_profil pharmacologique pour le produit spécifique (95) et ses analogues. 156
3.IV.6 Conclusion. 158
Bibliographie Chapitre 3.III. 162
Conclusion. 164
PARTIE EXPÉRIMENTALE 165
MATÉRIEL ET MÉTHODES 165
E.1.I Matériels et méthodes d'analyse et d'identification structurale. 165
E.1.I.1.Spectrométrie de masse. 165
E.1.I.2 HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance). 165
E.1.I.3 LC/MS (Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse).
E.1.I.4 RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire). 166
E.1.I.5 Points de Fusion. 166
E.1.I.6 CCM (Chromatographie sur Couche Mince). 166
E.1.II Méthodes de purification. 166
E.1.III Méthodes biologiques. 167
E.1.III.1 IC_{50}, HTS, Profil Pharmacologique. 167
E.1.III.2 Profil Pharmaceutique 167
E.2 PARTIE EXPÉRIMENTALE DU CHAPITRE 2. 176
E.2.I Synthèse de disulfonamides. 176
E.2.I.1 Synthèse de N,N'-1,3-benzènedisulfonamides. 176
E.2.I.2 Synthèse de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides. 185
E.2.II Synthèse de 4-(N-substitués)-amino,3-nitro-benzylamides. 189

E.2.II.1 Synthèse des acides 4-(N-substitués)-amino-3-nitro-benzoïques. 189
E.2.II.2 Synthèse de 4-(N-substitués)-amino,3-nitro-benzylamides en micropalques à l'échelle 5 µmoles. 192
E.3 PARTIE EXPÉRIMENTALE DU CHAPITRE 3. 197
E.3.I Découverte et optimisation de ligands du récepteur BZR. 197
E.3.I.1 Résultats du criblage primaire. 197
E.3.I.2 Mise en évidence de phénomènes d'oxydation dans le DMF et/ou le DMSO. 208
E.3.I.3 Conception, Synthèse et Criblage d'une chimiothèque focalisée basée sur le modèle tri-aromatique, sur le récepteur BZR. 209
E.3.I.4 Conception et évaluation de la faisabilité chimique d'une chimiothèque focalisée basée sur des "amino-alcools" et active sur BZR. 210
E.3.II Découverte de têtes de série et optimisation en utilisant une procédure intégrée "conception et sélection" impliquant la modélisation moléculaire, la synthèse organique et le profil pharmacologique effectués à haut débit. 214
E.3.II.1 Synthèse des produits actifs issus du criblage primaire. 214
E.3.II.2 Synthèse de monomères utilisés dans la synthèse des analogues de *(95)*. 215
E.3.II.3 Synthèse de monomères utilisés dans la synthèse des analogues de *(96)*. 221
E.3.II.4 Synthèse d'analogues de *(96)*. 223
E.3.II.5 Synthèse d'analogues de *(95)*. 231
Annexe 1 : Méthodes d'identification d'une molécule active au sein d'une chimiothèque combinatoire. 254
Annexe 2 : Exemples de FBPA. 263
Annexe 3 : Profil Pharmacologique (% d'inhibition). 264
Annexe 4 : Profil Pharmacologique (IC_{50}). 265
Abréviations_Glossaire. 266
Résumé. 270

- Introduction-

En l'espace de quelques années, le criblage à haut débit est devenu une étape incontournable du processus de découverte de nouveaux médicaments. Nous chercherons dans un premier temps à montrer comment la chimie combinatoire est une conséquence logique de cette évolution. Egalement, nous montrerons l'importance de la notion de pharmacophore dans la recherche de nouveaux médicaments. Dans un second temps, nous évoquerons une partie de nos travaux qui ont principalement concerné la conception et la synthèse de deux chimiothèques combinatoires généralistes basées sur le concept de « tenseur ». En dernier lieu, nous présenterons notre travail basé sur l'utilisation de la synthèse en parallèle, du criblage pharmacologique à haut débit, de la modélisation moléculaire pour la découverte et l'optimisation de têtes de série du récepteur aux benzodiazépines et du récepteur aux opiacés de type μ.

- Chapitre 1-

Criblage à haut débit, chimie combinatoire, modélisation moléculaire :les nouveaux outils de la découverte de médicaments.

CHAPITRE 1
CRIBLAGE A HAUT-DEBIT, CHIMIE COMBINATOIRE, MODELISATION MOLECULAIRE: LES NOUVEAUX OUTILS DE LA DECOUVERTE DE MEDICAMENTS.

1.I. LE CRIBLAGE A HAUT DEBIT.

1.I.1. Principe et avantages du criblage systématique.

L'étape-clé dans la découverte d'un nouveau médicament est l'identification d'une molécule susceptible d'interférer avec un processus biologique normal ou pathologique. Cette molécule doit être capable de se lier de manière efficace et spécifique à la cible biologique (récepteur ou enzyme). La découverte d'une telle structure, protégée par des brevets constitue donc une étape capitale dans le processus de mise sur le marché d'un médicament. Cette étape est longtemps resté un processus lent le plus souvent gouverné par le hasard et la chance. Pour tenter d'accélérer cette étape, des stratégies très différentes ont été élaborées. La stratégie actuellement privilégiée dans l'industrie pharmaceutique repose sur le criblage (screening) systématique de collections de produits chimiques différents, appelées pharmacothèques ou chimiothèques. Après avoir relié un phénomène physiopathologique à un couple ligand /récepteur, on met au point un test permettant de visualiser cette liaison. Dans le cas le plus simple, le récepteur est immobilisé sur un support solide et le ligand est modifié au moyen d'un marqueur qui le rend facilement identifiable. Si l'on ajoute à ce couple un composé susceptible de s'associer au récepteur en occupant la place du ligand, le déplacement du ligand marqué sera facilement détecté (Figure 1.I.1). En général, le composé identifié ne constitue pas le médicament final. Il s'agit d'un « lead » ou tête de série qui donne lieu à la synthèse d'analogues qui permettront d'optimiser son activité. L'identification d'une tête de série constitue donc une étape extrêmement importante.

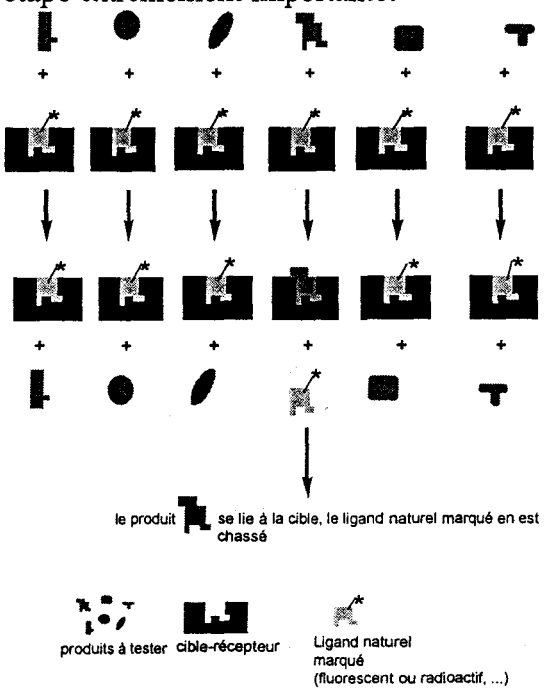


Figure 1.I.1 : Principe du criblage systématique.

Le processus de découverte de médicaments est long, coûteux et soumis à forte concurrence. Les compagnies tendent donc à vouloir réduire les délais de réalisation des

projets. Il est devenu crucial d'alimenter les tests de criblage le plus rapidement possible avec des collections de composés les plus divers et les plus nombreux. La chimie, étape limitante, a été contrainte à une profonde évolution afin d'accélérer ses processus, notamment lors de l'étape de découverte primaire. En effet, l'optimisation des têtes de série nécessaire avant le passage en toxicologie et clinique est une étape extrêmement laborieuse, et dont l'issue n'est jamais garantie. Le chimiste synthétise des composés qui sont ensuite évalués quant à leur biodisponibilité et leur différentes caractéristiques pharmacocinétiques et dynamiques (telles que la sélectivité, la puissance ou encore la toxicité). Il n'existe pas de modèles multiparamètres prédictifs fiables dans les disciplines au dessus et l'optimisation est bien souvent piégée dans un minimum local. Grâce au criblage systématique, de nombreux ligands, dont les optimisations se feront en parallèle, sont mis en évidence . Un autre avantage considérable du criblage systématique est que les composés identifiés sont les fruits d'une démarche purement empirique. Leur « brevetabilité » est renforcée puisque leur activité n'était pas prévisible.

Etant donné les succès rencontrés avec cette approche, des efforts énormes ont été consacré à l'augmentation du nombre de molécules susceptibles d'être soumises aux tests de criblage. La première étape a consisté en une automatisation des procédés, grâce à des robots dérivés de ceux utilisés dans les laboratoires d'analyse médicale. Il est possible actuellement d'évaluer entre 100.000 et 1.000.000 composés chimiques différents par an dans un test de criblage donné. La plupart des compagnies pharmaceutiques disposent de dizaines, voire de plus d'une centaine de cibles thérapeutiques susceptibles de faire l'objet de criblage robotisé.

1.I.2. Les composés qui alimentent le criblage systématique.

Jusqu'à ce qu'apparaissent les méthodes de chimie combinatoire, les composés testés avaient deux sources principales : les produits naturels et les collections historiques des compagnies pharmaceutiques elles-mêmes.

Les produits naturels ont toujours représenté une source abondante et précieuse de structures biologiquement actives. Cette approche se heurte néanmoins à deux difficultés. En effet, quand une activité a été détectée, dans un extrait de plante par exemple, il est nécessaire de procéder à des opérations de purification et d'identification structurale souvent complexes, qui n'aboutissent pas systématiquement. Paradoxalement, un produit très actif est susceptible d'être détecté même s'il est très faiblement concentré. Ainsi, si sa détection est facile, son identification structurale risque d'être laborieuse (approvisionnement en matière première naturelle, concentration des fractions actives). Egalement, la complexité de la structure peut en interdire toute tentative de synthèse économiquement viable, ce qui constitue un probléme majeur, si l'approvisionnement à partir de la source naturelle est limité (ex : taxol et ses dérivés). Il faut également souligner que les pays les plus riches biologiquement (zones intertropicales) n'offrent pas toujours les meilleures garanties de stabilité politique et économique, et sont soucieux de protéger leur biodiversité et donc d'en limiter sévèrement l'accès.

Les collections de produits présentent souvent l'inconvénient de ne permettre d'explorer qu'une faible partie de la diversité moléculaire puisqu'elles sont, de par leur origine, focalisées sur certaines séries chimiques.

Par sa capacité à engendrer rapidement de nombreuses entité chimiques, la synthèse combinatoire s'est rapidement imposée en complément du criblage à haut débit. Les composés issus de la synthèse combinatoire dérivent de chimies contrôlées, généralement

robustes et de monomères facilement accessibles. La préparation d'analogues et la synthèse à grande échelle sont simplifiées. A la différence des mélanges naturels, le format des chimiothèques combinatoires est contrôlé dès leur préparation et simplifie l'identification structurale.

1.II. LA CHIMIE COMBINATOIRE.

1.II.1. Principe de la chimie combinatoire.

En synthèse chimique classique, la réaction chimique met en jeu un représentant de chacune des classes réactives (A1, B1...). Elle est suivie d'étapes de purification et d'identification structurale du ou des produits de la réaction. L'évaluation biologique n'est entreprise que lorsque l'échantillon a subit un ensemble bien codifié d'analyses de pureté et de confirmations de structure. La chimie des produits naturels a pour point de départ un mélange complexe actif et pour issue une série d'analyses permettant l'isolement d'un produit actif au sein du mélange et son élucidation structurale (Figure 1.II.1).

Très récemment, les chimistes de synthèse ont pris conscience de leur capacité à engendrer rapidement des mélanges de composés organiques au moyen de la chimie dite combinatoire et de l'intérêt de cette démarche dans la découverte de nouveaux médicaments (Figure 1.II.1).

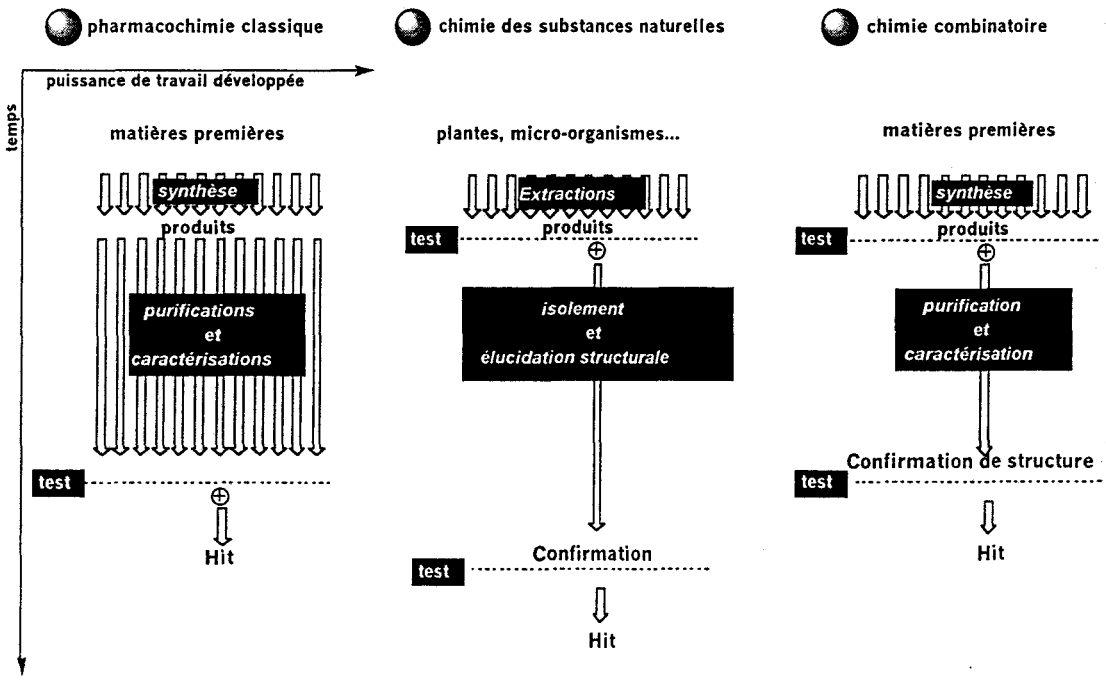


Figure 1.II.1 : Comparaison des différents processus de découverte de nouvelles substances actives.

Ce concept a connu un développement extrêmement rapide au cours des quatre dernières années. Les voies explorées sont nombreuses et variées et il est devenu difficile de donner une définition exacte de la synthèse combinatoire.
Toutes ces démarches ont en commun d'engendrer un grand nombre de composés chimiques différents en synthétisant de façon systématique toutes les combinaisons possibles de plusieurs familles de monomères (Figure 1.II.2).

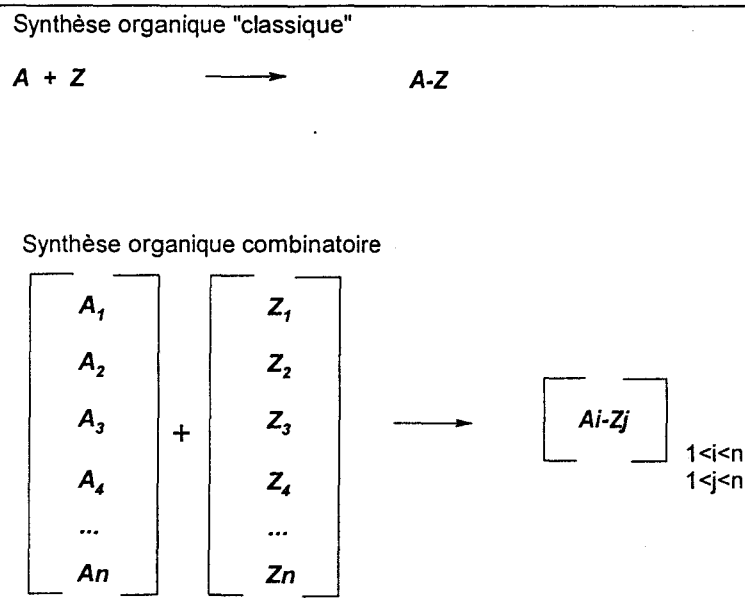


Figure 1.II.2 : Principe de la chimie combinatoire dans le cas de la synthèse de dimères.

1.II.2. Application des chimiothèques combinatoires à la découverte de médicaments.

Grâce à la bonne maîtrise de la synthèse récurrente des peptides, les premières chimiothèques étaient de nature peptidique, pseudopeptidique, ou oligonucléotidique. L'inconvénient de ces chimiothèques dérivées de polymères naturels est les mauvaises biodisponiblité et stabilité de leurs constituants. Les chimistes se sont donc orientés vers la synthèse combinatoire de petites molécules organiques. La synthèse peptidique ou oligonucléotidique se prêtait à la synthèse en mélange, ce n'est pas le cas pour la plupart des autres réactions de la chimie organique. Ainsi, la stratégie de la synthèse combinatoire qui permet d'engendrer un grand nombre de composés par combinaison de plusieurs séries de monomères est conservée mais chaque réaction est réalisée séparément des autres. Cette stratégie est connue sous le nom de synthèse parallèle. Elle n'est cependant possible que grâce à une automatisation et une informatisation poussées des protocoles, telles qu'elles ont été mises en œuvre au laboratoire.

La chimie combinatoire couplée à la chimie médicinale a un impact significatif à la fois sur le processus de découverte de « leads » et sur leur optimisation.

1.III. IDENTIFICATION D'UNE MOLECULE ACTIVE AU SEIN D'UNE CHIMIOTHEQUE COMBINATOIRE (ANNEXE 1).

1.III.1. Principes généraux.

Le format des chimiothèques combinatoires est conçu pour faciliter la détection et l'identification des produits actifs. Les méthodes d'identification se répartissent en deux catégories : les méthodes dites « d'étiquetage moléculaire » et les méthodes de déconvolution. Les premières sont directes alors que les secondes nécessitent plusieurs synthèses et plusieurs évaluations biologiques des mêmes structures moléculaires. L'étiquetage moléculaire nécessite toujours le recours aux méthodes de synthèse en phase solide pour la préparation des chimiothèques, alors que les méthodes de déconvolution et les méthodes apparentées s'appliquent à des chimiothèques synthétisées aussi bien en phase homogène qu'en phase

solide. Le chimiste opte pour la méthode la plus appropriée à la réalisation de ses synthèses. Ce choix peut représenter une contrainte majeure au niveau des tests biologiques, puisque certains d'entre eux ne permettent pas d'évaluer des molécules encore liées à un support insoluble (cas des tests utilisant des récepteurs ancrés dans des membranes).

1.III.1.1. Etiquetage moléculaire ou « molecular tagging ».

A. Principe du « one bead / one compound ».

En synthèse en phase solide, l'utilisation de grands excès de réactif, facilement éliminés en fin de réaction par de simples lavages, est classique et permet de travailler en grandes concentrations de réactifs, d'améliorer la sélectivité des réactions, d'augmenter leur vitesse, et d'accroître la pureté des produits. En synthèse combinatoire en mélange, ce principe se heurte au risque de voir les réactifs aux cinétiques les plus favorables préférentiellement incorporés et sur-représentés ensuite dans le mélange final, au détriment des composés les moins réactifs. La méthode « DCR » (Divide, Couple and Recombine) permet de résoudre ce problème.

Avant chaque étape de couplage combinatoire, la résine insoluble est divisée en autant de lots qu'il y a de réactifs à introduire à cette étape de synthèse. Chacun des réactifs est alors mis en réaction en excès dans un réacteur séparé. En fin de réaction, les résines contenues dans les différents réacteurs sont mélangées, et l'on peut procéder à l'étape suivante. Ainsi, en fin de synthèse, chaque bille aura suivi une chemin réactionnel particulier, et portera donc une seule espèce moléculaire [1]. Il est cependant nécessaire d'identifier la structure attachée à la bille de résine active.

Récemment il a été montré[2] que des spectres de RMN peuvent être réalisés sur une seule bille de polymère et permettent, dans des cas simples de molécules non peptidiques, l'identification de la molécule fixée sur cette bille. Pour élargir le champs d'application de cette stratégie à la synthèse et aux tests de molécules non directement identifiables par séquençage ou RMN, des méthodes d'étiquetage des billes de résine ont été développées[3].

B. L'étiquetage moléculaire.

Le principe consiste à dissocier les fonctions de liaison au récepteur et d'identification de la structure de l'entité liante. Pour la première fonction on recherchera la diversité maximale, pour la deuxième fonction, on recherchera un système robuste sensible et universel.

Pour cela, utilisant la méthode « DCR», à chaque division du support de synthèse, on réalisera deux réactions de façons indépendantes, l'une pour la synthèse de la molécule-ligand, l'autre pour la synthèse des molécules ou de la molécule « codante ». L'analyse de la molécule codante permettra de déterminer la structure théorique de la molécule-ligand. Dans la pratique, la structure de la molécule codante permet de déterminer les étapes de synthèse qui ont été réalisées sur ce grain de résine, et qui doivent théoriquement conduire à la « structure ligand ». Les premières stratégies d'étiquetage moléculaire ont utilisé les peptides comme molécules codantes.

Ces méthodes sont cependant limitées aux chimiothèques synthétisées et testées en phase solide. De même, il est certain qu'ancrées au polymère, les ligands n'offrent qu'une fraction de leurs interactions potentielles au récepteur. Ce masquage d'une partie de la surface moléculaire par le support polymérique peut être responsable de la non détection d'espèces

actives (fausse négatifs). Pour ces raisons ont été mises au point des méthodes de clivage des molécules-ligand respectant l'ancrage des étiquettes ou encore des méthodes de clivage partiel des molécules-ligand, permettant le criblage en solution.

Enfin la réalisation chimique de telles chimiothèques pose de nombreuses difficultés. Elle nécessite la mise au point d'une chimie d'assemblage des ligands respectant la structure des étiquettes moléculaires. De même, l'incorporation des étiquettes doit respecter la structure des molécules ligands, au risque de voir des positifs non confirmés lors d'une resynthèse conventionnelle.

Ces contraintes ont beaucoup limité l'étendue des méthodes chimiques d'assemblage combinatoire utilisables avec l'étiquetage moléculaire, et par voie de conséquence, la diversité structurale accessible par ces voies.

1.III.1.2. Les méthodes de déconvolution.

A. Principes généraux.

Comme il a été noté par Pirrung[4], toute chimiothèque combinatoire peut être considérée comme une matrice à N dimensions, dans laquelle chaque dimension a un nombre n d'éléments égal au nombre de variants présents à une position variable donnée. Dans ce modèle, N représente le nombre d'étapes combinatoires impliquées dans la préparation de la chimiothèque, par exemple 3 pour une chimiothèque de trimères. Bien que leur représentation graphique soit moins aisée si N>3, toute chimiothèque combinatoire peut-être représentée par une matrice de dimension N, chaque élément de la matrice correspondant à un composant (« N-mérique ») de la chimiothèque.

Pour obtenir toute l'information qu'une chimiothèque peut receler, il faudrait pouvoir tester chaque composant de la chimiothèque et associer à la matrice de composés, une matrice homologue d'activités biologiques. Ceci n'est réalisable rapidement que dans le cas des chimiothèques obtenues par synthèses parallèles [5]. Dans le cas de chimiothèques testées en mélange, l'identification de la structure nécessite des expériences complémentaires (biologiques et chimiques). Le principe de la déconvolution est de limiter le nombre d'expériences biologiques nécessaires pour faire cette identification.

B. La déconvolution itérative.

Le principe de déconvolution itérative met en jeu la synthèse et le criblage de plusieurs séries de sous-chimiothèques. Il y a autant de séries qu'il y a de positions variables (N) ou de dimensions dans la matrice de la chimiothèque. Ces séries contiennent un nombre variable de sous-chimiothèques, égal au nombre de variants présents à chaque étape combinatoire de la synthèse (n). Au cours de la déconvolution, qui s'effectue de manière interactive avec les biologistes, les sous-chimiothèques constituant les séries contiennent de moins en moins de produits, jusqu'à ce qu'un produit unique soit identifié.

Ainsi, une chimiothèque d'hexapeptides, construite à partir de 20 aminoacides contient 20^6 soit 64,000,000 peptides alors que sa déconvolution réclame la synthèse et l'évaluation de 20 x 6 = 120 sous-chimiothèques.

Cette méthode de déconvolution s'est révélée efficace dans plusieurs cas mais un inconvénient majeur de cette méthode est la nécessité de préparer et d'évaluer une nouvelle série de sous-chimiothèques à chaque étape de déconvolution. Même si la chimiothèque doit

être utilisée dans de nombreux tests, il est improbable que les mêmes sous-chimiothèques soient impliquées. De nouvelles synthèses sont donc requises pour chaque activité détectée.

C. « Balayage » des positions. («Positional scanning»).

Cette méthode a été conçue et mise en œuvre par Houghten pour l'évaluation de chimiothèques de peptides[6],[7] . Cette méthode requiert de préparer N séries de n sous-chimiothèques. Chacune de ces séries réalise une partition de la chimiothèque complète, tout comme dans la première étape de déconvolution itérative. Et chacune de ces N séries de sous-chimiothèques sert à déterminer le variant utile dans chaque position variable de la molécule-ligand. Les sous-chimiothèques d'une série sont préparées en randomisant toutes les étapes de la synthèse sauf une où chaque variant est incorporé séparément.

La détermination de l'activité des sous-chimiothèques de ces séries permet d'identifier la structure des variants les plus adaptés à chaque position. A la différence de la méthode précédente, cette méthode ne requiert aucune interaction entre le chimiste et le biologiste pendant la déconvolution. Néanmoins, il faut noter que, contrairement au cas précédent, le processus de déconvolution n'est pas convergent, et que les produits sont toujours testés à haute dilution, ce qui peut poser des problèmes de détection.

Mais on peut également décider de procéder à une déconvolution itérative complète en partant de la position variable la mieux définie par le scanning positionnel (position correspondant à une série pour laquelle les résultats biologiques sont contrastés et où le choix d'un variant s'impose). Dans ces deux cas, la définition d'un ligand (qui reste à confirmer) nécessite plusieurs « resynthèses » après le scanning.

D. Principe des chimiothèques orthogonales

Conçu au laboratoire, le principe général des chimiothèques orthogonales implique la préparation de 2 séries-partitions de la chimiothèque totale, quels que soient N et n_i. Ces deux séries contiennent chacune tous les congénères de la chimiothèque envisagée[8]. Les sous-chimiothèques de ces deux séries sont telles que le nombre de composés par sous-chimiothèques est égal ou inférieur au nombre de sous-chimiothèques dans une série. Entre deux sous-chimiothèques prises dans deux partitions orthogonales il n'y a qu'un composé désiré en commun, un composé actif peut être immédiatement identifié comme *le* composé en commun entre les deux sous-chimiothèques actives.

1.III.1.3. Evolution vers la synthèse en parallèle.

Dans les premières années de la synthèse combinatoire, les réactions étaient réalisées avec des mélanges de plusieurs représentants de chaque famille de réactifs impliqués dans la réaction engendrant donc des mélanges de composés. L'identification du composé actif dans un mélange est souvent désignée par le terme de déconvolution et a la particularité de ne nécessité ni purification, ni analyse structurale, à l'inverse du cas des produits d'origine naturelle. L'organisation préalable des mélanges permet cette identification.

Il s'est rapidement avéré que l'un des défauts majeurs des méthodes qui consistent à tester des mélanges de produits, est d'engendrer un nombre considérable de faux positifs dont la détection implique généralement des expériences longues, coûteuses et inutiles. Ces expériences mobilisent non seulement les équipes de biologie mais aussi celles de chimie (de synthèse, dans le cas des déconvolutions itératives ou du scanning de position, ou analytique

dans le cas de l'étiquetage). Ces activités, auxquelles il est difficile sinon impossible, d'attribuer une structure chimique ont deux origines principales.

A. Les faux positifs dus à l'insuffisance de diversité structurale.

La synthèse combinatoire engendre de façon systématique, simultanément et au même endroit, un grand nombre de composés différents (i.e. non identiques) au départ d'un nombre restreint de matières premières (appelées variants, par exemples les 20 aminoacides naturels) en les combinant de différentes manières. Ces variants n'apportent donc qu'un nombre restreint d'éléments de pharmacophore. Ainsi, étant donnée une chimie d'assemblage, la diversité recelée par un mélange combinatoire sera corrélée à la diversité des variants ou plus exactement au rapport du nombre de variants mis en jeu pour réaliser ce mélange au nombre de produits obtenus dans ce mélange. Le « discernement » du récepteur varie d'un récepteur à l'autre, mais n'est jamais parfait. Il pourra donc voir dans une famille de congénères structuralement proches et capables d'offrir un même pharmacophore, un seul et même type de molécule, à une concentration égale à la somme des concentrations de ces congénères. Si cette concentration « ressentie » par le récepteur est suffisante, un signal apparaît pendant le criblage biologique. La déconvolution qui s'en suit ne permet pas de définir une structure active, mais au mieux un congénère d'activité décevante.

B. Les faux positifs liés aux réactions secondaires.

On peut diviser les réactions secondaires en deux catégories. D'une part, les réactions qui intéressent un variant particulier traité dans les conditions de synthèse, et d'autre part, les réactions secondaires qui n'ont lieu que lorsque deux variants sont présents simultanément. Le premier type de réaction secondaire est le moins gênant, car le produit secondaire sera un « satellite » permanent du produit attendu qui l'accompagne jusqu'à l'étape ultime de déconvolution. Lors de la confirmation d'activité, il s'avère que le produit purifié est peu actif ou inactif. Il « suffit » alors de reprendre le milieu réactionnel non purifié, de le chromatographier, et d'évaluer l'activité de toutes les fractions. Plus le produit est actif, plus son seuil de détection est bas. Dans ce cas il est possible que des traces de sous-produit soient biologiquement détectables mais que sa faible concentration en rende l'élucidation structurale très difficile, voire impossible.

Le deuxième type de réactions secondaires peut être beaucoup plus gênant. En effet, tous les types de déconvolution sont basés sur des partitions de la chimiothèque initiale qui impliquent une séparation des variants. Si la réaction implique la présence simultanée de deux variants dans la même position variable au cours de la synthèse combinatoire initiale, elle ne se produit plus lorsque ces ceux variants sont dans des groupes différents. Alors le sous-produit n'est plus formé et paradoxalement l'activité disparaît dès que l'on essaie d'identifier le variant qui confère l'activité en cette position.

C'est en vue d'une simplification des méthodes de déconvolution, qu'a été pensée la méthode des chimiothèques orthogonales. Le mélange « post-synthèse » des composés préparés par synthèse parallèle est également plus adapté à la préparation de bibliothèque de large divergence, permettant d'éviter les faux-positifs.

Une dernière possibilité pour s'affranchir des problèmes de complexité et de divergence, et qui est conditionnée par l'existence de systèmes de criblage de très haute capacité, consiste en l'évaluation séparée de composés synthétisés individuellement. C'est cette dernière méthode qui a été utilisée pour notre travail.

1.IV. L'INTERACTION LIGAND-RECEPTEUR ET LA NOTION DE PHARMACOPHORE.

1.IV.1. Les forces en jeu dans l'interaction ligand-récepteur.

Pour qu'un composé puisse jouer un rôle sur une fonction biologique de l'organisme, il doit interagir avec une structure propre de cette organisme. Les liaisons non covalentes dans lesquelles les paires électroniques sont conservées n'aboutissent pas à la formation d'un nuage électronique commun entre les deux atomes. Ces liaisons sont réversibles et sont caractéristiques des interactions des médicaments avec leur cible biologique[9]. Les liaisons non covalentes sont beaucoup plus faibles que les liaisons covalentes (10 kcal/mol) et peuvent donc être facilement cassées. Ainsi un petit changement dans l'environnement chimique peut former ou briser une telle liaison dans les processus biologiques.

L'interaction ligand-récepteur peut être décrite par l'équation :

$$\text{Ligand + Récepteur} \underset{k_{diss}}{\overset{k_{ass}}{\rightleftharpoons}} \text{Complexe}$$

où la constante de vitesse d'association du complexe est k_{ass} et celle de vitesse de dissociation est k_{diss}. L'affinité ou constante d'association est le rapport de ces vitesses $K_{as} = k_{ass} / k_{diss}$. Les paramètres thermodynamiques liés à K_{as} sont l'énergie libre ($\Delta G°$), l'enthalpie ($\Delta H°$) et l'entropie ($\Delta S°$) reliés par les équations :

$$\Delta G° = -RT\ln K_{as} \text{ (T : temperature en °K, R constante de gaz universelle)}$$
$$\Delta G° = \Delta H° - T\Delta S°$$

Il existe plusieurs contributions à l'énergie d'interactions moléculaires. Principalement K_{as} dépend de deux facteurs : la complémentarité électrostatique entre le ligand et le récepteur (fonction de la densité électronique) et la complémentarité stérique (fonction de la conformation)[10].

1.IV.1.1. Les forces électrostatiques

Ces interactions résultent de l'attraction d'une charge positive et d'une charge négative, qui peuvent être entières ou partielles, permanentes ou transitoires.

A. Interactions Ioniques

L'attraction entre deux ions de charge opposée s'exerce à une distance importante et constitue la première force d'attraction vers le site de liaison. Cette liaison ionique est relativement stable. La force peut être calculée selon la formule suivante [10] :

$$E = (q_i q_j)/(Dr_{ij})$$

où q_i et q_j sont les charges et r_{ij} la distance les séparant dans un milieu de constante diélectrique D. La force des interactions ioniques dépend donc du milieu environnant (D). Egalement, E est inversement proportionnelle à la distance r. Cependant, les autres interactions non covalentes sont beaucoup plus dépendantes de la distances que les liaisons ioniques ce qui explique que celles-ci dominent les interactions longues distances initiales entre le ligand et le récepteur.

B. Interactions charge-dipôle et dipôle-dipôle

Bien que ces interactions soient plus faibles que les interactions ioniques, elles contribuent cependant à l'interaction ligand-récepteur globale car elles se produisent dans toute molécule pour laquelle les différences d'électronégativité entre atomes engendrent des moments dipôlaires [10]. Ces liaisons proviennent de l'interaction entre une charge partielle et un ion ou entre deux charges partielles.

C. Liaisons hydrogène

Il s'agit des interactions non covalentes les plus importantes dans les systèmes biologiques. A l'opposé des interactions ioniques, ces forces s'exercent de manière non-isotrope (comme les liaisons covalentes) et sont dépendantes des orientations relatives des deux entités. Les liaisons hydrogène les plus fortes se produisent entre des paires non liantes d'atomes d'azote ou d'oxygène et les hydrogènes portés par le même type d'atomes.

D. Les liaisons de Van der Waals

Il existe des interactions possibles concernant les molécules non polaires, particulièrement à des distances intermoléculaires courtes (décroissantes en $1/R^6$). Les forces de van der Waals sont de ce type. Elles se forment entre deux groupements apolaires situés à proximité l'un de l'autre. Des altérations spontanées et transitoires de la répartition électronique d'une molécule induisent un changement en sens contraire sur la molécule voisine, et donc une attraction.

1.IV.1.2. Les forces de répulsion

Hormis la répulsion de deux charges de signe égal, le principe d'exclusion de Pauli qui empêche les orbitales électroniques des différentes molécules de s'interpénétrer lorsque des complexes non-covalents sont formés, est à la base de la force répulsive prédominante. Elle s'exerce à des distances très faibles (décroissantes en e^{-R}).

1.IV.2. La notion de pharmacophore

L'extrapolation des données de relation entre structure et activité (liaison au récepteur idéalement), repose sur le concept de pharmacophore. Le pharmacophore est l'ensemble des caractéristiques stériques et électroniques nécessaires pour assurer les interactions supramoléculaires optimales avec une cible biologique spécifique et déclencher (ou bloquer) sa réponse biologique. Un pharmacophore ne représente pas une molécule réelle ou une association réelle de groupes fonctionnels mais un concept purement abstrait qui explique les capacités d'interactions moléculaires d'un groupe de composés envers la structure cible. Le pharmacophore peut être considéré comme le plus grand dénominateur commun partagé par un ensemble de molécules actives [11]. L'utilisation de ce concept suppose la rigidité du site de liaison du récepteur.

Le corollaire à ce concept est la possibilité de remplacer le squelette liant les groupes pharmacophoriques tout en gardant l'activité[12]. La modélisation moléculaire permet en utilisant des descripteurs des molécules et des modèles mathématiques de comparer les structures des ligands entre-elles afin de déterminer leur similarité et d'évaluer ainsi leur

« probabilité » d'être actifs. Il n'existe cependant pas de métrique de similarité idéale qui garantirait la validité du corollaire puisque l'évaluation de la similarité de deux molécules sous-entend la comparaison de toute la structure moléculaire, alors que l'activité peut ne dépendre que de certaines régions clés qui doivent être conservées et qu'un degré arbitraire de dissimilarité pourrait permettre certains groupes non essentiels dans la molécule. La mise en évidence de ces régions clés requiert des modèles mathématiques plus complexes qui doivent être calibrés et éduqués grâce à des ensembles de molécules actives et inactives. Cette étape n'est alors utile que dans les étapes plus avancées de la découverte.

1.IV.3. Les descripteurs utilisés.

Au laboratoire, nous utilisons deux types de représentations des molécules en fonction du nombre de molécules que nous avons à traiter. Le premier est basé sur les autocorrélogrammes de propriétés physicochimiques (FBPA) « Fuzzy Bipolar Pharmacophore Autocorellograms ». Les molécules sont représentées par une série de valeurs numériques. Une grande quantité d'information structurale est perdue mais on peut gérer de grands nombre de molécules dans un temps restreint. Le second type de représentation consiste en des modèles tridimensionnels (ComPharm) dans lesquels les propriétés physicochimiques des atomes sont pris en compte sans que leur nature exacte soit considérée. Une grande partie de l'information dont relèvent les interactions entre molécule et récepteur est conservée. Par contre, l'utilisation de ces descripteurs nécessite des temps de calcul beaucoup plus longs.

Les FBPA représentent la distribution de distances qui séparent les groupements pharmacophoriques dans une molécule. Pour chaque atome de chaque conformère on attribue le ou les caractères suivants qui tiennent compte des points structuraux importants pour la liaison au récepteur :

- Charge positive
- Charge négative
- Aromatique
- Alkyle
- Donneur de liaisons hydrogène
- Accepteur de liaisons hydrogène

Pour chaque couple d'éléments de pharmacophore (par exemple : charge positive – aromatique), on obtient un histogramme représentant la densité de population pour chacun des 12 incréments de distance (Annexe 2 pour un exemple). On obtient ainsi une matrice de 21 histogrammes contenant chacun 12 valeurs. Les FBPA sont donc un descripteur de dimension 21 * 12 =252.

Le score de similarité entre deux molécules est fonction des scores partiels pondérés de chaque couple d'éléments de pharmacophore. Si une partie des éléments essentiels à l'activité sont connus, il est possible de faire varier alors les facteurs de pondération de chaque couple d'éléments de pharmacophore pour intégrer ces données.

Cette méthode de similarité de pharmacophore a été utilisée dans ce travail pour la recherche d'analogues de molécules actives en parallèle avec les méthodes de chimie médicinale classique qui conservent la topologie mais pas le pharmacophore.

BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 1

[1] Lam K.S., Salmon S.E., Hersch E.M., Hruby, V.J., Kazmiierski W.M., Knapp R.J., *Nature*, ***1991*** 91 p10779-10785.

[2] Pop I.E., Dhalluins C., Déprez B., Melnyk P., Lippens G., and Tartar A. *Tetrahedron*, ***1996***, vol 52, 37, p 12209-12222

[3] Janda K.D., *Proc. Nat. Acad. Sci USA* , ***1994***, 91 p10779-10785

[4] Pirrung M.C., Chen J., J.Am. Chem. Soc, ***1995***, 117, p1240-1245.

[5] Fodor S.P.A., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D., *Science*, ***1991***, 251, p767-773.

[6] Pinilla C., Appel R.J., Blondelle S., Dooley C.T., Eichler J., Ostreh J.M., Houghten R.A., *Drug Development Research*, ***1994***, 33, p133-145.

[7] Dooley C.T ;, Houghten R.A., *Life Science* ***1993***, 52, p1509-1517.

[8] Déprez B., Williard X., Bourel L., Coste H., Hyafil F., Tartar A., Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries, J.Am.Chem.Soc., ***1995***, 117, pp 5405-5406.

[9] Kollman P.A., Drug-Target Binding Forces, in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Wolff M.E. Ed., 5th Ed., John Wiley and Sons, ***1995***, 1, pp399-413.

[10] Andrews P.R., The Role of Functionnal Groups in Drug-Receptor Interactions, in The Practice of Medicinal Chemistry, Wermuth C.G. Ed., Academic Press, ***1996***, pp345-365.

[11] C-G Wermuth, C.R. Ganellin, P. Lindberg, L.A. Mitscher, « Glossary of Terms Used in medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1997), J.A. Bristol, Trends and Perspectives, Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol. 33, Academic Press, ***1998***, pp 385-395.

[12] Marshall G.R., Molecular Modeling in Drug Discovery, in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Wolff M.E. Ed., 5th Ed., John Wiley and Sons, ***1995***, 1, pp619-627.

- Chapitre 2-

Rôle des tenseurs dans la conception et la synthèse de chimiothèques.

CHAPITRE 2
RÔLES DES TENSEURS DANS LA CONCEPTION ET LA SYNTHESE DE CHIMIOTHEQUES.

2.I. LA NOTION DE TENSEUR

2.I.1. Le tenseur du point de vue structural et biologique

2.I.1.1. Définition.

En chimie combinatoire, chaque monomère mis en jeu dans une réaction apporte une partie des éléments du pharmacophore global de la molécule. Nous avons appelé ***tenseur*** l'entité qui distribue les éléments de pharmacophore dans l'espace et autour de laquelle s'engendre la diversité structurale par l'approche combinatoire (Figure 2.I.1).

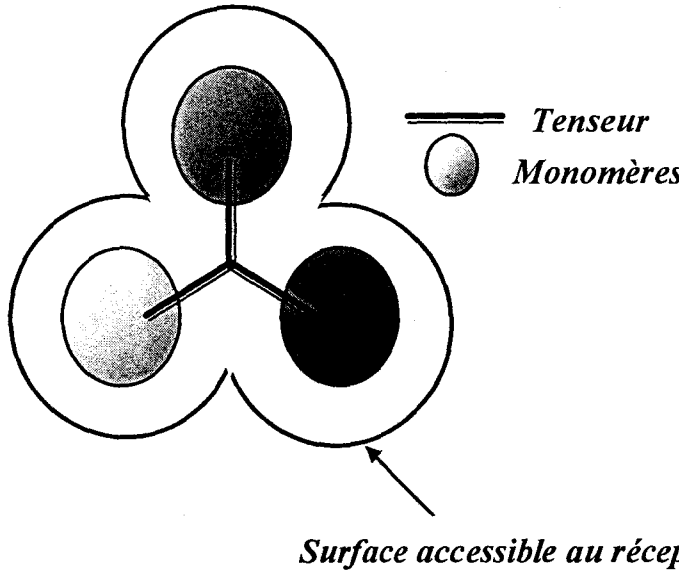


Figure 2.I.1 : Le tenseur dans une molécule combinatoire

Le tenseur a deux fonctions essentielles :

- Assurer la connexion covalente entre les monomères apportant la diversité et les éléments de pharmacophore.
- Orienter ces éléments de pharmacophores dans l'espace.

2.I.1.2. Le rôle biologique du tenseur .

Depuis quelques années se développe le concept de « twin-drugs » qui consiste en la synthèse de dimères de ligands afin de potentialiser l'activité biologique. Ces twin-drugs peuvent être la combinaison de deux ligands identiques par dimérisation (Figure 2.I.2. ***A*** à ***C***) ou l'association de deux ligands différents (Figure 2.I.2. ***D***)[1].

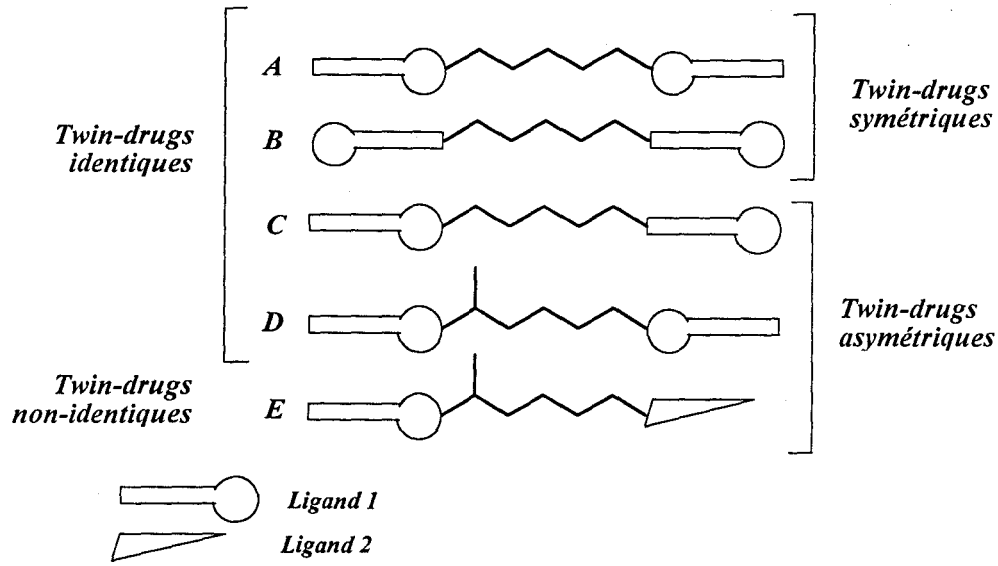


Figure 2.I.2. : Mode de connexion de deux composés dans des « twin-drugs » [1] .

A. « Twin-drugs » identiques

Ce nouveau concept a été largement utilisé dans le domaine des ligands adrénergiques, des enképhalines (Figure 2.I.3.) [1], et dans le cas diverses hormones peptidiques comme la bradykinine, l'insuline ou la substance P.

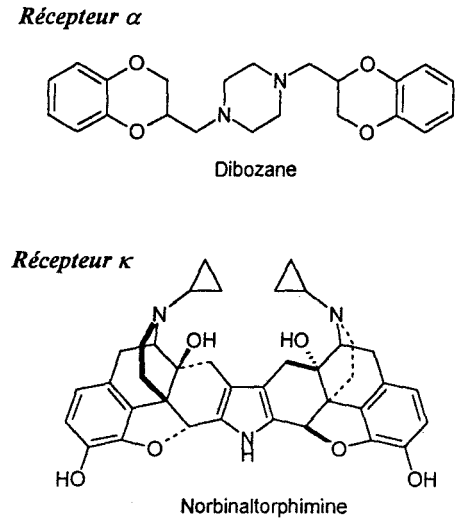


Figure 2.I.3. : Exemples de « twin-drugs » pour des récepteurs[1].

Ce concept est également utilisé pour la synthèse d'inhibiteurs d'enzymes. Un exemple de l'utilisation de dimères est la synthèse d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1[2] (Figure 2.I.4). Certains catéchols ayant montré une cytotoxicité, Zhao et al. ont décidé d'augmenter l'efficacité de ces molécules en les dimérisant.

Le tenseur choisi est le 1,3 diaminopropane présent déjà dans d'autres dimères actifs de la famille des tyrphostines inhibiteurs de tyrosines kinases. Dans l'exemple de la Figure 2.I.4., la bistyrphostine est 150 fois plus active que le monomère correspondant [1].

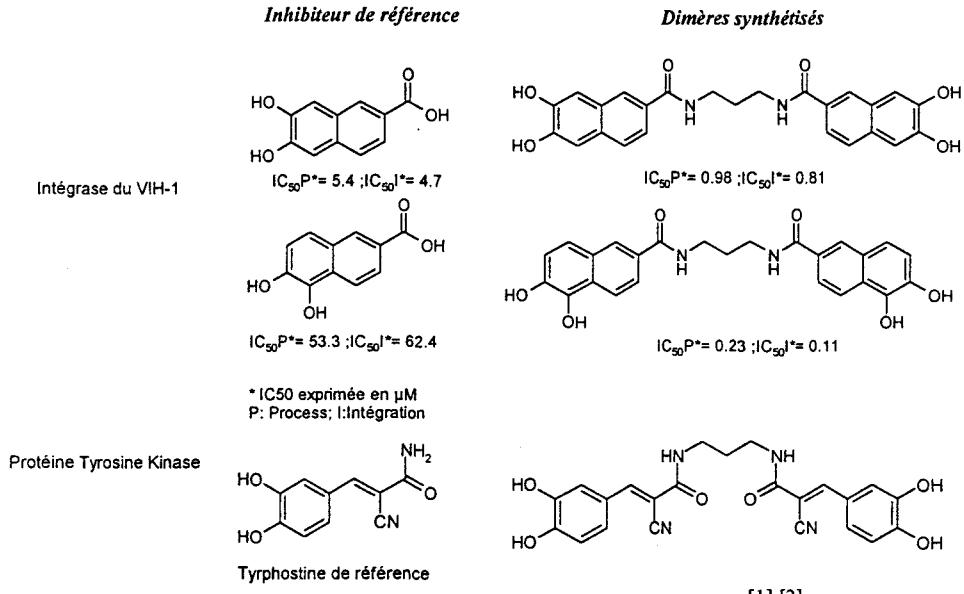


Figure 2.I.4 : Dimères inhibiteurs d'enzymes [1],[2].

Les exemples présentés ci-dessus montrent les applications biologiques des tenseurs qui permettent de relier des ligands pour en faire des dimères.

Une autre application plus récente de l'utilisation des tenseurs est dans la conception des molécules appelées Chemical Inducers of Dimerization (CID), molécules qui induisent la dimérisation de récepteurs ou protéines. La dimérisation de récepteurs ou de proteines induite par un ligand est l'un des mécanismes permettant de faire passer le signal du domaine extra-cellulaire vers le domaine intra-cellulaire. (Figure 2.I.5)

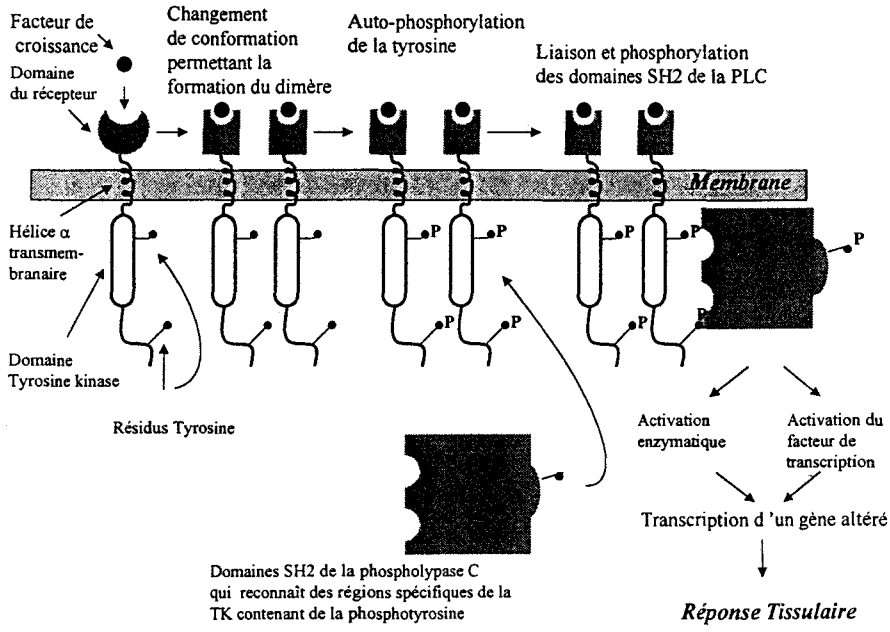


Figure 2.I.5 : Mécanisme de transduction du signal pour les récepteurs du facteur de croissance[3].

A l'état non activé, les récepteurs sont sous forme monomère et la phospholipase C sous forme inactive . Lorsque l'agoniste se lie au récepteur, celui-ci se dimérise ce qui se

traduit par une phosphorylation au niveau de certains résidus tyrosine. Un changement conformationnel s'opère permettant l'association du dimère avec les domaines SH2 de la phospholipase C laquelle est à son tour phosphorylée. La phospholipase peut alors déclencher la cascade des messagers secondaires. De nombreux récepteurs procèdent selon ce mécanisme de dimérisation (Tableau 2.I.1).

Récepteurs Cytokines de classe 1		
Famille	***Exemples***	***Caractéristiques de l'activation***
recepteur GH	GHR, EPOR, PRLR, G-CSFR	homo-dimères
recepteur IL-3	IL-3R, GM-CSFR, IL-5R	hétéro-dimérisation avec β_c
recepteur IL-6	IL-6R, LIFR, CNTFR, iL-11R	hétéro-dimerisation avec la gp130
recepteur IL-2	IL-2Rα, IL-2Rβ, IL-4R, IL-7R	hétérodimérisation avec IL-2Rγ
Récepteurs Proteine-Tyrosine-kinases activés par dimerisation ou oligomerisation		
Famille	***Exemples***	
Récepteur PDGF	PDGFR-α, PDGFR-β, SCFR, CSFR, Fik-2	
Récepteur EGF	GFR (erbB), erbB-2 (Neu), erbB-3, erbB-4	
Récepteur FGF	FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4	
Récepteur IGF	Insulin R, IGF-1R	
Récepteur HGF	HGFR (Met), MSPR (Ron)	
Récepteur VEGF	Flt-1, Flt-2 (KDR)	
Récepteur Neurotrophine	Trk, TrkB, TrkC	
Récepteur Eph	Eph, Elk, Eck, Cck5, Sek, Eck, Erk	

Abréviations : R : récepteur, CSF : colony-stimulating facteur, GH : growth hormone, EPO : erythropoietine, PRL : prolactine, IL : interleukine, LIF : leukemia inhibitory factor, CNTF : ciliary neurotrophic factor, PDGF : Platelet-derived growth factor, SCF : Stem Cell Factor, EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, IGF : insulin-like growth factor, HGF : hepatocyte growth factore, MSP : microphage-stimulating protein, VEGF : vascular endothelial growth factor, FN : fibronectine.

Tableau 2.I.1 : Exemples de récepteurs activés par dimérisation[4].

Deux types d'oligomérisation des récepteurs peuvent avoir lieu : soit un ligand monovalent provoque un changement conformationnel qui stabilise les interactions de deux récepteurs adjacents, soit un ligand bivalent provoque le « pontage » entre deux récepteurs adjacents [5]. Dans le cadre de l'utilisation des tenseurs, nous nous intéressons aux ligands bivalents. Schreiber et collaborateurs décrivent la synthèse par métathèse d'oléfines du CID FK1012A (Figure 2.I.5)[6],[7], dimère du FK506 ligand de la FKBP12, une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase.

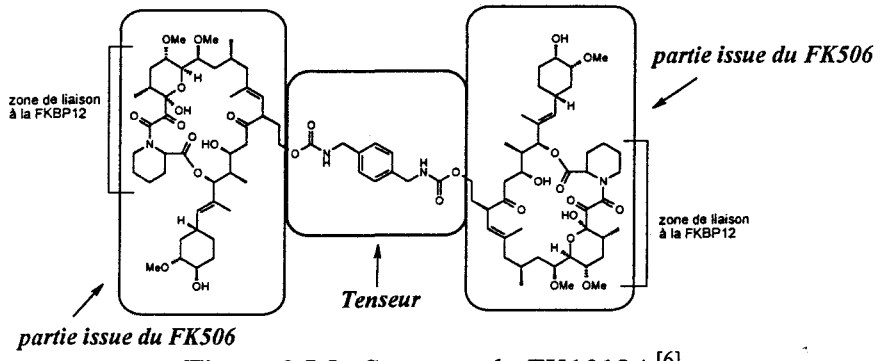


Figure 2.I.5 : Structure du FK1012A[6].

Une protéine A associée à une sous-structure cellulaire est liée à 3 copies de la FKBP12. L'addition du CID FK1012A augmente la molarité de la protéine B à proximité de la protéine A permettant ainsi la transduction du signal (Figure 2.I.6)[7].

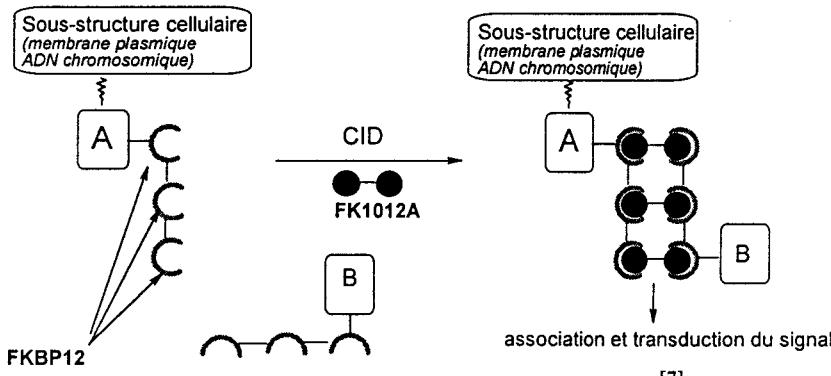


Figure 2.I.6 : Rôle de CID du FK1012A[7] .

B. « Twin-drugs » non identiques

Deux types de mécanismes d'action des « twin-drugs » qu'ils soient issus de monomères différents ou non, existent. Dans le premier, le dimère régénère *in vivo* chacun de ses composants, agissant ainsi comme une pro-drogue. Dans le second, qui nous intéresse, le dimère agit tel quel in vivo. Ceci suppose plusieurs modes d'actions :

- soit par interaction du second bras du dimère avec un site de liaison secondaire sur le même récepteur.
- soit sur deux récepteurs (Figure 2.I.7 ***A***) et dans certains cas une dimérisation du récepteur a lieu (le dimère est alors un CID).
- soit sur un récepteur et une enzyme (Figure 2.I.7 ***B***).

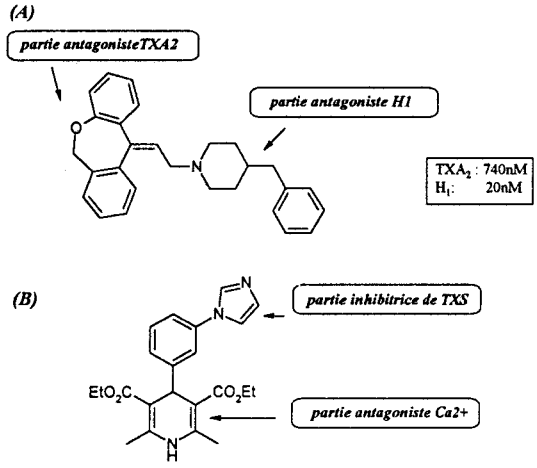


Figure 2.I.7. : Exemples de « twin-drugs » issus d'une association de deux ligands présentants des activités différentes [1] .

Dans l'ensemble des trois cas évoqués, il n'est pas nécessaire que le ligand soit un dimère au sens strict du terme. Il peut ainsi être l'association covalente de molécules très différentes.

Récemment, Dessolin et coll. ont développé des bicyclames-conjugués à l'AZT antagonistes du recepteur CXCR-4 intervenant dans la réplication du VIH (Figure 2.I.8)[8]

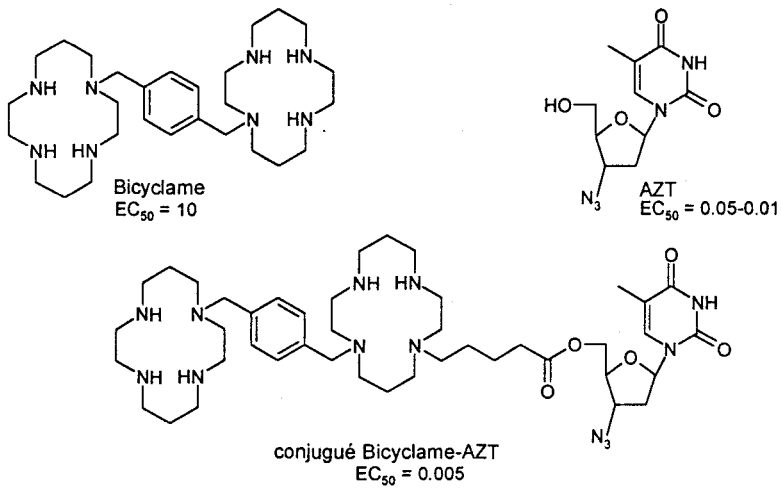


Figure 2.I.8 : Bicyclames-conjugué à l'AZT inhibiteur du CXCR-4 [8].

Les exemples cités montrent que la dimérisation de molécules biologiquement actives augmente le potentiel d'activité : soit par interaction du dimère avec deux cibles simultanément, soit par interaction du second bras du dimère avec un site de liaison secondaire, soit par augmentation de la concentration locale apparente au niveau du récepteur, selon le modèle d'association-dissociation rapide.

2.I.2. Approches chimiques de la conception de tenseurs.

2.I.2.1. Introduction.

A. Utilité des tenseurs et des chimiothèques combinatoires pour la synthèse de « twin-drugs ».

Le principe de la chimie combinatoire est parfaitement adapté à la préparation de grandes familles de molécules par dimérisation. Dale Boger et collaborateurs ont synthétisé en 1997 et 1998 des chimiothèques combinatoires destinées à la découverte de nouveaux CID. Ils décrivent la dimérisation de diamines d'acides d'iminodiacetiques en utilisant soit des acides dicarboxyliques symétriques soit la réaction de métathèse d'oléfines pour faire varier la longueur du tenseur (Figure 2.I.9)[4],[9],[10],[11]

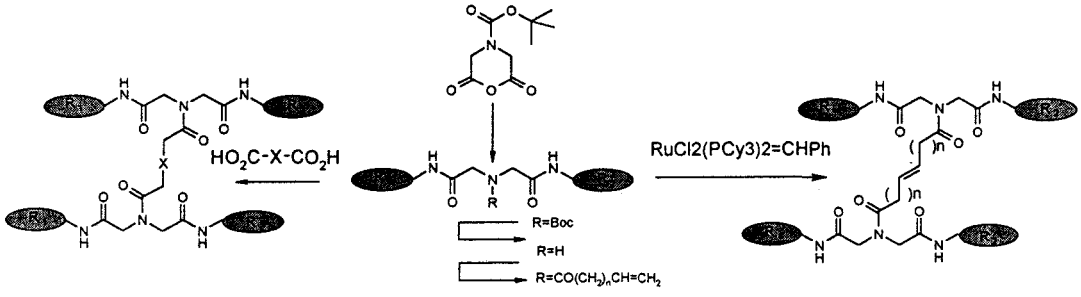


Figure 2.I.9 : Exemples de chimiothèques combinatoires utilisées pour la dimérisation de protéines ou de récepteurs[4],[9],[10],[11]

Il existe différents modes de conception de « twin-drugs ». Quelque soit le mode d'action biologique, les deux entités composant le dimère doivent être placés à une distance appropriée l'un de l'autre pour interagir avec la cible biologique. Les pharmacophores

peuvent donc être liés par un groupe espaceur (qui peut lui même interagir avec la cible, augmentant ainsi l'affinité) ou être juxtaposés ou même se superposer en partie (Figure 2.I.10). Le tenseur remplit cette fonction.

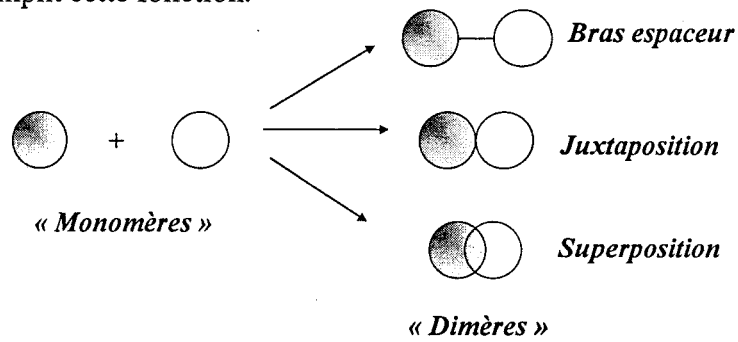


Figure 2.I.10. : Modes de combinaison de deux entités dans les « twin-drugs » [1] .

Les tenseurs peuvent avoir des structures très diverses (Figure 2.I.11).

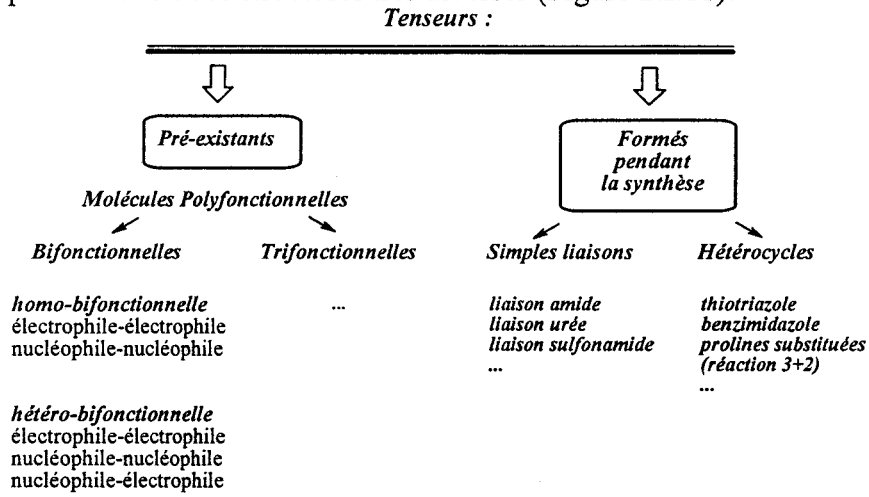


Figure 2.I.11 : Les différentes structures observées pour les tenseurs.

Dans la suite de ce travail, nous distinguerons essentiellement les tenseurs pré-existants des tenseurs créés au cours de la synthèse.

B. Les tenseurs pré-existants.

Il s'agit de molécules polyfonctionnelles sur lesquelles est greffée la diversité apportée par des monomères monofonctionnels. De nombreux tenseurs de ce type sont ainsi disponibles commercialement.

Généralement, ces tenseurs sont classés par la nature de leurs fonctions réactives : si celles-ci sont identiques, il s'agit d'un tenseur homo-polyfonctionnel ; si elles sont différentes, d'un tenseur hétéro-polyfonctionnel. Cependant, des fonctions différentes peuvent faire appel à la même classe de monomères, il est donc précisé si la fonction est électrophile ou nucléophile. Cette classification permet de choisir rapidement un tenseur en fonction, par exemple, des monomères disponibles. Parmi les tenseurs que nous avons étudiés, le 1,3 benzène disulfochlorure est un tenseur *homo-bi-fonctionnel* alors que l'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque est un tenseur *hétéro-bi-fonctionnel* (Figure 2.I.12).

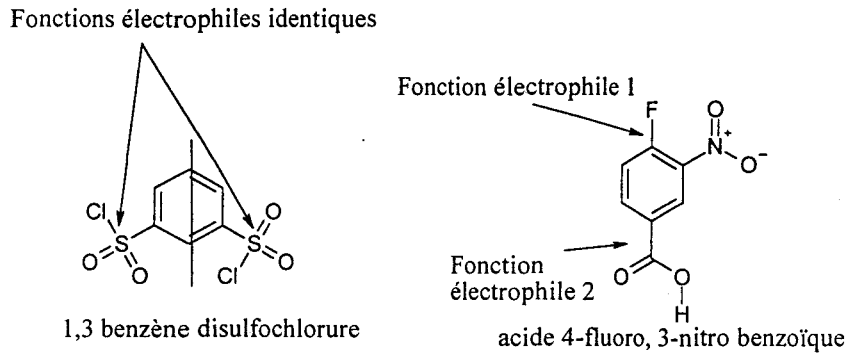


Figure 2.I.12 : Exemples de tenseurs homo- et hétéro-bifonctionnels.

Il convient cependant de remarquer que la notion de tenseur *homo-bi-fonctionnel* est approximative car la seconde réaction se fait sur une fonction dont la réactivité est modulée par la présence du premier groupe. Ainsi, les tenseurs appelés *homo-(bi ou tri)-fonctionnels* sont des molécules présentant une symétrie de fonctions se différentiant au cours de la synthèse.

Parmi les tenseurs tri-fonctionnels, la trichlorotriazine a fait l'objet de plusieurs études. Ses trois sites identiques au départ se différencient au cours de la réaction de substitution par désactivation du cycle. La première étape se fait à –20°C tandis que les suivantes nécessitent respectivement 25°C et 80°C [12],[13] (Figure 2.I.13)

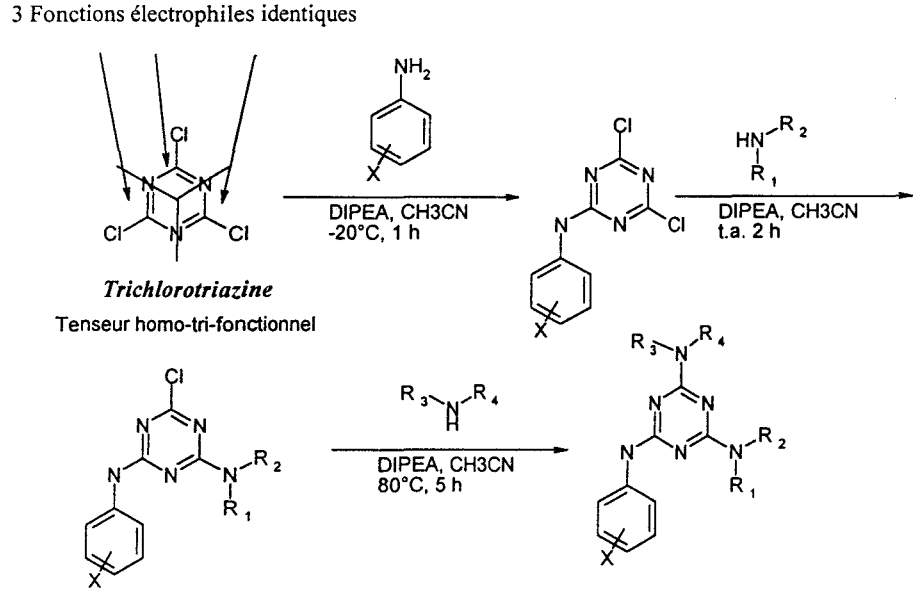


Figure 2.I.13 : Exemple d'une chimiothèque réalisée à partir du tenseur trichlorotriazine [12],[13].

C. Les tenseurs créés lors de la synthèse.

Les tenseurs créés lors de la synthèse peuvent être de différents niveaux de complexité. Certains sont aussi simples que la liaison amide issue de la condensation d'un acide activé avec une amine. Cette liaison génère, grâce à sa planéité, des contraintes précises en termes d'orientation des monomères.

Les hétérocycles sont un autre exemple de tenseurs créés lors de la synthèse mais présentant un niveau de « complexité » supérieur. C'est le cas par exemple du tenseur tétra-

hydroquinoline assemblé lors d'une seule étape de synthèse à partir de trois éléments de diversité différente. (Figure 2.I.14).

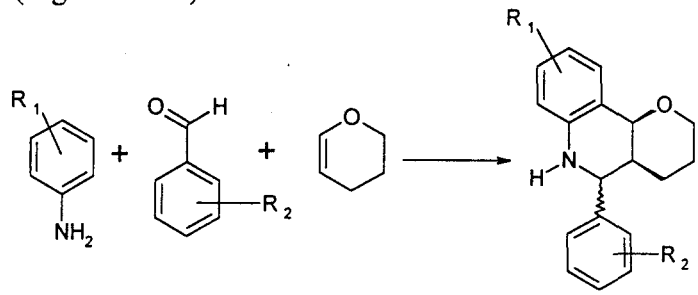


Figure 2.I.14 : Synthèse de tétrahydroquinolines [15]

2.I.2.2. Utilisation de tenseurs pour générer la diversité

Cette fonction est définie par les propriétés chimiques du tenseur. La diversité des dimères (ou trimères) générés est limitée par la réactivité du tenseur vis-à-vis des monomères.

A. Diversité synonyme de large recrutement de monomères.

Pour être intéressant et permettre l'incorporation d'éléments de diversité, le tenseur doit participer à des réactions chimiques recrutant dans de grandes familles de monomères commerciaux de bonne diversité. Un nombre communément admis pour chacune des dimensions de diversité est d'une centaine de monomères. Cependant, dans le cas de tenseurs recrutant dans au minimum 3 niveaux de diversité, une des dimensions peut être moins représentée (5 à 50 monomères) si la diversité des 2 autres dimensions reste importante.

Dans l'exemple des tétrahydroquinolines de la Figure 2.I.14, le nombre de diénophiles est limité, mais le nombre d'aldéhydes et d'anilines a permis la synthèse d'une chimiothèque comportant 1920 produits avec le dihydropyrane comme seul élément de diversité[16] .

B. Diversité induite par le changement de tenseur.

Une autre possibilité de modulation serait d'employer des tenseurs qui permettent, au sein d'une même classe de monomères, de recruter des sous-ensembles de réactivité différente, élargissant ainsi la diversité structurale globale. Par exemple, si l'on considère le cas où deux amines sont assemblées par le biais de plusieurs tenseurs (Figure 2.I.15), des ensembles différents de monomères seront recrutés pour chaque tenseur. En effet, les amines utilisables pour la synthèse des thiourées, ne le seront pas toutes pour la synthèse d'urées ou pour la formation d'hétérocycles comme les thiazolidin-5-ones [16] ou les thiobarbiturates [17]. Un nombre plus important de monomères d'une même classe peut ainsi réagir et de nouvelles combinaisons être réalisées.

Ainsi, le tenseur thiazolidin-5-one et le tenseur thiobarbiturate nécessitent des amines primaires afin de réaliser la cyclisation, alors que le tenseur thiourée permet un recrutement beaucoup plus large (Figure 2.I.15).

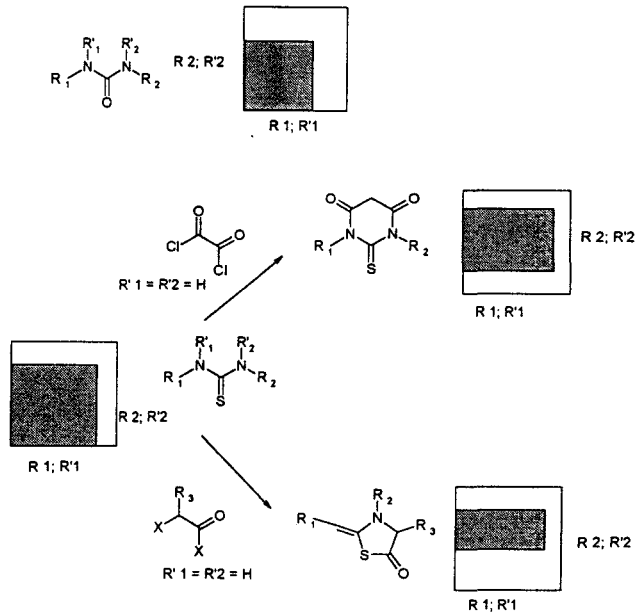


Figure 2.I.15 : Amines utilisables dans la synthèse des urées, thiourées, thiazolidin-5-ones et des thiobarbiturates [16],[17]

2.I.2.3. Utilisation des tenseurs pour orienter dans l'espace les éléments de pharmacophore.

L'introduction a rappelé l'importance de la structure tridimensionnelle des molécules dans les interactions ligand-récepteur. L'ensemble des éléments de pharmacophore des monomères mais aussi leurs distances et leur orientation relatives constituent le pharmacophore global d'une molécule combinatoire.

En plus de l'établissement de liaisons covalentes entre les monomères, le tenseur va leur conférer une orientation précise dans l'espace. Le nombre de degrés de liberté apporté par le tenseur sera un élément clé qu'il conviendra de prendre en compte. (Figure 2.I.16)

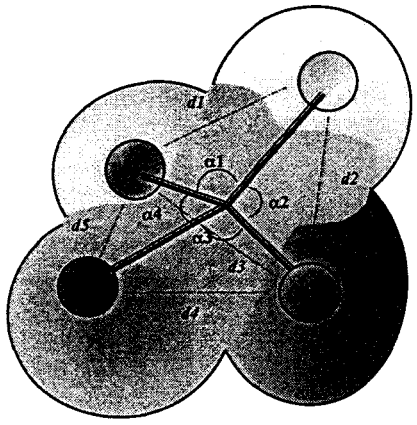


Figure 2.I.16 : Pharmacophore d'une molécule combinatoire avec son tenseur.

Deux tenseurs « équivalents » du point de vue de la chimie, c'est-à-dire ayant des fonctions réactives similaires, peuvent cependant engendrer des chimiothèques très différentes du point de vue tridimensionnel. Le tenseur lui même est un élément de diversité dans une molécule. L'utilisation de tenseurs différents avec les mêmes monomères permet de générer

des chimiothèques différant considérablement l'une de l'autre, tout particulièrement au niveau de leur structure dans l'espace. (Figure 2.I.17).

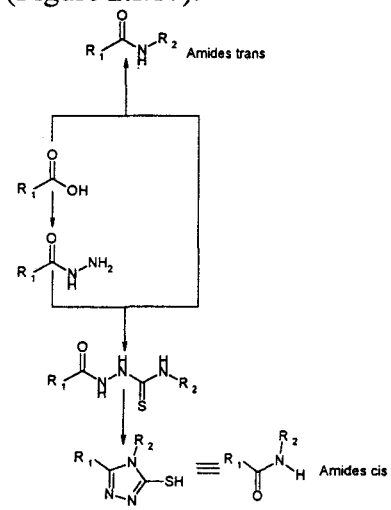


Figure 2.I.17 : Utilisation des amines et acides pour générer des chimiothèques présentant des tenseurs différents.

L'altération des distances entre les éléments de pharmacophore d'une molécule peut produire des changements qualitatifs et quantitatifs dans les effets pharmacologiques[18] .Il est possible que la longueur d'une chaîne alkyle par exemple ne soit pas la meilleure pour l'interaction biologique et donc l'exploration des séries homologues est importante (Figure 2.I.18).

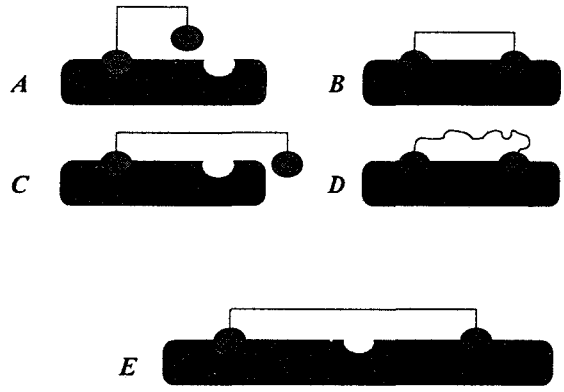


Figure 2.I.18 : Importance de la distance inter-pharmacophore pour la liaison au récepteur.

Si la chaîne est petite (Figure 2.I.18, ***A***), la molécule est trop courte et seulement un de ces groupes peut interagir avec l'un des sites. La molécule sera donc peu active. Si la chaîne a la bonne longueur, les deux sites interagissent avec la molécule. Il s'agit du cas optimal (Figure 2.I.18, ***B***). Dans le cas où la longueur de chaîne dépasse la longueur optimale, trois cas peuvent se présenter (Figure 2.I.18, ***C***,***D*** et ***E***). Si la molécule est suffisamment flexible les interactions peuvent avoir lieu. Egalement dans certains cas, la molécule peut se lier à un site secondaire plus éloigné. L'activité qui en résulte peut être différente : la molécule peut se comporter comme un antagoniste [18].

L'incorporation d'un certain degré de rigidité dans une molécule organique flexible permet d'aboutir à des composés puissants et actifs montrant une meilleure spécificité[19]. Dans le cas de molécules rigides, les groupements fonctionnels sont dans une position fixe et

dans le cas d'une molécule semi-rigide, ces groupes sont contraints à un nombre limité de dispositions et de distances inter-atomiques.

2.I.2.4. Utilisation des tenseurs pour la conception de chimiothèques focalisées destinées aux étapes d'optimisation.

Nous avons montré que les tenseurs permettent d'engendrer des chimiothèques très diverses. Cette stratégie est donc intéressante pour le criblage primaire. Cependant, l'utilisation de tenseurs facilite également la conception de chimiothèques focalisées qui en résultent.

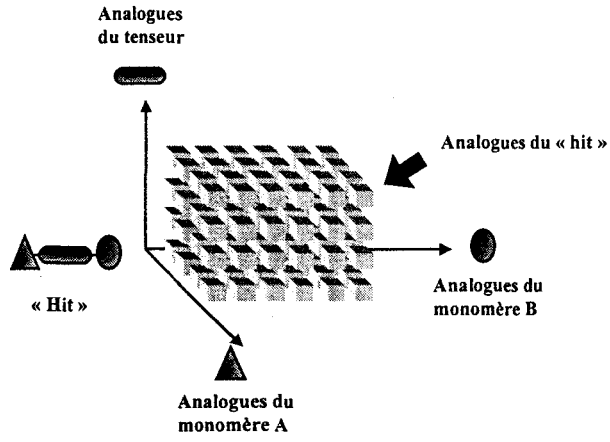


Figure 2.I.19 : Stratégies de recherche d'analogues d'un produit actif.

Il existe plusieurs méthodes pour concevoir les analogues d'un produit actif issu du criblage primaire. La première consiste à garder le tenseur mais à y associer les monomères les plus proches de ceux présents dans la molécule à optimiser. La seconde consiste à faire varier le tenseur, dans le but d'explorer la rigidité, la bioisostérie et la position relative des éléments de pharmacophore des monomères, en gardant les monomères ayant donné le produit actif. La chimie combinatoire permet d'explorer simultanément ces deux possibilités (Figure 2.I.19).

Dans le cas de la conception d'une chimiothèque généraliste basée sur un tenseur, il est donc très important de prendre en compte dès le départ la possibilité d'obtenir des analogues de ce tenseur en vue de l'optimisation de composés actifs (Figure 2.I.20).

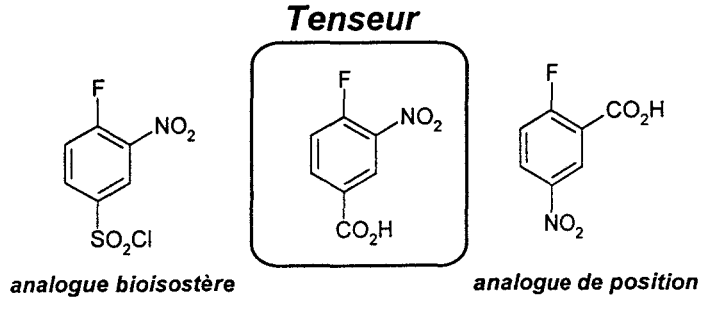


Figure 2.I.20 : Exemples d'analogues du tenseur dans le cas de l'acide 4-fluoro, 3-nitro benzoïque.

Lors de la conception d'une chimiothèque avec un tenseur, il est aussi nécessaire de s'assurer de la possibilité de préparer des analogues à partir des familles de monomères recrutées. Il est donc important que ces familles soient diverses pour la synthèse de chimiothèques primaires mais également bien peuplées en monomères de structures voisines.

Les tenseurs hétérocycliques présentent un avantage supplémentaire par rapport aux autres tenseurs. En effet, leurs voies d'accès sont nombreuses et impliquent le plus souvent des monomères de classes différentes. Ainsi, un analogue particulier d'une molécule active difficilement accessible par la voie de synthèse utilisée pour synthétiser le « hit », pourrait être accessible en suivant une autre voie synthétique. (Figure 2.I.21)

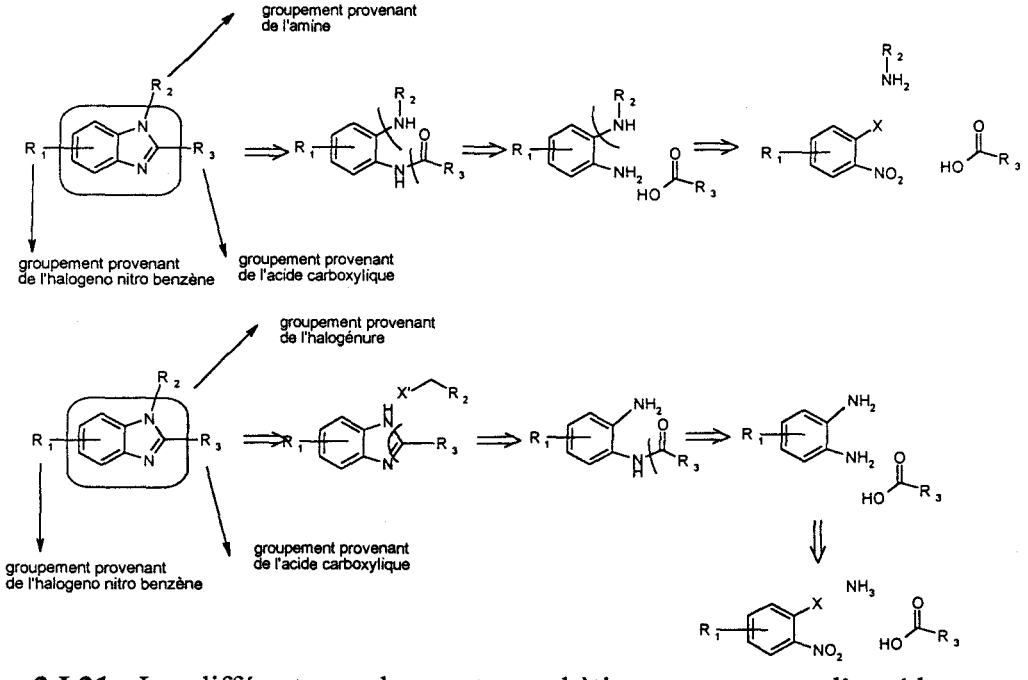


Figure 2.I.21 : Les différentes analyses retrosynthètiques permettant d'accéder au tenseur benzimidazole à partir de différentes classes de monomères [21].

2.I.2.5. Stratégies de synthèse des chimiothèques autour d'un tenseur pré-existant : « transformeur » et tenseur.

Les deux chimiothèques généralistes présentées dans ce chapitre ont fait partie d'un programme plus général de criblage systématique de tenseurs pré-existants. Après avoir fait l'inventaire des classes de monomères mises en jeu, de la diversité disponible, du nombre d'étapes de la réaction envisagée pour le tenseur choisi, il est nécessaire de choisir la stratégie de synthèse. Le tenseur est utilisé soit en chimie combinatoire robotisée, soit pour la synthèse de monomères obtenus par la stratégie des transformeurs définie ci-dessous :

Le transformeur est un tenseur bi-fonctionnel, comme par exemple la pipérazine, qui permet d'utiliser la diversité apportée par une famille de monomères large mais peu réactive pour en faire une famille de monomères réactifs. (Figure 2.I.22) Une seule étape est réalisée et il reste donc une fonction réactive. C'est le stade de la pré-combinatoire. Les transformations de groupes fonctionnels à l'aide de transformeurs doivent se faire à l'échelle du gramme pour produire des monomères qui seront utilisés dans de nombreuses réactions d'assemblage.

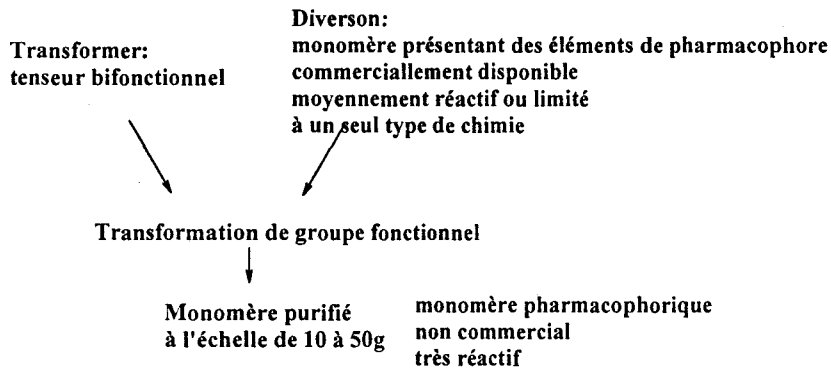


Figure 2.I.22 : Stratégie des transformeurs.

Plusieurs critères permettent d'évaluer l'intérêt d'un tenseur.

- Si la synthèse envisagée pour obtenir le produit de combinatoire est multi-étape, et donc susceptible de générer des produits secondaires, il peut être intéressant de préparer des intermédiaires et de les purifier par la stratégie des transformeurs.

- Si la molécule envisagée pour être un tenseur est très onéreuse, on s'orientera vers l'intégration directe en chimie combinatoire. En effet, les chimies robotisables produisent des composés à l'échelle du milligramme, alors que la stratégie des transformeurs nécessite des grammes de produits.

- Si les fonctions portées par le tenseur ne réagissent pas de manière orthogonale, c'est-à-dire qu'il n'y a pas possibilité de les faire réagir de manière dissociée, on peut dans certains cas obtenir des produits secondaires qui ne sont pas souhaités.

- Si on désire s'affranchir de ces produits secondaires (ce n'est pas toujours le cas), on peut intégrer le tenseur en chimie combinatoire en envisageant des groupes protecteurs compatibles avec la robotisation de la réaction, sinon on peut utiliser la stratégie des transformeurs.

- Si le nombre de monomères dans une dimension est important on préférera développer directement une stratégie combinatoire puisque la stratégie des transformeurs se fait généralement pour une vingtaine de composés.

Dans le cas où la stratégie du tenseur classique est choisie, il convient alors d'évaluer la solubilité du tenseur dans les conditions de synthèse, en utilisant de préférence des solvants « classiques » et des concentrations compatibles avec la synthèse robotique. Egalement , il est nécessaire d'étudier la réactivité du tenseur avec des représentants « classiques » des monomères au cours d'étapes de validation au moyens de petites chimiothèques.

Dans la suite de ce chapitre seront présentés les travaux effectués autour de deux tenseurs pré-existants : le 1,3-benzènedisulfochlorure et l'acide 4-fluoro,3-nitro benzoïque (Figure 2.I.23).

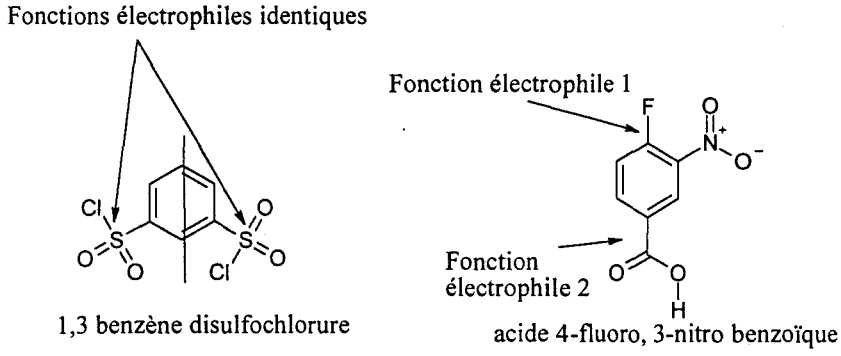


Figure 2.I.23 : Tenseurs homo- et hétéro-bifonctionnels étudiés.

BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 2.I

[1] Bourguignon J.J., Identical and Nonidentical Twin Drugs, *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth C.G. Ed., ***1996***, 1st Ed., Academic press, pp 261-293.
[2] Zhao H., Neamati N., Mazumder A., Sunder S., Pommier Y., Burke T.R., Jr., Arylamide inhibitors of HIV-1 integrase, J.Med.Chem., ***1997***,40, pp 1186-1194.
[3] Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Pharmacology , 3rd Ed., Churchill Livingstone, ***1995***, p 43.
[4] Boger D.L. , Chai W., Solution-phase Combinatorial Synthesis : Convergent multiplication of Diversity via the Olefin Metathesis Reaction, Tetrahedron, ***1998***, 54, pp 3955-3970.
[5] Landry Y., Gies J.P., Pharmacologie Moléculaire : mécanisme d'action des médiateurs et des médicaments, ***1993***, 2nd Ed, Arnette Ed ., pp
[6] Schultz L.W. , Clardy J., Chemical Inducers of Dimerization :The Atomic Structure of FKBP12-FK1012A-FKBP12, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, ***1998***, 8, pp 1-6.
[7] Diver S.T., Schreiber S.L., Single-Step Synthesis of Cell-Permeable Protein Dimerizers That Activate Signal Transduction and Gene expression, J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119, pp 5106-5109.
[8] Dessolin J., Galea P., Vlieghe P., Chermann J-C., Kraus J-L., New Bicyclam-AZT conjugates : Design, Synthesis, Anti-HIV Evaluation, and their interaction with CXCR-4 Coreceptor, J.Med.Chem., ***1999***, 42, pp 229-241.
[9] Boger D.L., Ducray P., Chai W., Jiang W., Goldberg J., Higher order iminodiacetic acid libraries for probing Protein-protein interactions, Bioorg. & Med. Chem. Lett., ***1998***, 8, pp 2339-2344.
[10] Boger D.L., Chai W., Ozer R.S., Andersson C.M., Solution-Phase Combinatorial Synthesis via the olefin metathesis reaction, Bioorg. & Med. Chem. Lett., ***1997***, 7, n°4, pp 463-468.
[11] Boger D.L., Ozer R.S., Andersson C.M., Generation of targeted C2 symmetrical Coumpound Libraries by Solution-Phase Combinatorial Chemistry, Bioorg. & Med. Chem. Lett., ***1997***, 7, n°14, pp1903-1908.
[12] Stankova M., Lebl M., Library generation through successive substitution of trichlorotriazine, Molecular Diversity, ***1996***, 2, pp 75-80.
[13] Gustafson G.R., Baldino C.M., O'Donnell M.E., Sheldon A., Tarsa R.J., Verni C.J., Coffen D.L., Incorporation of Carbohydrates and Peptides into Large Triazine-Based Screening Libraries Using Automated Parallel Synthesis, Tetrahedron, ***1998***, 54, pp 4051-4065.
[15] Baudelle R., Melnyk P., Déprez B.P., Tartar A., Parallel Synthesis of Polysubstituted Tetrahydroquinolines, Tetrahedron, ***1998***, 54, pp 4125-4040.
[17] Okawara T., Nakayama K., Furukawa M., Heterocycles, ***1982***, 19, pp1571-1574.
[17] Shalmashi A., Palit G., Srivastava V.K., Shanker K., Indian J. Chem., **1994**, 33B, pp 597-599.
[18] Wermuth C.G., Molecular Variations in Homologous Series : Vinylogues and Benzologues, *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth C.G. Ed., ***1996***, 1st Ed., Academic Press, pp 181-202.
[19] Cannon J.G., Analog Design, Burger's Medicinal and Drug Discovery, 5th Ed., Volume 1 : Principles and Practice, Wolff M.E. Ed., John Wiley and Sons, ***1995***, p 788.
[21] Eicher T., Hauptmann S., The Chemistry of Heterocycles, Thieme Organic Chemistry Monograph Series, **1995**, 174-177.

2.II CHIMIOTHEQUES DE N,N'-BENZÈNEDISULFONAMIDES.

2.II.1 Introduction

2.II.1.1 Intérêt des benzènedisulfonamides du point de vue de la synthèse chimique.

L'intérêt d'une chimiothèque s'évalue selon les critères suivants :

- Elle fait appel à une chimie à haut rendement.
- Elle présente peu de sous-produits ou des sous-produits identifiables.
- Elle est robotisable.
- Elle est composée de produits non connus et non commerciaux.
- Elle contient des produits présentant de nombreux pharmacophores et de rigidité moyenne.
- Elle permet le développement facile d'analogues.

Deux chimiothèques de N,N'-benzènedisulfonamides (Figure 2.II.1) ont été synthétisées. Ces composés sont obtenus par substitution nucléophile des benzènedisulfochlorures, tenseurs homo-bifonctionnels, correspondants. Pour obtenir un ensemble des composés plus divers que celui des N-nucléophiles de départ, il est nécessaire de faire réagir deux N-nucléophiles différents afin d'obtenir toutes les combinaisons et donc les disulfonamides asymétriques correspondants. Ces chimiothèques remplissent tout à fait les critères définis plus haut. Nous avons vérifié qu'aucun composé de ce type ne se trouve répertorié dans ACD. Cette chimiothèque présente donc une réelle originalité. Nous présenterons les études qui ont précédé la synthèse de ces deux chimiothèques.

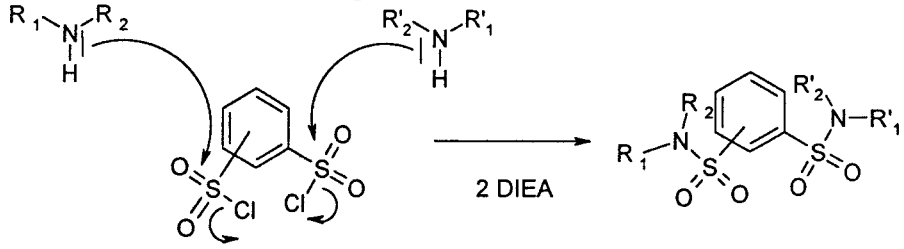


Figure 2.II.1 : Schémas de synthèse des chimiothèques de N,N'-benzènedisulfonamides.

Des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides symétriques ont déjà été synthétisés pour des applications très différentes (Figure 2.II.2). L'utilisation de ce tenseur a permis de préparer des matériaux photosensibles utilisables en imprimerie, par l'introduction d'une fonction azide sur l'amine substituante [1]. La synthèse est réalisée dans un solvant inerte avec la pyridine. Une autre application est la synthèse de dérivés symétriques d'esters d'acides thiophosphoniques vasodilatateurs [2]. L'étape de substitution du 1,3-benzènedisulfochlorure est réalisée dans le benzène en présence de potasse 2M dans l'éthanol. Récemment, des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides ont été utilisés comme récepteurs à anions [3].

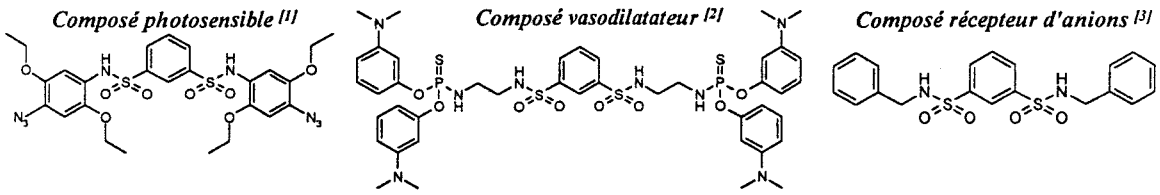


Figure 2.II.2 : Structures de trois N,N'-1,3-benzènedisulfonamides et leurs applications.

2.II.1.2 Intérêt des benzènedisulfonamides du point de vue biologique.

Outre les éventuelles applications biologiques évoquées dans la première partie de ce chapitre, et dues à l'utilisation de tenseurs, il est important de noter que les groupements aryl-sulfonamides sont très souvent présents dans des molécules antagonistes sur différentes cibles biologiques comme le récepteur au Neuropeptide Y[4], le récepteur de l'endothéline [5], ou les inhibiteurs de metalloprotéases[6], ...(Figure 2.II.3).

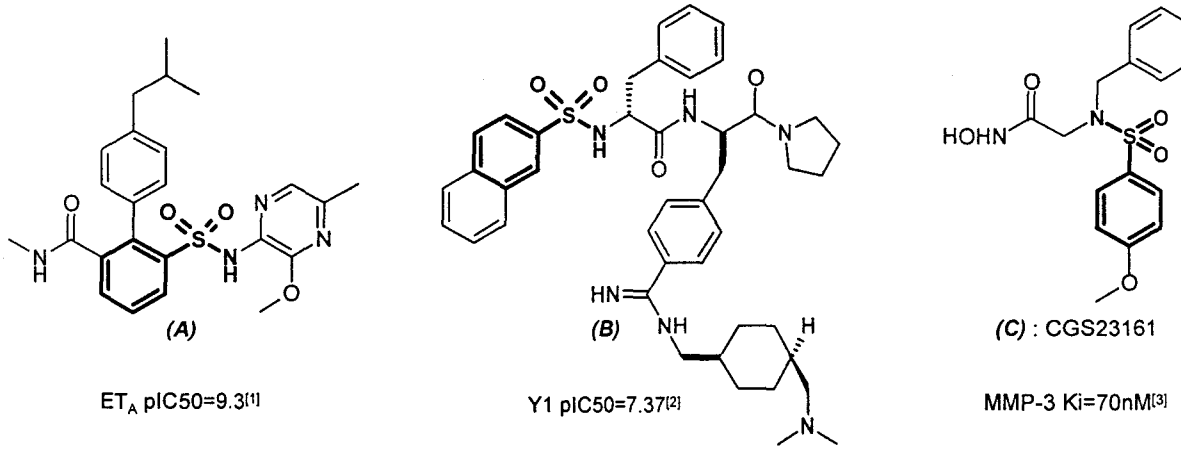


Figure 2.II.3 : Exemples de molécules actives présentant un groupement aryle-sulfonamide [4],[5],[6].

On peut noter ici que le composé *(A)* (Figure 2.II.3) est doublement intéressant car la fonction méthylamide pourrait très facilement faire l'objet d'un remplacement isostère par un groupement N-methylsulfonamide. Le composé correspondant ferait partie de la même série chimique que les N,N'-1,3-benzènedisulfonamides.

Un autre exemple montre l'activité inhibitrice de l'anhydrase carboxylique (activité diurétique) portée par la fonction $-SO_2NH_2$ des benzènedisulfonamides N-substituées (Figure 2.II.4)[7].

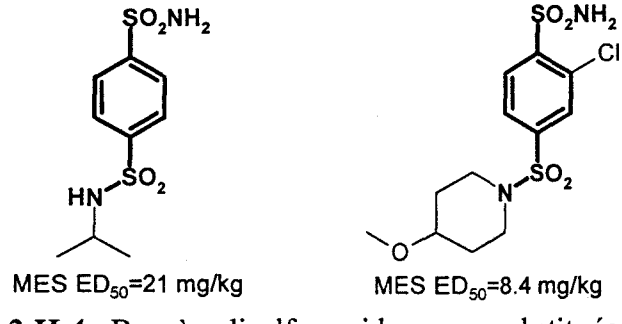


Figure 2.II.4 : Benzènedisulfonamides monosubstituées actives sur l'anhydrase carboxylique [7].

Pour l'ensemble des raisons citées ici, il nous a donc paru intéressant de synthétiser des chimiothèques de N,N'-benzènedisulfonamides afin d'engendrer de nouvelles molécules utilisables dans des criblages biologiques primaires afin de trouver de nouvelles séries chimiques actives.

2.II.2 Chimiothèque de N,N'-1,3-benzènedisulfonamides.

2.II.1.1 Evaluation de la synthèse en solution de N,N'-1,3-benzènedisulfonamides.

La synthèse de ces N,N'-1,3 benzènedisulfonamides a été étudiée en solution. La réaction doit être facilement utilisable dans un système robotique et permettre la synthèse d'un grand nombre de ces composés. L'idée de départ était d'introduire de manière séquentielle deux N-nucléophiles (N_1 et N_2) différents pour n'obtenir que le N,N'-1,3-benzènedisulfonamide asymétrique dans le milieu réactionnel.

A. Le protocole séquentiel.

Le tenseur est solubilisé dans le THF afin d'éviter la dégradation des fonctions sulfochlorures avant la réaction. Le DMF est utilisé comme solvant pour les N-nucléophiles compte-tenu des études de solubilité faites sur une large gamme de ces composés. Ce solvant est d'ailleurs compatible avec une robotisation de la réaction.

Le protocole est inspiré de la synthèse de monosulfonamides. A un volume v d'une solution du N-nucléophile N_1 0,1M avec un équivalent de base, est ajouté un volume v/20 d'une solution 0,5M dans le THF de 1,3 benzènedisulfochlorure. Le mélange est agité pendant quelques secondes. Après un temps intermédiaire *t*, un volume v d'une solution du N-nucléophile N_2 0,1M avec un équivalent de base, est ajouté. Différents solvants ont été utilisés pour les N-nucléophiles et les temps intermédiaires ont été variés (Tableau 2.II.1).

La réaction, ici mettant en jeu la phénéthylamine (N_1) et la p-chloro-phénéthylamine (N_2), est suivie en HPLC ou en LC/MS. Quelles ques soient les conditions réactionnelles choisies, le N,N'-1,3-benzènedisulfonamide asymétrique ***(1)*** attendu n'est pas obtenu majoritairement. Le produit majoritaire est le N,N'-1,3-benzènedisulfonamide symétrique de la phénethylamine ***(2)***. On observe également un peu de N,N'-1,3-benzènedisulfonamide symétrique de la p-chlorophénethylamine ***(3)*** et les acides 3-(N-phénéthyl)-sulfonamide-benzènesulfonique ***(4)*** et acides 3-(N-(p-chloro)-phénéthyl)-sulfonamide-benzènesulfonique ***(5)*** ainsi que les N-nucléophiles non modifiés (Figure 2.II.5).

Solvant	***Temps Intermédiaires t (min)***			
DMF	0.5	1	2	5
ACN	0.5	1	2	5
THF	0.5	1	2	5

Tableau 2.II.1: Conditions réactionnelles testés pour le protocole séquentiel.

Avant l'ajout de la p-chloro-phénéthylamine, le 1,3-benzènedisulfochlorure est en présence la phénéthylamine uniquement. Si les substitutions de chacune des fonctions sulfochlorures étaient indépendantes, le mélange obtenu serait alors composé à 50% de N,N'-diphénéthyl-1,3-benzènedisulfonamide ***(2)*** et de 50% d'acide acides 3-(N-phénéthyl)-sulfonamide-benzènesulfonique ***(4)*** (qui correspond à la mono-substitution) il s'agit d'une répartition statistique dans le cas d'un problème symétrique. Or, seules des traces de cet acide sont observées, et le dérivé N,N'-1,3-benzènedisulfonamide est toujours très largement majoriatire. L'attaque sur la deuxième fonction sulfochlorure semble donc être favorisée par la première substitution.

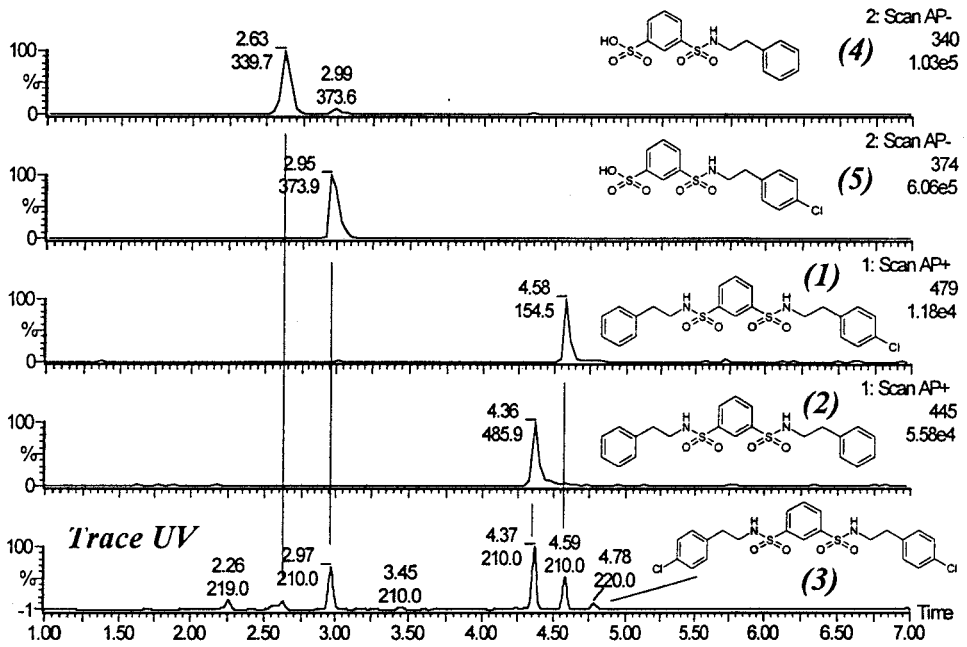


Figure 2.II.5 : Chromatogrammes LC/MS obtenus lors de la synthèse de N-(1-phenéthyl), N'-(1-(p-chloro) phenéthyl)-benzène-1,3-disulfonamide *(1)* .

Dans une réaction de substitution, le choix du solvant est très important. En effet, celui-ci peut favoriser ou non la cinétique. Selon les règles de Hughes-Ingold, dans le cas d'une substitution mettant en jeu des réactifs neutres et induisant une apparition de charges différentes lors du passage à l'état de transition, l'utilisation d'un solvant polaire accélère la réaction [8].

Le DMF, solvant aprotique polaire, est donc un bon choix pour notre réaction. Cependant, il est légérement nucléophile, (comme dans la réaction de Vilsmeier-Haack) et dégrade les fonctions sulfochlorures (Figure 2.II.6). La concentration en DMF étant très supérieure à celle du sulfochlorure, elle est considérée comme invariante au cours du temps. La solvolyse est donc de pseudo-premier ordre et on ne peut pas distinguer entre la substitution nucléophile d'ordre 1 et la substitution nucléophile d'ordre 2 [8] .

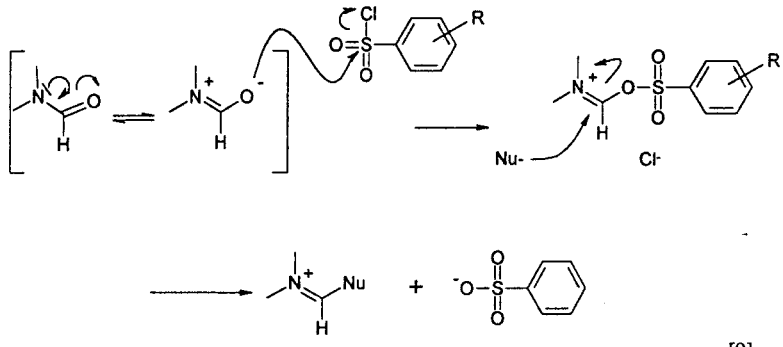


Figure 2.II.6 : Solvolyse du sulfochlorure par le DMF[9]

Au vu des problèmes observés pour obtenir les produits attendus par le protocole séquentiel, la synthèse en mélange est envisagée. Dans ce cas, le mélange de trois N,N'-1,3-benzènedisulfonamides est attendu (Figure 2.II.7) :le disulfonamide asymétrique et les deux disulfonamides symétriques correspondants.

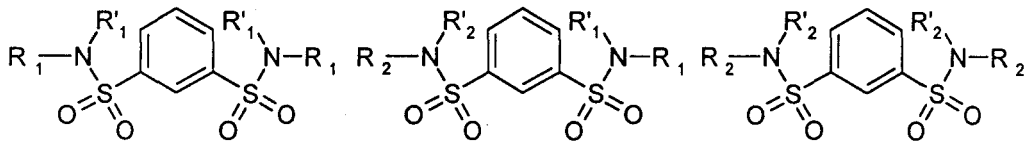


Figure 2.II.7 : Le mélange de N,N'-1,3-benzènedisulfonamides

Nous avons essayé de modéliser la réaction du point de vue cinétique afin de prévoir la distribution des concentrations des différents N,N'-1,3-benzènedisulfonamides.

B. Etude cinétique de la synthèse en mélange.

Dans la littérature, la substitution nucléophile sur les halogénures de groupement sulfonyles a d'abord été comparée à celle mettant en jeu les halogénures d'acides carboxyliques. Pour ces derniers, l'état de transition est tétrahédrique. Puisque le soufre possède une orbitale *d* vacante, il a été tout d'abord envisagé, par analogie, un état de transition avec cinq substituants sur autour de l'atome central (***(A)*** Figure 2.II.8)[10] .

Des études sur la stéréospécificité de cette réaction ont mis en évidence une inversion de configuration, compatible avec un mécanisme de type SN_2[11]. Les études cinétiques ont montré que l'état de transition était en fait trigonal bipyramidal (***(B)*** Figure 2.II.8)[12]. Celui-ci favorise la réaction car le N-nucléophile et l'halogène partant sont dans un plan perpendiculaire à celui contenant les autres substituants.

De façon plus générale, le mécanisme, suivant les substituants, peut évoluer vers une substitution nucléophile d'ordre1 (état de transition lâche) ou vers un mécanisme dont l'état de transition est le penta-coordinat (état de transition serré)[13].

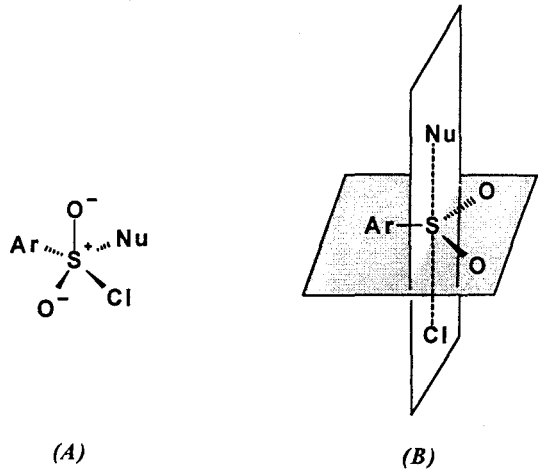


Figure 2.II.8 : Etats de transition pour la substitution sur un groupement sulfonyle.

Il a été également observé dans le cas de substituants porteurs d'un hydrogène en α, le passage par un intermédiaire de type sulfène. Le mécanisme mis en évidence est de type élimination-addition (Figure 2.II.9)[10].

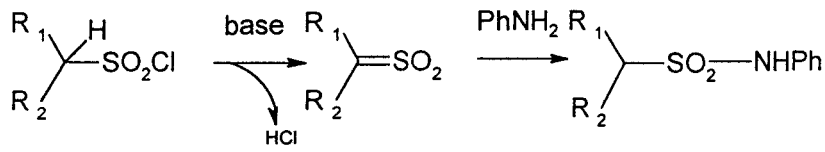
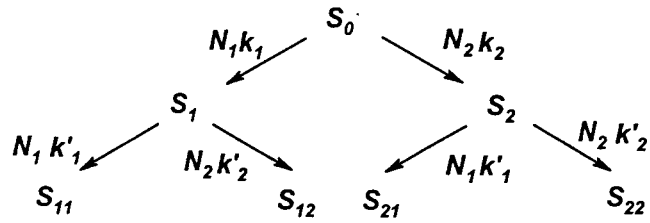


Figure 2.II.9 : Mécanisme d'élimination-addition [10].

Le système réactionnel a été schématisé (Figure 2.II.10) et les 5 hypothèses suivantes (H_1 à H_5) ont été introduites pour faciliter sa résolution.



S_0 : disulfochlorure non substitué.
N_1: N-nucléophile 1.
N_2 : N-nucléophile 2.
S_1 : disulfochlorure monosubstitué par le N-nucléophile 1.
S_2 : disulfochlorure monosubstitué par le N-nucléophile 2.
S_{11} : disulfonamide symétrique du N-nucléophile 1.
S_{22} : disulfonamide symétrique du N-nucléophile 2.
S_{12} et S_{21} : disulfonamide asymétrique.
ki : constantes de vitesse de la première substitution.
k'i :constantes de vitesse de la seconde substitution.

Figure 2.II.10 : Le système réactionnel.

H_1 : La réaction est strictement de type SN_2.
H_2 : Les k'i correspondent à l'attaque du N-nucléophile Ni sur n'importe quel dérivé monosubstitué Sj.
H_3 : Quelque soit le N-nucléophile envisagé, le rapport des constantes de vitesse de l'attaque sur le dérivé monosubstitué, et de l'attaque sur le disulfochlorure est identique.
H_4 : La solvolyse du disulfochlorure par le DMF n'est pas prise en compte.
H_5 : L'intervention de la base n'est pas évaluée.

Le système réactionnel est un système complexe qui inclut des réactions composées concurrentes (ou compétitives) **(A)** et des réactions complexes à séquence ouverte (réactions où S est porteur de deux fonctions de même nature) **(B)** (Figure 2.II.11).

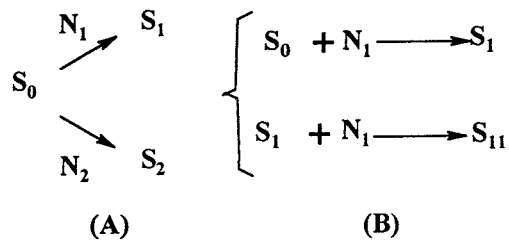


Figure 2.II.11 : Les sous-systèmes réactionnels.

N_1 et N_2 imposent des constantes de vitesses k_1 et k_2 a priori différentes. L'étude du système consiste donc essentiellement à établir la réactivité comparée, représentée par le rapport $\rho=(k_2/k_1)$, des deux réactifs N_1 et N_2 par rapport à un même co-réactif S_0 dans des conditions rigoureusement identiques.

Les systèmes de type **(A)** et **(B)** (Figure 2.II.11) sont facilement résolus et intégrés séparement. Cela est impossible pour le système réactionnel complet. Les dérivées par rapport au temps des différents réactifs, produits et intermédiaires monosubstitués peuvent néanmoins facilement être exprimées:

$d[S0]/dt = - k_1 x[S_0]x[N_1] - k_2 x[S_0]x[A_2]$

$d[N_1]/dt = - k_1 x[S_0]x[N_1] - k'_1 x[S_1]x[N_1] - k'_1 x[N_2]x[N_1]$
$d[N_2]/dt = - k_2 x[S_0]x[N_2] - k'_2 x[S_1]x[N_2] - k'_2 x[S_2]x[N_2]$

$d[S_1]/dt = k_1 x[S_0]x[N_1] - k'_1 x[S_1]x[N_1] - k'_2 x[S_1]x[N_2]$
$d[S_2]/dt = k_2 x[S_0]x[N_2] - k'_1 x[S_2]x[N_1] - k'_2 x[S_2]x[N_2]$

$d[S_{11}]/dt = k'_1 x[S_1]x[N_1]$
$d[S_{12}]/dt = k'_2 x[S_1]x[N_2]$
$d[S_{22}]/dt = k'_2 x[S_2]x[N_2]$

Par le calcul, il est possible de simuler l'avancement de la réaction, en augmentant le temps t d'un incrément dt à chaque étape et en suivant l'évolution des concentrations des différentes espèces. Puisque l'intérêt est de faire varier ρ, un changement de variables s'impose :

$\rho = (k_2/k_1)$ avec $k_2 \geq k_1$ car le problème est symétrique.
$\rho' = (k'i / ki)$ $\forall$i (traduction de H_2).

$[N_1]_0 = [N_2]_0 = [S_0] = \mathbf{c_0}$,
$\mathbf{n_1} = [N_1]$, $\mathbf{n_2} = [N_2]$,
$\mathbf{u_0} = k_1 x[S_0]$, $\mathbf{u_1} = [S1]$, $\mathbf{u_2} = [S2]$,

$\mathbf{v_1} = k_1 x[S_0]x[N_1] = \mathbf{u_0} \times \mathbf{n_1}$,
$\mathbf{v_2} = k_2 x[S_0]x[N_2] = \rho \times \mathbf{u_0} \times \mathbf{n_2}$,
$\mathbf{v_{11}} = k'_1 x[S_1]x[N_1] = \mathbf{u_1} x \mathbf{n_1} x \rho'$,
$\mathbf{v_{12}} = k'_2 x[S_1]x[N_2] = \rho \times \mathbf{u_2} \times \mathbf{n_2} \times \rho'$,
$\mathbf{v_{21}} = k'_2 x[S_2]x[N_1] = \mathbf{u_2} \times \mathbf{n_1} \times \rho'$,
$\mathbf{v_{22}} = k'_2 x[S_2]x[N_2] = \rho \times \mathbf{u_2} \times \mathbf{n_2} \times \rho'$.
$\mathbf{u_{11}} = [S_{11}]$, $\mathbf{u_{12}} = [S_{12}] + [S_{21}]$, $\mathbf{u_{22}} = [S_{22}]$,

D'où :

$d[S_1] = (\mathbf{u_1} + \mathbf{v_1} - \mathbf{v_{11}} - \mathbf{v_{12}})xdt$
$d[S_2] = (\mathbf{u_2} + \mathbf{v_2} - \mathbf{v_{21}} - \mathbf{v_{22}})xdt$
$d[S_{11}] = (\mathbf{u_{11}} + \mathbf{v_{11}})xdt$
$d[S_{12}] = (\mathbf{u_{12}} + \mathbf{v_{12}} + \mathbf{v_{21}})xdt$ car le tenseur est symétrique
$d[S_{22}] = (\mathbf{u_{22}} + \mathbf{v_{22}})xdt$

Quelque soit la réactivité relative ρ des N-nucléophiles en présence et le rapport ρ', les disulfonamides symétriques seront toujours produits avec la même concentration. Ceci est démontré par les équations de conservation de la matière pour les deux N-nucléophiles <u>en fin de réaction</u> :

(I) $2\mathbf{u_{11}} + \mathbf{u_{12}} = [N_1]_0 = \mathbf{c_0}$
(II) $2\mathbf{u_{22}} + \mathbf{u_{12}} = [N_2]_0 = \mathbf{c_0}$

(I)- (II) = $2(\mathbf{u}_{11}+ \mathbf{u}_{22}) = [N_1]_0-[N_2]_0= 0$

Ceci implique que $\mathbf{u}_{11}= \mathbf{u}_{22}$. Néanmoins ces équations ne sont vraies qu'en l'absence de solvolyse. Le programme écrit en Pascal a permis d'aboutir aux résultats présentés dans la Figure 2.II.12.

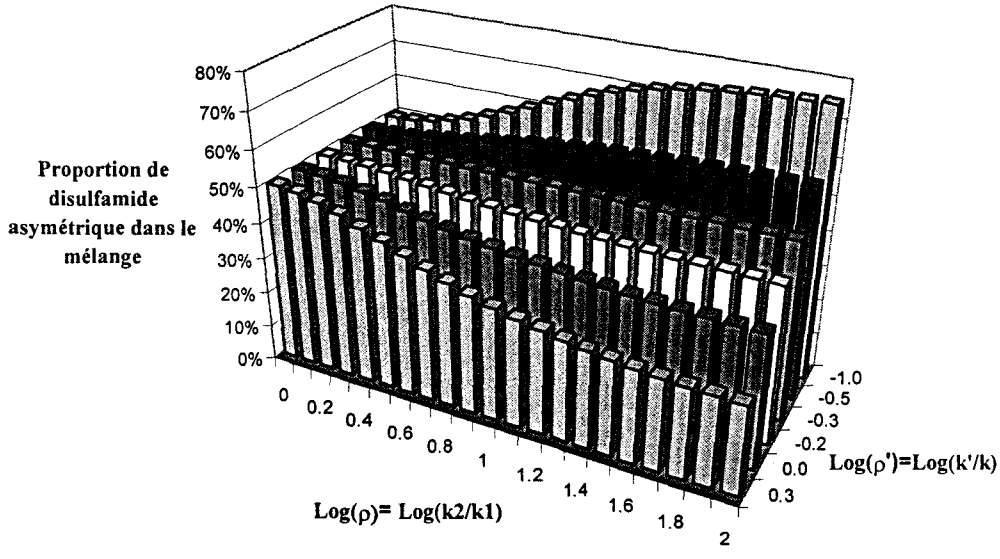


Figure 2.II.12 : Proportion calculée de N,N'-1,3-benzènedisulfonamide asymétrique dans le mélange en fonction de la réactivité comparée des deux N-nucléophiles

$$(\mathbf{u12} / (\mathbf{u11} + \mathbf{u12} + \mathbf{u22}) = f(\mathrm{Log}(\rho'), \mathrm{Log}(\rho))$$

Le rapport ρ'est le rapport des constantes de vitesse de la seconde étape par rapport à la première étape. Il représente donc la façon dont la deuxième substitution est influencée par la première. La Figure 2.II.12 montre que, dans le cas où la seconde substitution est favorisée par la première, c'est-à-dire $\rho' \geq 1$ ou $\mathrm{Log}(\rho') \geq 0$, la proportion de disulfonamide asymétrique augmente lorsque la réactivité des N-nucléophiles en présence est similaire. Cependant, cette proportion ne dépasse pas les 50%. Ces résultats doivent être confrontés à l'expérience pour pouvoir être validés.

2.II.1.2 Résultats expérimentaux de la synthèse en mélange des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides.

A. Sélection et validation des N-nucléophiles pour la synthèse en mélange.

Parmi l'ensemble des N-nucléophiles disponibles, 373 monomères ont été choisis pour être soumis à une étape de validation pour la synthèse des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides en mélange. Les grandes catégories de N-nucléophiles retenues après les tests préliminaires sont : les amines primaires aliphatiques, les amines secondaires aliphatiques, les anilines primaires, les amino-acides, les α-amino-alcools. Le principe de la validation est de comparer tous les N-nucléophiles avec la même amine dite « qualifiante » *A*. La 4-chloro-benzhydrylamine a été choisie pour sa réactivité moyenne et son hydrophobie permettant une meilleure séparation des 3 disulfonamides en HPLC.

Un volume v d'une solution 0,5M de1,3-benzènedisulfochlorure dans le THF réagit sur un volume 40v de mélange équimolaire de deux solutions 0,1M dans le DMF de N-nucléophiles, en présence de deux équivalents de DIEA (un équivalent par fonction sulfochlorure). Le mélange des trois disulfonamides est obtenu. La Figure 2.II.13 présente un milieu réactionnel type.

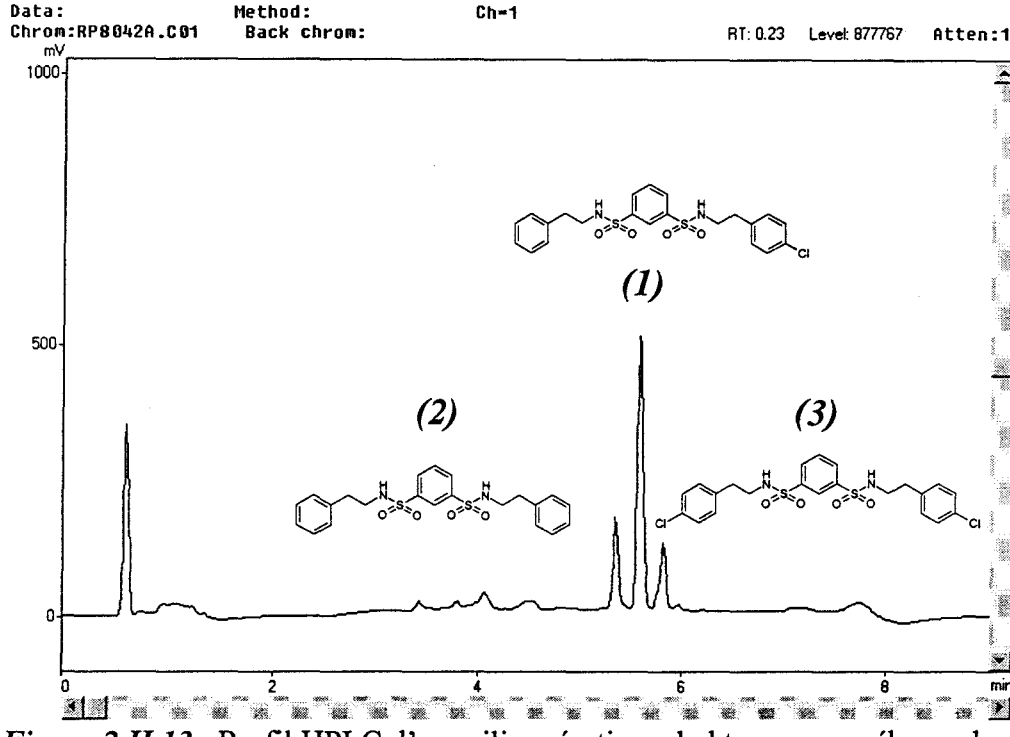


Figure 2.II.13 : Profil HPLC d'un milieu réactionnel obtenus par mélange de deux N-nucléophiles avec le 1,3 benzènedisulfochlorure.

Les techniques d'analyse quantitative et de caractérisation utilisées sont l'HPLC et la LC/MS. Les critères retenus pour la sélection des N-nucléophiles sont les suivants :

- **critère d'hétérodimérisation :** présence en quantité suffisante, au moins 50% au vu du chromatogramme HPLC, du N,N'-1,3-benzènedisulfonamide asymétrique et confirmation de la présence de l'ion moléculaire en spectrométrie de masse. La présence du benzènedisulfonamide asymétrique est la base même de la production de diversité dans cette banque de produits d'où la nécessité de donner priorité à ce critère.

- **critère de réactivité :** la réactivité des N-nucléophiles à qualifier est évaluée par le rapport amine « qualifiante » résiduelle *A* / benzènedisulfonamide symétrique de l'amine « qualifiante ». En effet, si le N-nucléophile à valider *N*, réagit plus vite que l'amine « qualifiante » *A*, le benzènedisulfonamide symétrique de *N* et le benzènedisulfonamide asymétrique se font plus rapidement que le benzènedisulfonamide symétrique de *A*. Ainsi, l'amine *A* réagit avec le 1,3-benzènedisulfochlorure restant. Cette dernière réaction n'est pas totale compte-tenu de l'hydrolyse du disulfochlorure. Plus le rapport est élevé, plus le N-nucléophile *N* à valider est réactif.

- **critère de conversion :** les quantités des trois N,N'-1,3-benzènedisulfonamides du mélange, évaluées par les aires respectives des pics dans le chromatogramme HPLC, sont comparées à la quantité théorique attendue. Les benzènedisulfonamides symétriques sont synthétisés afin d'évaluer cette quantité théorique attendue. Les disulfonamides asymétriques

n'étant pas isolés des mélanges, l'aire HPLC qui correspondrait à la synthèse du produit asymétrique seul est extrapolée à partir de celle des benzènedisulfonamides symétriques par une moyenne arithmétique. Le pourcentage de conversion ainsi obtenu n'est pas tout à fait exact compte-tenu des hypothèses de travail utilisées :

- ***H_1*** : Les interférences entre le chromophore du premier et celui du second N-nucléophiles dans le dimère sont négligées. L'utilisation d'une simple moyenne arithmétique n'est donc pas entièrement représentative.
- ***H_2*** : Le rendement de la synthèse des benzènedisulfonamides symétriques est supposé quantitatif. Cela est rendu nécessaire compte-tenu de l'impossibilité de mesurer en HPLC la quantité de disulfochlorure restant, ou l'acide disulfonique correspondant. Cette hypothèse suppose que des conversions de 100% vont être pour tous les monomères à valider !

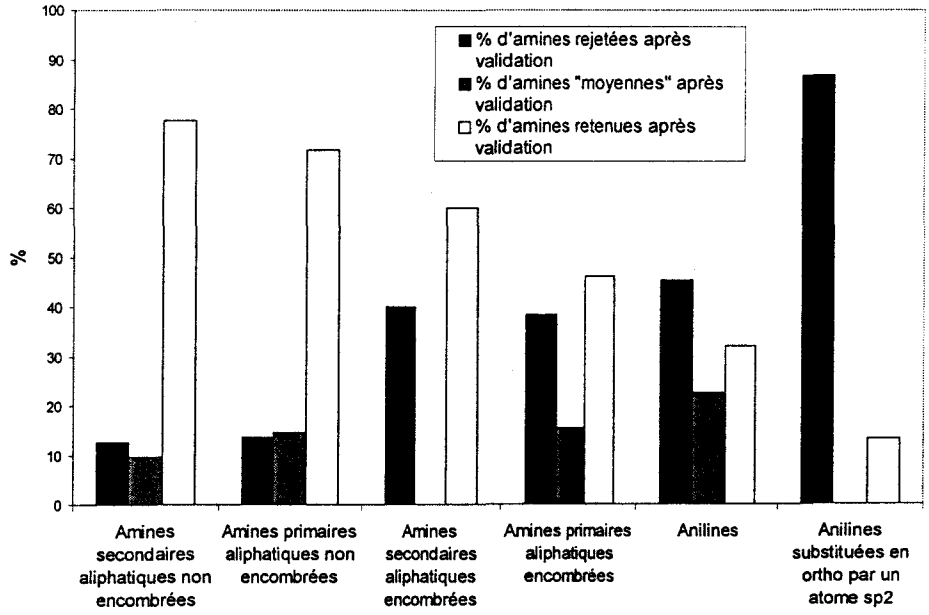


Figure 2.II.14 : Répartition des amines par réactivité pour chaque catégorie soumise à la validation pour la synthèse des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides en mélange.

L'ensemble de ces critères a permis néanmoins de valider ou d'invalider certains N-nucléophiles pour le protocole de synthèse en mélange des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.II.14. Sur les 373 N-nucléophiles 240 ont été retenus, 51 jugées « moyens » et 82 rejetés. Des critères structuraux ont ensuite été employés pour optimiser cette sélection. L'encombrement stérique autour du doublet de l'azote intervient de manière importante, expliquant que les amines primaires et secondaires aliphatiques non encombrées réagissent bien. La réactivité médiocre des anilines s'explique par la faible nucléophilie de ces N-nucléophiles.

La chimiothèque de produits résultante utilisant 240 N-nucléophiles contient **28680** mélanges ((240x240-240(les benzènedisulfonamides symétriques résultant du croisement des mêmes N-nucléophiles))/2 car la chimiothèque est symétrique), constitués de 28680

disulfonamides asymétriques accompagnés de 240 disulfonamides symétriques, ainsi que la diagonale de **240** benzènedisulfonamides symétriques.

B. Confrontation du modèle cinétique avec l'expérience.

L'étude est faite sur dix N-nucléophiles. Les 45 mélanges ((10x10 –10)/2) qui en résultent sont analysés à partir des chromatogrammes HPLC. Pour cela, les N,N'-1,3-benzènedisulfonamides symétriques correspondants (Figure 2.II.15) sont synthétisés, caractérisés en ^{1}H et ^{13}C RMN et utilisés pour faire des courbes d'étalonnage, permettant ainsi une conversion de l'absorbance en concentration.

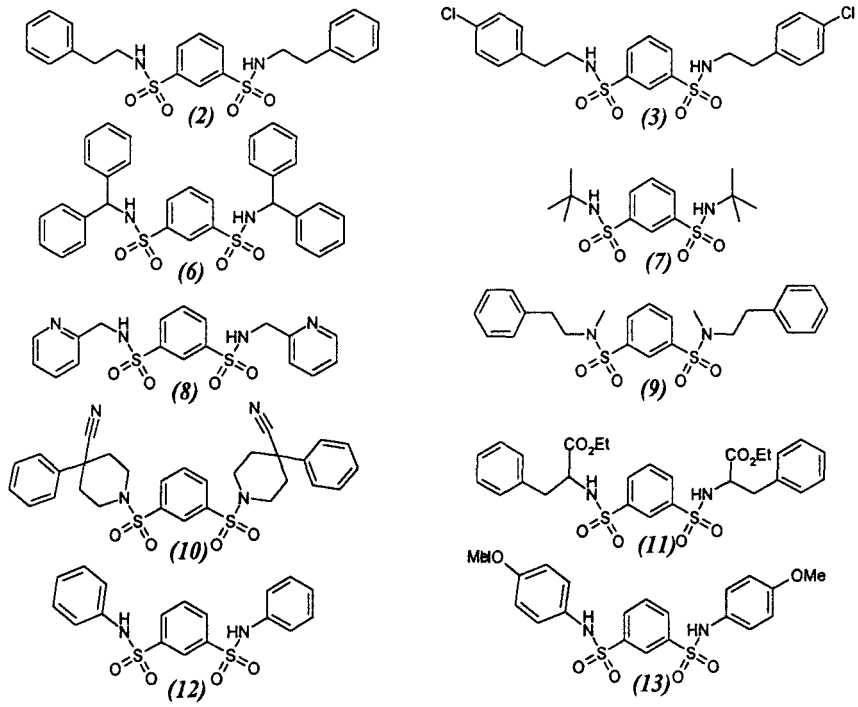


Figure 2.II.15 : Formules des dix N,N'-1,3-benzènedisulfonamides symétriques de référence préparés individuellement.

Les benzènedisulfonamides asymétriques n'étant pas isolés des mélanges, leurs courbes d'étalonnage sont extrapolées de celles des benzènedisulfonamides symétriques par une moyenne arithmétique. Le profil HPLC du mélange réactionnel (absorbances à 215nm ou 254nm) permet d'évaluer les concentrations respectives des différents benzènedisulfonamides.

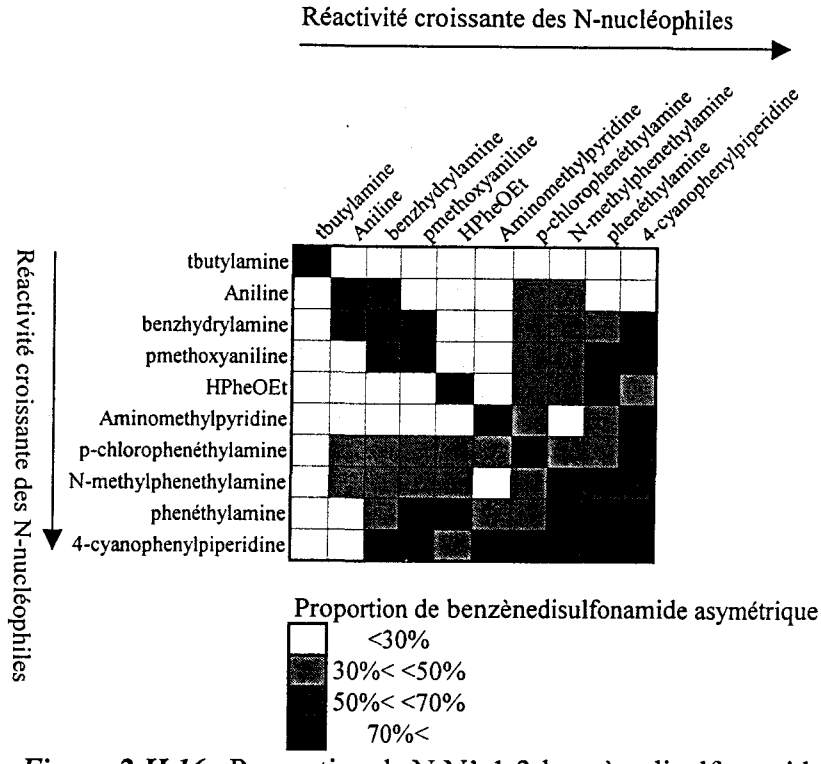


Figure 2.II.16 : Proportion de N,N'-1,3-benzènedisulfonamide asymétrique dans 45 mélanges.

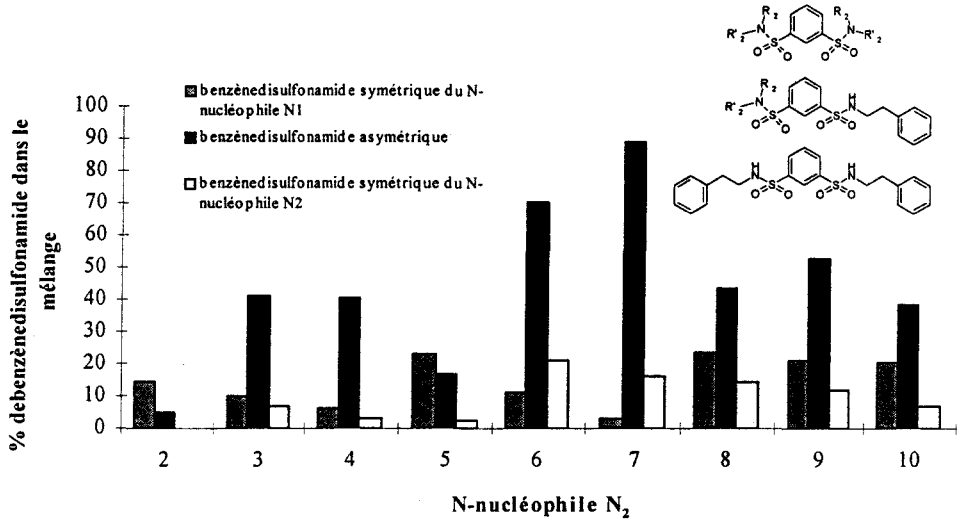


Figure 2.II.17 : Profil des proportions des trois benzènedisulfonamides dans les mélanges réalisés avec la phénéthylamine (N_1).

La Figure 2.II.16 représente la proportion de benzènedisulfonamide asymétrique dans chacun des mélanges. Conformément à la théorie on remarque que la proportion de ce produit augmente lorsque les N-nucléophiles en présence ont une réactivité similaire. Ainsi la phénéthylamine et la 4-cyanophénylpiperidine, amines très réactives, mise en présence du 1,3-benzènedisulfochlorure donnent le benzènedisulfonamide asymétrique correspondant à plus de 85%. De même, les anilines et la benzhydrylamine, moyennement réactives, croisées entre elles, donnent une grande proportion du produit asymétrique. Parallèlement, les zones blanches du graphique correspondent à des croisements de N-nucléophiles de réactivités

différentes. Cependant, outre ces grandes tendances observées, il existe une zone floue du graphe où les croisements donnent une proportion de benzènedisulfonamide asymétrique « moyenne » difficile à prévoir. L'hypothèse selon laquelle la seconde substitution nucléophile est favorisée par la première implique, dans notre modèle cinétique, que la proportion de benzènedisulfonamide asymétrique ne dépasse pas 50%. Or ceci n'est pas vérifié dans les exemples présentés dans la Figure 2.II.16, où les proportions varient d'environ 10% pour les mélanges faisant intervenir la t-butyl-amine à 89% dans le meilleur des cas. De plus la Figure 2.II.17 montre que la proportion des deux benzènedisulfonamides symétriques n'est pas toujours identique. Cela peut-être dû aux hypothèses de calculs mais également au phénomène de solvolyse des fonctions sulfochlorures. Au vu de ces résultats, il conviendrait d'affiner le modèle cinétique pour pouvoir conclure sur l'influence de la première substitution sur la deuxième.

Nous avons également conçu une chimiothèque de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides en nous inspirant des résultats obtenus pour la synthèse des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides en mélange.

2.II.3 Chimiothèque de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides.

2.II.1.1 Etude de diversité comparative des chimiothèques de N,N'-1,3- et N,N'-1,2-benzènedisulfonamides.

Le but de la synthèse de chimiothèques combinatoires est de générer le maximum de composés divers afin d'augmenter la probabilité d'obtenir des hits en criblage biologique primaire. C'est dans cette optique qu'il convient de définir si la synthèse d'une chimiothèque de 1, 2 benzènedisulfonamides augmente la diversité d'une chimiothèque de 1,3 benzènedisulfonamides décrite précédemment. La modélisation moléculaire apporte un élément de réponse à cette question.

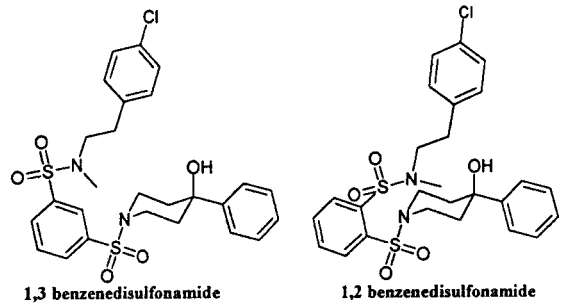
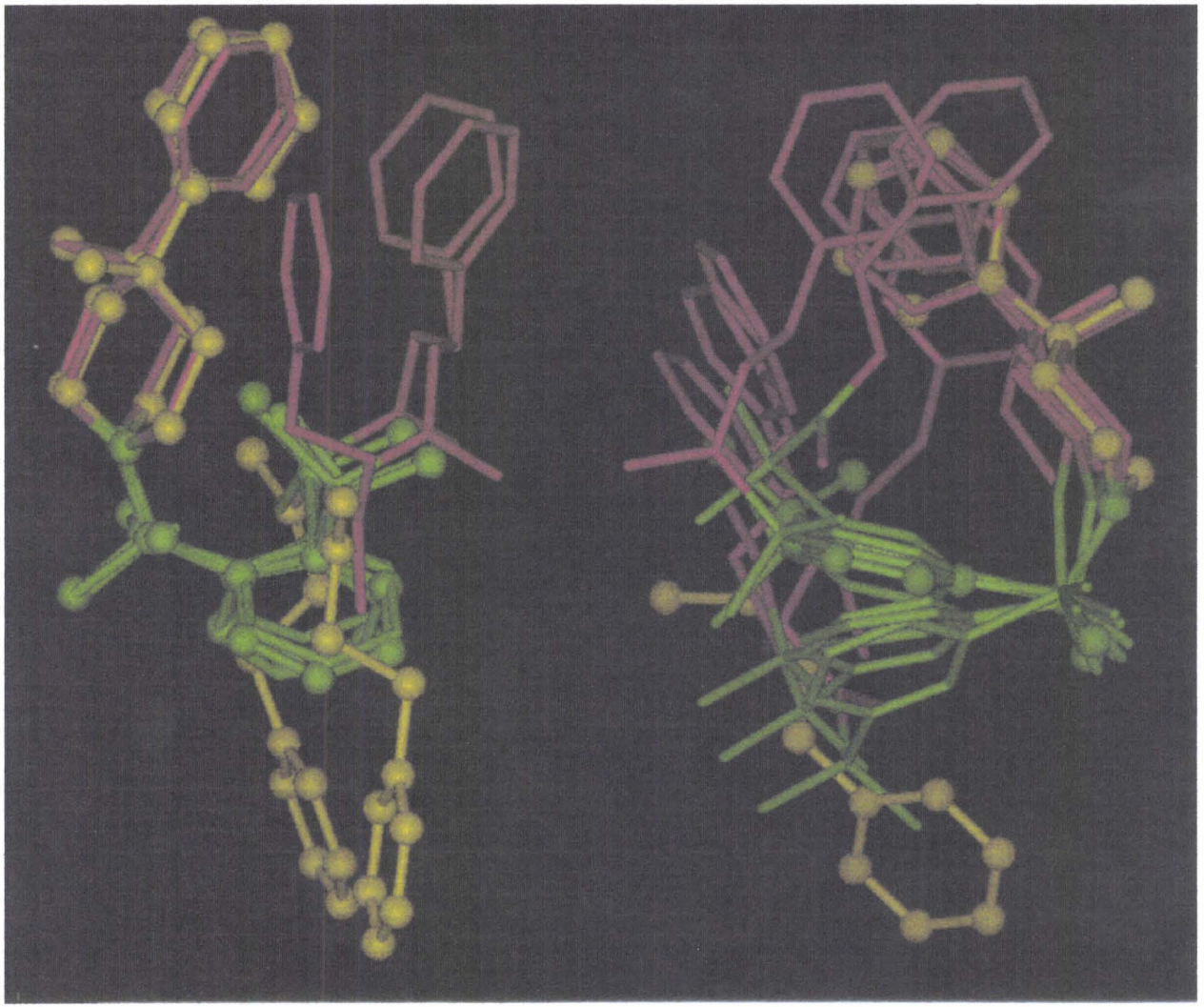


Figure 2.II.18 : Structures des deux molécules choisies pour être modélisées.

Deux N,N'-benzènedisulfonamides ne différant que par leur tenseur ont été modélisés et leurs FBPAs (Fuzzy Bipolar Pharmacophore Autocorrelogrammes) calculés (Figure 2.II.18 et Figure 2.II.20). L'ensemble des FBPAs est une matrice d'histogrammes représentant les distances entre les différents groupements pharmacophores de l'ensemble des conformères de la molécule modélisée. Les interactions hydrophobes, les interactions avec des groupes donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes..., sont ainsi prises en compte (Chapitre 1).

Figure 2.II.19



1,2-benzènedisulfonamide *1,3-benzènedisulfonamide*

Tenseur

Substituants en trans

Substituants en cis

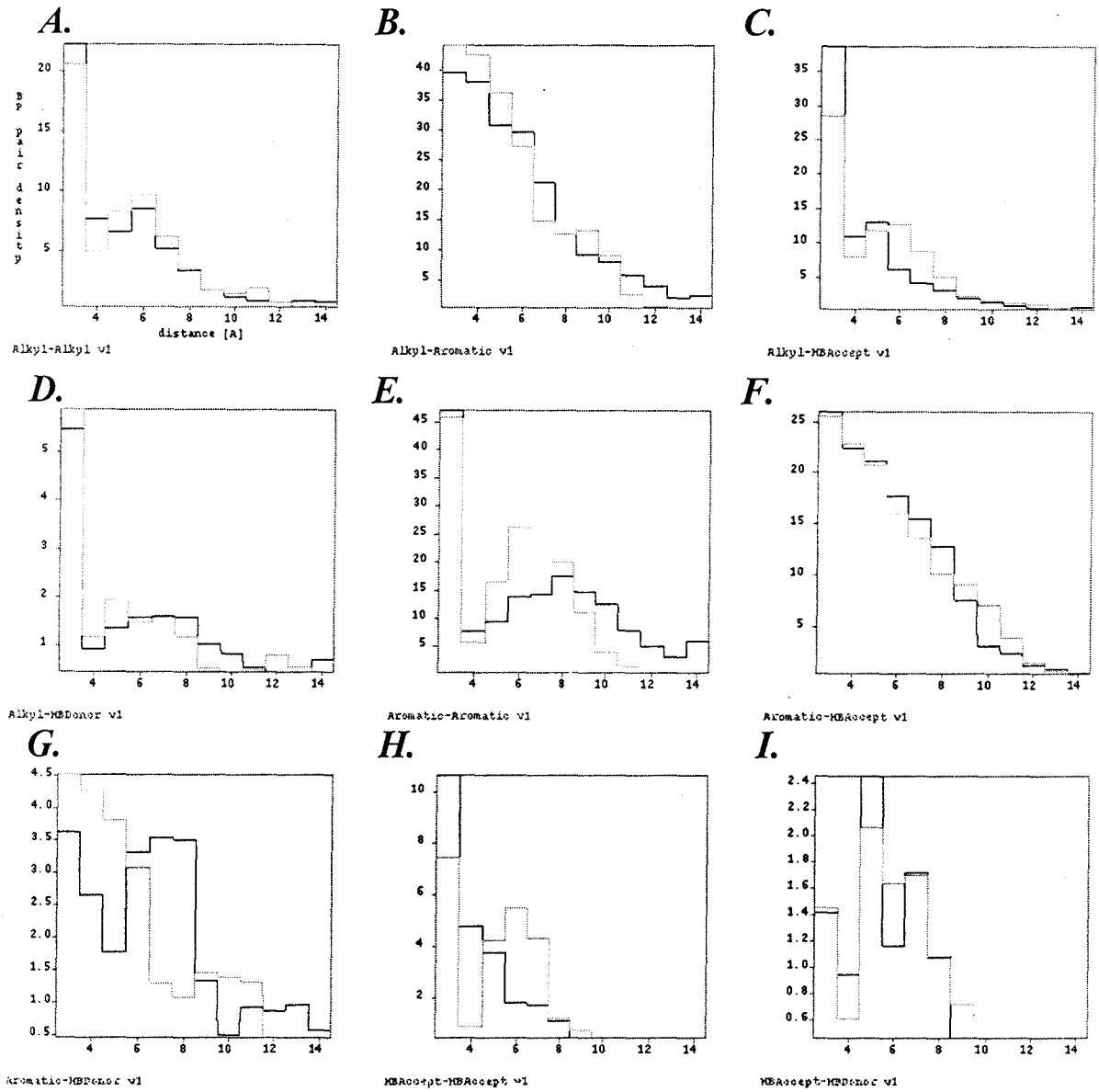


Figure 2.II.20 : FBPAs calculés pour les deux molécules de la Figure 2.II.18 : N,N'-1,2-benzènedisulfonamide en noir, et N,N'-1,3-benzènedisulfonamide en gris.

Dans l'échantillonage conformationnel réalisé, le N,N'-1,3-benzènedisulfonamide présente 9 conformères. L'un d'entre eux présente ses monomères en *trans* du tenseur, ce qui représente 11% des conformères (Figure 2.II.19). Le N,N'-1,2-benzènedisulfonamide possède lui 5 conformères dont deux ont des monomères en *trans*, soit 40% des conformères. Il en résulte que les chaînes latérales des 1,2-benzènedisulfonamides ont une probabilité plus faible d'être proches que celles des 1,3-benzènedisulfonamides. Les autocorrélogrammes ***D.*** et ***E.*** (Figure 2.II.20) montrent une différence d'environ 2 Angströms.

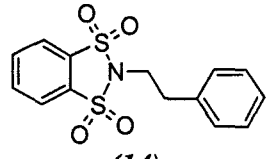
L'autocorrélogramme ***G.*** (Figure 2.II.20) illustrant les interactions Aromatique-Donneurs de liaison hydrogène est très représentatif de la répartition spatiale des deux chaînes latérales car seule l'une des deux amines utilisées possède un groupement donneur (-OH). Il montre donc bien les interactions inter-amines. Dans le cas du 1,2-benzènedisulfonamide, les distances entre ces deux éléments de pharmacophore sont comprises entre 5 et 8 Angströms tandis que pour le 1,3-benzènedisulfonamide, l'espace conformationnel est beaucoup mieux exploré. Ceci traduit une plus grande rigidité des 1,2-benzènedisulfonamides.

Les autocorrélogrammes ***C.*** et ***H.*** (Figure 2.II.20) faisant intervenir les atomes Accepteurs de liaisons hydrogènes, c'est à dire les atomes d'azote, sont caractéristiques des différences de topologie entre les deux tenseurs. Ainsi, ces atomes sont naturellement plus proches dans les disulfamides substituées en ortho, et plus éloignés dans ceux substitués en méta. Les autocorrélogrammes ***A.***, ***B.*** et ***F.*** (Figure 2.II.20) des deux molécules se superposent bien car les interactions inter-chaînes latérales sont « masquées » par les interactions très nombreuses entre atomes sur la même chaîne.

Ainsi, puisque ces deux molécules pourtant semblables du point de vue chimique se comportent différemment dans l'espace, il est prévisible qu'elles auront des interactions différentes avec un récepteur ou une enzyme. La chimiothèque de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides est donc complémentaire de celle des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides.

2.II.1.2 Synthèse en mélange des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides : cas des amines primaires.

Le protocole de synthèse en mélange a également été utilisé dans ce cas. Les premières études consistent comme précédemment à synthétiser quelques disulfonamides symétriques pour tester la réactivité des N-nucléophiles sur le tenseur. Deux cas se distinguent : celui des amines primaires et celui des amines secondaires. Dans le cas de l'utilisation de la phénéthylamine, le protocole « classique » de synthèse dans le DMF fait apparaître un produit majoritaire qui n'est pas le N,N'-1,2-benzènedisulfonamide, et que nous avons supposé être le N,N-1,2-benzènedisulfonylimide correspondant (Figure 2.II.21). En effet contrairement aux benzènemono- et disulfonamides, ce produit ne présente pas de fonctions $-SO_2NH-$ révélées au KI/TDM.



(14)

Figure 2.II.21 : N,N-1,2-benzènedisulfonyl-1-phénéthylamine ***(14)*** .

Les sulfonamides sont des bases très faibles. Pour être réactifs, ils doivent être convertis en leur base conjuguée. Le mécanisme proposé pour la formation des composés disulfonylimides procède donc d'abord par l'arrachement du proton du benzènemonosulfonamide par la base (ici la DIEA) additionnée dans le milieu réactionnel dans le but initial de neutraliser l'acide chlorhydrique libéré par la substitution nucléophile. Cette étape est suivie de la substitution nucléophile d'ordre 2 de l'halogène par l'anion ainsi formé (Figure 2.II.22).

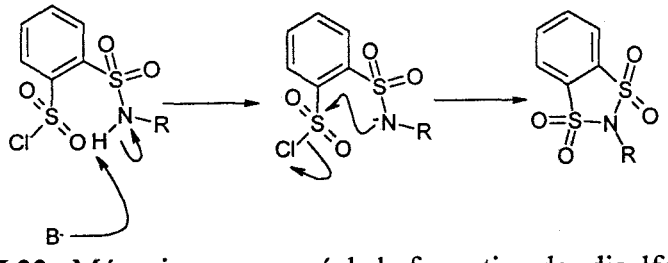


Figure 2.II.22 : Mécanisme supposé de la formation des disulfonylimides.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé plusieurs bases de force croissante : la pyridine (pKa = 5.25), la DIEA (pKa = 11),utilisée dans les conditions normales de la réaction) et la DBU (pKa = 23.9). En parallèle, nous avons essayé de changer le solvant utilisé afin d'obtenir majoritairement le N,N'-1,2-benzènedisulfonamide attendu. Dans notre exemple, la phénéthylamine a été solubilisé dans l'ACN, le DMF ou le DCM. Les chromatogrammes des 9 milieux réactionnels ainsi obtenus sont présentés en Figure 2.II.23.

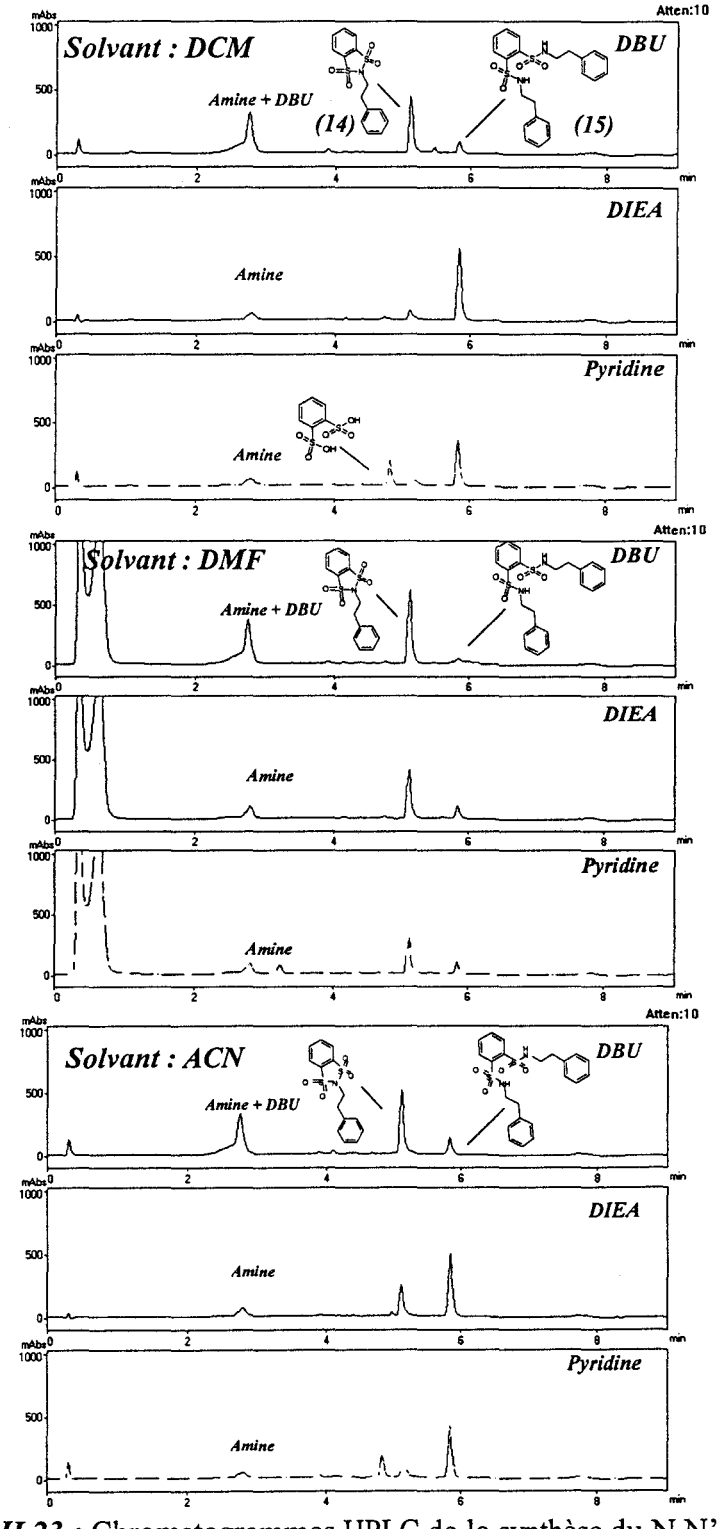


Figure 2.II.23 : Chromatogrammes HPLC de la synthèse du N,N'-di (1-phénéthyl)-1,2-benzènedisulfonamide ***(15)*** dans différents solvants et en présence de différentes bases.

Le mécanisme par déprotonation est vérifié expérimentalement puisque la proportion de benzènedisulfonylimide augmente avec la force de la base. (Figure 2.II.23).

Nous sommes en présence de deux réactions SN_2 schématisées en Figure 2.II.24. Pour comprendre les différences observées entre les solvants utilisés, il faut faire intervenir les effets de solvants pour ce type de réactions et caractériser les trois solvants utilisés (Tableau 2.II.2) [7].

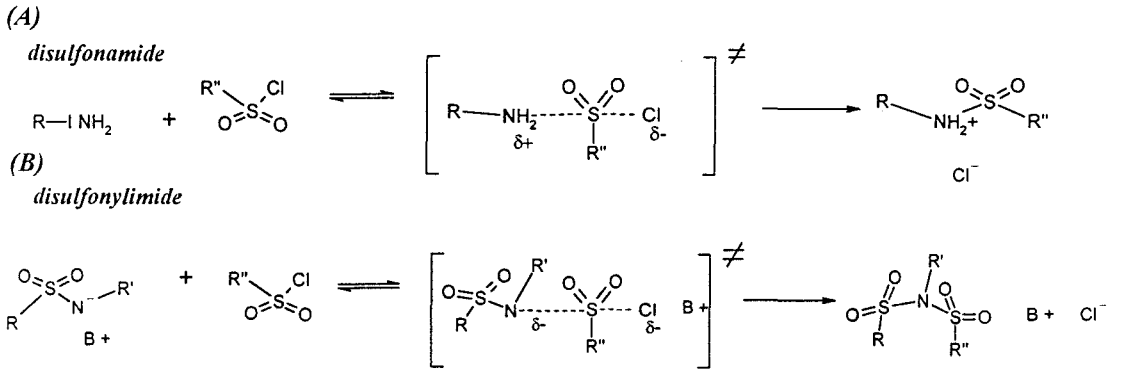


Figure 2.II.24 : Schéma des SN_2.

Dans le cas de la synthèse du benzènedisulfonamide, il y a apparition de charges différentes dans l'état de transition ((**A**), Figure 2.II.24). Selon les règles de Hughes-Ingold, l'augmentation de la polarité du solvant induit une solvatation accrue des espèces les plus chargées. Ainsi une réaction dont le mécanisme est caractérisé par une densité de charge de l'état de transition supérieure à celle de l'état initial, sera accélérée par l'augmentation de la polarité du solvant.

Dans le cas de la synthèse du benzènedisulfonylimide ((**B**), Figure 2.II.24), selon les règles de Hughes-Ingold, la dispersion des charges dans l'état de transition implique la diminution de la vitesse de la réaction avec l'augmentation de la polarité du solvant. Cela est vrai si le solvant est protique. Dans le cas de solvants aprotiques polaires (DMF, ACN), les espèces anioniques sont très peu solvatées (N.A faible), ce qui les rend plus réactives. Ceci explique (dans le cas d'utilisation de base faible ou moyenne), la présence de benzènedisulfonylimide ***(14)*** dans les milieux DMF et ACN et pas dans le DCM où la faible constante diélectrique implique que les anions soient peu solvatés, forment une paire d'ions intimes avec B+ et ne soient donc pas réactifs[7].

La réaction de type **(A)**, où l'espèce réactive n'est pas un anion, est certes favorisée dans des solvants aprotiques polaires mais elle n'est pas défavorisée comme la réaction **(B)** dans les solvants aprotiques apolaires comme le DCM, ce qui explique qu'elle soit prédominante.

La différence entre les proportions observées dans les milieux DMF et ACN s'explique par des N.D différents. Les solvants présentant un N.D élevé solvatent mieux les cations, accroissant leur rayon ionique et donc la dissociation des paires d'ions. Le DMF qui possède un N.D supérieur à celui de l'ACN favoriserait donc plus la réaction **(B)** que l'ACN, car elle présente un effet cumulé de solvatation des cations et de non-solvatation des anions (Tableau 2.II.2). Les résultats obtenus avec la DBU quelque soit le solvant tendent à montrer que la force de la base permet de former l'anion quelques soient les conditions.

Solvant	*Type*	*ε (20°C)*	*N.A*	*N.D*
DCM	Aprotique apolaire	8.93	20.4	0.0
DMF	Aprotique dipolaire	36.7	16.0	26.6
ACN	Aprotique polaire	35.9	18.9	14.1

NB : ε : constante diélectrique, N.A : pouvoir accepteur du solvant (calculé par RMN), N.D : pouvoir donneur du solvant (calculé par calorimétrie).

Tableau 2.II.2 : Constantes physiques des trois solvants utilisés.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons choisi le DCM comme solvant pour la synthèse de N,N'-1,2-benzènedisulfonamide à partir d'au moins une amine primaire. Nous avons pu ainsi synthétiser le composé ***(15)*** et le N,N'-di-(p-chloro)phénéthyl-1,2-benzènedisulfonamide ***(16)***.

L'hypothèse selon laquelle le disulfonylimide pourrait être un intermédiaire pour la synthèse de disulfonamide lors de l'attaque nucléophile par une deuxième amine pour n'obtenir que le composé asymétrique s'est révélée infructueuse. Ceci est conforme à l'utilisation des disulfonylimides comme groupe partant lors de l'attaque nucléophile pour la benzylation d'alcools ou de phénols, ou comme groupe partant pour la substitution nucléophile stéréosélective d'amines (Figure 2.II.25). En fait, le groupement disulfonylimide inverse la réactivité de l'amine en transformant l'azote en groupement partant et le carbone qui le porte en électrophile [14], [15].

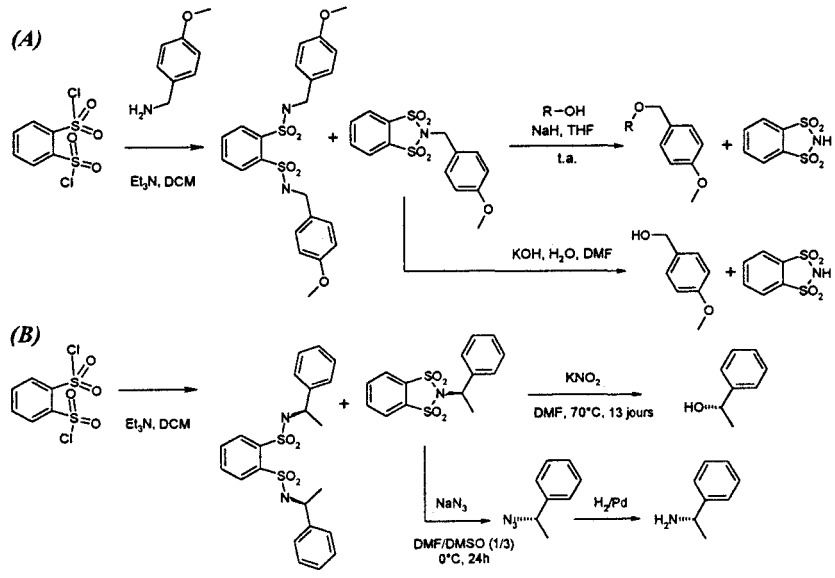


Figure 2.II.25 : Utilisation des groupements N,N-1,2-benzènedisulfonylimide [14], [15].

Dans les cas cités plus haut, les N,N'-1,2-benzènedisulfonamides sont des produits secondaires que l'on cherche à éviter. Différentes conditions réactionnelles ont été testées dans ce but (Tableau 2.II.3). Dans tous les cas, le N,N'-1,2-benzènedisulfonamide est cependant présent en plus ou moins grande quantité. La synthèse des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides est limitée par l'ajout lent de l'amine dans le milieu réactionnel. La recristallisation permet d'éliminer le reste du produit secondaire (Tableau 2.II.3, entrées 10 et 11).

	Amine	Ratio molaire amine / 1,2-benzène-disulfochlorure	Solvant	Base [(a)]	Temps /T°C [(b)]	Ratio imide / disulfonamide	Référence
1	Benzylamine	4:1	THF	5% NaOH aq.	0.5h / t.a.	4:1	[16]
2	Benzylamine	3:1	C_6H_6	NaH [(c)]	0.5h / Δ	14:11	[16]
3	Benzylamine	4:1	$(CH_3O)_3B$		2h / Δ	14:11	[16]
4	Benzylamine	1:1	C_6H_6	$BF_3.Et_2O$ Pyridine (4)	4h / Δ	1:3	[16]
5	Benzylamine	1:1	C_6H_6	Et_3N	5min / t.a.	1:1	[16]
6	Benzylamine	1:1 [(d)]	C_6H_6	C_6H_5N	1h / t.a.	1:4	[16]
7	Benzylamine	1:1	DCM	Et_3N (1)	0.5h / t.a.	3:2	[16]
8	Benzylamine	1:1 [(d)]	t-BuOH	t-BuO⁻ (2)	3h / t.a.	1:1	[16]
9	Benzylamine	1:1 [(d)]	t-BuOH	t-BuO⁻ (2)	4h / Δ	1:1	[16]
10	4-Methoxybenzylamine	1,1:1 [(d)]	DCM	Et_3N (0.7)	1h / Δ + 1 nuit / t.a.	100:0	[14]
11	(S)-Phénéthylamine	1:1 [(d)]	DCM	Et_3N	30h / t.a. + 2h / Δ	?	[15]

(a) : excès de base sauf nombre d'équivalents spécifié entre parenthèses.

(b) : t.a. température ambiante.

(c) : amine d'abord ajoutée à NaH.

(d) : addition lente de l'amine pendant 30 min à 30h.

(e) : un équivalent de base est ajouté au disulfochlorure puis, addition lente de l'amine avec un excès de base

Tableau 2.II.3 : Différentes conditions utilisées pour la synthèse des N,N-1,2-benzènedisulfylimide [14],[15],[16]

2.II.1.3 Synthèse en mélange des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides : cas des amines secondaires.

Comme il était possible de le prévoir, l'absence de proton mobile évite la cyclisation. Des résultats semblables à la synthèse des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides sont donc obtenus, avec le même protocole. La synthèse réalisée en mélange aboutit à des profils très similaires à ceux observés pour la première chimiothèque (Figure 2.II.26).

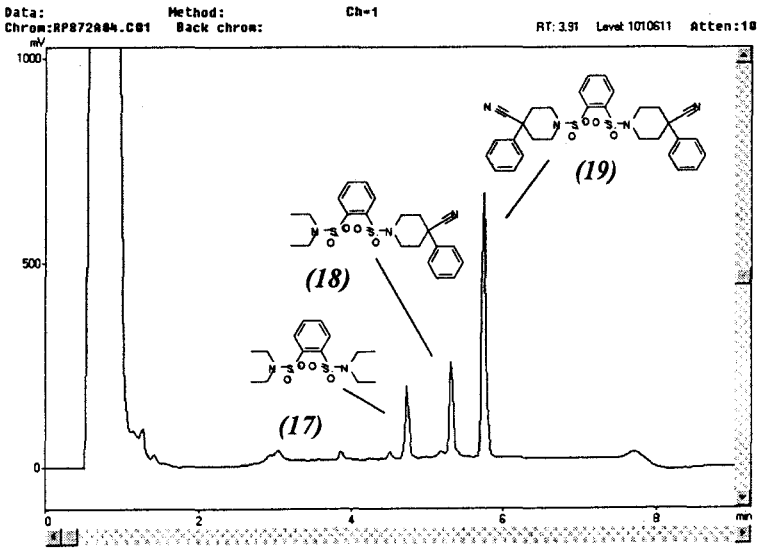


Figure 2.II.26 : Profil HPLC de la synthèse en mélange de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides à partir de la diéthylamine et de la 4-cyano,4-phényl-pipéridine.

L'ensemble des amines secondaires retenues après l'étape de validation pour la synthèse des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides ont été soumises à validation pour cette chimiothèque. Sur 82 amines testées, les 15 amines qui présentaient un chromatogramme HPLC moyen ont été rejetées, et les 67 amines restantes ont été retenues.

2.II.4 Extension des chimiothèques de N,N'-benzènedisulfonamides.

2.II.1.1 Nouveaux tenseurs « benzènedisulfochlorures ».

Il est encore possible d'augmenter la diversité de ces chimiothèques en ayant recours à d'autre tenseurs de type « benzènedisulfochlorure » qui imposeront aux substituants d'explorer d'autres positions spatiales relatives. Quelques-uns de ces tenseurs commerciaux sont présentés en Figure 2.II.27.

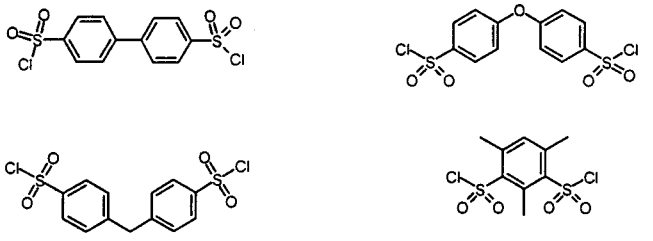


Figure 2.II.27 : Quelques tenseurs "benzènedisulfochlorure".

2.II.1.2 Etude de la cyclisation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides.

Afin d'élargir la diversité de la chimiothèque, la possibilité de favoriser la cyclisation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides est étudiée. Plusieurs voies de cyclisation ont été tentées. Dans l'une d'entre-elles, nous avons envisagé la possibilité d'apporter une nouvelle source de diversité par condensation avec un aldéhyde, selon le mécanisme présenté en Figure 2.II.28.

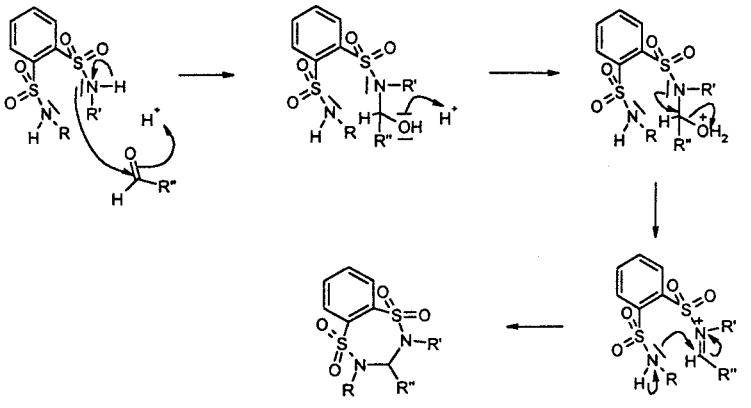


Figure 2.II.28 : mécanisme proposé de la condensation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides avec un aldéhyde.

Les tentatives pour réaliser cette réaction n'ont pas donné le résultat attendu : le disulfonamide ne réagit pas (Figure 2.II.29). D'après le mécanisme envisagé, la catalyse acide doit être utilisée. Elle favorise l'étape d'élimination tout en ne provoquant pas la protonation de l'azote du sulfonamide. Les première et deuxième méthodes font appel au TFA. Pour la troisième méthode cependant, nous avons tenté d'utiliser le caractère labile du proton du groupement sulfonamide en utilisant la DBU pour l'arracher.

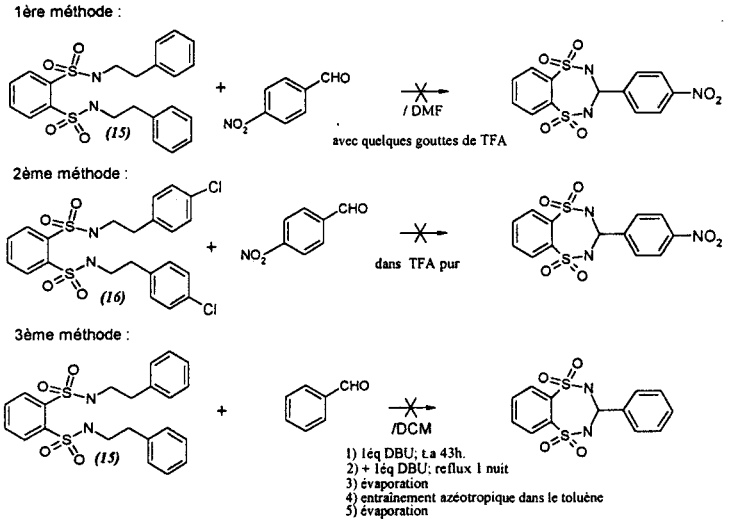


Figure 2.II.29 : essais de condensation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides avec un aldéhyde.

Nous avons également tenté d'insérer un groupement CH_2 ou CHAlkyl entre les deux azotes grâce à des dérivés halogénés ou méthoxylés (Figure 2.II.30). Dans ce cas, les produits de la réaction sont les dérivés N-monosubstitués et N,N'-disubstitués. Ces réactions n'ont pas donné les produits de cyclisation attendus.

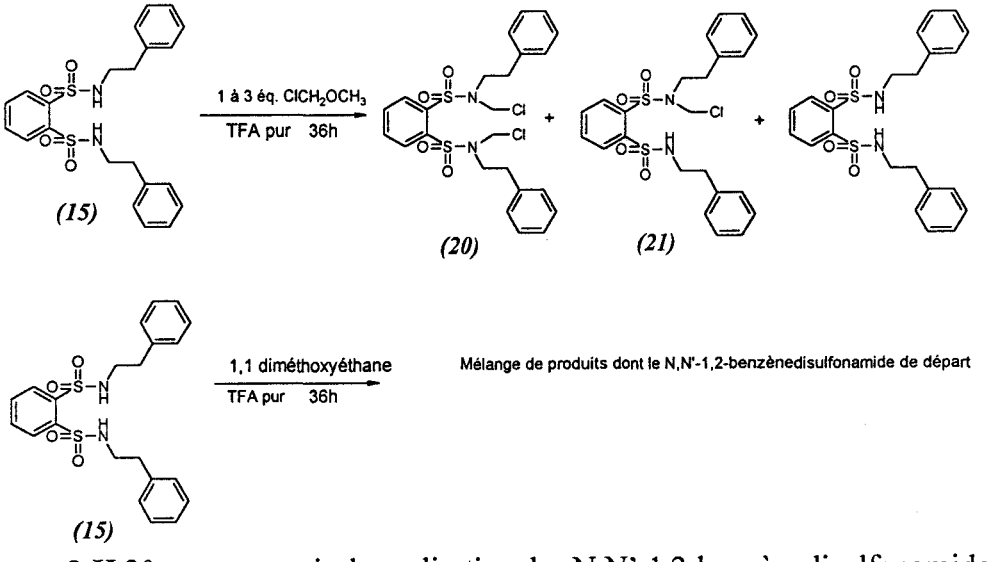


Figure 2.II.30 : autres essais de cyclisation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides.

Les échecs que nous avons rencontrés pour la cyclisation des N,N'1,2-benzènedisulfonamides nous semblent dus au fait que le cycle attendu soit un cycle à 7 peu favorisé. La rigidité des N,N'1,2-benzènedisulfonamides, dont les chaînes latérales s'orientent facilement en *trans* du tenseur, nous semble également justifier ces résultats.

Au cours de l'étude du tenseur N,N'-1,3-benzènedisulfonamide, nous avons été amené à étudier la cinétique des réactions en jeu, à valider des monomères pour le protocole chimique mis au point et à comparer l'expérience au modèle cinétique.

La diversité complémentaire apportée par une chimiothèque de N,N'-1,2-benzènedisulfonamides a été illustrée par une étude de modélisation moléculaire. Le protocole expérimental utilisé pour la synthèse des N,N'-1,3-benzènedisulfonamides a été modifié dans le cas d'amines primaires afin d'éviter la synthèse des disulfonylimides. L'étude de la cyclisation des N,N'-1,2-benzènedisulfonamides n'a pas donné de résultats.

L'ensemble des deux chimiothèques décrites peut encore être élargi par l'apport de nouveaux tenseurs « disulfochlorures ».

Une stratégie a été mise au point pour le criblage biologique de ces deux chimiothèques. L'activité des seuls N,N'-benzènedisulfonamides symétriques est tout d'abord évaluée. Ceci permet d'apprécier leur activité intrinsèque et d'optimiser le choix des N,N'-benzènedisulfonamides asymétriques à tester en seconde intention.

BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 2.II.

[1] Süs O., Schäfer W., Verfahren zur photomechanischen Herstellung von Flachdruckformen und lichtempfindliches Material dafür, Patentschrift Kalle & Co., DE 929460, ***1953***.

[2] Fitch H.M., Dialkylaminophenyl esters of thiophosphoric acids, Patent Campbell Pharmaceuticals Inc., US 2901503, ***1959***.

[3] Kavallieratos K., Bertao C.M., Crabtree R.H, Hydrogen Bonding in Anion Recognition: A Family of Verssatile, Nonpreorganized Neutral and Acyclic Receptors, J. Org. Chem., ***1999***, 64, pp 1675-1683.

[4] Hipskind P.A., Gehlert D.R., Neuropeptide Y, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Robertson D.W., Ed., Academic Press, ***1996***, N°31, 1, p7.

[6] Hagmann W.K., Lark M.W., Becker J.W., Matrix Metalloproteinases, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Hagmann W.K., Ed., Academic Press, ***1996***, N°31, 24, p 237.

[7] Edafiogho I.O., Scott K.R., Anticonvulsivants, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Wolff M.E., Ed., 5th Ed., John Wiley and Sons, ***1996***, Vol 3, pp 226-228.

[8] Loupy A., Haudrechy A., *Effets de milieu en synthèse organique*, Masson, Paris, ***1996***, pp.

[10] March J., *Advanced Organic Chemistry*, 4th Ed., John Wiley and Sons, New-York, ***1992***, pp 496-500.

[11] Arcolia A., Ballistreti F.P., Musumarra G., Tomaselli G.A., J.C.S. Perkin II, ***1981***, pp 221-227.

[12] Ballistreti F.P., Cantone A., Maccarone E., Tomaselli G., Tripolone M., Nucleophilic Substitution at Sulfonyl Sulfur. Part2. Hydrolysis and Alcoholysis of Aromatic Sulfonyl Chlorides, J.C.S. Perkin II, ***1981***, pp 438-441.

[13] Arcoria A., Ballistreti F.P., Cantone A., Spina E., Tomaselli G., Maccarone E., Nucleophilic Substitution at Sulphonyl Sulphur. Part 4. Hydrolysis of Substituted Thiophenesulphonyl Halides in Water Acetone mixtures, J.C.S. Perkin II, ***1988***, pp 1793-1797.

[14]Carlsen P.H.J., Benzylation of Alcohols and Phenols with N-(4-methoxybenzyl)-o-benzenedisulfonimide, Tet. Lett, ***1998***, 39, pp 1799-1802.

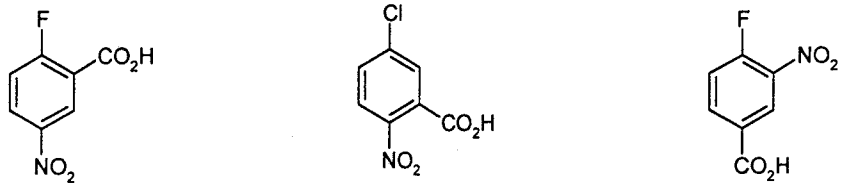
[15] Sørbye K., Tautermann C., Carlsen P., Fiksdahl A., N,N-1,2-benzenedisulfonylimide, a new cyclic leaving group for the stereoselective nucleophilic substitution of amines, Tet. Asym, ***1998***, 9, pp 681-689.

[16] Hendrickson J.B., Okano S., Bloom R.K., o-Benzenedisulfonimide and Its derivatives, J. Org. Chem., **1969**, 34, pp 3434-3438.

2.III. CHIMIOTHEQUE DE 4-AMINO, 3-NITRO-BENZYLAMIDES.

2.III.1. Introduction

Dans le cadre du criblage des tenseurs pré-existants, nous nous sommes intéressés également à des molécules possédant une triple réactivité orthogonale et pouvant subir des substitutions nucléophiles aromatiques. Les tenseurs envisagés possèdent une fonction électrophile réactive : le carbone porteur de l'halogène, une fonction électrophile potentielle : les acides carboxyliques, ainsi qu'une fonction nucléophile masquée : le groupement $-NO_2$ (Figure 2.III.1).



(22) acide 2-fluoro,5-nitro benzoïque — *(23)* acide 5-chloro ,2-nitro benzoïque — *(24)* acide 4-fluoro,3-nitro benzoïque

Figure 2.III.1 : Tenseurs choisis pour concevoir des chimiothèques utilisant la substitution nucléophile aromatique.

Les chimiothèques envisagées à partir de ces tenseurs font appel à la réactivité des fonctions électrophiles. Ces tenseurs fournissent des séries d'isomères de position et des bioisostères en fonction des nucléophiles utilisés (Figure 2.III.2). Dans une stratégie de synthèse de chimiothèque primaire, il convient de synthétiser d'abord l'une de ces séries. Les autres chimiothèques seront utilisées pour la recherche d'analogues lors de la phase d'optimisation d'un produit actif.

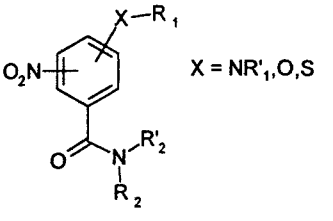


Figure 2.III.2 : Schéma générique des chimiothèques envisagées.

Une grande partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude de l'étape de substitution nucléophile aromatique.

2.III.2. Conception d'une chimiothèque autour de la réaction de Substitution Nucléophile Aromatique

2.III.2.1. Le mécanisme de la SNAr, les effets de groupes partants, les effets de groupes activateurs.

Les réactions de substitution sur un substrat aromatique font appel, globalement, à quatre types de mécanismes. Les réactions dans lesquelles l'azote d'un sel de diazonium est remplacé par un nucléophile procèdent par un mécanisme de type SN_1 (Elimination-Addition). Le mécanisme des réactions initiées par des donneurs d'électrons est radicalaire ($S_{RN}1$). Les réactions catalysées par des bases très fortes sur des halogénures d'aryle non activés forment un intermédiaire de type aryne. Enfin, les réactions activées par des groupements électro-

attracteurs en position ortho- ou para- du groupe partant procèdent par un mécanisme appelé SNAr de type Addition-Elimination [1],[2].

Dans le cas des trois tenseurs envisagés, la substitution nucléophile aromatique est activée par la présence du groupement $-NO_2$ en ortho- ou para- de l'halogène. Le mécanisme est donc de type SNAr : une attaque nucléophile suivie d'une ré-aromatisation par élimination de l'halogène (Figure 2.III.3).

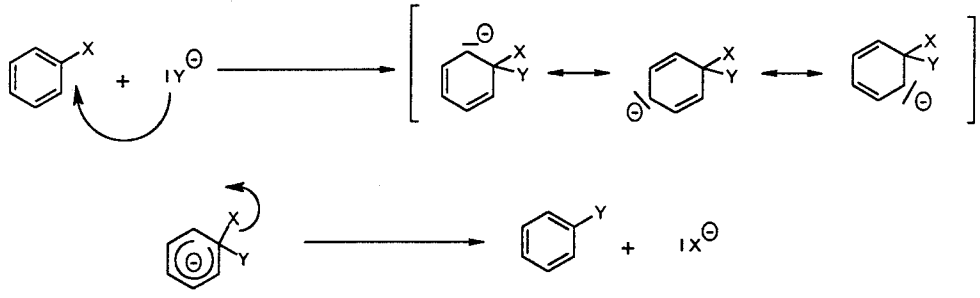


Figure 2.III.3 : Mécanisme de type SNAr [1].

Le mécanisme explique que les substituants permettant de répartir la charge négative sur l'extérieur du cycle stabilisent l'état de transition. Le groupe –NO2 qui contribue à cette stabilisation par effet inducteur et mésomère est particulièrement efficace. Certains de ces intermédiaires sont si stables qu'ils ont pu être isolés : il s'agit des complexes Meisenheimer (Figure 2.III.4) [1],[3].

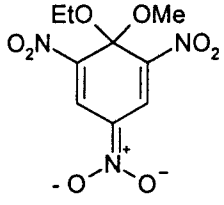


Figure 2.III.4 : Exemple d'intermédiaire de Meisenheimer [1] .

La liaison C_6H_5-F est une des liaisons les plus fortes (E=524kJ/mol contre 399kJ/mol pour C_6H_5-Cl), elle est donc difficile à briser. Dans la plupart des substitutions nucléophiles aromatiques, le fluor est plus réactif que le chlore, lui même plus réactif que le brome. Ainsi, puisque F est le plus réactif des halogènes, accélérant ainsi l'étape lente, on en déduit que cette étape lente n'est pas l'élimination de l'halogène mais l'addition du nucléophile.

La très bonne réactivité du fluor s'explique par sa forte électronégativité qui rend le carbone porteur plus électropositif, facilitant ainsi l'étape d'addition du nucléophile. L'ordre de réactivité observé suit donc celui de l'électronégativité des halogènes : F(4.0) > Cl(3.0) > Br(2.7) > I(2.5) [2],[4].

2.III.2.2. Rappel sur les conditions réactionnelles « classiques » pour une SNAr.

Les conditions classiques de la SNAr requièrent un solvant aprotique dipolaire comme le DMSO ou le DMF (Tableau 2.III.1).

Solvant	N.A.	N.D.
HMPT	10.6	38.8
NMP	13.3	27.3
DMF	16	26.6
Sulfolane	19.2	14.8
DMSO	19.3	29.8

Tableau 2.III.1 : Caractéristiques de quelques solvants aprotiques dipolaires.

Le faible caractère accepteur (N.A.) des solvants aprotiques dipolaires renforce la nucléophilie de l'anion tandis que son fort caractère donneur (N.D.) stabilise par solvatation l'état de transition qui procède par une dissociation de charges (Figure 2.III.5) [4].

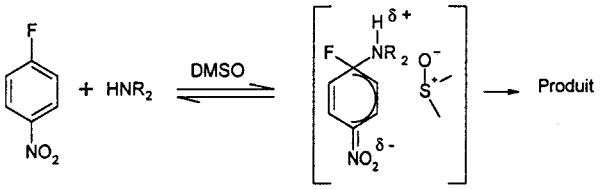


Figure2.III.5 : Solvatation par le DMSO des complexes activés lors de la première étape d'une SNAr [4].

De nombreuses variations sont observées dans le choix du solvant et de la base. La figure 2.III.6 propose quelques exemples. Toutes les réactions illustrées nécessitent du chauffage.

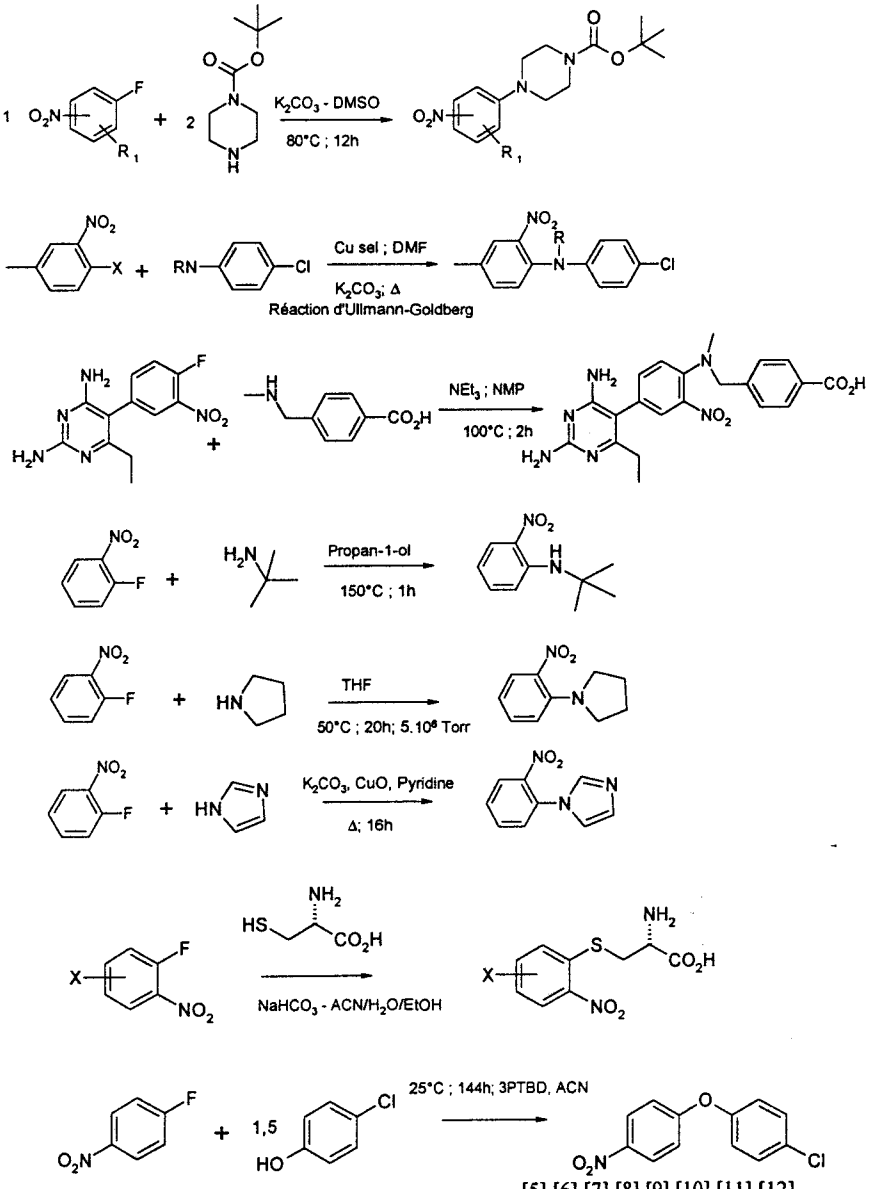


Figure 2.II.6 : Exemples de SNAr [5],[6],[7],[8],[9],[10],[11],[12]

2.III.3. Mise au point des conditions expérimentales de la SNAr et comparaison des tenseurs.

2.III.3.1. Choix de l'ordre des réactions.

Dans ce type de tenseurs, le carbone porteur de l'halogène est déjà activé, l'acide carboxylique ne l'est pas, nous avons donc décidé de procéder d'abord à l'étape de substitution nucléophile aromatique avant la synthèse d'amides (Figure 2.II.7).

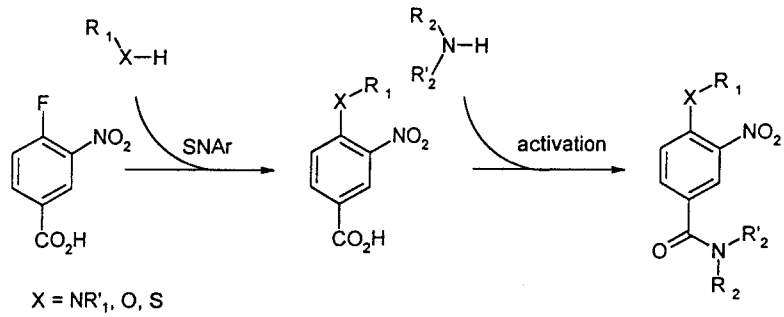


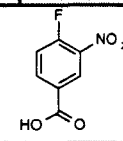
Figure 2.II.7 : Séquence des réactions pour la synthèse de 4-amino,3-nitro benzylamides.

2.III.3.2. Expériences préliminaires.

Nous avons choisi de tester la phénéthylamine et le phénol comme représentants de leur classe de nucléophiles. Le solvant choisi est le DMF et la base la DIEA (ou la DBU dans le cas du phénol), car il s'agit d'un bon compromis entre les exigences de la réaction et la robotisation du procédé. Le nombre d'équivalents de base est de deux au minimum : un équivalent est « consommé » par la fonction acide carboxylique et l'autre sert à la neutralisation de l'HF libéré.

L'ensemble des conditions réactionnelles testées est présenté dans la tableau 2.III.2. Les expériences ont été réalisées à l'échelle de 0.1mmol dans tubes « kimble ». Le chauffage est effectué dans des blocs chauffants.

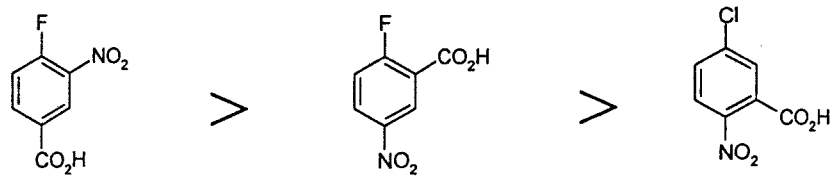
Entrée/ Tenseur[a]	*Temperature*	*Nucléophile*[b] *(Nu)*	Nb d'éq *(Nu)*	*Temps (min)*	*Base*	Nb d'éq *(Base)*	*Conversion %*[c]
			(22)				
1	ambiante	phénéthylamine	1	60	DIEA	2	0
2	ambiante	phénéthylamine	1	120	DIEA	2	0
3	50°C	phénéthylamine	1	60	DIEA	2	46.2
4	50°C	phénéthylamine	1	120	DIEA	2	47.1
5	ambiante	phénol	1	60	DBU	2	0
6	ambiante	phénol	1	120	DBU	2	0
7	50°C	phénol	1	60	DBU	2	0
8	50°C	phénol	1	120	DBU	2	0
Entrée/ Tenseur[a]	*Temperature*	*Nucléophile*[b] *(Nu)*	Nb d'éq *(Nu)*	*Temps (min)*	*Base*	Nb d'éq *(Base)*	*Conversion %*[c]
			(23)				
9	ambiante	phénéthylamine	1	60	DIEA	2	0
10	ambiante	phénéthylamine	1	120	DIEA	2	0
11	50°C	phénéthylamine	1	60	DIEA	2	0
12	50°C	phénéthylamine	1	120	DIEA	2	0
13	ambiante	phénol	1	60	DBU	2	0

14	ambiante	phénol	1	120	DBU	2	0
15	50°C	phénol	1	60	DBU	2	0
16	50°C	phénol	1	120	DBU	2	0
Entrée/ Tenseur[a]	*Temperature*	*Nucléophile [b] (Nu)*	Nb d'éq *(Nu)*	*Temps (min)*	*Base*	Nb d'éq *(Base)*	*Conversion % [c]*
		 *(24)*					
17	ambiante	phénéthylamine	1	60	DIEA	2	5.4
18	ambiante	phénéthylamine	1	120	DIEA	2	19.2
19	50°C	phénéthylamine	1	60	DIEA	2	79.4
20	50°C	phénéthylamine	1	120	DIEA	2	91.3
21	70°C	phénéthylamine	1	180	DIEA	3	92.8
22	70°C	phénéthylamine[d]	1	180	DIEA	3	94.1
23	75°C	phénéthylamine	1	180	DIEA	3	98
24	ambiante	phénol	1	60	DBU	2	2.4
25	ambiante	phénol	1	120	DBU	2	2.4
26	50°C	phénol	1	60	DBU	2	14.5
27	50°C	phénol	1	120	DBU	2	14.5
28	ambiante	phénol	1.1	30	DBU	3.2	2.6
29	ambiante	phénol	1.1	150	DBU	3.2	10
30	50°C	phénol	1.1	150	DBU	3.2	40.3
31	50°C	phénol	1.1	240	DBU	3.2	47.6
32	50°C	phénol	1.1	1440	DBU	3.2	98

(a) tenseur 0.5M/DMF.
(b) phénol : 0.1M/(DMF/DBU) ; phénéthylamine 0.1M/(DMF/DIEA).
(c) Conversion calculée par la disparition du tenseur en HPLC à 215nm.
(d) + 1 éq. d'imidazole.

Tableau 2.III.2 : Conditions réactionnelles testées pour la SNAr.

Les expériences préliminaires montrent que l'acide 4-fluoro,3nitro benzoïque est le plus réactif des trois tenseurs (Figure 2.II.8). Le classement est conforme à ce qui pouvait être supposé au vu de la théorie.



(24) **acide 4-fluoro,3-nitro benzoïque** > ***(22)*** **acide 2-fluoro,5-nitro benzoïque** > ***(23)*** **acide 5-chloro ,2-nitro benzoïque**

Figure 2.II.8 : Réactivité comparée des trois tenseurs au vu des résultats du Tableau 2.II.2.

La plus faible réactivité du tenseur ***(23)*** (acide 5-chloro, 2-nitro benzoïque) est liée au chlore qui est un moins bon groupement partant que le fluor. De plus, dans ce tenseur, l'effet inducteur du groupement $-NO_2$ est diminué par sa position en para du groupe partant. Alors que dans les tenseurs ***(24)*** et ***(22)***, le groupement –COOH participe à l'activation car il est placé en ortho ou para de l'halogène, l'acide carboxylique est en position méta ou seul l'effet inductif peut avoir lieu d'où une participation à la stabilisation de l'état de transition moindre. La différence entre les tenseurs acide ***(23)*** 4-fluoro,3nitro benzoïque et ***(22)*** acide 2-fluoro, 5-nitro benzoïque s'explique par la position ortho ou para du groupement activateur $-NO_2$ par rapport à l'halogène.

Dans le cas de la phénéthylamine, une conversion de 50% au moins nécessite une température minimale de chauffage de 50°C (Tableau 2.III.2, entrées ***3 ,4 ,19*** à ***23***). Le temps de réaction optimal se situe entre 2 et 3h. (Tableau 2.III.2, entrées ***4, 20*** à ***23***) et trois

équivalents de DIEA sont nécessaires (Tableau 2.III.2, entrées ***21*** à ***23***) pour atteindre des conversions totales.

Dans le cas du phénol, même l'utilisation d'une base plus forte comme la DBU n'est pas suffisante pour donner des conversions satisfaisantes. Il est nécessaire de chauffer au minimum 4h à 50°C pour atteindre 50% de conversion (Tableau 2.III.2, entrées ***30*** à ***32***). Néanmoins, ces conditions pourraient sans doute être améliorées en augmentant la température de chauffage. Par contre, les très hautes températures sont proscrites si l'on veut appliquer la réaction à la plus large diversité de matières premières. Egalement, le chauffage est limité par la température maximale admise sur les modules de chauffage utilisés pour la synthèse robotisée.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes intéressés en priorité au tenseur ***(24)*** et aux amines puisque les conditions développées semblent tout à fait convenir à l'automatisation de la réaction, en particulier : les solvants et les réactifs manipulables par le pipetteur automatique, et le temps et la température de chauffage sont compatibles avec les automates dont nous disposons.

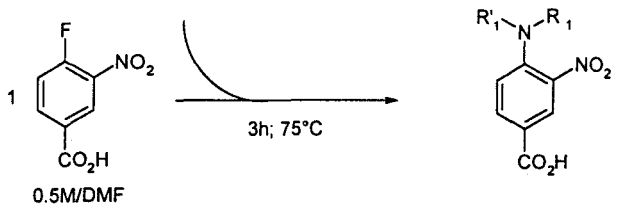
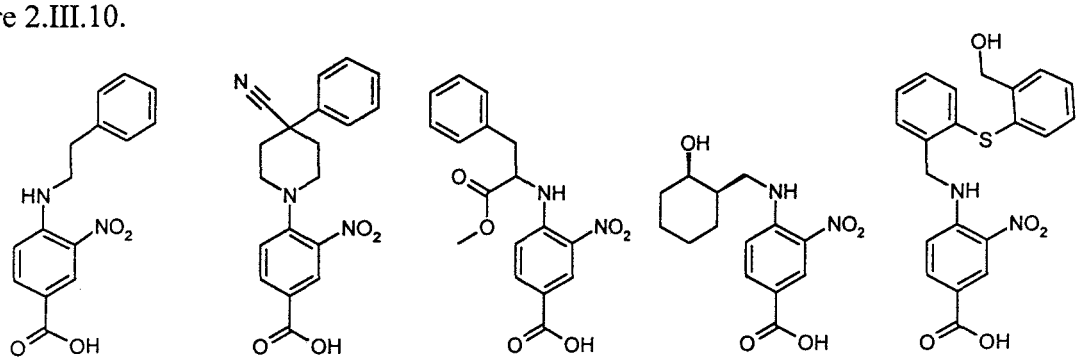


Figure 2.III.9 : Protocole expérimental adopté pour la SNAr.

Le protocole expérimental adopté pour cette étape est schématisé en Figure 2.III.9. Nous utilisons donc trois équivalents de DIEA, une température de 75°C et un temps de chauffage de trois heures. Ce protocole a été utilisé pour synthétiser les produits présentés en figure 2.III.10.



(25) ***(26)*** ***(27)*** ***(28)*** ***(29)***

Figure 2.III.10 : Exemple d'acides benzoïques synthétisés à partir du tenseur ***(24)*** par réaction de substitution nucléophile aromatique.

2.III.3.3. Mini-matrice pour l'étude de l'étendue d'application de la SNAr.

A. Monomères et Conditions réactionnelles.

Afin d'avoir une idée des possibilités d'application de cette réaction aux amines, nous l'avons évaluée dans le cas de 11 amines différentes (Figure 2.III.11). Au cours de cette évaluation, nous avons également testé le changement d'échelle de la réaction à 5 µmoles par puits en plaques et la deuxième étape de couplage au CDI.

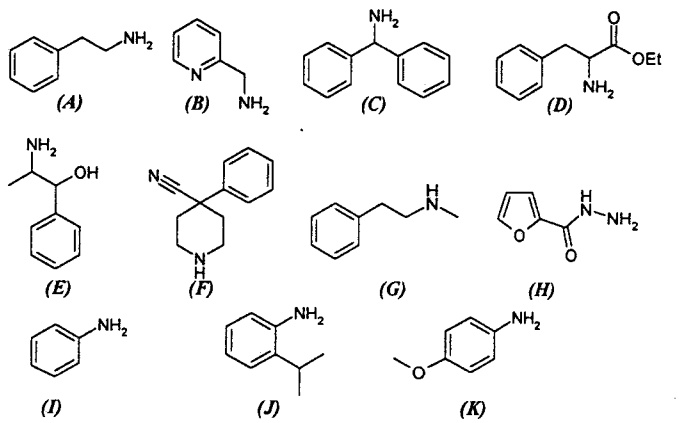


Figure 2.III.11 : N-nucléophiles utilisées pour la mini-qualification

En synthèse peptidique, le 2,4-dinitrofluorobenzène est utilisé comme groupe protecteur de l'imidazole de l'histidine. La déprotection réalisée à température ambiante avec le mercaptoéthanol ou la piperidine est quantitative. Il s'agit d'une SNAr où le groupe partant est l'imidazole de l'acide-aminé [13]. De plus, quelques-unes de nos expériences ayant montré une augmentation des rendements de la SNAr en présence d'imidazole, nous avons décidé d'ajouter un équivalent d'imidazole dans les milieux réactionnels afin de « catalyser » la réaction. Nous avons donc réalisé 121 réactions. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.III.3.

Produits > N-nucléophiles V	Conversion pour l'étape de SNAr en %						
	90,2	Majoritaire	Traces		Traces		Traces
	88,3	Majoritaire	Traces		Traces		Traces
	81,1	Majoritaire	Traces	Minoritaire		Traces	Traces
	63,4	Majoritaire	Traces	Minoritaire			Traces
	88,0	Majoritaire	Traces				Traces
	84,1	Majoritaire	Traces				Traces
	100,0	50%	Traces		50%		Traces
	58,6	Majoritaire	Traces				Traces
	31,8	Majoritaire	Traces				Traces
	45,7		Traces				Majoritaire
	58,9	Majoritaire	Traces	Minoritaire			Traces

Tableau 2.III.3 : Résultats de la mini qualification.

Dans le tableau 2.III.3, figurent en ligne les 11 amines utilisées à l'étape de SNAr, la conversion à cette étape et la liste des produits secondaires observés le plus souvent dans les 11 milieux réactionnels qui ont fait intervenir cette amine. Nous avons pu conclure quant à la réactivité des amines utilisées. Ainsi, les anilines semblent moins bien réagir que le reste des amines, de même pour l'hydrazide utilisée et l'amino-acide.

Pour ce qui est de l'ensemble de la réaction (étape SNAr et couplage), le produit attendu est très majoritaire toutes les réactions exceptées celles impliquant l'aniline o-substituée comme première amine. D'autres produits sont parfois présents en petites quantités ou à l'état de traces. . Ces dérivés proviennent de la substitution du fluor par l'imidazole lors de l'étape de SNAr. Ainsi les résultats préliminaires montrant une meilleure homogénéité du milieu avec un équivalent d'imidazole n'ont pas pu être reproduits pour les amines les moins réactives. Ces résultats justifient également l'ordre choisi pour les deux réactions (SNAr et Acylation). Nous pouvons donc éviter facilement la formation de ces produits en n'ajoutant pas d'imidazole à cette étape.

Nous avons également pu observer des traces d'urée. Celle-ci provient de l'attaque de la seconde amine sur l'espèce activée de la première. Ceci est rendu possible par l'activation des restes d'amine issue de la SNAr par le N,N'-carbonylediimidazole. A priori, moins l'amine utilisée pour la SNAr est réactive, plus il y a possibilité d'observer cette urée. Néanmoins, si cette amine absorbe peu, l'urée ne sera pas détectée en LC/MS.

Enfin, dans le cas où la première amine est l'amino-alcool, le produit présenté en figure 2.III.12 est présent en petite quantité. Il s'agit du produit attendu ayant réagit avec sa fonction alcool pour former un carbamate avec la deuxième amine, par activation au CDI.

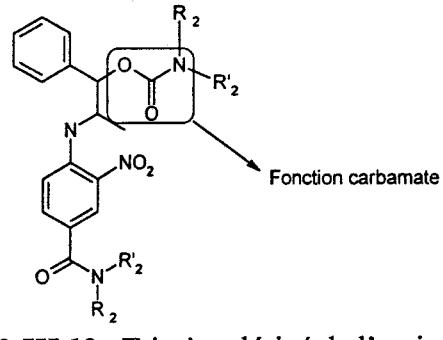


Figure 2.III.12 : Trimère dérivé de l'amino-alcool.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de valider 448 N-nucléophiles pour la SNAr dans ces conditions, sans ajouter d'imidazole. Nous avons choisi dans un premier temps d'inclure les amino-alcools pour cette étape de validation même si la plupart d'entre-eux ne peuvent pas entrer dans cette chimiothèque car ils généreront des produits secondaires à la seconde étape. Leur réactivité pour la SNAr est cependant intéressante à connaître.

2.III.4. Sélection et validation des N-nucléophiles pour la SNAr.

Au total, 448 amines ont été soumises à une validation. Parmi elles se trouvent des hydrazides et des anilines bien que le filtre chimique les auraient écartées au vu des résultats des premières études.

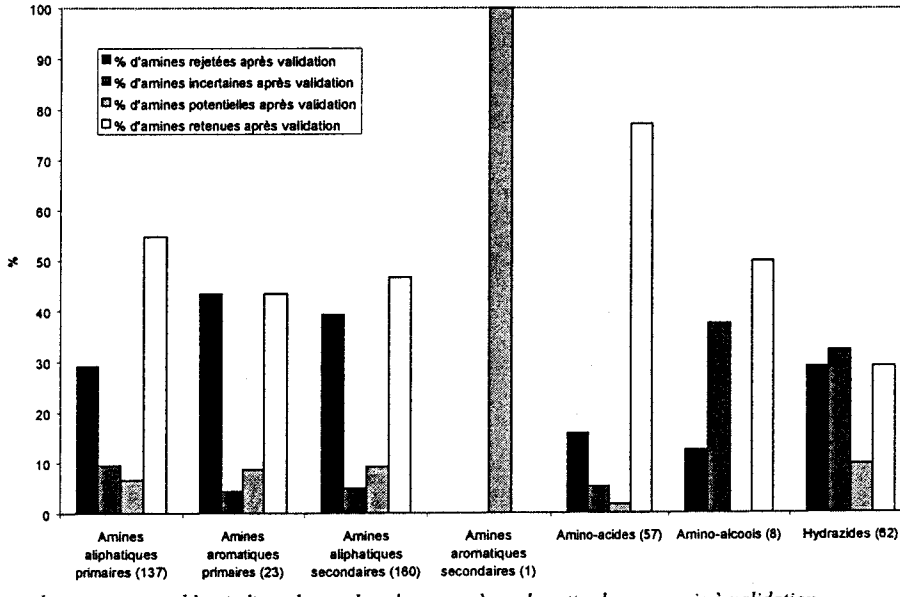
La validation consiste ici à mettre en réaction les N-nucléophiles avec le tenseur et à quantifier le tenseur restant. Ce résultat numérique de conversion constitue le premier critère

de sélection, le second étant l'absence de produits secondaires dans le milieu. L'analyse a été faite en HPLC à 215nm. Une courbe d'étalonnage du tenseur a été réalisée afin de permettre le dosage.

Les N-nucléophiles sont alors classés parmi l'une des quatre catégories suivantes :

- Les N-nucléophiles ***incertains*** ont présenté un chromatogramme HPLC peu interprétable par exemple lorsque le produit fini semble coéluer avec le tenseur. Ces milieux devraient être analysés dans d'autres systèmes analytiques.
- Les N-nucléophiles ***qualifiés*** ont présenté une conversion supérieure à 80% et les seuls produits présents étant le tenseur et le produit attendu.
- Les N-nucléophiles ***potentiels*** ont donné une conversion entre 50 et 80% et nécessiteront un changement des conditions réactionnelles pour augmenter cette conversion.
- Les N-nucléophiles ***rejetés*** sont ceux qui ont présenté des milieux sales et/ou une faible conversion.

Les résultats sont présentés en figure 2.III.13. Ils sont représentés en pourcentage du nombre de N-nucléophiles dans chaque catégorie. Comme le nombre testé de monomères dans chaque classe et le mode de sélection ne sont pas les mêmes, les comparaisons sont difficiles d'une classe à l'autre. Par exemple, une amine aromatique secondaire a été soumise à qualification. Dans ce cas précis 100% des monomères de cette classe ont été jugés monomères potentiels. Néanmoins, à l'intérieur d'une même classe, il est possible de dégager quelques règles de réactivité.



Le nombre entre parenthèse indique le nombre de monomères de cette classe soumis à validation.

Figure 2.III.13 : Répartition des amines par réactivité pour chaque catégorie soumise à validation pour l'étape de SNAr.

Les amines aliphatiques ont donné les meilleurs résultats, avec une large proportion de monomères qualifiés. Le nombre d'amines aromatiques retenues a été plus faible comme nos premiers résultats permettaient de le prévoir.

Les amines aliphatiques primaires non encombrées réagissent mieux que celles ramifiées en α. De plus la présence d'un groupement aromatique semble favorable à la réactivité. Parmi les hydrazides, seules les hydrazides aromatiques et benzyliques réagissent bien. La réactivité des anilines est très sensible à l'encombrement stérique et influencée par les effets électroniques. Les groupements –OMe en ortho diminuent la conversion à cause de l'effet inductif attracteur. Les groupements alkyl sont plus gênants en ortho à cause de l'augmentation de la gêne stérique autour de la fonction amine. La réactivité des amines aliphatiques secondaires est elle aussi très sensible à l'encombrement. La présence d'un ou plusieurs substituants sur le ou les carbones en α de l'amine entraîne une conversion inférieure. Le nombre d'amines de ce type qualifiées est donc moins important. Les amines cycliques sont elles beaucoup plus réactives que leurs analogues linéaires. Cette différence de réactivité est due à l'exposition extérieure au cycle du doublet de l'azote qui est donc ainsi plus réactif.

2.III.5. Synthèse de la chimiothèque et Analyse du Contrôle Qualité.

2.III.5.1. Synthèse de la chimiothèque.

Un protocole a été mis au point au laboratoire pour la synthèse d'amides en utilisant le N,N'carbonylediimidazole (CDI) comme activateur de l'acide. Le mécanisme de cette réaction libère deux équivalents d'imidazole (Figure 2.II.14).

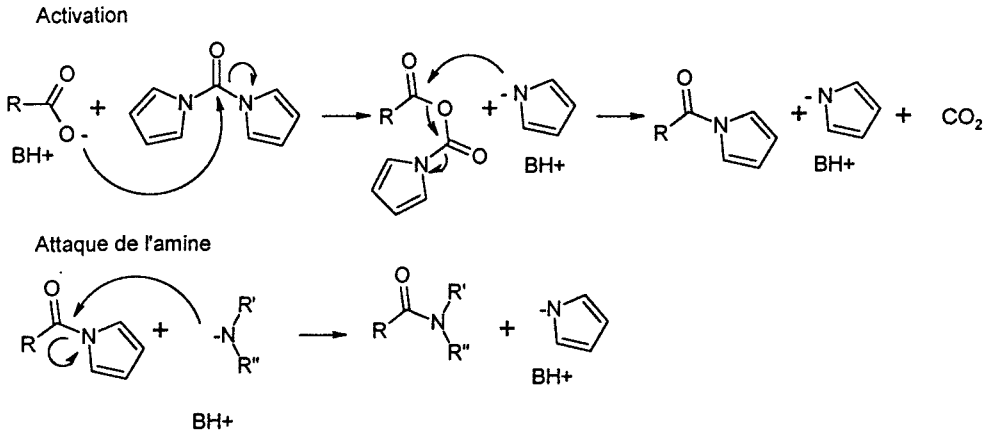


Figure 2.II.14 : Synthèse d'amides au N,N'carbonyldiimidazole (CDI).

Les amines n'ont pas été soumises à validation pour l'étape de synthèse des amides au CDI. Les résultats déjà répertoriés de la réactivité des amines disponibles pour la synthèse d'amides au N,N'-carbonyldiimidazole ont été utilisés. Les acides issus de la réaction de SNAr sont tous du type benzoïque non encombrés puisqu'ils sont dérivés du tenseur. Ce type d'acides est connu pour être réactif dans ce protocole de synthèse. La Figure 2.III.15 présente des exemples de produits synthétisés et la figure 2.II.16 un milieu réactionnel type.

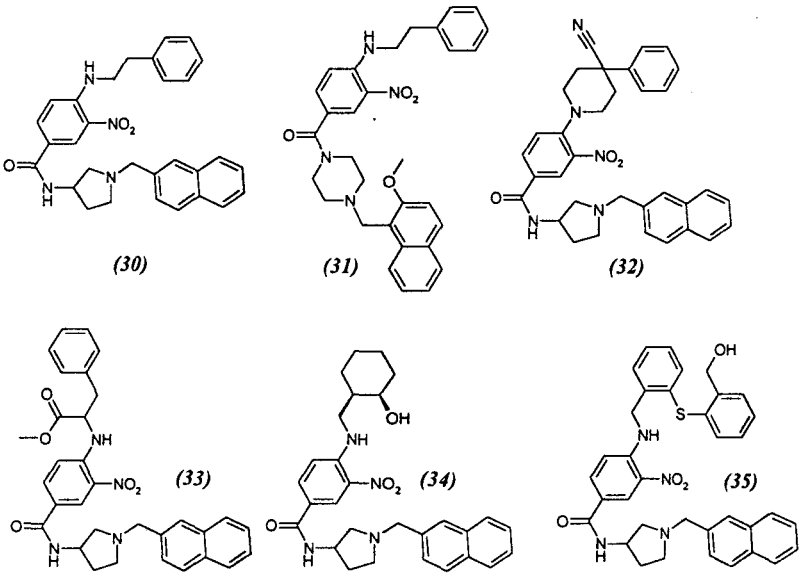


Figure 2.III.15 : Exemples de 4-(N-alkyl)-amino,3-nitro-benzylamides.

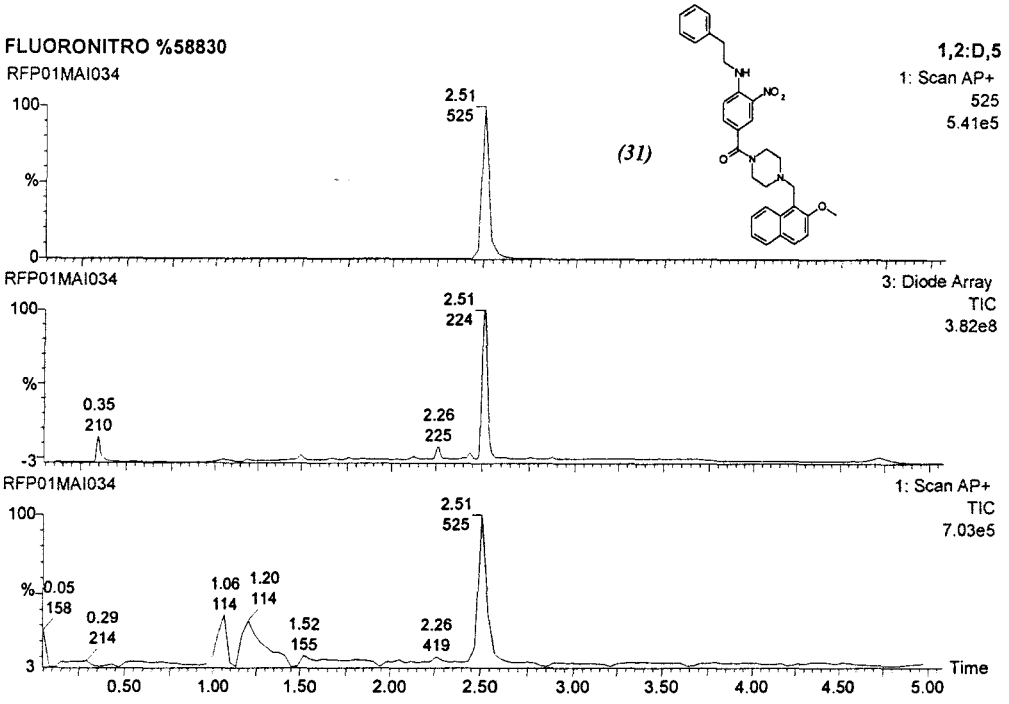


Figure 2.III.16 : Exemple d'analyse LC/MS d'un milieu réactionnel de cette chimiothèque.

Pour une production automatisée, il faut définir un format de chimiothèque. Le nombre de produits synthétisés est souvent un multiple de 80 car les plaques de synthèse utilisées ont un format de 96 puits (8*12) avec les colonnes 1 et 12 libres. Nous avons choisi de synthétiser 6400 (80*80) produits à l'échelle de 5 µmol.

Les 80 amines choisies pour l'étape de SNAr remplissaient les deux critères suivants : une conversion supérieure à 85% obtenue lors de l'étape de validation et un poids moléculaire inférieur à 200 g/mol. Ces amines sont toutes représentées dans une plaque de synthèse (1 amine différente par puits de synthèse). Les 80 amines choisies pour l'étape de synthèse d'amides au CDI devaient présenter un poids moléculaire inférieur à 250 g/mol. Chacune de ces amines est distribuée dans tous les puits d'une seule plaque. Toutes les combinaisons sont donc réalisées et les produits finaux ont un poids moléculaire inférieur à 598 g/mol.

2.III.5.2. Résultats du contrôle qualité

On appellera dans ce paragraphe amine 1, une amine réagissant dans l'étape de SNAr et amine 2, une amine réagissant lors de l'étape de formation d'amides.

Le contrôle qualité d'une chimiothèque combinatoire de cette taille ne peut en aucun cas être exhaustif. Seuls 2.5% des synthèses ont donc été contrôlées en LC/MS. Afin que chacune des 160 amines soit impliquée dans au moins une réaction contrôlée, nous avons choisi une plaque dans laquelle nous avons prélevé dans chaque puits. Toutes les amines 1 ont donc été examinées en présence d'une amine 2 unique : la 2-((3-amino)methylpyrrolidino) naphtalène. Les milieux réactionnels ont tous présenté une conversion et une pureté supérieure ou égale à 90%.

De même, nous avons prélevé dans un puits par plaque. Au total, 80 échantillons ont été analysés pour lesquels l'amine 1 est la phénéthylamine et l'amine 2 est variable. Les quatre familles structurales d'amines 2 utilisées pour la synthèse de cette chimiothèque sont présentées en Figure 2.III.17. Il s'agit de pipérazines, d'amino-pyrrolidines N-substituées, d'N-alkyl aminomethyl furanes et d'un composé spirannique. Les résultats du contrôle qualité pour chacune de ces familles d'amines est présenté dans le Tableau 2.III.4.

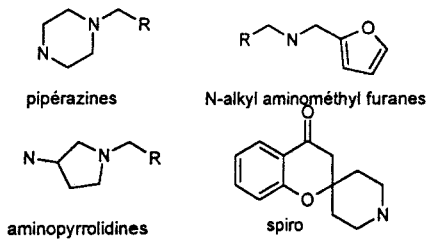


Figure 2.III.17 : Structures des Amines 2 utilisées pour la synthèse d'amides.

Entrée	*Amines*	*Produit attendu*	*Commentaires*
1	Pipérazines	Majoritaire [a]	Présence dans quelques cas d'un produit de poids moléculaire 623
2	Aminopyrrolidines	Majoritaire [a]	Traces dans quelques cas d'un produit de poids moléculaire 419
3	N-Alkyl aminométhyl furanes	Minoritaire [b]	Restes importants de tenseur
4	Spiro	Majoritaire [a]	-

[a] : Majoritaire au vu du Chromatogramme LC de la LCMS. [b] : Minoritaire au vu du Chromatogramme LC de la LCMS.

Tableau 2.III.4 : Résultats du Contrôle Qualité 1 puits/plaque (Amine 1 : phénéthylamine)

Dans le cas des pipérazines (Tableau 2.III.4, entrée *1*), un produit secondaire a été rapidement identifié comme étant la pipérazine di-acylée par l'acide issu de la SNAr *(25)* (Figure 2.III.18). Ce composé a pu être attribué à la présence de trace de piperazine contaminant l'amine utilisée. Ces amines ont été en effet obtenues par l'amination réductrice d'aldéhydes avec la piperazine.

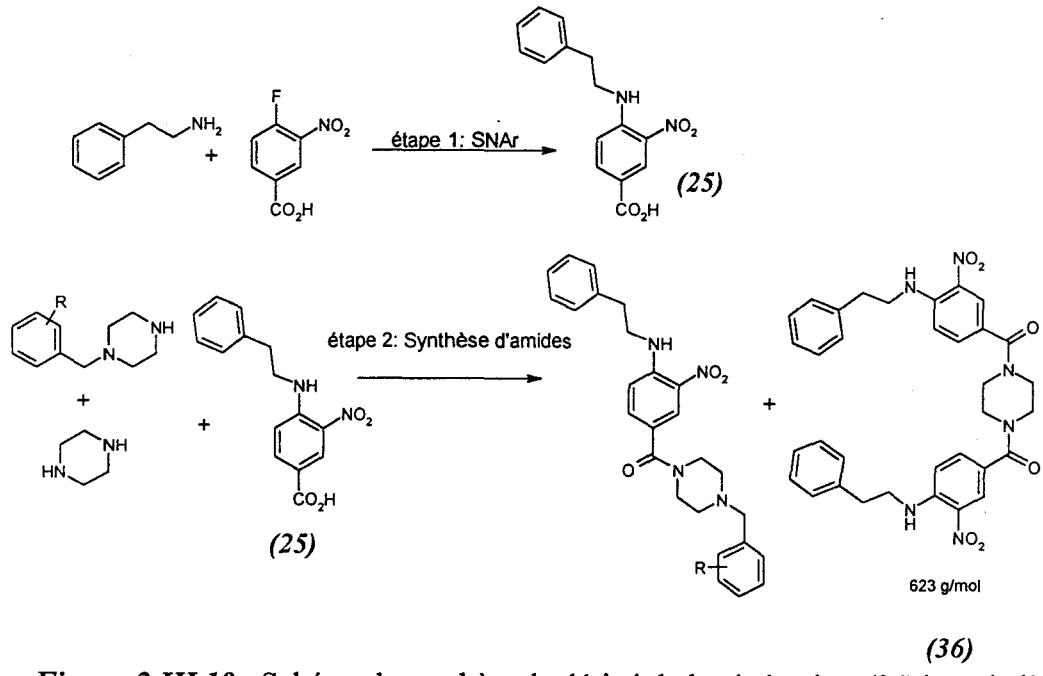


Figure 2.III.18 : Schéma de synthèse du dérivé de la pipérazine *(36)* issu de l'acide obtenu avec la phénéthylamine *(25)* .

Pour valider cette hypothèse, nous avons essayé d'obtenir le produit *(36)* par deux protocoles différents (Figure 2.III.18). Les protocoles utilisés ont permis de synthétiser le produit. Cependant, la purification a été rendue difficile par la mauvaise solubilité du produit dans la plupart des solvants (H_2O, ACN, DMF, DMSO, Acétone, DCM, DIEA/DMF(1/2)). Sa structure n'a donc pas pu être vérifiée en RMN mais le temps de rétention en LCMS et la masse sont identiques au produit repéré dans les milieux réactionnels. La mauvaise solubilité de ce produit serait due à la présence de deux groupements $-NO_2$ et d'aucune fonction facilement protonable.

Pour les amino-pyrrolidines, le même type de produits secondaires a été observé cette fois-ci avec l'autre diamine. L'apparition de ce type de produits secondaires dus à une impureté du monomère de départ justifie la nécessité de réaliser un contrôle qualité des monomères. Ce contrôle doit également faire appel à des techniques analytiques différentes. Dans le cas-ci, la LC/MS et la RMN n'ont pas permis de déceler la présence de pipérazine contaminante. La piperazine n'absorbe pas en UV et ses protons sont très étalés en RMN et masqués par ceux du monomère.

Les N-alkyl-amino methyl furanes ont présenté des conversions faibles. Dans les milieux réactionnels soumis au contrôle analytique, il reste systématiquement de l'acide de départ. Nous avons avancé deux hypothèses pour tenter d'expliquer ces résultats médiocres :

- faible réactivité de ces amines.
- stoechiométrie non respectée (par exemple avec des amines non-pures ou des amines pour lesquelles la quantité de contre-ion a mal été calculée).

Afin de départager ces deux hypothèses, nous avons couplé quatre de ces amines avec des acides benzoïques très réactifs, en utilisant soit le TBTU, soit le CDI comme activateurs. La conversion des acides est meilleure dans le cas du TBTU que dans celui du CDI. De plus, les amines sous forme de sels de sulfates semblent être moins réactives que celles sous forme de chlorhydrates. La réactivité de ces monomères dépend donc à la fois des conditions

d'activation et du contre-ion. Dans le cas de l'activation au TBTU, la présence d'amine résiduelle n'est pas détectée même s'il reste beaucoup d'acide activé. Nous avons donc introduit dans le milieu réactionnel plus d'acide que d'amine. Il semble donc y avoir un problème de stœchiométrie.

Le tableau 2.III.5 récapitule l'ensemble des produits, réactifs et sous-produits pouvant être présents dans les milieux réactionnels de cette chimiothèque. L'ordre représente le niveau de diversité de ces espèces. Ainsi un réactif ou le tenseur sont inchangés quelque soit le puits contrôlé. Les monomères, sources de diversité, sont des espèces d'ordre 1, de même que les acides issus de la première étape. Le produit attendu est d'ordre 2 puisqu'il présente 2 sites de diversité.

Ordre	*Espèces*	*Commentaires*	*Etape responsable*
1	Amine 1 ou Amine 2	Traces	Etapes 1 et 2
1	3-nitro, 4-(N-alkyl)amino benzoïque acides	En grande quantité pour les amines 2 faiblement réactives.	Etape 1
1	3-nitro, 4-(N-alkyl)amino benzoïque imidazolide	Traces	Etape 2
1	Dimère issu de la double acylation de la piperazine ou de l'amino-pyrrolidine résiduelle.	En petite quantité avec les amines 2 présentant des restes de di-amines	Etape 2
1	Urée asymétrique A1_A2	En petite quantité.	Etape 2
2	4-amino,3-nitro-benzylamides	Produit attendu.	Etape 2
0	Acide 4-fluoro,3-nitro benzoïque	Tenseur	Etape 1

Tableau 2.III.5 : Récapitulatif des produits d'ordre 0,1 et 2 pouvant être présents dans les milieux réactionnels.

2.III.5.3. Synthèse d'une sélection représentative de la chimiothèque.

Dans le cadre d'une campagne de criblage biologique primaire pour trouver de nouvelles têtes de série chimique, plusieurs chimiothèques différentes doivent être testées. Ces chimiothèques, de taille assez importante, ne peuvent pas toutes être criblées entièrement dans un premier temps. Il est donc intéressant de ne tester qu'une sélection de produits représentant chacune de ces chimiothèques. C'est dans cette optique que nous avons synthétisé une mini-chimiothèque de 4-amino,3-nitro benzylamides pour le criblage biologique de première intention.

Les amines 1 et les amines 2 ont été classées par poids moléculaire croissant. Deux sous-chimiothèques ont été réalisées. La première sous-chimiothèque A de 80 4-amino,3-nitro-benzylamides présente une distribution étroite de poids moléculaires puisque l'on couple la plus petite amine 1 avec la plus grosse amine 2, et ainsi de suite (Figure 2.III.19).

La deuxième sous-chimiothèque B de 80 produits présente une distribution large des poids moléculaires puisque l'on couple les petites amines ensemble, les amines moyennes ensemble,...(Figure 2.III.19).

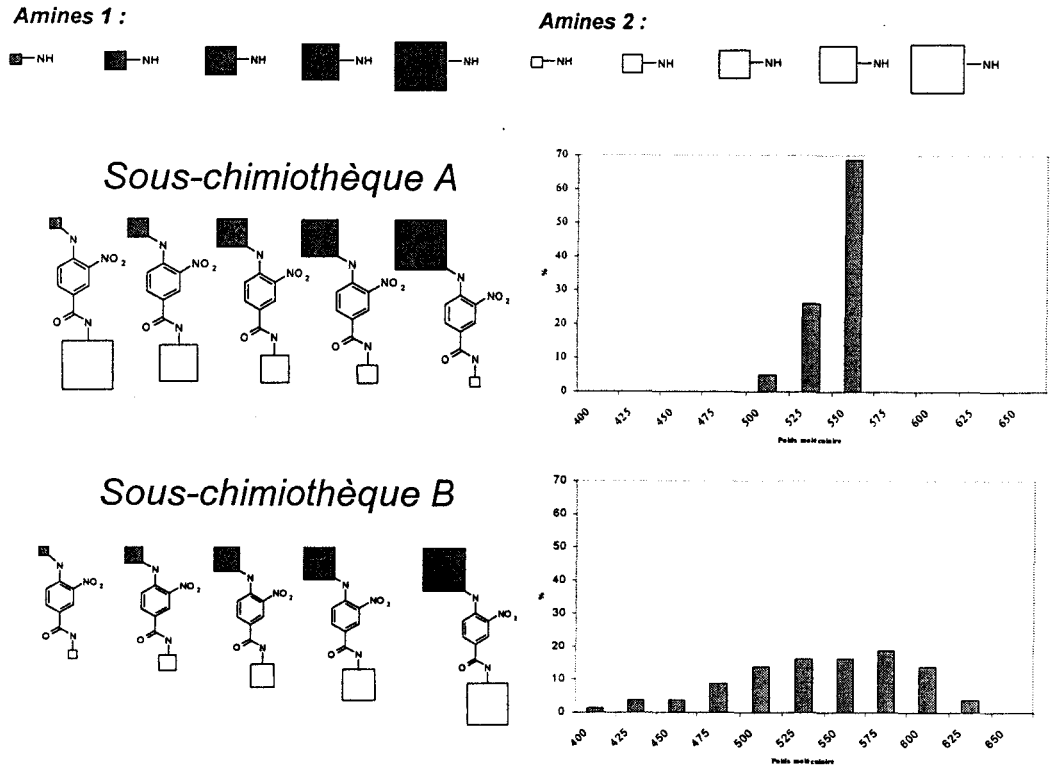


Figure 2.III.19 : Sélection de 4-amino,3-nitro benzylamides synthétisée.

Ces chimiothèques sont une sélection intéressante de produits représentant la chimiothèque totale. Si l'on assimile la taille des fragments à leur poids moléculaire, on peut dire dans ce cas que le tenseur explore différentes positions dans les molécules : d'une position centrale à une position latérale.

2.III.6. Extension de la chimiothèque.

2.III.6.1. Choix de la base et du solvant.

La première extension possible de cette chimiothèque nécessite un changement des conditions réactionnelles de synthèse. En effet, la SNAr est généralement réalisée dans le DMSO avec K_2CO_3 comme base à 80°C[15]. De nombreuses amines n'ont pas donné de résultats satisfaisants lors de l'étape de validation pourraient alors être utilisées. La diversité de la chimiothèque serait ainsi augmentée. Egalement des amines insolubles dans le DMF mais solubles dans le DMSO pourraient être choisies comme monomères.

2.III.6.2. Chimiothèques basées sur des isomères du tenseur.

Comme il a été suggéré au début de ce chapitre, il existe des tenseurs très similaires à celui que nous avons choisi et qui ne sont en fait que des isomères de position. Lors de la phase d'optimisation d'un hit, les produits dérivés de ces tenseurs seraient intéressants à tester (Figure 2.III.20).

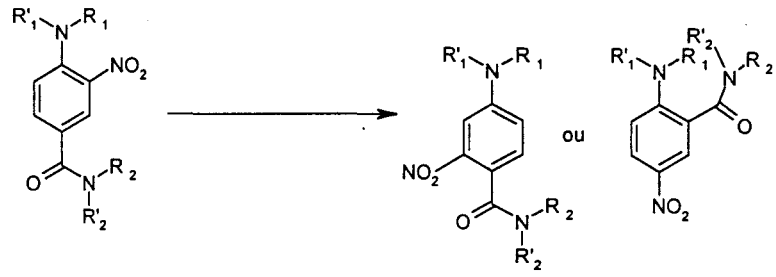


Figure 2.III.20 : Utilisation des isomères du tenseurs.

Les remplacements bioisostères peuvent également avoir lieu au niveau de l'acide carboxylique. Il est tout à fait envisageable d'avoir une fonction sulfamide en remplacement de la fonction amide. Le tenseur 4-chloro,3-nitro-benzènesulfochlorure est commercialement disponible. Il faudra cependant envisager une inversion dans la séquence des réactions de SNAr et d'acylation. En effet, la fonction sulfochlorure est très réactive et il est nécessaire de la faire réagir en premier[14] (Figure 2.III.21).

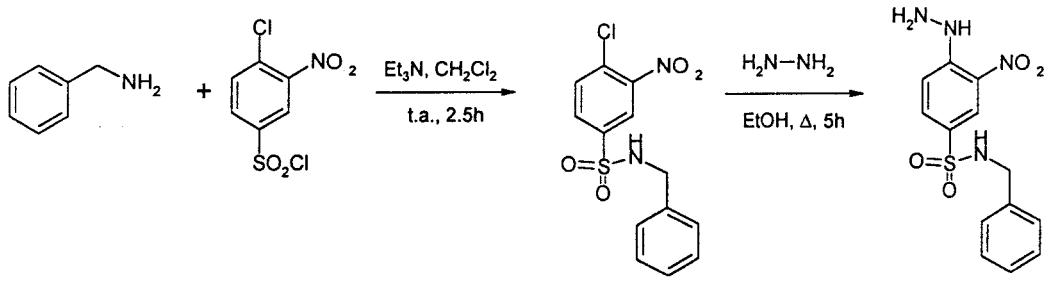


Figure 2.III.21 : Séquence des réactions avec le tenseur 4-chloro,3-nitro,benzènesulfochlorure [14].

2.III.6.3. Extension de la SNAr aux thiols et aux phénols.

Les amines ne sont pas les seuls nucléophiles utilisables dans les réactions de SNAr. Les thiols et les phénols pourraient être utilisés [11],[12]. Les conditions réactionnelles devraient être alors adaptées. Ainsi, comme nous l'avons vu par exemple, le phénol ne réagit bien qu'après de longs temps de chauffage [12]. Dans le cadre de remplacement bioisostères pour explorer les analogues autour d'un hit, ces molécules sont très intéressantes. Egalement, le recrutement de ces monomères permettraient d'apporter de nouveaux pharmacophores qui augmenteraient la diversité de la chimiothèque (Figure 2.III.22).

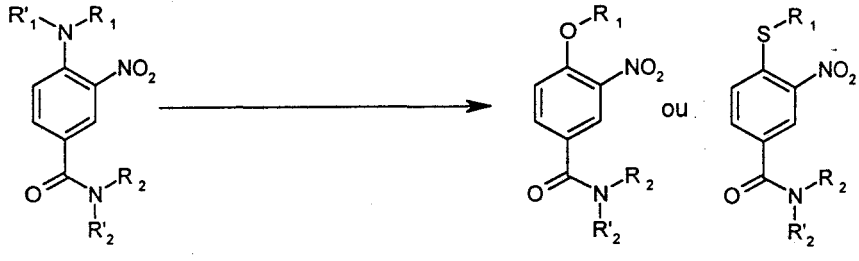


Figure 2.III.22 : Utilisation des thiols et phénols.

2.III.6.4. Synthèse de trimères.

Les expériences menées avec les amino-alcools lors de l'étude du champ d'application de notre protocole chimique ont montré que ces monomères généraient des trimères lors de la

seconde étape. Cette réaction indésirable dans notre chimiothèque initiale est le point de départ de la conception d'une chimiothèque de trimères. On pourrait tout à fait envisager d'effectuer l'étape de SNAr avec un composé bifonctionnel de type diamine mono-protégée ou amino-alcool. Dans ce dernier cas, il faudrait protéger la fonction alcool avant de réaliser l'activation au CDI de l'acide carboxylique ou utiliser un autre activateur qui soit spécifique des acides. La N-Boc-piperazine peut être par exemple utilisée pour la SNAr et après déprotection être alcylée avec des chlorures d'acides (Figure 2.III.23) [5].

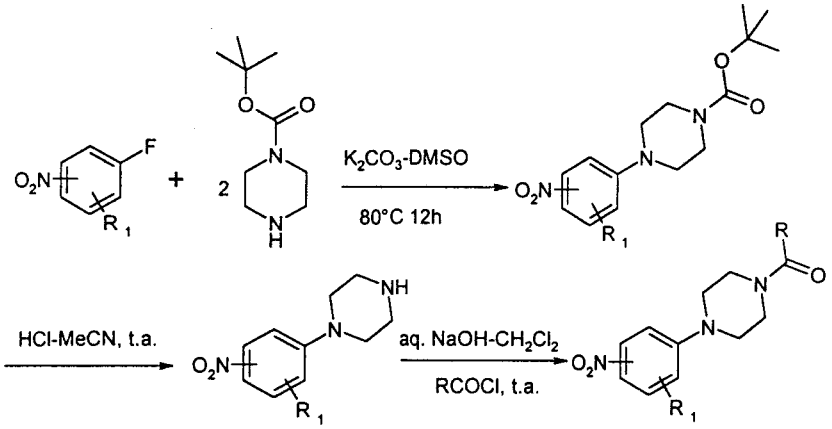


Figure 2.III.23 : Synthèse d'arylpipérazines [5].

2.III.6.5. Synthèses d'hétérocycles en phase solide.

Un autre moyen de diversifier les chimiothèques issues du tenseur acide 4-fluoro,3-nitro-benzène carboxylique est d'utiliser la fonction nucléophile potentielle qu'est le groupement nitro. Après réduction de cette fonction il est possible de synthétiser plusieurs types d'hétérocycles. La synthèse se fait alors en phase solide et la fonction acide carboxylique est utilisée pour ancrer le tenseur sur une résine (Figure 2.III.24). Selon la résine utilisée la fonction acide peut être régénérée permettant ainsi l'introduction d'une source de diversité par réaction avec des amines comme dans la chimiothèque que nous avons décrite.

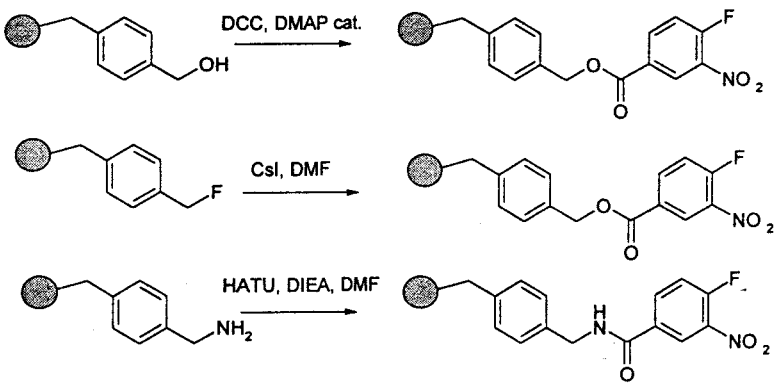


Figure 2.III.24. Ancrage du tenseur 4-fluoro,3-nitro benzène carboxylique.

Le tenseur acide 4-fluoro,3-nitro benzène carboxylique a déjà permis de synthétiser des hétérocycles variés : benzodiazépinones[15], benzimidazoles [16], benzopiperazinones [17],[18](Figure 2.III.25).

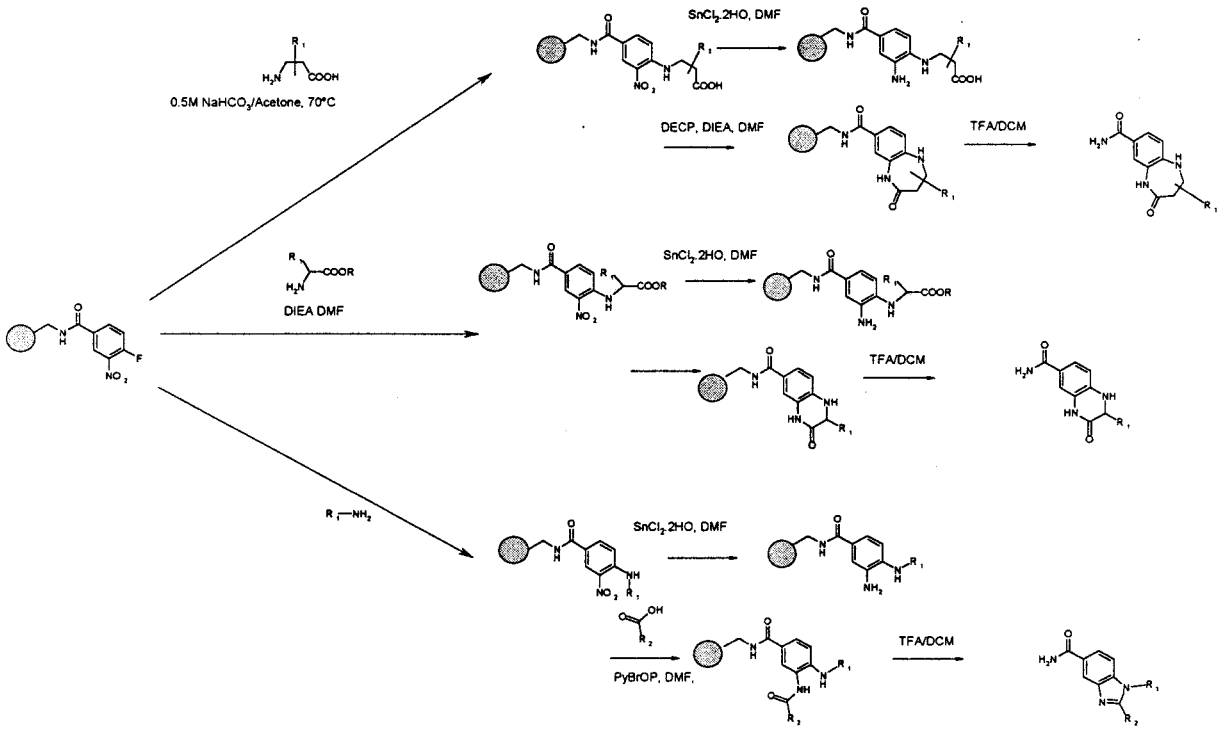


Figure 2.III.25 : Synthèse d'hétérocycles à partir du tenseur acide 4-fluoro, 3-nitro benzoïque.

Les composés hétérocycliques ainsi synthétisés présentent de nouveaux éléments de pharmacophores permettant d'espérer de nouvelles activités biologiques.

2.III.6.6. Schéma récapitulatif des extensions possibles.

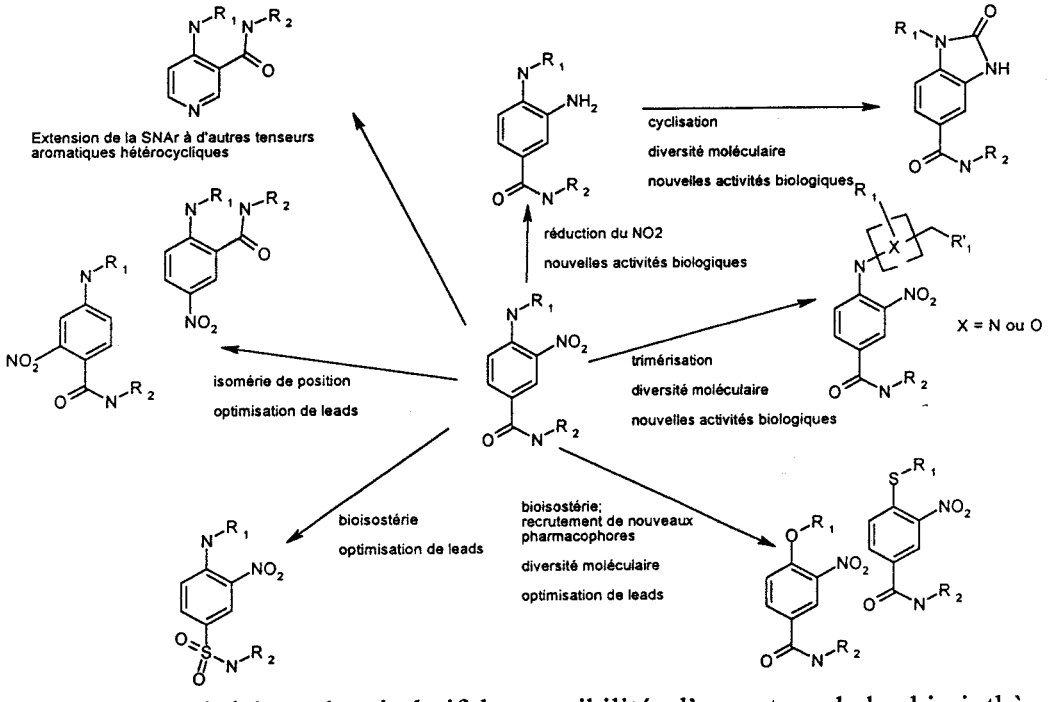


Figure 2.III.26 : Schéma récapitulatif des possibilités d'ouverture de la chimiothèque.

Nous avons conçu et réalisé la synthèse en solution d'une chimiothèque de 4-amino,3-nitro benzylamides. Parmi les tenseurs retenus pour l'étude de l'optimisation de la substitution nucléophile aromatique, seul l'acide 4-fluoro, 3-nitro benzoïque a montré une réelle facilité à subir des attaques nucléophiles.

La sélection de 80 amines pour la SNAr et 80 amines pour la formation d'amides a permis de réaliser la synthèse de 6400 4-amino, 3-nitro benzylamides. Une analyse du contrôle qualité a permis de mettre en évidence de très bonnes conversions. Quelques produits secondaires « inattendus » ont montré la nécessité d'un contrôle complet des monomères de départ.

La « chimiothèque-sélection » de 160 produits a également été produite, permettant si elle est criblée en première intention de déterminer l'activité intrinsèque de ces produits et d'orienter le choix des produits à tester ultérieurement.

BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 2.III.

[1] March J., *Advanced Organic Chemistry*, 4th Ed., John Wiley and Sons, New-York, ***1992***, pp 641-663.

[2] Chambers R.D., James S.R., Halo Compounds, *Comprehensive Organic Chemistry*, Stoddart J.F., ***1979***, Vol 1, pp560-566.

[3] Coomes R.G., Nitro and Nitroso Compounds, *Comprehensive Organic Chemistry*, Sutherland I.O., ***1979***, Vol 2, pp352-354.

[4] Loupy A., Haudrechy A., *Effets de milieu en synthèse organique*, Masson, Paris, ***1996***, pp153-157.

[5] Neuville L. Zhu J., Solution Phase Combinatorial Synthesis of Arylpiperazines, Tet. Lett., ***1997***, 38, pp 4091-4094.

[6] Torisawa Y., Hashimoto A., Furuta T., Minamikawa J., Investigation on the coupling reactions of Aryltriflates with Aromatic Amines : Selection of the Metal Catalyst., Biorg. & Med. Chem. Lett., ***1997***, 7, pp 1821-1824.

[7] Robson C., Meek M.A., Grundwaldt J.D., Lambert P.A., Queener S.F., Schmidt D., Griffin R.J., Non classical 2,4-diamino-5-aryl-6-ethyl pyrimidine Antifolates : Activity as Inhibitors of Dihydrofolate Reductase from Pneumocyqtis carinii and Toxoplasma gondii and as Antitumor Agents, J. Med. Chem., ***1997***, 40, pp 3040-3048.

[8] Hawkins D., Lindley J.M., Mc Robbie I.M., Meth-Cohn O., Competitive Cyclisations of Singlet and Triplet Nitrenes. Part 9. 2-(2-Nitrophenyl)-benzothiazoles and benzimidazoles, J.Chem. Soc. Perkin Trans. 1, ***1980***, pp 2387-2391.

[9] Ibata T., Isogami Y., Toyoda J., Aromatic Nucléophilic Substitution of Halobenzenes with Amines under high Pressure, Bull. Chem. Soc. Jpn., ***1991***, 64, pp 42-49.

[10] Blake A.J., Clark B.A., Mc Nab H., Sommerville C.C , Gas-Phase pyrolysis of 1-(2-azidophenyl) imidazole, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, ***1997***, 11, pp 1605-1608.

[11] Drysdale M.J., Reinhard J.F., S-Aryl cysteine S,S-dioxides as inhibitors of mammalian kynureninase, 1998, Bioorg. & Med. Chem. Lett., ***1998***, 8, pp 133-138.

[12] Xu W., Mohan R., Morrissey M.M., Polymer Supported Bases in Combinatorial Chemistry : Synthesis of Aryl Ethers from Phenols and Alkyl Halides and Aryl Halides, Tet. Lett. ***1997***, 38, N°42, pp 7337-7340.

[13] Greene T.W., Wuts P.G.M, Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd. Ed., John Wiley and Sons, ***1991***, pp 390-391.

[14] Pop I.E., Déprez B.P., Tartar A.L., Versatile Acylation of N-nucléophiles using a New polymer-Supported 1-Hydroxybenzotriazole Derivative, J.Org. Chem, ***1997***, 62, 8, pp 2594-2603.

[15] Schwarz M.K., Tumelty D., Gallop M.A., Solid Phase Synthesis of 1,5-Benzodiazepin-2-ones, Tet. Lett., ***1998***, 39, pp 8397-8400.

[16] Pop I.E., Thèse de doctorat de chimie organique et macromoléculaire, ***1997***, Lille I.

[17] Morales G.A., Corbett J.W., DeGrado W.F., Solid-Phase Synthesis of Benzopiperazinones, J.Org.Chem., ***1998***, 63, 1172-1177.

[18] Lee J., Murray W.V., Rivero R.A., Solid Phase Synthesis of 3,4-disubstituted-7-carbamoyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ones, J.Org.Chem, ***1997***, 62, pp 3874-3879.

- Chapitre 3-

Utilisation de la synthèse organique en parallèle, du criblage pharmacologique à haut débit et de la modélisation moléculaire pour la découverte et l'optimisation de têtes de série pharmaceutique.

CHAPITRE 3

UTILISATION DE LA SYNTHESE ORGANIQUE EN PARALLELE, DU CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE A HAUT DEBIT ET DE LA MODELISATION MOLECULAIRE POUR LA DECOUVERTE ET OPTIMISATION DE TÊTES DE SERIE PHARMACEUTIQUE.

3.I. INTRODUCTION

La découverte de médicaments consiste en une série d'étapes de création de diversité structurale qui sont chacune associées à une étape de sélection des composés selon un ou plusieurs critères biologiques ou pharmaceutiques. Dans un premier temps, ces critères sont l'activité de ces composés dans un système modélisant une pathologie comme l'affinité de liaison à une cible biologique ou un effet biologique complexe (phénotype cellulaire, réaction sur un organe isolé, comportement animal). Ensuite, quand un composé a montré une activité satisfaisante, d'autres propriétés doivent être étudiées telles que la sélectivité pharmacologique, la solubilité, la biodisponibilité, dans des modèles préfigurant l'environnement du principe actif dans la mise en forme pharmaceutique. La découverte de nouveaux médicaments est donc basée sur une accumulation de filtres d'une part expérimentaux et d'autre part basés sur la connaissance. Les nouvelles techniques d'automatisation et de miniaturisation des tests biologiques, de toxicité *in-vitro*,... , et de gestion des données ont permis d'accélérer considérablement durant la dernière décennie les étapes de « filtrage » pour la mise en évidence des candidats médicaments. L'avènement de la chimie combinatoire et des techniques de robotisation dans ce domaine ont par ailleurs permis d'alimenter l'ensemble des tests biologiques en nouveaux composés. La figure3.I.1 présente le nouveau cycle de la découverte de médicaments en intégrant les nouvelles technologies.

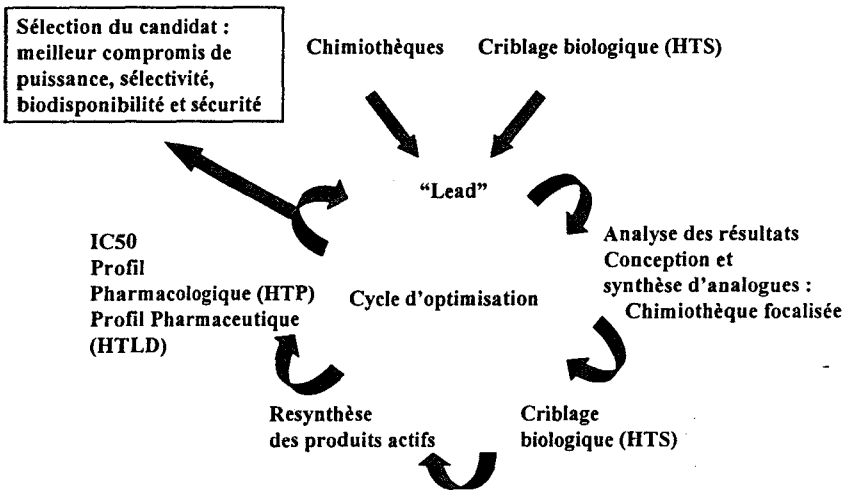


Figure 3.I.1 : Le cycle de la découverte de nouveaux médicaments.

Ce chapitre illustre sur deux cibles biologiques différentes : le récepteur aux opiacés de type μ et le récepteur aux benzodiazépines, l'utilisation de la synthèse organique en parallèle, du criblage pharmacologique à haut débit, de la modélisation moléculaire pour l'optimisation de têtes de série pharmaceutique.

3.II. LE CRIBLAGE PRIMAIRE.

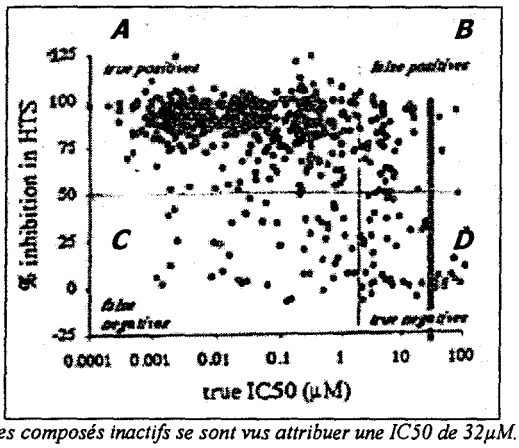
3.II.1. Introduction.

3.II.1.1. Mise en évidence de composés actifs lors d'un criblage biologique primaire HTS(High Throughput Screening).

La mise en évidence de composés actifs lors d'un criblage primaire dépend fortement de la qualité des résultats. Ceux-ci dépendent eux-mêmes du type de composés testés et de la technique d'HTS.

A. Qualité des résultats HTS.

Une analyse intéressante des résultats biologiques a été faite par Robin W.Spencer grâce à une représentation de l'IC_{50} du produit en fonction du pourcentage d'inhibition obtenu en HTS[1]. Cette analyse permet de déterminer un seuil au-dessus duquel une donnée positive pourra être considérée comme suffisamment fiable pour entreprendre la caractérisation du composé actif. Par exemple, les données peuvent être classées dans l'un des quatre groupes déterminés par les droites IC_{50}=2µM et pourcentage d'inhibition = 50%. On définit ainsi des vrais positifs dont l'IC_{50} est inférieure à 2µM et qui ont été détectés en HTS grâce à une inhibition supérieure à 50% (Figure 3.II.1 cadran A). De même on peut classer les autres composés en faux positifs (Figure 3.II.1 cadran B), vrais négatifs (Figure 3.II.1 cadran C), et faux négatifs (Figure 3.II.1 cadran D).



Les composés inactifs se sont vus attribuer une IC50 de 32µM.

Figure 3.II.1. : Analyse rétrospective de la qualité des résultats HTS [1].

D'une manière générale, le criblage biologique ne constitue pas l'étape la plus coûteuse, par contre la caractérisation approfondie des composés actifs est longue et coûteuse. Les composés répertoriés comme faux positifs constituent donc un problème majeur car ils requièrent un travail supplémentaire d'analyse. Les faux négatifs (cadran C) sont également problématiques car ils rendent compte de composés actifs que le HTS n'a pas su détecter. Ceci est très préjudiciable car il se pourrait très bien que ces composés non détectés soient les seuls composés actifs ! Dans une campagne de tests biologiques à haut débit, comme le montre le cycle de découverte de nouveaux médicaments de la Figure 3.I.1., les produits sont testés à une concentration donnée et seuls les composés actifs sont retenus pour des calculs d'IC_{50}, ...

Le calcul du pourcentage de vrais positifs par rapport au nombre total de composés actifs (vrais positifs et faux négatifs) donne la probabilité de trouver un composé actif grâce au HTS. Dans l'exemple de la figure 3.II.1, cette probabilité était de 91% [1]. Des produits peuvent être déplacés du cadran A (vrais positifs) vers le cadran C (faux négatifs) parce que le test présente une grande variabilité. On peut remédier à ce problème en testant plusieurs fois les produits. Dans l'exemple de la Figure 3.I.1, le test des produits deux fois diminue de 90% le risque de ne pas détecter un composé actif : $1 - (1\text{-}0.91)^2 = 99.2\%$!

La mise en évidence de composés actifs lors d'un test HTS dépend de l'exigence de la cible mais aussi des composés testés. Les produits connus pour être des actifs reproductibles mais qui ne constituent pas de véritables têtes de série sont à proscrire. On évitera ainsi de tester des colorants azo qui peuvent interférer avec le mécanisme de détection d'activité, des dérivés polysulfoniques, des agents d'alkylation qui peuvent altérer la cible de manière irréversible,, qui n'ont pas d'activité d'inhibition spécifique [1]. A l'inverse, certains composés peuvent apparaître comme «négatifs » parce qu'ils sont peu solubles dans les conditions du test : ils n'ont donc tout simplement pas été testés !

B. La chimiothèque idéale.

Il serait intéressant de trouver une « chimiothèque idéale », c'est à dire : diverse, unique, facilitant la synthèse d'analogue, « pharmacophorique ». Cependant, la variété des problématiques biologiques fait qu'il est difficile de définir une « chimiothèque idéale » pour la recherche pharmaceutique. Le tableau 3.II.1 montre un exemple de résultats obtenus avec une même chimiothèque de 2500 composés testée sur plusieurs récepteurs à une concentration de 30µM [2]. Cela illustre le fait que certaines cibles, comme TNF-R ou GLP1-R, aient des exigences particulières, non satisfaites dans la bibliothèque qui contient pourtant des ligands à d'autres cibles.

Test à 30µM	*% d'inhibition >90%*	*% d'inhibition >50%*
Dopamine Uptake	4,60	15,64
Canal sodium	5,20	14,00
Dopamine D4,4	4,80	8,72
CBenzodiazépineR	1,00	6,24
Phosphodiesterase PDE-II	0,36	2,80
EGF Tyrosine kinase	0,52	1,32
i-NO synthase	0,16	0,76
Cathepsine-B	0,04	0,40
GLP-1	0,00	0,24
TNF-a	0,00	0,04

Résultats exprimés en % de produits.

Tableau 3.II.1 : Criblage d'une chimiothèque de 2500 produits sur 10 cibles biologiques différentes[2].

Afin d'augmenter la probabilité de trouver des composés actifs, il est intéressant de tester des chimiothèques diverses qui recouvrent bien les espaces de diversité biologique et chimique. Tous les composés synthétisables ne peuvent pas raisonnablement être testés. Le criblage d'une chimiothèque diverse permet de réduire le champ d'investigation à plusieurs séries chimiques rapidement identifiées et de réduire donc le coût jusqu'au candidat médicament. De même la diversité de la chimiothèque diverse permet d'aboutir à des séries

différentes, permettant ainsi d'assurer le passage des différentes étapes de filtrage pour au moins l'une des séries (Figure 3.II.2).

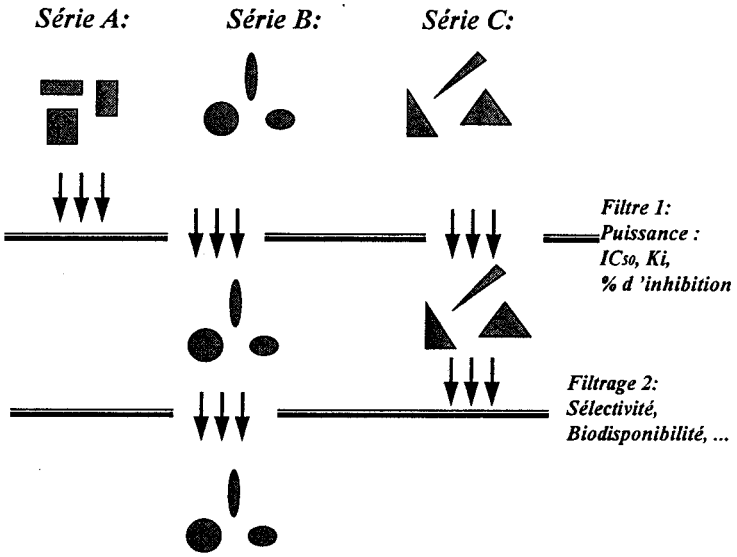


Figure 3.II .2 : Utilité de l'utilisation de chimiothèques diverses en criblage primaire.

Une chimiothèque diverse peut être considérée comme un ensemble de molécules chacune unique représentant d'une série. Cependant comme l'HTS peut être imparfait, et que de plus, des modifications mineures sur une molécule peuvent provoquer une perte d'activité, par exemple, un substituant en ortho sur un groupement aromatique peut induire une orientation « twistée » aboutissant à une perte d'activité de l'ordre de 3 ou 4 log, il convient de tester plusieurs représentants de chaque série qui serviront de vérificateurs et qui permettront d'identifier correctement une série active. Dans l'exemple de la figure 3.II.1, si deux analogues actifs sont présents dans la chimiothèque, la probabilité d'identifier la série, c'est à dire la probabilité qu'au moins un des deux analogues soit identifié par l'HTS est de $1 - (1-0.91)^2 = 99.2\%$ (pour un seul test par composé). Les chimiothèques combinatoires ont cet avantage qu'elles présentent toutes les combinaisons possibles entre deux monomères A et B (dans le cas d'une synthèse de dimères). Ainsi chaque composé est analogue d'un certain nombre de produits présentant un monomère en commun. L'inconvénient des chimiothèques combinatoires de présenter une certaine redondance est donc compensé par les informations permettant d'alimenter des tables de relations structure activité.

Lorsqu'un « composé actif » a été identifié, caractérisé et confirmé, une chimiothèque focalisée autour du « composé actif » est alors synthétisée et criblée pour permettre les études de relations structure activité. Afin de faciliter cette étape, la chimiothèque diverse testée doit être « ouverte » à la synthèse d'analogues.

Lors d'un programme de découverte de nouvelles têtes de séries chimiques, il est important de trouver des composés actifs uniques (originaux) dans une chimiothèque diverse. Des produits synthétisés par des voies originales (brevetées si possible) ou à partir de matières premières également originales augmentent considérablement l'intérêt d'une série chimique.

Enfin, les produits de la chimiothèque testée doivent présenter des éléments de pharmacophore. Ces éléments doivent rendre possible les interactions directionnelles ou de forte énergie : il s'agit des sites aromatiques, des sites aliphatiques, des donneurs de liaisons hydrogène, des accepteurs de liaisons hydrogène, des charges positives ou négatives.

L'ensemble de ces éléments de pharmacophore et la manière dont ils sont disposés les uns par rapport aux autres contribuent également aux propriétés physico-chimiques de ces produits.

3.II.1.2. Propriétés physico-chimiques des chimiothèques primaires.

Les méthodes de découverte de « têtes de série » ont changé depuis le début de la décennie. Il y a quelques années encore, les nouvelles molécules candidates provenaient de chimiothèques « historiques ». Celles-ci regroupaient des composés au sein de séries chimiques issues de molécules découvertes lors de tests *in vivo*. Les composés issus de ces collections historiques présentaient donc toutes les caractéristiques structurales et physico-chimiques compatibles avec une bonne biodisponibilité. Avec l'avènement de l'HTS de chimiothèques de composés nouveaux (c'est-à-dire non liés à une activité biologique a priori), les composés primaires actifs ont petit à petit présenté une lipophilie accrue (les stratégies simples de synthèse sans protection ne permettant pas d'utiliser des matières premières possédant des groupements plus hydrophiles qui sont généralement aussi réactifs) et un poids moléculaire plus élevé (la diversité des chimiothèques étant obtenue par accumulation de synthons sophistiqués autour d'un squelette) [3], [4], [5].

Dotés de telles caractéristiques, les composés sont moins solubles et généralement moins biodisponibles. Leur optimisation s'en trouve rendue plus difficile : il est souvent difficile de faire des modifications structurales qui augmentent de manière significative la perméabilité et la solubilité d'une molécule déjà optimisée pour l'activité de liaison à la cible [5]. L'étape d'obtention de molécules actives par voie orale est la moins prédictible, mais aussi moins automatisable du processus de découverte de médicaments, c'est celle qui réclame le plus de ressources multidisciplinaires. Il s'agit donc souvent de l'étape limitante.

Généralement le choix d'un candidat médicament est un équilibre entre la puissance, la solubilité et la perméabilité, et en théorie, une forte puissance peut compenser un problème de solubilité ou de perméabilité. En pratique, une trop grande puissance est aussi un défaut car le composé présent en très faible quantité est vite détruit. Bien que la formulation résolve certains problèmes, il apparaît clairement que la meilleure façon d'y remédier reste la chimie [4]. Il est donc important d'acquérir en même tant que des informations sur la puissance de la molécule, des données sur les caractéristiques physico-chimiques, la biodisponibilité orale étant fonction de la solubilité, de la perméabilité, du premier passage métabolique et de l'espèce.

Lipinski et ses coll., ont analysé ces propriétés pour les composés entrant en phase II et ont ainsi identifié une série de paramètres structuraux corrélés aux capacités des structures à passer les épreuves de sélections préliminaires [3],[4]. Il suggère de mettre en garde systématiquement les chercheurs lorsqu'ils travaillent sur des séries ne satisfaisant pas à ces critères. A partir des molécules ayant un United States Adopted Name (USAN) ou un International Nonproprietary Name (INN) et des molécules présentes dans le World Drug Index, un ensemble de 2245 structures a été utilisé pour évaluer les grandeurs suivantes :

- ***Le poids moléculaire.*** En effet, la perméabilité intestinale et le passage de la barrière hémato-encéphalique diminuent avec l'augmentation du poids moléculaire.

- ***Le LogP*** (logarithme(coefficient de partage n-octanol/eau)). Cette propriété reflète la lipophilie de la molécule.

- ***La somme du nombre de liaison NH et OH.*** Ce nombre est un indicateur du caractère donneur de liaisons hydrogène de la molécule qui lorsqu'il est élevé diminue la perméabilité à travers les bi-couches lipidiques membranaires.

- ***La somme du nombre d'atomes N et O.*** Ce nombre est un indicateur du caractère accepteur de liaisons hydrogène de la molécule qui lorsqu'il est élevé diminue la perméabilité à travers les bi-couches lipidiques membranaires : en effet plus ce nombre est élevé, plus le coût de désolvatation à payer pour rentrer dans la phase lipidique de la membrane sera élevé. Ce calcul n'est cependant pas représentatif des grandes variations de caractère accepteur de liaisons hydrogène pour un même atome dans des états d'hybridation ou de conjugaison différents où la disponibilité des doublés non liants peu varier (entre l'azote d'une pyridine ou l'azote d'un pyrrole par exemple)[3].

Les résultats obtenus pour le groupe de molécules choisies par Lipinski et ses coll. est présenté dans le tableau 3.II.2.

Propriétés	*% de molécules présentant la propriété (ou combinaison de propriétés)*
(A) Poids moléculaire <= 500 g/mol	89
(A') Poids moléculaire <= 600 g/mol	92
(B) CLogP <= 5 (ouMLogP <= 4.15)	90
(C) Somme NH + OH <= 5	92
(D) Somme N + O <= 10	88
Combinaisons de propriétés	***% de molécules présentant la propriété (ou combinaison de propriétés)***
(C) + (D)	90
(A) + (D)	93
(A) + (C)	96
(A) + (B)	99

Tableau 3.II.2 : Caractéristiques de la chimiothèque « USAN » décrite par Lipinski [3],[4].

De ces résultats, Lipinski a établi la « règle des 5 » (The Rule of Five), qui énonce qu'une faible absorption est plus probable quand un composé possède [3] :

- Plus de 5 donneurs de liaisons hydrogène.
- Plus de 10 accepteurs de liaisons hydrogène.
- Un cLogP plus grand que 5 (ou MLogP>4.15).
- Un poids moléculaire supérieur à 500g/mol.

L'ensemble de ces caractéristiques sont utilisés comme valeurs d'alerte mais ne remplace en aucun cas l'expérimentation lors du développement.

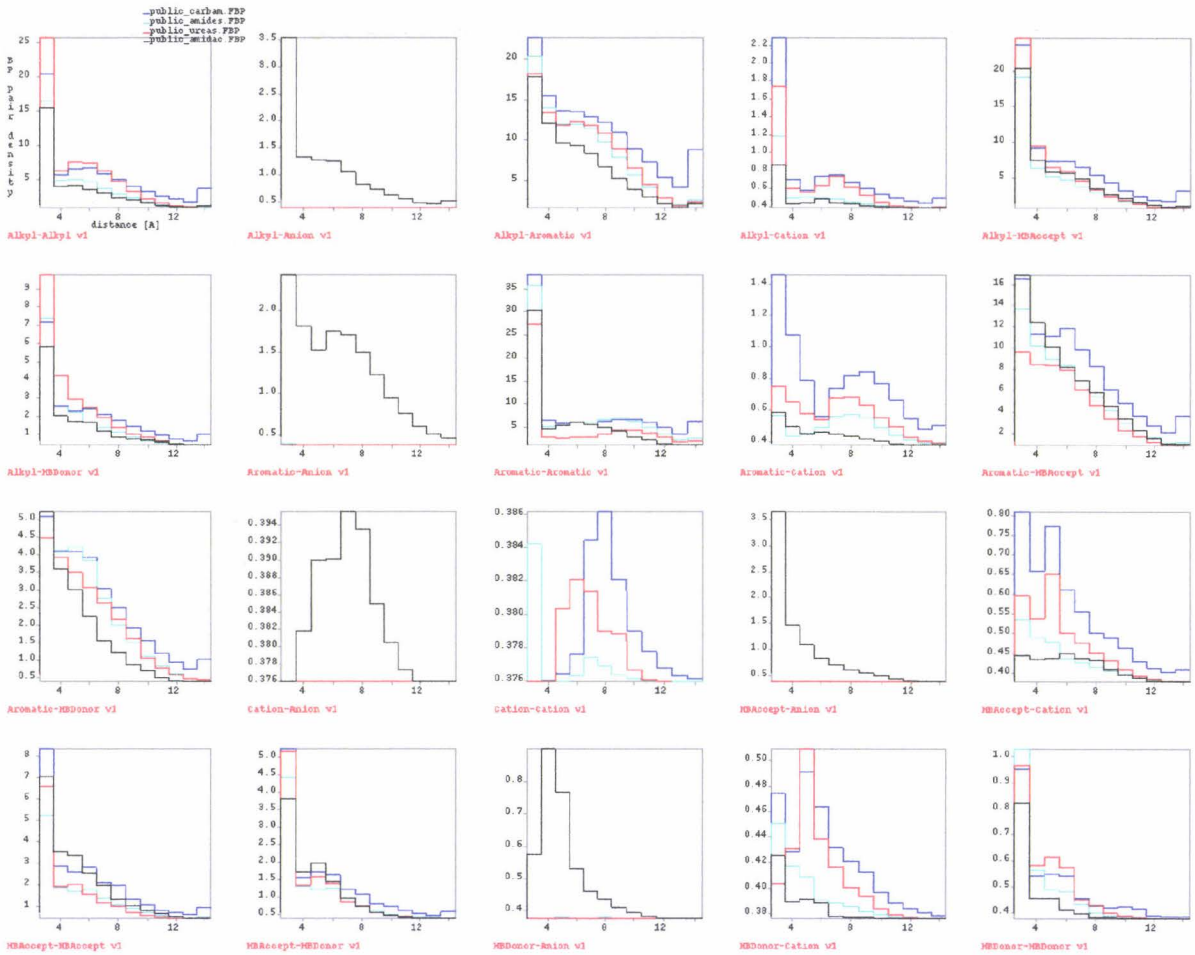

_public_carbam.FBP
_public_amides.FBP
_public_ureas.FBP
_public_amidac.FBP
pair density
distance [A]
Alkyl-Alkyl v1
Alkyl-Anion v1
Alkyl-Aromatic v1
Alkyl-Cation v1
Alkyl-HBAccept v1
Alkyl-HBDonor v1
Aromatic-Anion v1
Aromatic-Aromatic v1
Aromatic-Cation v1
Aromatic-HBAccept v1
Aromatic-HBDonor v1
Cation-Anion v1
Cation-Cation v1
HBAccept-Anion v1
HBAccept-Cation v1
HBAccept-HBAccept v1
HBAccept-HBDonor v1
HBDonor-Anion v1
HBDonor-Cation v1
HBDonor-HBDonor v1

Figure 3.II.4

3.II.2. La chimiothèque testée.

3.II.2.1. Les sous-librairies.

La chimiothèque testée est composée de 10560 produits répartis en 5 sous-chimiothèques structurales en fonction de la voie de synthèse : urées, carbamates, amides, sulfonamides et amido-acides (Figure 3.II.3).

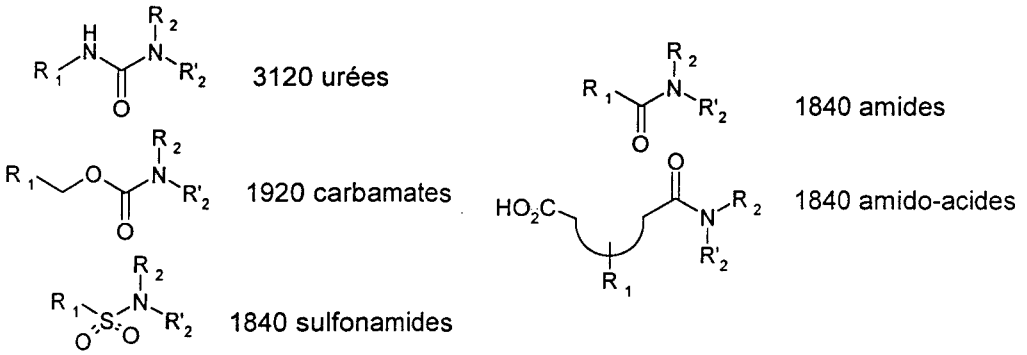


Figure 3.II.3 : Sous-librairies de la chimiothèque criblée sur les récepteurs μ opiacé et BZR.

3.II.2.2. La diversité structurale et la flexibilité.

La diversité structurale de la chimiothèque est illustrée par les autocorrelogrammes représentés en Figure 3.II.4.

Chaque famille chimique présente des autocorrélogrammes différents et donc par définition des pharmacophores différents. Dans une même famille, pour chaque couple d'éléments de pharmacophore, on peut remarquer que les composés couvrent plusieurs plages de distances. Ainsi au sein d'une même famille chimique, les composés sont divers du point de vue pharmacophorique.

Nous avons également calculé le nombre de liaisons à libre rotation pour chacune des molécules de la chimiothèque, afin d'évaluer leur flexibilité (Figure 3.II.5).

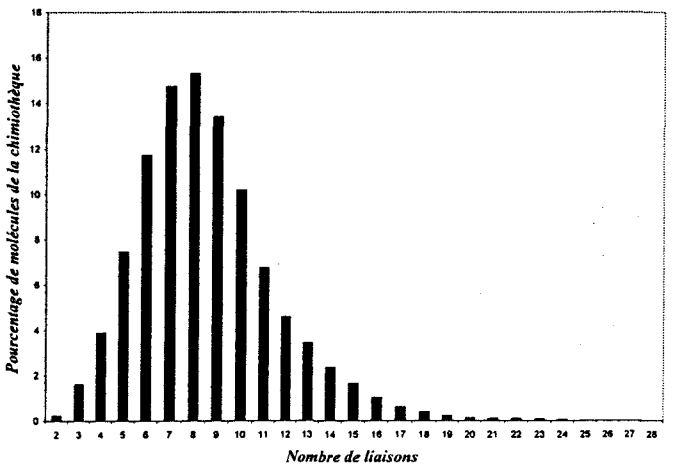


Figure 3.II.5 : Répartition du nombre de liaisons à libre rotation.

3.II.2.3. Les caractéristiques essentielles selon Lipinski.

Comme nous l'avons montré au paragraphe précédent, il est important d'évaluer certaines caractéristiques physico-chimiques des molécules criblées. Nous avons cherché à savoir si les molécules de la chimiothèque présentaient un risque de faible absorption selon la « Règle des 5 » de Lipinski. La figure 3.II.6 présente la répartition de ces caractéristiques pour la chimiothèque avec en gris foncé les valeurs d'alerte de Lipinski. Le tableau 3.II.3 résume ces résultats en les comparant à ceux trouvés par Lipinski sur la « USAN library ».

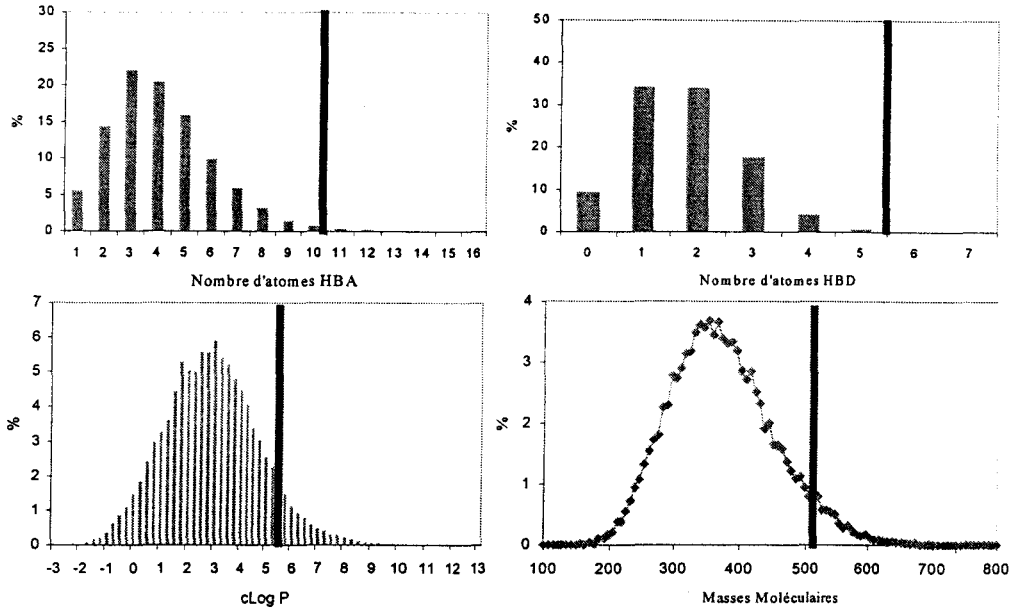


Figure 3.II.6 : Répartition du nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène, accepteurs de liaisons hydrogène, du cLogP et du poids moléculaire pour la chimiothèque criblée.

	Propriétés	*"USAN Library"*	*Chimiothèque choisie*
A	Poids moléculaire>500	11%	11.2%
B	cLogP>5	10%	6.2%
C	Somme NH+OH (caractère donneur de liaisons hydrogène)>5	8%	0.03%
D	Somme N+O (caractère accepteur de liaisons hydrogène)>10	12%	1.7%

Tableau 3.II.3 : Caractéristiques de la chimiothèque primaire selon les règles de Lipinski.

Lipinski a montré qu'il existait dans sa « USAN library » des molécules qui font exception à sa « règle des 5 ». Ces molécules, bien qu'actives oralement, possédaient des caractéristiques structurales ne remplissant pas les critères définis. Il s'agit de molécules appartenant à l'une des 4 classes thérapeutiques suivantes : antibiotiques, antifongiques, vitamines et glycosides cardiaques. L'activité orale de ces molécules qui ne présentent pas les caractéristiques définies par la « règle des 5 », est probablement due au fait que ces molécules ont souvent des transporteurs membranaires spécifiques. La présence de glycosides qui présentent des groupements « sucres » ayant de nombreuses fonctions O-H, augmente donc le pourcentage de produits ne remplissant pas les règles de Lipinski sur les caractères donneurs

et accepteurs de liaisons hydrogènes. L'ensemble des molécules de ces quatre classes montre généralement un poids moléculaire assez élevé et/ou un Log P élevé.

L'existence de ces exceptions dans la bibliothèque « USAN » explique les différences observées sur les caractères donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, entre la « USAN » (8 et 12%) et la chimiothèque (0.03 et 1.7%) que nous avons utilisée et qui ne contient pas ce type de produits. Par contre, ceci n'explique pas les pourcentages élevés dans notre chimiothèque de produits dont le poids moléculaire est supérieur à 500 et de produits dont le cLogP est supérieur à 5. On peut penser que la lipophilie accrue est due aux stratégies simples de synthèse sans protection qui ne permettent pas d'utiliser des matières premières possédant des groupements plus hydrophiles qui sont généralement aussi réactifs. Les poids moléculaires plus élevés sont dus à l'utilisation de monomères de poids moléculaires pouvant être faible ou élevé et qui produisent par synthèse combinatoire toutes les combinaisons de poids moléculaire. Ainsi de la même façon que sont synthétisés les produits de type petit-petit, gros-petit, moyen-moyen, ... sont synthétisés des produits de type gros-gros.

La chimiothèque primaire possède ainsi des caractéristiques comparables à la bibliothèque « USAN » qui a permis d'établir la « Règle des 5 ». Ceci est encourageant pour la capacité des molécules à être de bonnes têtes de série.

3.II.3. Les résultats du criblage primaire sur les récepteurs μ opiacé et BZR.

3.II.3.1. Les récepteurs choisis.

Les récepteurs μ et BZR ont été choisi car ils représentent chacun une famille de récepteurs membranaires extracellulaires. Le récepteur μ opiacé qui comporte 7 domaines trans-membranaires, est couplé aux protéines G tandis que le récepteur BZR est couplé à un canal ionique (chlorure). La découverte de composés actifs pour chacun des récepteurs montrerait l'aptitude de CEREP à fournir des candidats médicaments pour différentes cibles biologiques. Dans l'optique d'illustrer la plate-forme technologique de CEREP, il était également important d'utiliser des tests peu onéreux et de choisir des cibles pour lesquelles des données de relations structure activité sont publiées.

3.II.3.2. Les pourcentages de produits actifs.

A. Le pourcentage global d'actifs.

Le tableau 3.II.4 présente les résultats obtenus lors du criblage de la chimiothèque sur chacune des deux cibles biologiques à une concentration de 10μM. Cette concentration relativement élevée a été choisie afin de ne négliger aucune piste pour un criblage primaire et correspond à une concentration utilisée classiquement en criblage primaire.

% d'inhibition minimal	*% de molécules μ opiacé*	*% de molécules BZDc*
>=50	**1,70**	**1,89**
>=60	**1,00**	**1,29**
>=70	**0,55**	**0,80**
>=80	**0,24**	**0,37**
>=90	**0,06**	**0,16**

Tableau 3.II.4 : Taux de molécules actives présentant un pourcentage d'inhibition minimal de 50%.

Les pourcentages de produits actifs sont comparables aux taux publiés pour le criblage de chimiothèques généralistes à cette concentration. La chimiothèque semble suffisamment diverse pour permettre la découverte de structures actives sur différentes cibles. Les pourcentages étant similaires pour les deux récepteurs, la chimiothèque semble pouvoir apporter des réponses à des problèmes biologiques différents avec la même probabilité.

B. Le pourcentage d'actif par sous-librairie.

Bien que le classement des produits en 5 sous-chimiothèques correspondant aux voies de synthèse soit « arbitraire », il nous a paru intéressant de comparer les pourcentages d'actifs obtenus pour chacune des sous-chimiothèque (Tableau 3.II.5).

BZDc	*AMIDO-ACIDES*	*SULFAMIDES*	*CARBAMATES*	*UREES*	*AMIDES*
>=50	0,16	1,20	3,85	2,53	1,25
>=60	0,16	0,98	2,76	1,51	0,87
>=70	0,16	0,60	1,88	0,83	0,54
>=80	0,05	0,11	0,99	0,38	0,33
>=90	0,05	0,05	0,42	0,13	0,22
μ opiacé	*AMIDO-ACIDES*	*SULFAMIDES*	*CARBAMATES*	*UREES*	*AMIDES*
>=50	0,27	0,49	3,80	2,02	1,63
>=60	0,11	0,05	2,92	0,90	1,03
>=70	0,05	0,00	1,51	0,48	0,71
>=80	0,05	0,00	0,83	0,16	0,16
>=90	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00

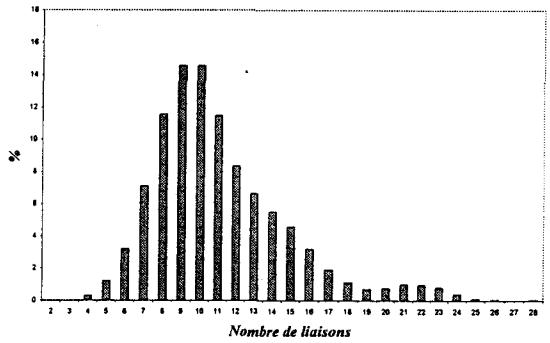
Tableau 3.II.5 : Taux de succès en % de produits sur les deux récepteurs pour les 5 sous-chimiothèques.

Les résultats les moins bons sont observés pour les produits résultants de l'ouverture d'anhydrides. Ceci peut être expliqué par le fait que ces composés portent une charge négative. Le classement est le suivant :

Carbamates>Urées>Amides>Sulfamides>Amic-acides

Une explication plausible serait la plus grande flexibilité des carbamates et des urées, leur permettant de se lier plus facilement à différents récepteurs. En effet, les carbamates testés sont formés exclusivement à partir d'alcools primaires. Ces molécules présentent donc un degré de liberté supplémentaire par rapport aux molécules issues des autres chimiothèques. Dans le cas des urées où une amine est forcément primaire également, le groupement NH-CO-N est moins encombré que le groupement N-CO des amides. La figure 3.II.7 montre la répartition du nombre de liaisons à libre rotation pour la sous-chimiothèque de carbamate. On peut remarquer la distribution est « bimodale »et plus étalée que la moyenne de la chimiothèque.

(A) :



(B) :

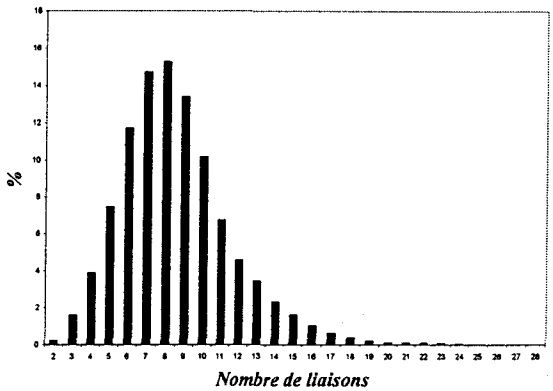


Figure 3.II.7 : Comparaison de la répartition du nombre de liaisons à libre rotation de la sous-chimiothèque de carbamates *(A)* avec la moyenne des 5 sous-chimiothèques *(B)*.

3.III. DECOUVERTE ET OPTIMISATION DE LIGANDS DU RECEPTEUR BZR.

La partie de ce chapitre abordée ici concerne l'analyse des résultats du criblage primaire sur le récepteur BZR et l'optimisation des têtes de séries obtenues.

3.III.1. Les résultats du criblage primaire.

3.III.1.1. Resynthèse des produits actifs et caractérisation biologique.

L'ensemble des milieux réactionnels ayant donné une activité en HTS ont été soumis à une vérification de leur activité à trois concentrations différentes 10^{-5}M, 10^{-6}M et 10^{-7}M. Nous avons ensuite resynthétisé et purifié les produits attendus afin de calculer leur IC_{50} sur le récepteur BZR (Tableau 3.II.6).

#	Structure	Milieu réactionnel		Produit purifié		#	Structure	Milieu réactionnel		Produit purifié	
		% d'inhibition à 10-5M	% d'inhibition à 10-7M/10-6M/10-5M	% d'inhibition à 10-7M/10-6M/10-5M	IC50 en nM			% d'inhibition à 10-5M	% d'inhibition à 10-7M/10-6M/10-5M	% d'inhibition à 10-7M/10-6M/10-5M	IC50 en nM
(37)		87 %	-/28/82 %	-/-/31%	ND	*(47)*		96 %	-/46/95 %	11/68/98%	764
(38)		84 %	-/29/75 %	3/23/77%	1368	*(48)*		89 %	-/19/79 %	17/26/85%	1479
(39)		82 %	-/25/71 %	-/-/21%	ND	*(49)*		92 %	-/26/81 %	1/46/90%	1454
(40)		84 %	-/28/84 %	-/2/2%	ND	*(50)*		92 %	-/23/81 %	6/46/87%	1303
(41)		84 %	8/35/81 %	8/5/2%	ND	*(51)*		91 %	1/26/86 %	4/6/1%	ND
(42)		89 %	18/53/89 %	-/2/5%	ND	*(52)*		95 %	15/71/94 %	1/12/21%	ND
(43)		87 %	5/46/88 %	6/53/90%	768	*(53)*		90 %	-/59/93 %	20/73/94%	370
(44)		85 %	5/42/90 %	-/14/61	3734	*(54)*		94 %	-/7/89 %	10/72/77%	520
(45)		88 %	6/44/88 %	16/64/95%	480	*(55)*		98 %	-/25/83 %	14/53/91%	1044
(46)		96 %	-/12/77 %	1/-/37%	ND	*(56)*		81 %	7/21/82 %	10/12/12%	ND

ND : Non déterminé.

Tableau 3.II.6 : Structures des composés actifs, résultats d'HTS et résultats d'IC_{50}.

Les IC_{50} des « composés actifs » varient de 370nM à 3734nM. D'après les représentations de la figure 3.II.8, la concentration test 10^{-5}M a permis d'identifier des composés actifs aussi bien micro-molaires ouvrant des pistes intéressantes que des composés plus actifs. Un test à la concentration 10^{-6}M permet de faire la distinction entre ces différents produits.

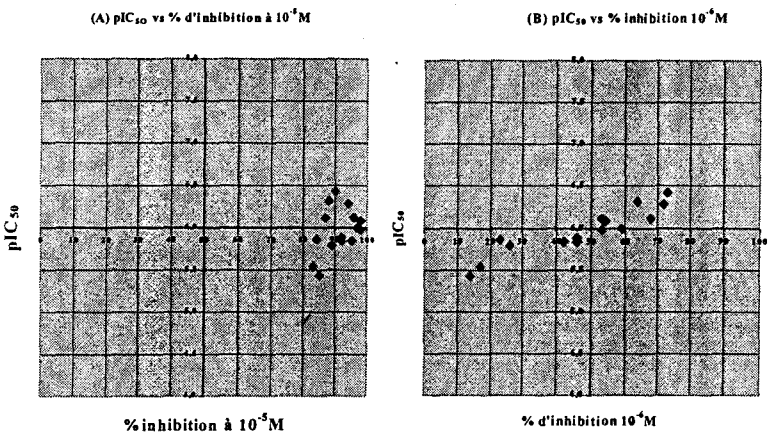


Figure 3.II.8 : Représentation du pIC50 en fonction de la valeur d'inhibition obtenue à 10^{-5}M *(A)* ou 10^{-6} M *(B)*.

L'activité de certains produits n'a pas été confirmée. Par exemple le produit *(56)* attendu dans le milieu réactionnel était en fait minoritaire (Figure 3.II.9). L'analyse LCMS du milieu réactionnel testé a mis en évidence la présence du trimère *(57)* majoritairement. L'activité a été attribuée à ce produit. Ce résultat explique que le produit attendu *(56)* synthétisé et purifié n'a pas montré d'activité. Nous avons supposé que l'effet attracteur de la pyridine stabilise l'espèce activée imidazolide de l'acide laissant ainsi le temps à la fonction alcool de réagir.

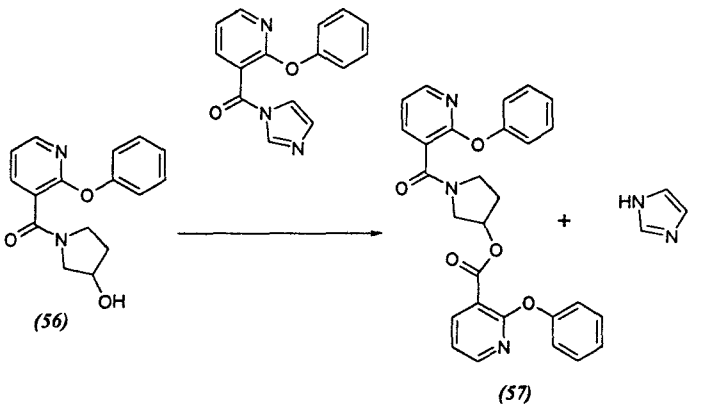


Figure 3.II.9 : Identification d'un produit secondaire actif.

Le milieu réactionnel obtenu lors de la synthèse du composé *(41)* contenait deux produits secondaires. Ces produits n'ont pas été resynthétisés. L'activité obtenue lors du test HTS n'a donc pas pu être attribuée à une structure.

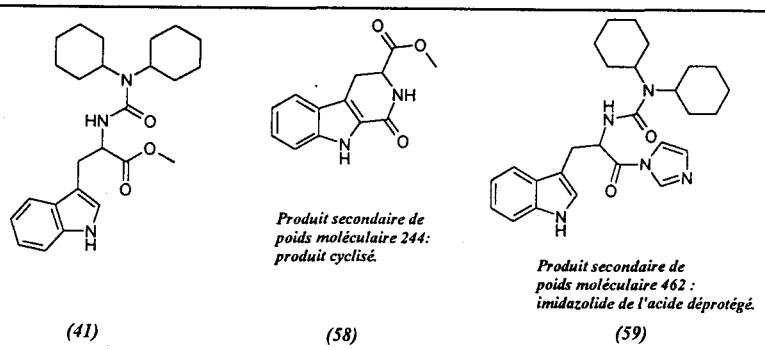


Figure 3.II.10 : Structure du produit ***(41)*** n'ayant pas donné l'activité et la structure supposée des produits secondaires présents dans le milieu testé en HTS.

Au vu des spectres de masses obtenus pour ces produits secondaires, nous avons supposé les structures présentées en figure 3.II.10. Le premier produit secondaire ***(58)*** proviendrait de la cyclisation du produit ***(41)*** par attaque nucléophile du carbone en α de l'azote de l'indole sur la liaison urée et départ de la N-dicyclohexylamine. Le second produit ***(59)*** serait issu de la formation de l'imidazolide (les urées sont réalisées grâce au CDI) de l'acide déprotégé.

3.III.1.2. Mise en évidence de phénomènes d'oxydation dans le DMF et/ou le DMSO.

Parmi les molécules actives 7 autres produits n'ont pas confirmé leur activité après resynthèse et purification. Dans quatre cas, lors de la resynthèse des produits secondaires ont été purifiés. La LCMS indiquait un ion moléculaire de masse = masse du produit attendu + 14. La RMN de ces produits secondaires a permis de montrer qu'il s'agissait de produits oxydés. L'analyse LCMS des milieux réactionnels testés en HTS a permis de montrer que les produits secondaires oxydés y étaient majoritaires. Les produits concernés sont dérivés soit de la 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline soit de la 1,2,3,6-tetrahydropyridine. Les produits isolés ont montré une activité intéressante (Tableau 3.II.7).

#	% d'inhibition du milieu réactionnel à 10^{-5}M lors de l'expérience HTS	% d'inhibition du milieu réactionnel à 10^{-7}M/10^{-6}M/10^{-5}M lors de la validation sur le milieu réactionnel.	Structure du Produit attendu de poids moléculaire M	% d'inhibition du produit attendu purifié, à 10^{-7}M/10^{-6}M/10^{-5}M.	#	Structure du Produit oxydé de poids moléculaire M+14	% d'inhibition du produit oxydé purifié, à 10^{-7}M/10^{-6}M/10^{-5}M.	IC_{50} nM du produit oxydé purifié.
(37)	87 %	-/28/82 %		-/-/31%	*(60)*		36/78/103 %	608
(39)	82 %	-/25/71 %		-/-/21%	*(61)*		-/31/80%	1356
(46)	96 %	-/12/77 %		1/-/37%	*(62)*		9/68/94%	447

(40)	84 %	-/28/84 %		- -/2/2%	*(63)*	?	ND	ND
(42)	89 %	18/53/89 %		-/2/5%	*(64)*	?	ND	ND
(51)	91 %	1/26/86 %		4/6/1%	*(65)*	*	ND	ND
(52)	95 %	15/71/94 %		1/12/21%	*(66)*	*	ND	ND

*ND : Résultat non déterminé (produit non resynthétisé) ; * : Structure supposée au vu des résultats précedents.*

Tableau 3.II.7 : Résultats biologiques des produits secondaires oxydés dérivés de la 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline et de la 1,2,3,6-tetrahydropyridine.

L'explication probable de la formation de ces produits serait l'oxydation dans le DMF (solvant de synthèse) ou dans le DMSO (solvant de mise en solution pour l'HTS) par l'oxygène de l'air. Ces deux solvants sont en effet de bons solvants de l'oxygène moléculaire. Lors de la resynthèse qui s'effectue dans les mêmes conditions que la synthèse initiale, c'est à dire dans le DMF, les produits oxydés ont également été synthétisés en proportion inférieure. Le DMF semble avoir joué un rôle. Cependant nous pensons que le stockage des produits en solution à 10^{-2}M dans le DMSO à température ambiante une quinzaine de jours avant d'être testés à permis d'obtenir ces dérivés oxydés.

Des réactions d'oxydation par l'oxygène de l'air dans le DMSO ont été décrites à partir des sels de 3,4-dihydroisoquinolinium et en présence d'acide chlorhydrique[6]. L'oxydation de tetrahydroisoquinoline N-substituée est décrite dans le DMSO par Shawcross et coll., à une température de 100°C pendant 2 heures[7]. Le DMSO n'est pas l'oxydant puisque la réaction se produit également dans le DMF. La réaction conduite sous atmosphère inerte ne conduit pas au produit oxydé, l'oxygène moléculaire est donc responsable de l'oxydation de ces composés. Le mécanisme ne procède pas par ouverture du cycle et formation d'un aldéhyde (Figure 3.II.11).

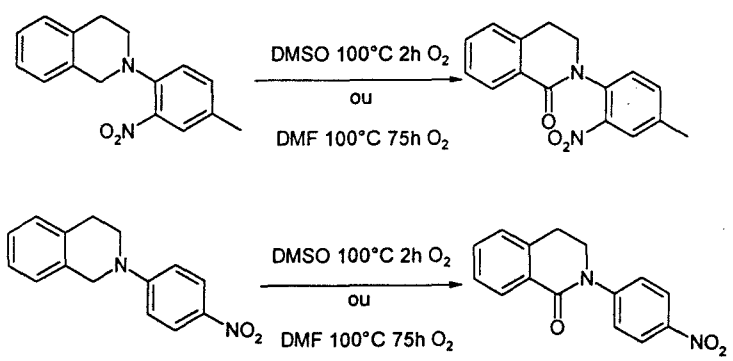


Figure 3.II.11 : Oxydation de 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline N-substituée

avec l'oxygène moléculaire [7].

Ces résultats ont mis en évidence la nécessité de stockage des produits à basse température et de suivi des milieux réactionnels avant les campagnes de criblage.

3.III.2. Conception, Synthèse et Criblage d'une chimiothèque focalisée basée sur le modèle tri aromatique, sur le récepteur BZR.

Le regroupement de certains composés actifs sur le récepteur BZR et ayant des caractéristiques structurales communes, permet de synthétiser en une seule chimiothèque les analogues de *x* composés actifs plutôt que de synthétiser *x* chimiothèques qui se recouperaient fortement.

Le groupe auquel nous nous sommes d'abord intéressés, est composé d'amides formés à partir d'une phénéthylamine et d'un acide bi-aromatique (Figure 3.II.12).

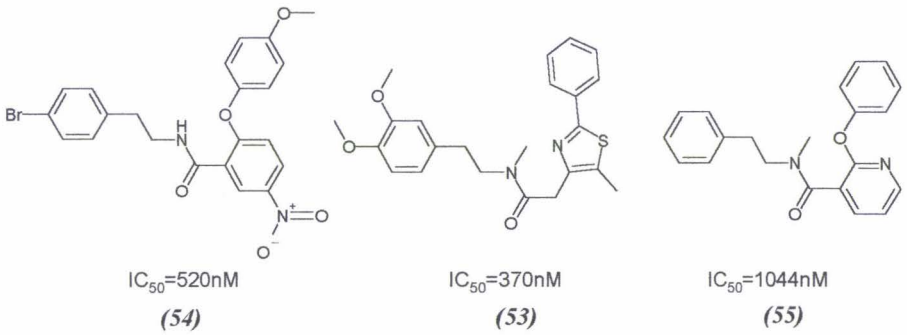


Figure 3.II.12 : Composés actifs retenus pour l'optimisation.

La figure 3.II.13 représente une superposition possible des trois produits actifs choisis pour l'optimisation.

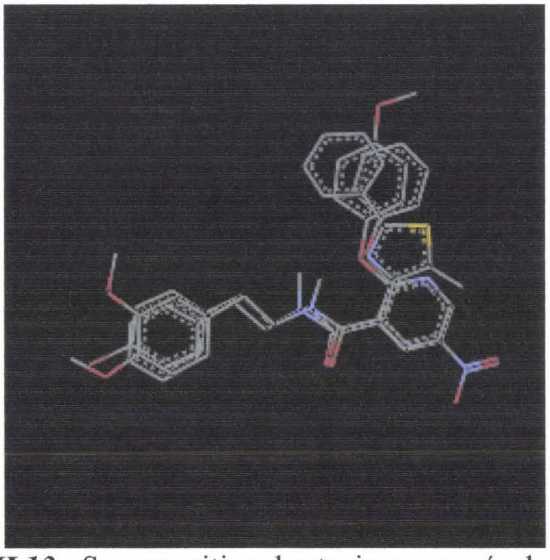


Figure 3.II.13 : Superposition des trois composés de référence.

BU LILLE 1

3.III.2.1. Conception et synthèse de la chimiothèque.

La méthode utilisée pour la conception d'analogues fait appel à la modélisation moléculaire. Il a été décidé de garder le lien amide et de chercher des analogues des

monomères. On réalise ensuite toutes les combinaisons entre les analogues Ai du monomère A et Bj de monomère B. Cette méthode est rapide à mettre en œuvre. La modélisation fournit une liste des n meilleurs analogues d'un monomère parmi les monomères disponibles. Il convient alors de retirer ceux qui sont insolubles ou non réactifs et de regrouper les listes. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 3.II.14.

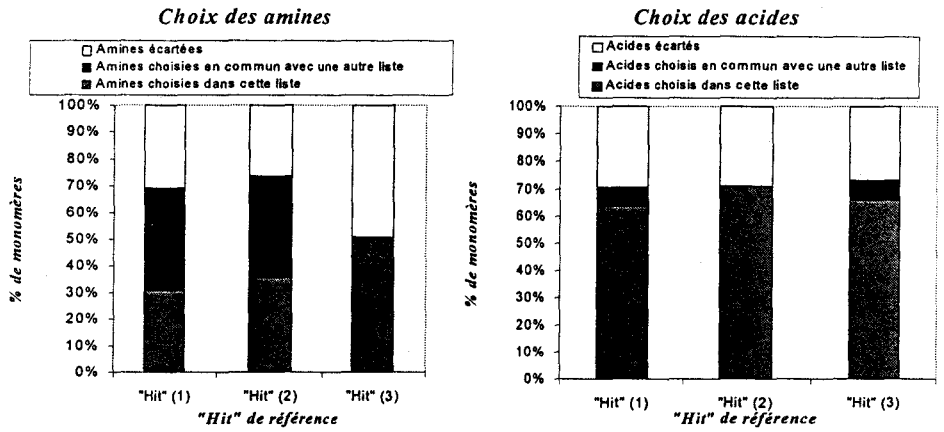


Figure 3.II.14 : Bilan des monomères sélectionnés dans chaque liste d'analogues.

Au total, 80 amines et 79 acides ont été sélectionnés pour la synthèse de 6320 analogues. On peut remarquer que les composés actifs 1 et 2 présentent des amines proches puisque leur listes se recouvrent à près de 40%. En effet on a bien la p-bromo-phénéthylamine et la N-methylphénéthylamine proches structuralement. Les groupements methoxy- présents sur l'amine du composé ***(53)*** présentent des atomes donneurs de liaisons hydrogènes. Le pharmacophore est donc différent. Les acides sont plus divers et les listes se recouvrent peu.

Parmi les amines choisies pour réaliser cette chimiothèque, nous trouvons des dérivés de la pipérazine ou de l'aminopyrrolidine, des anilines, des phénéthylamines, des benzylamines et des tryptamines. Les acides choisis n'étaient pas tous bicycliques, certains présentaient des cycles fusionnés et d'autres un cycle benzénique uniquement. Les monomères constitutifs des composés actifs de référence sont réintroduits dans la chimiothèque également, ce qui permet une vérification de l'expérience HTS.

La chimiothèque focalisée autour de ces trois composés actifs a été divisée en deux suivant le mode d'activation choisi pour l'acide. Les activateurs choisis ont été le TBTU et le PyClu (Figure 3.II.15).

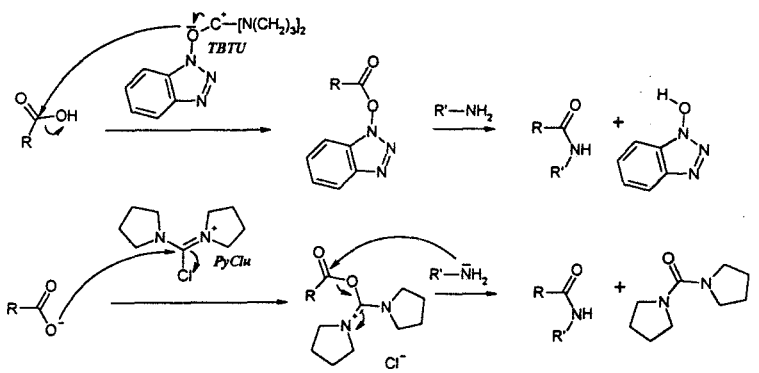


Figure 3.II.15 : Modes d'activation utilisés pour la synthèse d'amides.

3.III.2.2. Résultats du criblage biologique et des reconfirmations.

Les tests d'HTS ont été menés à une concentration de 10^{-5}M. Les résultats d'inhibition montrent que la chimiothèque présente de nombreux produits peu ou pas actifs. La médiane de la répartition étant située entre 0% et 5% d'inhibition (Figure 3.II.16).

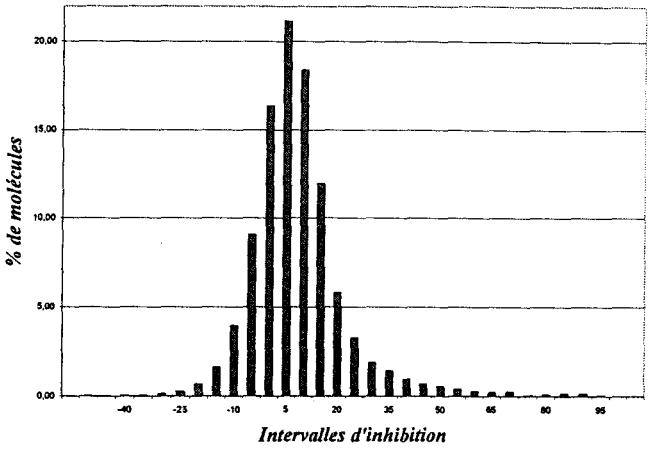


Figure 3.II.16 : Répartition des pourcentages d'inhibition à 10^{-5}M pour la chimiothèque d'analogues.

La concentration test de 10^{-5} M nous permet de comparer le pourcentage de produits actifs entre la chimiothèque d'amides analogues et la sous-chimiothèque d'amides de la chimiothèque primaire (Tableau 3.II.8).

% d'inhibition	*Sous-Chimiothèque primaire d'amides*		*Chimiothèque focalisée d'amides*		*Facteur d'enrichissement*
à 10^{-5} M	*Nombre de "Hits"*	*% d'actifs*	*Nombre de "Hits"*	*% d'actifs*	
≥ 50%	30	**1,63**	143	**2,26**	**1,39**
≥ 70%	12	**0,65**	51	**0,81**	**1,24**
≥ 80%	6	**0,33**	31	**0,49**	**1,49**
≥ 90%	4	**0,22**	14	**0,22**	**1,01**
Nombre de composés testés	1840		6320		

Tableau 3.II.8 : Comparaison du pourcentage d'actifs dans la chimiothèque primaire d'amides et dans la chimiothèque focalisée.

Le fait que l'augmentation pourcentage d'actifs ne soit que de 1.5, montre que la chimiothèque est encore très diverse. Au moment où la conception des chimiothèques focalisées a été réalisée, les seuls monomères disponibles au laboratoire étaient des monomères sélectionnés sur la base de leur diversité structurale, pour la préparation des chimiothèques primaires.

Parmi les composés actifs classés sur la base du pourcentage d'inhibition obtenu en HTS, 55 milieux réactionnels ont été soumis à une confirmation de l'activité à quatre concentrations différentes : $3{,}1.10^{-6}$M ; 10^{-6}M ; $3{,}1.10^{-7}$M ; 10^{-7}M. En utilisant le résultat d'inhibition à 10^{-5}M obtenu lors de l'expérience HTS et en fixant le pourcentage d'inhibition

à 100% à 10^{-4}M, et à 0% à 10^{-9}M, il a été possible d'évaluer l'IC_{50} des milieux réactionnels et de réaliser des études de relation structure-activité.

3.III.2.3. Identification de deux séries d'analogues actifs.

A. Première série d'analogues.

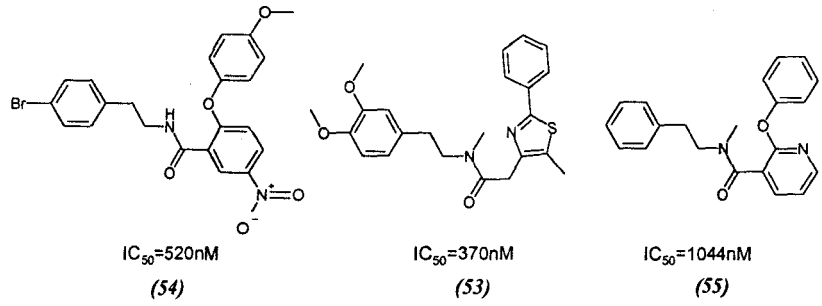


Figure 3.II.17 : Composés actifs utilisés pour réaliser la chimiothèque focalisée.

Parmi les composés actifs ayant permis la constitution de cette chimiothèque focalisée (Figure 3.II.17), deux étaient sub-micromolaires. Seuls deux de ces composés ont été à nouveau identifiés dans l'expérience HTS. L'activité du composé ***(55)*** avait été évaluée à 1044 nM, le milieu réactionnel correspondant a une activité estimée à 1518 nM. De même le composé ***(53)*** avait une IC_{50} de 370 nM et le milieu réactionnel une IC_{50} de 311 nM. Si ces deux produits actifs ont à nouveau été trouvés actifs dans l'expérience HTS, le produit ***(54)*** (Figure 3.II.17) qui avait une IC_{50} de 520nM n'a montré qu'une inhibition de 32,5% en HTS.

Les activités des autres produits actifs dans la chimiothèque focalisée vont de 50nM à 8,7μM. 11 produits ont une IC_{50} inférieure à 1μM et 19 produits ont une IC_{50} inférieure à 2μM.

Il semble que le criblage ait mis en évidence des composés ayant un pharmacophore très similaire à celui des références : groupement phénéthylamide et trois cycles aromatiques mais une topologie différente (***(67)***, ***(68)***, ***(69)*** Figure 3.II.18) et d'autre part des composés où l'on retrouve ce pharmacophore amputé d'un groupement aromatique (***(70)***, ***(71)*** Figure 3.II.18).

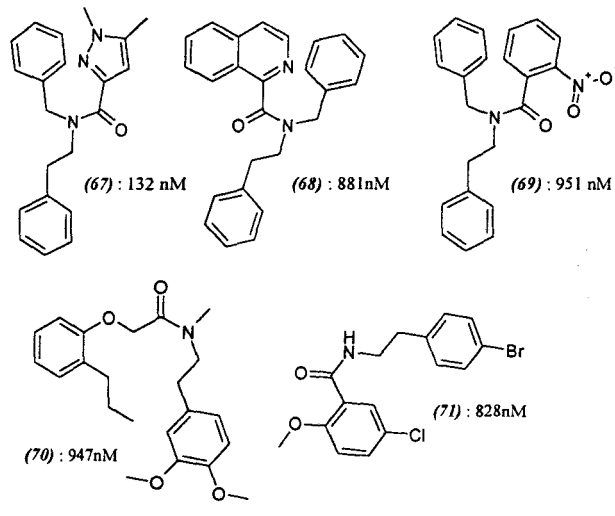


Figure 3.II.18 : Première série de produits actifs issus de la chimiothèque focalisée, dont l'IC_{50} sur le milieu réactionnel est inférieure à 1 µM.

Figure 3.II.19 : superposition des deux produits ***(70)*** et ***(71)*** sur l'une ou l'autre référence ayant servi à faire la chimiothèque.

Les produits ***(70)*** et ***(71)*** se superposent relativement bien aux références en grande partie grâce à la fonction phénéthylamide. On peut donc penser que le groupement phénéthylamide constitue la pièce essentielle du pharmacophore considéré. Dans la molécule ***(70)*** le groupement aromatique manquant a été remplacé par une chaîne propyle.

Les produits actifs de référence étaient constitués d'une phénéthylamine et d'un acide bi-cyclique dont le cycle porteur de la fonction acide était soit hétérocyclique soit substitué par des hétéroatomes. Parmi les nouveaux composés actifs certains présentent une organisation inverse : l'amine porte deux groupes aromatiques et l'acide est mono-cyclique (***(67)***, ***(68)***, ***(69)*** Figure 3.II.18). On peut remarquer que les deux cycles aromatiques portés par l'amine ne sont pas directement reliés l'un à l'autre, permettant ainsi un repositionnement d'un des deux cycles de l'autre côté de la liaison amide, comme s'il était porté par l'acide. La figure 3.II.20 montre un exemple de superposition possible de ces composés avec les produits ayant servis de base à la chimiothèque focalisée.

Figure 3.II.20 : Superposition des molécules à organisation inversée sur les produits de référence.

Afin d'optimiser les « composés actifs » de cette série, il conviendrait d'explorer plus finement l'espace des aryléthylamines comme notamment les phénéthylamines et des tryptamines.

B. Deuxième série d'analogues.

Un autre motif structural semble avoir été mis en évidence à l'occasion du criblage de cette chimiothèque. Les composés actifs obtenus dérivent de la même amine couplée avec un acide benzoïque ou phénoxyacétique de petite taille (Figure 3.II.21).

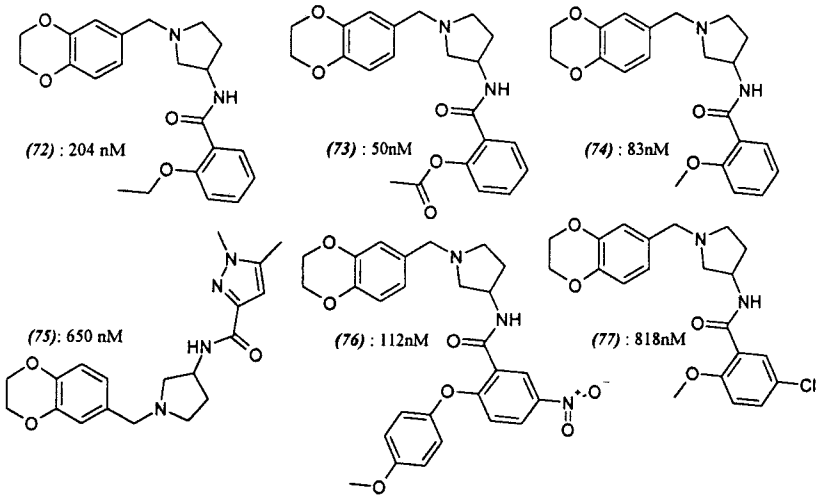


Figure 3.II.21 : Seconde série de produits actifs issus de la chimiothèque focalisée, dont l'IC_{50} sur le milieu réactionnel est inférieure à 1 µM.

Le pharmacophore de cette nouvelle série diverge assez fortement de celui de la série précédente notamment par l'apparition d'une charge positive (aminopyrrolidine) au milieu de la molécule. Les produits trouvés dans cette série sont très actifs.

Notre chimiothèque focalisée a souffert de la trop grande diversité des monomères disponibles lors de sa conception. Si elle ne nous a pas permis d'optimiser la série tri aromatique, elle nous a cependant permis d'identifier un pharmacophore différent et plus prometteur.

3.III.3. Conception et évaluation de la faisabilité chimique d'une chimiothèque focalisée basée sur des « amino-alcools » et active sur BZR.

3.III.3.1. Conception de la chimiothèque.

Le regroupement de produits actifs lors de l'optimisation peut être due à la présence d'un monomère en commun. C'est le cas pour les produits obtenus lors du criblage primaire et qui dérivent de l'alcool ***(78)*** (Figure 3.II.24). Ces composés sont au nombre de 4. Cet alcool est couplé sous forme de carbamate avec des amines de petites taille. Nous avons vérifié que l'alcool ***(78)*** n'est pas lui-même actif.

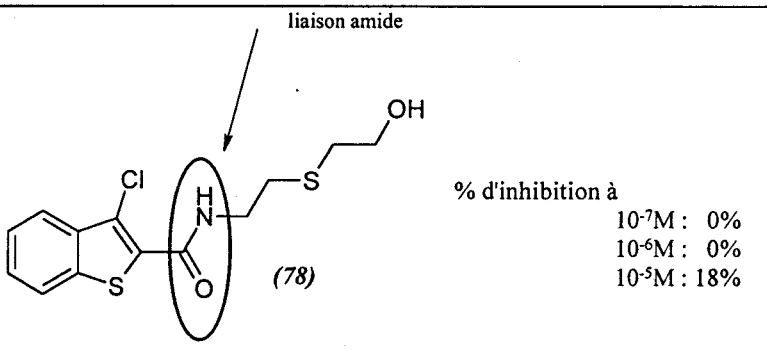


Figure 3.II.24 : Monomère commun à 8 composés actifs lors du criblage primaire.

Une recherche dans ACD a montré la quasi-absence d'alcools similaires dans le commerce. La présence de la fonction amide nous a permis une analyse retrosynthéthique différente. Ce monomère peut-être considéré comme la combinaison d'un acide avec un amino-alcool (Figure 3.II.25).

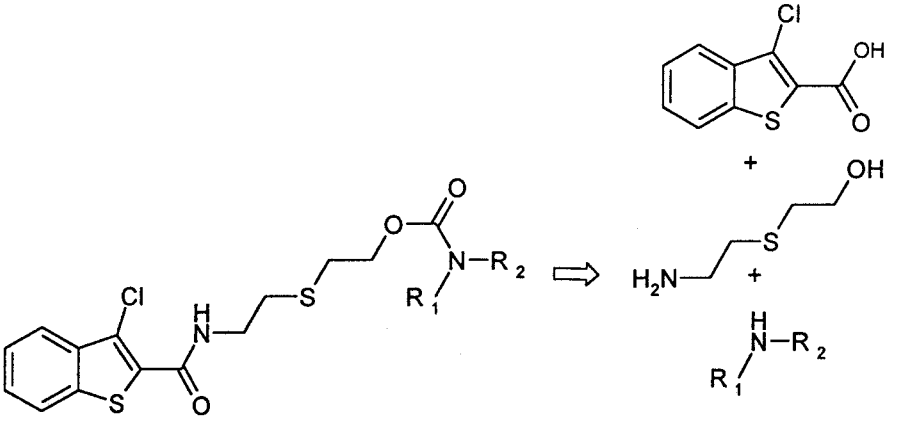


Figure 3.II.25 : Analyse rétrosynthétique des 5 produits actifs obtenus sur BZR dans cette série.

L'un des premiers essais dans l'étude des relations structure activité de cette série, serait de réduire la flexibilité de ces « composés actifs ». La méthode de « découpage » de l'alcool a l'avantage de permettre d'explorer la longueur de l'amino-alcool et ainsi l'influence de la flexibilité sur l'activité. Egalement, les remplacements isostères et les substitutions peuvent très facilement être étudiés tant sur la partie « acide » que sur la partie « amino-alcool » par cette méthode (Figure 3.II.26).

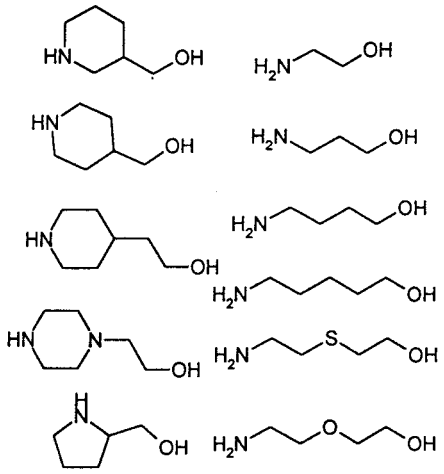


Figure 3.II.26 : Monomères amino-alcools retenus pour explorer les relations structure activité dans la chimiothèque focalisée.

3.III.3.2. Choix de la stratégie chimique à utiliser.

A. Stratégie sans protection

La chimiothèque envisagée sera donc composée de trimères amides-carbamates. Nous avons envisagé de synthétiser les trimères selon le schéma présenté en figure 3.II.27. La première étape serait la formation de l'amide et la seconde celle du carbamate. La séquence des réactions nous a été suggérée par le fait que la formation du carbamate requiert une activation préalable de l'alcool par le N, N'-carbonyldiimidazole (CDI). La présence de la fonction amine libre à cette étape aurait pu conduire à la formation d'un dimère de l'amino-alcool voire à un polymère. L'acide joue donc le rôle de « protection » de la fonction amine. De plus l'enchaînement dans cet ordre des réactions permet de réaliser les activations *in situ*.

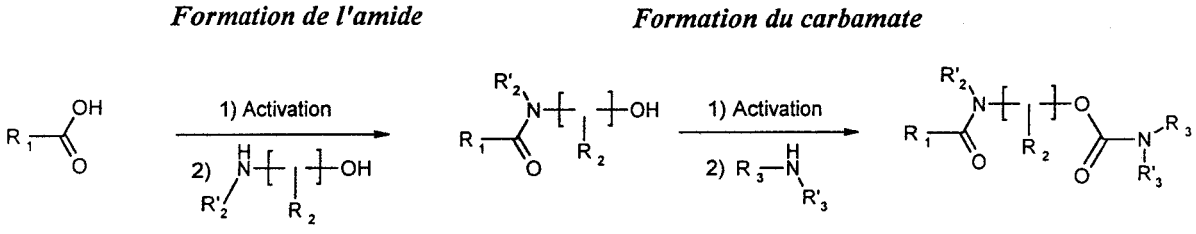


Figure 3.II.27 : Protocole envisagé pour la synthèse de la chimiothèque focalisée « B ».

L'étude de faisabilité de la réaction a été menée en parallèle avec deux amino-alcools (Figure 3.II.28) : un amino-alcool d'amine secondaire cyclique et un amino-alcool d'amine primaire linéaire. Il s'agissait d'évaluer l'influence de la réactivité de l'amine sur la conversion de l'acide en amide et sur la formation de trimère amide-ester, produit « indésirable » dû à la double réactivité de l'amino-alcool.

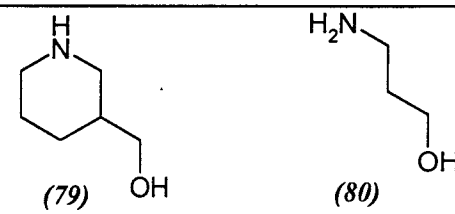


Figure 3.II.28 : Amino-alcools choisis pour l'étude de la réaction.

Des milieux réactionnels très différents ont été obtenus lors des expériences préliminaires de synthèse d'amides au moyen du N,N'-carbonylediimidazole. Certains milieux présentent une très bonne conversion de l'acide et très peu de trimère et d'autres une conversion plus faible et une proportion de trimère plus élevée (Figure 3.II.29).

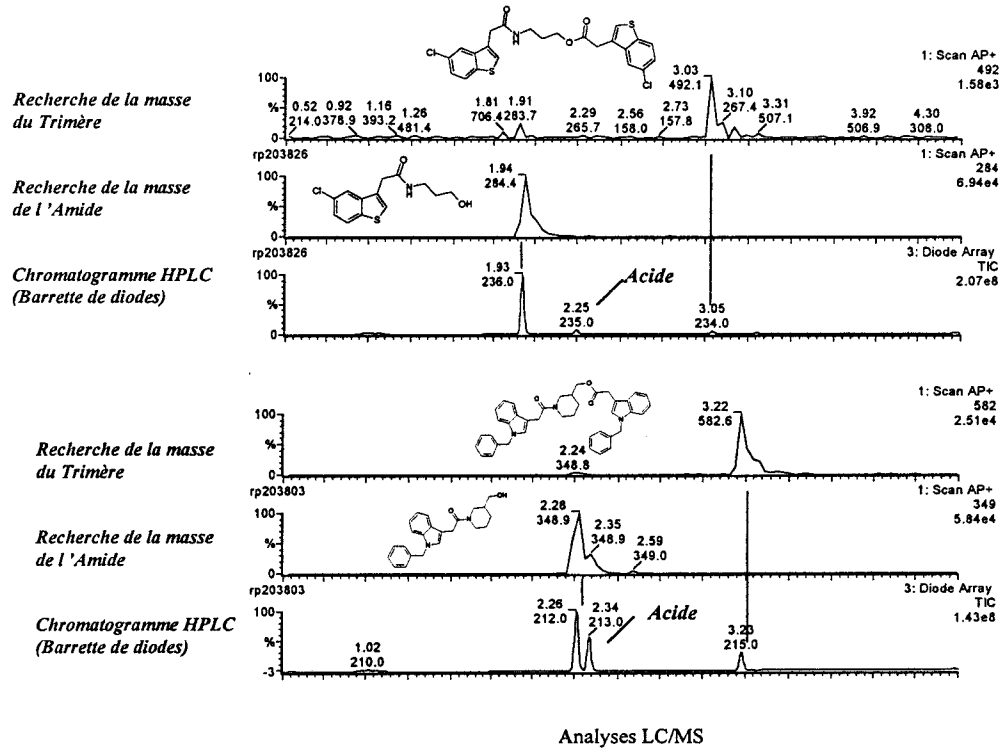
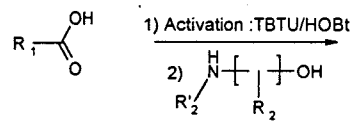


Figure 3.II.25 : Exemples HPLC/MS de milieux réactionnels obtenus lors des expériences préliminaires.

Au vu de ces résultats nous avons décidé d'étudier l'influence du temps d'activation sur la conversion. Le temps de mise en contact de l'espèce activée de l'acide avec l'amino-alcool ne semble pas jouer sur l'homogénéité des milieux réactionnels. Comme représentants des acides, nous avons choisi l'acide issu du « découpage » de l'alcool *(78)* et deux autres acides (Figure 3.II.30). L'activateur choisi est le TBTU connu en synthèse peptidique comme activateur permettant le couplage de la Boc-Sérine et de la Boc-Thréonine sans protection de l'alcool. Les résultats de l'étude sont présentés dans le tableau 3.II.9.

Formation de l'amide



Acides choisis

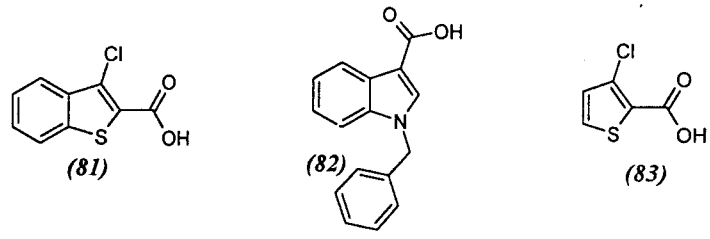


Figure 3.II.30 : Acides utilisés pour l'étude de la réaction de formation d'amide.

		Acide > (81)		(82)		(83)	
Amino-alcool v	**Temps d'activation (h)**	**R**	**Trimère**	**R**	**Trimère**	**R**	**Trimère**
(79)	1	0,40	(*)	0,33		0,14	++
	2	0,00	(*)	0,47	+	0,14	+
	3	0,00		1,02	++	0,10	
(80)	1	0,59	+	2,65	++	1,45	++
	2	0,04		1,22	+	0,89	+
	3	0,00		0,45		0,30	

R : hauteur pic du produit attendu/ hauteur pic de l'acide
(*) présence de l'ester et non du trimère.

Tableau 3.II.9 : Résultats du couplage en fonction des monomères utilisés et du temps d'activation.

Dans la majorité des cas, le trimère est formé en plus ou moins grande quantité. Suivant les acides et suivant l'amino-alcool, la proportion de produit attendu par rapport à l'acide résiduel est variable pour un même temps d'activation. Egalement, pour un même couple acide-amino-alcool l'augmentation du temps d'activation augmente ou diminue la proportion de produit attendu suggérant que les espèces activées sont de stabilité variable. Egalement, dans le cas de l'amino-alcool d'amine primaire, nous avons observé la formation parfois importante du trimère amide-ester, ce qui n'était pas attendu avec le TBTU, contrairement à d'autres activateurs comme le CDI. Les différences observées d'un temps d'activation à l'autre varient non pas en fonction de l'amino-alcool mais en fonction de l'acide utilisé.

B. Stratégie avec protection

Nous avons donc décidé d'avoir recours à des amino-alcools protégés par un groupement t-Boc sur l'amine (Figure 3.II.31). L'inconvénient de cette solution est d'inclure une étape supplémentaire de protection (des 11 amino-alcools), puis de déprotection (des *x* intermédiaires) et de nécessiter des transferts de milieux réactionnels plus nombreux.

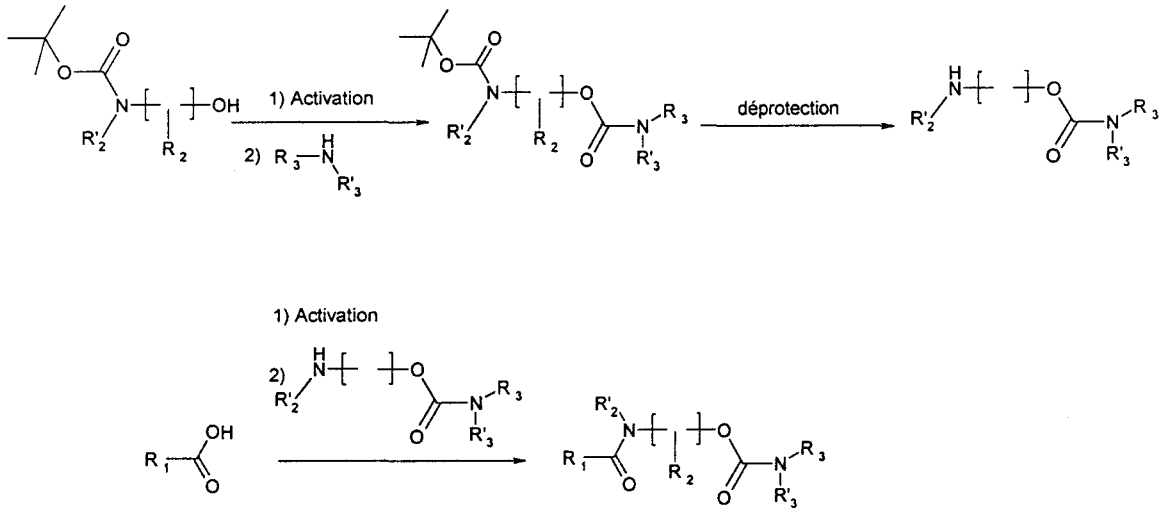


Figure 3.II.31 : Protocole de synthèse de la chimiothèque focalisée en trois étapes à partir de N-Boc-amino-alcools.

Cette stratégie a nécessité la synthèse des amino-alcools protégés par un groupement t-Boc sur la fonction amine (Figure 3.II.32).

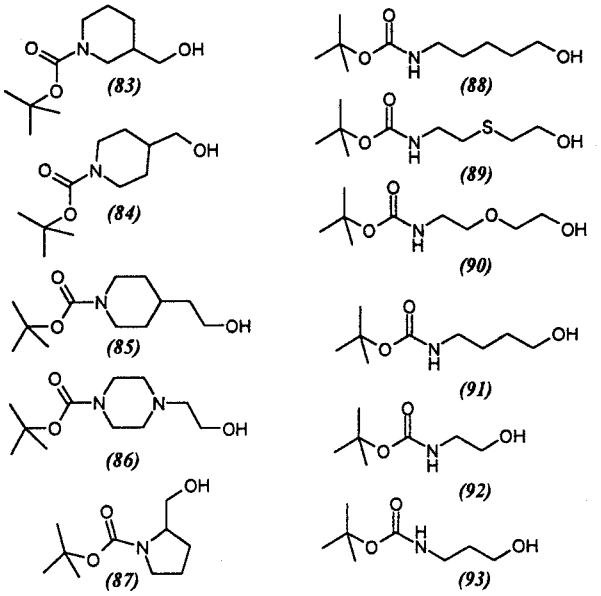
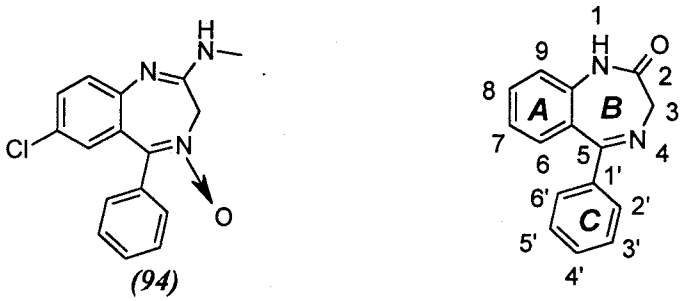


Figure 3.II.32 : Monomères N-Boc-amino-alcools synthétisés.

3.III.4. Comparaison des structures trouvées à celles de la littérature.

3.III.4.1. Les classes de ligands connus.

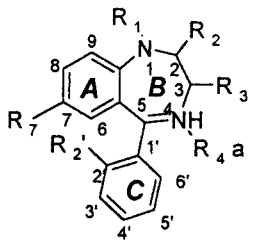


(94)
Chlordiazepoxide

5-phényl-1,4-benzodiazepine-2-one

Figure 3.II.35 : Structures des 5-phényl-1,4-benzodiazépine-2-ones et du chlordiazepoxide ***(94)***.

La série s'est augmentée de nombreux dérivés par variation des substituants et l'accolement d'hétérocycles (Tableau 3.II.10).



Benzodiazepine	Nom commercial	Utilisation thérapeutique	R_1	R_2	R_3	R_7	$R_{2'}$
Alprazolam	Xanax	Désordres de l'anxiété, agoraphobie	[Fused triazolo ring][b]		- H	- Cl	- H
Chlordiazepoxide	Librium	Désordres de l'anxiété, gestion du l'arrêt de la prise d'alcool	(−)	$-NHCH_3$	- H	- Cl	- H
Clonazepam	Klonopin	Désordres épileptiques, traitement d'apoint de la manie aigüe et de certains désordres du mouvement	- H	=O	- H	$-NO_2$	- Cl
Clorazepate	Tranxene	Désordres de l'anxiété, désordres épileptiques	- H	=O	$-COO^-$	- Cl	- H
Diazepam	Valium	Désordres de l'anxiété, statut épileptiques, relaxation musculaire	$-CH_3$	=O	- H	- Cl	- H
Estrazolam	Prosom	Insomnie	[Fused triazolo ring][c]		- H	- Cl	- H
Flurazepam	Dalmane	Insomnie	$-CH_2-CH_2N(C_2H_5)_2$	=O	- H	- Cl	- F
Halazepam	Paxipam	Désordres de l'anxiété	$-CH_2-CF_3$	=O	- H	- Cl	- H
Lorazepam	Ativan	Désordres de l'anxiété, médication pré-anesthésiques	- H	=O	- OH	- Cl	- Cl
Midazolam	Versed	Médication pré-anesthésique et intra-opératoire	[Fused triazolo ring][d]		- H	- Cl	- F
Oxazepam	Serax	Désordres de l'anxiété	- H	=O	- OH	- Cl	- H
Quazepam	Doral	Insomnie	$-CH_2-CF_3$	=S	- H	- Cl	- F
Temazepam	Kestoril	Insomnie	$-CH_3$	=O	- H	- Cl	- H
Triazolam	Halcion	Insomnie	[Fused triazolo ring][b]		- H	- Cl	- Cl

a : pas de substituant en position –4, excepté pour le chlordiazepoxide qui est un N-oxide.

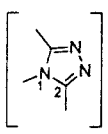
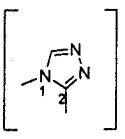
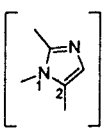
b  c  d 

Tableau 3.II.10 : Benzodiazépines commerciales : Structure et Utilisation thérapeutique (d'après [12]).

Les benzodiazépines ou imidazobenzodiazepines ne sont pas les seules structures qui interagissent au niveau de ce site du récepteur $GABA_A$. La première série non-benzodiazépine soumise à des études SAR est la série des β-carbolines qui ont un spectre d'action qui s'étend des plein agonistes aux plein agonistes inverses (Figure 3.II.35).

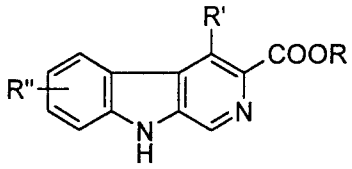


Figure 3.II.35 : Structure générale des β-carbolines.

Les autres séries étudiées sont les 6-alkoxyimidazo[1,2-b]pyridazines (***A***, Figure 3.II.36), les 2-phenylimidazolo[1,2-α]pyridines (***B***, Figure 3.II.36), les imidazo[2,1-b]benzothiazoles (***C***, Figure 3.II.36) et les 2-aryl-4-piperidinoquinolines (***D***, Figure 3.II.36)[13].

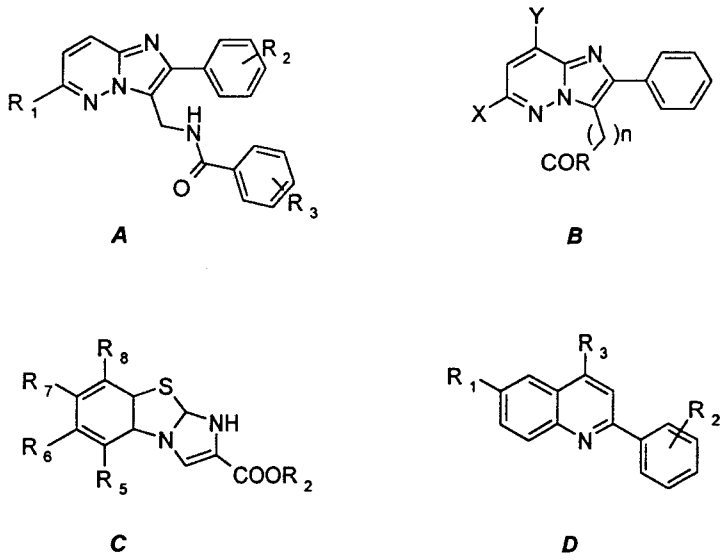


Figure 3.II.36 : Séries chimiques étudiées en QSAR [13].

Récemment, Da Settimo et coll. ont étudié les dérivés N-benzylindol-3-ylglyoxyl-amide (***A***, Figure 3.II.37) et leurs isostères N'-phénylindol-3-ylglyoxylohydrazides (***B***, Figure 3.II.37) avec pour but d'obtenir des produits ayant une activité *in vivo* grâce à une meilleure hydrosolubilité et par conséquent une meilleure biodisponibilité[14].

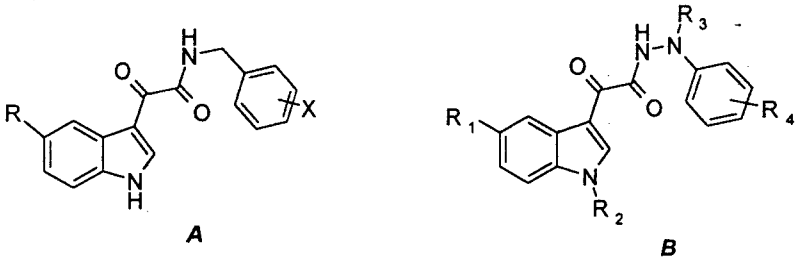


Figure 3.II.37 : N-benzylindol-3-ylglyoxylamide
et leurs isostères N'-phénylindol-3-ylglyoxylohydrazides.

La complexité des mécanismes biologiques impliqués dans l'action des ligands sur le récepteur BZR et l'interaction modulatrice qui en résulte avec le canal chlore couplé au récepteur $GABA_A$, rend difficile les études SAR. Les études QSAR nécessitent donc des tests biochimiques et pharmacologiques pour déterminer le profil des molécules[15]. La figure 3.II.38 présente un modèle tridimensionnel pour la liaison des benzodiazépines au récepteur BZR [15].

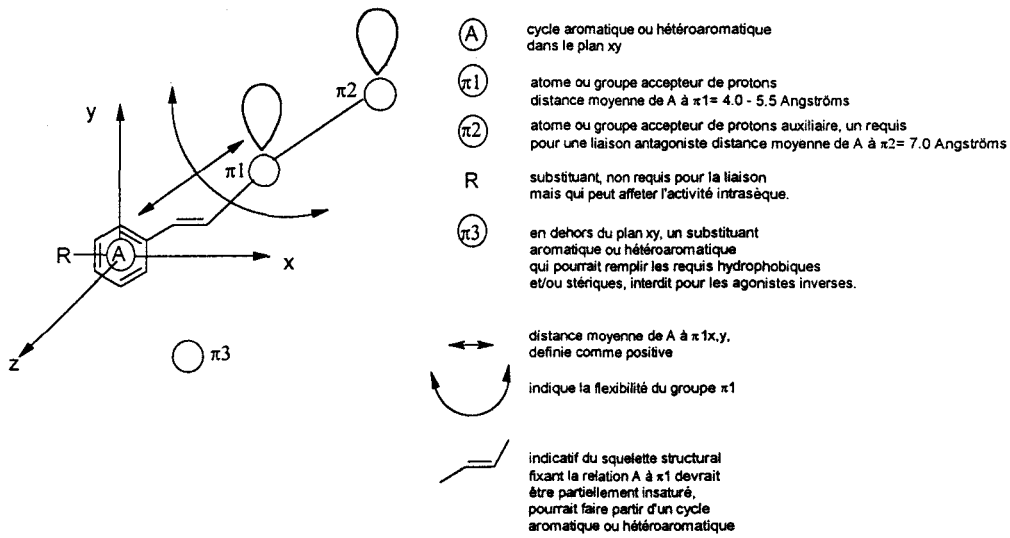


Figure 3.II.38 : Modèle tridimensionnel schématique pour la liaison des ligands benzodiazépines au récepteur BZR (d'après [15]).

Gupta et Paleti ont publié un modèle d'interaction des ligands non-benzodiazépines au récepteur BZR (Figure 3.II.39) basé sur l'étude QSAR des composés présentés en Figure 3.II.37 [13].

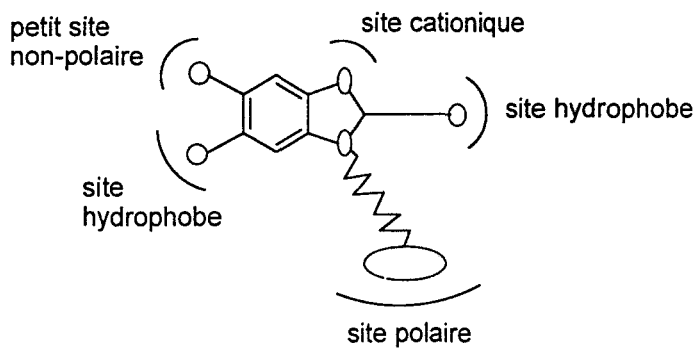


Figure 3.II.39 : Modèle schématique de l'interaction des ligands non-benzodiazépines au récepteur BZR (d'après [13]).

3.III.4.2. Discussion et comparaison.

A. Série tri aromatique.

Pour les N-methylamides ***(53)*** et ***(55)***, nous avons pu observer deux populations lors des expériences RMN. Ces populations correspondent aux conformations *cis* et *trans* de la liaison amide. Il existe donc une barrière d'énergie entre ces deux conformations qui interdit

leur inter conversion dans la durée d'une séquence RMN. De plus pour le composé (53), nous avons distingué 3 formes de protons pour l'un des groupements methoxy avec des interactions visibles en COSY (^{1}H, ^{1}H). Lors de l'élaboration du pharmacophore tridimensionnel par modélisation moléculaire, il sera intéressant d'intégrer ces contraintes conformationnelles qui permettront d'échantillonner de manière plus réaliste l'espace conformationnel de ces molécules. Toutefois, nous n'oublierons pas que les conformations de la molécule en solution peuvent ne pas recouvrir la (ou les) conformations liantes.

Les composés de la série tri aromatique peuvent être rapprochés de la série A utilisée par Gupta et coll. pour leur étude SAR (Figure 3.II.40). Gupta et coll. ont montré que la présence d'un liaison amide permettait l'interaction avec un site polaire [13].

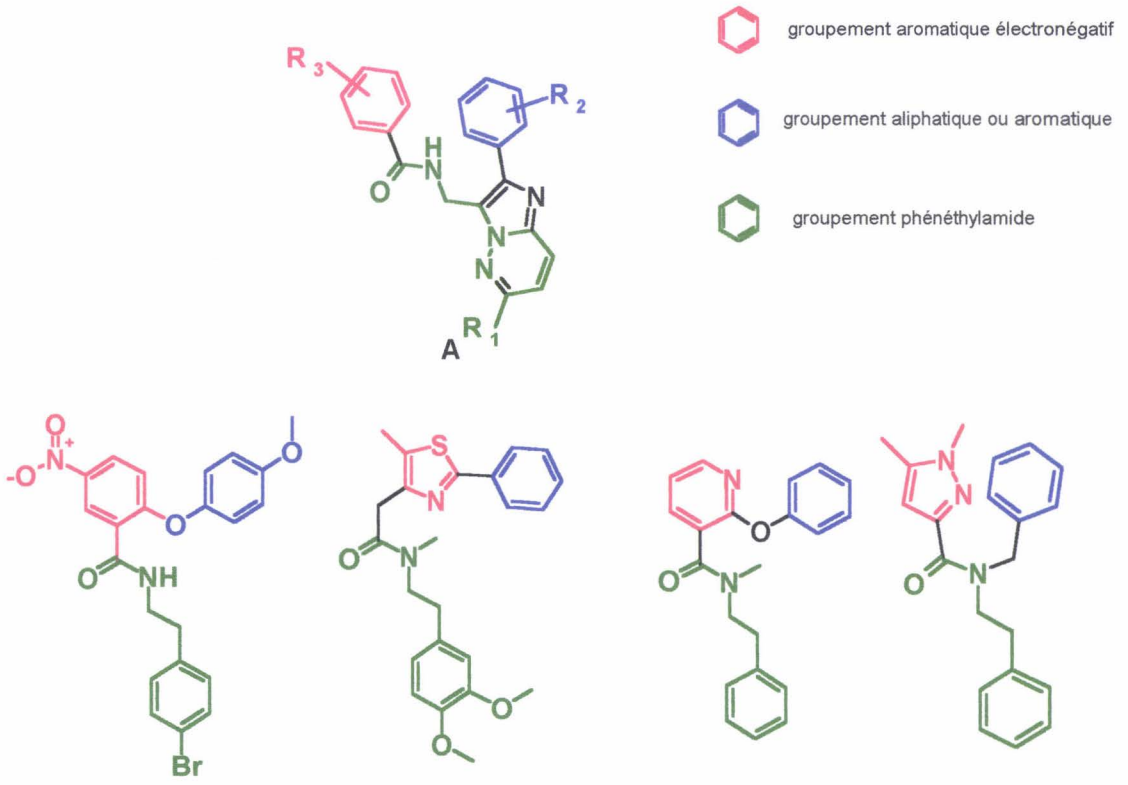


Figure 3.II.40 : Comparaison de la série tri aromatique avec la série des 6-alkoxyimidazo[1,2-b]pyridazines.

La deuxième série présentant une charge positive n'a pas à notre connaissance d'analogues publiés. Il serait intéressant de voir si l'amino-pyrrolidine est nécessaire à l'activité où si elle n'intervient qu'en tant que groupement espaceur. Il est possible qu'en dépit des différences topologiques et chimiques importantes, ces deux séries soient porteuses du même pharmacophore et que leur optimisation converge vers des structures identiques.

B. Série basée sur l'amino-alcool

Cette série est composée de séries extrêmement flexibles et ne permet en aucun cas la définition d'un pharmacophore tridimensionnel. Seule la réalisation d'analogues contraints au niveau de la chaîne carbonée permettra d'établir un modèle comparable aux autres modèles.

BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 3.II et III.

[1] Spencer R.W., High-Troughput Screening of Historic Collections : Observations on File Size, Biological Targets, and File Diversity, Biotechnol. Bioeng (Comb Chem), ***1998***, Vol. 61, N°1, Winter, pp 61-67.

[2] Saunders J., Screening the Universal informer Library, Combi Chem Inc., Coronado, Exploiting Molecular Diversity, CHI Meeting, 2-4 Mars ***1998***.

[3] Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev., ***1997***, 23, pp 3-25.

[4] Lipinski C.A., Oral Absorption and Solubility Screening in Early Drug Discovery, XVth EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, ***1998***.

[5] Curatolo W., Physical Chemical properties of oral drug candidates in discovery and exploratory development settings, Pharm. Sci. Tech. Today, ***1998***, Vol 1, N°9, pp 387-393.

[6] Ruchirawat S., Chuankamnerdkarn M., Thianpatanagul S., Oxidation of 3,4-dihydroisoquinolinium salts with DMSO/conc HCl, Tet. Lett., ***1984***, Vol. 25, N°32, pp 3479-3480.

[7] Shawcross A.P., Stanforth S.P., Reaction of N-Nitroaryl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Derivatives with Oxygen, J. Heterocyclic Chem., ***1990***, 27, pp 367-368.

[9] Nutt D.J., Benzodiazepine receptor ligands, Neurotransmissions, ***1988***, Vol IV, 2, pp 1-4.

[10] Vida J.A., Sedatives and Hyptnotics, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th Ed., Wolff M.E. Ed., Volume 3 : Therapeutic Agents, John Wiley and Sons, ***1996***, p129.

[11] Nickell P.V., Ward H.E., Booth R.G., Antianxiety Agents, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th Ed., Wolff M.E. Ed., Volume 5 : Therapeutic Agents, John Wiley and Sons, ***1997***, p168.

[12] Hobbs W.R., Rall T.W, Verdoorn T .A ., Hypnotics and Sedatives ; Ethanol, in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman Gilman A., Eds, McGraw-Hill, New-York, ***1996***, 9th Ed., pp 361-396.

[13] Gupta S.P., Paleti A., Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Some Nonbenzodiazepine Series of Compounds Acting at the Benzodiazepine Receptor, Bioorg. Med. Chem., ***1998***, 6, pp 2213-2218.

[14] Da Settimo A., Priomofiore G., Da Settimo F., Marini A.M., Novellino E., Greco G., Gesi M., Martini C., Giannaccini G., Lucacchini A., N'-Phenylindol-3-ylglyoxylohydrazide Derivatives : Synthesis, Structure-Activity Relationships, Molecular Modeling Studies, and Pharmacological Action on Brain Benzodiazepine Receptors, J.Med.Chem., ***1998***, 41, 3821-3830.

[15] Fryer R.I., Ligand Interactions at the Benzodiazepine Receptor, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, pp 539-566.

3.IV. DECOUVERTE DE TETES DE SERIE ET OPTIMISATION UTILISANT UNE PROCEDURE INTEGREE « DESIGN ET SELECTION » IMPLIQUANT LA MODELISATION MOLECULAIRE, LA SYNTHESE ORGANIQUE ET LE PROFIL PHARMACOLOGIQUE EFFECTUES A HAUT DEBIT

Etude de cas sur le récepteur opiacé de type mu.

3.IV.1. Choix de la stratégie.

Le but de ce projet était d'évaluer dans un cas concret, l'influence des modifications structurales sur la puissance sur la cible considérée, mais aussi sur une série d'autres récepteurs plus ou moins apparentés au récepteur choisi. De même, il était intéressant d'évaluer dans quelle mesure, puissance et spécificité sont corrélées lors de l'exploration d'une série chimique.

Les produits actifs obtenus lors du criblage à 10μM de la chimiothèque généraliste de 10560 produits sur le récepteur μ de cortex de rat (voir 3.II : La chimiothèque testée) ont été resynthétisés, purifiés et leur activité sur les récepteurs humains μ, κ et δ a été évaluée. Leur profil pharmacologique sur un panel de 73 récepteurs a également été réalisé (Tableau 3.IV.1). Le profil est déterminé par l'ensemble des pourcentages d'inhibition sur différente cibles.

Adenosine:	Cannabinoïds:		PACAP-null *(h)*	Canaux ioniques
A_1 *(h)*	CB1 *(h)*	CCR1 *(h)*	Phencyclidine PCP	Ca^{2+} verapamil
A_{2a} *(h)*	CB2 *(h)*	Histaminergiques:	TXA_2/PGH_2	K^+ voltage dependant
A_3 *(h)*	Cholecystokinine:	H_1 (central)	PGI_2	K^+ Ca
Adrénergique:	CCK_A *(h)*	H_2	Purinergiques:	Na^+ site 1
α_1 *(non sélectif)*	CCK_B *(h)*	ML_1	P_{2X}	Na^+ site 2
α_2 *(non sélectif)*	Dopaminergiques:	Muscariniques:	P_{2Y}	Cl^- ionophore
β_1 *(h)*	D_1 *(h)*	M_1 *(h)*	Serotoninergiques:	
β_2 *(h)*	D_2 *(h)*	M_2 *(h)*	5-HT_{1A} *(h)*	
NE recapture	D_3 *(h)*	M_3 *(h)*	5-HT_{1B}	
Angiotensine-II:	$D_{4.4}$ *(h)*	M_4 *(h)*	5-HT_{2A} *(h)*	
AT_1 *(h)*	D_5 *(h)*	M_5 *(h)*	5-HT_{2C} *(h)*	
AT2 *(h)*	DA uptake *(h)*	Neurokinines:	5-HT_3	
Atrial natriuretic peptide	Endotheline:	NK_1 *(h)*	5-HT_{5A} *(h)*	
Benzodiazepine:	ET_A *(h)*	NK_2 *(h)*	5-HT_6 *(h)*	
BZD central	ET_B *(h)*	NK_3 *(h)*	5-HT_7 *(h)*	
BZD périphérique	GABA (non selectif)	Neuropeptide Y:	σ (non sélectif)	
Bombesin	Galanin *(h)*	Y_1	Somatostatin	
Bradykinin B2 (h)	Platelet-derived Growth Factor : PDGF	Y_2	Vasointestinal Peptide VIP	
Calcitonin gene-related peptide CGRP (h)	IL-1β	Neurotensine *(h)*	Vasopressin:	
	Tumor Necrosis Factor TNF-α	Opioid Receptor Like ORL1 *(h)*	V_{1A} *(h)*	
			V2	

Tableau 3.IV.1 : Récepteurs inclus dans le profil pharmacologique.

Comme on peut le voir dans ce tableau, le profil contient un grand nombre de récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés à une protéine G, et plus particulièrement des récepteurs apparentés à la rhodopsine. Les récepteurs opiacés font partie de cette famille. Il est probable que si les composés démontrent des activités pharmacologiques indésirables, ce soit dû à la liaison à des récepteurs apparentés au récepteur mu en terme de séquence, comme en terme de mode de liaison.

Deux produits très différents tant du point de vue de la structure que du profil pharmacologique ont été sélectionnés pour l'optimisation. Le premier est très spécifique, présente une structure assez rigide et non chargée (***95***) (Figure 3.IV.1), le second est très peu spécifique et très flexible et chargé (***96***) (Figure 3.IV.1). Les activités de ces deux produits est similaires avec des IC_{50} légèrement supérieures à 1μM. Les IC_{50} sur les autres récepteurs opiacés sont supérieures à 10μM.

Le produit (*96*) se lie à de nombreuses cibles biologiques à la concentration de 10µM. Parmi les récepteurs, on trouve notamment de nombreux récepteurs mono-aminergiques (sérotonine, dopamine, acétylcholine, adrénaline,...).

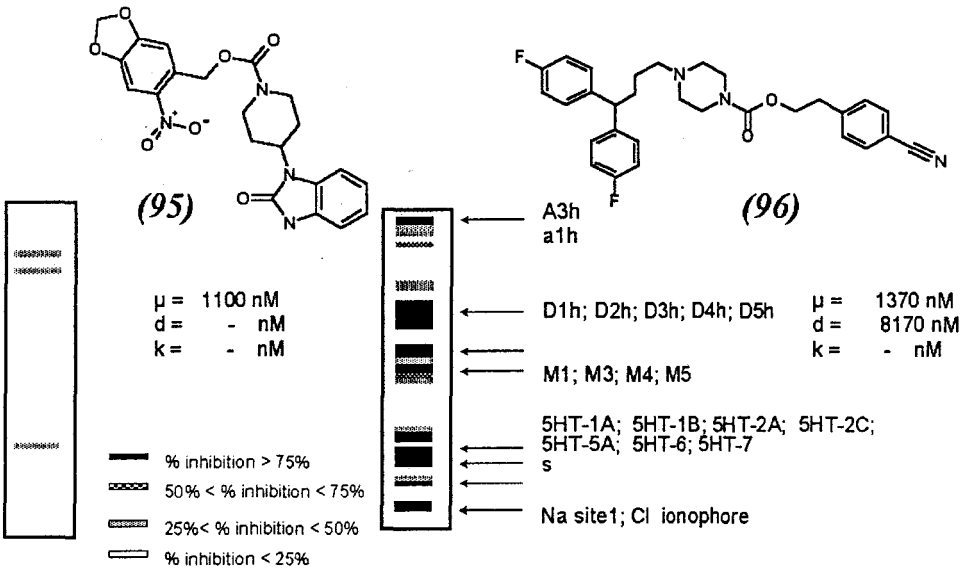


Figure 3.IV.1 : Produits actifs issus du criblage primaire et choisis pour l'optimisation.

3.IV.2. Méthodes de conception d'analogues et synthèse des analogues.

3.IV.2.1. Introduction.

Afin d'explorer de la manière la plus systématique l'espace structural autour des références *(95)* et *(96)*, deux approches « orthogonales », ou indépendantes, de recherche d'analogues sont utilisées :

- La première consiste à faire varier la distribution des groupes pharmacophores qui ornent le squelette présent dans la molécule de référence en conservant la topologie moléculaire. Cette méthode fait appel aux stratégies classiques de chimie médicinale : pharmacophores « mutés », « enrichis » ou « appauvris », par allongement de chaîne, substitution, fermeture ou ouverture de cycles, simplifications,...

- La seconde consiste à faire varier la topologie moléculaire en tentant de respecter au mieux la distribution spatiale des éléments de pharmacophore. Il s'agit de trouver de nouveaux squelettes qui présentent des groupes fonctionnels similaires à ceux de la molécule de référence , dans des orientations similaires. Cette méthode requiert l'utilisation d'un logiciel de modélisation moléculaire dont le principe est décrit au Chapitre 1.

Ces deux méthodes peuvent se recouper à certains endroit de l'espace structural autour de la molécule de référence.

3.IV.2.2. Analogues du produit spécifique *(95)*.

A. Analogues à topologie constante

Le composé actif de départ est un carbamate synthétisé à partir d'un alcool benzylique et de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine (Figure 3.IV.2).

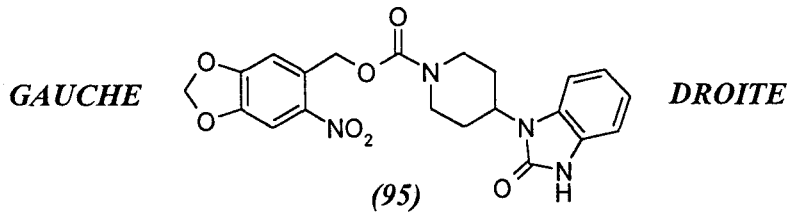
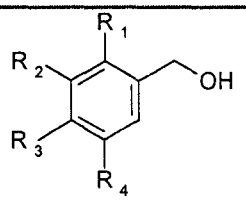


Figure 3.IV.2 : Produit de référence spécifique *(95)* .

Nous avons d'abord cherché à faire varier les parties gauche et droite de la molécule de part et d'autre du lien carbamate conservé. De nombreux alcools benzyliques sont facilement accessibles. Le tableau 3.IV.2 présente ceux qui ont été retenus pour l'étude.



Entrée	*R1*	*R2*	*R3*	*R4*
1	NO_2	H	$-OCH_2O-$	
2	NO2	H	OCH_3	OCH_3
3	Cl	H	$-OCH_2O-$	
4	Cl	H	OCH_3	OCH_3
5	Cl	OCH_3	OCH_3	H
6	F	H	F	F
7	H	H	$-OCH_2O-$	
8	H	H	OCH_3	OCH_3
9	H	H	thiadiazole	
10	NO2	H	H	H
11	H	H	OCH_3	H
12	H	H	OC_6H_5	H
13	F	H	H	H
14	H	H	F	H
15	H	H	H	H
16	H	H	pyrrolidinyl	H
17	F	H	H	F
18	CH_3	H	H	CH_3
19	NO2	H	H	Cl
20	H	H	$-(CH=CH)_2-$	

Tableau 3.IV.2 : Alcools benzyliques retenus.

Le groupement méthylènedioxy est très courant dans les produits thérapeutiques naturels et synthétiques. Il s'agit d'un groupement électronégatif qui est relativement peu réactif et non polaire. Nous étions conscients de la propension des composés contenant le groupe methylenedioxyphenyl à saturer les voies métaboliques assurées par les cytochromes

P450. Afin de prendre en compte le plus tôt possible cette éventualité, nous avons pensé avoir recours à un autre groupement. Par une étude de similarité de réseaux de Kohonen, Anzali et coll. ont montré que la distribution électronique du groupement méthylènedioxyphenyl était bien mimée par le groupement benzothiadiazole [1]. Dans le cadre de l'optimisation d'antagonistes du récepteur ET_A ils sont montré que le groupement benzothiadiazole est effectivement un bon isostère du groupement méthylènedioxyphenyl[2],[3]. Il nous a donc semblé intéressant de synthétiser le 2,1,3-benzothiadiazole-5-methanol (Entrée *9*, Tableau 3.IV.2) selon le schéma de synthèse présenté en Figure 3.IV.3.

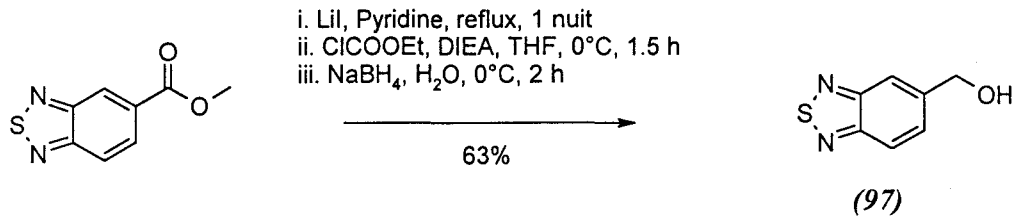


Figure 3.IV.3 : Schéma de synthèse du 2,1,3-benzothiadiazole-5-methanol *(97)*.

Nous nous sommes également intéressés à d'autres alcools comme les dérivés pyridiniques. De plus, afin d'évaluer l'influence de la flexibilité de la molécule sur l'activité nous avons inclus dans l'étude des alcools contraints comme le 1-indanol et le 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtol, et les dérivés plus flexibles du phénéthanol (Tableau 3.IV.3).

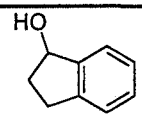
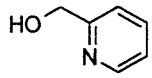
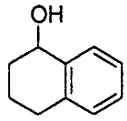
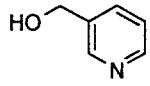
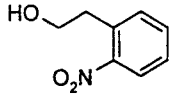
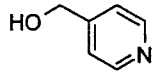
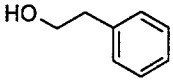
Entrée		*Entrée*	
1		*5*	
2		*6*	
3		*7*	
4			

Tableau 3.IV.3 : Alcools non benzyliques choisis pour l'optimisation.

De nouvelles amines ont été synthétisées afin d'explorer l'influence de cette partie du produit de référence. Nous avons ouvert le cycle piperidine en synthétisant les amines *(98)* et *(99)* (Figure 3.IV.4).

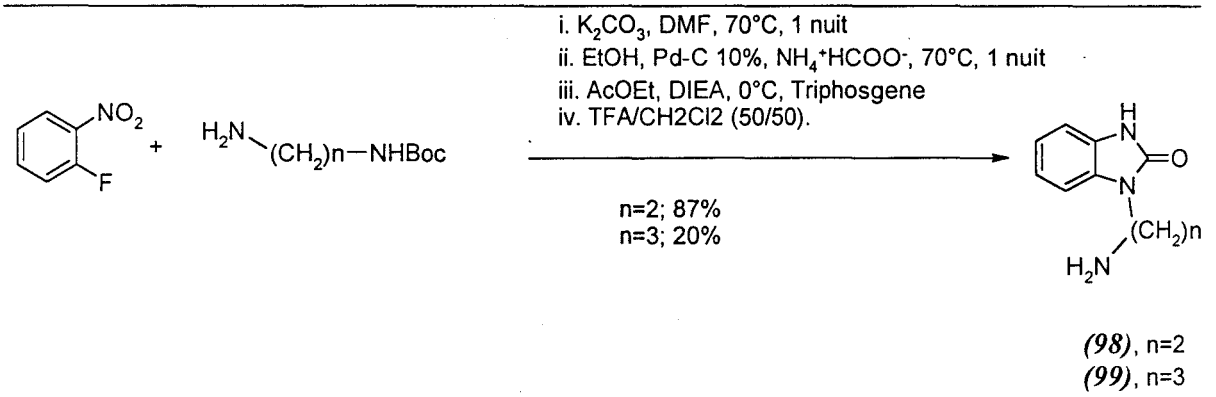


Figure 3.IV.4 : Schéma de synthèse des amines ***(98)*** et ***(99)***.

En vue d'explorer l'influence des substituants du cycle benzénique sur la liaison au récepteur mu, nous avons mis au point une synthèse de dérivés substitués de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine que nous avons appliqué à la synthèse de la 4-(2-oxo-4-methyl-1-benzimidazolinyl)piperidine ***(100)*** (voie a, Figure 3.IV.5). Cependant cette voie de synthèse n'est applicable que dans le cas où les substituants facilitent la substitution nucléophile aromatique. La synthèse de la 4-(2-oxo-5-methoxy-1-benzimidazolinyl)piperidine n'a ainsi pas pu être réalisée de cette manière. Nous avons également réalisé l'homologation du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl par insertion d'un groupement carbonyle supplémentaire ***(101)*** (voie b, Figure 3.IV.5). Ceci permet d'apporter un nouvel atome accepteur de liaison hydrogène, d'agrandir le cycle et de changer les propriétés électroniques du cycle.

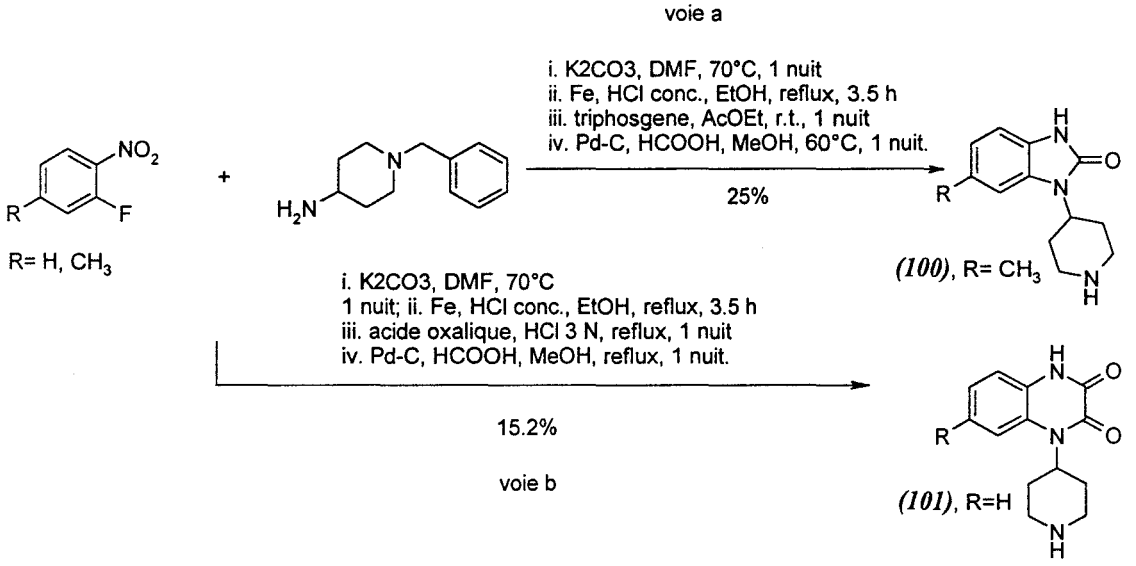
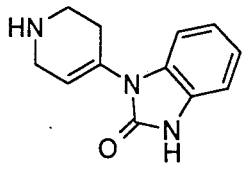


Figure 3.IV.5 : Schémas de synthèse des amines supplémentaires ***(100)***, ***(101)***.

A cette série d'amine, nous avons ajouté la 1,3-dihydro-1-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)-2H-benzimidazole-2-one ***(102)***, qui ne diffère du composé de référence que par une double liaison (Figure 3.IV.6).



(102)

Figure 3.IV.6 : Structure de la 1,3-dihydro-1-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)-2H-benzimidazole-2-one ***(102)***.

L'ensemble des combinaisons amines-alcools a été réalisé grâce à un protocole optimisé de synthèse de carbamates utilisant le N,N'-carbonyldiimidazole. L'alcool et l'amine utilisés pour synthétiser la référence ont été inclus également ce qui à conduit à la synthèse de 162 carbamates.

Nous avons voulu étudier dans un second temps l'influence du lien en remplaçant les carbamates par leurs isostères urées N,N'substituées (Tableau 3.IV.4). Nous avons choisi 6 amines que nous avons couplées aux 6 amines dérivées de la 4-(2-oxo1-benzimidazolinyl)piperidine, par un protocole de synthèse utilisant également le N,N'-carbonylediimidazole, obtenant ainsi 36 urées complémentaires.

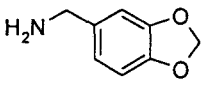
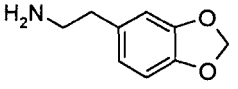
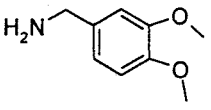
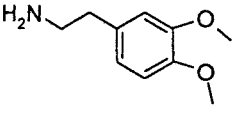
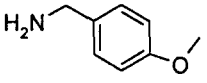
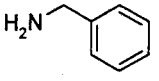
1		*4*	
2		*5*	
3		*6*	

Tableau 3.IV.4 : Amines choisies pour la synthèse d'analogues de type urées N,N'substituées.

Le modèle de liaison au récepteur mu communément admis consiste en un azote protoné qui interagit avec un site anionique du récepteur, le reste du corps du ligand qui pivotant autour de l'azote (Figure 3.IV.7). Nous avons donc voulu faire apparaître une charge positive au centre de la structure de quelques analogues en remplaçant la liaison carbamate par le groupement –CH2-CH2-N.

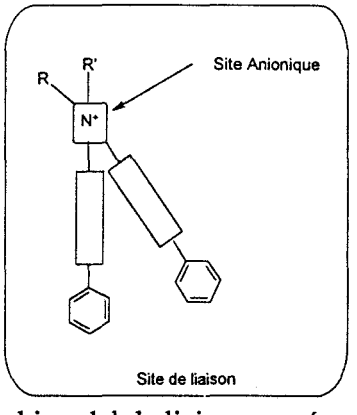
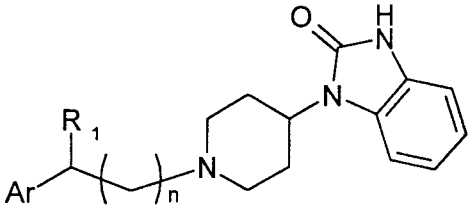


Figure 3.IV.7 : Mode bimodal de liaison au récepteur mu (d'après [4]).

Lorsqu'il s'agit de synthétiser de grandes séries d'analogues de ***(95)*** portant une charge positive, les voies de synthèse utilisant des aldéhydes aliphatiques ne sont pas facilement utilisables, du fait de la faibles stabilité de ces derniers. Par contre, il serait envisageable de recourir aux halogénures pour réaliser une N-alkylation de l'amine mais les halogénures requis ici (phénylpropyl-halogénures) sont peu réactifs.

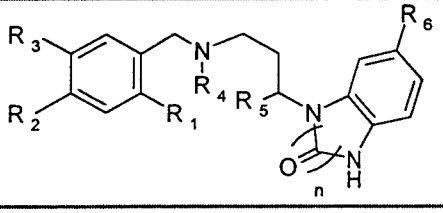
Dans un premier temps, nous avons donc choisi de réduire la chaîne carbonée afin de faciliter l'introduction de cette charge positive. Les halogénures benzyliques et les aldéhydes benzyliques peuvent alors être utilisés très facilement. De plus une grande diversité de ces monomères est facilement disponible. Ceci facilitera par la suite la synthèse rapide d'analogues s'il y a lieu. De plus, la structure des composés ainsi envisagée se rapproche très fortement des composés décrits par Janssen [5], ayant une activité analgésique in-vivo révélée par le test de la plaque chaude, et dérivés de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine (Figure 3.IV.8).



activité analgésique observée particulièrement
quand n=0 et R1=H ou préférentiellement Me, Et ou Pr.

Figure 3.IV.8 : Composés analgésiques dérivés de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine décrits par Janssen [5].

Afin d'évaluer certaines des modifications envisagées sur le cycle 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine dans cette série chargée, nous avons réalisé les composés présentés dans le tableau 3.IV.5. De plus dans la mesure du possible nous avons utilisé le dérivé chloro à la place du dérivé nitro pour des questions de solubilité.



#	*R1*	*R2*	*R3*	*R4*	*R5*	*R6*	*n*
103	NO_2	$-OCH_2O-$		$-(CH_2)_2-$		H	1
104	Cl	$-OCH_2O-$		$-(CH_2)_2-$		CH_3	1
105	Cl	$-OCH_2O-$		$-(CH_2)_2-$		H	2
106	Cl	$-OCH_2O-$		$-(CH_2)_2-$		H	1
107	Cl	$-OCH_2O-$		H	H	H	1
108	H	OCH_3	H	$-(CH_2)_2-$		H	1
109	NO_2	$-OCH_2O-$		$-CH_2-CH=$		H	1

Tableau 3.IV.5 : Analogues chargés de ***(95)***.

En dernier lieu nous nous sommes intéressés au remplacement du lien carbamate par un lien amide. En gardant l'amine présente dans le composé de référence, nous avons choisi 3 acides (Figure 3.IV.9).

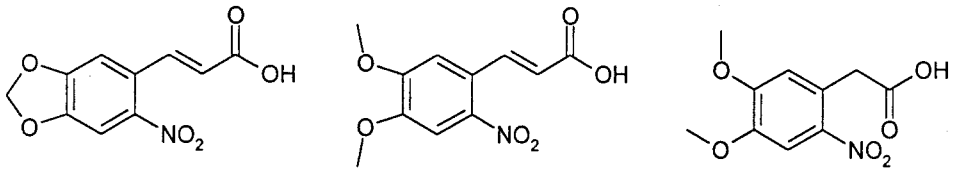
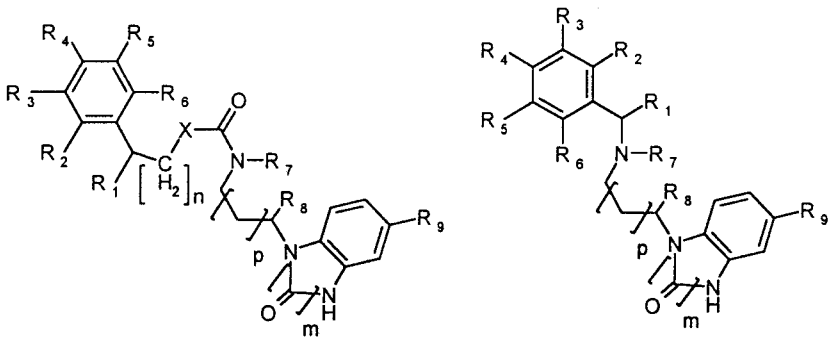


Figure 3.IV.9 : Acides choisis pour former des amides avec l'amine présente dans le composé ***(95)***.

Les acides cinnamiques conservent le nombre d'atomes entre l'azote de l'amine et le cycle aromatique.

La figure 3.IV.10 résume les analogues à topologie constante réalisés autour du produit de référence spécifique.



R_3; R_4; R_5; R_6 = H; F; NO_2; Me; OMe; Cl;
$-OCH_2O-$; -2,1,3-thiadiazole-
(R_1;R_2) = (H;H); ($-CH_2-CH-$); ($-CH_2-CH_2-CH-$)
X = O;N;CH n = 0;1 m = 1;2 p = 0;1
(R_7;R_8) = (H;H); ($=CH-CH_2$); ($-CH_2-CH_2-$)
R_9 = H; Me

Figure 3.IV.10 : Analogues à topologie constante du produit spécifique ***(95)***.

B. Analogues à pharmacophore constant

Le logiciel de reconnaissance de pharmacophores décrit au chapitre 1 a été utilisé pour identifier des analogues du produit actif ***(95)*** spécifique à pharmacophore similaire. Les analogues ont été cherchés parmi les produits faisables au laboratoire avec les protocoles développés à partir des monomères disponibles additionnés des monomères commerciaux non présents au laboratoire mais susceptibles d'avoir une réactivité adéquate dans les réactions chimiques d'assemblage envisagées. Trois « séries » d' analogues ont ainsi été conçues.

La première série contient des analogues à topologie conservée du composé ***(95)***, ainsi que des amides que nous avions déjà prévues de synthétiser. Ceci n'était pas évident a priori car durant le processus d'analyse de pharmacophore, la topologie atomique n'est pas prise en compte. C'est donc seule l'analogie de pharmacophore qui a fait ressortir les composés de la bibliothèque virtuelle.

La deuxième série consiste en des produits présentant une connectivité inter-atomique très différente de celle du composé de référence ***(95)***. La figure 3.IV.11 en présente quelques exemples.

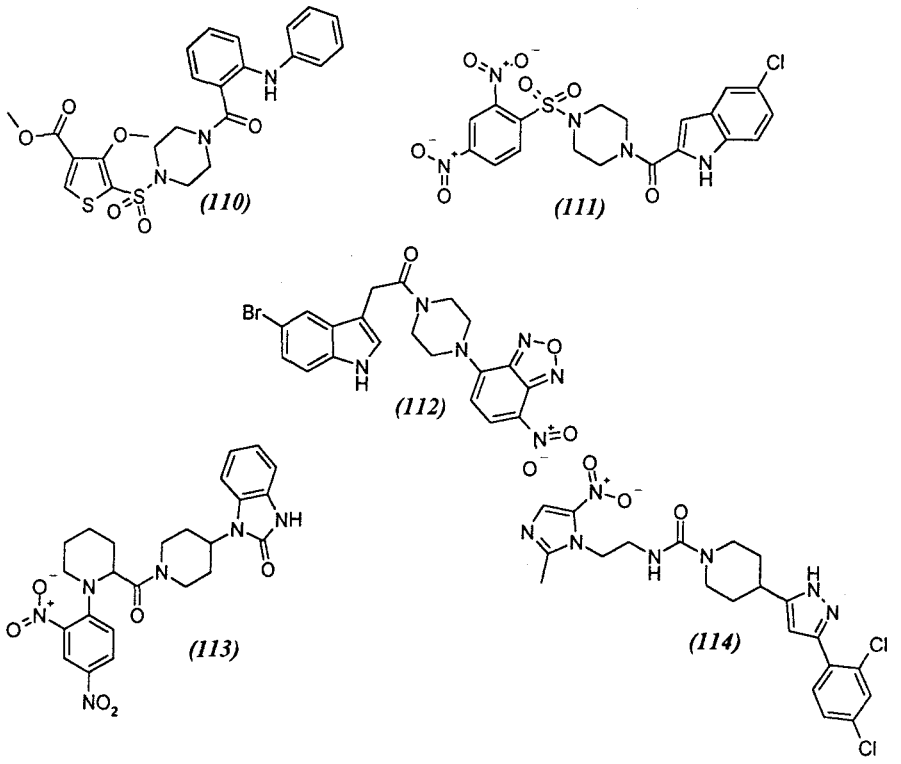


Figure 3.IV.11 : Exemples d'analogues à pharmacophore constant de ***(95)***.

Afin de réaliser certains des analogues trouvés par le logiciel , nous avons synthétisé les monomères ***(115)*** et ***(116)***(Figure 3.IV.12).

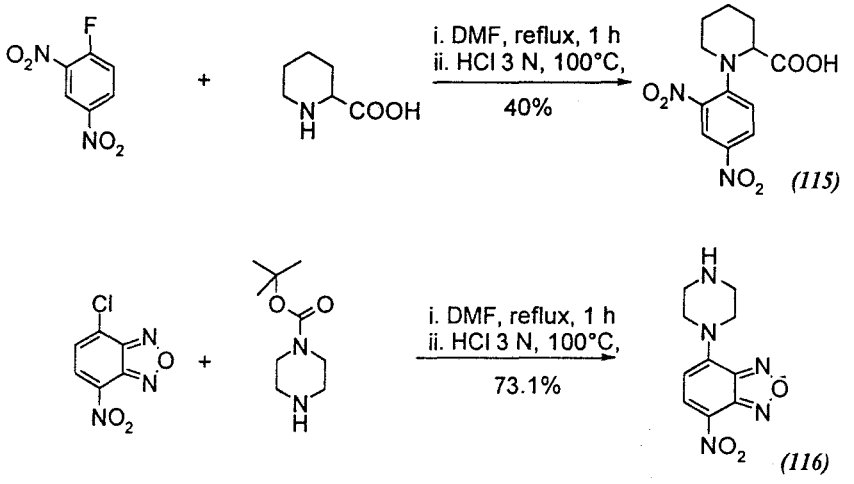


Figure 3.IV.12 : Synthèse de deux monomères pour les analogues à pharmacophore constant.

Une troisième série a été mise en évidence. Elle consiste en dérivés dont l'un des monomère est l'amine 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one en remplacement de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine (Figure 3.IV.13).

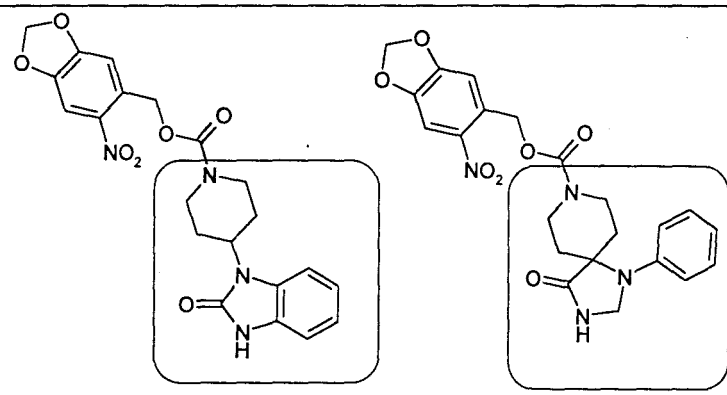


Figure 3.IV.13 : Dérivés de la 1-Phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one.

Au vu de ces résultats, il nous a semblé intéressant de compléter cette série en réalisant les mêmes combinaisons qu'avec la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine, c'est-à-dire des carbamates, des urées, des amides et des amines alkylées. L'un des produits chargés positivement, a dû être synthétisé à partir de l'alcool car l'halogénure et l'aldéhyde correspondants n'étaient pas disponibles (Figure 3.IV.14).

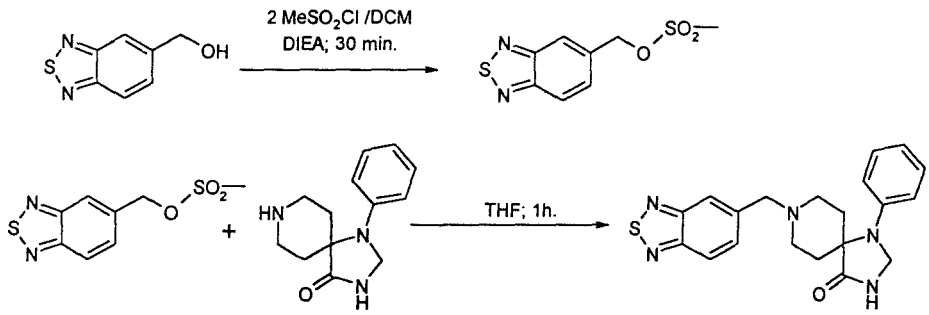


Figure 3 .IV.14 : Synthèse d'une amine tertaire à partir d'un alcool.

Pour évaluer l'importance des substituants du côté de l'amine 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one, nous avons également, cherché à obtenir d'autres amines de ce type. La figure 3.IV.15 présente la synthèse de deux analogues de cette amine réalisés à partir du Boc-3carboxymethyl-1-phenyl1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one.

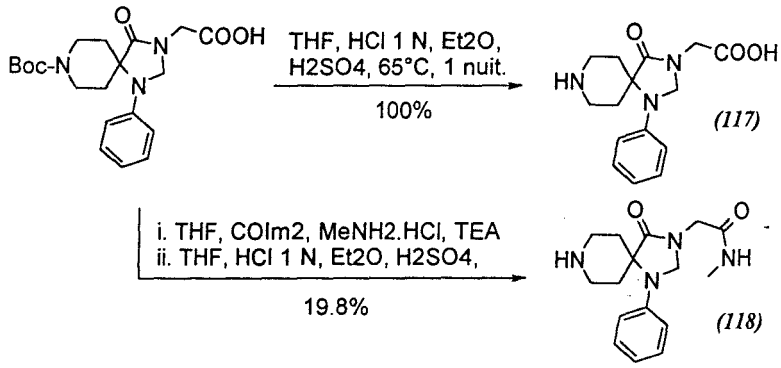


Figure 3.IV.15 : Synthèses d'analogues de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one.

En conclusion, nous avons synthétisé à l'échelle de 5µmoles, 143 analogues ayant une topologie similaire à la référence, 111 analogues issus de la série spiranique et 92 analogues à pharmacophore constant non-spiranique. L'ensemble de ces produits ont été soumis à un contrôle qualité en LC/MS.

3.IV.2.3. Analogues du produit non spécifique *(96)*.

A. Analogues à topologie constante

Le composé actif *(96)* est un carbamate synthétisé à partir du p-cyano-phenéthanol et de la 1-[4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl]piperazine (Figure 3.IV.16). A la différence du composé spécifique *(95)*, ce produit possède une charge positive. Nous avons dans la plupart des cas gardé cette charge.

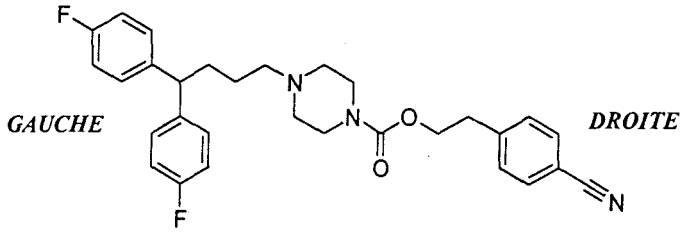
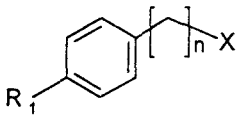


Figure 3.IV.16 : Produit de référence non spécifique *(96)*.

Nous avons exploré l'influence de la longueur et de la nature de la chaîne reliant le noyau aromatique de droite à l'azote piperazinique en synthétisant des carbamates, des urées et des amides. En remplacement du p-cyano-phénethanol nous avons utilisé les alcools, amines et acides présentés dans le tableau 3.IV.6. Nous avons donc synthétisé 17 produits dérivés de la 1-[4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl]piperazine.

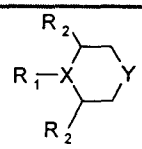


Entrée	*R1*	*n*	*X*
1	CN	1	OH
2	H	2	OH
3	OCH_3	2	OH
4	OC_2H_5	2	OH
5	F	2	OH
6	$OCH_2C_6H_5$	2	OH
7	NO_2	2	OH
8	OC_2H_5	3	OH
9	H	2	NH_2
10	OC_2H_5	2	NH_2
11	H	1	$O\text{-}COCH(CH_3)\text{-}NH_2$
12	CN	0	COOH
13	H	0	COOH
14	H	1	COOH
15	OCH_3	1	COOH
16	F	2	COOH
17	H	3	COOH

Tableau 3.IV.6 : Alcools, amines et acides choisis pour le remplacement du p-cyano-phénéthanol.

A gauche, la chaîne reliant les noyaux aromatiques à l'azote basique a été raccourcie (Entrées *1* à *6*, Tableau 3.IV.7), de même que les substituants de ces noyaux benzèniques ont été remplacés par des atomes de chlore ou d'hydrogène (Entrées *2* et *3*, Tableau 3.IV.7). Les deux noyaux aromatiques ont été rendus solidaires sous forme d'un système fluorènyle

(Entrée ***5***, Tableau 3.IV.7). La basicité de l'atome d'azote a été modulée en l'extrayant du système pipérazinique (Entrée ***4***, Tableau 3.IV.7). Dans d'autres molécules, un des deux noyaux du système benzhydryle a été supprimé (Entrées ***8*** à ***12***, Tableau 3.IV.7) et la charge de l'atome d'azote supprimée (Entrée ***12***, Tableau 3 .IV.7).



Entrée	*R1*	*R2*	*X*	*Y*
1		H	N	NH
2		H	N	NH
3		H	N	NH
4		H	CH	NH
5		H	N	NH
6		H	N	$CH\text{-}NH_2$
7		H	N	$CH\text{-}NH_2$
8		H	N	NH
9		H	N	NH
10		H	N	NH
11		H	N	NH
12		O=	N	NH
13		H	N	NH

Tableau 3.IV.7 : Amines choisies pour l'exploration de la partie gauche de ***(96)***.

Certaines de ces amines ont dû être synthétisées (Figure 3.IV.17).

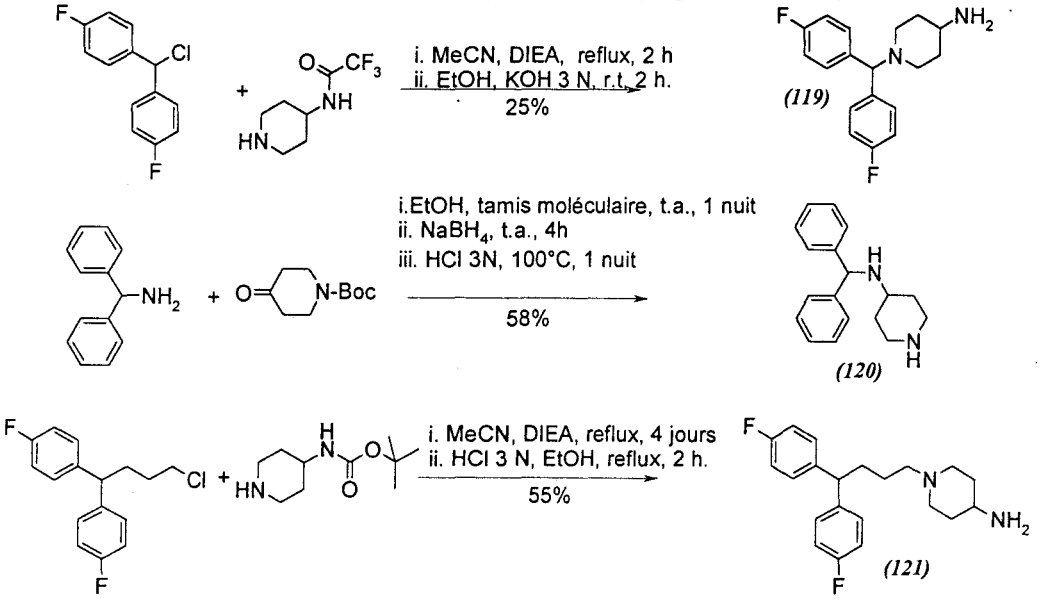


Figure 3.IV.17 : Synthèse d'amines pour les analogues de ***(96)***.

Toutes les amines du tableau 3.IV.7 sont couplées aux deux alcools et à l'amine de la figure 3.IV.18. Ces synthons permettent de déterminer l'influence de l'électronégativité du substituant en para, ainsi que l'influence du lien carbamate.

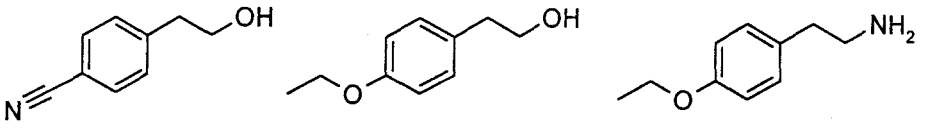


Figure 3.IV.18 : Monomères choisis pour être couplés aux amines du tableau 3.IV.7.

Dans les deux analogues de la figure 3.IV.19, nous avons rétabli le caractère basique de l'atome d'azote impliqué dans le lien carbamate dans la molécule ***(96)***, et supprimé un atome d'azote.

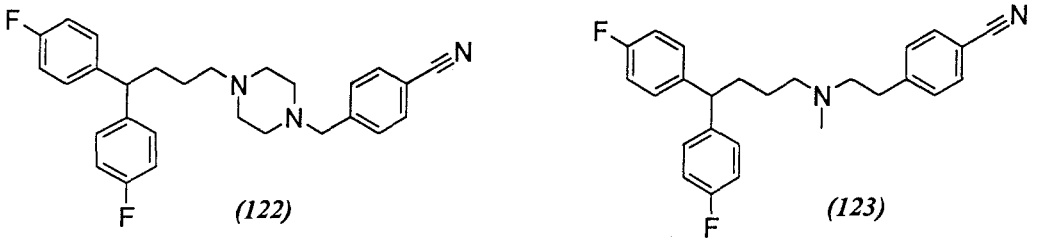


Figure 3.IV.19 : Analogues complémentaires synthétisés.

La figure 3.IV.20 présente la voie de synthèse utilisée pour le composé ***(123)***.

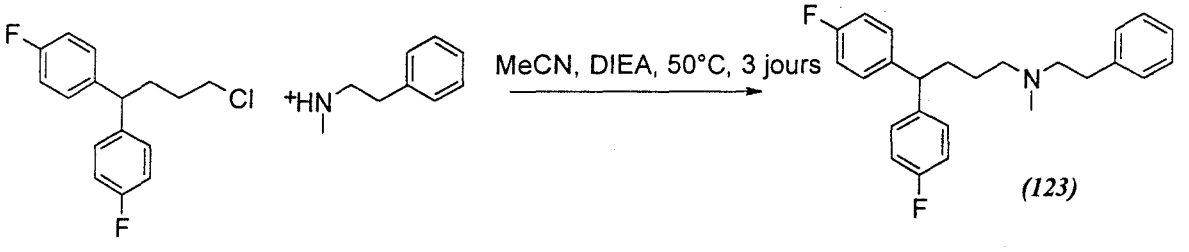


Figure 3.IV.20 : Synthèse du composé ***(123)*** par N-alkylation.

Au total, 58 analogues à topologie similaire à celle du produit *(96)* ont été synthétisés, parmi lesquels des carbamates, des urées, des amines secondaires et tertiaires, des amides.

B. Analogues à pharmacophore constant

Parmi les analogues à pharmacophore constant mis en évidence par le logiciel de modélisation moléculaire, de nombreux produits présentent un monomère commun avec le produit de référence *(96)*. Cependant d'autres analogues présentent une topologie différente. La figure 3.IV.21 présente deux exemples de ces analogues. Ceux-ci présentent à gauche deux aromatiques qui miment le benzhydryle et à droite également un aromatique comme dans la référence, de part et d'autre d'une acyl-piperazine.

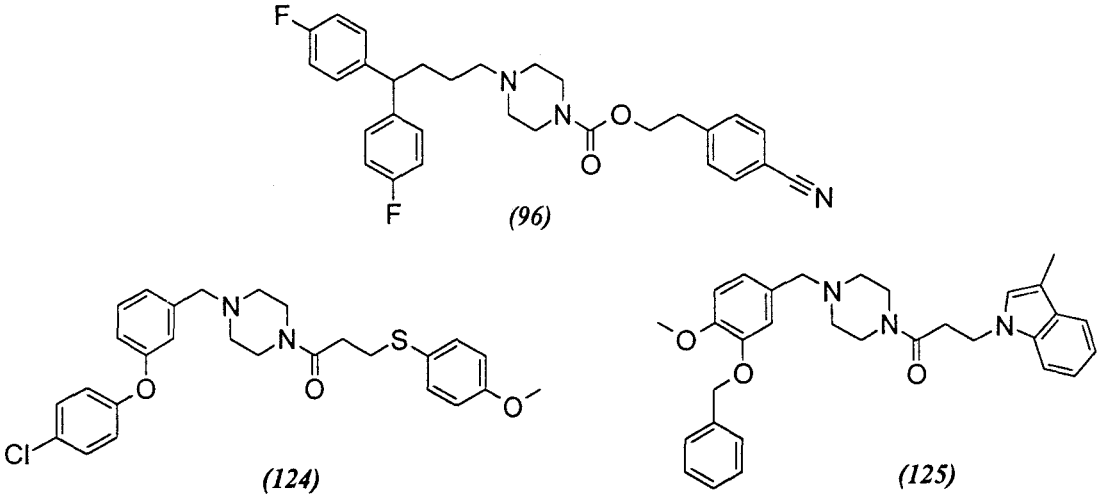


Figure 3.IV.21 : Exemples d'analogues de *(96)* à pharmacophore conservé.

3.IV.3. Criblage biologique.

L'ensemble des analogues de *(95)* et *(96)* ont été testés à la concentration de 10μM sur le récepteur μ humain cloné. En parallèle ont été menées les analyses de pureté des milieux réactionnels. Parmi les milieux seuls ceux présentant une pureté supérieure à 80% et un pourcentage d'inhibition supérieur à 50% à la concentration de 10μM ont été soumis à un test d'IC_{50}. La figure 3.IV.22 présente d'IC50 en fonction du pourcentage d'inhibition obtenu précédemment.

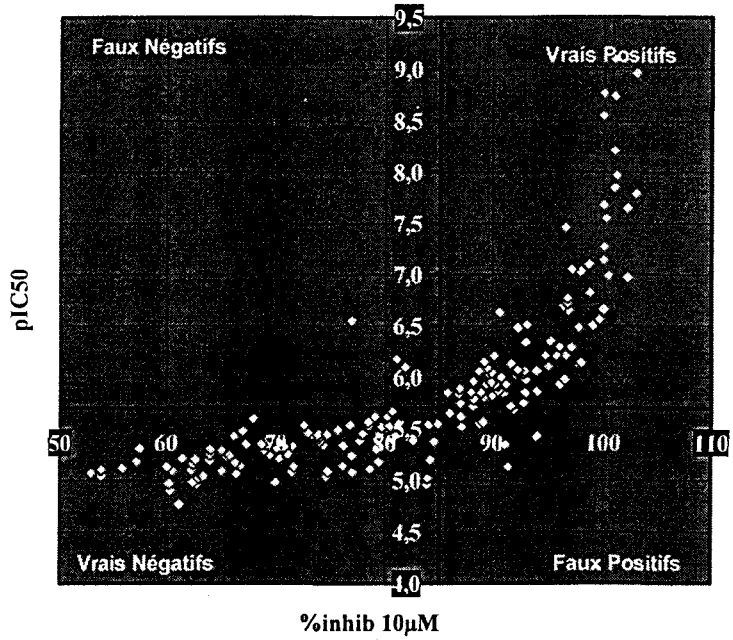


Figure 3.IV.22 : pIC50 = f(%inhibition à 10µM) sur les milieux réactionnels non purifiés.

La distribution des points en « croissant » est caractéristique de la non linéarité de la réponse biologique en fonction du logarithme de la concentration. Dans le cas de notre expérience, ce croissant est fin, ce qui permet de répartir les points expérimentaux dans deux cadrans sur le graphe. A chaque valeur d'IC_{50}, correspond une valeur de pourcentage d'inhibition ce qui permet de trier les composés en deux catégories de puissance ($IC_{50}<IC_{50}$ limite et $IC_{50}>IC_{50}$ limite) en se fiant au signal lu pendant l'expérience de criblage. Il est raisonnable de considérer qu'un produit est intéressant lorsqu'il possède une IC_{50} inférieure à 2µM (soit un pIC_{50} supérieur à 5.7). De même, en fixant le pourcentage d'inhibition minimal à 85% pour une concentration test de 10µM, il est possible de limiter le nombre de faux positifs par la suite. Ainsi dans notre expérience, l'HTS a permis de mettre en évidence quasiment tous les produits actifs. Un nombre très restreint de produits ont été déterminé comme étant de faux positifs ou de faux négatifs.

La zone du graphe où le signal (pourcentage d'inhibition) lu est relié de la manière la plus fiable à la puissance de la molécule est celle où la pente de la tangente au « croissant » est de ½. Elle correspond à 85-90% d'inhibition et dans cette expérience à une IC_{50} de 1 à 3 µmolaire. La concentration du test est donc particulièrement adaptée pour séparer les composés submicromolaires du reste de la population. D'une manière générale, sachant que c'est à 85-90% que l'on discrimine le mieux deux populations de composés, il faut adapter la concentration de test en conséquence.

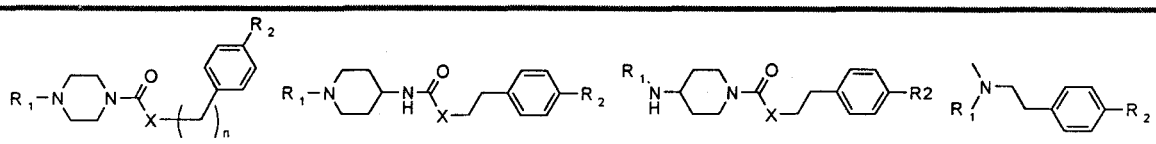
La corrélation entre structure et activité a permis de montrer que nous n'avions pas beaucoup optimisé en terme de puissance, le composé non spécifique ***(96)*** avec seulement deux composés submicromolaires. Par contre, de nombreux analogues du produit spécifique ***(95)*** ont montré une activité de l'ordre de 10 nanomolaire avec un maximum de puissance subnanomolaire. Au vu de ces résultats, nous avons sélectionné, sur la base de la puissance (IC_{50} du milieu réactionnel) et sur leur capacité à fournir des informations pour une étude de relations structure-activité, un nombre restreint d'analogues à resynthétiser, purifier et caractériser biologiquement. Nous avons donc ainsi choisi de resynthétiser 45 analogues du produit spécifique ***(95)*** et 10 analogues du produit non spécifique ***(96)***.

3.IV.4. Tables SAR (obtenues sur produits purifiés) et Modèle QSAR.

Les IC_{50} sont définies comme la concentration des composés testés qui inhibent 50% de la liaison du DAMGO (0.5 nM) pour μ(h), du U69593 (0.5nM) pour κ(h) et du DPDPE (0.5 nM) pour δ(h).

3.IV.4.1. Analogues du produit non-spécifique (96).

A. Topologie conservée



1 à 24 25 à 26 27 28

Entrée	#	R_1	n	X	R_2	μ (h)	κ (h)	δ (h)
1	*(96)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	O	CN	1370	8170	10000
2	*(126)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	O	F	3500	4230	>10000
3	*(127)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	1	CH_2	F	4360	3050	10000
4	*(128)*	3-phenylpropyl	2	O	CN	792	>10000	>10000
5	*(129)*	3-phenylprop-2-enyl	2	O	CN	257	>10000	>10000
6	*(130)*	3-phenylpropyl	2	O	OC_2H_5	1400	9610	NC
7	*(131)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	NH	OC_2H_5	2240	2780	4410
8		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	O	CN	>10000*	ND	ND
9	*(132)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	CH_2	H	5140	2610	7270
10		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	O	NO_2	2820**	ND	ND
11		3-phenylprop-2-enyl	2	O	OC_2H_5	1200**	ND	ND
12		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	O	OC_2H_5	6000**	ND	ND
13		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	1	O	CN	>10000*	ND	ND
14		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	1	O	OC_2H_5	>10000*	ND	ND
15		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	3	O	OCH_3	>10000*	ND	ND
16		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	2	O	OCH_3	7400**	ND	ND
17		9-fluorenyl	2	O	CN	>10000*	ND	ND
18		benzhydryl	2	O	CN	>10000*	ND	ND
19		4,4'-dichorobenzhydryl	2	O	CN	>10000*	ND	ND
20		benzyl	2	O	CN	>10000*	ND	ND
21		H	2	O	CN	>10000*	ND	ND
22		t-butyloxycarbonyl	2	O	CN	>10000*	ND	ND
23		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	0	CH_2	OCH3	>10000*	ND	ND
24		4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	0	CH_2	H	>10000*	ND	ND
25	*(133)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	-	O	CN	6360	2160	9760
26		4,4'-difluorobenzhydryl	-	O	CN	>10000*	ND	ND
27		benzhydryl	-	O	CN	>10000*	ND	ND
28	*(123)*	4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl	-	-	H	1202	ND	ND

NC : non calculable ; ND : non déterminé ; * : composé ayant montré un % d'inhibition inférieur à 50% à 10μM ; ** : sur milieu réactionnel (pureté supérieure à 90%).

Tableau 3.IV.8 : IC_{50} en nM sur μ, κ et δ des analogues de ***(96)***.

Dans l'ensemble, les produits sont plus actifs sur les récepteurs mu et kappa que sur le récepteur delta. Les entrées ***1***, ***2***, ***10***, ***12*** et ***16*** montrent l'influence des groupements portés par l'alcool (Tableau 3.IV.8). Les groupements nitrile et nitro augmentent l'activité par rapport aux groupements F, OEt et OMe. Il semble donc qu'il soit plus intéressant de faire apparaître un groupement électro-attracteur sur l'alcool.

L'alcool couplé à la pipéridine seule n'est pas suffisant pour conférer de l'activité aux produits (Entrées ***20*** et ***21***, Tableau 3.IV.8). Les aromatiques portés par l'amine sont donc importants pour l'activité.

La transformation du lien carbamate en lien amide s'accompagne d'une perte sensible de l'activité sur μ et d'une augmentation sensible de l'activité sur κ (Entrées ***2*** et ***3***, Tableau 3.IV.8). Dans cet exemple, la transformation en fonction amide s'accompagne de la diminution de la chaîne carbonée. Dans le cas où la chaîne carbonée est réduite au maximum, on peut observer une perte totale d'activité (Entrées ***23*** et ***24***, Tableau 3.IV.8). Si le nombre d'atomes séparant l'azote protonable de la piperidine et le groupement aromatique apporté à l'origine par l'alcool reste identique, le remplacement de la fonction carbamate par une fonction amide induit une perte d'activité conséquente (Entrées ***1*** et ***9***, Tableau 3.IV.8). Dans cet exemple cependant, le groupement nitrile a été supprimé, ce qui pourrait ajouter à la perte d'activité de cette molécule (Entrée ***9***, Tableau 3.IV.8). On observe en outre une amélioration de l'activité sur le récepteur κ.

Le remplacement du groupe piperidine-COO par un groupement N-Me modifie peu l'activité, laissant supposer que le paramètre important à conserver est la distance charge positive aromatique (Entrées ***1*** et ***28***, Tableau 3.IV.8).

L'influence de la longueur de la chaîne alkyle de l'amine qui relie la charge positive (azote protonable de la piperidine) et les cycles aromatiques semble essentielle à l'activité. En effet, la suppression du maillon n-butyle induit une perte totale d'activité (Entrées ***1***, ***8***, ***17***, ***18***, ***19***, ***20***, Tableau 3.IV.8). De même, l'introduction d'un degré de liberté supplémentaire dans la molécule par le remplacement de la piperidine par l'amino-pyrrolidine diminue l'activité d'un facteur 6 (Entrées ***1*** et ***25***, Tableau 3.IV.8). Il semble dans ce cas que l'aromatique porté par l'alcool et la charge positive doivent également être séparés par une distance précise. Le cumul de la réduction de la chaîne alkyle avec le remplacement de la pipérazine par l'amino-piperidine est également préjudiciable à l'activité (Entrées ***26*** et ***27***, Tableau 3.IV.8).

La modification permettant d'augmenter de manière conséquente l'activité des composés dans notre série est la réduction de la chaîne butyle d'un atome (Entrées ***4*** à ***6***, et ***11***, Tableau 3.IV.8). Ce raccourcissement est cependant accompagné de la suppression d'un des 2 aromatiques portés par l'amine. Cette modification permet d'obtenir des composés sub-micromolaires. L'introduction en sus d'une double liaison augmentant la rigidité de la molécule nous a permis d'obtenir un produit ayant une IC_{50} de 257 nM (Figure 3.IV.23).

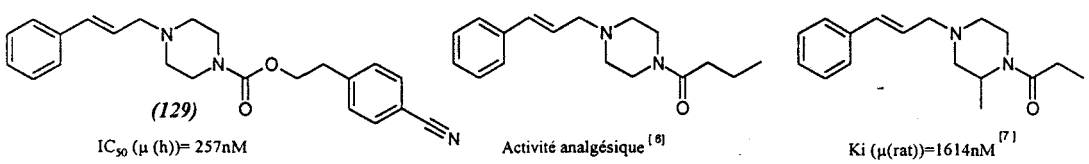


Figure 3.IV.23 : Analogue le plus actif ***(129)*** et des analogues trouvés dans la littérature.

L'analogue ***(129)*** présente une certaine similitude avec des dérivés de la pipérazine de la littérature : la 1-butyroyl-4-cinnamylpiperazine décrite comme ayant des propriétés analgésiques et étant active oralement[6], et l'un de ses dérivés porteur d'un méthyle sur la pipérazine[7].

Dans la série représentée par ***(129)***, on peut également observer que les groupements électroattracteurs (CN) sur la partie alcool sont préférables aux groupements électrodonneurs (OEt) (Entrées ***4*** et ***5***, et ***6*** et ***11***, Tableau 3.IV.8). Egalement, le changement du lien carbamate en un lien urée décroît l'activité (Entrées ***6*** et ***7***, Tableau 3.IV.8).

L'ensemble des conclusions auxquelles nous sommes arrivés au cours de cette étude SAR ont permis de concevoir le modèle simple présenté en Figure 3.IV.24. Cependant, la gamme d'activité des analogues n'étant pas assez étendue pour réaliser des études de QSAR, il conviendrait de refaire des analogues afin de vérifier nos hypothèses, et raffiner le modèle pour le rendre utilisable.

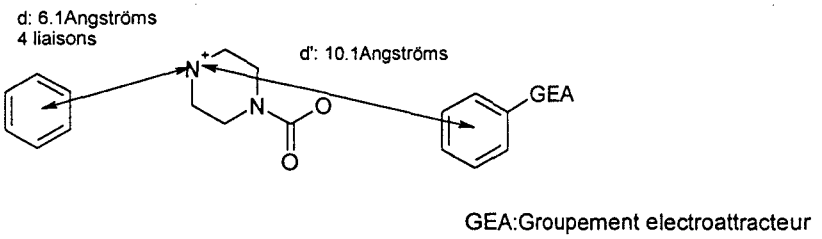
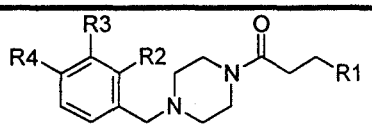


Figure 3.IV.24 : Modèle proposé pour la liaison au récepteur μ des analogues de ***(96)***.

B. Distribution d'éléments de pharmacophore conservée.

Comme nous pouvions l'imaginer, au vu des résultats précédents, mimer la distribution de pharmacophores de ***(96)*** ne pouvait pas aboutir à la conception de molécules très actives. Néanmoins, parmi les produits synthétisés, deux composés ont montré une activité détectable, au moins sur κ (Tableau 3.IV.9). A cette première étape d'optimisation, et à partir d'un dérivé flexible et peu actif, on ne pouvait pas attendre beaucoup mieux d'une telle stratégie. Par contre, il faut considérer l'optimisation comme un processus itératif. L'emploi systématique de cette stratégie indépendante des voies de la chimie médicinale dans les étapes précoces d'optimisation permet d'apporter des informations de structure-activité complémentaires et de rendre la modélisation moléculaire plus efficace. D'autre part, elle fournit des têtes de séries nouvelles à chaque itération, pourvu que la collection virtuelle dans laquelle on puise soit assez diverse.



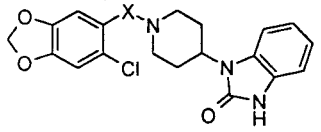
#	R_1	R_2	R_3	R_4	μ (nM)	κ (nM)	δ (nM)
(124)	4-methoxyphenylthio	4-chlorophenyloxy	H	H	NC	6210	>10000
(125)	1-(3-methylindole)	H	OC_6H_5	H	3570	3580	>10000

Tableau 3.IV.9. Analogues à pharmacophore constant obtenus grâce au logiciel de modélisation moléculaire.

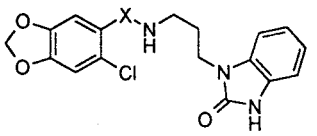
3.IV.4.2. Analogues du produit spécifique ***(95)***.

A. Changements conformationnels : influence de l'ouverture du cycle piperidine.

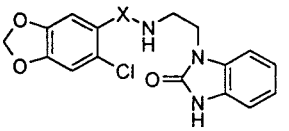
Nous avons tout d'abord analysé les résultats des analogues à topologie constante de *(95)* et en particulier, l'influence de l'ouverture du cycle pipéridine de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine (Tableau 3.IV.10).



(134) et *(106)*



(135) et *(107)*



(136)

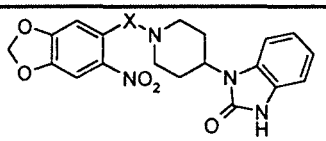
#	X	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(134)	CH_2OCO	133	292	1940	<1	4.2
(135)	CH_2OCO	8950	3100	>10000	1.2	–
(136)	CH_2OCO	>10000	>30000	>30000	2.2	3.2
(106)	CH_2	1.1	6.3	34	89.6	3.0
(107)	CH_2	218	472	>30000	185.7	1.8

Tableau 3.IV.10 : Influence de l'ouverture du cycle de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine, IC_{50} en nM.

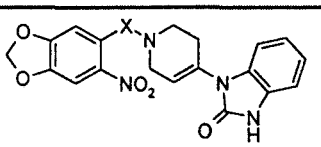
La forme ouverte de la pipéridine entraîne systèmatiquement une baisse d'un ou deux ordre de grandeurs d'activité, quelque soit le sous-type (*(134)* et *(135)* , *(106)* et *(107)*, Tableau 3.IV.10). Le facteur entropique est donc très important : l'influence de la rigidité de la molécule est aussi forte que celle de la charge (couplée à un raccourcissement de la chaîne). On remarque que la variation d'IC_{50} est plus forte dans la série chargée positivement. La fermeture du cycle pipéridine amène probablement le groupement aromatique et la charge positive en position favorable relativement au noyau benzimidazolone. Ceci explique également les différences observées lors de l'ouverture du cycle pipéridine couplée à la suppression d'un méthylène. De plus, on remarque que la fermeture de la chaîne diminue la solubilité et augmente le LogD, ce qui peut être relié à la perte de l'hydrogène sur l'azote.

B. Changements conformationnels : influence de la double liaison de la tétrahydropyridine.

Egalement, nous avons comparé l'influence du remplacement de la pipéridine par la tétrahydropyridine (Tableau 3.IV.11).



(95) et *(103)*



(138) et *(109)*

#	X	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(95)	CH_2OCO	1100	>30000	>30000	ND	ND
(138)	CH_2OCO	>10000	6500	10000	ND	ND
(103)	CH_2	1.7	26	227	2	2.4
(109)	CH_2	16	398	3300	8.2	2.9

ND : non déterminé

Tableau 3.IV.11 : Influence de l'incorporation d'une double liaison dans le cycle pipéridine de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine, IC_{50} en nM.

L'incorporation d'une contrainte stérique sous la forme d'une double liaison dans le cycle pipéridine de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine diminue l'activité de plus d'un ordre de grandeur sur les deux séries chimiques (carbamates et amines alkylées) pour l'ensemble des trois récepteurs opiacés. La modélisation moléculaire apporte un début d'explication à cette différence. En effet, la 1,3-dihydro-1-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)-2H-benzimidazole-2-one « aplatit » la molécule en rendant le cycle benzimidazole-2-one et l'azote de la pipéridine presque coplanaires (Figure 3.IV.25).

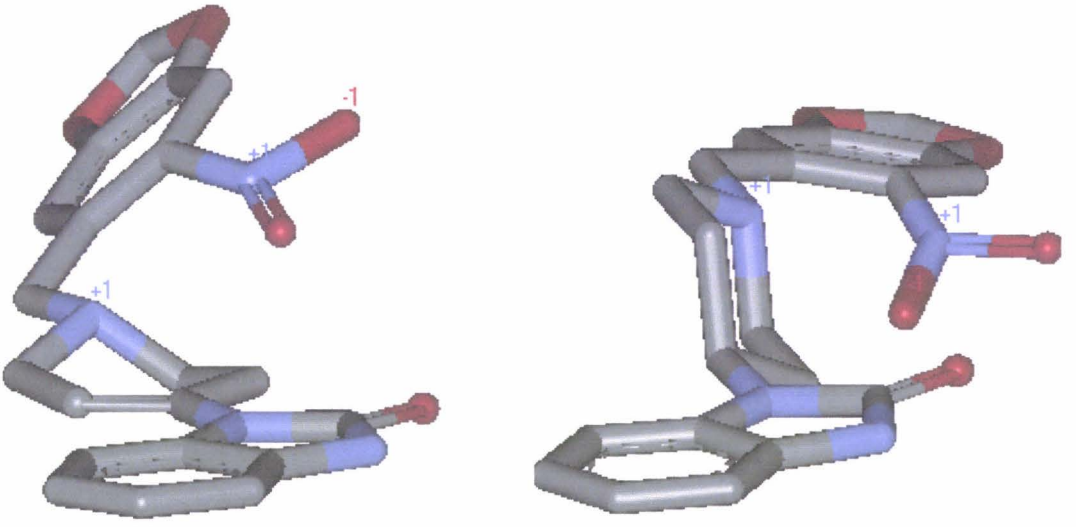
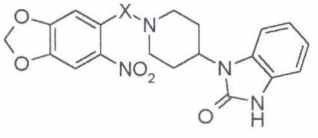


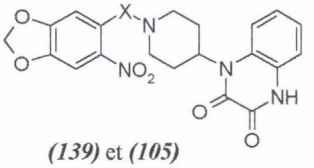
Figure 3.IV.25 : Comparaison de la 1,3-dihydro-1-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)-2H-benzimidazole-2-one et de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine.

C. Nouveaux éléments d'interaction potentielle avec le récepteur : homologation du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl

Nous avions également décidé d'évaluer l'influence de l'homologation du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl en 2,3-(1H, 4H)-quinoxalinedione (Tableau 3.IV.12).



(134) et *(106)*



(139) et *(105)*

#	X	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(134)	CH_2OCO	133	292	1940	<1	4.2
(139)	CH_2OCO	2880	1330	>10000	1.3	1 .1
(106)	CH_2	1.1	6.3	34	89.6	3.0
(105)	CH_2	6.1	32	408	46.4	1.3

Tableau 3.IV.12 : Influence de l'homologation du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl en 2,3-(1H, 4H)-quinoxalinedione, IC_{50} en nM.

L'homologation du cycle diminue l'activité d'un facteur entre 5 et 20, sur les trois récepteurs. Il n'y a pas comme dans l'exemple précédent de différences de conformations qui pourrait expliquer en partie cette différence (Figure 3.IV.26).

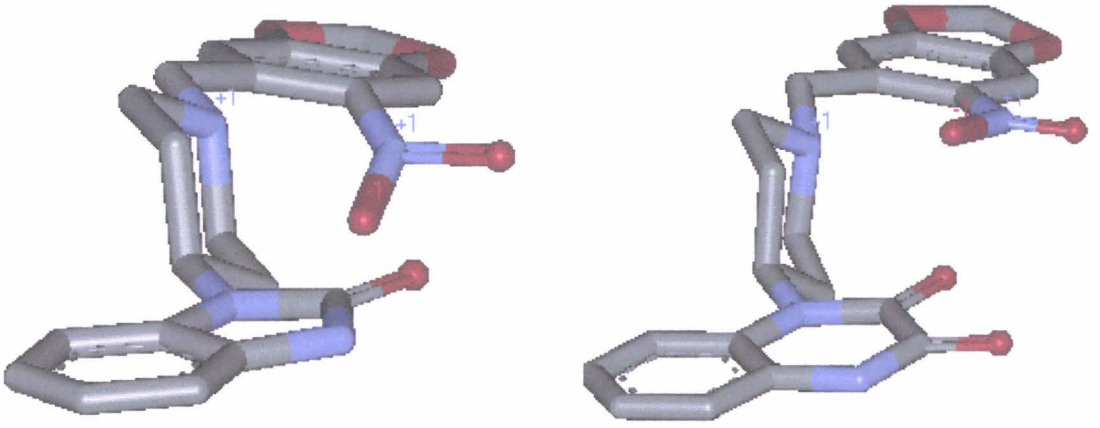
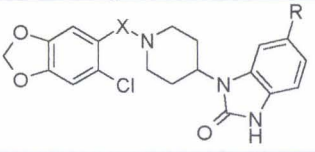


Figure 3.IV.26 : influence de l'homologation du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl.

Néanmoins, si une molécule d'eau est liée aux deux groupements carbonyles de la 2,3-(1H, 4H)-quinoxalinedione, la solubilité de la molécule pourrait être altérée et les éventuelles liaisons hydrogène avec le récepteur seront à cet endroit impossible alors qu'elles le seront avec le cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl. Cette particularité structurale peut-être mise en raport avec la différence de solubilité de la quinoxaline-dione malgré un LogD inférieur.

D. Nouveaux éléments d'interaction potentielle avec le récepteur : substitution du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyle.

Une dernière modification du cycle 2-oxo-1-benzimidazolinyl qui consiste en la substitution par un méthyle en position 4 (Tableau 3.IV.28).



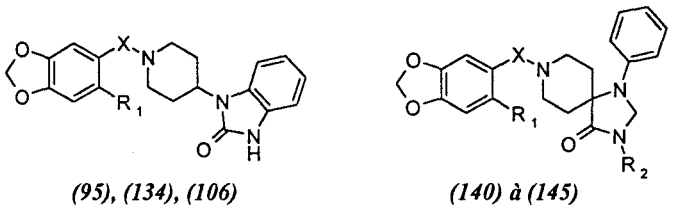
#	X	R	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(134)	CH_2OCO	H	133	292	1940	<1	4.2
(140)	CH_2OCO	CH_3	1510	785	7730	<1	3.4
(106)	CH_2	H	1.1	6.3	34	89.6	3.0±0.15%
(104)	CH_2	CH_3	2.8	2.7	101	3.4	2.6±0.06%

Tableau 3.IV.12 : Influence de la substitution par un methyle en position 4 de la 2-oxo-1-benzimidazolinyl, IC_{50} en nM.

Il s'agit de l'une des deux seules modifications étudiées ici qui permette de modifier la sélectivité sur kappa. Ainsi l'ajout du substituant permet d'augmenter l'affinité pour kappa d'un facteur 2 alors que l'affinité pour mu et delta décroît presque d'un facteur 3 en série amines alkylées. En série carbamate, la substitution en position 4 entraîne une chute de l'activité sur chacun des récepteurs. Cependant cette diminution de l'activité est la plus faible pour kappa (2.5 fois moins actif) que pour mu (11 fois) et delta (4 fois). Il est intéressant de noter que la solubilité des dérivés substitués est nettement moins bonne que celle des analogues non substitués.

E. Pharmacophore 4-anilino-piperidine.

Lors de la recherche d'analogues à pharmacophore constant, notre logiciel de similarité a proposé de remplacer la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine par la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one. Le tableau 3.IV.13 présente les résultats obtenus pour ces deux séries.



(95), (134), (106) *(140) à (145)*

#	X	R_1	R_2	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(95)	CH_2OCO	NO_2	–	1100	>30000	>30000	ND	ND
(141)	CH_2OCO	NO_2	H	>10000	5070	>30000	9.2	3.1
(134)	CH_2OCO	Cl	–	133	292	1940	<1	4.2
(140)	CH_2OCO	Cl	H	1510	785	7730	<1	3.4
(142)	CH_2OCO	Cl	$CH_2CONHCH_3$	152	355	1590	36.9	3.1
(143)	CH_2OCO	Cl	CH_2COOH	719	6570	7990	98.1	0.7
(106)	CH_2	Cl	–	1.1	6.3	34	89.6	3.0
(144)	CH_2	Cl	H	1.8	7.2	77	20.1	3.0
(145)	CH_2	Cl	$CH_2CONHCH_3$	0.8	2.1	12	208.9	2.9

Tableau 3.IV.13 : Analyse des différences entre les deux séries chimiques dérivées de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine et de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one, IC_{50} en nM.

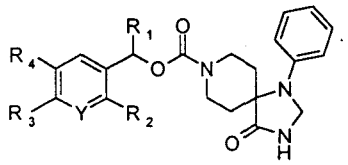
En série carbamates, le dérivé de la spirodécanone substituée en R_2 par un groupement $CH_2CONHCH_3$ ***(142)*** est aussi actif que le dérivé de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine ***(134)***. Par contre, les dérivés non substitués sont environ 10 fois moins actifs (***(141)*** et ***(140)***, Tableau 3.IV.13). En série amines alkylées, la différence entre les différents dérivés ***(106)***, ***(144)*** et ***(145)*** est négligeable par contre, les dérivés de la spirodécanone substitués ou non en R_2 sont plus solubles et semblent donc être de meilleurs candidats. Egalement, on peu noter l'activité intéressante du composé ***(143)*** qui présente un substituant CH_2COOH en R_2. La substitution en cette position semble donc importante pour l'activité sur mu. Bien que le composé ***(143)*** possède une charge négative, il est actif. On peut rappeler ici que la morphine-6-sulfate est également active sur mu[4].

Le pharmacophore à la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine est le groupement 4-anilidopiperidine, reconnu comme étant un pharmacophore pour les récepteurs opiacés [4]. Cette isostérie a également été décrite pour des ligands sérotoninergiques ($5HT_{1A}$)[8] et dopaminergiques (déplacement de l'[^{3}H]- halopéridol)[9]. Le pharmacophore de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one est le groupement 4-anilinopiperidine.

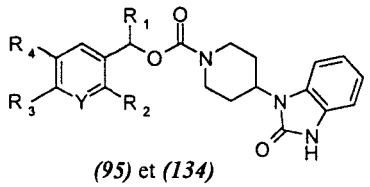
F. Influence des substitutions du groupement benzyle.

L'influence des substituants sur du groupement benzyle est présenté dans le tableau 3.IV.14.

Carbamates :



(141), (146) à *(151)*

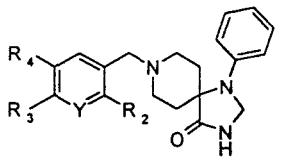


(95) et *(134)*

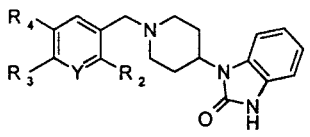
#	R_1	R_2	Y	R_3	R_4	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(141)	CH_2	NO_2	CH	$-OCH_2O-$		>10000	5070	>30000	9.2	3.1
(146)	CH_2	Cl	CH	$-OCH_2O-$		1730	2610	>10000	<1	2.9
(147)	CH_2	H	CH	$-OCH_2O-$		5650	2530	>30000	2	3.7
(148)	CH_2	H	CH	-thiadiazole-		>30000	1800	>10000	7.5	3.4
(149)	CH_2	H	CH	H	$-OC_6H_5$	>10000	2570	>10000	<1	_
(150)	$-(CH_2)_2-$[a]		CH	H	H	1430	671	>30000	<1	_
(151)	CH_2	H	N	H	H	>10000	4260	>30000	105	2.5
(95)	CH_2	NO_2	CH	$-OCH_2O-$		1100	>30000	>30000	ND	ND
(134)	CH_2	Cl	CH	$-OCH_2O-$		133	292	1940	<1	4.2

[a] : *alcool utilisé : (+/-)-indan1-ol.*

Amines :



(144) et *(152)* à *(154)*



(103), (106) et *(108)*

#	R_2	R_3	R_4	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(144)	Cl	$-OCH_2O-$		1.8	7.2	77	20.1	3.0
(152)	H	$-OCH_2O-$		14	51	1180	183.2	2.2
(153)	H	-thiadiazole-		21	102	4490	197	2.6
(154)	H	H	$-OC_6H_5$	72	105	2500	8.5	2.9
(103)	NO_2	$-OCH_2O-$		1.7	26	227	2	2.4
(106)	Cl	$-OCH_2O-$		1.1	6.3	34	89.6	3.0
(108)	H	OCH_3	H	16	198	2150	195.3	2.5

Tableau 3.IV.14 : Activités en fonction des différents substituants sur le benzyle, IC_{50} en nM.

Les composés *(147)* et *(148)* et les composés *(152)* et *(153)* permettent d'évaluer la validité de l'isostérie thiadiazole-méthylènedioxy. Il semble que celle ci soit tout à fait valable sur le récepteur mu puisque les activités sont similaires. De plus à partie droite constante, la solubilité est similaire.

Dans l'ensemble, on remarque que Cl est un meilleur substituant en R_1 que NO_2 en ce qui concerne l'activité sur mu (*(141)*, *(146)*, *(95)*, *(103)*, *(106)* et *(134)*, Tableau 3.IV.14). Il permet également à la molécule d'être plus soluble. La comparaison des dérivés de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one permet de montrer que l'absence de substituant en cette position diminue l'activité sur mu (*(146)* et *(147)*, *(144)* et *(152)*, Tableau 3.IV.14).

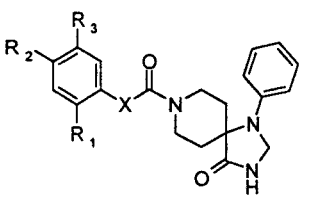
Le remplacement du cycle 2-nitro-3,4-méthylènedioxyphényle par la 3-pyridine fait disparaître l'activité sur mu mais augmente la solubilité de la molécule et décroît le LogD (***(151)***, Tableau 3.IV.14). Cette perte d'activité pourrait être due à une réorientation de la molécule dans le site de liaison consécutive à l'apparition d'une charge positive sur un substitution neutre habituellement dans la série. Le remplacement du cycle 3,4-méthylènedioxyphényle par le 3-phénoxyphényle diminue l'activité d'un facteur 5 (***(149)*** et ***(154)***, Tableau 3.IV.14), probablement à cause du cycle aromatique supplémentaire.

Le composé ***(108)*** (Tableau 3.IV.14) a subi deux variations : suppression du groupement méthylènedioxy et remplacement par un simple groupe méthoxy et absence de substitution en ortho. Ce produit est environ dix fois moins actif que les composés les plus actifs de la série. Il présente cependant une très bonne solubilité.

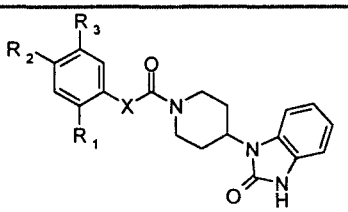
Enfin, le composé ***(150)*** (Tableau 3.IV.14) présente des caractéristiques intéressantes. En effet, alors que la plupart des composés décrits sont plus actifs sur le récepteur mu que sur le récepteur kappa, celui-ci présente une sélectivité inversée : 671nM sur kappa et 1430nM sur mu.

G. Modification du lien carbamate.

Une dernière modification avait consisté en la modification du lien carbamate du produit de départ en amide ou en urée (modification dans presque tous les cas isostère) (Tableau 3.IV.15).



(141), (147), (155) à (157)



(95), (158), (159)

#	X	R_1	R_2	R_3	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(147)	CH_2O	H	$-OCH_2O-$		5650	2530	>30000	2	3.7
(155)	CH_2NH	H	$-OCH_2O-$		>30000	5450	>10000	28.8	2.8
(141)	CH_2O	NO_2	$-OCH_2O-$		>10000	5070	>30000	9.2	3.1
(156)	CH=CH	NO_2	$-OCH_2O-$		>30000	9270	>10000	24.3	3.1
(157)	CH=CH	NO_2	OCH_3	OCH_3	>30000	8180	>10000	34.8	3
(95)	CH_2O	NO_2	$-OCH_2O-$		1100	>30000	>30000	ND	ND
(158)	CH=CH	NO_2	OCH_3	OCH_3	1060	3700	>10000	57.4	3
(159)	CH_2	NO_2	OCH_3	OCH_3	>30000	2090	>30000	1.4	2.4

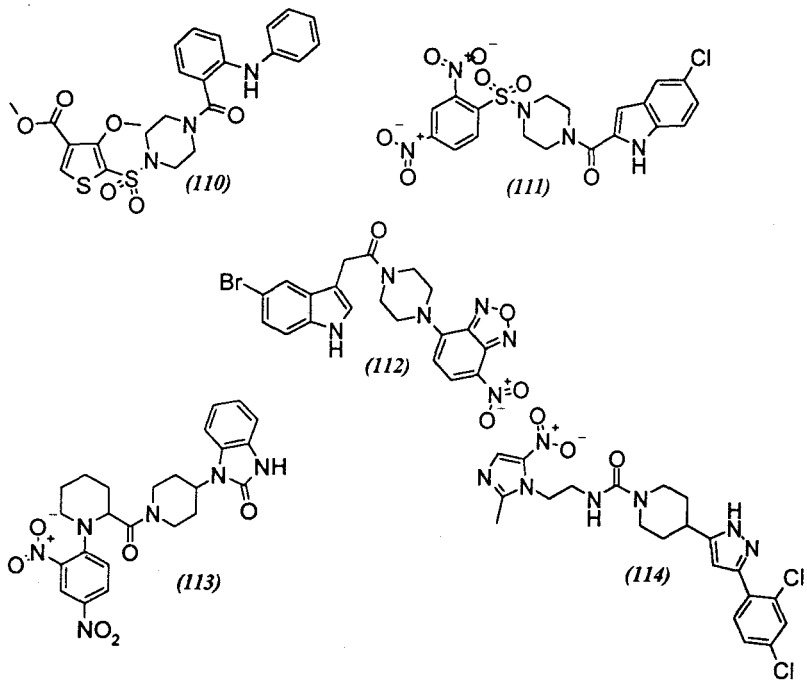
Tableau 3.IV.15 : Variation du lien carbamate, IC_{50} en nM.

Pour la série des dérivés de la spirodécanone, on remarque que l'urée est moins active que le carbamate (***(147)*** et ***(155)***, Tableau 3..IV.15). Le remplacement du groupe CH_2O par son isostère CH=CH ne varie pas beaucoup l'activité, les produits sont très peu actifs. Par contre, la solubilité est meilleure à LogD constant. Dans la série de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine, l'activité sur mu est similaire, mais l'activité sur kappa augmente (***(95)*** et ***(158)***, Tableau 3.IV.15). La solubilité est aussi meilleure. Bien que l'amide soit un bon isostère du carbamate et présente une meilleure solubilité, on peut noter que ces dérivés cinnamiques peuvent éventuellement créer des problèmes de toxicité ou de

pharmacocinétique à cause de leur caractère accepteur de Michael. Si l'on supprime alors un groupement méthylène de la chaîne carbonée (***(159)***, Tableau 3.IV.15), on perd toute l'activité sur mu, mais pas sur kappa. Une fois encore, une modification mineure du squelette permet de modifier la sélectivité.

H. Autres analogues.

Parmi les analogues à pharmacophore constant, ne dérivant pas de l'amine 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one, certains ont montré des IC50 inférieures à 10μM ce qui est de l'ordre de grandeur de la référence (Tableau 3.IV.16).



#	μ (h)	κ (h)	δ (h)	Solubilité μM	LogD
(110)	7640	7260	>30000	2.2	4.2
(111)	9530	8900	>30000	<1	
(112)	14510	7940	>10000	1.1	3
(113)	>10000[a]	ND	ND	ND	ND
(114)	7910	>10000	>10000	46.5	3.4

a : ***inhibition du milieu réactionnel (pureté 90%) en HTS inférieur à 50% à 10μM.***

Tableau 3.IV.16 : Analogues à pharmacophore constant non dérivés de la l'amine 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one.

On approche ici la limite de la stratégie « à pharmacophore constant ». En effet, celle-ci ne prend tout son intérêt que lorsque la référence présente une activité satisfaisante et permet de définir un pharmacophore optimal. Il n'est pas étonnant avec cette méthode de ne pas trouver de molécules submicromolaires ayant un pharmacophore similaire à ***(95)***. L'intérêt principal de cette méthode réside dans la capacité à trouver de nouvelles topologies est notamment d'échapper à des revendications de brevet qui sont souvent basées sur une description topologique des molécules, la formule de Markush.

I. Conclusions

Les amines alkylées se sont révélées les composés les plus actifs. D'après l'ensemble des tables SAR, il est clair que le mode de liaison des carbamates et celui des amines alkylées sont similaires car des substitutions identiques dans les deux séries donnent des variations similaires d'activité. Cependant la charge positive contribue de façon importante à l'activité. Ceci peut être relié au fait que les récepteurs opiacés font partie de la même famille phylogénique que les récepteurs aux amines biogènes (sérotonine, adrénaline, dopamine) apparentés au récepteur de la rhodopsine. Ceux-ci sont en effet caractérisés par deux résidus aspartate sur les domaines TM_2 et TM_3 qui participent à l'interaction avec les ligands naturels et artificiels[10]. Les dérivés de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one sont très « proches » de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine qui est du type anilino-piperidine (ici acylé)connu pour être un bon pharmacophore sur mu[4]. Un médicament commercialisé de cette classe est le fentanyl (Figure 3.IV.27).

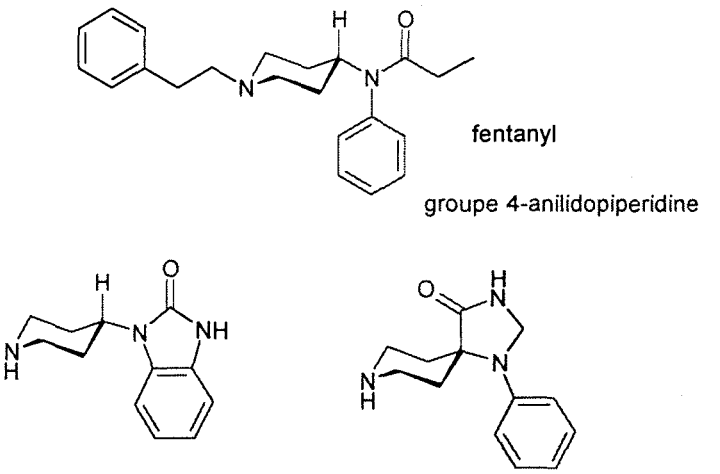


Figure 3.IV.27 : Le fentanyl et les 4-anilinopiperidines.

Comme écrit précédemment, des brevets de Janssen concernant la synthèse des dérivés de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one et de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-piperidine mentionnent les activités analgésiques type morphinique de certains produits, activités mises en évidence par le test de la plaque chaude sur des souris [11],[12],[5].

A notre connaissance, un des seuls dérivés de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one qui ait été testé pour son activité spécifique sur le récepteur μ est le dérivé présenté en Figure 3.IV.28 [13].

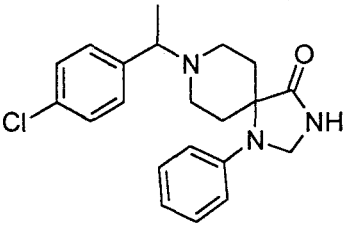


Figure 3.IV.28 : Seul dérivé 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one testé sur le récepteur mu.

Durant les 20 dernières années, des efforts importants ont été entrepris pour développer des ligands opioides qui seraient dépourvus des effets traditionnellement associés aux opioides comme la morphine : dépendance, tolérance, suppression immune, dépression respiratoire et constipation [14]. Des expériences sur les souris « knock-out » ont montré que

ces effets étaient exclusivement liés au récepteur mu[15]. Les effets dépendence-tolérance sont fortement liés à la durée qui s'écoule entre la prise et les premiers effets psychotropes. Un agoniste mu possédant une bonne biodisponibilité mais un étalement de l'absorption dans le temps serait utilisable en analgésie de longue durée. Par contre il n'est pas souhaitable d'utiliser des agonistes mu en analgésie post-opératoire notamment à cause des effets de constipation. Les agonistes du récepteur delta possèdent de faibles propriétés antalgiques. Les recherches se sont alors orientées vers le récepteur kappa. Les agonistes de ce récepteur peuvent cependant provoquer des effets dysphoriques importants. La spiradoline (Figure 3..IV.29) a ainsi été abandonnée[15].

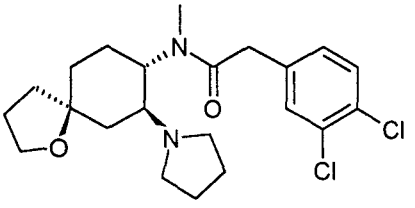


Figure 3.IV.29 : Structure de la spiradoline, agoniste kappa

Ainsi, une partie importante de la recherche actuelle sur les opioides et les antalgiques vise la découverte de ligands kappa qui ne passeraient pas la barrière hématoencéphalique et seraient utilisés en analgésie périphérique post-opératoire. En effet, un agoniste kappa périphérique permet d'éviter les effets dysphoriques associés à la cible centrale et l'absence de liaison au récepteur mu permet d'éviter les problèmes de constipation qui peuvent être gênants en utilisation post-opératoire. A ce titre, le composé ***(150)*** est intéressant car il présente une meilleure affinité pour kappa que pour mu. Il aurait été intéressant de savoir si son analogue en série amine alkylée ***(160)*** garde cette même sélectivité. On pourrait envisager de faire l'analogue substitué par le groupement $CH_2CONHCH_3$ ***(161)*** dont nous avons montré qu'il augmente la solubilité et diminue le LogD (Figure 3.IV.30). Ceci pourrait éviter à ce composé de passer la barrière hématoencéphalique et de prévenir les effets dysphoriques.

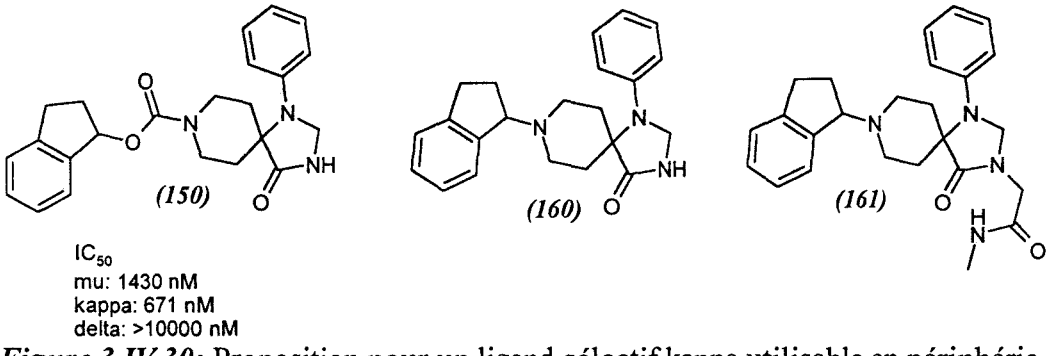


Figure 3.IV.30: Proposition pour un ligand sélectif kappa utilisable en périphérie.

Parmi les amines alkylées, le composé ***(108)*** présente un rapport d'IC_{50} kappa sur mu supérieur à 10. Il s'agit d'un des composés les plus sélectifs sur mu parmi les composés les plus actifs. Il présente de plus une très bonne solubilité.

Enfin, le composé le plus actif sur mu ***(145)*** (Tableau 3.IV.133) présente une très forte activité sur mu (IC_{50}=0.8nM) avec cependant une très faible sélectivité sur les 3 sous-types.

3.IV.4.3. Modèle QSAR sur μ et activité des références commerciales.

A partir des résultats de mesure d'IC_{50} de l'expérience HTS et des résultats sur les produits resynthétisés, nous avons établi un modèle QSAR par la méthode ComPharm[16]. Nous avons effectué une pré-sélection des descripteurs et avons raffiné le modèle avec les produits ayant donné une IC_{50} inférieure à 10μM. Les éléments de pharmacophore importants sont représentés sur la molécule la plus active ***(145)*** (Figure 3.IV.31). Ces éléments sont la charge positive de l'azote, l'aromatique à gauche et une zone hydrophobe au niveau de la pipéridine.

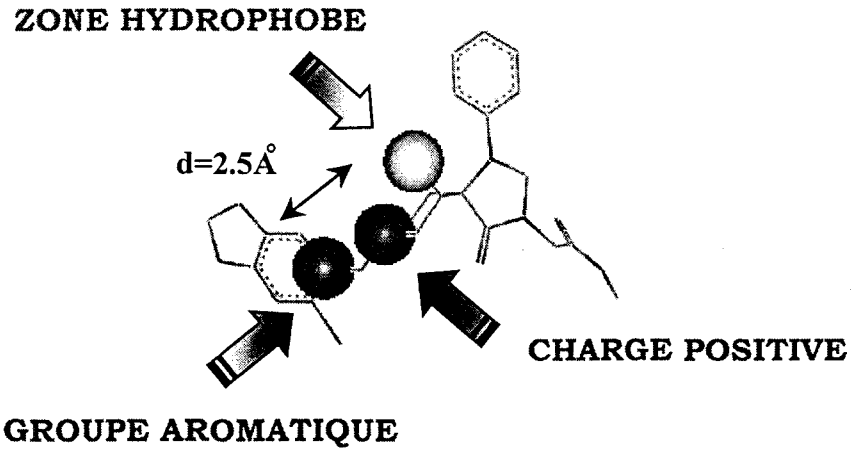


Figure 3.IV.31 : Modèle QSAR obtenu par la méthode ComPharm pour la série de produits testés sur μ.

Les premiers modèles du site de liaison de μ mentionnent un site anionique qui interagit avec l'amine protonée, une surface plane qui interagit avec le cycle aromatique et une cavité destinée à recevoir le cycle pipéridine des alkaloïdes opiacés rigides [4]. Par la suite des modifications du modèle original ont tenté d'expliquer comment les phénylpiperidines dans lesquelles le groupement phényl est équatorial peut interagir avec le même récepteur que les opiacés rigides dans lesquels le groupement phényl est axial. Portoghese et coll. ont proposé un modèle bimodal incluant un second site lipophile qui lierait les groupement phényl en équatorial des phénylpipéridines [4] (Figure 3.IV.32).

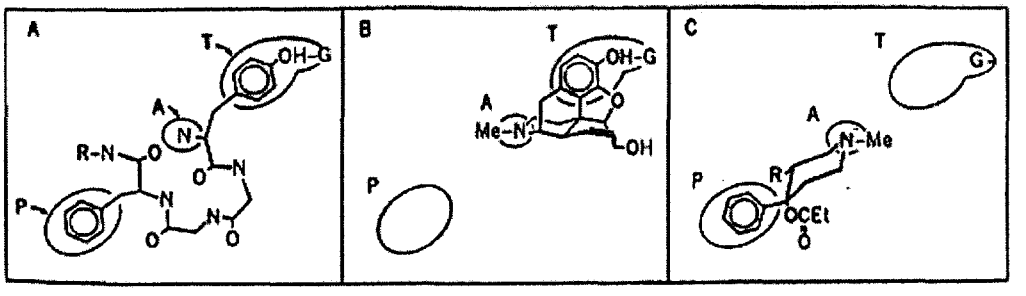


Figure 3.IV.32 : modèle bimodal de liaison au récepteur μ. A :liaison des enképhalines et endorphines, B liaison de la morphine, C liaison d'une phénylpipéridine [4].

Notre modèle a donc mis en évidence l'importance de la charge et du cycle pipéridinique ainsi qu'un groupement aromatique.

Nous avons également testé dans nos conditions sur mu(h), kappa(h) et delta(h) plusieurs composés commerciaux actifs sur mu ainsi que des produits ayant des caractéristiques structurales communes avec nos produits (Figure 3.IV.33, et Tableau 3.IV.17).

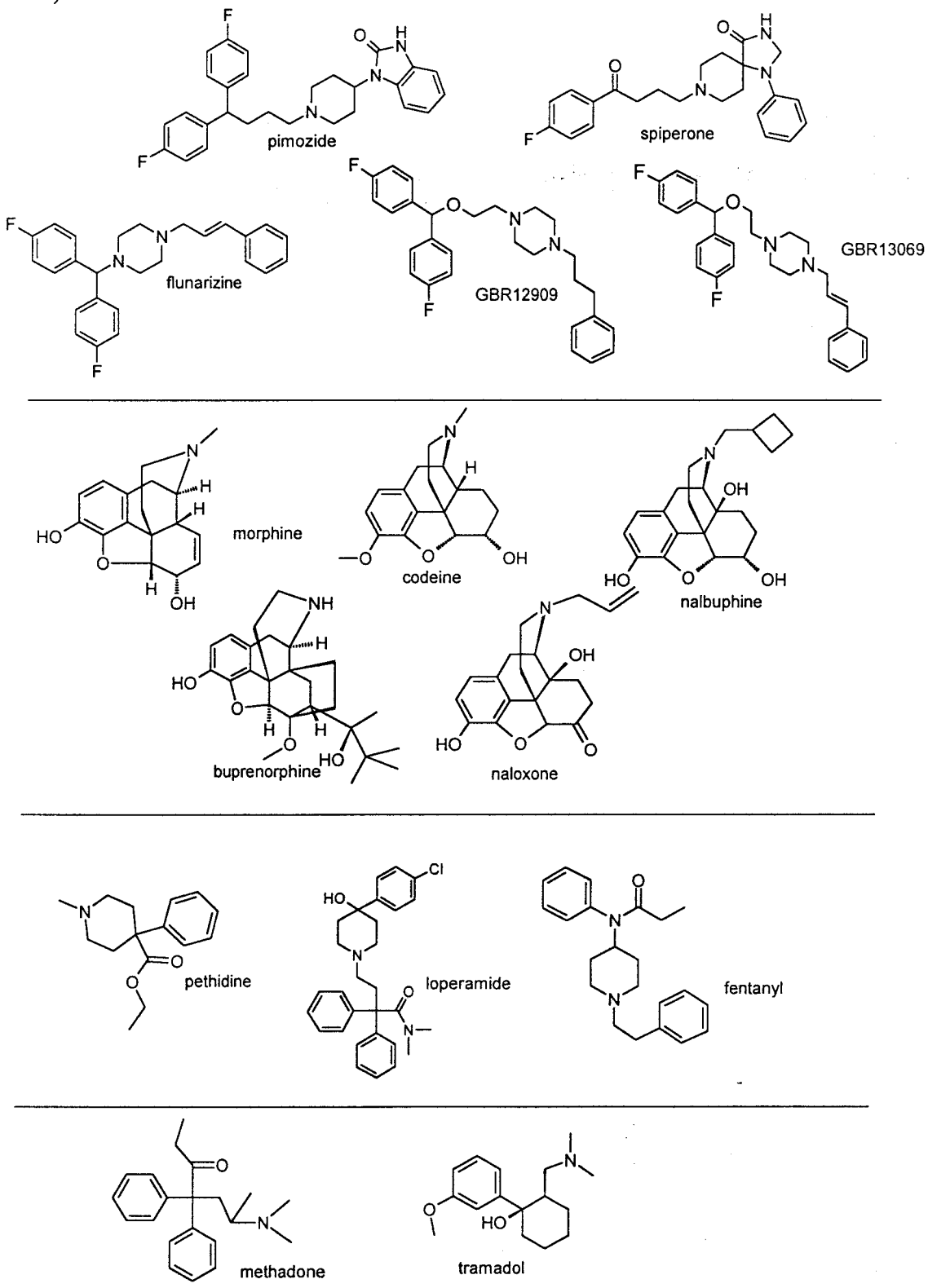


Figure 3.IV.33 : Composés commerciaux choisis.

#	Nom	μ (h)*	κ (h)**	δ (h)***
1	pimozide	107	1060	3210
2	spiperone	ND	1290	>30000
3	flunarizine	3520	4150	7160
4	GBR13069	1770	2820	>10000
5	GBR12909	2790	2240	>10000
6	morphine	1.5	ND	204
7	codeine	592	ND	>10000
8	nalbuphine	1.2	ND	249
9	buprenorphine	0.8	1.4	1.4
10	naloxone	2.6	1.9	137
11	pethidine	367	ND	>10000
12	loperamide	1.6	138	122
13	fentanyl	1.6	ND	310
14	methadone	4.7	536	847
15	tramadol	6400	>30000	NC

ND : non déterminé

Tableau 3.IV.17 : IC_{50} sur les récepteurs opiacés de 15 produits commerciaux.

Le coefficient de corrélation (r^2) IC_{50} prédite en fonction de l'IC_{50} expérimentale est de 0.82. De plus, nous avons utilisé les résultats d'IC_{50} des dérivés commerciaux afin de valider notre modèle QSAR. Dans ce cas r^2=0.61 (Figure 3.IV.34). Quelques composés sont en effet mal prédits.

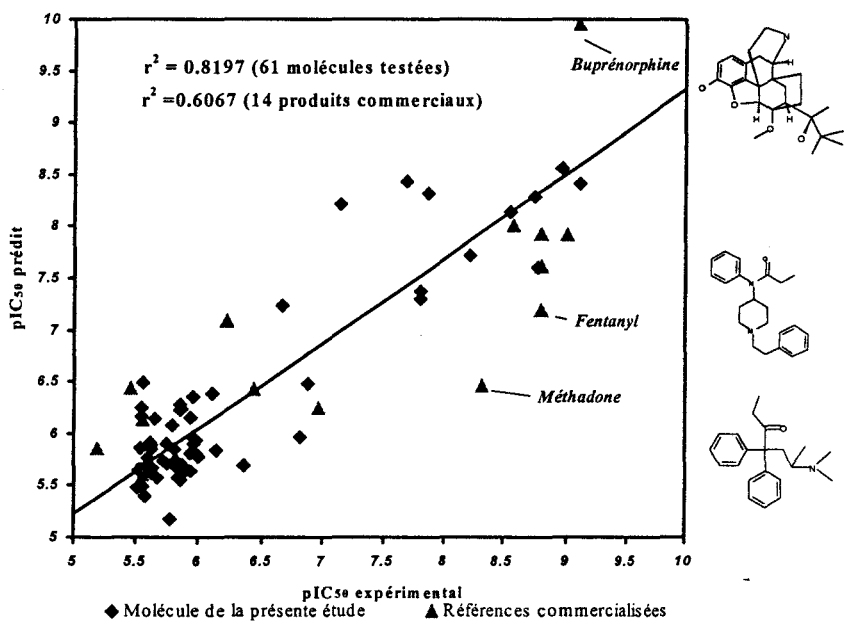


Figure 3.IV.34 : pIC50 prédite en fonction de pIC50 expérimentale pour les analogues synthétisés (carrés), pour les dérivés commerciaux (triangles).

La buprénorphine a été prédite plus active qu'elle ne l'est, et le fentanyl et la méthadone ont été prédits moins actifs qu'ils ne le sont. Il est surprenant que le fentanyl soit mal prédit par le modèle car il appartient, nous l'avons dit, à la classe des 4-anilino-pipéridines dont nos produits font partie. Cependant on peut remarquer qu'il porte un groupement phénéthyl alors que nos produits présentent un groupement benzyle. Il est

probable que la méthadone ait été mal prédite à cause de sa structure acyclique difficilement comparable à notre série, et d'un rapprochement important des deux noyaux aromatiques.

Dans cette série de composés commerciaux dont la plupart sont effectivement des médicaments (tous sauf la spiperone, les GBR12909 et GBR13069), plusieurs regroupements peuvent être faits. Nous avons d'abord voulu situer nos produits par rapports aux dérivés actifs sur les cibles opiacées. Parmi les produits choisis à cette fin, on distingue quatre grandes classes :

- Les dérivés morphiniques (morphine, naloxone, nalbuphine, codéine, buprénorphine)
- Les dérivés phényl-pipéridine (pethidine, loperamide)
- Les dérivés 4-anilidopipéridine (fentanyl)
- Les dérivés acycliques (methadone, tramadol)

L'ensemble de ces composés résultent d'une simplification progressive de la structure de la morphine pas suppression successive de cycles. Il a été rapidement montré que le groupement phénylpiperidine ou anilidopiperidine était essentiel pour l'activité d'analgésie centrale[4].

On peut remarquer que certains de nos produits ont des activités comparables aux meilleurs composés publiés. Nos produits sont par ailleurs (sauf à quelques exceptions près), peu sélectifs de mu et kappa. Certains produits commerciaux comme la buprénorphine et la naloxone possède ces caractéristiques.

Les autres composés choisis présentent des caractéristiques structurales communes avec l'un ou l'autre des composés actifs sur mu que nous avons mis en évidence. Deux d'entre-eux présentent un groupement 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one ou de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine commun avec les séries actives analogues du produit spécifique ***(95)*** : pimozide et spiperone. Quatre composés présentent un groupement 4,4'difluorobenzhydryl et une piperazine ou une pipéridine communs à ***(96)*** : flunarizine, pimozide, GBR13069, GBR12909.

La flunarizine ainsi que GBR13069 et GBR12909 présentent une partie cinnamyl-piperazine identique à celle de l'analogue de ***(96)*** le plus actif ***(129)***. On peut raisonnablement penser que la légère activité opiacée observée pour ces trois produits (1770nM à 3520nM) est due à la présence de ce groupement. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle, l'optimisation du composé ***(96)*** requiert la suppression d'un groupement méthylène du motif 4-benzhydryl-butyle. A pH 7.4 dans le tampon phosphate, l'ensemble des analogues de ***(96)*** possédant le motif benzhydryle ont montré une solubilité inférieure à 3µM. Ce résultat nous a surpris car ces produits possèdent tous une charge positive. Dans les mêmes conditions, la flunarizine a une solubilité inférieure à 1µM, comparable à celle de nos produits. Ces faibles valeurs peuvent être expliqués par la forte concentration du tampon (300mOsm). Il est intéressant de mentionner que la flunarizine a une solubilité de 50µM dans l'eau (Merck Index).

Il est intéressant de remarquer que le pimozide partage des groupements communs avec les deux produits que nous avons cherché à optimiser (Figure 3.IV.35). Le pimozide qui est un médicament antipsychotique, antagoniste du canal calcium, antagoniste D_2[17] et actif sur le canal sodium (type II_A)[18]a une IC_{50} de 107nM sur mu(h) (Tableau 3.IV.17). D'autres

« chimères » existent dans la littérature [19](Figure 3.IV.35). L'activité principale de ces produits est dopaminergique (déplacement de l'halopéridol).

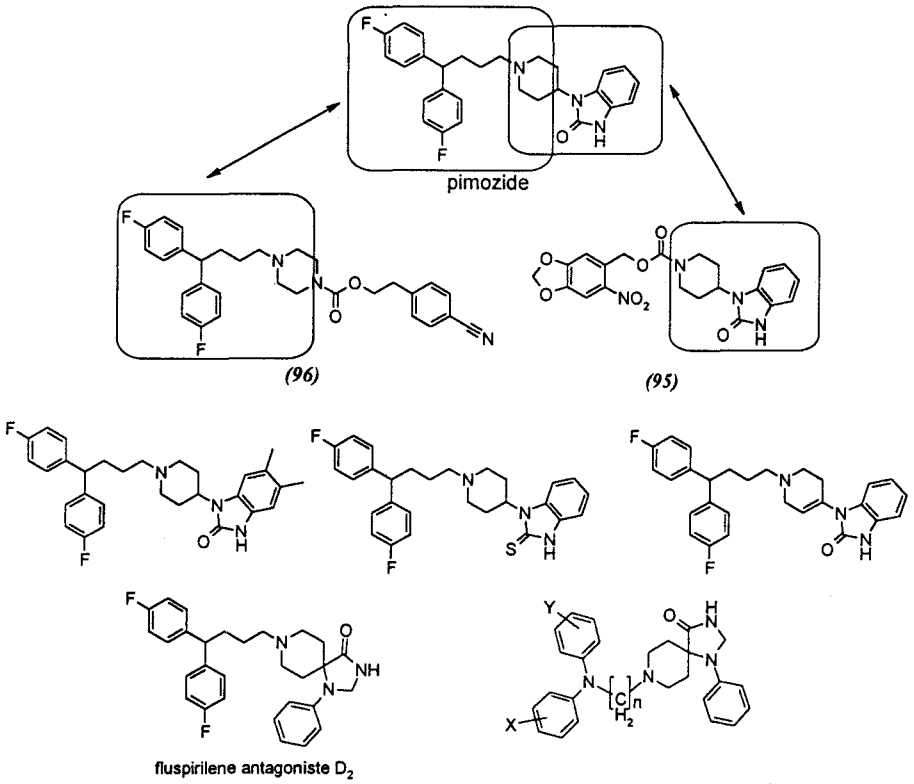


Figure 3.IV.35 : Le pimozide et les produits « chimères » [17],[18],[19].

Dans la littérature, d'autres structures partagent des caractéristiques structurales avec nos analogues. C'est le cas des produits présentés dans le tableau 3.IV.18.

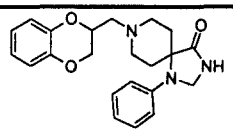
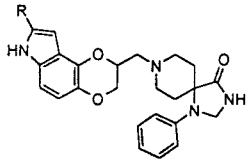
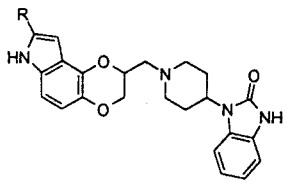
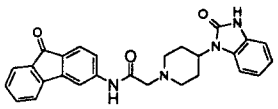
Entrée	*Structure*	*Série*	*Cible principale*	*Cible Secondaire*	*Réf.*
1		Spiroxatrine	D_2	$5HT_{1A}$	[20]
2		Indolodioxane	$5HT_{1A}$	D_2, opiacés (déplacement de l'étorphine)	[8]
3		Indolodioxane	$5HT_{1A}$	D_2, opiacés (déplacement de l'étorphine)	[8]
4			NPY_5		[21]

Tableau 3.IV.18 : Autres composés décrits présentant des caractéristiques structurales communes avec nos dérivés analogues de ***(95)***.

Parmi ces composés, les indolodioxanes sont très intéressants car ils montrent pour certains une activité opiacée (Entrées *2* et *3*, Tableau 3.IV.18).

Les diverses activités biologiques recensées parmi les composés structuralement proches des analogues que nous avons synthétisés permettent en partie de comprendre le profil pharmacologique de ces derniers.

3.IV.5. Profil pharmacologique.

Le profil pharmacologique est tout d'abord une aide à la conception des analogues de deuxième génération. Il permet de mieux focaliser, de regrouper les composés en familles, d'identifier les sous-structures responsables d'activités secondaires. Il est pour tout cela important de déterminer les IC_{50} correspondantes afin de relativiser les activités, et « d'étiqueter » les produits en fonction de l'activité la plus importante.

Les profils pharmacologiques permettent en outre d'enrichir la connaissance des relations structure-activité sur d'autres cibles que la cible sur laquelle on cherche à optimiser ; Ils permettent l'établissement d'une base de données.

Enfin, dans certains cas, c'est un profil pharmacologique précis et non pas une activité spécifique que l'on cherche à obtenir (action simultanée sur deux cibles).

L'un des objectifs de notre projet était d'évaluer dans quelle mesure les informations fournies par le profil pharmacologique peuvent être reliées aux structures chimiques des composés, et ceci étant vérifié, de déterminer comment ces informations pourraient nous aider à concevoir des analogues meilleurs (pas uniquement plus puissants) que les références. C'est avec cet objectif que des analogues à la fois d'un composé non spécifique et d'un composé spécifique ont été synthétisés. A l'aide des séries obtenues, il est possible de voir comment les altérations de structure et de pharmacophore réalisées par le chimiste médicinal peuvent modifier le profil pharmacologique. Dans cette étude, deux autres paramètres, plutôt reliés à la pharmacocinétique ont été inclus dans le profil (LogD et solubilité).

3.IV.5.1. Comparaison profil pharmacophorique et profil pharmacologique.

De même que les produits *(95)* et *(96)* que nous avons choisi d'optimiser ont été testés sur environ 73 cibles biologiques, un profil pharmacologique a été réalisé sur l'ensemble des analogues synthétisés et purifiés, à la concentration de 10μM. La totalité du profil pharmacologique est présentée en Annexe 3.

L'une des premières analyses des résultats obtenus sur les 44 produits profilés (plus les deux références) a été de déterminer comment d'une manière générale se corrèlent profil pharmacologique et profil de pharmacophore. Il semblait logique de supposer que des composés présentant une distribution spatiale d'éléments de pharmacophore similaire devaient montrer des profils d'activités similaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons calculé différents scores de similitude entre les analogues testés et les deux références *(95)* et *(96)* :

- Score de similitude de pharmacophore
- Score de similitude fonctionnelle

Le score de similitude de pharmacophore (cf. Chapitre 1) est défini comme la distance calculée entre les deux vecteurs caractérisant les molécules comparées. Dans le calcul de cette distance, les 21 dimensions (pour les 21 type de paires d'atomes) n'ont pas toutes la même importance. Les facteurs pondérant l'influence de ces différentes paires d'éléments de pharmacophore ont été choisis de manière à ce que les distances intermoléculaires permettent de discriminer parmi un set de molécules de référence, les différents groupes d'activités biologiques présents[16]. Les facteurs obtenus sont les suivants :

- Aliphatique (hydrophobe) : 0.45
- Aromatique : 0.63
- Accepteur de liaison hydrogène : 0.36
- Donneur de liaison hydrogène : 0.32
- Cation : 1.00
- Anion : 0.40

On peut remarquer que les paires de pharmacophores impliquant une charge (positive ou négative) ont une importance prépondérante dans le calcul de la distance. Les facteurs déterminés par optimisation automatique reflètent assez bien l'intuition du chimiste médicinal quant à l'importance générale des différents éléments de pharmacophore, qui est fonction de l'énergie d'interaction avec le récepteur. Il faut bien sûr garder à l'esprit qu'au cas par cas ces importances relatives peuvent être inversées.

La distance fonctionnelle ou pharmacologique entre deux molécules a été calculée entre les 2 vecteurs correspondant aux deux profils pharmacologiques obtenus sur les 73 récepteurs sélectionnés, en tenant compte de la variabilité inter-expérimentale et de la non-linéarité du signal de l'expérience de liaison.

Dans ce profil pharmacologique 36% des récepteurs sont les récepteurs de ligands naturels à charge nette positive de faible poids moléculaire (Figure 3.IV.36).

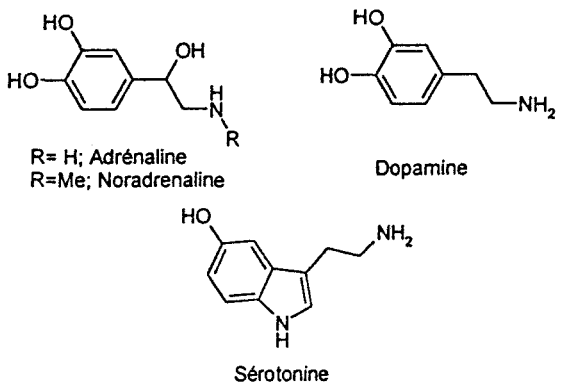


Figure 3.IV.36 : Ligands naturels.

A peu près 70% des récepteurs du profil sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G, apparentés à la Rhodopsine. Environ 30% sont des canaux ioniques ou des récepteurs également à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G, mais apparentés au récepteur de la calcitonine [10], ayant un mode de liaison différent de ceux apparentés à la Rhodopsine (ex. VIP-R, PACAP-R, CGRP,...).

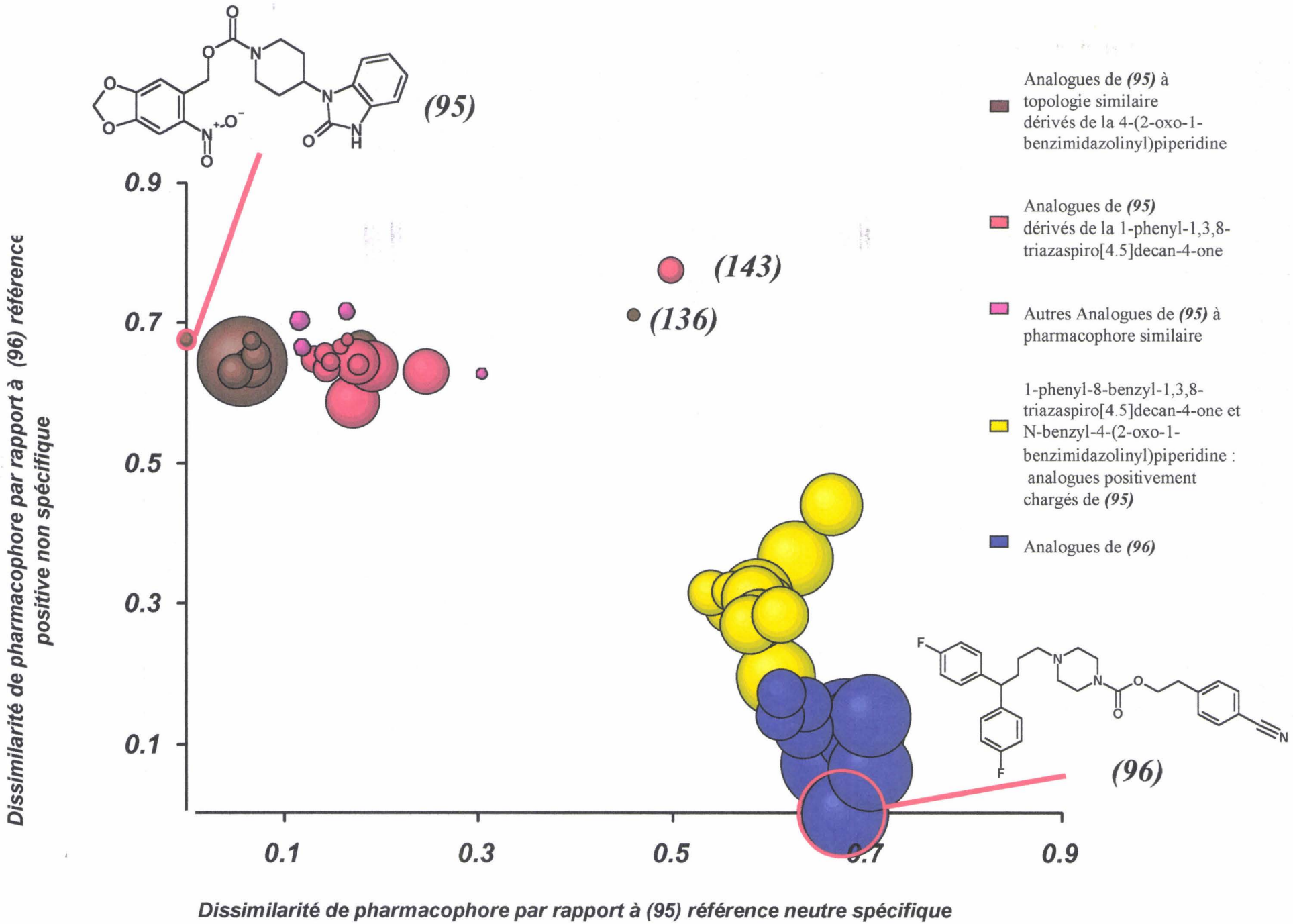


Figure 3 IV 37

Dans la figure 3.IV.37, chaque analogue est représenté par un disque. La fonction discontinue suivante a été employée pour calculer la taille de ce disque, fonction des pourcentages d'inhibition obtenus sur chacun des récepteurs du profil pharmacologique :

$$\text{Surface des disques} = (N_{<50\%}*0 + (N_{50\% < \% << 80\%}*0.5) + (N_{>80\%}*1)/73.$$

Ainsi plus un composé est spécifique, plus la taille du disque correspondante est petite, et inversement. La métrique introduite accorde plus de poids aux forts pourcentage d'inhibition. Il est intéressant de remarquer que la métrique employée icine tient pas comptge de la puissance sur la cible visée.

En abscisse est représentée la similarité de pharmacophore des molécules avec le produit spécifique ***(95)***. En ordonnée est représentée la similarité de pharmacophore des molécules avec le produit non-spécifique ***(96)***. Ainsi la dissimilarité de ***(95)*** par rapport à elle-même est nulle (abscisse = 0) et sa dissimilarité par rapport à ***(96)*** est grande (ordonnée = 0.7).

On peut tout d'abord remarquer qu'il n'y a pas de disques dans la « zone interdite » où les abscisses et ordonnées sont simultanément inférieures à 0.3, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de molécules présentant un pharmacophore à la fois proche de ***(95)*** (produit neutre) et ***(96)*** (produit chargé).

Les analogues du composé non-spécifique ***(96)*** sont représentés en bleu. Ils présentent tous un pharmacophore similaire à ***(96)*** (dissimilarité inférieure à 0.2), et dissimilaire à ***(95)*** (dissimilarité = 0.7). La surface des disques est relativement grande ce qui signifie que ces analogues sont peu spécifiques.

Les autres disques représentent des analogues du composé ***(95)***. Globalement, à quelques exceptions près que nous discuterons, les analogues non chargés positivement présentent un pharmacophore similaire à ***(95)*** (dissimilarité inférieure à 0.3), et dissimilaire à ***(96)*** (dissimilarité = 0.7). L'analogie de pharmacophore entre les dérivés de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine (série marron) et les dérivés de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one (série rouge) est ainsi illustrée. De plus, la surface des disques est relativement petite, à une exception près, indiquant que ces analogues sont assez spécifiques. Trois analogues sont des exceptions à l'une ou l'autre de ces considérations. Le premier est la molécule ***(134)*** (Figure 3.IV.38) qui est très peu spécifique (grande sphère). Cette molécule présente en effet un pourcentage d'inhibition supérieur à 80% sur les cibles suivantes : A_1, A_3, α_1, NE recapture, BZD périphérique, D_1, D_5, ML_1, NK_2, μ, κ, δ, $5HT_{1A}$, $5HT_{1B}$, V_{1A}, canal chlore.

La deuxième exception concerne le dérivé ***(136)*** (Figure 3.IV.38) dont le pharmacophore est dissimilaire de celui de ***(95)*** (dissimilarité=0.45). Cette dissimilarité est due à l'ouverture et du raccourcissement du cycle piperidine de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine. Cependant ce composé reste très dissimilaire de ***(96)*** d'où sa position en haut et à droite dans la figure 3.IV.37.

Enfin, le dérivé ***(143)*** (Figure 3.IV.38) présente également un pharmacophore très dissimilaire des deux références ***(95)*** et ***(96)***. Cela a dû à sa charge négative.

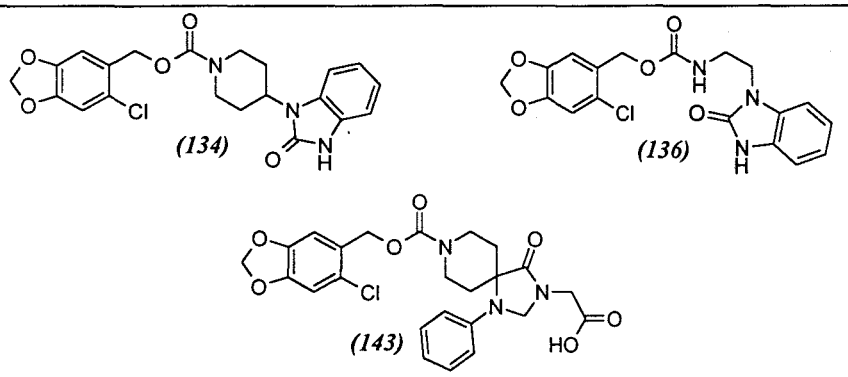


Figure 3.IV.38 : Analogues de *(95)* faisant exception à la règle énoncée précédemment.

La série des analogues de *(95)* présentant une charge positive (série jaune) est très dissimilaire de *(95)* qui est neutre (dissimilarité = 0.6). Par ailleurs, l'introduction d'une charge positive sur la pipéridine de ces analogues les rapproche de *(96)* qui est positivement chargé (dissimilarité comprise entre 0.25 et 0.5). Egalement ces analogues chargés sont peu spécifiques (grandes sphères). L'introduction de cette charge positive contribue beaucoup à l'interaction de ces molécules avec les autres récepteurs de type Rhodopsine présents dans le profil.

En conclusion, des changements pharmacophoriques importants (ajouts ou suppression d'une charge par exemple), peuvent atténuer de manière importante les profils pharmacologiques. Ces types de changements pharmacophoriques, réalisés par le chimiste médicinal, sont les plus intéressants car il permettent d'explorer le mode de liaison d'une série chimique à un récepteur, de construire des tables SAR et de réaliser des modèles pharmacophoriques précis. A pharmacophore similaire, dans une série chimique, on a globalement la même spécificité. Cependant, il est important de souligner que des changements mineurs de pharmacophore (méthyle, éthyle, ...) peuvent induire des changements particuliers dans le profil pharmacologique, tout en gardant l'aspect général de celui-ci. En outre, dans certains cas un changement mineur (Cl en NO_2) altère profondément le profil sans changer l'activité sur une cible.

En conclusion, on constate que les analogues du composé spécifique, neutre qui présente une distribution de pharmacophore similaire sont dans une large mesure eux aussi spécifiques. En revanche, dès que le pharmacophore est profondément altéré, notamment par l'introduction d'une charge positive, les composés correspondant deviennent moins spécifiques. Ceci est relativement peu étonnant car le profil comme on l'a écrit, contient plus de 30% de récepteurs liant des ligands naturels chargés positivement. Ainsi l'introduction d'une charge négative (altération théoriquement aussi importante que l'introduction d'une charge positive) a une influence beaucoup moins grande sur le profil.

Nous proposons ici deux définitions de la spécificité d'un produit. Un produit spécifique :

1 : présente un profil de pourcentage d'inhibition faible pour la majorité des récepteurs.

2 : présente un profil de puissances relatives faible pour la majorité des récepteurs par rapport à la cible visée.

Le plus souvent le chimiste médicinal considère qu'un produit est spécifique d'une cible A par rapport à une cible B s'il possède une IC_{50} 100 fois plus petite sur A. Malgré la

miniaturisation des tests, l'évaluation des IC_{50} sur un panel de 73 récepteurs reste très cher. En réalisant le profil par accumulation des pourcentages d'inhibition à la concentration de 10μM, on réalise alors une « coupe » du profil d'IC_{50}.

Nous l'avons vu précédemment, le pourcentage d'inhibition à la concentration de 10μM, ne permet pas de prédire la valeur de l'IC_{50}, mais plutôt de faire une distinction entre les composés dont l'IC_{50} est supérieure à 1μM et ceux dont l'IC_{50} est inférieure à 1μM. Nous avons donc sélectionné dans le profil pharmacologique de pourcentage d'inhibition, les « points » pour lesquels le pourcentage d'inhibition était supérieur ou égal à 80%, et soumis ces « points » à une IC_{50}. L'hypothèse faite ici est qu'un composé ayant un pourcentage d'inhibition inférieur à 80% à 10μM a peu de chances d'être submicromolaire. La figure 3.IV.38 montre la corrélation pIC50=f(%d'inhibition à 10μM) dans le cas du profil pharmacologique réalisé sur les composés ***(95)*** et ***(96)*** et leurs analogues respectifs, toutes cibles biologiques confondues. La dispersion est plus importante que dans le cas du criblage sur μ car il s'agit ici de données provenant de plusieurs tests avec notamment des ligands de référence de puissance variable.

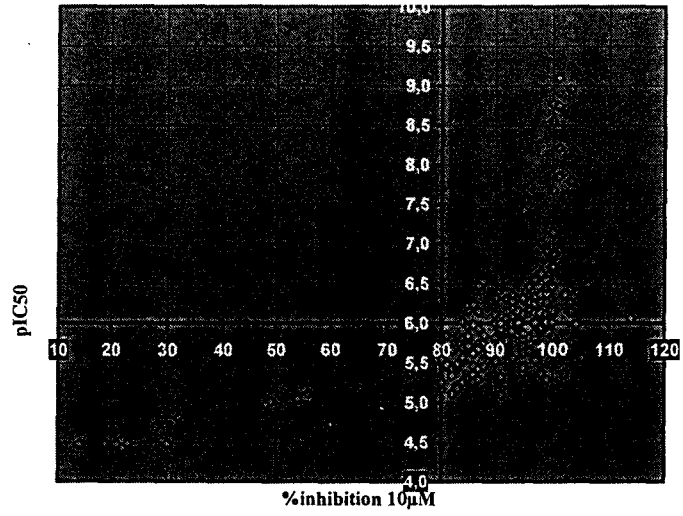


Figure 3.IV.38 : Corrélation pIC50=f(%inhibition à 10μM) pour l'HTP des analogues de ***(96)*** et ***(95)***.

D'après ces résultats, la probabilité d'avoir une IC_{50} inférieure à 1μM lorsque le pourcentage d'inhibition à 10μM est compris entre 80% et 90%, est de 0,10.

En Annexe 4, se trouve l'ensemble des IC_{50} des analogues de ***(95)*** et ***(96)***, sur les cibles ayant donné un pourcentage d'inhibition supérieur à 80% à la concentration de10μM. La Figure 3.IV.39 permet déjà de remarquer que les analogues du composé non spécifique ainsi que les analogues basiques du composé spécifique présentes des activités submicromolaires sur de nombreux récepteurs. Ce profil d'IC_{50} va être analysé point par point dans la partie qui suit.

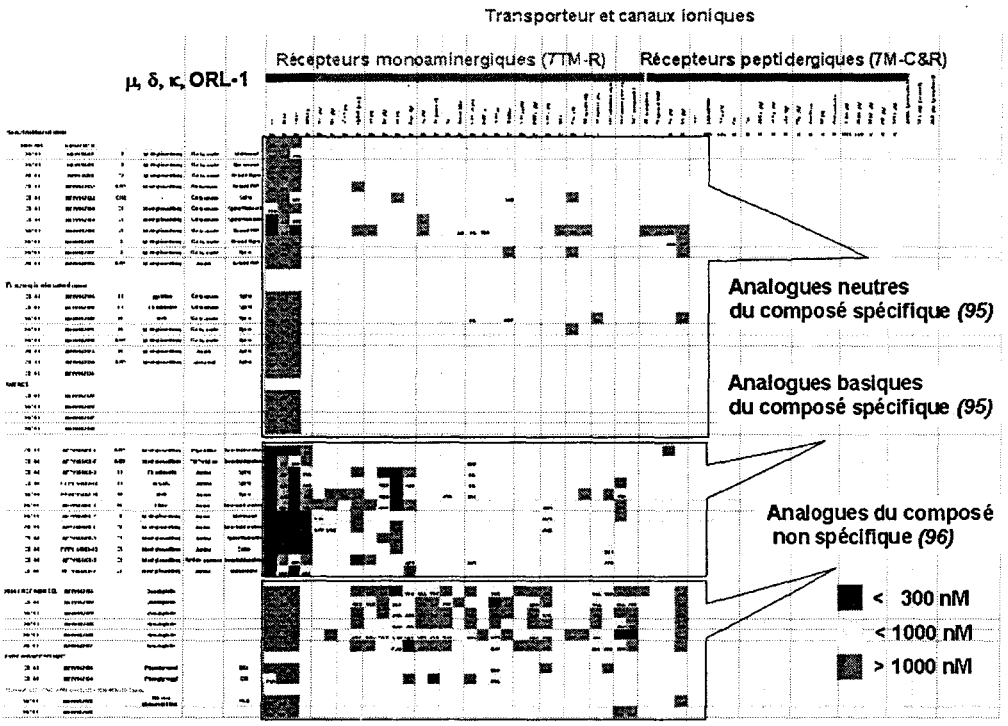


Figure 3.IV.39 : Ensemble des IC_{50} sur les récepteurs du profil pour les composés ayant donné des % d'inhibition supérieurs à 80% à 10μM (Annexe 4)

3.IV.5.2. Etudes de relation structure profil pharmacologique pour le produit non-spécifique *(96)* et ses analogues.

A. Résultats.

Le tableau 3.IV.19 rassemble les profils obtenus pour les analogues de *(96)* et la figure 3.IV.40 en rappelle les structures.

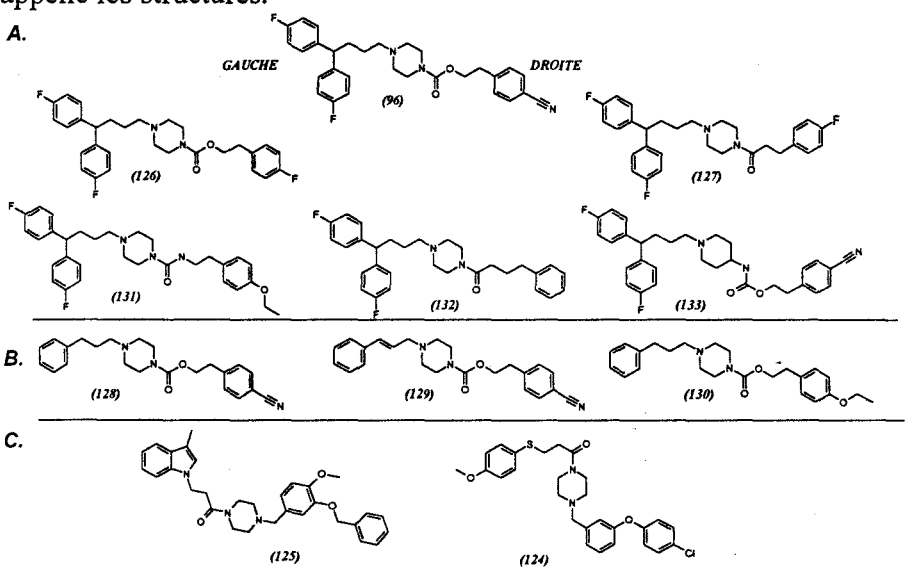


Figure 3.IV.40 : Structures de *(96)* et de ses analogues.

Récepteur		*Analogues de (96) à topologie constante de type benzhydryle (A.)*					*Analogues de (96) à topologie constante de type monoaromatique (B.)*			*Analogues de (96) à pharmacophore constant (C.)*	
	(96)	*(126)*	*(127)*	*(131)*	*(132)*	*(133)*	*(128)*	*(129)*	*(130)*	*(124)*	*(125)*
mu *(h)*	1370	3500	4360	2240	5140	6360	792	257	1400		3570
delta *(h)*				4410	7270	9760					
kappa *(h)*	8170	4230	3050	2780	2610	2160			9610	6210	3580
A_3 *(h)*	3480	4210	5080	4180	2460	5980				3750	
M_2 *(h)*						2210					
α_1 (n.s.)	1100	1640	1170	993	2190	417					
D1 *(h)*	1120			967	2750	376					
D_2 *(h)*	2240	2620		2890		551					
D_3 *(h)*	195	456	977	341	758	538					
$D_{4.4}$ *(h)*	776	338	716		280	543	1410				
D_5 *(h)*	988	1550	3020	1450	1860	513					
H_1 (central)	795	1280	1660	1820	1930	454	280	ND			
H_2	1030	1250	1340	757	1980	368		ND			
NK_2 *(h)*				5180							
5-HT_{1A} *(h)*	1020	1140	1110			985	1570				
5-HT_{1B}						3580					
5-HT_{2A}	715	1060	1030	231	950	683	854		980		
5-HT_{2C}		3450		1420		2760					
5-HT_{5A}*(h)*	3380				5520						
5-HT_6 *(h)*	2280	1530	1350	800	7780	427					
5-HT_7 *(h)*	1440	726	1170	2040	2130	998			1430		
V_{1a} *(h)*						3650					
NE recapture *(h)*						1140					
DA recapture *(h)*	996	2000	1280	994	954	781					
σ (n.s.)	702				482			ND	2170		
Canal Na (site 2)	1350	1800	737	438	539	165					1480
Ca2+ verapamil L	1720	2730	4300	860	2350	284					4840
Cl^- ionophore	3520										

ND : non déterminé mais correspondant à un pourcentage d'inhibition à la concentration de 10µM supérieur à 80% ; Les cases blanches correspondent à des IC_{50}>10µM ou %d'inhibition inférieur à 80% à la concentration de 10µM soit une probabilité d'avoir une IC_{50} submiccromolaire<0.1.

Tableau 3.IV.19 : IC_{50} en nM des produits sur les récepteurs correspondant à un pourcentage d'inhibition supérieur à 80% à la concentration de 10µM.

B. Optimisation activité-spécificité sur µ

Aucun des changements réalisés conservant la partie benzhydryle de ***(96)*** n'ont permis d'augmenter l'activité sur le récepteur µ. Les composés ***(96)***, ***(126)***, ***(127)*** et ***(131)*** à ***(133)***, constituent en revanche une série dopaminergique ou sérotoninergique. Parmi les produits commerciaux présentant une entité type benzhydryle ou 4-benzhydryl-butyle, les activités sont diverses. La flunarizine lie les canaux Ca^{2+} et Na^+ (IC_{50} = 420nM), le pimozide est un antagoniste D_2 et est également actif sur le canal Na^+ (IC_{50} = 340nM) tandis que GBR13069 et GBR12909 sont des ligands du récepteur à la recapture de dopamine. Les activités « parasites » de nos produits s'expliquent donc par la présence du groupement benzhydryle. Ainsi nos analogues présentent une activité sur le canal Na^+ (de 165nM pour ***(133)*** à 1800nM pour ***(126)***) qui disparaît totalement dans les composés mono-aromatiques. Egalement, nos analogues présentent un pharmacophore Ar-(NR)-(CH_2)n-NR_1R_2 décrit par Staub comme étant le pharmacophore histaminergique [22]. Ceci explique ainsi les activités histaminergiques de nos composés. Le composé ***(133)***, qui résulte du remplacement de la piperazine présente dans ***(96)*** par une amino-piperidine, a une affinité accrue pour l'ensemble des récepteurs

monoaminergiques. Cette moindre spécificité est sans doute due à la flexibilité accrue de la molécule et à l'introduction d'un donneur de liaison hydrogène. Les transformations de la liaison carbamate en une fonction amide qui remplace un atome d'O (accepteur de liaison hydrogène) par un atome de C diminue l'activité sur ces cibles.

A l'inverse, la réduction de la chaîne alkyle couplée à la suppression d'un cycle améliore la spécificité sur le récepteur μ, car l'activité sur cette cible augmente alors que les autres cibles ne sont plus touchées (***(128)*** à ***(130)***, Tableau 3.IV.19). Cependant il reste pour quelques produits une activité histaminergique résiduelle qui semble corrélée à la présence d'un substituant -CN. En effet, l'analogue ***(130)*** porteur d'un substituant –OEt à la place d'un groupement –CN ne présente pas cette activité histaminergique résiduelle. Il est cependant 5 fois moins actif que ***(129)*** sur le récepteur μ et 2 fois moins actif que ***(128)***.

En conclusion, dans le cas où l'on souhaiterait poursuivre cette série chimique il conviendrait alors pour assurer à la fois l'activité μ, et la spécificité de remplir les conditions suivantes :

- Introduction d'une rigidité supplémentaire à gauche (type double liaison).
- Distance 4 liaisons entre le cycle aromatique de gauche et la charge positive, couplée ou non à la suppression d'un cycle aromatique.
- Distance 5 liaisons entre le cycle aromatique de droite et le charge positive à respecter.
- Présence d'un substituant en para à droite souhaitable (compromis entre CN qui décroît la spécificité (activité histaminergique) et OEt qui diminue l'activité sur le récepteur μ)

C. Mise en évidence de profils intéressants : (96) et (132).

De nombreux produits portant le groupement benzhydryle sont décrits dans la littérature comme ayant une activité dopaminergique. En fait, le composé ***(96)*** est très actif sur D_3 (IC_{50}=195nM).

Les récepteurs dopaminergiques étaient classée jusqu'à il y a peu en 2 types : D_1 et D_2. les trois autres types de récepteur ont été découverts récemment, et D_5 ressemble à D_1, tandis que D_3 et D_4 ressemblent à D_2. Les maladies associées au récepteur D_2 sont entre autres la schizophrénie et d'autres troubles psychotiques [23]. Il est connu que l'administration prolongée de composés neuroleptiques peut donner lieu à des effets secondaires extrapyramidaux [24],[25]. Cependant des composés neuroleptiques, dits atypiques présentent beaucoup moins d'effets secondaires pyramidaux. L'ensemble des composés neuroleptiques classiques ou atypiques actifs sur D_2, ont été testés sur D_3 et D_4 dès la découverte de ces deux récepteurs [25]. Ces composés se lient en général à D_2, D_3 et D_4 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. De nombreuses observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle le soulagement des psychoses par les neuroleptiques serait dû à leur action antagoniste de D_3 ou D_4, alors que les dysfonctionnements moteurs observés lors de l'utilisation à long terme des neuroleptiques classiques seraient dus à l'augmentation du nombre de récepteurs D_2 dans le stratium[23]. Il semble donc intéressant actuellement de développer des composés sélectifs D_3. Le composé ***(96)*** semble montrer une certaine sélectivité pour D_3 (195nM) par rapport à $D_{4,4}$ (776nM) et D_2 (2240nM). L'optimisation en ce sens aboutirait peut-être à l'obtention d'un composé sélectif D_3 intéressant.

Un seul analogue présente une affinité submicromolaire pour le récepteur σ : ***(132)*** IC_{50} = 482nM. Comme de nombreux neuroleptiques actifs sur σ (butyrophénones), il présente

une meilleure affinité sur un récepteur dopaminergique $D_{4,4}$ (IC_{50} = 280nM). Glennon et coll. ont montré que les 4-phényl-pipéridines présentent une affinité 6 fois plus importante pour σ que les 1-phénylpipérazines correspondantes [26]. Le changement 4-oxycarbonyl-piperazine en 4-oxycarbonylpiperidine dans le composé ***(132)*** permettrait peut-être d'inverser la sélectivité $D_{4,4}$ / σ.

3.IV.5.3. Etudes de relation structure-profil pharmacologique pour le produit spécifique *(95)* et ses analogues.

A. Optimisation activité-spécificité sur μ

Les analogues du composé spécifique ***(95)*** se divisent en deux catégories : les composés neutres (carbamates, amides, urées) et les analogues chargés positivement.

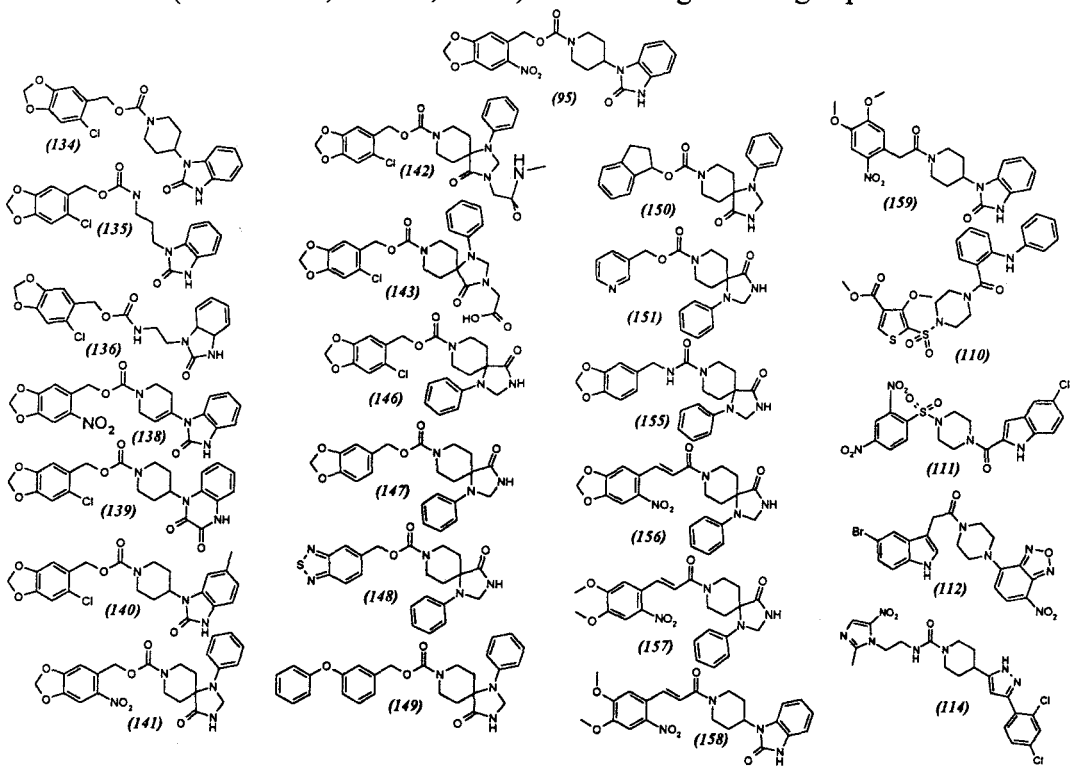


Figure 3.IV.41 : Structure de ***(95)*** et de ses analogues neutres.

Généralement, les analogues neutres (Figure 3.IV.41) présentent un pharmacophore moins « riche », peu actif sur le récepteur μ et sur les autres cibles du profil pharmacologique. Lorsque l'activité sur μ est présente, elle est accompagnée d'activités résiduelles sur d'autres cibles (***(134)*** et ***(142)***). L'ajout d'un substituant plus hydrophile à droite (***(142,*** IC_{50}=152nM) permet sans perdre l'activité sur μ par rapport au composé le plus actif dans cette série (***(134,*** IC_{50}=133nM) d'éviter de lier certaines cibles.

Les récepteurs touchés par les analogues neutres sont les mêmes globalement que ceux touchés par les analogues chargés positivement mais avec de plus faibles activités. Certains récepteurs cependant ne lient que les analogues neutres. C'est le cas de A_1 (***(135),*** IC_{50}=344nM), $5HT_{1B}$, $5HT_{2C}$, V_{1a}, canal chlorure, BZR périphérique.

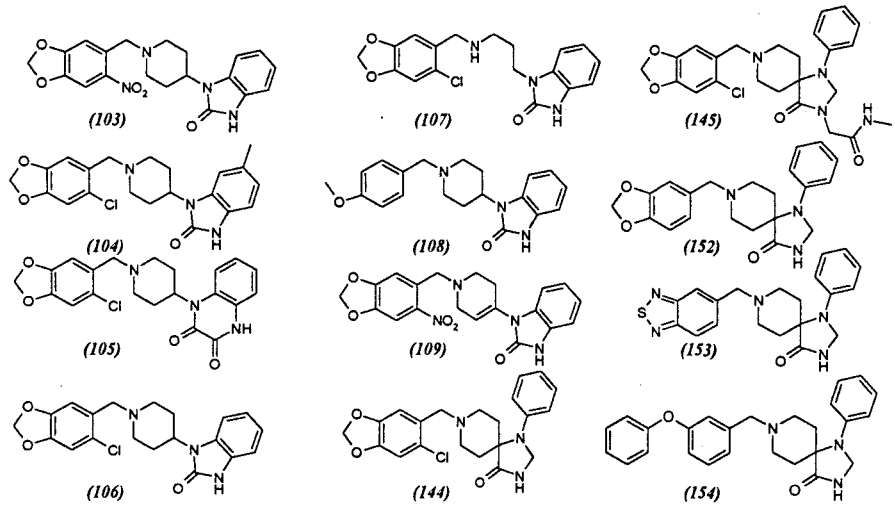


Figure 3.IV.42 : Structures des analogues chargés positivement.

Les analogues chargés (Figure 3.IV.42) présentent de nombreuses activités micromolaires et sub-micromolaires. Ceci n'est guère étonnant puisque la charge créée peut être considérée comme l'élément de pharmacophore commun aux récepteurs aux amines biogènes majoritaires dans ce profil. Cependant, ces analogues restent réellement plus actifs sur les cibles opiacées que sur les autres cibles. A cette activité sur μ, κ et δ, s'ajoute pour la première fois ici une activité non négligeable sur ORL-1 à mettre en relation avec la parenté entre les récepteurs ORL-1 et μ, κ et δ.

(1) Influence du substituant en ortho :

Parmi les analogues chargés positivement, un classement peut être réalisé en fonction de la partie gauche de la molécule. Ainsi la présence d'un groupement substituant en ortho sur le benzyl permet d'être plus spécifique. L' analogue ***(106)*** présentant un groupement $-NO_2$ en cette position est très spécifique par rapport aux analogues non substitués en cette position (***(108)***, ***(152)*** à ***(154)***) qui présentent entre-autres tous les quatre une activité sur D_3. L'augmentation de la spécificité des produits par la présence de substituants en ortho étaient également observable dans la série des analogues non chargés (***(147)***, ***(146)*** et ***(141)***). Les analogues dérivés du 2-chloro, 4,5-méthylènedioxy-benzyl présentent à la fois une moins bonne spécificité que les composés 2-nitro-substitués mais également une moins bonne sélectivité sur les sous-types μ, κ et δ et même ORL-1.

(2) Effet d'un méthyle :

En ce qui concerne l'influence de la partie droite, l'ajout d'un méthyle sur la benzimidazolone fait disparaître des activités secondaires comme M_2, α_1 et D_3 (***(104)*** et ***(106)***). Le même type de variation de la spécificité était également observable dans une moindre mesure dans la série carbamate (***(134)*** et ***(140)***). De plus la solubilité des dérivé porteurs du groupement méthyle est moins bonne alors que le LogD diminue.

(3) Quinoxaline-Benzimidazolone :

Le remplacement de la benzimidazolone par une quinoxaline permet de gagner en sélectivité sur δ, mais également en spécificité car toutes les activités secondaires

disparaissent (***(104)*** et ***(105)***). La solubilité de la quinoxaline est moins bonne malgré un logD inférieur.

(4) Isostérie benzothiazole-benzomethylenedioxy :

Il est intéressant de remarquer que l'isostérie thiadiazole méthylènedioxy ***(153)*** et ***(152)*** est applicable à toutes les cibles du profil confirmant ainsi la validité de l'hypothèse avancée par Anzali et coll.. Le groupement benzothiadiazole semble donc être un isostère « universel » du groupement benzomethylènedioxole.

(5) Isostérie 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine et 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one:

Par contre, l'isostérie mise en évidence par le logiciel de modélisation moléculaire et citée à de nombreuses reprises dans la littérature entre la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine et la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one s'avère moins générale puisque des différentes activités entre (***(106)*** et ***(144)***) sont observées sur M_1, M_2, $5HT_7$ et recapture de DA. Cette isostérie partielle est cependant « parfaite » sur les opiacés.

B. Mise en évidence de profils intéressants : (135), (153).

L'analogue ***(153)*** porteur du groupement thiadiazole est équipotent sur μ (IC_{50}=21nM) et D_3 (IC_{50}=29nM).

Parmi les analogues neutres, ***(135)*** présente une faible activité sur les récepteurs opiacés ($IC_{50}(\mu)$=8900nM) mais une activité intéressante sur A_1 ($IC_{50}(A_1)$=344nM). Il est intéressant de noter que la morphine augmente la libération d'adénosine, suggérant ainsi un rôle potentiel de l'adénosine dans l'analgésie. Des dérivés de l'adénosine ont d'ailleurs montré une activité antinociceptive in vivo corrélée avec une affinité de liaison à A_1[27]. Des activités faibles sur deux cibles impliquées dans la nociception comme μ et A1, pourraient peut-être donner lieu à une activité biologique analgésique intéressante (sous réserve de connaître les effets fonctionnels des produits). Dans ce cadre, le composé***(135)*** serait un bon point de départ. On peut rappeler ici que le tramadol, analgésique récemment mis sur le marché aux Etats-Unis après quinze ans de commercialisation en Europe cumule des activités inhibitrices de recapture de monoamines (0.8 à 1μM), ainsi qu'une activité morphinique faible (2μM)[28].

3.IV.6. Conclusion.

Dans cette partie 3.IV. qui est une étude de cas sur le récepteur μ, nous avons voulu évaluer les liens entre les structures et le profil pharmacologique. Nous avons montré que les composés présentant une distribution spatiale d'éléments de pharmacophore similaire présentent globalement des profils d'activité similaires. Par contre des modifications « importantes » du pharmacophore (ajout ou suppression de charges, variation de la flexibilité,...) peuvent engendrer des variations majeures du profil pharmacologique. De même, des variations mineures du pharmacophore peuvent changer fortement le profil.

L'ensemble des résultats obtenus ont montré que la série des analogues de ***(96)***, produit de référence non spécifique, sont plutôt des dérivés dopaminergiques. Cette activité semble être en partie conférée par le groupement benzhydryl-butyl-piperazine. Les analogues de type phényl-propyl-pipérazine présentent une meilleure activité sur μ et une meilleure spécificité, les rendant plus aptes à être de bons candidats.

Dans le cas des dérivés de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine ou de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one, les carbamates se sont révélés très spécifiques mais relativement peu actifs sur μ. L'introduction d'une charge a considérablement augmenté l'affinité sur les cibles opiacées mais également dans une moindre mesure l'affinité à d'autres récepteurs comme D_3. Différencier les activités doparminergiques et opiacées reste donc une question cruciale.

Leysen et coll. ont tenté en 1977 de différentier la liaison aux récepteurs opiacés et au récepteur neuroleptique avec l'étude de 6 grandes classes de dérivés dont des dérivés de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine ou de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one[29].

L'une des séries explorées est celle des dérivés du pimozide. Le tableau 3.IV.20 regroupe les résultats obtenus par Leysen et coll. pour cette série.

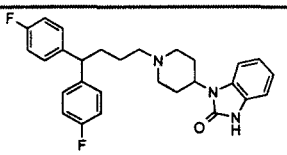
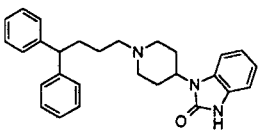
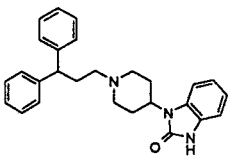
Entrée	Structures	IC_{50} (déplacement de ^3H fentanyl) nM	IC_{50} (déplacement de ^3H halopéridol) nM
1		540	7.9
2		85	15
3		4	1900

Tableau 3.IV.20 : Résultats obtenus avec des dérivés du pimozide.

Leysen et coll. ont ainsi mis en évidence que les dérivés 3,3-diphényl propyl ont une très bonne affinité pour le récepteur aux opiacés et que les dérivés 4,4-diphényl butyl sont actifs dans le test neuroleptique. Ainsi en raccourcissant la chaîne d'un groupement méthylène, l'activité neuroleptique peut être complètement abolie. On peut remarquer également que la liaison au récepteur neuroleptique est augmentée avec la substitution avec des atomes de fluor sur le groupement benzhydryle (Entrées ***1*** et ***2***, Tableau 3.IV.20). Ceci corrobore les hypothèses que nous avons formulées dans la série des analogues de ***(96)***.

Des dérivés décrits dans les brevets de Janssen ont été testés » (Tableau 3.IV.21). Ceux-ci sont à mettre directement en relation avec les amines tertiaires que nous avons synthétisées.

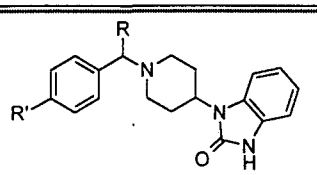
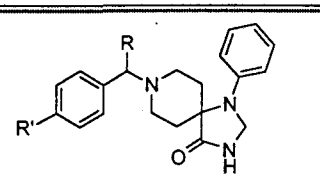
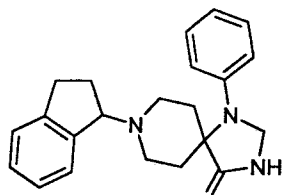
						
	R	R'	Opiacé	Neuroleptique	Opiacé	Neuroleptique
1	H	H	150	440	130	300
2	CH_3	H	6.8	>100	11	>100
3	CH_3	Cl	5.4	230	3.8	61
4	CH_3	F	1.6	370	9.5	>100
5	CH_3	CH_3	6.9	330	2.9	>100

Tableau 3.IV.21 : IC_{50} obtenues sur les dérivés décrits dans les brevets de Janssen.

Ces dérivés sont assez spécifiques des récepteurs opiacés par rapport aux récepteurs neuroleptiques. De plus, on peut remarquer que le groupement méthyle en α de l'amine est essentiel à l'activité.

Bien que les dérivés auxquels nous nous sommes intéressés sont couverts par la formule de Markush des brevets Janssen, nous avons pu montrer l'influence des substituants sur le cycle benzénique et sur la partie benzimidazolone ou spirodecanone, sur les activités biologiques. Ainsi, des changements mineurs peuvent impliquer des changements majeurs dans l'activité sur la puissance sur μ et/ou sur la spécificité.

Nous avons entre-autre au cours de notre travail mis en évidence l'importance d'un substituant en ortho sur le benzyle. Peut-être ce substituant remplit-il la « même » fonction que le groupement méthyle ? Dans cette optique, il serait intéressant, en plus des raisons évoquées précédemment, de synthétiser le composé ***(160)*** (Figure 3.IV.43).



(160)

Figure 3.IV.43 : Structure du composé ***(160)***.

Egalement, nous avons ouvert la voie à de nouvelles substitutions notamment sur la spirodécanone, permettant d'améliorer la solubilité des produits, de diminuer le LogD et vraisemblablement de moduler la pharmacocinétique des composés.

Il est intéressant de constater que le test « neuroleptique » de Leysen et coll. constituait par lui même un « profil » puisque le ligand de référence utilisé, l'halopéridol » marque plusieurs récepteurs (D_m et σ). Dans notre cas (profil sur récepteurs le plus souvent clonés, réalisé avec des ligands spécifiques), l'antagonisme de nos produits vis-à-vis de l'halopéridol est déconvoluée en au moins 6 activités distinctes. L'information fournie est plus importante, mais le lien avec un profil d'activité *in vivo* est plus difficile à réaliser. Il reste donc un travail important à réaliser pour relier les activités sur les différents récepteurs isolés et les activités biologiques *in vivo* des composés.

Au laboratoire, nous travaillons à l'élaboration d'une grande base de données qui comprendra des données de liaison in vitro sur de nombreux récepteurs et enzymes et des données d'activité *in vivo* (toxicité, pharmacocinétique, pharmacodynamique, effets secondaires). L'étude statistique de ces données associée à une analyse détaillée des relations profil-structure permettront peut-être de fonder les bases de méthodes de concept raisonnées des médicaments de demain.

BIBLIOGRAPHIE du Chapitre 3.IV.

[1] Anzali S., Mederski W.W.K.R., Osswald M., Dorsch D., 1-Endothelin antagonists : Search for surrogates of methylenedioxyphenyl by means of a kohonen neural network, Bioorg. Med. Chem. Lett., ***1998***, 8, pp 11-16.

[2] Mederski W.W.K.R, Osswald M., Dorsch D., Anzali S., Christadler M., Schmitges C-J., Wilm C., 2-Endothelin antagonists : Evaluation of 2,1,3-benzothiadiazole as a methylendioxyphenyl bioisoster, Bioorg. Med. Chem. Lett., ***1998***, 8, pp 17-22.

[3] Mederski W.W.K.R, Dorsch D., Osswald M., Anzali S., Christadler M., Schmitges C-J., Schelling P., Wilm C., Fluck M., 3-Endothelin antagonists : Discovery of EMD 122946, A highly potent and orally active ET_A selective antagonist, Bioorg. Med. Chem. Lett., ***1998***, 8, pp 17-22.

[4] Aldrich, J.V., Analgesics, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery,* Vol. 3, Therapeutic Agents, Wolff, M.E., Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, ***1996***, pp 321-441.

[5] Janssen P.A.J., Derivatives of benzimidazolinyl piperidine, US Patent 3,318,900, ***1967***.

[6] Protiva M., Kopicova Z., Grimova J., Synthesis of several 1-(aminoacyl)-4-cinnamylpiperazines as potential analgetics, Collect. Czech., Chem. Commun., ***1982***, 47, pp 636-643.

[7] Barlocco D., Brunello N., Bernardi M., Cignarella G., Synthesis of 1,4-disubstituted-2-méthylpiperazines and study of their anagesic properties, Farmaco, ***1995***, 50, pp 119-124.

[8] Ennis M., Baze M.E., Smith M.W., Lawson C.F., McCall R.B., lahti R.A., Piercey M.F., Novel Indolodioxanes with Antihypertensive Effects : Potent Ligands for the $5\text{-}HT_{1A}$ Receptor, J. Med. Chem., ***1992*** , 35, pp 3058-3066.

[9] Wise L.D., Pattison I.C., Butler D.E., DeWald H.A., Lewis E.P., Lobbestael S.J., Nordin I.C., Poschel B.P.H., Coughenour L.L, 1-[3-(diarylamino)propyl]piperidines and Related Compounds, Potential Antipsychotic Agents with low Cataleptogenic Profiles, J. Med. Chem., ***1985***, 28, pp 606-612

[10] Beck-Sickinger A.G., Structural Characterization and Binding sites of G-protein coupled receptors, DDT Vol. 1, ***1996***, pp 502-513.

[11] Janssen P.A.J., 1-oxo-2,4,8,triaza-spiro(4,5)decanes, US Patent, 3,155,670, ***1964***.

[12] Janssen P.A.J., Substituted 2,4,8,triaza-spiro(4,5)decanes, US Patent, 3,238,216, ***1966***.

[13] Galzi J-L., Mejean A., Ilien B., Mollereau C., Meunier J-C., Gœldner M., Hirth C., Photoactivatable Opiate Derivatives as Irreversible Probes of the μ-opioid Receptor, J.Med.Chem., ***1990***, 33, 2456-2464.

[15] Kieffer B.L., Opioids : first lessons from knockout mice, TiPS, ***1999***, 20, pp 19-26.

[16] Horvath D. en cours de publication.

[17] Baldessarini R.J., Drugs in the Treatment of psychiatric disorders, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman Gilman A. Eds, 9th Ed., Mc-Graw-Hill, ***1996***, p406.

[18] Roufos I., Hays S., Schwarz R.D., A structure-Activity Relationship Study of Novel Phenylacetamides which are sodium channel blockers, J.Med.Chem., ***1996***, 39, 7, pp1514-1520.

[19] Wise L.D., Pattison I.C., Butler D.E., DeWald H.A., Lewis E.P., Lobbestael S.J., Tecle H., Coughenour L.L, Downs D.A., Poschel B.P.H., Examination of a Series of 8-[3-[Bis(4-fluorophenyl)amino]propyl]-1-aryl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-ones as Potential Antipsychotic Agents, J. Med. Chem., ***1985***, 28, pp 1811-1817.

[20] Nikam S.S., Martin A.R. Nelson D.L, Serotonergic Properties of Spiroxatrine Enantiomers, J.Med.Chem., ***1988***, 31, pp 1965-1968.

[21] Kordik C.P., Reitz A.B., Pharmacological Treatment of Obesity : Therapeutic strategies, J.Med.Chem., ***1999***, 42, pp 181-201.
[22] Sharif N.A., Hellberg M.R., Yanni J.M., Antihistamines, Topical Ocular, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery,* Volume 5 : Therapeutic Agents, 5th Ed ., Wolff M. Ed., ***1997***, pp 255-279.
[23] TenBrink R.E., Huff R.M., Recent advances in Dopamine D_3 and D_4 Receptor ligands and pharmacology, McCall J.M. Ed., Ann. Rep. Med. Chem., Academic Press, 29, ***1994***, pp 43-52.
[24] Bloom F.E., Neurotransmission and the central nervous system, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman Gilman A. Eds, 9th Ed., Mc-Graw-Hill, ***1996***, pp282-283.
[25] Schaus J.M., Bymaster F.P., Dopaminergic approaches to Antipsychotic Agents, Robertson D.W. Ed., Ann. Rep. Med. Chem., 33, ***1998***, pp 1-10.
[26] Glennon R.A., Yousif M.Y., Ismaiel A.M. El-Ashmawy M.B., Herndon J.L., Fischer J.B., Server A.C., Burke Howie K.J., Novel 1-phenylpiperazine and 4-phenylpiperidine Derivatives as High-Affinity σ ligands, J.Med.Chem., ***1991***, 34, 3360-3365.
[27] Reitz A.B., Jetter M.C., Wild K.D., Raffa R.B., Centrally Acting Analgesics, Robertson D.W. Ed., Ann. Rep. Med. Chem., 30, ***1995***, pp .
[28] Williams M., Kowaluk E.A., Arneric S.P., Emerging Molecular Approaches to Pain Therapy, J.Med.Chem., ***1999***, 42, pp1481-1500.
[29] Leysen J., Tollenaere J.P., Koch M.H.J., Laduron P., Differentiation of opiate and neuroleptic receptor binding in rat brain, European. J. Pharmacol., **1977**, 43, pp 253-267.

- Conclusion-

Au cours de ce travail nous avons exploré deux aspects de la synthèse combinatoire: l'utilisation pour la découverte de nouvelles têtes de série chimique et l'utilisation pour l'optimisation de produits actifs, conjointement avec les techniques de modélisation moléculaire et de pharmacologie in-vitro.

Tout d'abord, nous avons conçu et synthétisé des chimiothèques généralistes pour le criblage primaire, dans le but de couvrir de larges espaces de diversité structurale.

Deux chimiothèques combinatoires ont donc été conçues autour du concept de tenseur. Plus de 19000 1,3-benzènedisulfonamides ont été synthétisés. La cinétique de la réaction de disubstitution nucléophile a été modélisée puis le modèle obtenu a été confronté à l'expérience. La modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence des différences entre les 1,3-benzènedisulfonamides et leurs isomères les 1,2-benzènedisulfonamides. Nous avons mis au point la synthèse de ces derniers en optimisant les conditions réactionnelles (base, solvant) afin d'éviter la synthèse de benzènedisulfonimide obtenu dans le cas de la subsitution nucléophile sur le tenseur avec une amine primaire. De même, 6400 3-nitro-4-(N-substitués)-amino-benzylamides ont été synthétisés. A cette occasion, nous avons mis au point une réaction de substitution nucléophile aromatique compatible avec une grande diversité de N-nucléophiles. Afin de pouvoir évaluer rapidement l'activité intrasèque de cette chimiothèque dans un test biologique donnée, nous avons synthétisé deux sous-chimiothèques de 80 produits représentatifs de l'ensemble de la chimiothèque.

Nous avons ensuite utilisé les outils de criblage biologique et modélisation moléculaire discutés au chapitre 1, pour concevoir des chimiothèques focalisées autour de structures actives. Le criblage à haut débit de 10000 produits issus de chimiothèques combinatoires diverses sur le récepteur aux benzodiazépines, a permis de mettre en évidence une nouvelle série de ligands de type tri-aromatique. Grâce aux résultats du criblage priamire, nous avons conçu, synthétisé et testé 6400 analogues. De nombreux analogues ont montré une activité submicromolaire. Nous nous sommes également intéressés à une autre série de produits actifs obtenus lors du criblage primaire et pour laquelle nous avons testé la faisabilité chimique d'une chimiothèque focalisée basée sur un motif amino-alcool.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'optimisation de deux produits micromolaires sur le récepteur aux opiacés de type μ, obtenus précédemment par criblage systématique de chimiothèques combinatoires. Nous avons conçu et synthétisé des analogues présentant une topologie conservée (techniques de chimie médicinale) ou un pharmacophore conservé (techniques de modélisation moléculaire) pour chacune des deux références. Les analogues synthétisés au cours de cette optimisation ont été soumis à une caractérisation biologique étendue permettant d'évaluer leur puissance et leur spécificité. Des produits nanomolaires sur le récepteur μ et très spécifiques des sous-types opiacés ont ainsi été mis en évidence. Ayant à notre disposition de grandes séries de composés et d'activités biologiques, nous nous sommes attachés à montrer les liens entre les structures chimiques et la spécificité des composés dans les séries étudiées. En particulier, nous avons évalué l'influence de la flexibilité, des substituants, des homologations ou ouverture de cycles, ... Egalement, nous avons pris en considération des paramètres physico-chimiques comme la solubilité et le LogD.

Partie Expérimentale

E.1.MATERIELS ET METHODES

E.1.I Matériels et méthodes d'analyse et d'identification structurale

E.1.I.1 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse obtenus selon les techniques d'ionisation chimique (IC+ ou IC-) sont réalisés sur un spectromètre GC/MS ATI Unicam Automass. L'ionisation chimique des molécules est réalisée en utilisant le méthane.

E.1.I.2 HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance)

Les analyses HPLC sont réalisées sur une chaîne Shimadzu possédant un injecteur de type SIL-10A, des pompes LC-10AS et un détecteur à double longueur d'onde de type SPD-10A.

Les séparations des produits sont réalisées d'une part sur une colonne en phase inverse (C18 TSK-GEL Super ODS 2µm, 50 x 4.6 mm^2) avec un solvant A : (H2O / TFA0.05%) et un solvant B : (ACN aqueux 80% / TFA 0.045%). Le temps de rétention est noté t_R. Un débit de 2.75 mL/min est utilisé pour les deux méthodes d'élution suivantes :

Méthode 1 *Temps*	*Solvant*	*Proportion*	*Méthode 2* *Temps*	*Solvant*	*Proportion*
0.01min	B	0%	0.01min	B	0%
4,00min	B	100%	5.50min	B	100%
4.01min	B	0%	8.5min	B	0%
5.00min		STOP	9.00min		STOP

Les séparations des produits sont réalisées d'autre part sur une colonne en phase polaire (Alltech Adsorbosphere CN 3U, 3µ, 50 x 4.6 mm^2) avec un solvant A : (H2O / TFA0.05%) et un solvant B : (ACN aqueux 80% / TFA 0.045%). Le temps de rétention est noté t_R'. Un débit de 2.75 mL/min est utilisé pour la méthode d'élution suivante :

Méthode *Temps*	*Solvant*	*Proportion*
0.01min	B	0%
24.00min	B	100%
24.01min	B	0%
25.00min		STOP

E.1.I.3 LC/MS (Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse)

Les analyses LC/MS sont réalisées sur un spectromètre de masse MicroMass Platform couplé à un système HPLC doté d'un détecteur, Hewlett Packard et d'un pipetteur-injecteur Gilson 215 ou un spectromètre de masse Micromass ZMD couplé à un système HPLC Gilson doté d'un détecteur 307 DAD, des pompes LC 306 et d'un pipetteur-injecteur Gilson 215.

Les spectres de masse sont déterminé par une méthode APCI+. La séparation des produits est réalisée sur des colonnes en phase inverse (C18 TSK-GEL Super ODS 2µm, 50 x

4.6 mm^2) avec un solvant A : (H2O / TFA0.05%) et un solvant B : (ACN aqueux 80% / TFA 0.045%). Un débit de 2.75 mL/min est utilisé pour la méthode d'élution suivante :

Méthode Temps	*Solvant*	*Proportion*
0.01min	B	0%
4,00min	B	100%
4.01min	B	0%
5.00min		STOP

E.1.I.4 RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

Les spectres RMN sont enregistrés sur des appareils Bruker DRX – 300 ou Bruker DMX – 600. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Les abréviations s, ls, d, dd, ddd, ld, t, dt, tt, q, m désignent successivement des singulets, singulets larges, doublets, doublets de doublets, doublets de doublets de doublets, doublets larges, triplets, doublets de triplets, triplets de triplets, quadruplets et massifs. Les indices « ***a*** » et « ***e*** » se rapportent à la position axiale ou équatoriale d'un substituant sur un cycle à 6 chaînons.

Les attributions sont réalisées en utilisant les spectres 1D ^1H et ^{13}C et les spectres 2D HMQC et COSY(^1H,^1H).

E.1.I.5 Points de Fusion :

Les points de fusion sont mesurés sur un appareil Büchi B-540 et ne sont pas corrigés.

E.1.I.6 CCM (Chromatographie sur couche mince) :

Les CCM sont réalisées sur des plaques de silice Merck Kieselgel 60 F_{254} et les produits visualisés en utilisant une lampe UV (254nM) ou des révélateurs.

E.1.II Méthodes de purification :

Les produits sont purifiés par extraction ou par HPLC préparative. Les purifications par HPLC préparative sont réalisées sur une chaîne Shimadzu possédant des pompes de type LC-8A et un collecteur de fraction FRC-10A et dotée d'un détecteur SPD-10A. Les séparations des produits sont réalisées sur des colonnes en phase inverse Vydac C18 5µm (250 x 4.4 mm^2, 110 mg) avec un solvant A : (H2O / TFA0.05%) et un solvant B : (ACN aqueux 80% / TFA 0.045%). Un débit de 50 mL/min est utilisé pour la méthode d'élution suivante :

0.01 min	B	0%
30.00 min	B	100%
35.00 min	B	100%
35.01 min		STOP

Les phases organiques obtenues après extractions de solutions aqueuses sont séchées sur $MgSO_4$ et filtrées avant évaporation sous vide. Par défaut, les HPLC Préparatives sont réalisées avec des solvants contenant du TFA, sauf si la molécule à purifier présente une ou des fonctions protonables ou sensibles en milieu acide.

E.1.III Méthodes biologiques.

Les expériences de criblage à haut débit ont été réalisées sur le site de CEREP Lille. Les expériences d'IC50 ont été réalisées à CEREP Lille pour les ligands au récepteur BZR et à CEREP Celle pour les ligands au récepteur μ. Tous les tests de profil pharmacologique ont été réalisés à CEREP Celle. Les tests de profil pharmaceutique ont été réalisées à CEREP Inc. à Seattle.

Tous les composés sont solubilisés dans le DMSO à une concentration de 10-2M.Cette solution constitue la solution mère à partir de laquelle toutes les dilutions vont être faites.

E.1.III.1 IC_{50}, HTS, Profil Pharmac ologique

Après incubation des produits avec les membranes, le radioligand et leproduit non-spécifique, les membranes sont rapidement filtrées sous vide à travers des filtres en fibres de verre (GF/B ou GF/C, Whatman ou Packard). Les filtres sont alors lavés plusieurs fois avec du tampon froid en utilisant un récolteur de cellules (Brandel, Packard). La radioactivité liée est mesurée sur un compteur à scintillation (LS 6000, Beckman, Topcount, Packard) en utilisant un liquide scintillant (Formula 989 ou microscint 0, Packard).

Les produits sont testés dans chaque essai à la concentration 10 μM deux fois. Dans chaque expérience, le composé de référence respectif (Non spécifique) est testé au minimum à 8 concentrations, deux fois, pour obtenir une courbe de compétition servant à valider l'expérience. La liaison spécifique du radioligand est définie par la différence entre la liaison totale et la liaison non-spécifique déterminée en présence d'un excès de ligand non-marqué.

Pour les expériences HTS et les expériences HTP, les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison de contrôle spécifique et en pourcentage d'inhibition de la liaison de contrôle spécifique en présence des composés testés.

Les valeurs d'IC_{50} et les coefficients de Hill (nH) sont déterminés par une analyse de régression non-linéaire des courbes de compétition. Les IC_{50} des produits de référence ont passé les inspections requises et sont dans les limites des moyennes historiques ± 0.5 log unité.

Le tableau suivant liste l'ensemble des tests inclus dans le HTP, les tissus utilisés, les radioligands et les ligands « froids » non marqués.

Récepteur	Tissu	Radioligand	[ ]	Nonspecifique	Réf.
A_1 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]DPCPX	1 nM	DPCPX (1 μM)	[1]
A_{2a} *(h)*	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{3}H]CGS 21680	6 nM	NECA (10 μM)	[2]
A_3 *(h)*	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{125}I]AB-MECA	0.1 nM	IB-MECA (1 μM)	[3]
α_1(NS)	cortex de rat	[^{3}H]prazosin	0.25 nM	prazosin (0.5 μM)	[4]
α_2(NS)	cortex de rat	[^{3}H]RX 821002	0.5 nM	(-)epinephrine (100 μM)	[5]
β_1 *(h)*	Humain recombinant (Sf9 cellules)	[^{3}H](-)CGP 12177	0.15 nM	alprenolol (50 μM)	[6]

β_2 *(h)*	Humain recombinant (Sf9 cellules)	[^{3}H](-)CGP 12177	0.15 nM	alprenolol (50 µM)	[6]
NE recapture *(h)*	Humain recombinant (MDCK cellules)	[^{3}H]nisoxetine	0.3 nM	desipramine (1 µM)	[7]
AT_1 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I][Sar^1,Ile^8]-A II	50 pM	angiotensin II (10 µM)	[8]
AT_2 *(h)*	Humain recombinant (Hela cellules)	[^{125}I]CGP 42112A	50 pM	angiotensin II (1µM)	[9]
ANP	guinea-pig	[^{125}I]ANP	50 pM	ANP (0.1 µM)	[10]
BZD (central)	cortex de rat	[^{3}H]flunitrazepam	0.4 nM	diazepam (3 µM)	[11]
BZD (peripheral)	rat heart	[^{3}H]PK 11195	0.2 nM	PK 11195 (10 µM)	[12]
Bombesin	cortex de rat	[^{125}I][Tyr^4]bombesin	10 pM	bombesin (1 µM)	[13]
B_2 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]bradykinin	0.2 nM	bradykinin (1 µM)	[14]
CGRP *(h)*	SK-N-MC cellules	[^{125}I]hCGRPα	40 pM	hCGRPα (1 µM)	[15]
CB1 *(h)* (central)	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{3}H]WIN 55212-2	2 nM	WIN 55212-2 (10 µM)	[16]
CB2 *(h)* (periphérique)	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{3}H]WIN 55212-2	0.8 nM	WIN 55212-2 (5 µM)	[17]
CCK_A *(h)*	Humain recombinant (NIH-3T3 cellules)	[^{3}H]devazepide	1 nM	devazepide (1 µM)	[18]
CCK_B *(h)*	Humain recombinant (NIH-3T3 cellules)	[^{3}H]CCK-8	1 nM	CCK-8 (1 µM)	[19]
D_1 *(h)*	Humain recombinant (L cellules)	[^{3}H]SCH 23390	0.3 nM	SCH 23390 (1 µM)	[20]
D_2 *(h)*	Humain recombinant (A9L cellules)	[^{3}H]spiperone	0.3 nM	(+)butaclamol (10 µM)	[21]
D_3 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]spiperone	0.3 nM	(+)butaclamol (10 µM)	[22]
$D_{4.4}$ *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]spiperone	0.3 nM	(+)butaclamol (10 µM)	[23]
D_5 *(h)*	Humain recombinant (GH4 cellules)	[^{3}H]SCH 23390	0.3 nM	SCH 23390 (10 µM)	[24]
DA recapture *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]BTCP	5 nM	BTCP (10 µM)	[25]
ET_A *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I]endothelin-1	30 pM	endothelin-1 (0.1 µM)	[26]
ET_B *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I]endothelin-1	30 pM	endothelin-1 (0.1 µM)	[26]
GABA (NS)	cortex de rat	[^{3}H]GABA	10 nM	GABA (100 µM)	[27]
GAL1 *(h)*	Humain recombinant (HEK 293 cellules)	[^{125}I]galanin	30 pM	galanin (1 µM)	[28]
PDGF	Balb/c 3T3 cellules	[^{125}I]PDGF BB	30 pM	PDGF BB (10 nM)	[29]
IL-8A *(h)* (CXCR1)	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I]IL-8	0.1 nM	IL-8 (0.3 µM)	[30]
TNF-α *(h)*	U-937 cellules	[^{125}I]TNF-α	0.1 nM	TNF-α (10 nM)	[31]
CCR1 *(h)*	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{125}I]MIP-1α	30 pM	MIP-1α (0.1 µM)	[32]
H_1 (central)	guinea-pig cerebellum	[^{3}H]pyrilamine	0.5 nM	triprolidine (100 µM)	[33]
H_2	guinea-pig striatum	[^{125}I]APT	0.1 nM	tiotidine (100 µM)	[34]
ML_1	chicken brain	[^{125}I]iodomelatonin	25 pM	melatonin (1 µM)	[35]
M_1 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]pirenzepine	2 nM	atropine (1 µM)	[36]
M_2 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]AF-DX 384	2 nM	atropine (1 µM)	[36]
M_3 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]4-DAMP	0.2 nM	atropine (1 µM)	[36]
M_4 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]4-DAMP	0.2 nM	atropine (1 µM)	[36]

M_5 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]4-DAMP	0.2 nM	atropine (1 μM)	[36]
NK_1 *(h)*	U-373MG cellules	[^{3}H][Sar^9,Met(O$_2$)^{11}]-SP	1.2 nM	[Sar^9,Met(O$_2$)^{11}]-SP (1 μ	[37]
NK_2 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I]NKA	0.1 nM	[Nle^{10}]-NKA(4-10) (10 μ	[38]
NK_3 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I][MePhe^7]-NKB	50 pM	senktide (1 μM)	
Y_1 *(h)*	SK-N-MC cellules	[^{125}I]peptide YY	25 pM	neuropeptide Y (1 μM)	[40]
Y_2 *(h)*	KAN-TS cellules	[^{125}I]peptide YY	25 pM	neuropeptide Y (1 μM)	[40]
Neurotensin *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{125}I]neurotensin	20 pM	neurotensin (1 μM)	[41]
δ *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]DPDPE	0.5 nM	naltrexone (10 μM)	[42]
κ *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]U 69593	0.5 nM	U50488 (10 μM)	[43]
μ *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]DAMGO	0.5 nM	naloxone (10 μM)	[44]
ORL1 *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]nociceptin	0.2 nM	nociceptin (1 μM)	[45]
PACAP-null *(h)*	Humain recombinant (NIH-3T3 cellules)	[^{125}I]PACAP 1-27	30 pM	PACAP 1-27 (0.1 μM)	[46]
PCP	cortex de rat	[^{3}H]TCP	5 nM	MK 801 (10 μM)	[47]
TXA_2/PGH_2 *(h)*	human platelets	[^{3}H]SQ 29,548	5 nM	U 44069 (50 μM)	[48]
PGI_2 *(h)*	human platelets	[^{3}H]iloprost	10 nM	iloprost (10 μM)	[49]
P_{2X}	rat urinary bladder	[^{3}H]α,β-MeATP	3 nM	α,β-MeATP (10 μM)	[50]
P_{2Y}	rat liver	[^{35}S]ADPβS	1 nM	ADPβS (3 μM)	[51]
5-HT_{1A} *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]8-OH-DPAT	0.3 nM	8-OH-DPAT (10 μM)	[52]
5-HT_{1B}	cortex de rat	[^{125}I]CYP	0.1 nM	serotonin (10 μM)	[53]
5-HT_{2A} *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]ketanserin	2 nM	ketanserin (1 μM)	[54]
5-HT_{2C} *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]mesulergine	0.7 nM	mesulergine (1 μM)	[54]
5-HT_3 *(h)*	Humain recombinant (HEK 293 cellules)	[^{3}H]BRL 43694	0.5 nM	MDL 72222 (10 μM)	[55]
5-HT_{5A} *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]LSD	0.7 nM	serotonin (100 μM)	[56]
5-HT_6 *(h)*	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{3}H]LSD	2 nM	serotonin (100 μM)	[57]
5-HT_7 *(h)*	Humain recombinant (HEK293 cellules)	[^{3}H]LSD	4 nM	serotonin (10 μM)	[58]
σ (NS)	cortex de rat	[^{3}H]DTG	8 nM	haloperidol (10 μM)	[59]
Somatostatin	AtT-20 cellules	[^{125}I]Tyr^{11}-somatostatin	50 pM	somatostatin (0.3 μM)	[60]
VIP *(h)*	HT-29 cellules	[^{125}I]VIP	20 pM	VIP (1 μM)	[61]
V_{1a} *(h)*	Humain recombinant (CHO cellules)	[^{3}H]V_1-antagonist	0.2 nM	V_1-antagonist (1 μM)	[62]
Ca^{2+} channel (L, verapamil site)	cortex de rat	[^{3}H](-)D 888	0.5 nM	D 600 (10 μM)	[63]
K^+ channel (Volt - dependent)	cortex de rat	[^{125}I]charybdotoxin	50 pM	charybdotoxin (10 nM)	[64]
K^+ channel (Ca^{2+} - dependent)	cortex de rat	[^{125}I]apamin	4 pM	apamin (0.1 μM)	[65]
Na^+ channel (site 2)	cortex de rat	[^{3}H]batrachotoxinin	10 nM	veratridine (300 μM)	[66]
Cl^- ionophore	cortex de rat	[^{35}S]TBPS	3 nM	picrotoxinin (20 μM)	[67]

E.1.III.2 Profil pharmaceutique :

La solubilité est évaluée par dilution au centième dans le PBS à pH 7.4, d'une solution stock dans le DMSO à 200µM (ou à 10mM). La comparaison des aires HPLC permet d'évaluer cette solubilité[68].

Le coefficient de partition Log D permet de quantifier la lipophilie des composés, facteur important dans l'absorption, la distribution et la recapture des molécules. Les produits sont équilibrés entre le n-octanol et le PBS pH 7.4. La spectrophotométrie couplée à la LC/MS permet de calculer le LogD [69]. La chromatographie liquide est réalisée sur un système muni de pompes HP 1100. Le spectromètre de masse couplé à ce système est un Finnigan MAT TSQ 7000 à quadrupole.

BIBLIOGRAPHIE de la partie expérimentale E.1.

[1] Townsend-Nicholson A., Schofield P.R., A threonine residue in the seventh transmembrane domain of the human A_1 adenosine receptor mediates specific agonist binding, J. Biol. Chem., ***1994***, 269, pp 2373-2376.

[2] Luthin D.R., Olsson R.A., Thompson R.D., Sawmiller D.R., Linden J., Characterization of two affinity states of adenosine A_{2a} receptors with a new radioligand, 2-[2-4-amino-3-[^{125}I]iodophenyl,ethylamino]adenosine, Mol. Pharmacol., ***1995***, 47, pp 307-313.

[3] Salvatore C.A., Jacobson M.A., Taylor H.E., Linden J., Johnson R.G., Molecular cloning and characterization of the human A_3 adenosine receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1993***, 90, pp 10365-10369.

[4] Greengrass P., Bremner R., Binding characteristics of [^{3}H]-prazosin to rat brain α-adrenergic receptors, Eur. J. Pharmacol., ***1979***, 55, pp 323-326.

[5] Uhlen S., Wikberg J.E., Rat spinal chord α_2-adrenoceptors are of the α_{2A}-subtype: comparison with α_{2A}- and α_{2B}-adrenoceptors in rat spleen, cerebral cortex and kidney using ^{3}H-RX821002 ligand binding, Pharmacol. Toxicol., ***1991***, 69, pp 341-350.

[6] Abrahamsson T., Ek B., Nerme V., The β_1- and β_2-adrenoceptor affinity of atenolol and metoprolol. A receptor-binding study performed with different radioligands in tissues from the rat, the guinea pig and man, Biochem. Pharmacol., ***1988***, 37, pp 203-208.

[7] Pacholczyk T., Blakely R.D., Amara S.G., Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter, Nature, ***1991***, 350, pp 350-354.

[8] Bergsma D.J., Ellis C., Kumar C., Nuthulaganti P., Kersten H., Elshourbagy N., Griffin E., Stadel J.M., Aiyar N., Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun., ***1992***, 183, pp 989-995.

[9] Tsuzuki S., Ichiki T., Hakakubo H., Kitami Y., Guo D.F., Shirai H, Inagami T., Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor, Biochem. Biophys. Res. Commun., ***1994***, 200, pp 1449-1454.

[10] Quirion R., Dalpe M., Dam T.-V., Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1994***, 83, pp 174-178.

[11] Speth R.C., Wastek G.J., Yamamura H.I., Benzodiazepine receptors : temperature dependence of [^{3}H]flunitrazepam binding, Life Sci., ***1979***, 24, pp 351-358.

[12] Le Fur G., Vaucher N., Perrier M.L., Flamier A., Benavides J., Renault C., Dubroeucq, M.C., Gueremy C., Uzan A., Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [^{3}H]Ro5-4864 and [^{3}H]PK 11195, by thermodynamic studies, Life Sci., ***1983***, 33, pp 449-457.

[13] Guard S., Watling K.J., Howson W., Structure-activity requirements of bombesin for gastrin-releasing peptide- and neuromedin B-preferring bombesin receptors in rat brain, Eur. J. Pharmacol., ***1993***, 240, pp 177-184.

[14] Jong Y.-J. I., Dalemar L.R., Wilhelm B., Baenziger N.L., Human bradykinin B_2 receptors isolated by receptor-specific monoclonal antibodies are tyrosine phosphorylated, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1993***, 90, pp 10994-10998.

[15] Muff R., Stangl D., Born W., Fischer J.A., Comparison of a calcitonin gene-related peptide receptor in a human neuroblastoma cell line SK-N-MC, and a calcitonin receptor in a human breast carcinoma cell line T47D, Ann. N.Y. Acad. Sci., ***1992***, 657, pp 106-110.

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

[17] Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M., Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, Nature, ***1993***, 365, pp 61-65.
[18] Talkad V.D., Fortune K.P., Pollo D.A., Shah G.N., Wank S.A., Gardner J.D., Direct demonstration of three different states of the pancreatic cholecystokinin receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1994***, 91, pp 1868-1872.
[19] Lee Y.-M., Beinborn M., Mcbride E.W., Lu M., Kolakowski L.F., Kopin A.S., The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor, J. Biol. Chem., ***1993***, 268, pp 8164-8169.
[20] Zhou Q.-Y., Grandy D.K., Thambi L., Kushner J.A., Van Tol H.H.M., Cone R., Pribnow D., Salon J., Bunzow J.R., Civelli O., Cloning and expression of human and rat D_1 dopamine receptors, Nature, ***1990***, 347, pp 76-80.
[21] Grandy D.K., Marchionni M.A., Makam H., Stofko R.E., Alfano M., Frothingham L., Fischer J.B., Burke-Howie K.J., Bunzow J.R., Server A.C., Civelli O., Cloning of the cDNA and gene for a human D_2 dopamine receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1989***, 86, pp 9762-9766.
[22] Mackenzie R.G., Vanleeuven D., Pugsley T.A., Shih Y-H., Demattos S., Tang L., Todd R., O'Malley K.L., Characterization of the human dopamine D_3 receptor expressed in transfected cell lines, Eur. J. Pharmacol., ***1994***, 266, pp 79-85.
[23] Van Tol H.H.M., Wu C.M., Guan H.-G., Ohara K., Bunzow J.R., Civelli O., Kennedy J., Seeman P., Niznik H.B., Jovanovic V., Multiple dopamine D_4 receptor variants in the human population, Nature, ***1992***, 358, pp 149-152.
[24] Sunahara R.K., Guan H.C., O'Dowd B.F., Seeman P., Laurier L.G., Ng G., George S.R.,Torchia J., Van Tol H.M.M., Niznik H.B., Cloning of the gene for a human dopamine D_5 receptor with higher affinity for dopamine than D_1, Nature, ***1991***, 350, pp 614-619.
[25] Pristupa Z.B., Wilson J.M., Hoffman B.J., Kish S.J., Niznik H.B., Pharmacological heterogeneity of the cloned and native human dopamine transporter : disassociation of [^{3}H]WIN 35,428 and [^{3}H]GBR 12,935 binding, Mol. Pharmacol., ***1994***, 45, pp 125-135.
[26] Buchan K.W., Alldus C., Christodoulou C., Clarck K.L., Dykes C.W., Sumner M.J., Wallace D.M., White D.G., Watts I.S., Characterization of three non-peptide endothelin receptor ligands using human cloned ET_A and ET_B receptors, J. Pharmacol. Exp. Ther., ***1994***, 112, pp 1251-1257.
[27] Tsuji A., Sato H., Kume Y., Tamai I., Okesaki E., Nagata O., Kato H., Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on γ-aminobutyric acid binding to receptor sites in rat brain membranes, Antimicrobial Agents Chemother., ***1988***, 32, pp 190-194.
[28] Sullivan K.A., Shiao L.-L., Cascieri M.A., Pharmacological characterization and tissue distribution of the human and rat GALR1 receptors, Biochem. Biophys. Res. Commun., ***1997***, 233, pp 823-828.
[29] Williams L.T., Tremble P.M., Lavin M.F., Sunday M.E., Platelet-derived growth factor receptors form a high affinity state in membrane preparations. Kinetics and affinity cross-linking studies, J. Biol. Chem., ***1984***, 259, pp 5287-5294.
[30] White J.R., Lee J.M., Young P.R., Hertzberg R.P., Jurewicz A.J., Chaikin M.A., Widdowson K., Foley J.J., Martin L.D., Griswold D.E., Sarau H.M., Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration, J. Biol. Chem., ***1998***, 273, pp 10095-10098.
[31] Brockaus M., Schoenfeld H.J., Schlaeger E.J., Hunziker W., Lesslauer W., Loetscher H., Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1990***, 87, pp 3127-3131.
[32] Neote K., Digregorio D., Mak J.Y., Horuk R., Schall T.J., Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor, Cell, ***1993***, 72, pp 415-425.

[33] Dini S., Caselli G.F., Ferrari M.P., Giani R., Clavenna G., Heterogeneity of [^{3}H]-mepyramine binding sites in guinea pig cerebellum and lung, Agents and Actions, ***1991***, 33, pp 181-184.
[34] Ruat M., Traiffort E., Bouthenet M.L., Schwartz J.C., Hirschfeld J., Buschauer A., Schunack W., Reversible and irreversible labeling and autoradiographic localization of the cerebral histamine H_2 receptor using [^{125}I]iodinated probes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1990***, 87, pp 1658-1662.
[35] Rivkees S.A., Cassone V.M., Weaver D.R., Reppert S.M., Melatonin receptors in chick brain : characterization and localisation, Endocrinology, ***1989***, 125, pp 363-367.
[36] Dorje F., Wess J., Lambrecht G., Tacke R., Mutschler E., Brann M.R., Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes, J. Pharmacol. Exp. Ther., ***1991***, 256, pp 727-733.
[37] Heuillet E., Menager J., Fardin V., Flamand O., Bock M., Garret C., Crespo A., Fallourd A. M., Doble A., Characterization of a human NK_1 tachykinin receptor in the astrocytoma cell line U373MG, J. Neurochem., ***1993***, 60, pp 868-876.
[39] Suman-Chauhan N., Grimson P., Guard S., Madden Z., Chung F.Z., Watling K., Pinnock R., Woodruff G, Characterization of [^{125}I][MePhe^7]neurokinin B binding to tachykinin NK_3 receptors: evidence for interspecies variance, Eur. J. Pharmacol., ***1994***, 269, pp 65-72.
[40] Fuhlendorff J., Gether U., Aakerlund L., Langeland-Johansen N., Thogersen H., Melberg S.G., Olsen U.B., Thastrup O., Schwartz T.W., [Leu^{31},Pro^{34}]neuropeptide Y : a specific Y_1 receptor agonist, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1990***, 87, pp 182-186.
[41] Vita N., Laurent P., Lefort S., Chalon P., Dumont X., Kaghad M., Gully D., Le Fur G., Ferrara P., Caput D., Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor, FEBS Lett., ***1993***, 317, pp 139-142.
[42] Malatynska E., Wang Y., Knapp R.J., Santoro G., Li X., Waite S., Roeske W.R., Yamamura H.I., Human δ opioid receptor : a stable cell line for functional studies of opioids, NeuroReport, ***1995***, 6, pp 613-616.
[43] Simonin F., Gaveriaux-Ruff C., Befort K., Matthes H., Lannes B., Micheletti G., Mattei M.-G., Charron G., Bloch B., Kieffer B., κ-opioid receptor in humans : cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ***1995***, 92, pp 7006-7010.
[44] Wang J.-B., Johnson P.S., Persico A.M., Hawkins A.L., Griffin C.A., Uhl G.R., Human μ-opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacological characterization and chromosomal assignment, FEBS Lett., ***1994***, 338, pp 217-222.
[45] Ardati A., Henningsen R.A., Higelin J., Reinscheid R.K., Civelli O., Monsma F.R., Interaction of [^{3}H]orphanin FQ and ^{125}I-Tyr^{14}-orphanin FQ with the orphanin FQ receptor : kinetics and modulation by cations and guanine nucleotides, Mol. Pharmacol., ***1997***, 51, pp 816-824.
[46] Pisegna J.R., Wank, S.A., Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor, J. Biol. Chem., ***1996***, 271, pp 17267-17274.
[47] Vignon J., Privat A., Chaudieu I, Thierry,A., Kamenka J.M., Chicheportiche R., [^{3}H]thienyl-phencyclidine [^{3}H]TCP, binds to two different sites in rat brain. Localization by autoradiographic and biochemical techniques, Brain Res., ***1986***, 378, pp 133-141.
[48] Hedberg A., Hall S.E., Ogletree M.L., Harris D.N., Liu E.C.-K., Characterization of [5,6-^{3}H]SQ 29,548 as a high affinity radioligand, binding to thromboxane A_2/ prostaglandin H_2-receptors in human platelets, J. Pharmacol. Exp. Ther., ***1988***, 245, pp 786-792.

[49] Hall J.M., Strange P.G., The use of a prostacyclin analog, [^{3}H]iloprost, for studying prostacyclin-binding sites on human platelets and neuronal hybrid cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., ***1984***, 89, pp 41-43 .
[50] Bo X., Burnstock G., High- and low-affinity sites for [^{3}H]-α,β-methylene ATP in rat urinary bladder membranes, Brit. J. Pharmacol., ***1990***, 101, pp 291-296.
[51] Boyer J.L., Cooper C.L., Harden T.K., [^{32}P]3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP as a photoaffinity label for a phospholipase C-coupled P_{2Y}-purinergic receptor, J. Biol. Chem., ***1990***, 265, pp 13515-13520.
[52] Mulheron J.G., Casanas S.J., Arthur J.M., Garnovskaya M.N., Gettys T.W., Raymond J.R, Human 5-HT_{1A} receptor expressed in insect cells activates endogenous G_0-like G protein, J. Biol. Chem., ***1994***, 269, pp 12954-12962.
[53] Hoyer D., Engel G., Kalkman H.O., Characterization of the 5-HT_{1B} recognition site in rat brain : binding studies with ^{125}I, iodocyanopindolol, Eur. J. Pharmacol., ***1985***, 118, pp 1-12.
[54] Bonhaus D.W., Bach C., De Souza A., Salazar F.H.R., Matsuoka B.D., Zuppan P., Chan H.W., Eglen R.M., The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine$_{2B}$ (5-HT_{2B}) receptor gene products : comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors, Brit. J. Pharmacol., ***1995***, 115, pp 622-628.
[55]Hoyer D., Neijit H.C, Mol. Pharmacol., ***1988***, 33, p 303.
[56] Rees S., Den Dass I., Foord S., Goodson S., Bull D., Kilpatrick G., Lee M. Cloning and characterization of the human 5-HT_{5A} serotonin receptor, FEBS Lett., ***1994***, 355, pp 242-246.
[57] Monsma F.J., Shen Y., Ward R.P., Hamblin M.W., Sibley D.R., Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs, Mol. Pharmacol., ***1993***, 43, pp 320-327.
[58] Aharony D., Little J., Powell S., Hopkins B., Bundell K.R., McPheat W.L., Gordon R.D., Hassal G., Hockney R., Griffin R., Graham A., Pharmacological characterization of cloned human NK-2 (neurokininA) receptor expressed in a baculovirus/Sf-21 insect cell system, Mol. Pharmacol, ***1993***, 44, pp 356-363.
[58] Shen Y., Monsma F.J., Metcalf M.A., Jose P.A., Hamblin M.W., Sibley D.R., Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine 7-serotonin receptor subtype, J. Biol. Chem., ***1993***, 268, pp 18200-18204.
[59] Shirayama Y., Nishikawa T., Umino A., Takahashi K., π-Chlorophenylalanine-reversible reduction of σ binding sites by chronic imipramine treatment in rat brain, Eur. J. Pharmacol., ***1993***, 237, pp 117-126.
[60] Brown P.J., Lee A.B., Norman M.G., Presky D.H., Schonbrunn A., Identification of somatostatin receptors by covalent labeling with a novel photoreactive somatostatin analog, J. Biol. Chem., ***1990***, 265, pp 17995-18004.
[61] Couvineau A., Rousset M., Laburthe M., Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the human colon adenocarcinoma cell line, HT-29, Biochem. J., ***1985***, 231, pp 139-143.
[62] Thibonnier M., Auzan C., Madhun Z., Wilkins P., Berti-Mattera L., Cläuser E., Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V_{1a} vasopressin receptor, J. Biol. Chem., ***1994***, 269, pp 3304-3310.
[63] Reynolds I.J., Snowman A.M., Snyder S.H., -,[^{3}H]desmethoxyverapamil labels multiple calcium channel modulator receptors in brain and squeletal muscle membranes : differentiation by temperature and dihydropyridines, J. Pharmacol. Exp. Ther., ***1986***, 237, pp 731-738.
[64] Vazquez J., Feigenbaum P., King V.F., Jaczorowski J., Garcia M.L. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain, J. Biol. Chem., ***1990***, 265, pp 15564-15571.

[65] Hugues M., Duval D., Kitabgi P., Lazdunski M., Vincent J.P., Preparation of a pure monoiodo derivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes, J.. Biol. Chem., ***1982***, 257, pp 2762-2769.
[66] Brown G.B., ^{3}H-batrachotoxinin-A benzoate binding to voltage-sensitive sodium channels : inhibition by the channel blockers tetrodotoxin and saxitoxin, J. Neurosci., ***1986***, 6 pp 2064-2070.
[67] Lewin A.H., De Costa B.R., Rice K.C., Skolnick P., meta- and para-isothiocyanato-t-butylbicycloorthobenzoate : irreversible ligands of the γ-aminobutyric acid-regulated chloride ionophore, Mol. Pharmacol., ***1989***, 35, pp 189-194.
[68] Higuchi T. et coll., J. Pharm. Sci., ***1979***, 68, p 1267.
[69] Yazdanian M. et coll., Pharm. Res., ***1998***, 15, p 1490.
[70] Kuhnz W., Gieschen H., Drug Metab. Dispos., ***1998***, 26, p 1120.

E.2. PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 2

E.2.I Synthèse de disulfonamides.

Les synthèses décrites dans ce paragraphe sont réalisées dans des tubes en verre borosilicate Kimble (13*100mm) pour des quantités de l'ordre de 40 µmoles à 1 mmoles et dans des plaques Beckman Deepwell 96 puits pour des quantités de 5 à 10 µmoles.

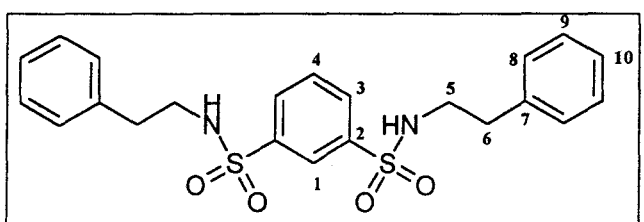
NB1 : les protocoles sont transposables pour une quantité de produit allant de 5µmol à 1 mmol.
NB2 : l'ensemble des disulfamides d'amine primaire sont révélés grâce au KI/TDM.

E.2.I.1 Synthèse de 1,3 benzenedisulfonamides.

A. Synthèse de 1,3 benzenedisulfonamides symétriques.

Dans un tube, sont pesés 0.2mmol d'une solution d'amine secondaire auxquels sont ajoutés 34.7µL (0.2mmol, 1 éq.) de DIEA (plus un équivalent de DIEA par équivalent de sel à neutraliser) et du DMF qsp 2 mL. Puis, 0.2ml (0.1mmol) d'une solution 0.5 M/THF de 1,3 benzenedisulfochlorure sont ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel est agité au vortex pendant 5 s puis agité plus doucement pendant 20 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous vide.

N,N'-di(1-phenéthyl)-benzène-1,3-disulfonamide (2). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la phenéthylamine. Le résidu obtenu est extrait dans HCl.aqueux /AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée.

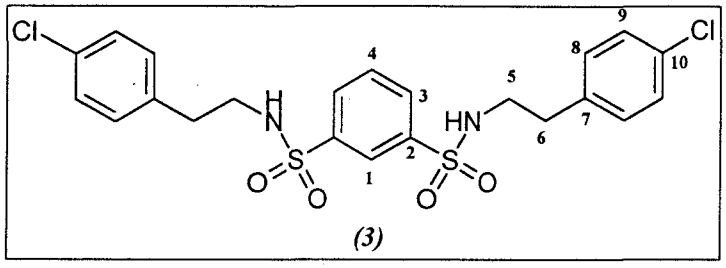


(2)

Aspect : poudre jaune.
MM : 444.5g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.83 (t, J_{5-6}= 7.0Hz, 4H, H_6), 3.30 (dt, J_{5-6}= 7.0Hz, J_{5-NH} = 6.8Hz, 4H, H_5), 4.83 (t, J_{5-NH} = 6.8Hz, 2H, N-H), 7.10 (d, J_{8-9}= 8.0Hz, J_{8-10}= 1.7Hz, 4H, H_8), 7.26-7.34 (m, 6H, H_9 et H_{10}), 7.66 (t, J_{3-4}=7.9Hz, 1H, H_4), 8.02 (dd, J_{3-4}=7.9Hz, J_{3-1}=1.7Hz, 2H, H_3), 8.35 (t, J_{3-1}=1.6Hz, 1H, H_1).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 36.3 (C_6), 44.8 (C_5), 126.0 (C_1), 127.4 (C_{10}), 129.2 (C_{8-9}), 130.5 (C_4), 131.0 (C_3), 137.7 (C_7), 141.9 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.31 min. Pureté (215nm) 90.4%.

CCM : (DCM 98/ MeOH 2) *Rf* = 0.57.
MS : APCI+ *m/z* 446 $[M+H]^+$.
PF : 117-120°C
Rend : 49.5%

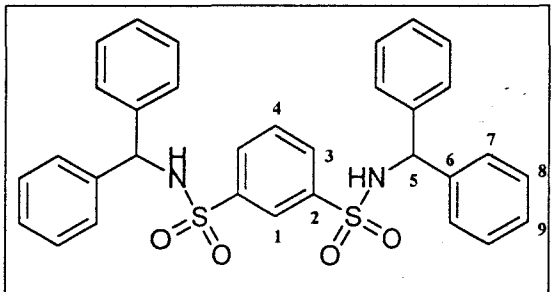
N,N'-di(p-chloro-phenéthyl)-benzène-1,3-disulfonamide (3). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la p-chloro-phenéthylamine. Le résidu obtenu est purifié par HPLC Préparative (gradient de 2h , 30% de tampon B à 100% de tampon B).



(3)

Aspect : poudre blanche.
MM : 513.5g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.74 (t, J_{5-6}= 7.0Hz, 4H, H_6), 3.20 (dt, J_{5-6} = 7.0Hz, J_{5-NH} = 6.5Hz, 4H, H_5), 5.16 (t, J_{5-NH} = 6.1Hz, 2H, N-H), 7.01 (d, J_{8-9}= 8.3Hz, 4H, H_8), 7.19 (d, J_{8-9} = 8.3Hz, 4H, H_9), 7.61 (t, J_{3-4} = 7.9Hz, 1H, H_4), 7.95 (dd, J_{3-4} = 7.9Hz, J_{3-1} = 1.6Hz, 2H, H_3), 8.32 (s, 1H, H_1).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 35.3 (C_6), 44.4 (C_5), 125.5 (C_1), 128.9 (C_9), 130.2 (C_8), 130.2 (C_4), 130.7 (C_3), 132.8 (C_{10}), 136.0 (C_7), 141.7 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.73 min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 99/ MeOH 1) *Rf* = 0.27.
MS : APCI+ *m/z* 514 $[M+H]^+$.
Rend : 11.7%.

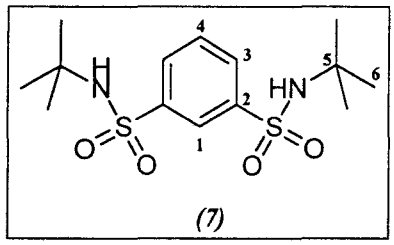
N,N'-dibenzhydryl-benzène-1,3-disulfonamide (6). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la benzhydrylamine. Le résidu obtenu est extrait dans HCl.aqueux /AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée.



(6)

Aspect : poudre blanche.
MM : 568.7g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300MHz) δ(ppm) : 5.49 (d, $J_{5\text{-}NH}$=8.8Hz, 2H, H_5), 6.99 (t, $J_{3\text{-}4}$=7.9Hz, 1H, H_4), 7.04-7.12 (m, 20H, $H_{7\text{-}8\text{-}9}$), 7.46 (dd, $J_{3\text{-}4}$=7.9Hz, $J_{3\text{-}1}$=1.7Hz, 2H, H_3), 8.03 (t, $J_{3\text{-}1}$=1.7Hz, 1H, H_1), 8.1 (d, $J_{5\text{-}NH}$=8.8Hz, 2H, N-H).
^{13}C RMN : (DMSO-d6) (300MHz) δ(ppm) : 61.7 (C_5), 125.9 (C_1), 127.6 (C_9), 127.9 (C_7), 128.6 (C_8), 128.9 (C_4), 129.9 (C_3), 140.8 (C_6), 142.3 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.81 min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 99/ MeOH 1) *Rf*= 0.61.
PF : 172-176.1 °C
Rend : 21.1%

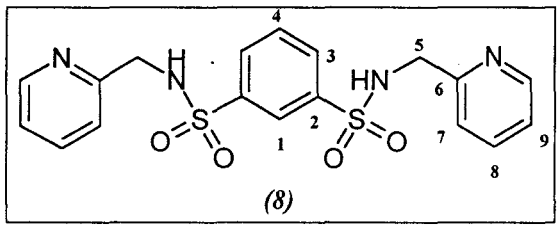
N,N'-di-(ter-butyl)-benzène-1,3-disulfonamide (7). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la t-Bu-amine. Le résidu obtenu est purifié par HPLC Préparative (gradient de 2h , 30% de tampon B à 100% de tampon B).



(7)

Aspect : poudre blanche.
MM : 348.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300MHz) δ(ppm) : 1.10 (s, 18H, H_6), 7.79 (t, $J_{3\text{-}4}$=7.8Hz, 1H, H_4), 7.84 (s, 2H, N-H), 8.03 (dd, $J_{3\text{-}4}$=7.8Hz, $J_{3\text{-}1}$=1.8Hz, 2H, H_3), 8.29 (t, $J_{3\text{-}1}$=1.6Hz, 1H, H_1).
^{13}C RMN : (DMSO-d6) (300MHz) δ(ppm) : 30.57 (C_6), 53.90 (C_5), 125.05 (C_1), 130.30 (C_3), 131.20 (C_4), 146.0 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 4.71min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 98/ MeOH 2) *Rf*= 0.40.
MS : APCI+ *m/z* 349 $[M+H]^+$.
PF : 189.9-191.2°C
Rend :17.2%

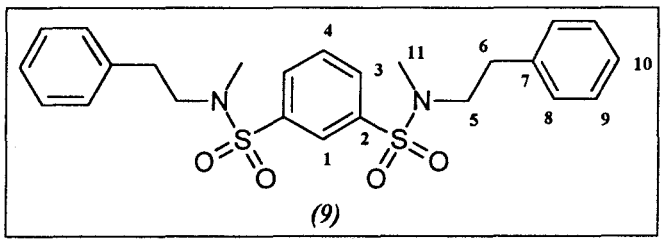
N,N'-di(2-pyridylmethyl)-benzène-1,3-disulfonamide (8). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la 2-aminomethyl-pyridine. Le résidu obtenu est purifié par HPLC Préparative (gradient de 2h , 30% de tampon B à 100% de tampon B).



(8)

Aspect : poudre blanche.
MM 418.5g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300MHz) δ(ppm) : 4.22 (d, $J_{5\text{-NH}}$ = 6.0Hz, 4H, H_5), 7.43 (t, $J_{8\text{-}9}$ = 6.05Hz, 2H, H_8), 7.52 (d, $J_{7\text{-}8}$ =7.9Hz, 2H, H_7), 7.71 (t, $J_{4\text{-}3}$ = 7.8Hz, 1H, H_4), 7.95 (t, $J_{3\text{-}4}$ = 7.7Hz, 2H, H_3), 7.97 (dd, $J_{8\text{-}9}$ = 7.8Hz, $J_{9\text{-}7}$ = 1.5Hz, 2H, H_9), 8.14 (s, 1H, H_1), 8.51 (d, $J_{9\text{-}10}$ = 4.8Hz, 2H, H_{10}), 8.72 (t, $J_{5\text{-NH}}$ = 6.0Hz, 2H, N-H).
^{13}C RMN : (DMSO-d6) (300MHz) δ(ppm) : 48.77 (C_5), 122.52 (C_9), 123.28 (C_7), 125.42 (C_1), 130.92 (C_4), 131.16 (C_3), 137.54 (C_8), 142.52 (C_2), 149.64 (C_{10}), 157.52 (C_6).
HPLC (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 3.08 min. Pureté (215nm) : 92.4%.
CCM (DCM 95/ MeOH 5) *Rf* = 0.22.
PF : 153-155.8 °C
Rend 8.6%

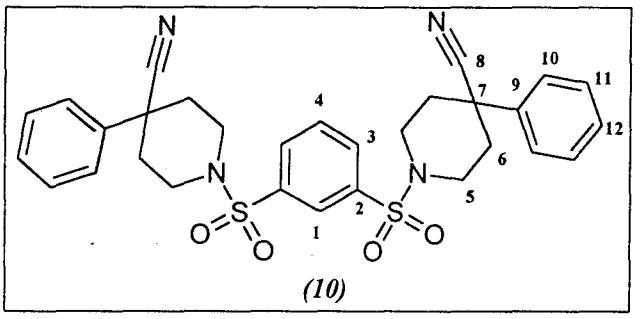
N,N'-dimethyl-N,N'-diphenethyl- benzène-1,3-disulfonamide (9). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la N-methyl-phenéthylamine. Le résidu obtenu est extrait dans HCl.aqueux /AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée.



(9)

Aspect : poudre orange.
MM 472.6 g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.82 (s, 6H, H_{11}), 2.91 (t, $J_{5\text{-}6}$ = 8.1Hz, 4H, H_6), 3.35 (t, $J_{5\text{-}6}$ = 7.9Hz, 4H, H_5), 7.21-7.38 (m, 10H, $H_{8\text{-}9\text{-}10}$), 7.68 (t, $J_{3\text{-}4}$ = 7.8Hz, 1H, H_4), 7.96 (dd, $J_{3\text{-}4}$=7.8Hz, $J_{3\text{-}1}$=1.7Hz, 2H, H_3), 8.23 (t, $J_{3\text{-}1}$=1.6Hz, 1H, H_1).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 35.2 (C_6), 35.6 (C_{11}), 52.2 (C_5), 126.3 (C_1), 127.1 (C_{10}), 129.2 ($C_{8\text{-}9}$), 130.6 (C_4), 131.2 (C_3), 140.1 (C_7), 142.5 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.81 min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 99/ MeOH 1) *Rf* = 0.74.
MS : APCI+ *m/z* 473 $[M+H]^+$.
PF : 94.4-95.6°C
Rend : 55%

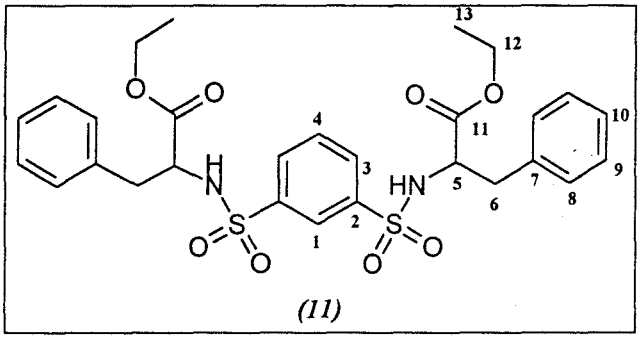
Benzène-1,3-disulfonyl bis -<4-cyano- 4-phenyl-piperidyl amide> (10). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la 4-cyano-4-phenyl-piperidine. Le résidu obtenu est extrait dans HCl.aqueux /AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée. Le résidu obtenu est mis en suspension dans 1 mL de MeOH. La suspension est filtrée. Lefiltrat est évaporé sous vide.



(10)

Aspect : poudre blanche.
MM 574.73 g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.15 (dt, $J_{6ax-6eq}$ = 13.0Hz, $J_{6ax-5eq}$ = 3.7Hz, 4H, H_{6ax}), 2.26 (ld, $J_{6ax-6eq}$= 13.0Hz, 4H, H_{6eq}), 2.62 (dt, $J_{5ax-5eq}$=12.2Hz, $J_{5ax-6eq}$=2.15Hz, 4H, H_{5ax}), 3.96 (ld, $J_{5ax-5eq}$= 12.4Hz, 4H, H_{5eq}), 7.36-7.54 (m, 10H, $H_{10-11-12}$), 8.08 (t, J_{3-4} =7.5Hz, 1H, H_4), 8.10 (d, J_{3-1} =1.7Hz, 1H, H_1), 8.27 (dd, J_{3-1} = 1.8Hz, J_{3-4} = 7.5Hz ,2H, H_3).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 35.2 (C_6), 42.3 (C_7), 44.6 (C_5), 121.7 (C_8), 126.5 (C_{11-1}), 129.2 (C_{12}), 129.9 (C_{10}), 132.7 (C_4), 133.0 (C_3), 137.5 (C_9), 139.8 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.77 min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 99/ MeOH 1) *Rf*=0.65.
MS : APCI+ *m/z* 575 $[M+H]^+$.
PF : 216.2-219.7 °C
Rend : 31.3%

N,N'-di-(2-(3-phényl)propionate d'éthyle)-benzène-1,3-disulfonamide (11). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la H-Phe-OEt. Le résidu obtenu est extrait dans HCl.aqueux /AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée.

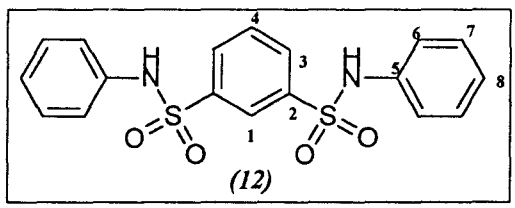


(11)

Aspect : poudre blanche.

MM 588.70g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 1:14 (t, J_{13-12}=7.1Hz, 6H, H_{13}), 3.09 (dd, J_{6-5} = 5.8Hz, J_{gem} = 2.8Hz, 4H, H_6), 3.99 (q, J_{13-12} =7.1Hz, 4H, H_{12}), 4.27 (dt, J_{6-5} = 5.9Hz, J_{6-5} = 5.8Hz, 2H, H_5), 5.26 (d, J_{6-5} = 5.8Hz, 2H, NH), 7.10-7.15 (m, 4H, H_8), 7.25-7.32 (m, 6H, H_{9-10}), 7.55 (t, J_{4-3} = 7.8Hz, 1H, H_4), 7.90 (dd, J_{3-1} = 1.8Hz J_{4-3} = 7.8Hz, 2H, H_3), 8.21 (t, J_{3-1} = 1.7Hz, 1H, H_1).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 14.32 (C_{13}), 39.77 (C_6), 57.22 (C_5), 62.48 (C_{12}), 126.19 (C_1), 127.86 (C_{10}), 129.08 (C_9), 129.84 (C_8), 130.53 (C_4), 131.25 (C_3), 135.10 (C_7), 141.64 (C_2), 170.90 (C_{11}).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.54 min. Pureté (215nm) : 92.5%.
CCM (DCM 99/ MeOH 1) *Rf*=0.33.
MS : APCI+ *m/z* 589 $[M+H]^+$.
Rend : 10.1 %

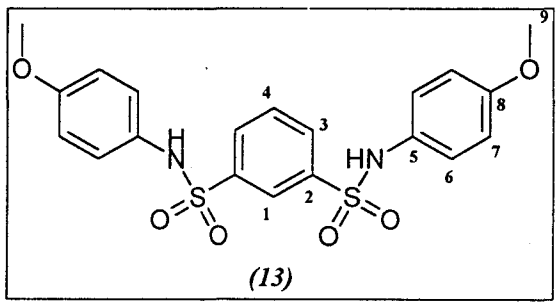
N,N'-diphényl- benzène-1,3-disulfonamide (12). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de l'aniline. Le résidu obtenu est purifié par HPLC Préparative (gradient de 2h , 30% de tampon B à 100% de tampon B).



(12)

Aspect : poudre blanche.
MM : 388.47/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 7.14-7.32 (m, 10H, H_{6-7-8}), 7.43 (t, J_{3-4}=7.9Hz, 1H, H_4), 7.48 (s, 2H, NH), 7.7 (dd, J_{3-4}= 7.9Hz, J_{3-1} = 1.4Hz, 2H, H_3), 8.71 (t, 1H, H_1).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) δ(ppm) : 123.08 (C_6), 126.34 (C_4), 126.69 (C_8), 129.92 (C_{7-1}), 136.02 (C_3), 140.68 (C_5), 148.99 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 4.98 min. Pureté (215nm) : 97,6%.
CCM : (DCM 99/ MeOH 1) *Rf* = 0.29.
MS : APCI+ *m/z* 389 $[M+H]^+$.
Rend : 10.8%

N,N'-di-(p-méthoxy)-phényl- benzène-1,3-disulfonamide (13). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure et de la p-methoxy-aniline. Le produit est préparé selon le protocole général. Le résidu est repris dans le minimum de DMF. Le produit est purifié par HPLC Préparative (gradient de 2h , 30% de tampon B à 100% de tampon B).



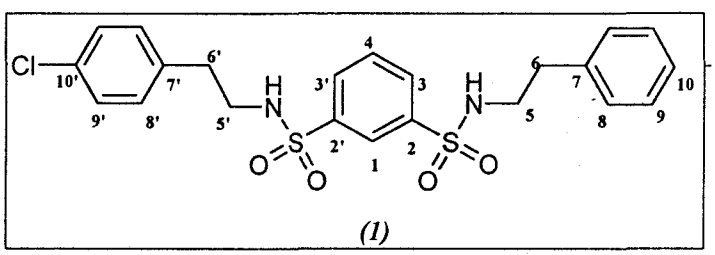
(13)

Aspect : poudre blanche.
MM : 448.52g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 3.80 (s, 6H, H9), 6.81 (d, J_{6-7} = 8.8Hz, 4H, H_6), 7.05 (d, J_{6-7}=8.1Hz, 4H, H_7), 7.41 (t, J_{3-4} = 7.6Hz, 1H, H_4), 7.42 (s, 2H, NH), 7.69 (d, J_{3-4} = 7.8Hz, 2H, H_3), 8.71 (s, 1H, H_1).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 55.85 (C_9), 114.99 (C_7), 126.32 (C_6), 128.47 (C_4), 129.69 (C_1), 131.93 (C_{3-5}), 140.57 (C_2), 158.78 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 4.87min. Pureté (215nm) : 89.8%.
PF : 160.8-162.5 °C
Rend : 10%

B. Synthèse de 1,3 benzenedisulfonamides asymétriques.

Les disulfamides asymétriques sont synthétisés en mélange avec les disulfamides symétriques correspondants selon le protocole général suivant. Dans un tube sont introduits 0.2 mL (0.2 mmol) d'une solution du N-nucléophile A à 0.1 M/DMF avec 1 équivalent de DIEA, auxquels ont ajoute introduits 0.2 mL (0.2 mmol) d'une solution du N-nucléophile B à 0.1 M/ DMF avec 1 équivalent de DIEA. La solution est agitée pendant 5'' au vortex. Puis, 0.4 mL (0.2mmol) d'une solution 0.5M/THF de 1,3 benzènedisulfochlorure sont ajoutés. La solution est agitée au vortex 5'' puis agitée plus doucement pendant 20 minutes. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le mélange est purifié par HPLC Préparative.

N-(1-phenéthyl), N'-(1-(p-chloro)phenéthyl)- benzène-1,3-disulfonamide (1). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,3-benzène-disulfochlorure, de la phenéthylamine et de la p-chloro-phénéthylamine. Le résidu obtenu est purifié par HPLC Préparative (gradient de 2h , 20% de tampon B à 100% de tampon B).



(1)

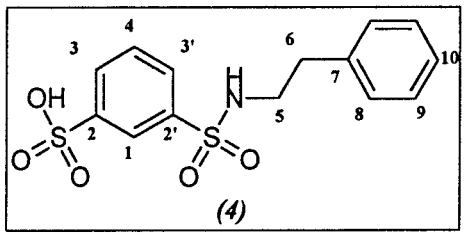
Aspect : poudre blanche.
MM : 479.02 g/mol

^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.80 (t, $J_{5'-6'}$ = 7.1Hz, 2H, $H_{6'}$), 2.83 (t, J_{5-6}= 7.0Hz, 2H, H_6), 3.28 (dt, $J_{5'-6'}$ = 6.9Hz, $J_{5'-NH'}$ = 6.5Hz, 2H, $H_{5'}$), 3.31 (dt, J_{5-6} = 6.4Hz, J_{5-NH} = 6.5Hz, 2H, H_5), 4.76 (t, J_{5-NH} = 6.1Hz, 1H, NH), 4.78 (t, $J_{5'-NH'}$ = 6.1Hz, 1H, NH'), 7.06 (d, $J_{8'-9'}$ = 8.4Hz, 2H, $H_{8'}$), 7.13 (d, $J_{8'-9'}$ = 8.0Hz, J_{8-10} = 1.7Hz, 2H, H_8), 7.21-7.35 (m, 5H, $H_{9-9'-10}$), 7.66 (t, J_{3-4} = 7.9Hz, 1H, H_4), 7.97-8.03 (m, 2H, $H_{3-3'}$), 8.33 (s, 1H, H_1).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.53 min.
MS : APCI+ *m/z* 480 $[M+H]^+$.
Rend : 5.1%

C. Synthèse des acides 3-(sulfamoyl) benzene sulfoniques.

Les acide 3-(sulfamoyl) benzene sulfoniques sont des produits secondaires observés parfois lors de la synthèse des 1,3 benzènedisulfonamides. La synthèse de ce type de composés n'a donc pas été optimisée au mieux. Les conditions de synthèse du composé suivant ont été choisies car le ratio produit secondaire sur 1,3 benzènedisulfonamide est inversé par rapport aux conditions « classiques » où l'acide 3-(sulfamoyl) benzene sulfonique était minoritaire. Ces conditions nécessitent quand même une séparation des produits.

Acide 3-(N-phenéthyl)-sulfonamide-benzènesulfonique (4). Dans un tube sont dissous 82.5 mg (0.3 mmol) de 1,3 benzènedisulfochlorure dans 0.3 mL de THF et 5.93 mL de DMF. La solution est agitée 15 mn. Cela permet l'hydrolyse partielle du sulfochlorure. 75 µL de phénéthylamine et 104.5 µL de DIEA sont alors ajoutés. La solution est agitée 30 mn puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait dans HCl.aqueux/AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée. Le résidu est purifié par HPLC Préparative (4mL/min ; gradient 2h de 20% de Tampon B à 100% de Tampon B



(4)

Aspect : poudre blanche.
MM : 323.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (600MHz) δ(ppm) : 2.65 (t, J_{5-6} = 7.8Hz, 2H, H_6), 2.92 (dt, J_{5-6} = 7.8Hz, J_{5-NH} = 5.8Hz, 2H, H_5), 7.13 (d, J_{8-9} = 6.9Hz, 2H, H_8), 7.16 (t, J_{9-10} = 7.4Hz, 1H,H_{10}), 7.24 (t, J_{8-9} = 6.9Hz, J_{9-10} = 7.4Hz, 2H, H_9), 7.52 (t, J_{3-4} = 7.7Hz, 1H, H_4), 7.69 (dt, J_{1-3} = 1.2Hz, J_{3-4} = 7.7Hz, 1H, H_3), 7.76 (t, J_{5-NH} = 5.8Hz, 1H, NH), 7.79 (dt, $J_{1-3'}$ = 1.3Hz, $J_{3'-4}$ = 7.7Hz, 1H, $H_{3'}$), 8.02 (t, $J_{1-3'ou3}$ = 1.7Hz, 1H, H_1).
^{13}C RMN : (DMSO-d6) (600MHz) δ(ppm) : 36.1 (C_6), 44.9 (C_5), 124.5 (C_1), 127.1 (C_{10}), 127.4 (C_3), 129.2 (C_9), 129.5 (C_8), 129.7 (C_4), 130.2 ($C_{3'}$), 139.5 (C_7), 140.7 ($C_{2'}$), 150.2 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 3.77 min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 90/ MeOH 10) *Rf* = 0.41
Rend : 12.4%

D. Programme utilisé pour simuler l'avancement de la réaction de synthèse des 1,3-benzènedisulfonamides.

```
subroutine integral (c0,epst,r,rr,u11,u12,u22)

u0=c0 ;a1=c0 ;a2=c0
u1=0 ;u2=0 ;u11=0 ;u21=0 ;u12=0
repeat
{
        v1=u0*a1
        v2=r*u0*a2
        v11 = u1*a1*rr
        v12 =r*u2*a2*rr
        v21 = u2*a1*rr
        v22 = r*u2*a2*rr
        vmax=amax(v1,v2,v11,v12,v21,v22)
        dt=epst/vmax
        v1=v1*dt ; v2=v2*dt ;v11=v11*dt ;v12=v12*dt ;v21=v21*dt ;v22=v22*dt
        u0=amax1(u0-v1-v2,0)
        u1=amax1(u1+v1-v11-v12,0)
        u2=amax1(u2+v2-v21-v22,0)
        a1=amax1(a1-v1-v11-v12,0)
        a2=amax1(a2-v2-v21-v22,0)
        u11=u11+v11
        u12=u12+v12+v21
        u22=u22+v22
                write (*, ''(8f15.6)'') u0/c0,a1/c0,a2/c0,u1/c0,u2/c0,u11/c0,u22/c0,u12/c0
}
until ((u0.lt.1e-3*c0).and. (u1.lt.1e-3*c0).and. (u2.lt.1e-3*c0))
test=2*u11+u12+u1+a1
if (abs(c0-test).gt.1e-2*c0)
{
        write (*,''(a)'' ) ''check after integration failed..''
        stop
}
test=2*u22+u12+u2+a2
if (abs(c0-test).gt.1e-2*c0)
{
        write (*,''(a)'' ) ''check after integration failed..''
        stop
}
test=u0+u1+u2+u11+u12+u22
if (abs(c0-test).gt.1e-2*c0)
{
        write (*,''(a)'' ) ''check after integration failed..''
```

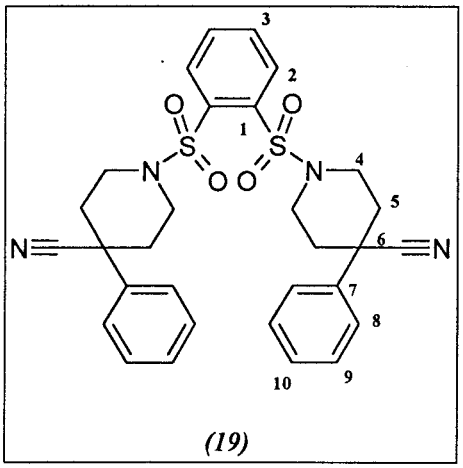
```
        stop
}

return
end


program kinetics

c0=1 ; epst=1e-3
do t=0,2,0.1
{
        r=10**t
        do t1=-1,1,0.1
        {
        rr=0.1
        call integral(c0,epst,r,rr,u11,u12,u22)
        write (*,''(2f15.6)'') t,t1,u12/(u11+u12+u22)
        }
}
end
```

E.2.I.2 Synthèse de 1,2 benzenedisulfonamides.

A. Synthèse de 1,2 benzenedisulfonamides symétriques d'amines secondaires.

Dans un tube, sont introduits 0.2mmol d'une solution d'amine secondaire auxquels on ajoute 34.7µL (0.2mmol, 1 éq.) de DIEA (plus un équivalent de DIEA par équivalent de sel à neutraliser) et du DMF qsp 2 mL. 0.2 mL d'une solution 0.5M de 1,2 benzènedisulfochlorure sont ensuite ajoutés. La solution est agitée au vortex 5 s puis agitée plus doucement pendant 20 mn. Le milieu réactionnel est évaporé.

Benzène-1,2-disulfonyl bis-<4-cyano-4-phényl-piperidyl amide> (19). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,2-benzènedisulfochlorure et de la 4-cyano-4-phényl-piperidine. Le résidu est extrait dans HCl.aqueux/AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée sous pression réduite.



(19)

Aspect : poudre rose.
MM 574.73 g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.19 (m, 8H, H_5), 3.31 (dt, $J_{4ax-4eq}$ = 11.0Hz, $J_{4ax-5eq}$ = 3.8Hz, 4H, H_{4ax}), 4.10 (ld, , $J_{4ax-4eq}$ = 13.5Hz, 4H, H_{4eq}), 7.33-7.57 (m, 10H, H_{8-9-10}), 7.78 (dd, $J_{3-2'}$ = 3.4Hz, J_{3-2} = 5.9Hz, 2H, H_3), 8.27 (dd, $J_{3'-2}$ = 3.4Hz, J_{3-2} = 5.9Hz ,2H, H_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.31 min. Pureté (215nm) : 100%.
CCM : (DCM 99/ MeOH 1) *Rf*=0.43.
PF : 145-149 °C
Rend : 63%

B. Protocole général de synthèse de 1,2 benzenedisulfonamides asymétriques d'amines secondaires.

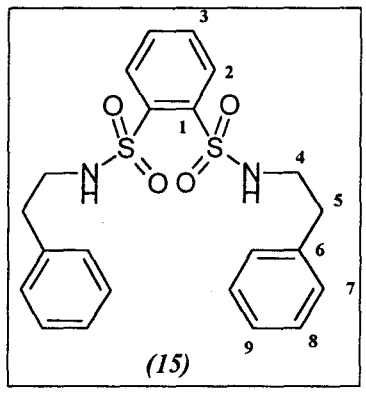
Dans un tube sont introduits 0.2 mL (0.2 mmol) d'une solution du N-nucléophile A à 0.1 M/DMF avec 1 équivalent de DIEA (plus un équivalent de DIEA par équivalent de sel à neutraliser), auxquels est ajouté 0.2 mL (0.2 mmol) d'une solution du N-nucléophile B à 0.1 M/ DMF avec 1 équivalent de DIEA (plus un équivalent de DIEA par équivalent de sel à neutraliser). La solution est agitée pendant 5 s au vortex. Puis, 0.4 mL (0.2mmol) d'une solution 0.5M/THF de 1,3 benzènedisulfochlorure sont ajoutés. La solution est agitée au vortex 5 s puis agitée plus doucement pendant 20 mn. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le mélange est purifié par HPLC Préparative.

C. Synthèse de 1,2 benzenedisulfonamides symétriques d'amines primaires.

Dans un tube, sont introduits 0.2mmol d'une solution d'amine secondaire auxquels on ajoute 34.7µL (0.2mmol, 1 éq.) de DIEA (plus un équivalent de DIEA par équivalent de sel à neutraliser) et du DCM qsp 2 mL. 0.2 mL d'une solution 0.5M de 1,2 benzènedisulfochlorure sont ensuite ajoutés. La solution est agitée au vortex 5 s puis agitée plus doucement pendant 20 mn. Le milieu réactionnel est évaporé.

N,N'-di-(1-phenéthyl)-benzène-1,2-disulfonamide (15). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,2-benzène-disulfochlorure et de la phenéthylamine. Le résidu est

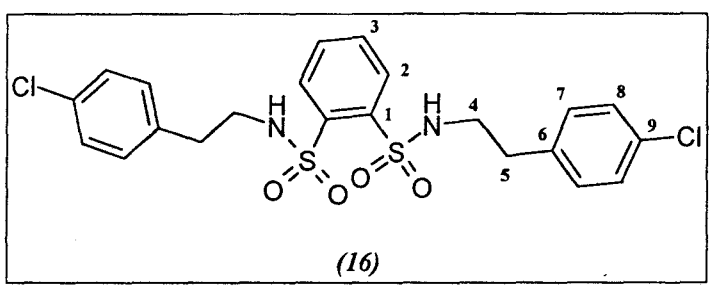
extrait dans HCl.aqueux/AcOEt. La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée sous pression réduite.



(15)

Aspect : poudre blanche.
MM 444.5 g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.79 (t, J_{4-5} = 7.6Hz, 4H, H_5), 3.21 (dt, J_{4-5} = 7.6Hz, J_{4-NH} = 6.0Hz, 4H, H_4), 6.25 (t, J_{4-NH} = 6.0Hz, 2H, N-H), 7.12 (d, J_{7-8} = 6.3Hz, J_{7-9} = 1.7Hz, 4H, H_7), 7.25-7.31 (m, 6H, H_{8-9}), 7.75 (dd, J_{2-3} = 5.8Hz, $J_{2'-3}$ = 2.3Hz, 2H, H_3), 8.22 (dd, J_{2-3} = 5.8Hz, $J_{2-3'}$ = 2.3Hz , 2H, H_2).
^{13}C RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 36.4 (C_5), 45.3 (C_4), 127.2 (C_{1-9}), 129.0 (C_{7-8}), 132.1 (C_2), 133.4 (C_3), 137.9 (C_6).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.82 min.
CCM : (DCM 98/ MeOH 2) *Rf*= 0.84.
PF : 165-167.8°C
Rend : 67.8%

N,N'-di(p-chloro-phenéthyl)-benzène-1,2-disulfonamide (16). Le produit est préparé selon le protocole général à partir du 1,2-benzènedisulfochlorure et de la p-chloro-phenéthylamine. Le résidu est mis en suspension dans l'ACN. Le précipité obtenu est filtré.



(16)

Aspect : poudre blanche.
MM : 513.5g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6/D_2O) (600MHz) δ(ppm) : 2.61 (t, J_{4-5} = 6.8Hz, 4H, H_5), 3.05 (t, J_{4-5} = 6.8Hz, 4H, H_4), 7.06 (ld, J_{7-8} = 8.3Hz, 4H, H_7), 7.19 (ld, J_{7-8} = 8.3Hz, 4H, H_8), 7.77 (dd, J_{2-3} = 5.8Hz, $J_{2'-3}$ = 3.3Hz, 2H, H_3), 7.98 (dd, J_{2-3} = 5.8Hz, $J_{2-3'}$ = 3.3Hz, 2H, H_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.73 min. Pureté (215nm) : 100%.

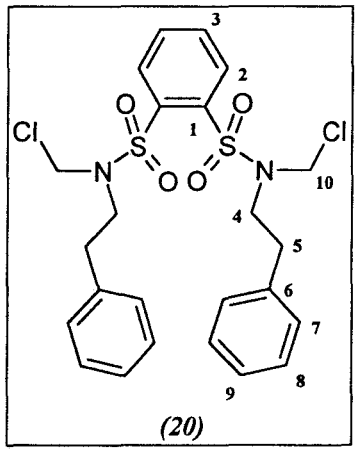
PF : 201.4-203.2°C
Rend : 15.5%

D. Protocole général de synthèse de 1,2 benzenedisulfonamides asymétriques avec au moins une amine primaire.

Dans un tube sont introduits 0.2 mL (0.2 mmol) d'une solution de l'amine primaire A à 0.1 M/DCM avec 1 équivalent de DIEA, auxquels ont ajoute introduits 0.2 mL (0.2 mmol) d'une solution de l'amine B à 0.1 M/ DCM avec 1 équivalent de DIEA. La solution est agitée pendant 5'' au vortex. Puis, 0.4 mL (0.2mmol) d'une solution 0.5M/THF de 1,2 benzènedisulfochlorure sont ajoutés. La solution est agitée au vortex 5 s puis agitée plus doucement pendant 20 minutes. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le mélange peut être purifié par HPLC Préparative.

E. Synthèse de N,N'-di-(1-phénéthyl)-N,N'-di-(chloro-methyl)-1,2 benzenedisulfonamide (20).

Dans un ballon sont introduits 0.2 mmol de N,N'-di-(1-phénéthyl)-1,2-benzènedisulfonamide *(15)*. 15 mL de TFA pur et 20µL (1.3 éq.) de chloro-methyl-methyl-ether sont ensuite ajoutés. La solution est agitée pendant 8 heures. 20 mL d'H_2O sont alors ajoutés et la solution est extraite au DCM. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) puis évaporée.



(20)

Aspect : poudre marron.
MM 541.5 g/mol
^{1}H RMN : ($CDCl_3$) (300MHz) δ(ppm) : 2.89 (t, J_{4-5} = 5.83Hz, 4H, H_5), 3.61 (t, J_{4-5} = 5.9Hz, 4H, H_4), 5.6 (s, 4H, H_{10}), 7.04-7.11 (m, 10H, H_{7-8-9}), 7.61 (dd, J_{2-3} = 5.9Hz, $J_{2'-3}$ = 3.3Hz, 2H, H_3), 8.10 (dd, J_{2-3} = 5.9Hz, $J_{2-3'}$ = 3.3Hz , 2H, H_2).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 9 min) t_R = 5.7 min.
CCM : (DCM 98/ MeOH 2) *Rf* = 0.72.

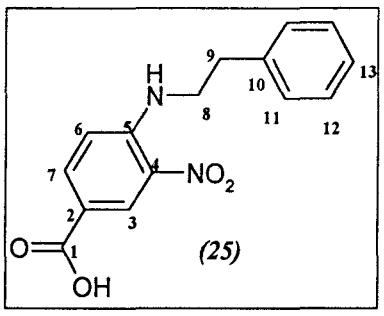
E.2.II Synthèse de 4-(N-substitués)amino, 3-nitro-benzylamides.

Les synthèses décrites dans ce paragraphe sont réalisées dans des tubes en verre borosilicate Kimble (13*100mm) pour des quantités de l'ordre de 40 µmoles à 1 mmoles et dans des plaques Beckman Deepwell 96 puits pour des quantités de 5 à 10 µmoles.

E.2.II.1 Synthèse des acides 4-(N-substitués)amino, 3-nitro-benzoïques.

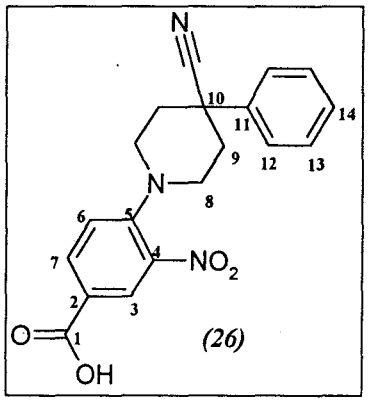
Dans un tube, sont pesés 0.2mmol d'une solution d'amine auxquels sont ajoutés 104.1µL (0.6mmol, 3 éq.) de DIEA (plus un équivalent de DIEA par équivalent de sel à neutraliser) et du DMF qsp 2 mL. Puis, 0.2ml (0.1mmol) d'une solution 0.5 M/DMF d'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque. Le solution est agitée au vortex pendant 5 s puis chauffée à 75°C pendant 3h. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous vide. Le résidu obtenu est extrait dans H_2O/DCM. La phase organique est évaporée.

Acide 3-nitro,4-(N-phenéthyl)amino-benzoïque (25). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque et de la phénéthylamine.



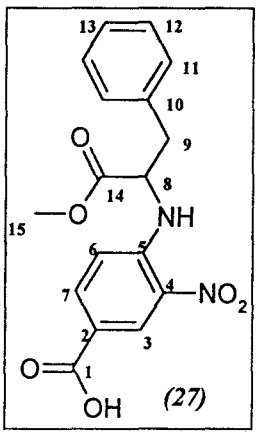
Aspect : poudre jaune.
MM : 286.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO) (300MHz) δ(ppm) : 2.77 (t, J = 7.7Hz, 2H, H_9), 3.47 (dt, J= 7.4Hz, $J_{H\text{-}NH}$ = 6.2Hz, 2H, H_8), 6.98 (d, J = 9.2Hz, 1H, H_7), 7.0-7.11 (m, 2H, H_{12}), 7.13-7.14 (m, 3H, $H_{12\text{-}13}$), 7.78 (dd, J = 9.1Hz, J' = 1.7Hz, 1H, H_7), 8.29 (t, J = 5.6Hz, 1H, N*H*), 8.41 (d, J = 2.1Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.62 min.
MS : APCI+ *m/z* 287 $[M+H]^+$.
Rend : 85%.

Acide 4-(4-cyano,4-phényl),3-nitro-piperidinyl-benzoïque (26). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque et de la 4-cyano,4-phényl-piperidine.



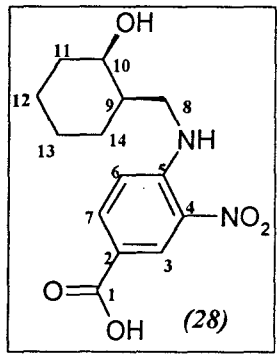
Aspect : poudre jaune.
MM : 351.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO) (300MHz) δ(ppm) : 1.96-2.00 (m, 2H, H_{9ax}), 2.07-2.12 (m, 2H, H_{9eq}), 3.05-3.13 (m, 2H, H_{8ax}), 3.29-3.33 (m, 2H, H_{8eq}), 7.19-7.41 (m, 6H, $H_{6\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$), 7.87 (dd, J = 8.7Hz, J' = 2.1Hz, 1H, H_7), 8.14 (d, J = 2.1Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.67 min.
MS : APCI+ *m/z* 352 $[M+H]^+$.
Rend : 78%.

Acide 4-(1-methoxycarbonyl-2-phenyl-ethylamino)-3-nitro-benzoïque (27). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque et de la phénylalanine methyl ester.



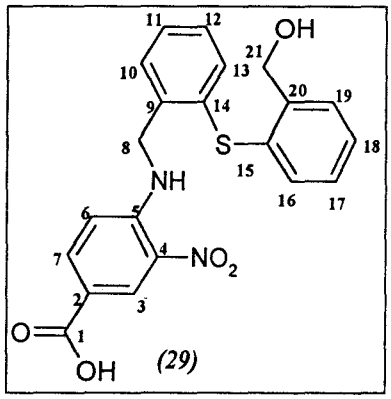
Aspect : poudre jaune.
MM : 344.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO) (300MHz) δ(ppm) : 3.07 (d, J = 5.8Hz, 2H, H_9), 3.36-3.42 (m, 1H, H_8), 3.53 (s, 3H, H_{15}), 6.94 (d, J = 9.2Hz, 1H, H_6), 6.97-7.16 (m, 5H, $H_{12\text{-}13\text{-}14}$), 7.77 (dd, J = 9.1Hz, J' = 2.1Hz, 1H, H_7), 8.30 (d, J = 7.9Hz, 1H, N*H*), 8.42 (d, J = 2.0Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.55 min.
MS : APCI+ *m/z* 345 $[M+H]^+$.
Rend : 67%.

Acide 4-(cis-(1-hydroxy-cyclohexanyl))methylamino-3-nitro-benzoïque (28). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque et du cis-aminomethyl-1-cyclohexanol.



Aspect : poudre jaune.
MM : 294.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO) (300MHz) δ(ppm) : 1.10-1.53 (m, 9H, $H_{9\text{-}11\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$), 3.09-3.24 (m, 2H, H_8), 3.64 (s, 1H, H_{10}), 6.95 (d, J = 9.2Hz, 1H, H_6), 7.76 (dd, J = 9.1Hz, J' = 2.1Hz, 1H, H_7), 8.41 (d, J = 2.0Hz, 1H, H_3), 8.55 (d, J = 7.9Hz, 1H, N*H*).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.24 min.
MS : APCI+ *m/z* 295 $[M+H]^+$.
Rend : 86%.

Acide 4-N-(2-(2-hydroxymethyl)thiophenyl)benzyl)-amino-3-nitro-benzoïque (29). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-fluoro,3-nitro-benzoïque et de l'alcool 2-((2-aminomethyl)phenylthio)benzylique.



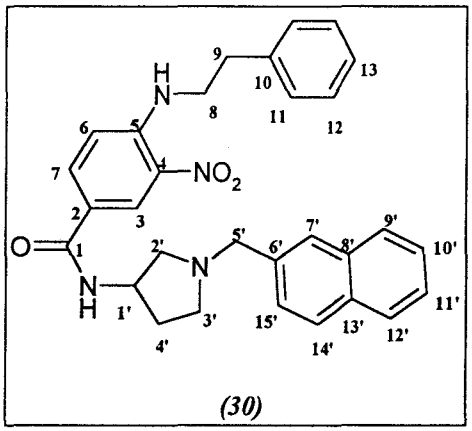
Aspect : poudre jaune.
MM : 410.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO) (300MHz) δ(ppm) : 4.41 (s, 2H, H_{21}), 4.50 (d, J = 6.0Hz, 2H, H_8), 6.51 (d, J = 9.1Hz, 1H, H_{11}), 6.88 (dd, J = 7.7Hz, J' = 1.2Hz, 1H, H_{18}), 7.01-7.19 (m, 6H, $H_{10\text{-}12\text{-}13\text{-}16\text{-}17\text{-}19}$), 7.38 (dd, J = 7.6Hz, J' = 1.1Hz, 1H, H_6), 7.67 (dd, J = 8.9Hz, J' = 2.0Hz, 1H, H_7), 8.43 (d, J = 2.0Hz, 1H, H_3), 8.77 (t, J = 6.1Hz, 1H, N*H*).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.59 min.

MS : APCI+ *m/z* 411 $[M+H]^+$.
Rend : 74%.

E.2.II.2 Synthèse des 4-(N-substitués)amino, 3-nitro-benzylamides en *x* fois 5 µmoles.

Dans x puits d'une plaque Deepwell sont introduits 9µL (5µmol, 1 éq.)d'une solution 0.56M dans le DMF d'acide 4-(N-substitués)amino-3-nitro-benzoïque avec 1 équivalent de DIEA et 42µL (10µmol, 1 éq.) d'une solution 0.25M dans le THF de N,N'carbonyldiimidazole. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante. 50 µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1M dans le DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait dans H_2O/DCM. La phase organique est évaporée.

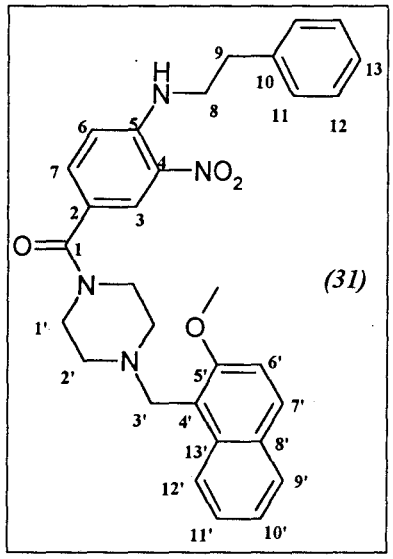
1-<3-nitro-4-(phenéthylamino)-benzoyl>-3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine (30). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 3-nitro,4-(N-phenéthyl)amino-benzoïque ***(25)*** et de la 3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine.



(30)

Aspect : huile jaune.
MM : 494.60 g/mol
^{1}H RMN et COSY(^{1}H,^{1}H): (CD_3CO_2D) (300MHz) δ(ppm) : 2.24-2.30 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 2.53-2.61 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 2.97 (s, 2H, $H_{5'}$), 2.97 (t, *J* = 7.1Hz, 2H, H_9), 3.43-3.48 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.52-3.71 (m, 4H, H_8 et $H_{pyrrolidine}$), 3.83-3.87 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 4.83-4.87 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 6.93 (d, *J* = 9.2Hz, 1H, H_6), 7.19-7.31 (m, 5H, $H_{11-12-13}$), 7.50-7.53 (m, 2H, $H_{10'-11'}$), 7.60 (dd, *J* = 1.5Hz, *J* = 8.4Hz, 1H, $H_{14'}$), 7.83-7.91 (m, 4H, $H_{7'-15'}$, N*H* et N*H*CO), 7.94 (dd, *J* = 2.2Hz, *J'* = 9.1Hz, 1H, H_7), 7.99-8.01 (m, 2H, $H_{9'-12'}$), 8.58 (d, *J* = 2.2Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.61 min.
MS : APCI+ *m/z* 495 $[M+H]^+$.
Rend : 81%.

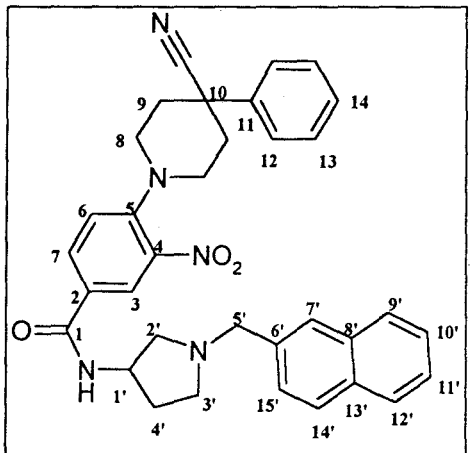
1-<3-nitro-4-(phenéthylamino)-benzoyl<-4-methyl-(2-methoxy)naphtyl-piperazine (31). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 3-nitro,4-(N-phenéthyl)amino-benzoïque ***(25)*** et de la 4-methyl-(2-methoxy)naphtyl-piperazine.



(31)

Aspect : huile jaune.
MM : 524.63 g/mol
^{1}H RMN et COSY(^{1}H,^{1}H): (CD_3CO_2D) (300MHz) δ(ppm) : 1.22-1.27 (m, 2H, $H_{2'ax}$), 2.84-3.07 (m, 2H, $H_{2'eq}$), 3.32-3.77 (m, 4H, $H_{1'}$), 3.47 (t, J = 7.1Hz, 2H, H_9), 3.62 (dt, J = 7.1Hz, $J_{H\text{-}NH}$ = 1.7Hz, 6.5H, H_8), 3.86 (s, 3H, $H_{13'}$), 4.72 (s, 2H, $H_{3'}$), 6.86 (d, J = 9.1Hz, 1H, H_6), 7.06-7.14 (m, 5H, $H_{7'\text{-}10'\text{-}11\text{-}13}$), 7.26 (d, J = 9.0Hz, 2H, H_{12}), 7.38-7.44 (m, 2H, $H_{11'}$ et N*H*), 7.47 (dd, J = 9.0Hz, J' = 2.0Hz, 1H, H_7), 7.88 (d, J = 9.1Hz, 1H, $H_{9'}$), 7.95 (d, J = 8.7Hz, 1H, $H_{12'}$), 8.13 (d, J = 2.0Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.57 min.
MS : APCI+ *m/z* 525 $[M+H]^+$.
Rend : 87%.

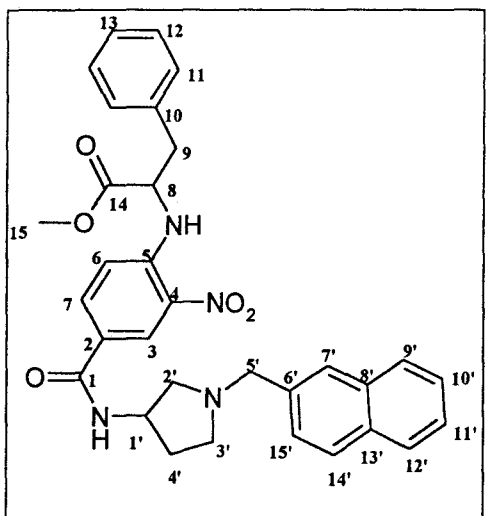
1-<4-((4-cyano,4-phenyl-piperazinyl)-3-nitro-benzoyl>-3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine (32). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-(4-cyano,4-phényl),3-nitro-piperidinyl-benzoïque *(26)* et de la 3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine.



(32)

Aspect : huile jaune.
MM : 559.6 g/mol
^{1}H RMN : (CD_3CO_2D) (300MHz) δ(ppm) : 2.03-2.16 (m, 5H, H_9 et $H_{pyrrolidine}$), 2.46-2.49 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.17-3.36 (m, 7H, $H_{5'-8}$ et $H_{pyrrolidine}$), 3.49-3.53 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.57-3.61 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.74-3.78 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 4.78-4.81 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 7.15 (d, J = 8.8Hz, 1H, H_6), 7.30 (t, J = 7.8Hz, 2H, H_{12}), 7.38-7.45 (m, 5H, $H_{10'-11'-11-13}$), 7.49 (dd, J = 1.5Hz, J = 8.5Hz, 1H, $H_{14'}$), 7.83-7.91 (m, 3H, N*H*CO), 7.89 (s, 2H, $H_{9'-12'}$), 7.91 (dd, J = 9.4Hz, J' = 2.2Hz, 1H, H_7), 8.19 (d, J = 2.2Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.67 min.
MS : APCI+ *m/z* 510 $[M+H]^+$.
Rend : 74%.

1-<4-(1-methoxycarbonyl-2-phenyl-ethylamino)-3-nitro-benzoyl>-3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine (33). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-(1-methoxycarbonyl-2-phenyl-ethylamino)-3-nitro-benzoïque *(27)* et de la 3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine.

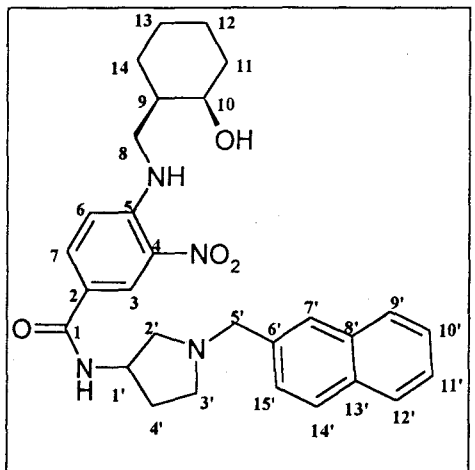


(33)

Aspect : huile jaune.
MM : 552.6 g/mol
^{1}H RMN et COSY(^{1}H, ^{1}H): (CD_3CO_2D) (300MHz) δ(ppm) : 2.12-2.18 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 2.43-2.48 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.09-3.21 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.26-3.31 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.50-3.60 (m, 9H, $H_{8-9-15-5'}$ et $H_{pyrrolidine}$), 3.62-3.73 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 4.78-4.81 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 6.69 (d, J = 9.2Hz, 1H, H_6), 6.96-7.14 (m, 5H, $H_{11-12-13}$), 7.37-7.49 (m, 3H, $H_{10'-11'-14'}$), 7.71-7.82 (m, 5H, $H_{7-7'-15'}$, N*H* et N*H*CO), 7.83-7.91 (m, 2H, $H_{9'-12'}$), 8.47 (ls, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.58 min.
MS : APCI+ *m/z* 553 $[M+H]^+$.
Rend : 61%.

1-<4-(cis-(1-hydroxy-cyclohexanyl)methylamino)-3-nitro-benzoyl>-3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine (34). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de

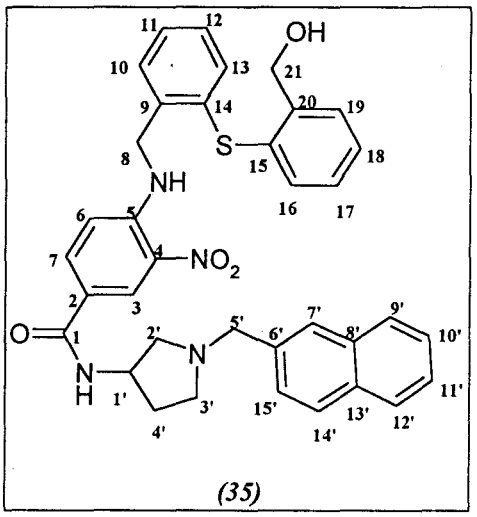
l'acide 4-(cis-(1-hydroxy-cyclohexanyl))methylamino-3-nitro-benzoïque ***(28)*** et de la 3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine.



(34)

Aspect : huile jaune.
MM : 502.6 g/mol
^{1}H RMN : (CD_3CO_2D) (300MHz) δ(ppm) : 1.21-1.52 (m, 8H, $H_{11-12-13-14}$), 1.69-1.72 (m, 2H, H_8), 2.13-2.18 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 2.43-2.47 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.06-3.37 (m, 3H, $H_{5'}$ et $H_{pyrrolidine}$), 3.58-3.62 (m, 2H, $H_{pyrrolidine}$), 3.67-3.72 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.95 (ls, 1H, H_{10}), 4.70-4.73 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 6.82 (d, J = 9.3Hz, 1H, H_6), 7.35-7.41 (m, 2H, $H_{10'-11'}$), 7.48 (dd, J = 8.5Hz, J' = 1.5Hz, 1H, $H_{14'}$), 7.70-7.82 (m, 5H, $H_{7-7'-15'}$, N*H* et N*H*CO), 8.46 (d, J = 2.2Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.36 min.
MS : APCI+ *m/z* 504 $[M+H]^+$.
Rend : 55%.

1-<4-(N-(2-(2-hydroxymethyl)thiophenyl)benzyl)-amino)-3-nitro-benzoyl>-3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine (35). Le produit est préparé selon le protocole général à partir de l'acide 4-N-(2-(2-hydroxymethyl)thiophenyl)benzyl)-amino-3-nitro-benzoïque ***(29)*** et de la 3-(N-(2-naphtyl)-methyl)-pyrrolidinyl-amine.



Aspect : huile jaune.
MM : 618.8 g/mol
^{1}H RMN : (CD_3CO_2D) (300MHz) δ(ppm) : 2.08-2.16 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 2.32-2.49 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 2.83 (s, 2H, H_8), 3.26-3.30 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 3.56-3.72 (m, 5H, $H_{5'}$ et $H_{pyrrolidine}$), 4.68 (d, J = 4.3Hz, 2H, H_{21}), 5.05-5.14 (m, 1H, $H_{pyrrolidine}$), 6.57 (d, J = 9.2Hz, 1H, H_6), 6.90-7.24 (m, 7H, $H_{10\text{-}11\text{-}12\text{-}17\text{-}18\text{-}19\text{-}11'}$), 7.33-7.41 (m, 5H, $H_{10'\text{-}14'\text{-}16}$, N*H* et N*H*CO), 7.69-7.77 (m, 5H, $H_{7\text{-}13\text{-}15'\text{-}9'\text{-}12'}$), 7.88 (s, 1H, $H_{7'}$), 8.46 (d, J = 2.2Hz, 1H, H_3).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.63 min.
MS : APCI+ *m/z* 620 $[M+H]^+$.
Rend : 57%.

E.3. PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 3

E.3.I Découverte et optimisation de ligands du récepteur BZR.

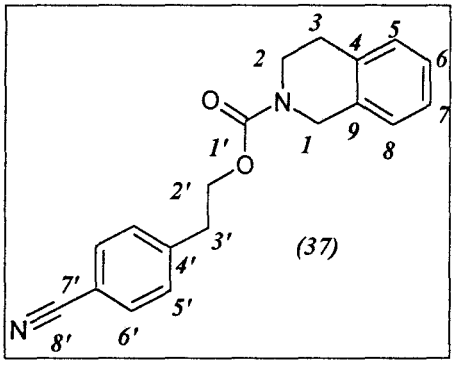
E.3.I.1 Résultats du criblage primaire

A. Synthèse de carbamates en microplaques à l'échelle de 5µmol.

A.1. 42 µL (10.3 µmol, 2.1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'alcool. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans l'AcOEt et purifié par extractions acido-basiques. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite.

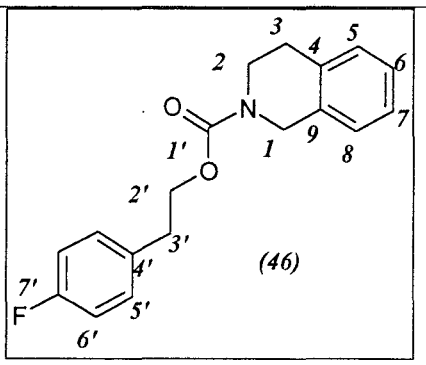
A.2. 42 µL (10.3 µmol, 2.1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'alcool. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

4-cyano-phénéthyl- 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin carboxylate (37). Le produit est obtenu à partir du 4-cyano-phénéthanol et de la 1,2,3,4-tetrahydoisoquinoline selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle.



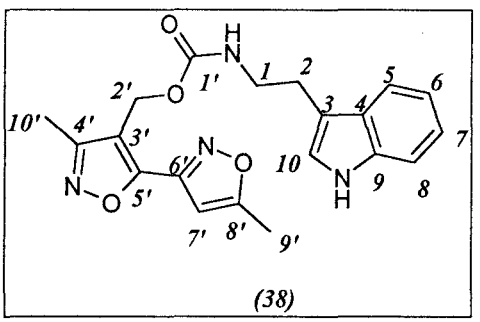
Aspect : poudre blanche.
MM : 306.4 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 2.69 (m, 2H, H_3), 2.97 (t, J= 6.4 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.52 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H_2), 4.23 (t, J= 6.5 Hz, 2H, $H_{2'}$), 4.43 (s, 1H, H_1), 7.10-7.15 (m, 2H, H_{5-6}), 7.35-7-45 (m, 3H, $H_{5'-6'-7}$), 7.7 (m, 1H, H_8).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6; 300 MHz) δ 28.5 (C_3), 35.2 ($C_{3'}$), 42.8 (C_2), 45.6 (C_1), 65.2 ($C_{2'}$), 110.2 ($C_{7'}$), 119.4 ($C_{8'}$, CN), 126.5 (C_6), 126.9 (C_7), 129.0 (C_5), 129.1 (C_4), 129.3 (C_8), 130.5 ($C_{5'}$), 132.6 ($C_{6'}$), 134.7 (C_9), 145.0 ($C_{4'}$), 154.4 ($C_{1'}$, NCOO).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.69 min.
MS : APCI+ *m/z* 307 $[M+H]^+$.
Rend : 87%.

4-fluoro-phenethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinyl-2-carboxylate (46). Le produit est obtenu à partir du 4-fluoro-phénéthanol et de la 1,2,3,4-tetrahydoisoquinoline selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle.



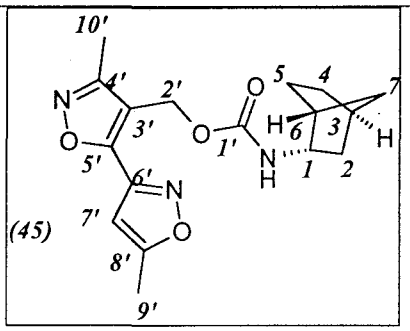
Aspect : poudre blanche.
MM : 299.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 2.70 (m, 2H, H_3), 2.86 (t, J= 6.6 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.51 (t, J = 5.8 Hz, 2H, H_2), 4.18 (t, J= 6.7 Hz, 2H, $H_{2'}$), 4.46 (s, 1H, H_1), 7.06-7.27 (m, 8H, $H_{5-6-7-8-5'-6'}$).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.92 min.
MS : APCI+ *m/z* 300 $[M+H]^+$.
Rend : 52.7%.

3-methyl-5-(5-methylisoxazol-3-yl)-isoxazole-4-methyl-tryptamine carboxylate (38). Le produit est obtenu à partir du 3-hydroxymethyl-5-(5-methylisoxazol-3-yl)-isoxazole et de la tryptamine selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle.



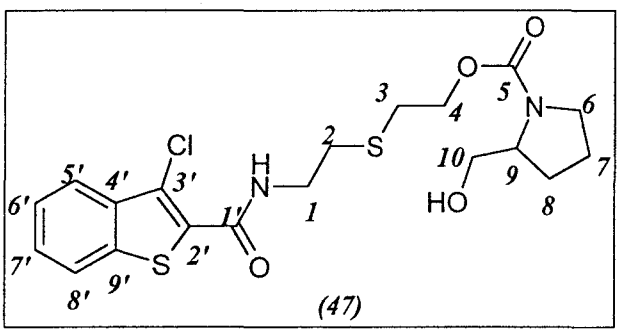
Aspect : poudre jaune pâle.
MM : 380.4 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.34 (s, 3H, $H_{10'}$), 2.52 (s, 3H, $H_{9'}$), 2.81 (t, J= 8.2 Hz, 2H, H_2), 3.25 (dt, J= 8.2 Hz, J_{N-H} = 6.2 Hz, 1H, H_1), 5.14 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.82 (s, 1H, $H_{7'}$), 6.95 (t, J= 7.4 Hz, 1H, H_6), 7.05 (t, J= 7.2 Hz, 1H, H_7), 7.12 (d, J= 1.8 Hz, 1H, H_{10}), 7.32 (d, J= 8.1 Hz, 1H, H_8), 7.38 (t, J= 5.6 Hz, 1H, N*H*COO), 7.48 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H_5), 11.1 (s, 1H, N*H* indole).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.49 min.
MS : APCI+ *m/z* 381 $[M+H]^+$; 338 $[M-44]^+$.
Rend : 72.0%.

3-methyl-5-(5-methylisoxazol-3-yl)-isoxazole-2-endo-(bicyclo<2.2.1>hept-2-yl)amino carboxylate (45). Le produit est obtenu à partir du 3-hydroxymethyl-5-(5-methylisoxazol-3-yl)-isoxazole et de la 2-endo-(bicyclo<2.2.1>hept-2-yl)amine selon la procédure A.2 menée 9 fois en parallèle.



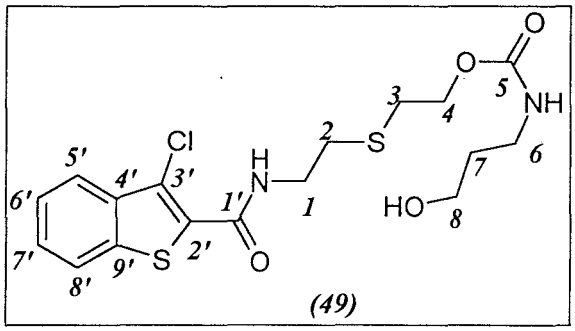
Aspect : poudre blanche.
MM : 331.4 g/mol.
^{1}H RMN et COSY(^{1}H,^{1}H) RMN: (DMSO-d6; 600 MHz) δ 0.85 (d, J= 12.3 Hz, 1H, H_6), 1.19-1.27 (m, 3H, H_{3-7}), 1.32 (d, J= 9.8 Hz, 1H, H_2), 1.4-1.42 (m, 1H, H_5), 1.51-1.54 (m, 1H, H_4), 1.80 (t, J= 12.1 Hz, 1H, H_5), 2.09 (s, 1H, H_4), 2.23 (s, 1H, H_2), 2.35 (s, 3H, $H_{10'}$), 2.52 (s, 3H, $H_{9'}$), 3.69 (m, 1H, H_1), 5.12 (d, J= 4.2 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.81 (s, 1H, $H_{7'}$), 7.30 (d, J= 6.7 Hz, 1H, N*H*COO).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.64 min.
MS : APCI+ *m/z* 332 $[M+H]^+$.
Rend : 77.1%.

3-chloro-2-(aminoethylmercaptoethyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide-2-hydroxymethyl-pyrrolidine carboxylate (47). Le produit est obtenu à partir du 3-chloro-2-(aminoéthyl-mercaptoéthylhydroxy)-benzo[b]thiophène-2-carboxamide et de la 2-hydroxy-methyl-pyrrolidine selon la procédure A.2. menée 11 fois en parallèle.



Aspect : poudre blanche.
MM : 443.0 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.71-1.82 (m, 4H, H_{7-8}), 2.78-2.81 (m, 4H, H_{2-3}), 3.27-3.30 (m, 3H, H_6 et O*H*), 3.48 (dd, J= 10.5 Hz, J' = 7.7 Hz, 2H, H_{10}), 3.51 (t, 1H, H_9), 3.72 (dt, J = 6.1 Hz, J' = 7.7 Hz, 2H, H_1), 4.13-4.18 (m, 2H, H_4), 7.58-7.61 (m, 2H, $H_{6'-7'}$), 7.89-7.91 (m, 1H, $H_{5'}$), 8.10-8.11 (m, 1H, $H_{8'}$), 8.51 (t, J= 5.7 Hz, 1H, CON*H*).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.46 min.
MS : APCI+ *m/z* 444 $[M+H]^+$.
Rend : 82.1%.

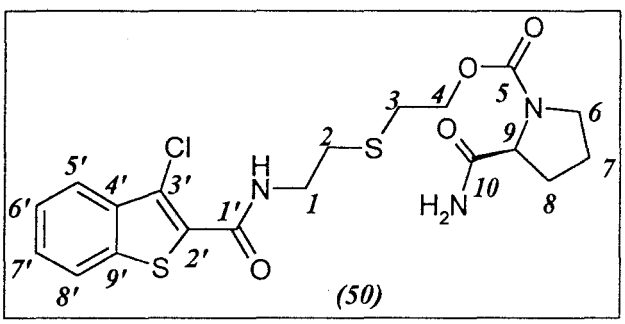
3-chloro-2-(aminoethylmercaptoethyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide-2-(3-hydroxy)-propylamine carboxylate (49). Le produit est obtenu à partir du 3-chloro-2-(aminoéthylmercaptoéthylhydroxy)-benzo[b]thiophène-2-carboxamide et de la 2-(3-hydroxy)-propylamine selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle.



(49)

Aspect : poudre blanche.
MM : 416.9 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.54 (m, 2H, H_7), 1.84-1.85 (m, 4H, H_{2-3}), 3.02 (dt, J = 6.2 Hz, J' = 6.7 Hz, 2H, H_6), 3.40 (dt, J= 6.2 Hz, J' = 4.9 Hz, 2H, H_8), 3.51 (dt, J= 7.7 Hz, J' = 6.3 Hz, 2H, H_1), 4.10 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H_4), 4.38 (t, J = 4.8 Hz, 1H, O*H*), 7.10 (t, J = 5.3 Hz, 1H, OCON*H*), 7.58-7.61 (m, 2H, $H_{6'-7'}$), 7.89-7.91 (m, 1H, $H_{5'}$), 8.10-8.11 (m, 1H, $H_{8'}$), 8.51 (t, J= 5.6 Hz, 1H, CON*H*).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.28 min.
MS : APCI+ *m/z* 417 $[M+H]^+$.
Rend : 62.5%.

3-chloro-2-(aminoethylmercaptoethyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide-L-prolinamide carboxylate (50). Le produit est obtenu à partir du 3-chloro-2-(aminoéthyl-mercaptoéthylhydroxy)-benzo[b]thiophène-2-carboxamide et de la L-prolinamide selon la procédure A.1 menée 9 fois en parallèle.

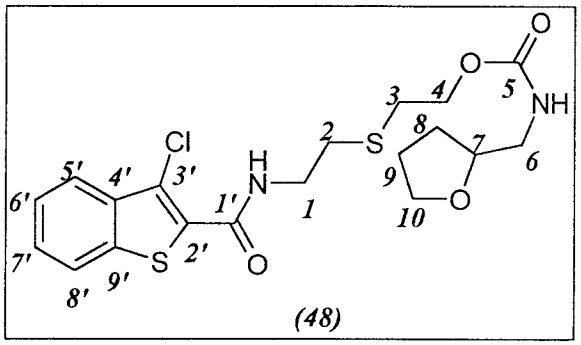


(50)

Aspect : poudre blanche.
MM : 455.9 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.77-1.83 (m, 3H, H_7 et 0.5 H_8), 2.05-2.15 (m, 1H, 0.5 H_8), 2.73-2.82 (m, 4H, H_{2-3}), 3.31-3.35 (m, 0.5H, 0.5 H_6), 3.40-3.42 (m, 0.5H, 0.5 H_6), 3.49-3.53 (m, 2H, H_1), 4.07-4.10 (m, 2H, H_4), 4.12-4.17 (m, 2H, H_9), 6.93 (d, J = 18.9 Hz, 1H, 0.5 $CONH_2$), 7.34 (d, J = 17 Hz, 1H, 0.5 $CONH_2$), 7.58-7.61 (m, 2H, $H_{6'-7'}$), 7.89-7.91 (m, 1H, $H_{5'}$), 8.10-8.11 (m, 1H, $H_{8'}$), 8.51 (t, J= 5.6 Hz, 1H, CONH).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.26 min.
MS : APCI+ *m/z* 456 $[M+H]^+$.
Rend : 58.6%.

3-chloro-2-(aminoethylmercaptoethyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide-1-(2-tetrahydro-furane)-methylamine carboxylate (48). Le produit est obtenu à partir du 3-chloro-2-

(aminoéthylmercaptoéthylhydroxy)-benzo[b]thiophène-2-carboxamide et de la 1-(2-tetra-hydrofurane)-methylamine selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle.



(48)

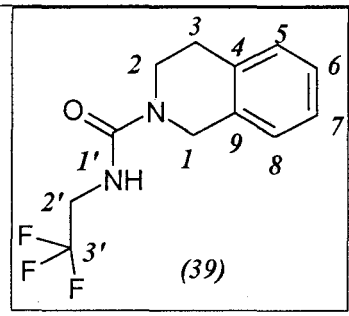
Aspect : poudre blanche.
MM : 443.0 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.47-1.52 (m, 1H, 0.5 H_8), 1.75-1.80 (m, 2H, H_9), 1.81-1.85 (m, 1H, 0.5 H_8), 2.77 (t, J = 6.8 Hz, 4H, $H_{2\text{-}3}$), 2.98-3.05 (m, 2H, H_{10}), 3.51 (dt, J = 6.2 Hz, J' = 7.7 Hz, 2H, H_6), 3.58 (dt, J = 7.8 Hz, J' = 6.8 Hz, 1H, H_7), 3.71 (dt, J = 6.9 Hz, J' = 6.8 Hz, 1H, 0.5 H_1), 3.80 (dt, J = 6.2 Hz, J' = 6.8 Hz, 1H, 0.5 H_1)), 4.10 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H_4), 7.21 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OCON*H*), 7.58-7.61 (m, 2H, $H_{6'\text{-}7'}$), 7.89-7.91 (m, 1H, $H_{5'}$), 8.10-8.11 (m, 1H, $H_{8'}$), 8.50 (t, J= 5.7 Hz, 1H, CON*H*).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.56 min.
MS : APCI+ *m/z* 444 $[M+H]^+$.
Rend : 70.2%.

B. Synthèse d' urées en microplaques à l'échelle de 5µmol.

B.1. 21 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'amine. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 10 minutes, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF de la seconde amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans l'AcOEt et purifié par extractions acido-basiques. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite.

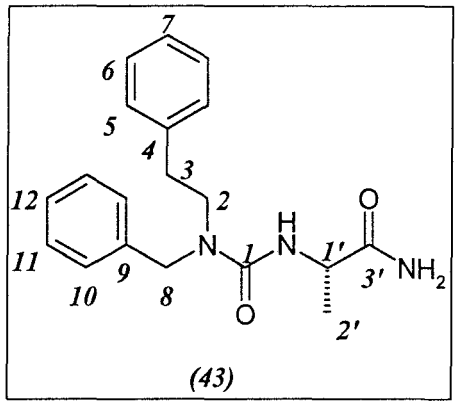
B.2. 21 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'amine. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 10 minutes, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF de la seconde amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

1-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolincarboxamide (39). Le produit est obtenu à partir de la 2,2,2-trifluoro-ethylamine et de la 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline selon la procédure B.2. menée 9 fois en parallèle.



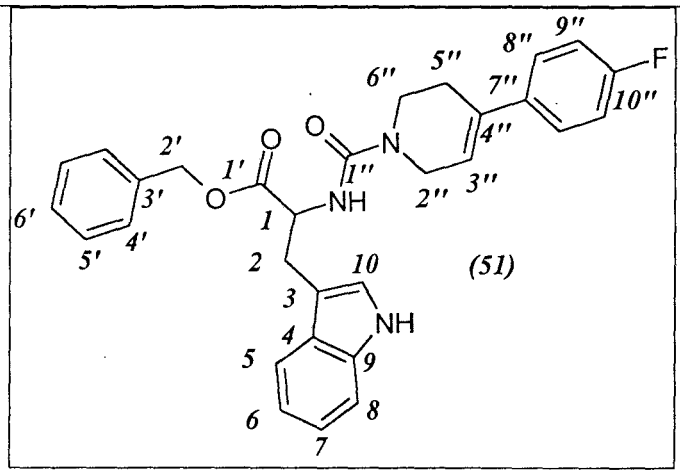
Aspect : poudre blanche.
MM : 258.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.78 (t, J= 5.9 Hz, 2H, H_3), 3.58 (t, J= 5.9 Hz, 2H, H_2), 3.85 (m, 2H, $H_{2'}$), 4.52 (s, 2H, H_1), 7.10-7.20 (m, 5H, $H_{5\text{-}6\text{-}7\text{-}8\text{-}NHCO}$).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.16 min.
MS : APCI+ *m/z* 259 $[M+H]^+$.
Rend : 47.3%.

N-benzyl-N-phenethyl-N'-(R)-propionamide urée (43). Le produit est obtenu à partir de la N-benzyl-phénéthylamine et L-alanylamide selon la procédure B.1. menée 9 fois en parallèle.



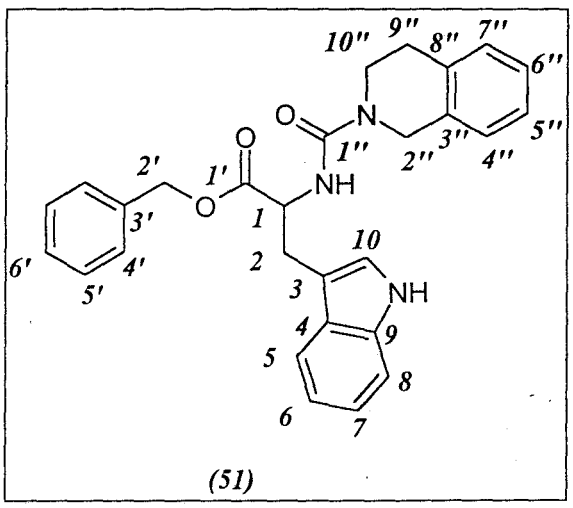
Aspect : poudre blanche.
MM : 325.4 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.20 (d, J= 7.2 Hz, 3H, $H_{2'}$), 2.74 (t, J= 7.8 Hz, 2H, H_3), 3.36 (t, J= 7.6 Hz, 2H, H_2), 4.15 (dq, J= 7.2 Hz, $J_{NH\text{-}H}$= 7.2 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.41 (s, 2H, H_8), 6.22 (d, $J_{NH\text{-}H}$ = 7.5 Hz, 1H, NCON*H*), 6.91 (s, 1H, 0.5 $CONH_2$), 7.17-7.19 (m, 4H, $H_{5\text{-}6}$), 7.22-7.28 (m, 5H, $H_{7\text{-}10\text{-}12}$ et 0.5 $CONH_2$), 7.32 (dt, J= 7.7 Hz, 2H, H_{11}).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.26 min.
MS : APCI+ *m/z* 326 $[M+H]^+$.
Rend : 79.9%.

2-[4-(p-fluoro-phényl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine]carboxamido-3-(indol-3-yl)-propionate de benzyle (51). Le produit est obtenu à partir de 4-(p-fluoro-phényl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine et du tryptophane benzyl ester selon la procédure B.2. menée 9 fois en parallèle.



Aspect : poudre blanche.
MM : 497.6 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.38-2.39 (m, 2H, $H_{5''}$), 3.14-3.20 (m, 2H, H_2), 3.50-3.53 (m, 2H, $H_{6''}$), 3.96 (dd, J = 2.9 Hz, $2H_{2''}$), 4.41-4.43 (m, 1H, H_1), 5.04 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.10-6.12 (m, 1H, $H_{3''}$), 6.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NCON*H*), 6.98 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H_6), 7.07 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H_7), 7.15-7.18 (m, 3H, $H_{9''-10}$), 7.20 (dd, J = 1.8 Hz, J' = 7.9 Hz, 2H, $H_{4'}$), 7.28-7.30 (m, 3H, $H_{5'-6'}$), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_8), 7.45 (d, J = 8.8 Hz, 2H, $H_{8''}$), 7.53 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_5), 10.83 (s, 0.66H, NH_{indole}).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.95 min.
MS : APCI+ *m/z* 498 $[M+H]^+$.
Rend : 72.7%.

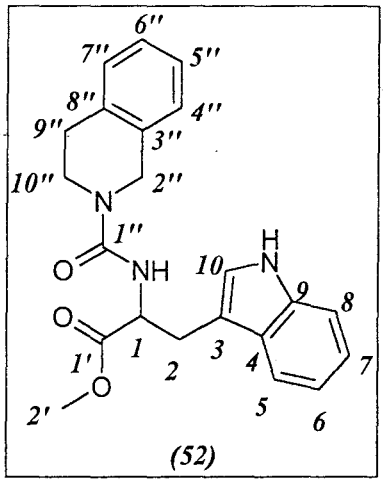
2-[1,2,3,6-tetrahydroisoquinolinyl]carboxamido-3-(indol-3-yl)-propionate de benzyle (51).
Le produit est obtenu à partir de la 1,2,3,6-tetrahydroisoquinoline et du tryptophane benzyl ester selon la procédure B.2. menée 10 fois en parallèle.



Aspect : poudre blanche.
MM : 453.5 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.72 (m, 2H, $H_{9''}$), 3.17 (m, 2H, H_2), 3.54 (m, 2H, $H_{10''}$), 4.43 (m, 1H, H_1), 4.47 (s, 2H, $H_{2''}$), 5.03 (m, 2H, $H_{2'}$), 6.86 (d, J_{NH-H} = 7.6 Hz, 1H, CONH), 6.97 (dt, J = 7.9 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H_6), 7.05 (dt, J = 7.9 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H_7), 7.08-7.19

(m, 5H, $H_{3'-4'-5'-5''-6''}$), 7.26-7.28 (m, 3H, $H_{4''-7''-10}$), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_8), 7.53 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_5), 10.82 (s, 1H, NH_{indole}).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.83 min.
MS : APCI+ *m/z* 454.5 $[M+H]^+$.
Rend : 41.4%.

2-[1,2,3,6-tetrahydroisoquinolinyl]-carboxamido-3-(indol-3-yl)-propionate de méthyle (52). Le produit est obtenu à partir du tryptophane méthyl ester et de la 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline selon la procédure B.1. menée 10 fois en parallèle.



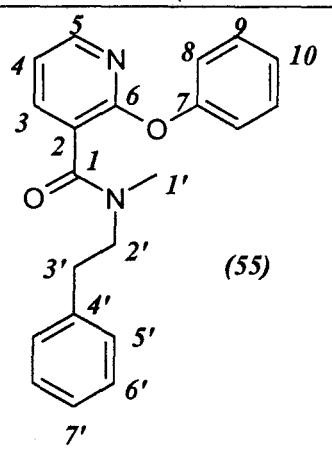
(52)

Aspect : poudre blanche.
MM : 377.5 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ δ 2.68 (m, 2H, $H_{9''}$), 3.10 (m, 2H, H_2), 3.50-3.53 (m, 2H, $H_{10''}$), 3.54 (s, 3H, $H_{2'}$), 4.41-4.43 (m, 3H, $H_{1-2''}$), 6.78 (d, J_{NH-H} = 7.6 Hz, 1H, CON*H*), 6.97 (dt, J = 7.9 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H_6), 7.05 (dt, J = 7.9 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H_7), 7.08-7.16 (m, 5H, $H_{5''-6''-4''-7''-10}$), 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_8), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_5), 10.82 (s, 1H, NH_{indole}).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.42 min.
MS : APCI+ *m/z* 378.5 $[M+H]^+$.
Rend : 69.4%.

C.1. 42 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans l'AcOEt et purifié par extractions acido-basiques. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite.

C.2. 42 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

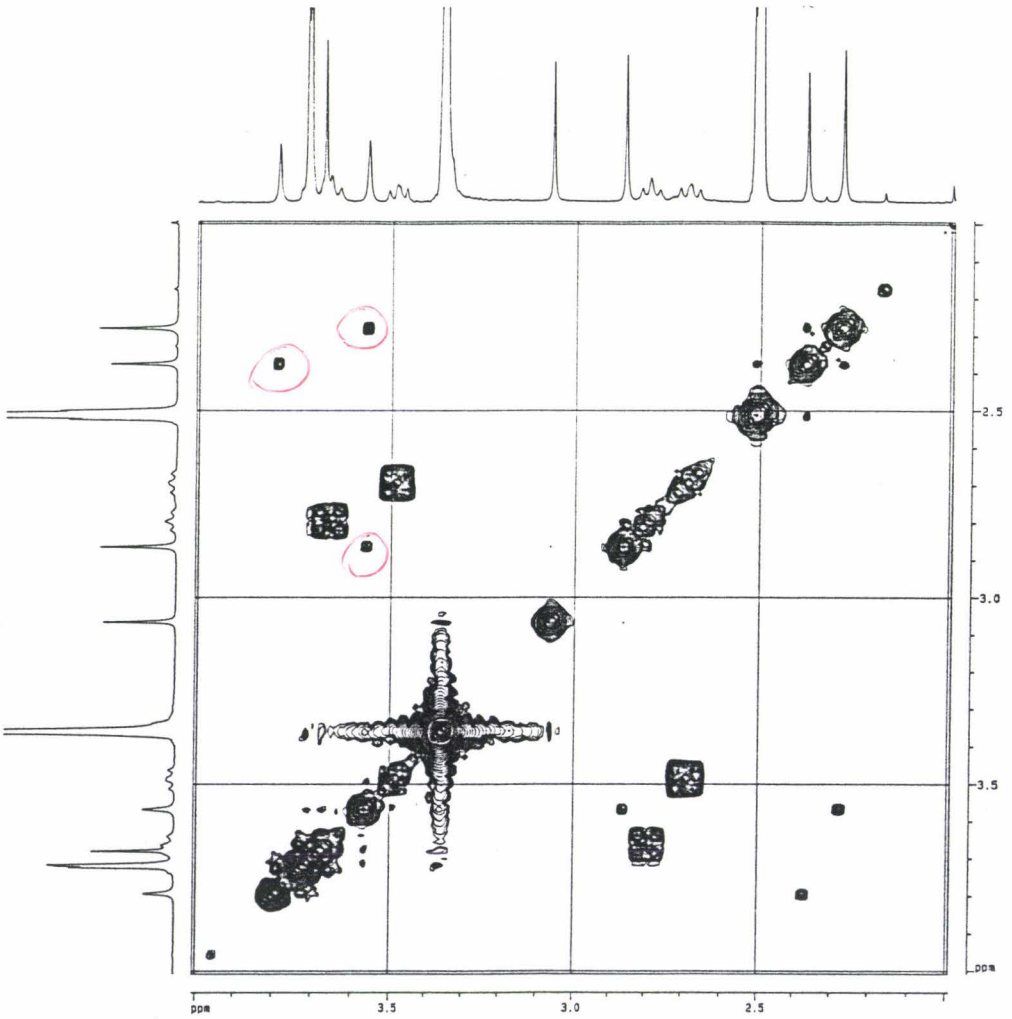
N-(2-phenethyl)-N-methyl-(2-phenoxy)-nicotinamide (55). Le produit est obtenu à partir de l'acide 2-phenoxy-nicotinique et de la N-methyl-phenethylamine selon la procédure C.1. menée 10 fois en parallèle.



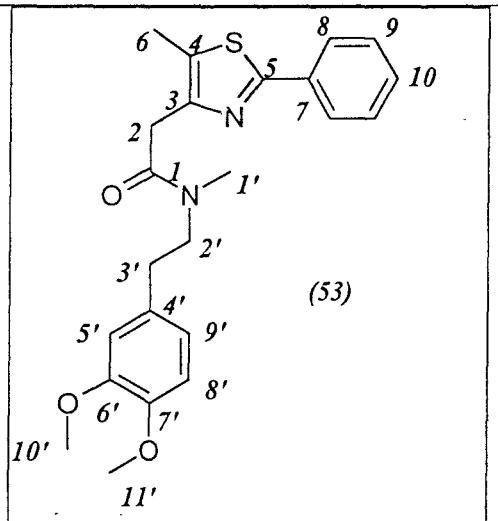
Conformères *trans* : groupe Me- et C=O en *trans* de la liaison amide; Conformères *cis* : groupe Me- et C=O en *cis* de la liaison amide

Aspect : poudre blanche.
MM : 332.4 g/mol.
On observe en RMN un mélange équimolaire des formes *cis* et *trans*.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 2.77 (s, 1.5H, $H_{1'cis}$), 2.77 (t, J= 7.3 Hz, 1H, $H_{2'cis}$), 2.84 (t, J= 7.2 Hz, 1H, $H_{2'trans}$), 2.99 (s, 1.5H, $H_{1'trans}$), 3.41 (t, J= 6.9 Hz, 1H, $H_{3'cis}$), 3.65 (t, J= 7.1 Hz, 1H, $H_{3'trans}$), 6.98-7.01 (m, 4H, $H_{4cis-3cis-8-10}$), 7.14-7.23 (m, 5.5H, $H_{4trans-5'-7'-6'}$), 7.38 (dd, J= 7.3 Hz, J'= 6.9 Hz, 2H, H_9), 7.70 (dd, J= 1.9 Hz, J'= 7.3 Hz, 0.5H, H_{3trans}), 8.07 (dd, J= 1.9 Hz, J'= 4.9 Hz, 0.5H, H_{5cis}), 8.12 (dd, J= 1.9 Hz, J'= 4.9 Hz, 0.5H, H_{5trans}).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6; 300 MHz) δ 32.9 ($C_{1'trans}$), 33.6 ($C_{2'trans}$), 34.5 ($C_{2'cis}$), 37.3 ($C_{1'cis}$), 49.2 ($C_{3'trans}$), 52.5 ($C_{3'cis}$), 119.7 (C_{4cis}), 120.0 (C_{4trans}), 121.9 (C_2), 122.3 (C_8), 125.5 ($C_{7'cis}$), 125.6 ($C_{7'trans}$), 127.0 ($C_{5'cis}$), 127.2 ($C_{5'trans}$), 129.1 ($C_{6'cis}$), 129.3 ($C_{6'trans}$), 129.6 (C_{10}), 130.5 (C_9), 138.8 (C_{3cis}), 138.9 (C_{3trans}), 139.2 ($C_{4'cis}$), 139.9 ($C_{4'trans}$), 148.3 (C_{5cis}), 148.6 (C_{5trans}), 154.3 (C_7), 166.8 (C_1), 166.9 (C_6).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.53 min.
MS : APCI+ *m/z* 333.4 $[M+H]^+$.
Rend : 62.6%.

N-(2-(3,4-dimethoxy)phenethyl)-N-methyl-(5-methyl-2-phenyl-thiazol-4-yl) acetamide (53). Le produit est obtenu à partir de la N-méthyl-(3,4-diméthoxy)-phénéthylmine et de l'acide 5-methyl-2-phényl-thiazol-4-yl acétique selon la procédure C.1. menée 10 fois en parallèle.



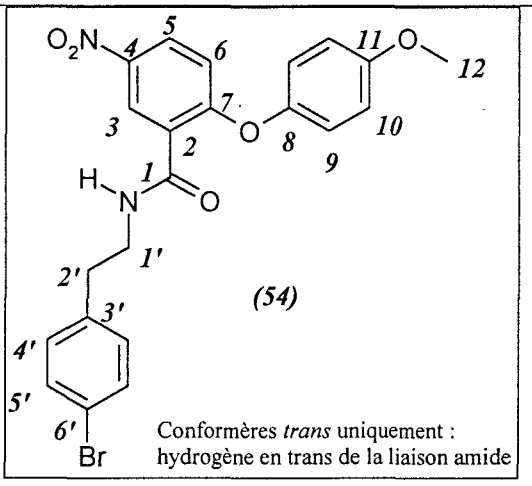
RMN (^1H,^1H) du composé (53).



Conformères *trans* : groupe Me- et C=O en *trans* de la liaison amide ; Conformères *cis* : groupe Me- et C=O en *cis* de la liaison amide

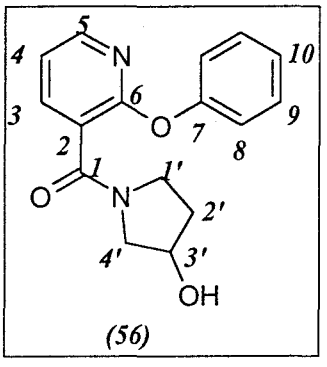
Aspect : poudre blanche.
MM : 410.5 g/mol.
On observe en RMN un mélange (58/42 %) des formes *cis* et *trans*.
^{1}H RMN et COSY(^{1}H, ^{1}H): (DMSO-d6; 300 MHz) δ 2.27 (s, 1.74H, $H_{1'cis}$), 2.37 (s, 1.26H, $H_{1'trans}$), 2.69 (t, J= 7.9 Hz, 0.84H, $H_{2'trans}$), 2.79 (t, J= 7.9 Hz, 1.16H, $H_{2'cis}$), 2.86 (s, 1.74H, H_{6cis}), 3.06 (s, 1.26H, H_{6trans}), 3.49 (t, J= 7.7 Hz, 0.84H, $H_{3'trans}$), 3.57 (s, 1H, 0.33$H_{10'}$), 3.66 (t, J= 7.7 Hz, 1.16H, $H_{3'cis}$), 3.68 (s, 2H, H_2), 3.71-3.73 (m, 4H, 0.33$H_{10'}$ et $H_{11'}$), 3.79 (s, 1.26H, 0.33$H_{10'}$), 6.67 (dd, J= 1.8 Hz, J'= 8.1 Hz, 0.58H, $H_{5'cis}$), 6.77 (dd, J= 1.8 Hz, J'= 8.1 Hz, 0.42H, $H_{5'trans}$), 6.79 (d, J= 8.0 Hz, 1H, $H_{8'}$), 6.87 (dd, J= 1.8 Hz, J'= 5.4 Hz, 1H, $H_{9'}$), 7.42-7.51 (m, 3H, H_{8-10}), 7.83 (dt, J= 1.9 Hz, J'= 8.2 Hz, 2H, H_9).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.60 min.
MS : APCI+ *m/z* 411.5 $[M+H]^+$.
Rend : 85.7%.

N-(2-(4-bromo)phenethyl)- 5-nitro-2-phenoxy-benzamide (54). Le produit est obtenu à partir de l'acide 5-nitro-2-phenoxy-benzoïque et de la 2-(4-bromo)-phénéthylamine selon la procédure C.1. menée 10 fois en parallèle.



Aspect : poudre jaune.
MM : 471.3 g/mol.
Seul les conformères qui présentent le substituant de l'azote en position cis du groupement carbonyle de l'amide sont observables.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 2.78 (t, J= 6.9 Hz, 2H, $H_{2'}$), 3.50 (dt, J= 6.8 Hz, $J_{H\text{-}NH}$= 5.8 Hz, 2H, $H_{1'}$), 3.77 (s, 3H, H_{12}), 6.79 (d, J= 9.2 Hz, 1H, H_6), 7.03 (d, J= 9.3 Hz, 1H, H_{10}), 7.11 (d, J= 9.2 Hz, 1H, H_9), 7.16 (d, J= 8.4 Hz, 1H, $H_{4'}$), 7.32 (d, J= 8.4 Hz, 1H, $H_{5'}$), 8.20 (dd, J= 9.2 Hz, J'= 3.0 Hz, 1H, H_5), 8.37 (d, J= 3.0 Hz, 1H, H_3), 8.44 (t, J= 5.8 Hz, 1H, N*H*CO).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 3.05 min.
MS : APCI+ *m/z* 472.3 $[M+H]^+$.
Rend : 79.0%.

N-(3-(2-phénoxy)-pyridinyl)carbonyl (3-hydroxy)-pyrrolidine (56). Le produit est obtenu à partir de l'acide 2-phenoxy-nicotinique et de la 3-hydroxypyrrolidine selon la procédure C.2. menée 10 fois en parallèle.

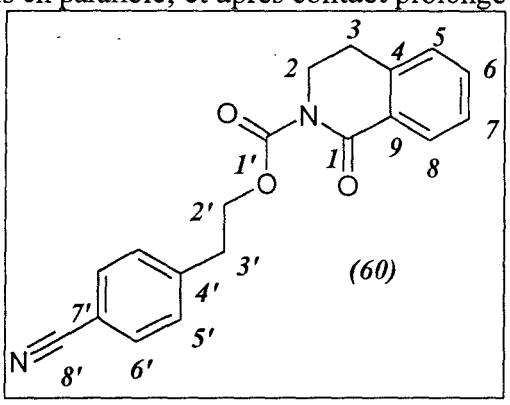


Aspect : poudre blanche.
MM : 284.3 g/mol.
On observe en RMN un mélange équimolaire des formes *cis* et *trans*.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.73-1.81 (m, 1H, $H_{2'ax}$), 1.82-2.04 (m, 1H, $H_{2'éq}$), 3.11 (d, J= 11.2 Hz, 0.5H, $H_{1'ax\ cis}$), 3.27-3.38 (m, 1H, $H_{3'}$), 3.40 (d, J= 11.2 Hz, 0.5H, $H_{1'ax\ trans}$), 3.43-3.54 (m, 2H, $H_{1'éq\text{-}4'ax}$), 4.27 (dd, J= 19 Hz, J= 2.7 Hz, 1H, $H_{4'éq}$), 4.97 (t, J= Hz, 1H, O*H*), 7.09 (d, J= 7.6 Hz, 2H, H_8), 7.17 (t, J= 7.4 Hz, 1H, H_4), 7.19 (t, J= 7.2 Hz, 1H, H_{10}),

7.38 (t, J= 7.7 Hz, 2H, H_9), 7.80 (dd, J= 1.7 Hz, J= 7.3 Hz, 0.5H, $H_{3\ cis}$), 7.81 (dd, J= 1.7 Hz, J= 7.3 Hz, 0.5H, $H_{3\ trans}$), 8.13 (dd, J= 4.9 Hz, J= 1.8 Hz, 1H, H_5).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 1.55 min.
MS : APCI+ *m/z* 285 $[M+H]^+$.
Rend : 62.3%.

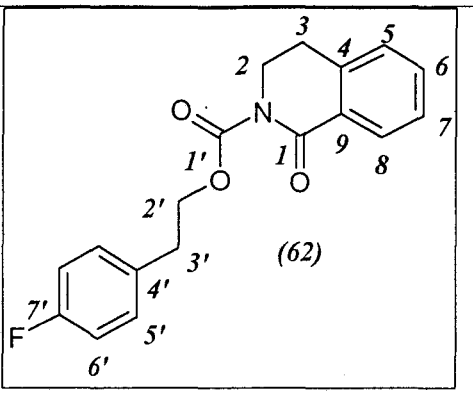
E.3.I.2 Mise en évidence de phénomènes d'oxydation dans le DMF et/ou le DMSO.

4-cyano-phenethyl- 3',4'-dihydro-2'H-isoquinolin-1'-one carboxylate (60). Le produit est obtenu à partir du 4-cyano-phénéthanol et de la 1,2,3,4-tetrahydoisoquinoline selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle, et après contact prolongé avec le DMSO.



Aspect : poudre blanche.
MM : 320.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 3.01 (t, J= 6.0 Hz, 2H, H_3), 3.10 (t, J= 6.4 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.10 (t, J= 6.4 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.93 (t, J= 6.1 Hz, 2H, H_2), 4.45 (t, J= 6.5 Hz, 2H, $H_{2'}$), 7.37 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H_5), 7.42 (t, J= 7.6 Hz, 1H, H_6), 7.57 (d, J= 7.9 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.58 (t, J= 7.7 Hz, 1H, H_7), 7.80 (d, J= 8.1 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.99 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H_8).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C) : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 28.2 (1C, C_3), 35.1 (1C, $C_{3'}$), 45.3 (1C, C_2), 67.2 (1C, $C_{2'}$), 110.2 (1C, $C_{7'}$), 119.8 (1C,$C_{8'}$, *C*N), 127.9 (1C, C_6), 128.6 (1C, C_5), 129.3 (1C, C_4), 129.6 (1C, C_8), 131.0 (2C, $C_{5'}$), 133.1 (2C, $C_{6'}$), 134.0 (1C, C_7), 141.0 (1C, C_9), 145.0 (1C, $C_{4'}$), 154.4 (1C, $C_{1'}$, N*C*OO), 163.7 (1C, C_1, *C*ONCOO)
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.45 min.
MS : APCI+ *m/z* 321 $[M+H]^+$.
Rend : 13%.

4-fluoro-phenethyl- 3',4'-dihydro-2'H-isoquinolin-1'-one carboxylate (62). Le produit est obtenu à partir du 4-fluoro-phénéthanol et de la 1,2,3,4-tetrahydoisoquinoline selon la procédure A.2. menée 9 fois en parallèle, et après contact prolongé avec le DMSO.



Aspect : poudre blanche.
MM : 320.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 2.94 (t, J= 6.6 Hz, 2H, $H_{3'}$), 2.96 (t, J= 6.8 Hz, 2H, H_3), 3.90 (t, J= 5.7 Hz, 2H, H_2), 4.34 (t, J= 6.8 Hz, 2H, $H_{2'}$), 7.09 (t, J_{H-F} = J_{H-H} = 8.9 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.31-7.37 (m, 4H, $H_{5-8-5'}$), 7.38 (dt, J= 7.8 Hz, J= 1.3 Hz, 1H, H_7), 7.54 (dt, J = 7.4 Hz, J' = 1.43 Hz, 1H, H_6), 7.95 (dd, J= 1.1 Hz, J' = 7.8 Hz, 2H, H_8).
HPLC: (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min), t_R = 2.66 min.
MS : APCI+ *m/z* 314 $[M+H]^+$.
Rend : 26.9%.

E.3.I.3 Conception, Synthèse et Criblage d'une chimiothèque focalisée basée sur le modèle tri-aromatique, sur le récepteur BZR.

A. Synthèse d' amides en microplaques à l'échelle de 5µmol, protocole au CDI.

42 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans 500µL de DMSO (solution 10-2M). Cette solution constitue la solution mère utilisée pour les test biologiques.

B. Synthèse d' amides en microplaques à l'échelle de 5µmol, protocole au TBTU.

13 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution équimolaire de TBTU/HOBt 0.41 M / DMF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 10 à 20 min., 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF avec 3 équivalents de DIEA d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 4 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans 500µL de DMSO (solution 10-2M). Cette solution constitue la solution mère utilisée pour les test biologiques.

C. Synthèse d' amides en microplaques à l'échelle de 5µmol, protocole au PyClu.

13 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution équimolaire de PyClu 0.41 M / DCM sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après

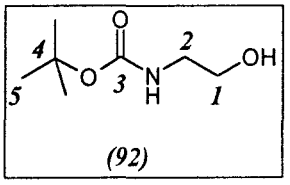
agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 8 à 12 min., 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF avec 2 équivalents de DIEA d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 4 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans 500µL de DMSO (solution 10-2M). Cette solution constitue la solution mère utilisée pour les test biologiques.

E.3.I.4 Conception et évaluation de la faisabilité chimique d'une chimiothèque focalisée basée sur des « amino-alcools » et active sur BZR.

Synthèse de N-Boc-amino-alcools :

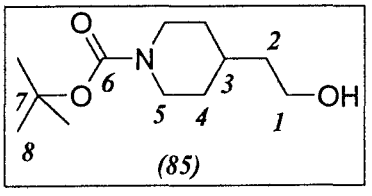
Dans un ballon de 500 mL est pesé l'équivalent de 78 mmol d'amino-alcool (1 éq.) auquel est ajouté 160 mL de CH_3CN. Sous agitation sont alors ajoutés 18.72 g (858 mmol, 1.1 éq.) de di-tertbutyl pyrocarbonate ($(Boc)_2O$). Après agitation une nuit à température ambiante du milieu réactionnel, sont ajoutés 150 mL d'une solution saturée de Na_2CO_3 pour détruire l'excès de $(Boc)_2O$. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant quatre heures. Le CH_3CN est ensuite évaporé. Le N-Boc-amino-alcool est alors extrait de la phase aqueuse par de l'AcOEt. La phase organique est lavée deux fois par une solution saturée de NaCl, séchée ($MgSO_4$), filtrée et concentrée. Les amino-alcools sont caractérisés par RMN.

N-Boc-ethanol amine (92).



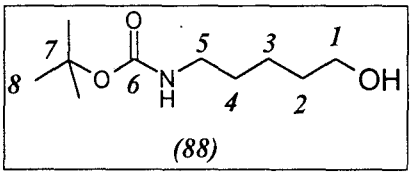
Aspect : huile incolore.
MM : 161.2 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.32 (s, 9H, H_5), 2.92 (dt, J = 6.1 Hz, $J_{H\text{-}OH}$ = 6.2 Hz, 2H, H_1), 3.30 (dt, J = 5.9 Hz, $J_{H\text{-}NH}$ = 6.2 Hz, 2H, H_2), 4.52 (t, J = 5.7 Hz, 1H, OH), 6.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H, CONH).
Rend : 31.1%.

N-Boc-4-(2-hydroxyethyl)piperidine (85).



Aspect : huile incolore.
MM : 229.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 0.76-0.88 (m, 2H, H_{4ax}), 1.20 (dt, J = 6.6 Hz, J' = 6.6 Hz, 2H, H_2), 1.24 (s, 9H, H_8), 1.28-1.40 (m, 1H, H_3),1.47 (l d, J = 12 Hz, 2H, $H_{4éq}$), 2.48-2.52 (m, 2H, H_{5ax}), 3.29 (dt, J = 6.6 Hz, $J_{H\text{-}OH}$ = 5.2 Hz, 2H, H_1), 3.74-3.78 (m, 2H, $H_{5éq}$), 4.22 (t, J = 5.1 Hz, 1H, OH).
Rend : 50.7%.

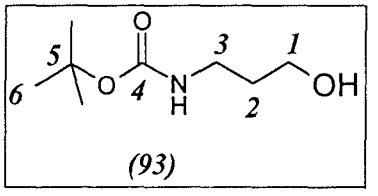
N-Boc-5-amino-1-pentanol (88).



(88)

Aspect : huile incolore.
MM : 203.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.03-1.30 (m, 6H, $H_{2\text{-}3\text{-}4}$), 1.23 (s, 9H, H_8), 2.74 (dt, J = 6.5 Hz, $J_{H\text{-}OH}$ = 6.3 Hz, 2H, H_1), 3.22 (dt, J = 6.2 Hz, $J_{H\text{-}NH}$ = 5.4 Hz, 2H, H_5), 4.20 (t, J = 5.2 Hz, 1H, O*H*), 6.62 (t, J = 5.4 Hz, 1H, CON*H*).
Rend : 77.9%.

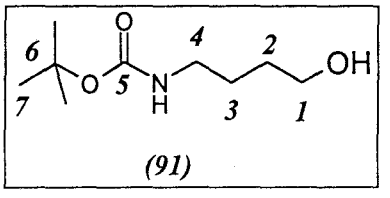
N-Boc-3-amino-1-propanol (93).



(93)

Aspect : huile incolore.
MM : 175.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.32 (s, 9H, H_6), 1.42-1.53 (m, 2H, H_2), 2.90 (dt, J = 6.6 Hz, $J_{H\text{-}OH}$ = 6.4 Hz, 2H, H_1), 3.34 (dt, J = 6.2 Hz, $J_{H\text{-}NH}$ = 5.4 Hz, 2H, H_5), 4.35 (t, J = 5.2 Hz, 1H, OH), 6.68 (t, J = 5.4 Hz, 1H, CONH).
Rend : 90.5%.

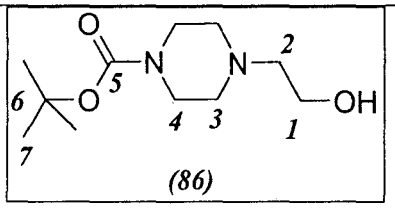
N-Boc-3-amino-1-butanol (91).



(91)

Aspect : huile incolore.
MM : 189.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.23-1.25 (m, 13H, $H_{2\text{-}3\text{-}7}$), 2.75 (dt, J = 6.5 Hz, $J_{H\text{-}OH}$ = 5.8 Hz, 2H, H_1), 3.25 (dt, J = 6.2 Hz, $J_{H\text{-}NH}$ = 5.4 Hz, 2H, H_5), 4.24 (t, J = 5.2 Hz, 1H, O*H*), 6.63 (t, J = 5.5 Hz, 1H, CON*H*).
Rend : 47.9%.

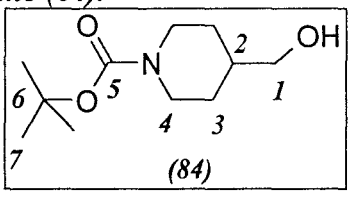
N-Boc-4-(2-hydroxyethyl)piperazine (86).



(86)

Aspect : huile incolore.
MM : 230.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.38 (s, 9H, H_7), 2.33 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H_3), 2.36 (t, J = 6.3 Hz, 2H, H_2), 3.28 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H_4), 3.48 (dt, J = 6.3 Hz, $J_{H\text{-}OH}$ = 5.4 Hz, 2H, H_1), 4.41 (t, J = 5.4 Hz, 1H, O*H*).
Rend : 60.5%.

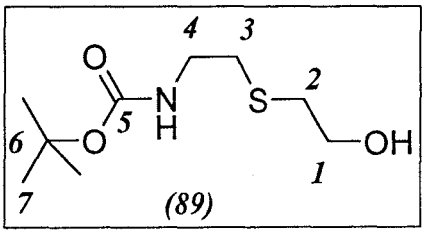
N-Boc-4-hydroxymethyl-piperidine (84).



(84)

Aspect : huile incolore.
MM : 215.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 0.88-0.98 (m, 2H, H_{3ax}), 1.34 (s, 9H, H_8), 1.34-1.50 (m, 1H, H_2),1.56 (l d, J = 11.5 Hz, 2H, $H_{3éq}$), 2.58-2.62 (m, 2H, H_{4ax}), 3.19 (t, $J_{H\text{-}OH}$ = 5.9 Hz, 2H, H_1), 3.82-3.91 (m, 2H, $H_{4éq}$), 4.42 (t, J = 5.3 Hz, 1H, O*H*).
Rend : 39.1%.

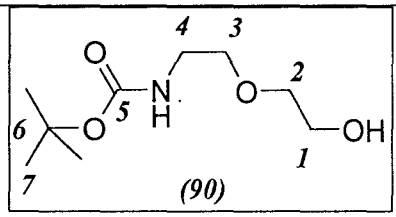
N-Boc-2-(2-aminoethylthio)ethanol (89).



(89)

Aspect : huile incolore.
MM : 221.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 0.88-0.98 (m, 2H, H_{3ax}), 1.37 (s, 9H, H_7), 2.49-2.57 (m, 4H, $H_{2\text{-}3}$), 3.06 (dt, J = 6.5 Hz, J' = 7.9 Hz, 2H, H_2), 3.52 (dt, $J_{H\text{-}OH}$ = 5.8 Hz, J' = 6.7 Hz, 2H, H_1), 4.79 (t, J = 5.5 Hz, 1H, O*H*), 6.90 (t, 1H, CON*H*).
Rend : 44.4%.

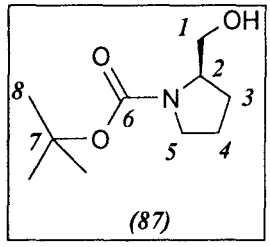
N-Boc-2-(2-aminoethoxy)ethanol (90).



(90)

Aspect : huile incolore.
MM : 205.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.37 (s, 9H, H_7), 3.06 (dt, $J_{H\text{-}OH}$ = 5.9 Hz, J' = 6.0 Hz, 2H, H_1), 3.34-3.40 (m, 3H, H_4 et 0.5H_3), 3.46 (t, J = 5.3 Hz, 1H, 0.5H_3), 3.55 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 0.5H_2), 4.08 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 0.5H_2), 4.57 (t, J = 5.5 Hz, 1H, O*H*), 6.77 (t, J = 5.3 Hz, 1H, CON*H*).
Rend : 85.6%.

N-Boc-D-prolinol (87).



(87)

Aspect : huile incolore.
MM : 201.3 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.34 (s, 9H, H_8), 1.60-1.77 (m, 4H, $H_{3\text{-}4}$), 3.15-3.21 (m, 3H, $H_{2\text{-}5}$), 3.39-3.45 (m, 1H, H_1), 3.59-3.61 (m, 1H, H_1), 4.63 (t, J = 5.2 Hz, 1H, O*H*).
Rend : 80.3%.

E.3.III Découverte de têtes de série et optimisation en utilisant une procédure intégrée « design et sélection » impliquant la modélisation moléculaire, la synthèse organique et le profil pharmacologique effectués à haut débit.

Etude de cas sur le récepteur μ.

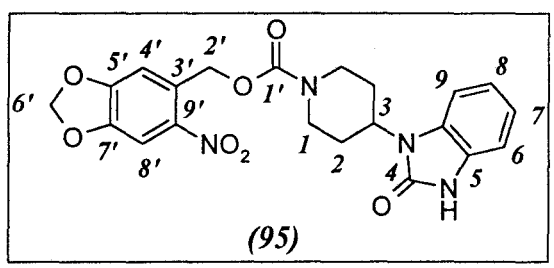
E.3.III.1 Synthèse des produits actifs issus du criblage primaire.

Synthèse de carbamates en microplaques à l'échelle de 5μmol.

A.1. 42 μL (10.3 μmol, 2.1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50μL (5μmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'alcool. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 μL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans l'AcOEt et purifié par extractions acido-basiques. La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite.

A.2. 42 μL (10.3 μmol, 2.1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50μL (5μmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'alcool. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 μL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

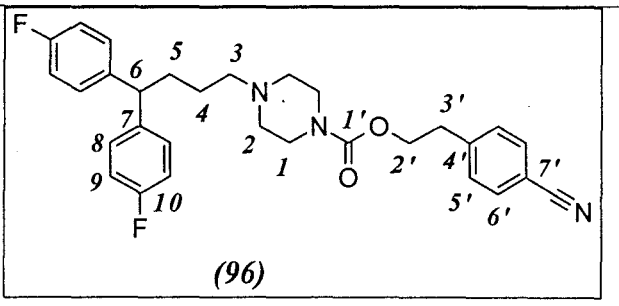
6-nitro-piperonyl-4'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)piperidine carboxylate (95). Le produit est synthétisé selon la procédure générale A.1. à partir de l'alcool 2-nitro-piperonyl et de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine à l'échelle de 60*5 μmoles.



(95)

Aspect : huile jaune.
MM : 440.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.71 (dd, J= 9.9 Hz, J'= 2.1 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.22 (ls, 2H, $H_{2éq}$), 3.05-3.07 (m, 2H, H_{1ax}), 4.15 (d, J= 13.6 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.38-4.39 (m, 1H, H_3), 5.36 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.26 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.97-6.99 (m, 3H, $H_{4'-7-8}$), 7.17 (s, 1H, H_9), 7.20-7.22 (m, 1H, H_6), 7.71 (s, 1H, $H_{8'}$), 10.85 (s, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.39 min.
MS : APCI+ *m/z* 441 $[M+H]^+$.
Rend : 95%.

4-cyano-phenethyl-4'-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine carboxylate (96). Le produit est synthétisé selon la procédure générale A.2. à partir du 4-cyano-phénéthanol et de la 4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine à l'échelle de 60*5 μmoles.

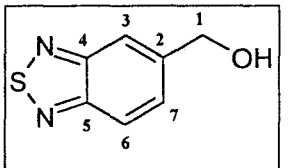


(96)

Aspect : huile jaune.
MM : 503.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.37 (m, 2H, H_4), 2.06 (dt, J= 7.8 Hz, J= 7.3 Hz, 2H, H_5), 2.28 (br s, 4H, H_2), 2.36 (t, J= 7.1 Hz, 2H, H_3), 3.05 (t, J= 6.4 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.33 (br s, 4H, H_1), 4.05 (t, J= 7.9 Hz, 1H, H_6), 4.29 (t, J= 6.5 Hz, 2H, $H_{2'}$), 7.18 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.8 Hz, 4H, H_9), 7.40 (dd, J_{H-H} = 8.7 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 4H, H_8), 7.54 (d, J= 8.2 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.85 (t, J= 8.2 Hz, 2H, $H_{6'}$).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 25.2 (C_4), 35.4 (C_5), 39.4 ($C_{3'}$), 43.9 (C_1), 49.3 (C_6), 52.9 (C_2), 57.9 (C_3), 65.3 ($C_{2'}$), 109.9 ($C_{7'}$), 115.8 (J_{C-F} = 83 Hz, C_9), 119.6 (*C*N), 129.9 (J_{C-F} = 32 Hz, C_8), 130.7 ($C_{5'}$), 132.8 ($C_{6'}$), 141.9 (C_7), 145.2 ($C_{4'}$), 154.9 (N*C*OO), 162.9 (C_{10}).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.56 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) $t_{R'}$ = 14.4 min.
MS : APCI+ *m/z* 505 $[M+H]^+$.
Rend : 29.8%.

E.3.III.2 Synthèse de monomères utilisés dans la synthèse des analogues de ***(95)***.

2,1,3-benzothiadiazole-5-methanol (97). Un mélange de methyl-2,1,3-benzothiadiazole-5-carboxylate (3 g, 15.44 mmol) dans la pyridine (51 mL) et LiI (14.46 g, 108.1 mmol) est porté à reflux pendant une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner un résidu huileux brun. L'huile obtenue est dissoute dans H_2O (25 mL). L'addition d' HCl 3 N à 0°C permet à l'acide intermédiaire de précipiter. La suspension est filtrée et le solide lavé avec H_2O (2 x 20 mL) et CH_3CN (2 x 20 mL). La poudre obtenue est dissoute dans le THF (65 mL) et la DIEA (2.9 mL, 16.64 mmol). Le mélange est refroidi à 0°C et le ClCOOEt (1.54 mL, 16 mmol) est ajouté. Après agitation 1.5 h à 0°C, une solution de $NaBH_4$ (1.36 g, 36.06 mmol) dans H_2O (8.5 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante et évaporé sous pression réduite. Le résidu orange est dissout dans l'AcOEt (40 mL) et lavé avec une solution saturée de Na_2CO_3 (2 x 30 mL) et une solution saturée de NaCl (1 x 30 mL). La phase organique est séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans l'Et_2O, filtré et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

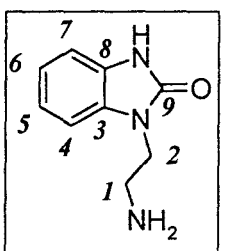


(97)

Aspect : poudre jaune.
MM : 166.2 g/mol

^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 4.74 (d, J = 5.8 Hz, 2H, H_1), 5.57 (t, J = 5.7 Hz, 1H, O*H*), 7.69 (dd, J = 1.4 Hz, J = 9.2 Hz, 1H, H_7), 7.98 (s, 1H, H_3), 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_6)
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.23 min.
MS : APCI+ *m/z* 167 $[M+H]^+$, 208 $[M+MeCN]^+$.
PF : 54.8-55.5°C.
Rend : 63%.

3-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)ethylamine *(98)*. Un mélange de 1-fluoro,2-nitrobenzene (1.72 mL, 16.3 mmol), de terbutyl-3-(aminoethyl)carbamate (2.61 mL, 16.3 mmol) et de carbonate de potassium (3.61 g, 26.1 mmol, 1.6 éq.) dans le DMF (42 mL) est chauffé à 70°C peandnat une nuit. Le milieu réactionnel est refroidi et évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est traité avec du CH_2Cl_2 (50 mL) pour donner un précipité blanc, qui est filtré et lavé avec du CH_2Cl_2 (2 x 50mL). L'évaporation du filtrat aboutit à 5.2 g d'une huile orange, qui est solubilisé dans l'EtOH (105 mL). Du Pd-C 10% (1.96 g, 1.8 mmol) et du formate d'ammonium (4.61 g, 72 mmol, 4 éq.) sont ensuite ajouté à la solution. La suspension est chauffée à 70°C une nuit, filtrée sur célite et rincée avec de l'EtOH (2 x 50 mL). L'évaporation du filtratpermet d'obtenir une huile (2.75 g, 10.95 mmol) que l'on dissout dans l'AcOEt (140 mL) avec de la DIEA (3.82 mL, 21.8 mmol, 2 éq.). La solution est refroidie à 0°C avant d'ajouter le triphosgene (1.7 g, 3.61 mmol, 0.33 éq.). Après agitation 10 min à 0°C et une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau (3 x 50 mL). La phase organique est séchée ($MgSO_4$), filtrée et évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie flash sur gel de silice avec le système de solvants CH_2Cl_2/MeOH (97:3). La recristallisation de l'huile obtenue dans CH_3CN donne 1.1 g du résidu purifié. La protection Boc a été ensuite enlevée par dissolution de l'amine protégée (1.1 g, 2.99 mmol) dans CH_2Cl_2 (7.485 mL), TFA (7.485 mL) et H_2O (0.748 mL) à température ambiante. Après 2 h d'agitation, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est triturée avec Et_2O.

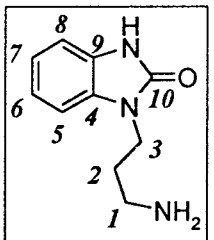


(98)

Aspect : solide blanc.
MM : 177.2 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 3.14-3.16 (m, 2H, H_1), 4.06 (t, J= 6.2 Hz, 2H, H_2), 7.04-7.07 (m, 3H, H_{4-5-6}), 7.19 (dd, J= 5.8 Hz, J= 1.8 Hz, 1H, H_7), 7.90 (br s, 3H, NH_3^+), 10.98 (s, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.18 min.
MS : $APCI^+$ m/z 178 $[M+H]^+$.
Rend : 20%.

3-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)propylamine *(99)*. Un mélange de 1-fluoro,2-nitrobenzene (2.2 mL, 21 mmol), terbutyl-3-(aminopropyl)carbamate (3.66 mL, 21 mmol) et de carbonate de potassium (4.65 g, 33.6 mmol, 1.6 éq.) dans le DMF (42 mL) est chauffé à 70°C pendant une

nuit. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et refroidi et le résidu obtenu est traité dans CH_2Cl_2 (50 mL). La suspension obtenue est filtrée, lavée avec CH_2Cl_2 (2 x 50mL). L'évaporation du filtrat aboutit à 6.50 g (100%) d'une huile orange: HPLC: t_R = 2.75 min, MS APCI$^+$ m/z 240 ([M+H]$^+$ - tBu). L'huile (21 mmol) est dissoute dans l'EtOH (120 mL). Du Pd-C 10% (2.24g, 2.1 mmol) et du formate d'ammonium (5.25 g, 84 mmol, 4 éq.) sont ajoutés à la solution. La suspension est chauffée à 70°C pendant une nuit , filtrée sur célite et rincée avec EtOH (2 x 50 mL). L'évaporation du filtrat donne une huile qui est alors triturée dans un mélange Et_2O (30 mL)/pentane (50 mL). Le précipité blanc obtenu est filtré et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner 3.69 g d'une huile bordeaux (66%). HPLC: t_R = 1.89 min, MS APCI$^+$ m/z 266 [M+H]$^+$. L'aniline (3.69 g, 13.90 mmol) est alors dissoute dans AcOEt (140 mL) avec de la DIEA (2.69 mL, 15.43 mmol, 1.2 éq.). La solution est refroidie à 0°C avant d'ajouter le triphosgene (1.53 g, 5.14 mmol, 0.37 éq.). Après agitation10 min à 0°C pendant une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau (3 x 50 mL). La phase organique est évaporée sous pression réduite et le résidu est trituré dans l'HCl (1 N), filtré et lavé avec de l'eau (2 x 50 mL) pour donner 2.80 g d'une poudre beige(69%). HPLC : t_R = 2.90 min, MS APCI$^+$ m/z 192 ([M+H]$^+$ - Boc). La protection Boc-protection est ensuite enlevée en dissolvant l'amine protégée (2.80 g, 9.61 mmol) dans CH_2Cl_2 (24 mL) et TFA (24 mL) à température ambiante. Après 2 h d' agitation, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle est triturée avec un mélange Et_2O/pentane (50/50).

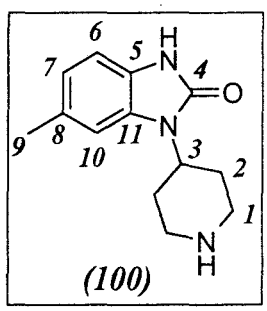


(99)

Aspect : solide blanc.
MM : 191.2 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.93-1.95 (m, 2H, H_1), 2.80-2.85 (m, 2H, H_2), 3.88 (t, J= 6.6 Hz, 2H, H_3), 7.01-7.05 (m, 3H, $H_{4\text{-}5\text{-}6}$), 7.19 (d, J= 5.5Hz, 1H, H_7), 7.75 (br s, 3H, NH_3^+), 10.95 (s, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.40 min.
MS : APCI$^+$ m/z 192 [M+H]$^+$.
PF : 208-209 °C
Rend : 87%.

4-(2-oxo-4-methyl-1-benzimidazolinyl)piperidine (100) Un mélange de 3-fluoro-4-nitro-toluène (3.26 g, 21 mmol, 1 éq.), de 4-amino-(1-benzyl)piperidine (4 g, 21 mmol, 1 éq.), et de K_2CO_3 (4.65 g 33.63 mmol, 1.6 éq.) dans le DMF (42 mL) est chauffé à 70°C pendant une nuit, et évaporé ensuite sous pression réduite. Le résidu est dissous dans CH_2Cl_2 et lavé avec de l'eau (2 x 30 mL). La phase organique est alors évaporée sous pression réduite pour donner 7.64 g d'une huile rouge. Cette huile est solubilisée dans EtOH (150 mL). Un mélange de cette solution avec du Fe (7 g, 6éq.) et de l'HCl concentré (8.6 mL, 5 éq.) est porté à reflux pendant 3.5 h. Après refroidissement, le mélange est filtré sur célite et rincé avec du DMF. Le filtrat est évaporé sous pression réduite, et le résidu est dissous dans un mélange

H_2O/AcOEt et neutralisé avec Na_2CO_3. La phase organique est lavée deux fois avec de l'eau, séchée ($MgSO_4$) puis évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue (4.8 g, 16.2 mmol, 1 éq.) est solubilisée dans l'AcOEt (65 mL) avec de la DIEA (4.61 g, 35,73 mmol, 2.2 éq.). Le mélange est refroidi à 0°C et 1.78 g (6mmol, 0.37 éq.) de triphosgene sont ajoutés. Le mélange est porté à température ambiante et agité une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est solubilisée dans l'AcOEt (25 mL) et H_2O (25 mL). La phase organique est évaporée. Une recristallisation dans CH_3CN (100 mL) permet d'obtenir 2 g (6.2 mmol) de la N-benzyl- amine sous la forme d'une poudre marron. Une solution de cet intermédiaire dans le MeOH (39 mL) avec HCOOH (1.69 mL, 44.8 mmol, 7.2 éq.) et 870 mg de Pd-C 10% est chauffée à 60°C et agitée pendant 4 h. L'évaporation sous pression réduite donne une huile noire. Une solution de cette huile dans l'HCl 1 N (30 mL) et l'AcOEt (5 mL) est agitée 30 min à température ambiante. Le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une huile qui se solidifie par trituration dans un mélange Et_2O/pentane.

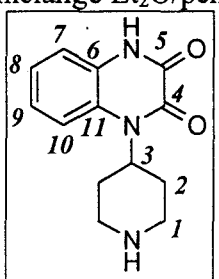


(100)

Aspect : poudre beige.
MM : 231.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.77 (d, J = 12 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.29 (s, 3H, H_9), 2.57-2.69 (m, 2H, H_{2eq}), 2.98-3.10 (m, 2H, H_{1ax}), 3.36 (d, J = 12 Hz, 2H, H_{1eq}), 4.48 (m, 1H, H_3), 6.76 (d, J = 7.84 Hz, 1H, H_7), 6.83 (d, J = 7.84 Hz, 1H, H_6), 7.33 (s, 1H, H_{10}), 9.15 (m, 2H, H_2N^+(piperidine)), 10.76 (s, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.48 min.
MS : APCI+ *m/z* 232 $[M+H]^+$.
Rend : 25%.

1-(4-piperidinyl)-1,4-dihydro-quinoxaline-2,3-dione (101). Un mélange de 2-nitrofluorobenzene (7.46 g, 52.9 mmol), de 4-amino-(1-benzyl)piperidine (10.07 g, 52.9 mmol) et de K_2CO_3 (11.54 g 83.5 mmol) dans le DMF (100 mL) est chauffé à 70°C une nuit, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans l'EtOH (300 mL). Un mélange de cette solution avec du Fe (17.4 g, 331 mmol) et de l'HCl 12 N (26 mL) est porté à reflux pendant 2 h. Après refroidissement, le mélange est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans l'HCl 3 N (130 mL) avec de l'acide oxalique acid (9.36 g, 104 mmol). Le mélange est porté à reflux une nuit, refroidit et neutralisé avec une solution aqueuse 1M de Na_2CO_3 puis extrait avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 30 mL), séchée ($MgSO_4$), filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner 2.8 g (8.35 mmol) de l'intermediaire N-benzyl-amine. Un mélange de ce résidu dissous dans le MeOH (80 mL), Pd-C 10% (400 mg) et HCOOH (1.5 mL) est porté à reflux pendant une nuit. Le mélange est alors filtré et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner une huile marron. Une solution de cette huile dans l'HCl 1 N (30 mL) et l'AcOEt (5 mL) est agitée 30 min à

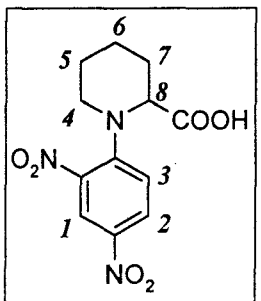
température ambiante. Le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une huile qui se solidifie par trituration dans un mélange Et_2O/pentane.



(101)

Aspect : poudre beige.
MM : 245.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.82 (d, J = 12.9 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.86 (dq, J = 3.6 Hz, J = 13.2 Hz, 2H, H_{2eq}), 3.12 (q, J = 13.4 Hz, 2H, H_{1ax}), 3.34 (d, J = 12 Hz, 2H, H_{1eq}), 4.82 (m, 1H, H_3), 7.13-7.18 (m, 3H, $H_{8\text{-}9\text{-}10}$), 7.76-7.78 (m, 1H, H_7), 9.36 (m, 2H, H_2N^+(piperidine)), 12.0 (s, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = **1.48** min.
MS : APCI+ *m/z* 246 $[M+H]^+$.
Rend : 15.2%.

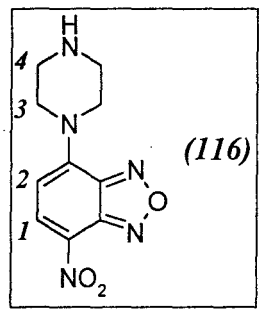
Acide 1-(2,4-dinitro-phenyl)-piperidine-2-carboxylique (115). Un mélange de 2,4-dinitro-fluoro-benzène (10 g, 53.7 mmol, 1 éq.) dans le dioxane (53.7 mL) et d'acide piperidine-2-carboxylique (7.63 g, 59.2 mmol, 1.1 éq.) dans une solution de Na_2CO_3 1 M dans l'eau (59.2 mL) est porté à reflux pendant 1 h. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu moir est mis en suspension dans l'eau et de l'HCl 1 N est ajouté goutte à goutte pour atteindre la neutralité. Le milieu réactionnel est ensuite filtré. Le filtrat est plongé dans un bain froid pour permettre au reste du produit de précipiter. La solution est ensuite filtrée, et le précipité récupéré.



(115)

Aspect : poudre jaune.
MM : 295.2 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.32-1.37 (m, 1H, $H_{piperidine}$), 1.57-1.85 (m, 4H, $H_{piperidine}$), 2.16 (l d, J = 13.4 Hz, 1H, $H_{piperidine}$), 3.19 (d, J = 13.4 Hz, 1H, $H_{piperidine}$), 3.36 (dt, J = 3.3 Hz, J' = 13.3 Hz, 2H, $H_{piperidine}$), 7.34 (d, J = 9.47 Hz, 1H, H_3), 8.28 (d, J = 2.78 Hz, J' = 9.41 Hz, 1H, H_2) 8.59 (d, J = 2.78 Hz, 1H, H_1).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 3.16 min.
PF : 77-78°C.
MS : APCI+ *m/z* 296 $[M+H]^+$.
Rend : 40%.

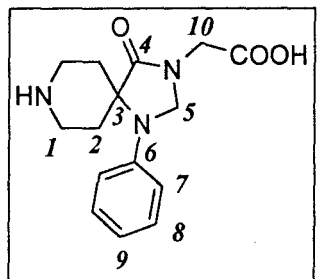
4-(7-nitro-benzo<1,2,5>oxadiazol-4-yl)piperazine (116). Un mélange de 4-chloro-7-nitro-benzo<1,2,5>oxadiazole (4.5 g, 22.5 mmol, 1 éq.) et de N-(t-butyloxycarbonyl)-4-piperidine (5.04 g, 27.1 mmol, 1.2 éq.) dans le DMF (49.6 mL) est porté à reflux pendant 1 h. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est lavé avec de l'eau (3 x 30 mL) et la suspension est filtrée pour donner 7.315 g (20.9 mmol) d'une poudre jaune. Une solution de cette poudre dans un mélange EtOH (20 mL)/HCl 3 N (40 mL) est portée à reflux pendant 2 h. Le mélange est évaporé sous pression réduite et le résidu est recristallisé dans un mélange Et_2O/pentane (50:50).



(116)

Aspect : poudre violette.
MM : 249.2 g/mol
^{1}H RMN : (D_2O-Na_2CO_3; 600 MHz) δ 2.78 (m, 4H, H_4), 3.38 (m, 2H, H_3), 6.26 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H_2), 8.6 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H_1).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.04 min.
PF : 297-299°C.
MS : APCI+ *m/z* 250 $[M+H]^+$.
Rend : 73.1%.

Acide 3-(1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl acetique (117). Une suspension d'acide 3-(1-phenyl-8-t-butyloxycarbonyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl acetique (3.9 g, 10 mmol) dans le THF (30 mL), HCl 1 N/Et_2O (20 mL, 20 mmol, 2 éq.) et H_2SO_4 (560 µL) est agitée une nuit à 65 °C. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est trituré dans l'AcOEt (50 mL) et l'Et_2O (2 x 50 mL) pour donner le produit attendu sous forme de sel d'acide sulfurique.

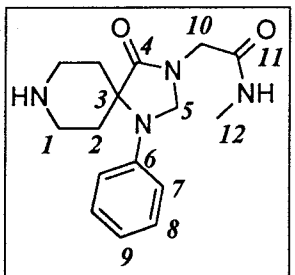


(117)

Aspect : poudre grise.
MM : 289.3 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.77 (d, J= 14.3 Hz, 2H, H_{1ax}), 2.71 (dt, J= 4.8 Hz, J= 14.2 Hz, 2H, H_{1eq}), 3.29-3.31 (m, 2H, H_{2ax}), 3.47-3.55 (m, 2H, H_{2eq}), 4.10 (s, 2H, H_{10}), 4.70

(s, 2H, H_5), 6.81 (t, J= 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.95 (d, J= 8.2 Hz, 2H, H_7), 7.25 (t, J= 7.6 Hz, 2H, H_8), 8.75 (br s, 2H, NH_2^+).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.45 min.
MS : APCI+ *m/z* 290 $[M+H]^+$.
Rend : 100%.

N-methyl-3-(1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl-acetamide (118). 3.9g (10 mmol) d'acide 3-(1-phenyl-8-t-butyloxycarbonyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl acetique sont dissous dans une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247M/THF (80 mL). Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 1.350 g de chlorhydrate de methylamine (20 mmol, 2 éq.) et 1 g de triethylamine sont ajoutés. Après agitation une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour donner une huile. Le résidu est dissous dans CH_2Cl_2 et la solution est lavée avec de l'eau acide (pH = 2; 3 x 50 mL), séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune qui cristallise en une nuit: HPLC: t_R = 2.44 min, MS $APCI^+$ m/z 303 ($[M+H]^+$ - Boc). Un mélange de ce produit dans le THF (75 mL) avec HCl 1 N/Et_2O (20 mL, 20 mmol, 2 éq.) et H_2SO_4 (560 µL) est agité une nuit à 65 °C. La suspension est filtrée et lavée avec de l'AcOEt (30 mL). Le solide est dissous dans l'eau (50 mL) et du Na_2CO_3 est ajouté. La base libre est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 30 mL) et la phase organique est évaporée sous pression réduite.



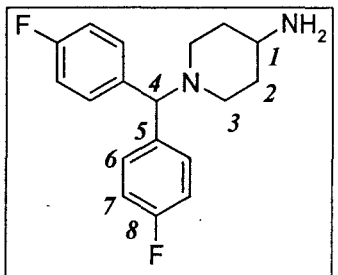
(118)

Aspect : poudre blanche.
MM : 302.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.63 (d, J= 14 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.53-2.60 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.59 (d, $J_{H\text{-}NH}$ = 4.5 Hz, 3H, H_{12}), 3.02 (dd, J= 13 Hz, J'= 4.4 Hz, 2H, H_{1ax}), 3.22-3.25 (m, 2H, $H_{1éq}$), 3.95 (s, 2H, H_{10}), 4.66 (s, 2H, H_5), 6.71-6.83 (m, 2H, $H_{9\text{-}NH}$), 6.90 (d, J= 8.2 Hz, 2H, H_7), 7.22 (t, J= 7.4 Hz, 2H, H_8), 8.00-8.05 (m, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.47 min.
MS : APCI+ *m/z* 303 $[M+H]^+$.
Rend : 19.8%.

E.3.III.3 Synthèse de monomères utilisés dans la synthèse des analogues de *(96)*.

4-amino, 1-(4,4'-difluorobenzhydryl)-piperidine (119). Un mélange de chlorhydrate de 4,4'-difluoro-benzhydryl (436 mg, 1.83 mmol), de chlorhydrate de 4-trifluoroacetamidopiperidine (448 mg, 1.92 mmol), de DIEA (636 µL, 3.65 mmol) dans CH_3CN (3.5 mL) est porté à reflux pendant 2 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une huile qui est ensuite dissoute dans l'AcOEt (10 mL). La solution est lavée avec HCl 1 N (1 x 6 mL) et H_2O (2 x 6

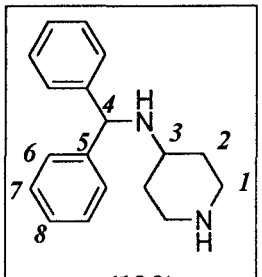
mL). La phase organique est récupérée, séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite pour donner 594 mg (1.49 mmol) d'une huile jaune. Un mélange de l'intermédiaire amine protégée en solution dans EtOH (3 mL) et KOH 3 N (15 mmol) est agité 2 h à température ambiante. Le mélange est alors évaporé sous pression réduite. L'huile résiduelle est extraite dans l'AcOEt (10 mL) et une solution saturée de Na_2CO_3 dans l'H_2O (10 mL). La phase organique est récupérée, séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est triturée dans HCl/Et_2O.



(119)

Aspect : poudre jaune.
MM : 302.4 g/mol
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.65 min.
MS : APCI+ *m/z* 303 $[M+H]^+$.
Rend : 25.0%.

4-(benzhydrylamino)-piperidine (120). Un mélange de benzhydrylamine (3.95 mL, 22.92 mmol, 1.2 éq.), de N-(t-butyloxycarbonyl)-4-piperidone (3.805 g, 19.1 mmol, 1 éq.), et de 19.1 g de tamis moléculaire dans l'EtOH (40 mL) est agité à température ambiante une nuit. L'imine formée est alors réduite par $NaBH_4$ (2.89 g, 4 éq.) et le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h, filtré, basifié avec Na_2CO_3 et extrait avec CH_2Cl_2. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie flash sur gel de silice avec le système de solvant CH_2Cl_2/MeOH (95:5) donne une huile (9.77 g, 13.01 mmol). L'amine est ensuite déprotégée par HCl 3 N (26 mL) à 100°C pendant une nuit. Le mélange est évaporé sous pression réduite et le résidu est recristallisé dans un mélange Et_2O/pentane (50:50).

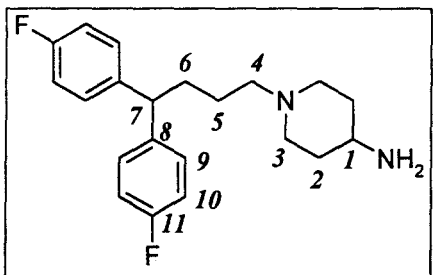


(120)

Aspect : poudre blanche.
MM : 266.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.94 (dt, J = 10.6 Hz, J' = 12.7 Hz 2H, H_{2ax}), 2.38 (d, J = 11.7 Hz, 2H, H_{2eq}), 2.79 (dt, J = 11.4 Hz, J' = 11.9 Hz, 2H, H_{1ax}), 3.11 (m, 1H, H_3), 3.25

(d, J = 11.7 Hz, 2H, H_{1eq}), 5.69 (t, J = 5.73 Hz, 1H, $^{+}NH_2$), 7.27-7.38 (m, 7H, H_{4-6-8}), 7.81 (d, 4H, H_7), 10.3 (l s, 2H, NH_2^{+}(piperidine)).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.53 min.
MS : APCI+ *m/z* 267 $[M+H]^+$.
Rend : 58%.

1-(4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butyl),4-amino-piperidine (121). Un mélange de 1-chloro-4,4-Bis-(4-fluorophenyl)butane (3 g, 10.7 mmol) et de 4-(N-t-butyloxycarbonyl-amino)piperidine (1.95 g, 9.7 mmol) dans CH_3CN (17.7 mL) avec de la DIEA (3.72 mL) est porté à reflux pendant 4 jours. Le solvant est évaporé ensuite sous pression réduite pour donner une huile marron. La purification par chromatographie flash sur gel de silice avec le système d'élution CH_2Cl_2/MeOH (95:5) permet d'obtenir 2.69 g d'une huile jaune. Une solution de la N-Boc-amine dans HCl 3 N/EtOH (50 mL) est portée à reflux pendant 2 h. Le mélange est évaporé sous pression réduite pour donner une poudre marron clair qui est lavée par un mélange Et_2O/pentane (50:50) (2 x 20 mL).



(121)

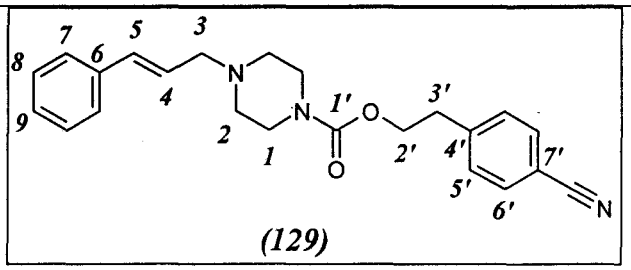
Aspect : poudre beige.
MM : 344.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.53-1.55 (m, 2H, H_5), 1.84-2.11 (m, 6H, $H_{2ax-4-6}$), 2.83-3.02 (m, 4H, $H_{2eq-3ax}$), 3.18-3.26 (m, 1H, H_1), 3.32-3.40 (m, 2H, H_{3eq}), 3.97 (t, J = 7.53 Hz, 1H, H_7), 7.09 (t, $J_{H-F} = J_{H-H}$ = 8.8 Hz, 4H, H_{10}), 7.32 (dd, J_{H-H} = 8.6 Hz, J_{H-F} = 5.5, 4H, H_9), 8.40 (br s, 3H, H_3N^+), 10.52 (s, 1H, NH^+).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.97 min.
MS : APCI+ *m/z* 345.4 $[M+H]^+$.
Rend : 55%.

E.3.III.4 Synthèse d'analogues de *(96)*.

A. Synthèse de carbamates en microplaques à l'échelle de 5µmol.

Les HPLC préparatives sont réalisées sans TFA.

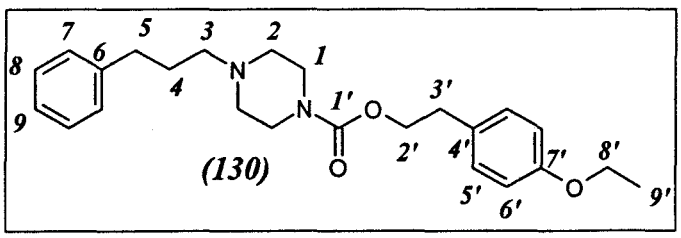
4-cyano-phénéthyl-4'-(3'-phenylpropyl-2'-enyl)piperazine carboxylate (129). Le produit est obtenu selon la procédure générale A.2. à partir de l'alcool 4-cyano-phénéthanol et de la trans-1-cinnamylpiperazine à l'échelle de 13*5 µmoles.



(129)

Aspect : poudre blanche.
MM : 375.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.31 (br s, 4H, H_2), 2.98 (t, J= 6.4 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.09 (dd, J= 6.7 Hz, J= 1 Hz, 2H, H_3), 4.22 (t, J= 6.5 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.23 (dt, J= 6.6 Hz, J= 15.9 Hz, 1H, H_4), 6.53 23 (d, J= 15.9 Hz, 1H, H_5), 7.23 (t, J= 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.32 (t, J= 7.8 Hz, 2H, H_8), 7.44 (d, J= 7.1 Hz, 1H, $H_{5'}$), 7.45 (t, J= 8.3 Hz, 2H, H_7), 7.76 (d, J= 8.3 Hz, 2H, $H_{6'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.08 min.
MS : APCI+ *m/z* 376 $[M+H]^+$.
Rend : 95%.

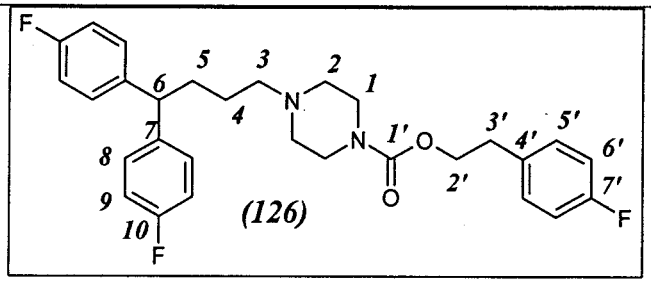
4-ethoxy-phenethyl-4'-((3'-phenyl)propyl)-piperazine carboxylate (130). Le produit est obtenu selon la procédure A.2. à partir du 4-éthoxy-phénéthanol et de la 4-(3-phényl)propyl-pipérazine à l'échelle de 60*5 µmol.



(130)

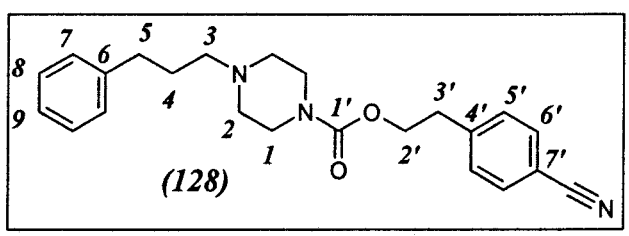
Aspect : huile jaune.
MM : 396.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.25 (t, J= 6.9 Hz, 2H, $H_{9'}$), 1.66 (m, 2H, H_4), 2.19-2.24 (m, 6H, H_{2-3}), 2.53 (t, J= 7.5 Hz, 2H, H_5), 2.74 (t, J= 6.8 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.24-3.26 (m, 4H, H_1), 3.93 (q, J= 6.9 Hz, 2H, $H_{8'}$), 4.08 (t, J= 6.8 Hz, 1H, $H_{2'}$), 6.78 (d, J= 8.7 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.08 (d, J= 8.7 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.10-7.16 (m, 3H, H_{7-9}), 7.22 (t, J= 7.3 Hz, 2H, H_8).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 16.3 ($C_{9'}$), 29.5 (C_4), 34.4 (C_5), 35.4 ($C_{3'}$), 44.8 (C_1), 54.1 (C_2), 57.9 (C_3), 64.4 ($C_{8'}$), 66.9 ($C_{2'}$), 115.8 ($C_{6'}$), 127.2 (C_9), 129.8 (C_{8-7}), 131.3 ($C_{5'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.47 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R = 12.36 min.
MS : APCI+ *m/z* 397 $[M+H]^+$.
Rend : 23.5%.

4-fluoro-phenethyl-4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine carboxylate (126). Le produit est obtenu selon la procédure A.2. à partir du 4-fluoro-phénéthanol et de la 4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine à l'échelle de 60*5 µmol.



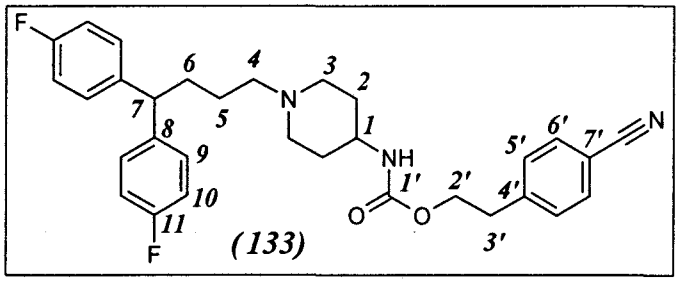
Aspect : huile jaune.
MM : 496.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.37 (m, 2H, H_4), 2.06 (dt, J= 7.8 Hz, J= 7.3 Hz, 2H, H_5), 2.28 (br s, 4H, H_2), 2.36 (t, J= 7.1 Hz, 2H, H_3), 3.05 (t, J= 6.4 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.33 (br s, 4H, H_1), 4.05 (t, J= 7.9 Hz, 1H, H_6), 4.29 (t, J= 6.5 Hz, 2H, $H_{2'}$), 7.05 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.9 Hz, 4H, H_9), 7.06 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.9 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.22 (dd, J_{H-H} = 8.6 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.27 (dd, J_{H-H} = 8.6 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 4H, H_8).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 27.3 (C_4), 35.1 (C_5), 36.1 ($C_{3'}$), 45.1 (C_1), 50.3 (C_6), 54.5 (C_2), 58.9 (C_3), 66.8 ($C_{2'}$), 109.9 ($C_{7'}$), 116.6 (C_{10}), 116.9 ($C_{6'}$), 131.0 (C_9), 132.6 ($C_{5'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.63 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R'= 14.54 min.
MS : APCI+ *m/z* 498 $[M+H]^+$.
Rend : 23.5%.

4-cyano-phenethyl-4'-((4'-phenyl)propyl)-piperazine carboxylate (128). Le produit est obtenu selon la procédure A.2. à partir du 4-cyano-phénéthanol et de la 4-(4-phényl)-propyl-piperazine à l'échelle de 60*5µmoles.



Aspect : huile jaune.
MM : 377.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.66 (m, 2H, H_4), 2.19-2.24 (m, 6H, H_{2-3}), 2.53 (t, J= 7.5 Hz, 2H, H_5), 2.93 (t, J= 6.5 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.24-3.26 (m, 4H, H_1), 4.18 (t, J= 6.5 Hz, 1H, $H_{2'}$), 7.10-7.16 (m, 3H, H_{7-9}), 7.20-7.25 (m, 2H, H_8), 7.41 (d, J= 8.4 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.73 (d, J= 8.4 Hz, 2H, $H_{6'}$).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 29.5 (1C, C_4), 34.4 (1C, C_5), 36.4 (1C, $C_{3'}$), 44.8 (2C, C_1), 54.1 (2C,C_2), 57.9 (1C, C_3), 66.2 (1C, $C_{2'}$), 126.8 (1C, C_9), 129.8 (4C, C_{8-7}), 131.7 (2C, $C_{5'}$), 133.7 (2C, $C_{6'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.11 min.
MS : APCI+ *m/z* 378 $[M+H]^+$.
Rend : 36.2%.

<1-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperidin-1-yl>carbamic acid (4-cyano)-phenethyl ester (133). Le produit est obtenu selon la procédure A.2. à partir de la 4-amino-N-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-pipéridine et du 4-cyanophénéthanol à l'échelle de 60*5µmoles.



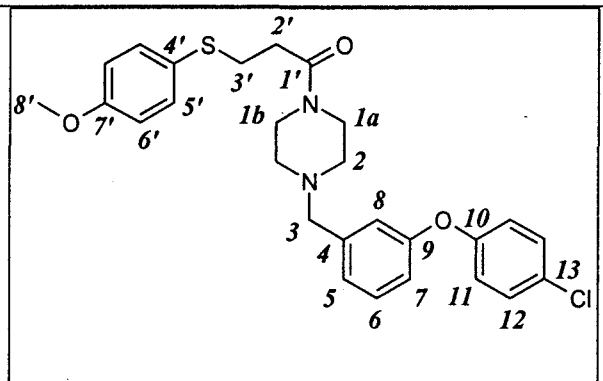
(133)

Aspect : huile marron clair.
MM : 517.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.19-1.33 (m, 4H, $H_{5\text{-}2ax}$), 1.58 (d, J= 10.8 Hz, 2H, H_{2eq}), 1.75 (t, 2H, H_{3ax}), 1.91 (dt, J= 7.3 Hz, J'= 7.6 Hz, 2H, H_6), 2.17 (t, J= 7.0 Hz, 2H, H_4), 2.62 (d, 2H, H_{3eq}), 2.89 (t, J= 6.7 Hz, 2H, $H_{3'}$), 2.94-3.21 (m, 1H, H_1), 3.92 (t, J= 7.9 Hz, 1H, H_7), 4.11 (t, J= 6.6 Hz, 2H, $H_{2'}$), 7.04 (t, $J_{H\text{-}H} = J_{H\text{-}F}$ = 8.9 Hz, 4H, H_{10}), 7.26 (dd, $J_{H\text{-}H}$ = 8.8 Hz, $J_{H\text{-}F}$ = 5.6 Hz, 4H, H_9), 7.41 (d, J= 8.3 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.71 (d, J= 8.3 Hz, 2H, $H_{6'}$).
^{13}C NMR et HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 25.2 (C_4), 35.4 (C_5), 39.4 ($C_{3'}$), 43.9 (C_1), 49.3 (C_6), 52.9 (C_2), 57.9 (C_3), 65.3 ($C_{2'}$), 109.9 ($C_{7'}$), 115.8 ($J_{C\text{-}F}$ = 83 Hz, C_{10}), 119.6 (*C*N), 129.9 ($J_{C\text{-}F}$ = 32 Hz, C_9), 130.7 ($C_{5'}$), 132.8 ($C_{6'}$), 141.9 (C_7), 145.2 ($C_{4'}$), 154.9 (N*C*OO), 162.9 (C_{10}).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.56 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R = 14.3 min.
MS : APCI+ *m/z* 519 $[M+H]^+$.
Rend : 14.2%.

B. Synthèse d'amides en microplaques à l'échelle de 5µmol.

B. 42 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

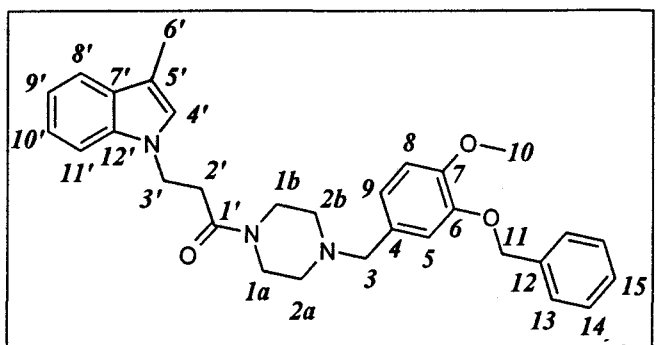
1-(3-phenylsulfanyléthyl)-carbonyl-4-(3-(4-chlorophenoxy)benzyl)piperazine (124). Le produit est obtenu selon le protocole B à partir de l'acide 3-phenylsulfanylpropionique et de la 4-(3-(4-chlorophenoxy)benzyl)piperazine à l'échelle de 60*5µmol.



(124)

Aspect : huile jaune.
MM : 497.1 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.35-2.41 (m, 4H, H_2), 2.63 (t, J= 7.2 Hz, 2H, $H_{2'}$), 3.10 (t, J= 7.2 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.42-3.45 (m, 2H, H_{1a}), 3.48-3.52 (m, 2H, H_{1b}), 3.56 (s, 2H, H_3), 3.82 (s, 3H, $H_{8'}$), 6.99 (d, J= 8.8 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.0 (dd, J= 7.7 Hz, J' = 1.0 Hz, 1H, H_5), 7.06 (m, 1H, H_8), 7.11 (d, J= 9.0 Hz, 2H, H_{11}), 7.19 (dd, J= 7.7 Hz, J' = 1.0 Hz, 1H, H_7), 7.41 (d, J= 8.9 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.44 (dt, J= 7.8 Hz, J' = 0.5 Hz, 1H, H_6), 7.52 (d, 2H, H_{12}).
^{13}C NMR et HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 30.99 ($C_{3'}$), 33.1 ($C_{2'}$), 41.8 (C_{1a}), 45.4 (C_{1b}), 52.8 (C_{2a}), 53.3 (C_{2b}), 55.9 ($C_{8'}$), 61.9 (C_3), 115.5 ($C_{6'}$), 118.1 (C_5), 119.6 (C_8), 120.9 (C_{11}), 124.9 (C_7), 126.6 (C_{13}), 127.8 ($C_{4'}$), 130.6 ($C_{5'\text{-}6}$), 132.9 (C_{12}), 141.1 (C_4), 156.4 (C_{10}), 156.9 (C_9), 159.0 ($C_{7'}$), 169.4 (NCO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.52 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R = 14.4 min.
MS : APCI+ *m/z* 498 $[M+H]^+$.
Rend : 32.2%.

1-(3-methylindol-1-yl)éthyl-carbonyl-4-(3-benzyloxy-4-methoxybenzyl)piperazine (125). Le produit est obtenu selon le protocole B à partir de la 4-(3-benzyloxy,4-methoxybenzyl)-piperazine et de l'acide 3'-(3'-methylindol-1'-yl)propionique à l'échelle de 60*5 µmoles.

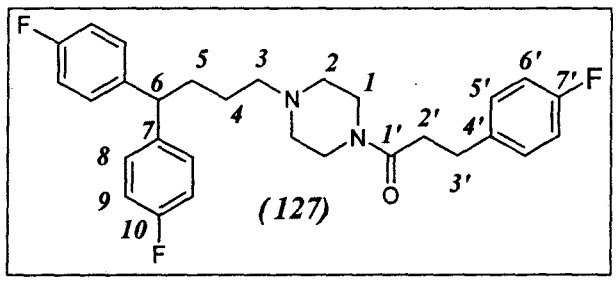


(125)

Aspect : solide blanc.
MM : 497.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 2.10-2.15 (m, 2H, H_{2a}), 2.20-2.25 (m, 2H, H_{2b}), 2.31 (s, 3H, $H_{6'}$), 2.84 (t, J= 6.8 Hz, 2H, $H_{2'}$), 3.28-3.45 (m, 2H, H_{1a}), 3.41 (s, 2H, H_3), 3.48-3.52 (m, 2H, H_{1b}), 3.82 (s, 3H, H_{10}), 4.41 (t, J= 6.8 Hz, 2H, $H_{3'}$), 5.13 (s, 2H, H_{11}), 6.86 (dd, J= 8.1 Hz, 1H, $H_{9'}$), 6.98 (d, J= 5.7 Hz, 2H, H_8), 7.00 (s, 1H, H_5), 7.08 (dt, J= 7.9 Hz, J' = 1.0 Hz,

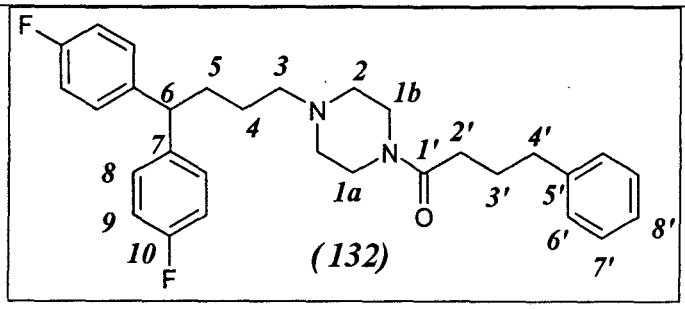
1H, H_9), 7.19 (dt, J= 1.2 Hz, J'= 8.3 Hz, 1H, $H_{10'}$), 7.20 (d, J = 1.0 Hz, 1H, $H_{4'}$), 7.33-7.57 (m, 5H, $H_{8'-11-13-14-15}$).
^{13}C NMR et HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 10.14 ($C_{6'}$), 33.64 ($C_{2'}$), 41.8 (C_{1a}), 45.4 (C_{1b}), 52.6 (C_{2a}), 53.0 (C_{2b}), 56.2 (C_{10}), 62.0 (C_3), 70.5 (C_{11}), 110.2 ($C_{11'}$), 112.5 (C_8), 115.2 (C_5), 118.9 ($C_{8'}$), 119.1 (C_9), 121.7 ($C_{9'}$), 125.4 ($C_{4'}$), 127.7 ($C_{7'}$), 128.4 (C_{13-15}), 129.0 (C_{14}), 135.5 ($C_{12'}$), 137.8 (C_4), 140.9 (C_{12}), 148.0 (C_7), 149.0 (C_6), 169.4 (NCO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.53 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R = 13.85 min.
MS : APCI+ *m/z* 499 $[M+H]^+$.
Rend : 5.4%.

1-(4-fluoro-phenethyl)-carbonyl-4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine (127). Le produit est obtenu selon la procédure B. à partir de l'acide 3-(4-fluorophényl)propionique et de la 4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine à l'échelle de 60*5 µmol.



Aspect : huile jaune.
MM : 480.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.19-1.29 (m, 2H, H_4), 1.93 (dt, J= 7.8 Hz, J= 7.3 Hz, 2H, H_5), 2.14 (br s, 4H, H_2), 2.21 (t, J= 7.1 Hz, 2H, H_3), 2.52 (t, J= 7.8 Hz, 2H, $H_{3'}$), 2.73 (t, J= 7.3 Hz, 2H, $H_{2'}$), 3.29-3.31 (m, 4H, H_1), 3.92 (t, J= 7.9 Hz, 1H, H_6), 7.03 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.9 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.05 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.9 Hz, 4H, H_9), 7.21 (dd, J_{H-H} = 8.5 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.27 (dd, J_{H-H} = 8.5 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 4H, H_8).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 26.2 (C_4), 31.4 ($C_{2'}$), 34.2 (C_5), 35.4 ($C_{3'}$), 42.5 (C_{1a}), 46.4 (C_{1b}), 50.2 (C_6), 54.2 (C_2), 58.7 (C_3), 116.4 ($C_{6'}$), 116.7 (C_9), 132.4 (C_8), 132.0 ($C_{5'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.47 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R'= 14.14 min.
MS : APCI+ *m/z* 481 $[M+H]^+$.
Rend : 34.7%.

1-(phenethyl)-carbonyl-4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine (132). Le produit est obtenu selon la procédure B. à partir de l'acide 4-phényl-butanoïque et de la 4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine à l'échelle de 60*5 µmol.

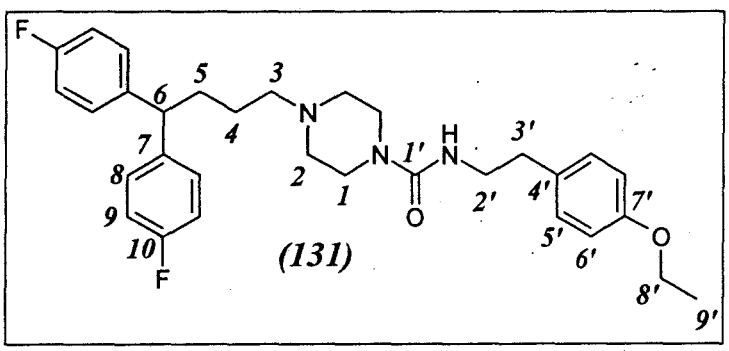


Aspect : huile jaune.
MM : 476.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.19-1.29 (m, 2H, H_4), 1.66-1.76 (m, 2H, $H_{3'}$), 1.94 (dt, J = 7.8 Hz, J= 7.2 Hz, 2H, H_5), 2.15-2.18 (m, 6H, H_{2-3}), 2.23 (t, J= 7.3 Hz, 2H, $H_{2'}$), 2.52 (t, J = 7.8 Hz, 2H, $H_{4'}$), 3.28-3.35 (m, 4H, H_1), 3.93 (t, J= 7.9 Hz, 1H, H_6), 7.05 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.9 Hz, 5H, $H_{6'-8'}$), 7.13 (d, J= 7.1 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.22 (t, J= 6.6 Hz, 2H, $H_{7'}$), 7.27 (dd, J_{H-H} = 8.5 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 4H, H_8).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 26.0 (C_4), 27.9 ($C_{3'}$), 32.7 ($C_{2'}$), 33.7 (C_5), 36.0 ($C_{4'}$), 42.3 (C_{1a}), 46.0 (C_{1b}), 50.2 (C_6), 53.9 (C_2), 59.4 (C_3), 116.7 ($C_{9-8'}$), 129.7 ($C_{7'}$), 129.9 ($C_{6'}$), 130.9 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.61 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R'= 14.46 min.
MS : APCI+ *m/z* 477 $[M+H]^+$.
Rend : 32.9%.

C. Synthèse d'urées en microplaques à l'échelle de 5µmol.

C. 21 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'amine. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 10 minutes, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF de la seconde amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

(4-ethoxy)-phenethyl-4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine carboxamide (131). Le produit est obtenu selon la procédure C. à partir de la 4-éthoxy-phénéthylamine et de la 4-(4,4-bis-(4-fluorophenyl)butyl)-piperazine à l'échelle de 60*5 µmol.

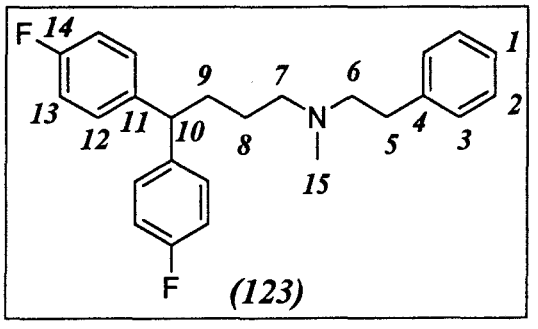


Aspect : huile jaune.

MM : 521.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 600 MHz) δ 1.25 (m, 5H, $H_{4-9'}$), 1.94 (dt, J= 7.7 Hz, J= 7.3 Hz, 2H, H_5), 2.14 (br s, 4H, H_2), 2.22 (t, J= 7.4 Hz, 2H, H_3), 2.56 (t, J= 8.2 Hz, 2H, $H_{3'}$), 3.07-3.12 (m, 2H, $H_{2'}$), 3.16 (m, 4H, H_1), 3.91 (t, J= 7.0 Hz, 1H, H_6), 3.93 (t, J= 7.0 Hz, 2H, $H_{8'}$), 6.46 (t, J= 5.3 Hz, 1H, N*H*CO), 6.77 (d, J= 8.6 Hz, 2H, $H_{6'}$), 7.03 (d, J= 8.6 Hz, 2H, $H_{5'}$), 7.05 (t, $J_{H-H} = J_{H-F}$ = 8.9 Hz, 4H, H_9), 7.28 (dd, J_{H-H} = 8.9 Hz, J_{H-F} = 5.6 Hz, 4H, H_8).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN: (DMSO-d6; 300 MHz) δ 16.2 ($C_{9'}$), 26.2 (C_4), 34.1 (C_5), 36.6 ($C_{3'}$), 43.4 ($C_{2'}$), 45 (C_1), 50.3 (C_6), 54.1 (C_2), 58.9 (C_3), 64.4 ($C_{8'}$), 115.6 ($C_{6'}$), 116.6 (C_9), 130.7 (C_8), 130.9 ($C_{5'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.80 min.
HPLC : (phase inverse CN, 215/254 nm, grad. 25 min) t_R = 14.37 min.
MS : APCI+ *m/z* 522 $[M+H]^+$.
Rend : 17.9%.

D. Autres

N-methyl, N-phénéthyl-4-(4,4'-difluorobenzhydryl)butylamine (123). Un mélange de 1-chloro-4-(4,4'-difluorobenzhydryl)butane (3.73 g, 14.54 mmol) et de N-methyl-pénéthylamine (1.5 g, 11 mmol) dans CH_3CN (20 mL) avec de la DIEA (2.32 mL, 13.31 mmol) est chauffé 4 jours à 50°C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est partagé entre l'eau (30 mL) et CH_2Cl_2 (30 mL). La phase organique est récupérée, séchée ($MgSO_4$) et évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie flash sur gel de siliceavec le système de solvants CH_2Cl_2/MeOH (97:3) permet d'obtenir le produit.



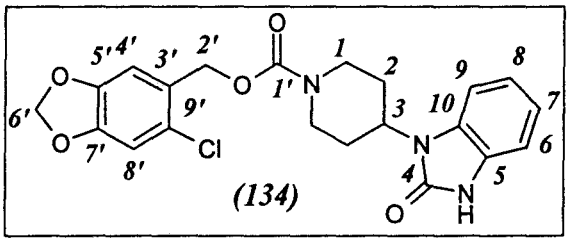
Aspect : huile jaune.
MM : 379.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.21 (m, 2H, H_8), 1.88 (dt, J = 7.8 Hz, J = 7.4 Hz, 2H, H_9), 2.07 (s, 3H, H_{15}), 2.27 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H_7), 2.40 (t, J = 5.8 Hz, 2H, H_6), 2.60 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H_5), 3.88 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H_{10}), 7.0-7.12 (m, 7H, H_{1-3-13}), 7.17-7.26 (m, 6H, H_{2-12}).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.58 min.
MS : APCI+ *m/z* 380 $[M+H]^+$.
Rend : 69%.

E.3.I.5 Synthèse des analogues de *(95)*.

A. Synthèse de carbamates en microplaques à l'échelle de 5 µmoles :

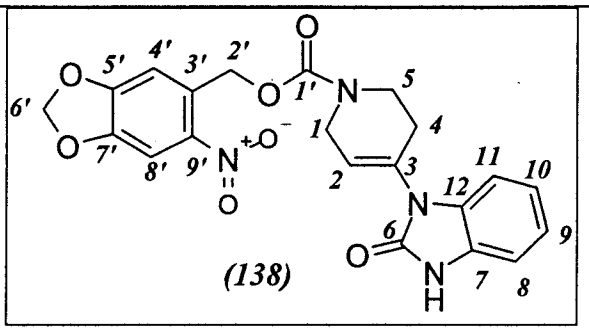
A. 42 µL (10.3 µmol, 2.1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'alcool. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

6-chloro-piperonyl-4'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)piperidine carboxylate (134). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de la 4'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)piperidine et de l'alcool 6-chloro-piperonyl à l'échelle de 40*5 µmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 429.86 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.65 (l d, J = 12 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.17 (ddd, J = 12 Hz, J' = 4.3 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 2.83-2.90 (l s, 2H, H_{1ax}), 4.09 (l d, J = 12 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.32 (m, 1H, H_3), 5.02 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.05 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.91-6.93 (m, 3H, $H_{7\text{-}8\text{-}9}$), 7.04 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.09 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.10-7.15 (m, 1H, H_6), 10.8 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) 29.4 (C_2), 41.2 (C_1), 50.5 (C_3), 64.8 ($C_{2'}$), 103.0 ($C_{6'}$), 109.4 (C_6), 109.8 (C_9), 110.6 ($C_{4'}$), 110.8 ($C_{8'}$), 121.2 (C_8), 121.5 (C_7), 125.7 ($C_{9'}$), 128.0 (C_{10}), 129.1 (C_5), 130.0 ($C_{3'}$), 147.4 ($C_{7'}$), 148.9 (C_3), 154.5 (C_4), 155.0 ($C_{1'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.45 min
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 14.1 min
MS : APCI+ *m/z* 430 $[M+H]^+$ et 386 $[M-44]^+$
Rend :46.5%.

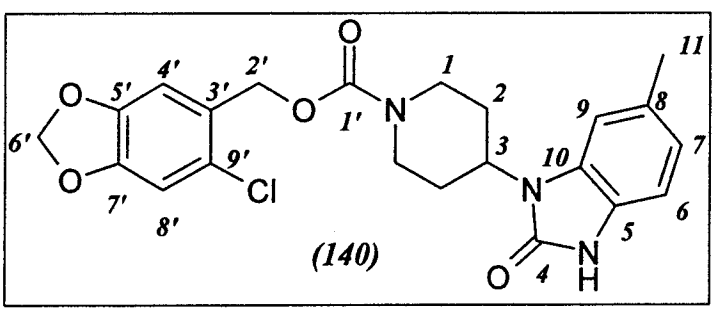
(3,4-methylenedioxy-6-nitro)-benzyl-1',2',3',6'-tetrahydro-4'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl) pyridine carboxylate (138). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-nitro-piperonyl et la 1',2',3',6'-tetrahydro-4'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)-pyridine à l'échelle de 17 fois 5µmoles.



(138)

Aspect : poudre blanche.
MM : 438.40 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 2.45 (s, 2H, H_4), 3.64 (l s, 2H, H_1), 4.12 (l d, 2H, H_5), 5.33 (s, 2H, $H_{2'}$), 5.90 (s, 1H, H_2), 6.60 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.93-6.98 (m, 4H, $H_{9-10-11}$), 7.03 (m, 1H, H_8), 7.16 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.68 (s,1H, $H_{8'}$), 10.94 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 27.3 (C_4), 41.1 (C_5), 43.3 (C_1), 64.6 ($C_{2'}$), 104.6 ($C_{6'}$), 105.1 ($C_{8'}$), 108.9 ($C_{4'}$), 109.6 (C_8), 110.0 (C_{11}), 122.1 (C_{9-10}), 122.8 (C_2).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.43 min.
MS : APCI+ *m/z* 439 $[M+H]^+$.
Rend : 33.5%

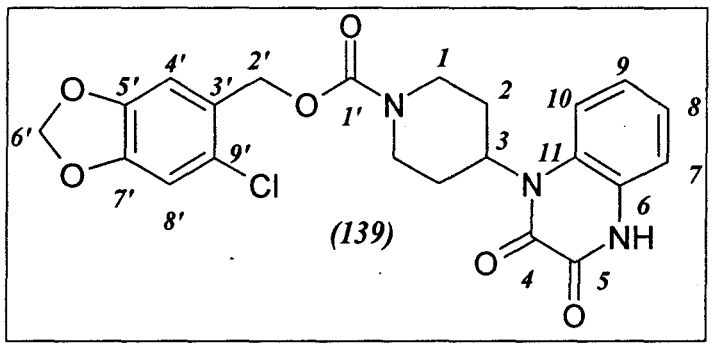
(3,4-methylenedioxy-6-chloro)-benzyl-4'-(2'-oxo-4'-methyl-1'-benzimidazolinyl)-pipéridine carboxylate (140). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-chloro-piperonyl et de la 4-(2-oxo-4-methyl-1-benzimidazolinyl)-pipéridine ***(100)*** à l'échelle de 40*5μmoles.



(140)

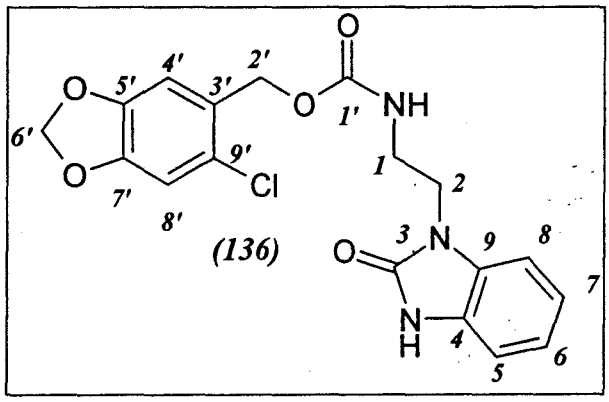
Aspect : poudre blanche.
MM : 443.89 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.63 (l d, J = 12 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.18 (ddd, J = 12.7 Hz, J' = 4.2 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 2.26 (s, 3H, H_{11}), 2.83-2.90 (l s, 2H, H_{1ax}), 4.09 (l d, J = 11.7 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.28 (m, 1H, H_3), 5.01 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.05 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.73 (dd, J = 7.9 Hz, J' = 0.6 Hz, 1H, H_7), 6.80 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_6), 6.98 (l s, 1H, H_9), 7.04 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.09 (s, 1H, $H_{8'}$), 10.7 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ(ppm) :
21.15 (C_{11}), 28.6 (C_2), 43.5 (C_1), 49.6 (C_3), 64.2 ($C_{2'}$), 103.0 ($C_{6'}$), 108.6 (C_6), 109.1 (C_9), 109.8 ($C_{8'}$), 110.2 ($C_{4'}$), 121.3 (C_7).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.67 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 14.74 min.
MS : APCI+ *m/z* 445 $[M+H]^+$ et 400 $[M-44]^+$.
Rend : 11.5%

(3,4-methylenedioxy-6-chloro)-benzyl-4'-(1'-(1',4'-dihydro-quinoxaline-2',3'-dione))-piperidine carboxylate (139). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de la 1-(4-piperidinyl)-1,4-dihydro-quinoxaline-2,3-dione ***(101)*** et de l'alcool 6-chloro-piperonyl à l'échelle de 40*5µmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 457.87 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6 ;300M Hz) δ 1.63 (l d, J = 11.2 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.48-2.56 (ddd, J = 12.7 Hz, J' = 4.2 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 2.83-2.90 (l s, 2H, H_{1ax}), 4.09 (l d, J = 10 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.68 (m, 1H, H_3), 5.05 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.09 (s, 2H, $H_{6'}$), 7.04 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.09 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.15-7.18 (m, 3H, $H_{8\text{-}9\text{-}10}$), 7.63 (m, 1H, H_7),10.7 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6 ; 300M Hz) δ 27.6 (C_2), 44.1 (C_1), 55.3 (C_3), 64.8 ($C_{2'}$), 103.0 ($C_{6'}$), 110.8 ($C_{8'}$), 110.9 ($C_{4'}$), 115.8 (C_7), 116.9 (C_{10}), 123.9 (C_8), 124.5 (C_9), 125.8 ($C_{9'}$), 127.0 (C_6), 127.6 (C_{11}), 128.0 ($C_{3'}$), 147.4 ($C_{7'}$), 148.9 ($C_{5'}$), 154.9 ($C_{1'}$), 156.3 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.40 min
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 3.41 min.
MS : APCI+ *m/z* 458 $[M+H]^+$ et 414 $[M-44]^+$.
Rend : 11.5%

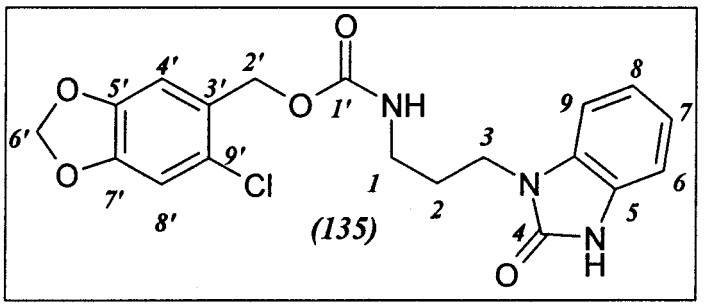
(3,4-methylenedioxy-6-chloro)-benzyl-2'-éthyl-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)amine carboxylate (136). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-chloro-piperonyl et de la 2-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)ethylamine ***(98)*** à l'échelle de 40*5µmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 391.8 g/mol.

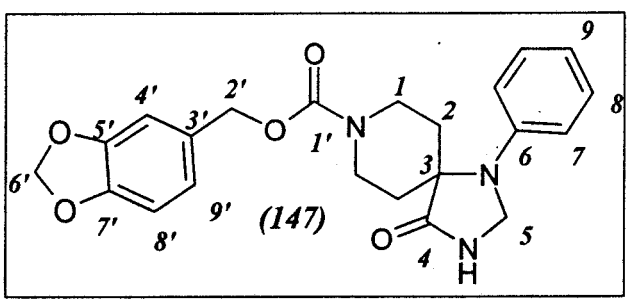
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 3.21 (q, J_{H-NH} = 5.9 Hz, J = 6.1 Hz, 2H, H_1), 2.78 (t, J = 6.1 Hz, 2H, H_2), 4.88 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.04 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.90-6.92 (m, 4H, $H_{4'-6-8-7}$), 6.99 (m, 1H, H_5), 7.06 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.39 (t, J_{H-NH} = 5.9 Hz, 1H, N*H*COO),10.7 (s, 1H, N*H*CON).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 40.5 (C_1), 41.3 (C_2), 63.6 ($C_{2'}$), 102.9 ($C_{6'}$), 108.2 (C_8), 110.4 ($C_{4'}$), 110.5 ($C_{8'}$), 121.2 (C_7), 121.5 (C_6).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.46 min
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 13.58 min.
MS : APCI+ *m/z* 392 $[M+H]^+$.
Rend : 16.6%.

(3,4-methylenedioxy-6-chloro)-benzyl-3'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)propylamine carboxylate (135). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-chloro-piperonyl et de la 3'-(2'-oxo-1'-benzimidazolinyl)propylamine ***(99)*** à l'échelle de 40*5μmoles.



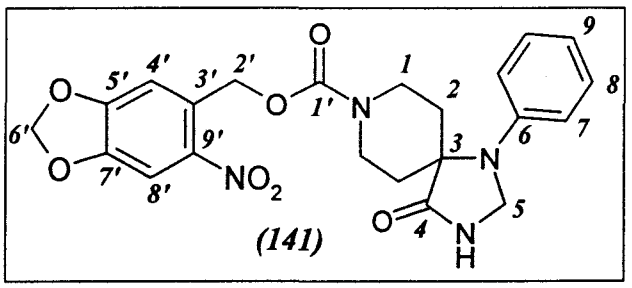
Aspect : Poudre blanche.
MM : 403.82
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ1.69-1.75 (m, 2H, H_2), 2.98 (dt, J = 6.2 Hz, J' = 6.7 Hz, 2H, H_1), 3.74 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H_3), 4.92 (s, 2H, $H_{2'}$), 6.03 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.93-6.96 (m, 3H, H_{7-8-9}), 6.99 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.31 (m, 2H, $H_{8'-6}$), 7.31 (t, J = 5.5 Hz, 1H, N*H*COO),10.80 (s, 1H, N*H*CON).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.5 (C_2), 39.0 (C_3), 39.3 (C_1), 63.9 ($C_{2'}$), 103.4 ($C_{6'}$), 109.4 (C_6), 110.8 ($C_{8'}$), 111.2 ($C_{4'}$), 110.3 (C_9), 122.2 (C_{7-8}).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.42 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 13.40 min.
MS : APCI+ *m/z* 404 $[M+H]^+$ et 360 $[M-44]^+$
Rend : 20.4%

1-phényl-8-piperonyloxycarbonyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (147). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool piperonyle et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 16*5μmoles.



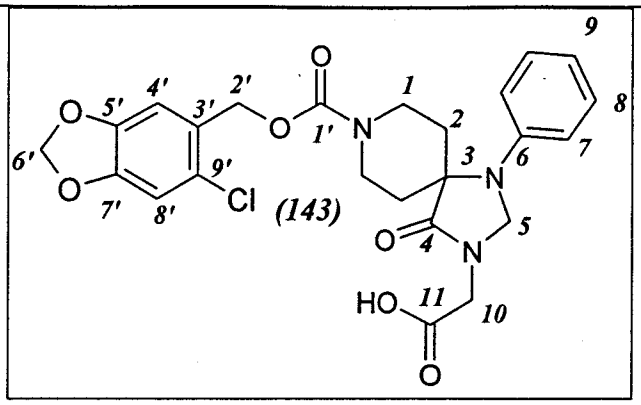
Aspect : poudre blanche.
MM : 409.44 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.59 (d, J= 13.8 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.30 (ddd, J = 5.1 Hz, J' = 13.2 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 3.46 (ls, 2H, H_{1ax}), 3.90 (dd, J = 4.1 Hz, J' = 12.7 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.55 (s, 2H, H_5), 4.98 (ld, J= 7.5Hz, $H_{2'}$), 5.96 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.63 (d, J= 8.0 Hz, 2H, H_7), 6.71 (t, J= 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.8-6.85 (m, 2H, $H_{8'-9'}$), 6.91 (d, J = 0.6 Hz, 1H, $H_{4'}$), 7.13 (t, J= 7.4 Hz, 2H, H_8), 8.75 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.3 (C_2), 41.6 (C_1), 59.7 (C_3), 59.7 (C_5), 67.6 ($C_{2'}$), 102.6 ($C_{6'}$), 109.6 ($C_{8'}$), 110.0 ($C_{4'}$), 115.9 (C_7), 119.4 (C_9), 123.1 ($C_{9'}$), 130.8 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.66 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 13.97 min.
MS : APCI+ *m/z* 410 $[M+H]^+$ et 366 $[M-44]^+$.
Rend : 15.9%.

1-phényl-(6-nitro-piperonyl-oxycarbonyl)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one carboxylate (141). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-nitro-piperonyl et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 16*5μmoles.



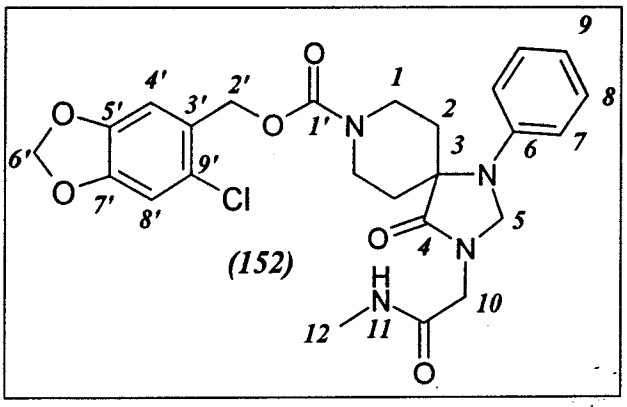
Aspect : poudre blanche.
MM : 454.45 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.62 (d, J_{gem} = 14.2 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.35 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.46 (m, 2H, H_{1ax}), 3.91 (dd, 2H, $H_{1éq}$), 4.56 (s, 2H, $H_{2'}$), 5.31 (l d, 2H, H_5), 6.21 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.68 (d, J_{7-8} = 8.25 Hz, 2H, H_7), 6.72 (t, J_{8-9} = 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.13 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.16 (dd, J_{8-9} = 7.4 Hz, J_{8-7} = 8.6 Hz, 2H, H_8), 7.67 (s, 1H, $H_{8'}$), 8.77 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 28.8 (C_2), 59.1 ($C_{2'}$), 64.8 (C_5), 104.6 ($C_{6'}$), 106.5 ($C_{8'}$), 109.2 ($C_{4'}$), 115.1 (C_9), 130.3 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.61 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 13.87 min.
MS : APCI+ *m/z* 455 $[M+H]^+$.
Rend :5.5%

3-carboxymethyl-8-(6-chloro-piperonyl-oxycarbonyl)-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one carboxylate (143). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-chloro-pipéronyl et de l'acide 3-(1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl acetique *(117)* à l'échelle de 40*5μmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 501.93 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.60 (d, J = 13.6 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.32 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.35 (ls, 2H, H_{1ax}), 3.90 (dd, 2H, $H_{1éq}$), 4.07 (s, 2H, H_{10}), 4.66 (s, 2H, H_5), 5.03 (l d, J = 18 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.04 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.67 (d, J = 8.15 Hz, 2H, H_7), 6.76 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.05 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.09 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.17 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H_8), 9.04 (s, 1H, COO*H*).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 30 (C_2), 41.8 (C_1), 43.6 (C_{10}), 65.0 (C_5), 65.7 ($C_{2'}$), 104.1 ($C_{6'}$), 111.3 ($C_{8'}$), 111.7 ($C_{4'}$), 116.2 (C_7), 120 (C_9), 130.7 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.82 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 14.04 min.
MS : APCI+ *m/z* 502 $[M+H]^+$ et 458 $[M-44]^+$.
Rend : 14.3%.

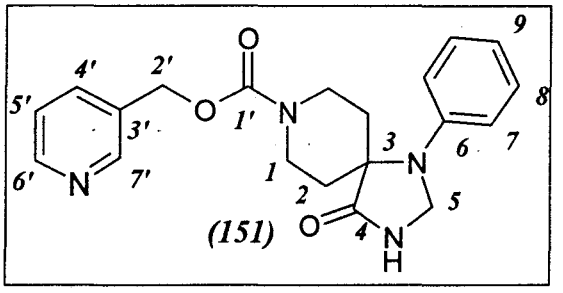
8-(6-chloro-piperonyloxycarbonyl)-3-(N-methyl)carboxamido-1-phényl-1,3,8-triazaspiro [4.5]decan-4-one (152). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de la N-methyl-3-(1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl-acetamide ***(118)*** et de l'alcool 6-chloro-piperonyl à l'échelle de 40*5μmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 514.97 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ1.64 (d, J = 13.6 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.32 (ddd, J = 13.6 Hz, J' = 5.43 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 2.57 (d, J_{NH-H} = 4.53, 3H, $H_{1éq}$), 3.41-3.45 (l s, 2H, H_{1ax}), 3.88 (l s, 2H, $H_{1éq}$), 3.93 (s, 2H, H_{10}), 4.65 (s, 2H, H_5), 5.03 (l d, J = 34.4 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.05 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.66 (d, J = 8.10 Hz, 2H, H_7), 6.74 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.05 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.09 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.16 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H_8), 7.99 (m, 1H, CH_3N*H*CO).

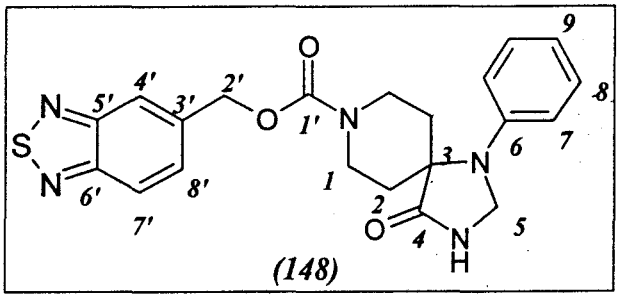
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 26.8 (C_{12}) 30.0 (C_2), 41.8 (C_1), 44.5 (C_{10}), 65.5 (C_5), 65.8 ($C_{2'}$), 103.7 ($C_{6'}$), 111.3 ($C_{8'}$), 111.8 ($C_{4'}$), 116.1 (C_7), 119.8 (C_9), 130.9 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.81min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 14.39 min.
MS : APCI+ *m/z* 515 $[M+H]^+$ et 471 $[M-44]^+$.
Rend : 19.4%.

1-phényl-8-(3-pyridine)-methyl-oxycarbonyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (151). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir du 3-hydroxyméthyl-pyridine et de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one à l'échelle de 40*5μmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 366.42 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.60 (d, *J* = 13.8 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.31 (ddd, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.5 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 3.48 (l s, 2H, H_{1ax}), 3.92 (dd, *J* = 13.1 Hz, *J'* = 4.9 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.55 (s, 2H, H_5), 5.13 (l d, *J* = 9.9 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.63 (d, J_{7-8} = 8.0 Hz, 2H, H_7), 6.72 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.15 (t, *J* =7.4 Hz, 2H, H_8), 7.37 (ddd, *J* = 4.9 Hz, *J'* = 7.9 Hz, *J''* = 0.7 Hz, 1H, $H_{5'}$), 7.77 (dt, *J* = 7.9 Hz, *J'* = 1.8 Hz, 1H, $H_{4'}$), 8.51 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, $H_{6'}$), 8.58 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, $H_{7'}$), 8.76 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.8 (C_2), 41.7 (C_1), 60.2 (C_5), 65.7 ($C_{2'}$), 115.7 (C_7), 119.5 (C_9), 125.1 ($C_{5'}$), 130.8 (C_8), 137.4 ($C_{4'}$), 150.5 ($C_{7'}$), 150.7 ($C_{6'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 1.87min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 3.77 min.
MS : APCI+ *m/z* 367 $[M+H]^+$.
Rend : 46.5%.

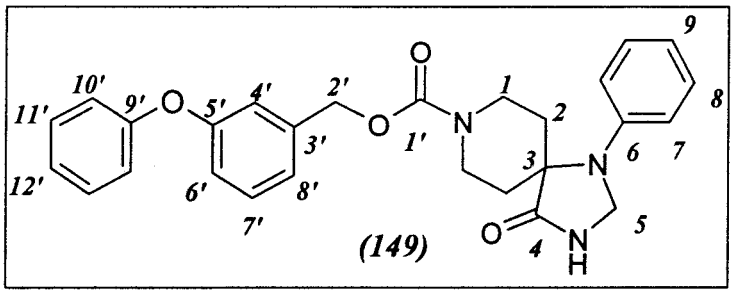
8-((2,1,3-benzothiadiazolyl)-methyloxycarbonyl)-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (148). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir du 2,1,3-benzothiadiazole-5-methanol *(97)* et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 40*5μmoles.



Aspect : poudre jaune.
MM : 423.50 g/mol

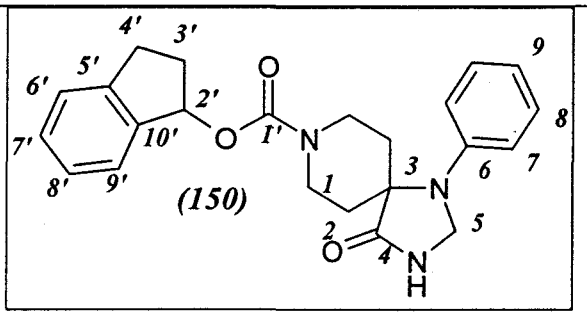
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.63 (d, J = 13.6 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.34 (ddd, J = 13.6 Hz, J = 5.5 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 3.5 (l s, 2H, H_{1ax}), 3.97 (l s, 2H, $H_{1éq}$), 4.55 (s, 2H, H_5), 5.31 (l d, J = 9.6 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.64 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H_7), 6.67 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.07 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H_8), 7.7 (dd, J = 9.0 Hz, J' = 1.4 Hz, 1H, $H_{8'}$), 8.02 (s, 1H, $H_{4'}$), 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H, $H_{6'}$), 8.77 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.8 (C_2), 42.0 (C_1), 60.2 (C_5), 67.3 ($C_{2'}$), 115.8 (C_7), 119.5 (C_9), 120.4 ($C_{4'}$), 122.8 ($C_{7'}$), 130.6 (C_8), 131.4 ($C_{8'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.64 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 12.07 min.
MS : APCI+ *m/z* 424 $[M+H]^+$.
Rend : 16.5%.

8-(3-phénoxy)-benzyloxycarbonyl-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (149). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 3-phénoxy-benzylique et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 40*5μmoles.



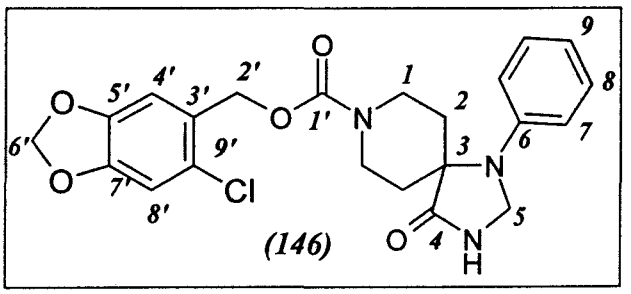
Aspect : poudre blanche.
MM : 457.53 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.59 (d, J = 14 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.24-2.35 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.4-3.6 (l s, 2H, H_{1ax}), 3.90 (dd, J = 12.3 Hz, J' = 3.6 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.55 (s, 2H, H_5), 5.08 (l d, J = 10.8 Hz, 2H, $H_{2'}$), 6.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_7), 6.70 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.91 (m, 3H, $H_{6'-10'}$), 6.96 (d, J' = 0.9 Hz, 1H, $H_{4'}$), 7.06-7.12 (m, 2H, $H_{8'-12'}$), 7.13 (t, J = 8.3 Hz, 2H, H_8), 7.30-7.37 (m, 3H, $H_{7'-11'}$), 8.76 (s, 1H, CON*H*).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.8 (C_2), 42.1 (C_1), 60.5 (C_5), 67.3 ($C_{2'}$), 115.7 (C_7), 118.4 ($C_{4'}$), 119.0 ($C_{6'}$), 119.4 (C_9), 120.5 ($C_{10'}$), 123.5 ($C_{8'}$), 125.3 ($C_{12'}$), 130.5 (C_8), 132.7 ($C_{7'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 3.38 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 15.33 min.
MS : APCI+ *m/z* 458 $[M+H]^+$.
Rend : 21.8%

8-(2,3-dihydro-2H-inden-1-yl)-oxycarbonyl-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (150). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'indan-1-ol et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 40*5μmoles.



Aspect : poudre blanche.
MM : 391.47 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.57 (l s, 2H, H_{2ax}), 1.96-2.02 (m, 1H, $H_{3'}$), 2.34-2.40 (l s, 2H, $H_{2éq}$), 2.44-2.47 (m, 1H, $H_{3'}$), 2.81-2.86 (m, 1H, $H_{4'}$), 2.92-2.97 (m, 1H, $H_{4'}$), 3.41-3.45 (m, 2H, H_{1ax}), 3.85-3.87 (m, 2H, $H_{1éq}$), 4.54 (s, 2H, H_5), 6.04 (ls, 1H, $H_{2'}$), 6.65 (d, J=8.1 Hz, 2H, H_7), 6.72 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H_9), 7.15-7.19 (m, 3H, $H_{8-9'}$), 7.26 (d, J = 3.8 Hz, 2H, $H_{7'-8'}$), 7.35 (d, J = 7.3 Hz, 1H, $H_{6'}$), 8.75 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.5 (C_2), 30.9 ($C_{4'}$), 41.8 (C_1), 60.5 (C_5), 80 ($C_{2'}$), 115.7 (C_7), 119.7 (C_9), 126.5 ($C_{6'-8'}$), 128.2 ($C_{9'}$), 130.4 ($C_{7'}$), 130.8 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 3.09 min
MS : APCI+ *m/z* 392 $[M+H]^+$.
Rend : 16.6 %.

8-(6-chloro-piperonyloxycarbonyl)-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (146). Le produit est obtenu selon le protocole A. à partir de l'alcool 6-chloro-piperonyl et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 40*5μmoles.

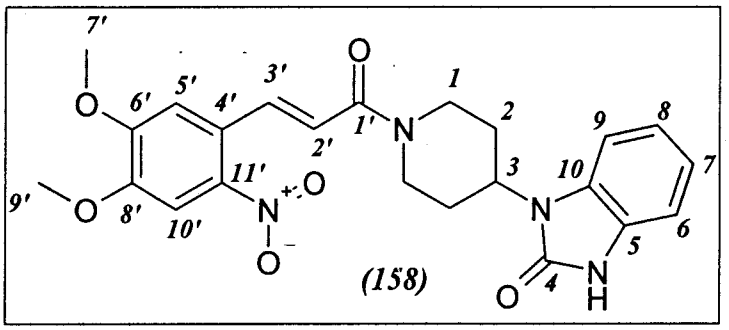


Aspect : poudre blanche.
MM : 443.89 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.59 (d, J = 13.7 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.32 (ddd, J = 13.6 Hz, J' = 5.5 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 3.42-3.49 (m, 2H, H_{1ax}), 3.87-3.91 (m, 2H, $H_{1éq}$), 4.55 (s, 2H, H_5), 4.97 (s, 1H, $H_{2'}$), 5.09 (s, 1H, $H_{2'}$), 6.04 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.64 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H_7), 6.72 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H_9), 7.04 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.09 (s, 1H, $H_{8'}$), 7.14 (t, J = 8.4 Hz, 2H, H_8), 8.76 (m, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.6 (C_2), 41.9 (C_1), 60.4 (C_5), 65.8 ($C_{2'}$), 103.7 ($C_{6'}$), 111.5 ($C_{8'}$), 111.8 ($C_{4'}$), 115.7 (C_7), 119.4 (C_9), 130.7 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.74 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 14.59 min.
MS : APCI+ *m/z* 445 $[M+H]^+$.
Rend : 32.3%.

B. Synthèse d'amides en microplaques à l'échelle de 5 µmoles :

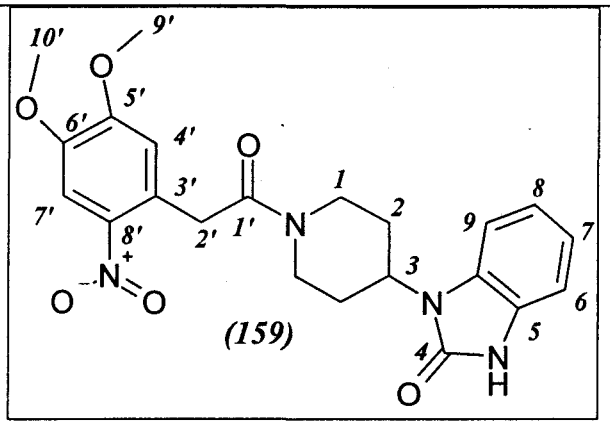
B. 42 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

1-(3,4-diméthoxy-6-nitro-phényl)-éthylen-carbonyl-4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)pipéridine (158). Le produit est obtenu selon le protocole à partir de l'acide 3,4-diméthoxy-6-nitro-cinnamique et de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)pipéridine à l'échelle de 40*5µmoles. Les deux isomères cis et trans (66%/33%) sont observés.



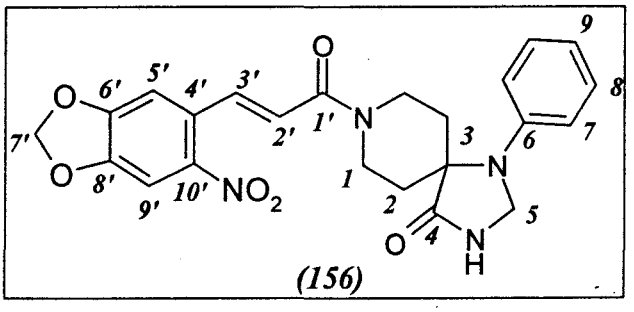
Aspect : poudre jaune.
MM : 452.47 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.75-1.78 (m, 2H, H_{2ax}), 2.29 (ld, J = 9.6 Hz, 1H, $H_{2éqcis}$), 2.30 (ld, J = 9.6 Hz, 1H, $H_{2éqtrans}$), 2.77 (t, J = 12 Hz, 1H, $H_{1ax\ cis}$), 2.92 (t, J = 12 Hz, 1H, $H_{1éqcis}$), 3.25 (t, J = 6.8 Hz, 1H, H_{3cis}), 3.85 (s, 3H, $H_{7'}$), 3.94 (s, 3H, $H_{9'}$), 3.97 (d, J = 12 Hz, 1H, $H_{1axtrans}$), 4.40-4.47 (m, 1H, H_{3trans}), 4.64 (d, J = 13 Hz, 1H, $H_{1éqtrans}$), 6.97-6.99 (m, 3H, H_{7-8-9}), 7.23-7.26 (m, 1H, H_6), 7.33 (d, J = 15 Hz, 1H, $H_{2'cis}$), 7.42 (s, 1H, $H_{10'}$), 7.63 (s, 1H, $H_{5'}$), 7.86 (d, J = 15 Hz, 1H, $H_{3'cis}$), 8.19 (d, J = 2 Hz, 1H, $H_{2'trans}$), 8.55 (d, J = 1 Hz, 1H, $H_{3'trans}$), 10.83 (s, 1H, N*H*CON$_{trans}$), 10.87 (s, 1H, N*H*CON$_{cis}$).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.8 ($C_{2\ cis}$), 30.6 ($C_{2\ trans}$), 42.7 ($C_{1\ cis}$), 45.8 (C_3), 48.0 (C_{1trans}), 57.2 ($C_{9'}$), 57.7 ($C_{7'}$), 109.1 ($C_{5'}$), 110.2 (C_6), 110.4 (C_{7-8}), 112.0 ($C_{10'}$), 122.0 (C_9), 123.5 ($C_{2'cis}$), 137.0 ($C_{3'}$), 144.8 ($C_{2'trans}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.36 min
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 3.41 min.
MS : APCI+ *m/z* 453 $[M+H]^+$.
Rend : 18.8%

1-(3,4-méthylènedioxy-6-nitro-phényl)-acetyl-4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine (159). Le produit est obtenu selon le protocole XXX à partir de l'acide 3,4-méthylènedioxy-6-nitro-phényl acétique et de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)pipéridine à l'échelle de 40*5µmoles. Les deux isomères cis et trans (52%/48%) sont observés.



Aspect : Poudre jaune.
MM : 440.46 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.67 (ld, J = 12 Hz, 1H, $H_{2ax\ cis}$), 1.76 (ld, J = 12 Hz, 1H, $H_{2ax\ trans}$), 2.03-2.11 (m, 1H, $H_{2éq\ cis}$), 2.36-2.45 (m, 1H, $H_{2éq\ trans}$), 2.68 (t, J = 12 Hz, 1H, $H_{1ax\ cis}$), 3.21-3.28 (m, 1H, $H_{1ax\ trans}$), 3.82 (s, 3H, $H_{9'}$), 3.85 (s, 3H, $H_{10'}$), 4.07 (d, J = 16 Hz, 1H, $H_{2'}$), 4.10-4.18 (m, 1H, $H_{1éq\ cis}$), 4.20 (d, J = 16 Hz, 1H, $H_{2'}$), 4.41-4.49 (m, 2H, $H_{3\text{-}1éq\ trans}$), 6.92-6.95 (m, 3H, $H_{7\text{-}8\text{-}9}$), 7.06 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.24-7.27 (m, 1H, H_6), 7.65 (s, 1H, $H_{8'}$), 10.83 (s, 1H, N*H*CON).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 30.0 ($C_{2\ cis}$), 30.6 ($C_{2\ trans}$), 39.7 ($C_{2'}$), 42.7 ($C_{1\ cis}$), 45.8 ($C_{1\ trans}$), 51.2 (C_3), 57.2 ($C_{9'}$), 57.7 ($C_{10'}$), 109.1 ($C_{8'}$), 110.2 (C_6), 110.4 ($C_{7\text{-}8}$), 117.0 ($C_{4'}$), 122.0 (C_9).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.17 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 13.02 min.
MS : APCI+ *m/z* 442 $[M+H]^+$.
Rend : 23.5%

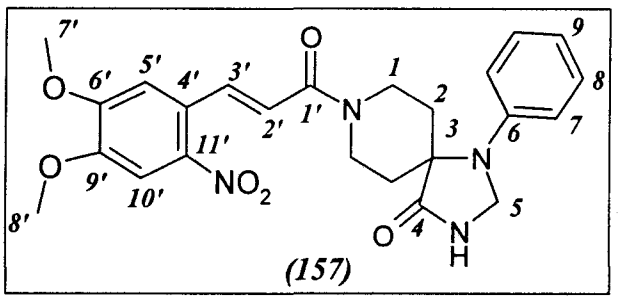
8-(2-(3,4-methylenedioxy-6-nitro-phenyl)-éthen-1-yl-carbonyl)-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (156). Le produit est obtenu selon le protocole B. à partir de l'acide 3,4méthylènedioxy-6-nitrocinnamique et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 16*5μmoles. On observe les isomères cis/trans (50%/50%).



Aspect : poudre jaune.
MM : 450.45 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.68 (d, J = 14.5 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.30-2.40 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.29-3.39 (m, 1H, $H_{1ax,\ cis}$), 3.75 (t, 1H, $H_{1ax,\ trans}$), 4.24 (d, J = 11.1 Hz, 2H, $H_{1éq,\ cis}$), 4.37 (d, J = 11.1 Hz, 2H, $H_{1éq,\ trans}$), 4.57 (s, 2H, H_5), 6.22 (s, 2H, $H_{7'}$), 6.67 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H_7), 6.70 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_9), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H_8), 7.27 (d, J =

15.1 Hz, 1H, $H_{2'}$), 7.60 (s, 1H, $H_{5'}$), 7.61 (s, 1H, $H_{9'}$), 7.71 (d, J = 15.1 Hz, 1H, $H_{3'}$), 8.79 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.8 (C_2 cis), 30.1 (C_2 trans), 40.3 (C_1 cis), 42.4 (C_1 trans), 60.2 (C_5), 105.2 ($C_{7'}$), 106.4 ($C_{5'}$), 108.7 ($C_{9'}$), 115.9 (C_7), 119.6 (C_9), 123.9 ($C_{2'}$), 130.9 (C_8), 137.4 ($C_{3'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.67 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 12.44 min.
MS : APCI+ *m/z* 451 $[M+H]^+$.
Rend : 33.3%

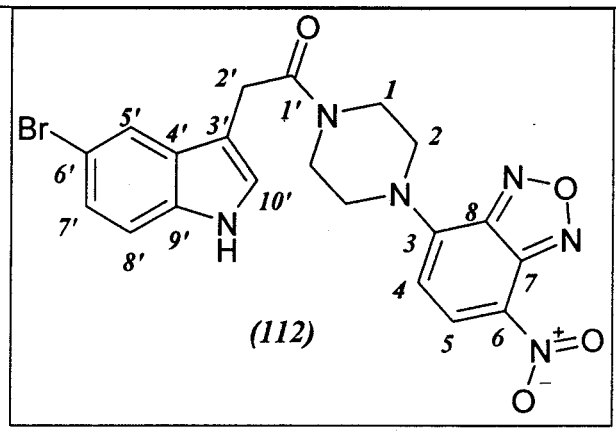
8-(2-(3,4-diméthoxy-6-nitro-phenyl)-éthen-1-yl-carbonyl)-1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (157). Le produit est obtenu selon le protocole B. à partir de l'acide 3,4diméthoxy-6-nitrocinnamique et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 16*5μmoles.



(157)

Aspect : poudre jaune.
MM : 466.50 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.60 (m, 2H, H_{2ax}), 2.40-2.45 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.30-3.35 (m, 1H, $H_{1ax, cis}$), 3.75-3.80 (m, 1H, $H_{1ax, trans}$), 3.84 (s, 3H, $H_{7'}$), 3.93 (s, 3H, $H_{8'}$), 4.24 (d, 2H, J = 11.1 Hz, $H_{1éq, cis}$), 4.37 (d, 2H, J = 11.1 Hz, $H_{1éq, cis}$), 4.58 (s, 2H, H_5), 6.68 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_7), 6.71 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H_9), 7.17 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H_8), 7.27 (d, J = 15.2 Hz, 1H, $H_{2'}$), 7.36 (s, 1H, $H_{5'}$), 7.58 (s, 1H, $H_{9'}$), 7.82 (d, J = 15.2 Hz, 1H, $H_{3'}$), 8.79 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.8 (C_2 cis), 31.1 (C_2 trans), 40.4 (C_1 cis), 43.5 (C_1 trans), 57.6 ($C_{7'}$), 58.3 ($C_{8'}$), 60.2 (C_5), 109.4 ($C_{9'}$), 112.1 ($C_{5'}$), 116.0 (C_7), 119.8 (C_9), 123.9 ($C_{2'}$), 130.8 (C_8), 138.1 ($C_{3'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.67 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 12.86 min.
MS : APCI+ *m/z* 467 $[M+H]^+$.
Rend : 40.7%

(5-bromo)-indolyl-3-acetyl-4'-(7'-nitro-benzo<1,2,5>oxadiazol-4-yl)-piperazine (112). Le produit est obtenu selon le protocole XXX à partir de l'acide (5-bromo)-indolyl-3-acétique et de la 4-(7-nitro-benzo<1,2,5>oxadiazol-4-yl)piperazine ***(116)*** à l'échelle de 40*5μmoles.



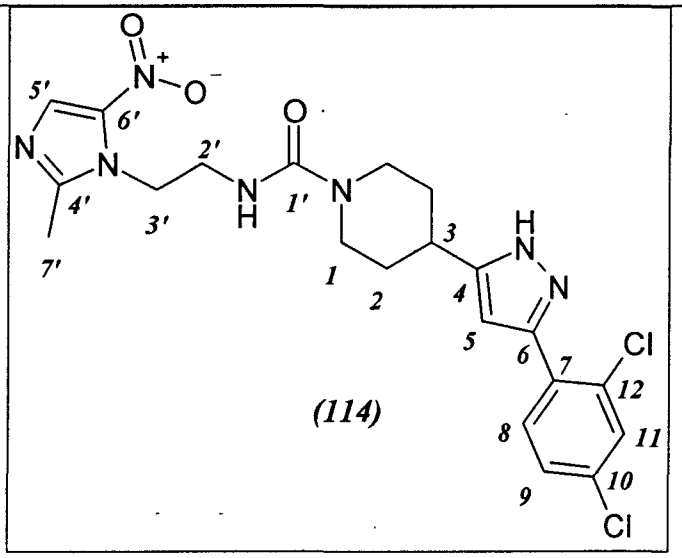
(112)

Aspect : Poudre orange.
MM : 485.30 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 3.70-3.73 (m, 2H, $H_{piperazine}$), 3.79 (s, 2H, $H_{2'}$), 3.81-3.84 (m, 2H, $H_{piperazine}$), 4.00-4.10 (m, 4H, $H_{piperazine}$), 6.54 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_4), 7.11 (d, J = 8.6 Hz, J' = 1.9 Hz, 1H, $H_{7'}$), 7.26 (d, J = 8.5 Hz, 1H, $H_{8'}$), 7.29 (s, 1H, $H_{10'}$), 7.71 (d, J = 1.8 Hz, 1H, $H_{5'}$), 8.46 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_5), 11.09 (s, 1H, NH_{indole}).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 31.8 ($C_{2'}$), 42.0 ($C_{piperazine}$), 45.5 ($C_{piperazine}$), 50.1 ($C_{piperazine}$), 50.4 ($C_{piperazine}$), 104.7 (C_4), 115 ($C_{8'}$), 122.8 ($C_{5'}$), 125 ($C_{7'}$), 127.1 ($C_{10'}$), 137.8 (C_5).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.54 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 3.99 min.
MS : APCI+ *m/z* 485 $[M+H]^+$.
Rend : 16.4%

C. Synthèse d'urées en microplaques à l'échelle de 5 µmoles :

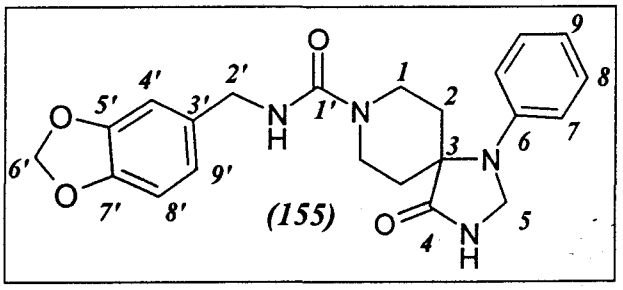
C. 21 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF d'amine. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 10 minutes, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF de la seconde amine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

N-(5-(3-(2,4-dichlorophenyl))pyrazole)piperidinyl)-carbonyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro)-imidazolyl)-éthylamine (114). Le produit est obtenu selon le protocole C. à partir de l'acide 4-(5-(3-(2,4-dichlorophenyl))pyrazole)piperidinyl-carboxylique et de la 2-(1-(2-methyl-5-nitro)imidazolyl)-éthylamine à l'échelle de 40*5µmoles.



Aspect : Poudre jaune.
MM : 492.37 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.44-1.56 (m, 2H, H_{2ax}), 1.93-1.97 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.48 (s, 3H, $H_{7'}$), 2.80-2.97 (m, 3H, H_{1ax-3}), 3.47 (dt, J = 5.6 Hz, J' = 5.7 Hz, 2H, $H_{2'}$), 3.98-4.02 (m, 2H, $H_{1éq}$), 4.41 (t, J = 5.7 Hz, 2H, $H_{3'}$), 6.64 (s, 1H, H_5), 6.84 (t, J = 5.4 Hz, 1H, N*H*CON), 7.54 (dd, J = 8.4 Hz, J' = 1.8 Hz, 1H, H_9), 7.74 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H_{11}), 8.40 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H_8), 8.11 (s, 1H, $H_{5'}$), 13.0 (s, 1H, N*H* $_{pyrazole}$).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 14.5 ($C_{7'}$), 31.9 (C_2), 33.6 (C_3), 39.9 ($C_{2'}$), 43.9 (C_1), 46.6 ($C_{3'}$), 103.0 (C_5), 128.1 (C_9), 130.2 (C_{11}), 132.0 (C_8), 132.3 (C_4), 132.9 (C_6), 133.8 ($C_{6-10-11}$), 139.2 ($C_{4'}$), 148.3 (C_7), 152.2 ($C_{6'}$), 157.6 ($C_{1'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.66 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 13.77 min.
MS : APCI+ *m/z* 493 $[M+H]^+$.
Rend : 37.7%

1-phényl-8-(piperonyl-carbamoyl)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one (155). Le produit est obtenu selon le protocole C. à partir de la piperonylamine et de la 1-phényl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one à l'échelle de 16*5μmoles



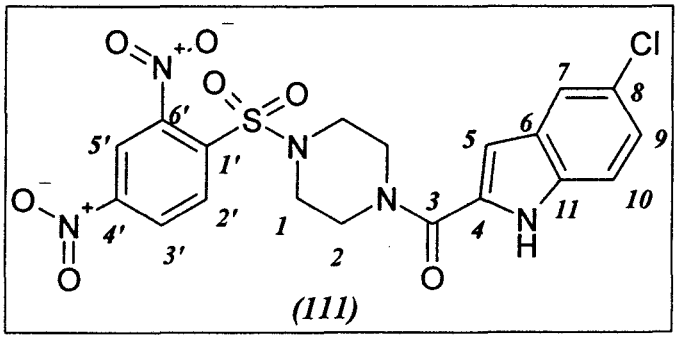
Aspect : poudre blanche.
MM : 408.46 g/mol
^{1}H RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 1.49 (d, J = 13.5 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.35 (ddd, J = 5.2 Hz, J' = 13.5 Hz, 2H, $H_{2éq}$), 3.37 (dt, J = 2.8 Hz, J' = 12.9 Hz, 2H, H_{1ax}), 4.25 (dd, J = 3.3 Hz, J' = 12.3 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.15 (d, J_{NH-H} = 5.7 Hz, 2H, $H_{2'}$), 4.54 (s, 1H, H_5), 5.93 (s, 2H, $H_{6'}$), 6.59 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_7), 6.68 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.72 (dd, J = 7.8

Hz, J' = 1.6 Hz, 1H, $H_{9'}$), 6.78 (s, 1H, $H_{4'}$), 6.81 (dd, J = 1.5 Hz, J' = 4.8 Hz, 1H, $H_{8'}$), 7.08 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H_8), 7.12 (t, J = 5.8 Hz, 1H, OCON*H*), 8.71 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 29.2 (C_2), 42.1 (C_1), 43.4 ($C_{2'}$), 60.2 (C_5), 102.3 ($C_{6'}$), 109.4 ($C_{8'}$), 109.6 ($C_{4'}$), 115.4 (C_7), 119.2 (C_9), 121.8 ($C_{9'}$), 130.8 (C_8).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.23 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 12.29 min.
MS : APCI+ *m/z* 409 $[M+H]^+$.
Rend : 52.6%

D. Synthèse de trimères en microplaques à l'échelle de 5 µmoles :

T. 25 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de sulfochlorure 0.2 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 50µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.1 M / DMF de N-Boc-pipérazine. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, le milieu réactionnel est évaporé. Le résidu est solubilisé dans 100µL d'une solution de TFA/DCM (50%/50%) et la solution est agitée à température ambiante pendant 30 minutes puis évaporée sous pression réduite. 42 µL (5 µmol, 1 éq.) d'une solution de N,N'-carbonyldiimidazole 0.247 M / THF sont ajoutés à température ambiante à 9µL (5µmol, 1 éq.) d'une solution 0.56 M / DMF d'acide. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 2 h, 50 µL d'une solution 0.1 M / DMF de l'amine déprotégée sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu est purifié par HPLC Préparative.

Acide cis/trans 5-chloro-indole-2-carboxylique 4-(2,5-dinitro-benzenesulfonyl)-piperazinyl amide (111). Le produit est obtenu selon le protocole T. à partir du chlorure 2,5-dinitro-benzenesulfonyle et de l'acide 5-chloro-indole-2-carboxylique à l'échelle de 40*5µmoles. On observe les formes cis et trans (68%/32%).

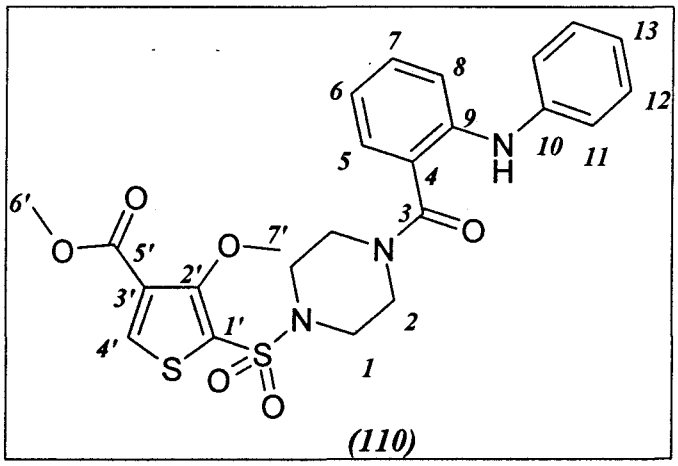


(111)

Aspect : Poudre jaune.
MM : 493.88 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 3.45-3.48 (m, 4H, $H_{piperazine}$), 3.93-3.98 (m, 4H, $H_{piperazine}$), 6.87 (dd, J = 2.0 Hz, J' = 0.6 Hz, 0.7H, $H_{5\ cis}$), 6.95 (dd, J = 2.0 Hz, J' = 0.6 Hz, 0.3H, $H_{5\ trans}$), 7.27 (dd, J = 2.1 Hz, J' = 8.8 Hz, 0.7H, $H_{9\ cis}$), 7.29 (dd, J = 2.1 Hz, J' = 8.8 Hz, 0.3H, $H_{9\ trans}$), 7.50 (d, J = 8.8 Hz, 0.7H, $H_{10\ cis}$), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 0.3H, $H_{10\ trans}$), 7.74 (d, J = 2.1 Hz, 0.7H, $H_{7\ cis}$), 7.76 (d, J = 2.1 Hz, 0.3H, $H_{7\ trans}$), 8.37 (d, J = 8.7 Hz, 0.7H, $H_{2'\ cis}$), 8.39 (d, J = 8.7 Hz, 0.3H, $H_{2'\ trans}$), 8.68 (dd, J = 2.3 Hz, J' = 8.7 Hz, 0.7H, $H_{3'\ cis}$), 8.72 (dd, J = 2.3 Hz, J' = 8.7 Hz, 0.3H, $H_{3'\ trans}$), 9.11 (d, J = 2.3 Hz, 1H, $H_{5'}$), 11.87 (d, J = 1.4 Hz, 0.7H, NH_{indole}), 11.93 (d, J = 1.4 Hz, 0.7H, NH_{indole}).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 45.8 ($C_{piperazine}$), 46.4 ($C_{piperazine}$), 50.4 ($C_{piperazine}$), 104.6 (C_5), 114.4 (C_{10}), 120.8 ($C_{5'\ cis}$), 121.1 (C_7 cis), 121.7 ($C_{5'\ trans}$), 123.9

($C_{3'\ trans}$), 124.2 (C_9), 125.0 (C_8), 127.7 ($C_{3'\ cis}$), 128.4 (C_6), 129.0 ($C_{2'\ trans}$), 131.5 (C_4), 133 ($C_{2'\ cis}$), 134.7 ($C_{1'}$), 135.1 (C_{11}), 148.5 ($C_{4'\ cis}$), 148.9 ($C_{4'\ trans}$), 150.9 ($C_{6'}$), 162.5 (C_3).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.88 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 15.27 min.
MS : APCI+ *m/z* 495 $[M+H]^+$.
Rend : 15.5%

1-(2-phenylamino-benzoyl)-4-(3-methoxy-4-methoxycarbonyl-thiophene-2-sulfonyl)-piperazine (110). Le produit est obtenu selon le protocole T. à partir du chlorure de 3-methoxy-4-methoxycarbonyl-thiophene-2-sulfonyle et de l'acide 2-phenylamino-benzoïque à l'échelle de 40*5µmoles.



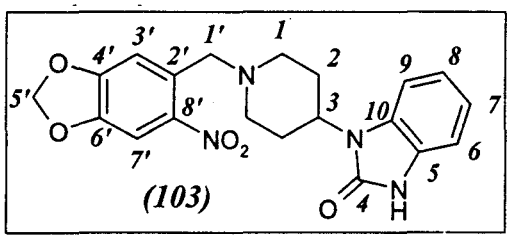
Aspect : Poudre jaune.
MM : 515.6 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6) (300M Hz) δ 3.00-3.10 (m, 4H, $H_{piperazine}$), 3.40-3.60 (m, 4H, $H_{piperazine}$), 3.89 (s, 3H, $H_{7'}$), 3.94 (s, 3H, $H_{6'}$), 6.83 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_8), 6.91 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H_{11}), 7.06 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H_{13}), 7.15 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H_{12}), 7.26 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_6), 7.31 (dd, J = 1.3 Hz, J' = 7.6 Hz, 1H, H_9), 7.40 (dt, J = 1.4 Hz, J' = 8.3 Hz, 1H, H_7), 7.82 (s, 1H, PhN*H*Ph), 8.72 (s, 1H, $H_{4'}$).
^{13}C RMN et HSQC (^{1}H ;^{13}C): (DMSO-d6) (300M Hz) δ 41.0 ($C_{piperazine}$), 46.2 ($C_{piperazine}$), 52.8 ($C_{7'}$), 63.8 ($C_{6'}$), 117.4 (C_{11}), 120.1 (C_6), 120.6 (C_8), 121.8 (C_{13}), 123.8 ($C_{3'}$), 126.8 (C_4), 129.5 (C_{12}), 129.7 (C_9), 140.0 ($C_{4'}$), 140.5 (C_5), 144.1 (C_{10}), 158.5 ($C_{1'}$), 161.4 ($C_{2'}$), 168.5 ($C_{5'}$).
HPLC : (phase inverse C18, barrette de diodes, grad. 5 min) t_R = 2.82 min.
HPLC : (phase inverse CN, barrette de diodes, grad. 25 min) t_R = 14.75 min.
MS : APCI+ *m/z* 516 $[M+H]^+$.
Rend : 25.2%

E. Synthèse d'amines secondaires ou tertiaires :

Amination réductrice

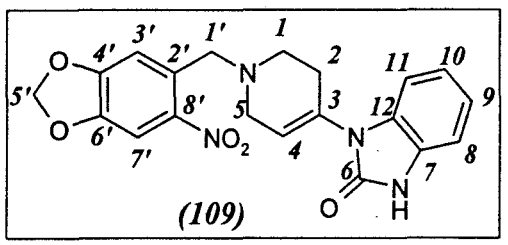
AR. Un mélange d'amine (1.5 mmol, 1 éq.), d'aldéhyde (1.5 mmol, 1 éq), de $NaHB(OAc)_3$ (3.75 mmol, 2.5 éq.) dans le CH_2Cl_2 est agité une nuit à température ambiante. Après refroidissement, le mélange est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est trituré dans une solution aqueuse de Na_2CO_3, lavé avec H_2O (2*10mL), filtré, puis à nouveau lavé avec un mélange Et_2O/pentane (50/50).

1-(3,4-méthylènedioxy-6-nitro-benzyl)-4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-piperidine (103). Le produit est obtenu selon le protocole AR. à partir de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-piperidine et du 2-nitropiperonal.



Aspect : poudre jaune.
MM : 396.4 g/mol
^{1}H RMN : (CD_3COOD; 300 MHz) δ 2.09 (d, J= 12.3 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.80-2.97 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.44 (t, 2H, H_{1ax}), 3.88 (d, J= 11.7 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 4.68 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.69-4.81 (m, 1H, H_3), 6.21 (s, 2H, $H_{5'}$), 7.08-7.12 (m, 2H, H_{7-8}), 7.17-7.20 (m, 1H, H_9), 7.28 (s, 1H, $H_{7'}$), 7.34-7.36 (m, 1H, H_6), 7.68 (s, 1H, $H_{3'}$).
^{13}C RMN : (CD_3COOD; 300 MHz) δ 26.0 (C_2), 48.1 (C_3), 52.9 (C_1), 57.7 ($C_{1'}$), 104.7 ($C_{5'}$), 106.4 ($C_{3'}$), 110.0 (C_6), 110.8 (C_9), 113.2 ($C_{7'}$), 121.1 ($C_{2'}$), 122.1 (C_7), 122.5 (C_8), 128.1 (C_{10}), 128.7 (C_5), 144.3 ($C_{8'}$), 150.2 ($C_{6'}$), 153.0 ($C_{4'}$), 155.6 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.76 min.
MS : APCI+ *m/z* 397 $[M+H]^+$.
Rend : 63%.

1-(3,4-méthylènedioxy-6-nitro-benzyl)-4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (109). Le produit est obtenu selon le protocole AR. à partir de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine et du 2-nitropiperonal.



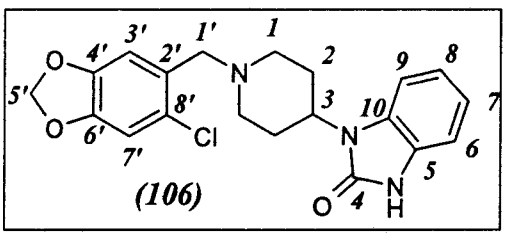
Aspect : poudre jaune.
MM : 394.4 g/mol
^{1}H RMN : (CD_3COOD; 300 MHz) δ 3.09 (s, 2H, H_2), 3.90 (t, J= 11.4 Hz, 2H, H_1), 4.31 (s, 2H, H_5), 4.88 (s, 2H, $H_{1'}$), 6.1 (s, 1H, H_4), 6.30 (s, 2H, $H_{5'}$), 7.18-7.22 (m, 2H, H_{9-10}), 7.25-7.36 (m, 2H, H_{8-11}), 7.42 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.77 (s, 1H, $H_{7'}$).

^{13}C RMN : (CD_3COOD; 300 MHz) δ 23.7 (C_2), 49.3 (C_1), 49.8 (C_5), 56.3 ($C_{1'}$), 103.2 ($C_{5'}$), 106.1 ($C_{7'}$), 109.4 (C_{11}), 110.3 (C_8), 112.8 ($C_{3'}$), 119.3 (C_4), 120.6 ($C_{2'}$), 122.0 (C_9), 122.7 (C_{10}), 127.8 (C_{12}), 129.3 (C_7), 130.4 (C_3), 144.0 ($C_{8'}$), 149.7 ($C_{6'}$), 152.6 ($C_{4'}$), 154.5 (C_6).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 1.73 min.
MS : APCI+ *m/z* 395 $[M+H]^+$.
Rend : 57%.

N-Alkylation :

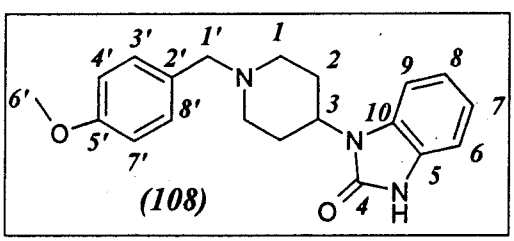
NA. Dans un tube on introduit 3 mL d'une solution 0.1 M / DMF d'amine (0.3 mmol, 1 éq.) sous forme de base libre, 52 µL (0.3 mmol, 1 éq.) de DIEA et 600µL d'une solution 0.5 M / DMF d'halogénure (0.3 mmol, 1 éq.). Après agitation deux minutes, la solution est chauffée à 70°C pendant 14 h. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par HPLC Préparative.

1-(3,4-méthylènedioxy-6-chloro-benzyl)-4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-piperidine (106). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine et du chlorure de 6-chloro-piperonyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 385.8 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.06 (d, J= 9.4 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.13 (t, J= 11.2 Hz, 2H, H_{1ax}), 2.26-2.38 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.90 (d, J= 11.2 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 3.48 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.07-4.17 (m, 1H, H_3), 6.03 (s, 2H, $H_{5'}$), 6.91-6.96 (m, 3H, H_{7-8-9}), 7.01 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.05 (s, 1H, $H_{7'}$), 7.19-7.20 (m, 1H, H_6), 10.79 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 29.5 (C_2), 50.9 (C_3), 53.5 (C_1), 59.0 ($C_{1'}$), 102.7 ($C_{5'}$), 109.6 (C_{6-9}), 110.2 ($C_{3'}$), 110.8 ($C_{7'}$), 121.2 (C_8), 121.3 (C_7), 125.5 ($C_{2'}$), 129.1 (C_{10}), 130.0 (C_5), 130.1 ($C_{8'}$), 147.5 ($C_{6'}$), 147.8 ($C_{4'}$), 154.5 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.19 min.
MS : APCI+ *m/z* 387 $[M+H]^+$.
Rend : 49.7%.

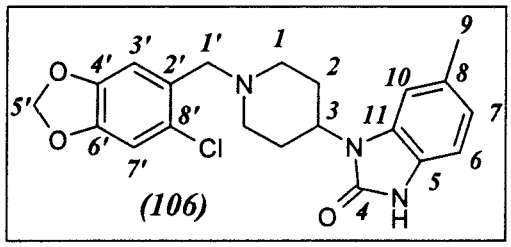
1-(4-méthoxy-benzyl)-4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-piperidine (108). Le produit est obtenu selon le protocole X. à partir de la 4-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)piperidine et du chlorure de 4-méthoxy-benzyl.



Aspect : poudre blanche.

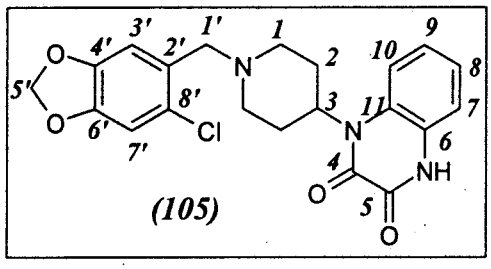
MM : 337.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.58 (d, J= 11.2 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.03 (t, J= 9.6 Hz, 2H, H_{1ax}), 2.22-2.35 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.88 (d, J= 11.2 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 3.45 (s, 2H, $H_{1'}$), 3.69 (s, 3H, $H_{6'}$), 4.05-4.13 (m, 1H, H_3), 6.85 (d, 2H, $H_{7'-4'}$), 6.91-6.96 (m, 3H, H_{7-8-9}), 7.15-7.20 (m, 1H, H_6), 7.21 (d, 2H, $H_{3'-8'}$), 10.75 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 29.5 (C_2), 51.0 (C_3), 53.3 (C_1), 55.8 ($C_{5'}$), 62.1 ($C_{1'}$), 109.5 (C_6), 109.6 (C_9), 114.4 ($C_{4'-7'}$), 121.2 (C_7), 121.3 (C_8), 125.6 ($C_{2'}$), 129.1 (C_{10}), 130.0 (C_5), 130.9 ($C_{3'-8'}$), 154.5 (C_4), 159.1 ($C_{5'}$).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.10 min.
MS : APCI+ *m/z* 338 $[M+H]^+$.
Rend : 7.6%.

1-(3,4-méthylènedioxy-6-chloro-benzyl)-4-(2-oxo-4-méthyl-1-benzimidazolinyl)-piperidine (106). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 4-(2-oxo-4-méthyl-1-benzimidazolinyl)piperidine ***(100)*** et du chlorure de 6-chloro-piperonyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 399.9 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.58 (d, J= 10.4 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.13 (t, J= 11.2 Hz, 2H, H_{1ax}), 2.28-2.38 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.91 (d, J= 10.2 Hz, 2H, $H_{1éq}$), 3.28 (s, 3H, H_9), 3.48 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.04-4.12 (m, 1H, H_3), 6.03 (s, 2H, $H_{5'}$), 6.72 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H_7), 6.78 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H_6), 7.01 (s, 1H, H_{10}), 7.02 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.05 (s, 1H, $H_{7'}$), 10.65 (s, 1H, N*H*CO).
HSQC (^{1}H ;^{13}C) RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 22.0 (C_9), 29.5 (C_2), 50.9 (C_3), 53.5 (C_1), 59.1 ($C_{1'}$), 102.7 ($C_{5'}$), 109.3 (C_6), 110.0 (C_{10}), 110.2 ($C_{3'}$), 110.9 ($C_{7'}$), 121.8 (C_7), 125.5 ($C_{2'-8'}$), 126.9 ($C_{6'}$), 129.9 (C_{11}), 130.3 (C_5), 140.4 ($C_{4'}$), 154.7 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.34 min.
MS : APCI+ *m/z* 400 $[M+H]^+$.
Rend : 30.5%.

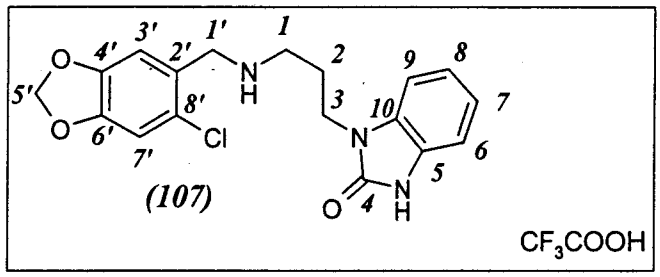
1-(3,4-méthylènedioxy-6-chloro-benzyl)-4-(1-(1,4-dihydro-quinoxaline-2,3-dione))-piperidine (105). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 1-(4-piperidinyl)-1,4-dihydro-quinoxaline-2,3-dione ***(101)*** et du chlorure de 6-chloro-piperonyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 413.9 g/mol

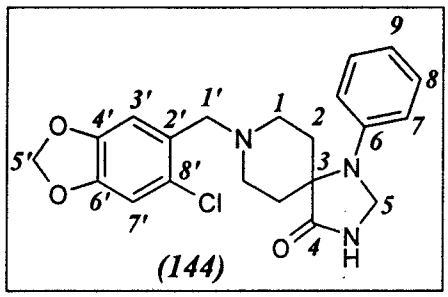
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.85-1.88 (m, 2H, $H_{piperidine}$), 2.50-2.58 (m, 1H, $H_{piperidine}$), 2.85-3.01 (m, 2H, $H_{piperidine}$), 3.23-3.57 (m, 1H, $H_{piperidine}$), 3.44 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.28 (s, 1H, $H_{piperidine}$), 4.69-4.80 (m, 1H, H_3), 6.12 (s, 2H, $H_{5'}$), 7.12-7.30 (m, 5H, $H_{7\text{-}8\text{-}9\text{-}10\text{-}3'}$), 7.59 (s, 1H, $H_{7'}$), 11.98 (s, 1H, N*H*CO).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.09 min.
MS : APCI+ *m/z* 415 $[M+H]^+$.
Rend : 30.5%.

1-(3,4-méthylènedioxy-6-chloro-benzyl)-3-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)-propylamine (107). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 3-(2-oxo-1-benzimidazolinyl)propylamine ***(99)*** et du chlorure de 6-chloro-piperonyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 473.8 g/mol.
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.92-2.02 (m, 2H, H_2), 2.95-2.98 (m, 2H, H_1), 3.84 (t, J= 6.7 Hz, 2H, H_3), 4.09-4.12 (m, 2H, $H_{1'}$), 6.07 (s, 2H, $H_{5'}$), 6.94-6.99 (m, 3H, $H_{7\text{-}8\text{-}9}$), 7.11-7.14 (m, 3H, $H_{6\text{-}3'\text{-}7'}$), 8.85 (s, 2H, NH_2^+), 10.91 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 25.7 (C_2), 37.9 (C_3), 45.4 (C_1), 48.0 ($C_{1'}$), 103.3 ($C_{5'}$), 108.6 (C_6), 109.8 (C_9), 110.6 ($C_{7'}$), 111.9 ($C_{7'}$), 121.4 (C_8), 121.9 (C_7), 123.2 ($C_{2'}$), 125.6 (C_{10}), 126.9 (C_5), 130.8 ($C_{8'}$), 147.6 ($C_{6'}$), 149.7 ($C_{5'}$), 155.2 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.12 min.
MS : APCI+ *m/z* 360 $[M+H\text{-}TFA]^+$.
Rend : 10.9%.

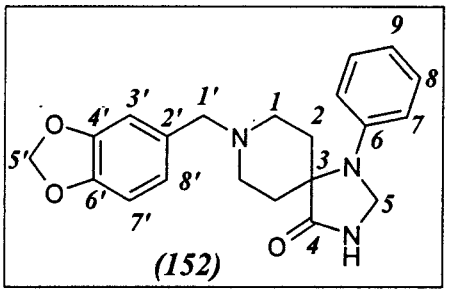
1-phényl-8-(3,4-méthylènedioxy-6-chloro-benzyl)-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one (144). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one et du chlorure de 6-chloro-piperonyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 399.9 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.56 (d, J= 13 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.48-2.56 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.72-2.88 (m, 4H, H_1), 3.51 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.56 (s, 2H, H_5), 6.06 (s, 2H, $H_{5'}$), 6.75 (t, J= 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.86 (d, J= 8.2 Hz, 2H, H_7), 7.04 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.07 (s, 1H, $H_{7'}$), 7.24 (t, J= 7.3 Hz, 2H, H_8), 8.64 (s, 1H, N*H*CO).

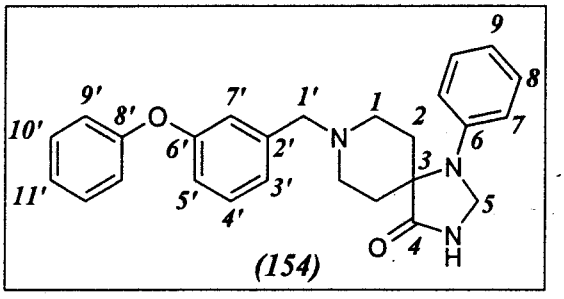
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 28.8 (C_2), 49.6 (C_1), 58.5 (C_3), 58.8 ($C_{1'}$), 59.1 (C_5), 102.3 ($C_{5'}$), 109.8 ($C_{7'}$), 110.4 ($C_{3'}$), 114.7 (C_7), 118.1 (C_9), 125.1 (C_6), 129.5 (C_8), 143.7 ($C_{6'}$), 147.0 ($C_{4'}$), 176.6 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.26 min.
MS : APCI+ *m/z* 400 $[M+H]^+$.
Rend : 15.8%.

1-phényl-8-(3,4-méthylènedioxy-benzyl)-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one (152). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one et du chlorure de piperonyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 365.4 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.51 (d, *J*= 13.4 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.42-2.52 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.65-2.68 (d, *J*= 7.8 Hz, 4H, H_1), 3.38 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.52 (s, 2H, H_5), 5.94 (s, 2H, $H_{5'}$), 6.68-6.75 (m, 2H, $H_{9\text{-}7'}$), 6.71-6.82 (m, 3H, $H_{7\text{-}8'}$), 6.87 (d, *J*= 1.4 Hz, 1H, $H_{3'}$), 7.21 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H, H_8), 8.59 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 29.3 (C_2), 49.9 (C_1), 59.0 (C_3), 59.5 (C_5), 62.7 ($C_{1'}$), 101.6 ($C_{5'}$), 108.7 ($C_{8'}$), 109.8 ($C_{3'}$), 115.0 (C_7), 118.4 (C_9), 122.7 ($C_{7'}$), 129.9 (C_8), 133.0 ($C_{2'}$), 144.2 (C_6), 146.9 ($C_{6'}$), 148.0 ($C_{8'}$), 177.1 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.19 min.
MS : APCI+ *m/z* 366 $[M+H]^+$.
Rend : 11.1%.

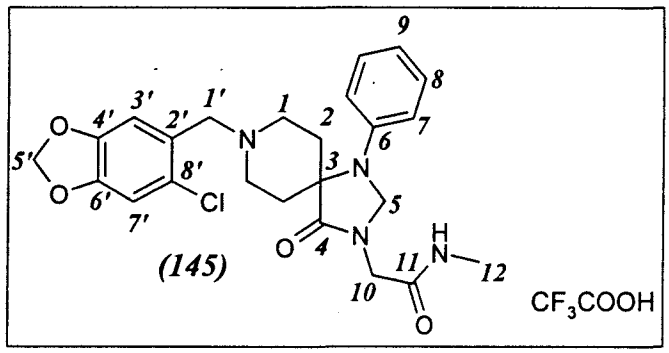
1-phényl-8-(3-phénoxy-benzyl)-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one (154). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one et du chlorure de 3-phénoxy-benzyl.



Aspect : poudre blanche.
MM : 413.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.56 (d, *J*= 13.2 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.45-2.50 (m, 2H, $H_{2éq}$), 2.71-2.73 (d, *J*= 7.8 Hz, 4H, H_1), 3.55 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.56 (s, 2H, H_5), 6.76 (t, *J*= 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.82 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H, H_7), 6.88-6.92 (m, 1H, $H_{3'}$), 7.01-7.04 (m, 2H, $H_{5'\text{-}7'}$), 7.08-7.17 (m, 2H, $H_{9'}$), 7.21 (T, *J*= 7.5 Hz, 2H, H_8), 7.35-7.48 (m, 4H, $H_{10'\text{-}11'\text{-}4'}$), 8.65 (s, 1H, N*H*CO).

^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 29.1 (C_2), 50.0 (C_1), 58.8 (C_3), 59.5 (C_5), 62.3 ($C_{1'}$), 115.0 (C_7), 117.8 ($C_{3'}$), 119.1 (C_9), 119.5 ($C_{5'}$), 119.7 ($C_{7'}$), 124.4 ($C_{9'}$), 125.5 (C_6), 128.8 (C_8), 130.7 ($C_{4'-11'}$), 130.9 ($C_{10'}$), 144.1 ($C_{2'}$), 157.4 ($C_{6'}$), 157.7 ($C_{8'}$), 177.0 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.61 min.
MS : APCI+ *m/z* 414 $[M+H]^+$.
Rend : 6.4%.

1-phényl-3-(N-méthyl)-acetamido-8-(3,4-méthylènedioxy-6-chloro-benzyl)-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one (145). Le produit est obtenu selon le protocole NA. à partir de la . N-methyl-3-(1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one)yl-acetamide ***(118)*** et du chlorure de 6-chloro-piperonyl.

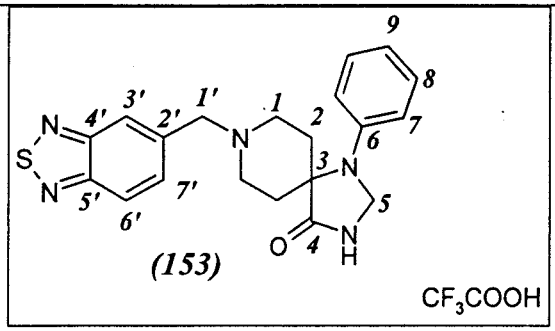


(145)

Aspect : poudre blanche.
MM : 585.0 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.90 (d, J= 14.4 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.57 (d, J_{NH-H}= 4.5 Hz, 3H, H_{12}), 2.69-2.80 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.46 (d, J= 10.0 Hz, 2H, H_{1ax}), 3.64-3.71 (m, 2H, $H_{1éq}$), 3.95 (s, 2H, $H_{1'}$), 4.36 (s, 2H, H_{10}), 4.65 (s, 2H, H_5), 6.12 (s, 2H, $H_{5'}$), 6.79 (t, J= 7.2 Hz, 1H, H_9), 6.88 (d, J= 8.4 Hz, 2H, H_7), 7.22 (t, J= 7.7 Hz, 2H, H_8), 7.23 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.26 (s, 1H, $H_{7'}$), 8.03 (d, J_{NH-H}= 4.5 Hz, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 26.4 (C_{12}), 27.2 (C_2), 43.9 ($C_{1'}$), 49.3 (C_1), 57.4 (C_{10}), 58.4 (C_3), 64.7 (C_5), 103.6 ($C_{5'}$), 110.9 ($C_{3'}$), 113.3 ($C_{7'}$), 115.5 (C_7), 119.6 (C_9), 125.6 (C_6), 130.0 (C_8), 143.2 ($C_{8'}$), 143.2 (C.·), 150.4 ($C_{4'}$), 167.7 (C_{11}), 173.6 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.26 min.
MS : APCI+ *m/z* 471 $[M+H-TFA]^+$.
Rend : 29.4%.

Méthode au Mésylate :

1-phényl-8-(2,1,3-benzothiadiazole-5-méthyl)-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one (153). On ajoute 500µL d'une solution 1.2 M / DCM de $MeSO_2Cl$ (2éq.) goutte à goutte à 188µL d'une solution 1.6 M / DCM de 2,1,3-benzothiadiazole-5-methanol ***(97)*** (1 éq.) avec 1 équivalent de DIEA à 0°C. La solution est agitée 30 minutes à température ambiante. Le mélange est lavé successivement à l'eau, avec une solution d'HCl (10%) et avec une solution de $NaHCO_3$ saturée. La phase organique est récupérée et évaporée. Le résidu est solubilisé dans 143µL de THF. On ajoute ensuite 150µL d'une solution 2 M / THF de 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one. La solution est agitée 1 h, puis évaporée. Le résidu est purifié par HPLC préparative.



(153)

Aspect : poudre jaune.
MM : 493.5 g/mol
^{1}H RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 1.91 (d, J= 14.5 Hz, 2H, H_{2ax}), 2.72-2.81 (m, 2H, $H_{2éq}$), 3.51 (d, J= 10.8 Hz, 2H, H_{1ax}), 3.73-3.84 (m, 2H, $H_{1éq}$), 4.61 (s, 2H, H_5), 4.64 (s, 2H, $H_{1'}$), 6.80 (t, J= 7.3 Hz, 1H, H_9), 6.90 (d, J= 8.1 Hz, 2H, H_7), 7.20 (t, J= 8.3 Hz, 2H, H_8), 7.90 (dd, J= 9.0 Hz, J= 1.5 Hz, 1H, $H_{7'}$), 8.20 (d, J= 9.0 Hz, 1H, $H_{6'}$), 8.41 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.04 (s, 1H, N*H*CO).
^{13}C RMN : (DMSO-d6; 300 MHz) δ 27.0 (C_2), 49.6 (C_1), 57.4 ($C_{1'}$), 59.7 ($C_{5\text{-}3}$), 115.5 (C_7), 119.3 (C_9), 122.5 ($C_{6'}$), 125.8 ($C_{3'}$), 130.7 (C_8), 132.7 (C_6), 133.0 ($C_{7'}$), 143.6 ($C_{2'}$), 154.8 ($C_{4'\text{-}5'}$), 175.6 (C_4).
HPLC : (phase inverse C18, 215/254 nm, grad. 5 min) t_R = 2.16 min.
MS : APCI+ *m/z* 366 $[M+H\text{-}TFA]^+$.
Rend : 7.8%.

- Annexe 1-

Méthodes d'identification d'une molécule active au sein d'une chimiothèque combinatoire.

1. Etiquetage moléculaire ou « molecular tagging ».

A. Principe du « one bead / one compound ».

Il s'agit d'une conséquence inattendue du principe de la synthèse en phase solide. En synthèse en phase solide, l'utilisation de grands excès de réactif est classique. En effet, ces excès, facilement éliminés en fin de réaction par simples lavages, permettent de travailler en grandes concentrations de réactifs, et d'améliorer la sélectivité des réactions, d'augmenter leur vitesse, et d'accroître la pureté des produits. En synthèse combinatoire, malheureusement, ce principe se heurte au risque de voir les réactifs aux cinétiques les plus favorables préférentiellement incorporés et sur-représentés ensuite dans le mélange final, au détriment des composés les moins réactifs. La solution à ce problème, appelée « DCR » (Divide, Couple and Recombine) est illustrée dans la figure 1.

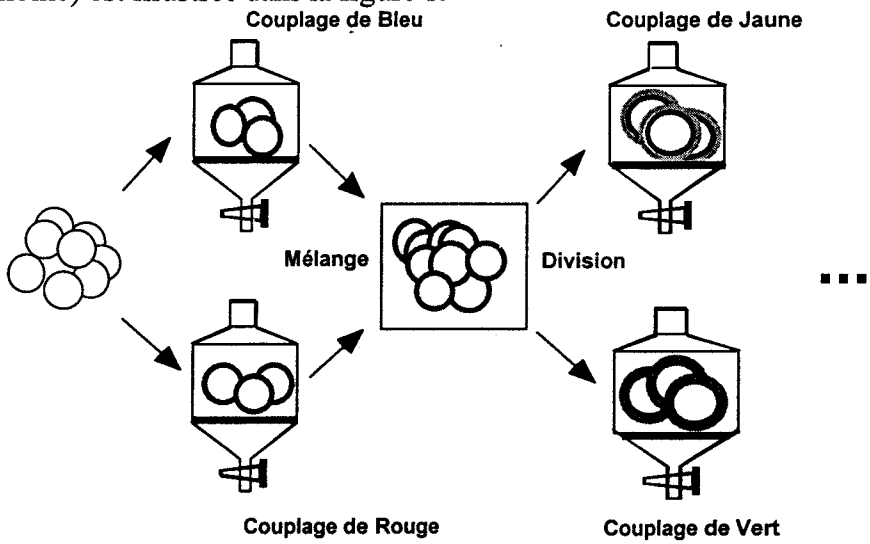


Figure 1 : Illustration de la méthode DCR (Divide, Couple and Recombine).

Préalablement à chaque étape de couplage combinatoire, le support polymérique insoluble est divisé en autant de lots qu'il y a de réactifs à introduire à cette étape de synthèse. Chacun des réactifs est alors mis en réaction individuellement dans une réacteur séparé. Ceci permet d'utiliser de gros excès sans craindre d'incorporation préférentielle. En fin de réaction, les résines contenues dans les différents réacteurs sont mélangées, et l'on peut procéder à l'étape suivante. Les supports utilisés pour la synthèse en phase solide sont constitués de « billes » de polymère dont le diamètre va de 25 à 200 µm, et sur lesquels les composés sont fixés de manière covalente. Lors de l'étape de division de la résine, chaque bille sera dirigée vers l'un des réacteurs pour y recevoir un seul des réactifs à coupler. Ce mécanisme se répète à chaque étape de division et de couplage. Ainsi, en fin de synthèse, chaque bille aura suivi une chemin réactionnel particulier, et portera donc une seule espèce moléculaire [1].

Au cours de ce processus, du fait de son indivisibilité, la bille de polymère constitue l'unité de synthèse. Cette observation a permis le développement de nombreuses méthodes ingénieuses à la fois pour la mise en évidence et l'identification de composés biologiquement actifs. La quantité de composé présente sur une bille standard, de l'ordre de d'une dizaine à quelques centaines de nanomoles peut être suffisante pour la mise en évidence d'une activité biologique et la caractérisation structurale de l'entité responsable de cette activité. En effet, certains tests biologiques ne peuvent se pratiquer avec des molécules encore ancrées sur un polymère, et des stratégies faisant appel à des doubles ancrages au polymère de stabilités

différentes ont été mises au point. Ces ancrages permettent de libérer une fraction du composé présent à la surface de chaque bille pour le tester, tout en laissant une deuxième fraction fixée, de manière à en permettre l'identification structurale.

On a reproché à la méthode « DCR» de ne s'appliquer qu'à des structures de nature peptidique, seules susceptibles d'être identifiées par dégradation récurrente d'Edman. Une telle limitation représente un inconvénient majeur en termes de diversité structurale. Récemment il a été montré[2] que des spectres de RMN peuvent être réalisés sur une seule bille de polymère et permettent, dans des cas simples de molécules non peptidiques, l'identification de la molécule fixée sur cette bille. Mais la qualité des spectres obtenus laisse un doute sur la possibilité d'élucider la structure d'un composé réellement inconnu à l'aide de cette seule technique. Néanmoins, pour élargir le champs d'application de cette stratégie à la synthèse et aux tests de molécules non directement identifiables par séquençage ou RMN, des méthodes d'étiquetage des billes de résine ont été développées[3].

B. L'étiquetage moléculaire.

Le principe consiste à dissocier les fonctions de liaison au récepteur et d'identification de la structure de l'entité liante (« molécule-ligand ») Pour la première fonction on recherchera la diversité maximale, pour la deuxième fonction, on recherchera un système robuste sensible et universel.

Pour cela, utilisant la méthode « DCR», à chaque division du support de synthèse, on réalisera deux réactions de façons indépendantes, l'une pour la synthèse de la molécule-ligand, l'autre pour la synthèse des molécules ou de la molécule « codante ». L'analyse de la molécule codante permettra de déterminer la structure théorique de la molécule-ligand. Dans la pratique, la structure de la molécule codante permet de déterminer les étapes de synthèse qui ont été réalisées sur ce grain de résine, et qui doivent théoriquement conduire à la « structure ligand ».

Les premières stratégies d'étiquetage moléculaire ont utilisé les peptides comme molécules codantes. Dans ce cas, à chaque variant d'une position variable donnée correspond un acide aminé séquençable. Un séquençage selon Edman permet d'identifier le variant fixé sur ce grain de résine pour chaque position variable de la synthèse. La seconde génération d'étiquetage moléculaire repose sur un codage non séquentiel : l'historique complet de la synthèse de la molécule-ligand est enregistré sur chaque bille sous la forme d'un codage chimique binaire.

Selon ce principe n marqueurs chimiques différents permettent de coder pour 2n événements de synthèse tels que la nature du variant et sa position dans la synthèse. Quand une bille « ligand » a été mise en évidence, les marqueurs qu'elle porte sont clivés simultanément (le plus souvent par photolyse). On obtient un mélange de marqueurs, que l'on sépare et identifie par chromatographie gazeuse avec détection par capture d'électrons (GC-EC). L'avantage de cette méthode est d'être très résolutive (elle permet donc d'utiliser un grand nombre de marqueurs chimiques) et d'une sensibilité permettant la détection des marqueurs dans les quantités délivrables par la photolyse d'une seule bille. Cette sensibilité est telle qu'elle permet de limiter à moins de 1% la part de la charge chimique disponible sur une bille affectée à l'étiquetage.

Ces méthodes sont cependant limitées aux chimiothèques synthétisées et testées en phase solide. Ceci restreint leur leur utilisation à des tests biologiques mettant en œuvre des récepteurs soluble et marqués. Par ailleurs, les conditions de criblage sont loin d'être naturelles, et par là susceptibles de donner lieu à de nombreux faux positifs : les structures actives dans un test sur bille et en présence des étiquettes moléculaires s'avèrent souvent

complètement inactives lors d'un test en solution (faux positifs). On estime généralement que c'est la coexistence de plusieurs molécules à proximité l'une de l'autre à la surface de la bille qui est responsable de l'activité. Celle-ci disparaît donc une fois les molécules libérées en solution.

De même, il est certain qu'ancrées au polymère, les molécules-ligand n'offrent qu'une fraction de leurs interactions potentielles au récepteur. Ce masquage d'une partie de la surface moléculaire par le support polymérique peut être responsable de la non détection d'espèces actives (fausse négativité). Pour ces raisons ont été mises au point des méthodes de clivage des molécules-ligand respectant l'ancrage des étiquettes ou encore des méthodes de clivage partiel des molécules-ligand, permettant le criblage en solution.

Enfin et surtout, la réalisation chimique de telles chimiothèques pose de nombreuses difficultés. Elle nécessite la mise au point d'une chimie d'assemblage des molécules-ligand respectant la structure des étiquettes moléculaires. De même, l'incorporation des étiquettes doit respecter la structure des molécules ligands, au risque de voir des positifs non confirmés lors d'une resynthèse conventionnelle.

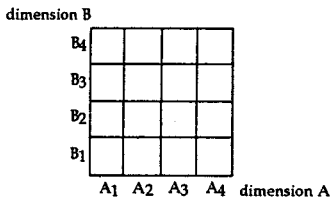
Ces contraintes ont beaucoup limité l'étendue des méthodes chimiques d'assemblage combinatoire utilisables avec l'étiquetage moléculaire, et par voie de conséquence, la diversité structurale accessible par ces voies.

2. Les méthodes de déconvolution.

A. Principes généraux.

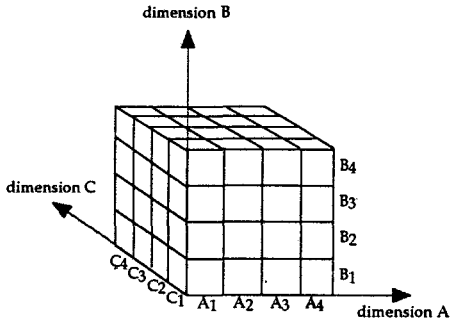
Comme il a été noté par Pirrung[4], toute chimiothèque combinatoire peut être considérée comme une matrice à N dimensions, dans laquelle chaque dimension a un nombre n d'éléments égal au nombre de variants présents à une position variable donnée. Dans ce modèle, N représente le nombre d'étapes combinatoires impliquées dans la préparation de la chimiothèque. Pour illustrer cette représentation, deux exemples sont donnés dans la figure 2. La première matrice (Figure 2 ***A***) représente une chimiothèque résultant de deux étapes combinatoires impliquant chacune quatre variants ($n_A = 4$ et $n_B = 4$). Cette chimiothèque contient $n_A.n_B$ composés. Chacun de ces 16 composés est un des éléments de la matrice 4x4. La seconde matrice (Figure 2 ***B***) représente une chimiothèque dont la synthèse met en œuvre trois étapes combinatoires impliquant chacune 4 variants. Cette chimiothèque contient 64 ($n^N = 4^3 = 64$) composés à trois positions variables. Dans ce cas également, ces 64 composés constituent les éléments de la matrice de 4 x4 x4. Bien que leur représentation graphique soit moins aisée si N>3, toute chimiothèque combinatoire peut-être représentée par une matrice de dimension N, chaque élément de la matrice correspondant à un composant (« N-mérique ») de la chimiothèque.

A



A : deux positions variables (N=2), 16 composés combinatoires du type An-Bn avec nA=nB=4

B



B : trois positions variables (N=3), 64 composés combinatoires du type An-Bn-Cn avec nA=nB=nC=4

Figure 2 : Représentations matricielles de deux chimiothèques.

Pour obtenir toute l'information qu'une chimiothèque peut receler, il faudrait pouvoir tester chaque composant de la chimiothèque et associer à la matrice de composés, une matrice homologue d'activités biologiques. Ceci n'est réalisable rapidement que dans le cas des chimiothèques obtenues par synthèses parallèles [5]. Dans le cas de chimiothèques testées en mélange, la réponse à la question : « Quelle structure a le produit actif ? » nécessite des expériences complémentaires (biologiques et chimiques). Le principe de la déconvolution est de limiter le nombre d'expériences biologiques nécessaires pour répondre à cette question.

Différentes méthodes ont été proposées pour résoudre ce problème. Toutes sont basées sur une présentation redondante de la chimiothèque. La chimiothèque, dans tous les cas, est présentée sous la forme de x sous-chimiothèques qui se recouvrent plus ou moins entre elles. En fonction du recouvrement de ces sous-chimiothèques, on peut définir trois grandes méthodes de déconvolution. Ces trois méthodes sont : premièrement la déconvolution itérative, deuxièmement le balayage de position « positional scanning », et enfin troisièmement, la méthode des partitions orthogonales.

B. La déconvolution itérative.

Le principe de déconvolution itérative met en jeu la synthèse et le criblage de plusieurs séries de sous-chimiothèques. Il y a autant de séries qu'il y a de positions variables (N) ou de dimensions dans la matrice de la chimiothèque. Ces séries contiennent un nombre variable de sous-chimiothèques, égal au nombre de variants présents à chaque étape combinatoire de la synthèse (n). Au cours de la déconvolution, qui s'effectue de manière interactive avec les biologistes, les sous-chimiothèques constituant les séries contiennent de moins en moins de produits, jusqu'à ce qu'un produit unique soit identifié. Le concept est illustré dans la figure 3, dans le cas d'une chimiothèque résultant de trois étapes combinatoires (N = 3) impliquant chacune un mélange de 4 variants (n = 4 , et la chimiothèque contient $n^N = 4^3 = 64$ trimères).

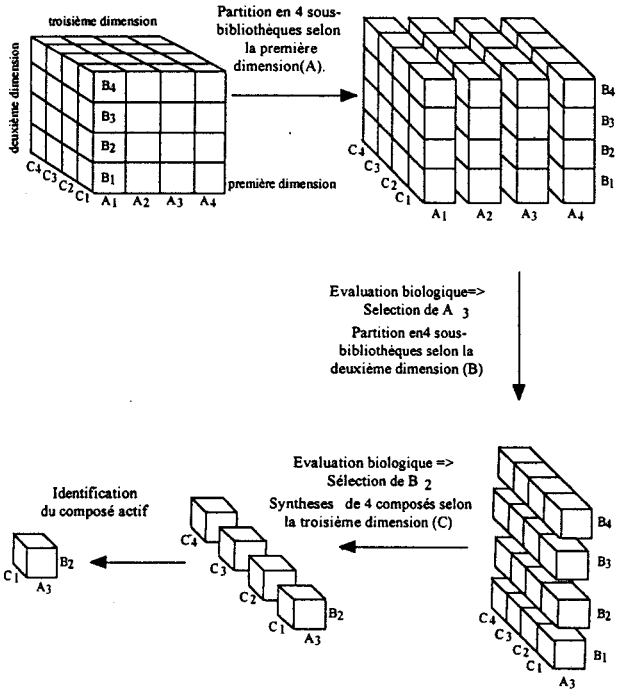


Figure 3 : Schéma de déconvolution par déconvolution itérative.

Selon la convention proposée par Houghten[6] pour la nomenclature des chimiothèques combinatoires, et dans laquelle X représente l'utilisation d'un mélange (Ai, Bi ou Ci avec i variant de 1 à n) de variants à une étape de synthèse (4 dans ce cas), et O l'introduction d'un variant unique et défini, la chimiothèque totale est du type XXX.

La première étape va permettre de définir le variant apportant une contribution au pharmacophore dans la position 1. Une première série de sous-chimiothèques de type OXX est donc préparée : à la première étape combinatoire de la synthèse, le chimiste incorpore un variant défini (« O »), tandis qu'aux deux étapes suivantes, il incorpore un mélange (« X ») de 4 variants. Chacune de ces 4 sous-chimiothèques (car n = 4), contient 1 x 4 x 4 (= 16) composants. Ces quatre sous chimiothèques constituent une partition de la chimiothèque XXX, puisque leur réunion constitue la chimiothèque XXX et que leurs intersections sont vides. Cette première partition de la chimiothèque est ensuite testée, pour déterminer quel variant de la position 1 contribue à l'édification du pharmacophore. Supposons que la sous-chimiothèque sélectionnée contient le variant A_3 en cette position.

Pour la deuxième étape de la déconvolution, le chimiste va préparer une deuxième série de sous-chimiothèques qui constituera une partition de la sous-chimiothèque A_3XX. Pour chacune des 4 sous-chimiothèques constituant cette série, à la première étape combinatoire de la synthèse, le chimiste incorpore A3 seul, à la deuxième étape, il incorpore chacun des 4 variants isolément, puis le mélange des 4 variants pour la troisième étape. Il obtient 4 sous-chimiothèques de type A_3OX. Chacune de ces 4 sous-chimiothèques contient 1 x 1 x 4 = 4 composants. La sélection de la sous-chimiothèque la plus active indiquera quel variant contribue au pharmacophore en position 2.

Si l'on suppose que la sous-chimiothèque la plus active de cette série contient le variant B_2 en position 2, alors pour la troisième et dernière étape de déconvolution (N= 3), quatre nouvelles « sous-chimiothèques » constituant une ultime série-partition de A_3B_2X va être préparée. Chacune de ces 4 « sous-chimiothèques » contient 1 x1 x 1 = 1 composé. Chacun de ces 4 composés est donc testé séparément, et à ce stade, on peut définir le dernier variant utile à la construction de la molécule active. Ces trois étapes de déconvolution itérative sont représenté sous forme de matrice dans la figure 3. Notons qu'au cours de la

déconvolution, la complexité des sous-chimiothèques diminue et que l'on converge vers une structure active. Cette déconvolution aura donc nécessité N x n = 3 x 4 = 12 synthèses pour identifier un composé actif parmi 64 ($n^N = 4^3 = 64$). Néanmoins la rentabilité r de la méthode - définie par le rapport du nombre de composés évalués au nombre de « synthèses » réalisées - s'accroît rapidement quand n et surtout N croissent. En effet r est défini par l'équation suivante : $r = \frac{n^N}{n.N} = \frac{n^{N-1}}{N}$.

Ainsi, une chimiothèque d'hexapeptides, construite à partir de 20 aminoacides contient 20^6 soit 64,000,000 peptides alors que sa déconvolution réclame la synthèse et l'évaluation de 20 x 6 = 120 sous-chimiothèques. La principale limitation, dans ce cas est bien sûr la capacité à détecter une espèce active au sein d'un mélange contenant un si grand nombre de composés (20^5 = 3,200,000), surtout si la chimiothèque est fortement divergente.

Néanmoins, en général, de telles chimiothèques sont de divergence limitée et si un composé actif y existe, il est pratiquement toujours entouré de congénères « sub-actifs dont l'effet cumulatif engendre une activité biologique détectable. Ces produits risquent d'affecter notre capacité à sélectionner le ligand optimal, en détournant le processus de convergence.

Cette méthode de déconvolution s'est révélée efficace dans plusieurs cas mais un inconvénient majeur de cette méthode est la nécessité de préparer et d'évaluer une nouvelle série de sous-chimiothèques à chaque étape de déconvolution. Même si la chimiothèque doit être utilisée dans de nombreux tests, il est improbable que les mêmes sous-chimiothèques soient impliquées. De nouvelles synthèses sont donc requises pour chaque activité détectée.

Ainsi Houghten prépare et évalue directement toutes les sous-chimiothèques de type OOX.....X. Dans le cas des chimiothèques utilisant les aminoacides naturels, il y a n^2 = 400 sous chimiothèques préparées à l'avance. Ces sous-chimiothèques sont préparées en évitant aux deux étapes combinatoires correspondantes (notées « OO »), de remélanger les résines après la division et les couplages des 20 variants. Les deux avantages de cette méthode sont, premièrement de diminuer la complexité des mélanges à tester initialement d'un facteur 400, et deuxièmement de limiter à 4 au lieu de 6 les étapes de déconvolution.

C. « Balayage » des positions. («Positional scanning»).

Cette méthode a été conçue et mise en œuvre par Houghten pour l'évaluation de chimiothèques de peptides[7],[8]. Cette méthode requiert de préparer N séries de n sous-chimiothèques. Chacune de ces séries réalise une partition de la chimiothèque complète, tout comme dans la première étape de déconvolution itérative. Et chacune de ces N séries de sous-chimiothèques sert à déterminer le variant utile dans chaque position variable de la molécule-ligand. Les sous-chimiothèques d'une série sont préparées en randomisant toutes les étapes de la synthèse sauf une où chaque variant est incorporé séparément.

Ainsi, pour chacune des N positions i combinatoires (« randomisées »), une série-partition de n_i sous-chimiothèques est préparée, avec n_i nombre de variants employés à l'étape i. La détermination de l'activité des sous-chimiothèques de ces séries permet d'identifier la structure des variants les plus adaptés à chaque position. A la différence de la méthode précédente, cette méthode ne requiert aucune interaction entre le chimiste et le biologiste pendant la déconvolution. Néanmoins, il faut noter que, contrairement au cas précédent, le processus de déconvolution n'est pas convergent, et que les produits sont toujours testés à haute dilution, ce qui peut poser des problèmes de détection. Un autre inconvénient est que cette méthode suppose la connectivité entre les variants conférant l'activité maximale en chacune des positions, ce qui n'est pas toujours le cas.

Le scanning de position peut représenté à l'aide d'éléments matriciels, comme il est montré dans la figure 4.

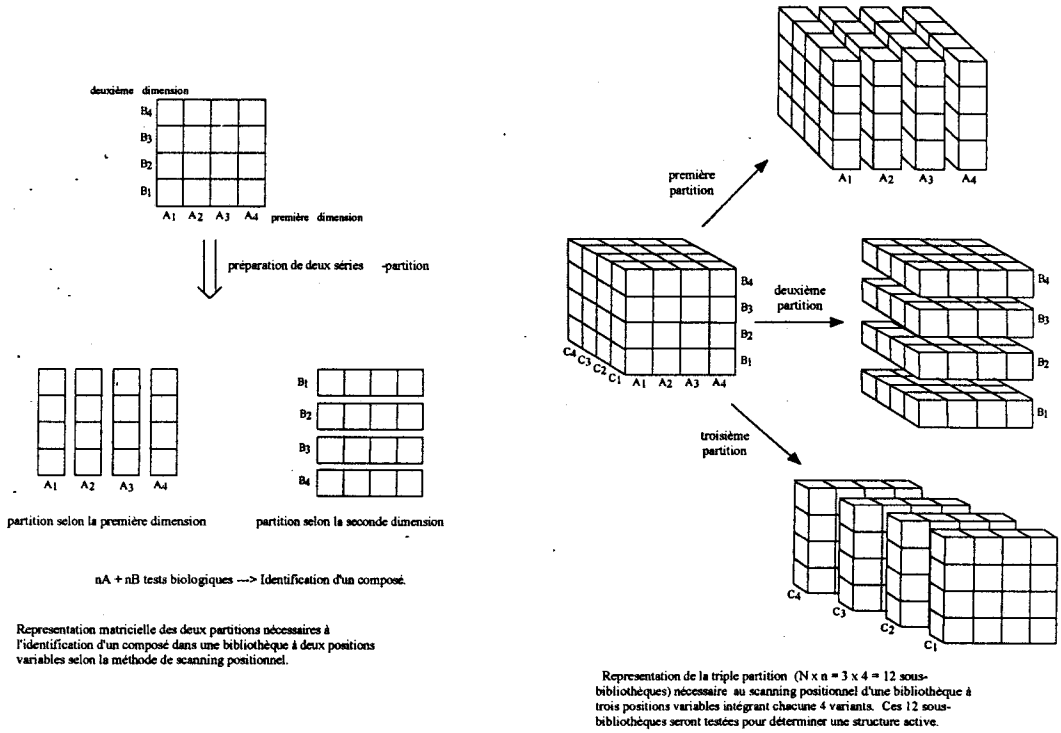


Figure 4. Schéma du « balayages des positions » .

Dans le cas simple d'une chimiothèque à deux positions variables A et B, préparée avec deux groupes de 4 variants, le groupe utilisé pour la position A et le groupe utilisé pour la position B ($n_A = n_B$, N = 2). Cette chimiothèque peut être représenté par une matrice bidimensionnelle 4 x 4, dont chacun des éléments correspond à un composant de la chimiothèque. Le scanning de position correspond à l'évaluation de 2 (N = 2) partitions de cette chimiothèque : la première suivant les colonnes, la seconde suivant les rangées.
Ainsi, une première série sera réalisée dans laquelle chaque variant de la position A (A_1 à A_4) sera couplé au mélange de variants de la position B. Parallèlement, la deuxième série sera réalisée en confrontant le mélange des variants de A à chaque variant de B (B_1 à B_2) pris séparément. Cette méthode a été utilisée par Houghten avec des chimiothèques de peptides obtenus par synthèse en phase solide mais aussi par Pirrung avec une chimiothèque de 54 carbamates préparés en solution[9]. Cette représentation peut bien entendu être étendu à des dimensions supérieures (Figure 4).

Comparé à la déconvolution itérative, le scanning de position offre le principal avantage suivant : les différentes positions variables de la chimiothèque sont évaluées simultanément. Et les résultats obtenus permettent la définition immédiate d'un composé probablement actif. Le principal défaut est que ce produit aura été testé à une concentration égale à $C/n^{(N-1)}$ d'autant plus faible que le nombre d'étapes combinatoire N est important. Cette faible concentration nuit à la lisibilité des résultats biologiques du scanning positionnel (or si l'on considère le temps requis pour exécuter une déconvolution, le scanning positionnel prend un avantage contradictoire sur la déconvolution itérative quand N augmente). De plus, si plusieurs sous-chimiothèques s'avèrent actives dans chaque série, le nombre de produits à synthétiser comme candidats à l'activité croît exponentiellement. Imaginons que trois sous-chimiothèques soient trouvées actives dans chacune des 6 séries d'une chimiothèque d'hexapeptides, il faudra alors synthétiser 3^6 = 729 tripeptides, même si parmi ces 729 hexapeptides seuls 3 sont actifs, car le scanning positionnel ne donne aucune information sur

la connectivité entre les variants définis par les sous-chimiothèques actives. Parmi les propositions faites par Houghten[10], on peut citer la possibilité de préparer une sous-chimiothèque combinatoire correspondant seulement aux variants sélectionnés par le scanning positionnel pour enrichir les mélanges testés en produits actifs.
Mais on peut également décider de procéder à une déconvolution itérative complète en partant de la position variable la mieux définie par le scanning positionnel (position correspondant à une série pour laquelle les résultats biologiques sont contrastés et où le choix d'un variant s'impose). Dans ces deux cas, la définition d'un ligand (qui reste à confirmer) nécessite plusieurs « resynthèses » après le scanning.

D. Principe des chimiothèques orthogonales

Le principe général des chimiothèques orthogonales implique la préparation de 2 séries-partitions de la chimiothèque totale, quels que soient N et n_i. Ces deux séries contiennent chacune tous les congénères de la chimiothèque envisagée[11]. Les sous-chimiothèques de ces deux séries sont telles que le nombre de composés par sous-chimiothèque est égal ou inférieur au nombre de sous-chimiothèques dans une série.

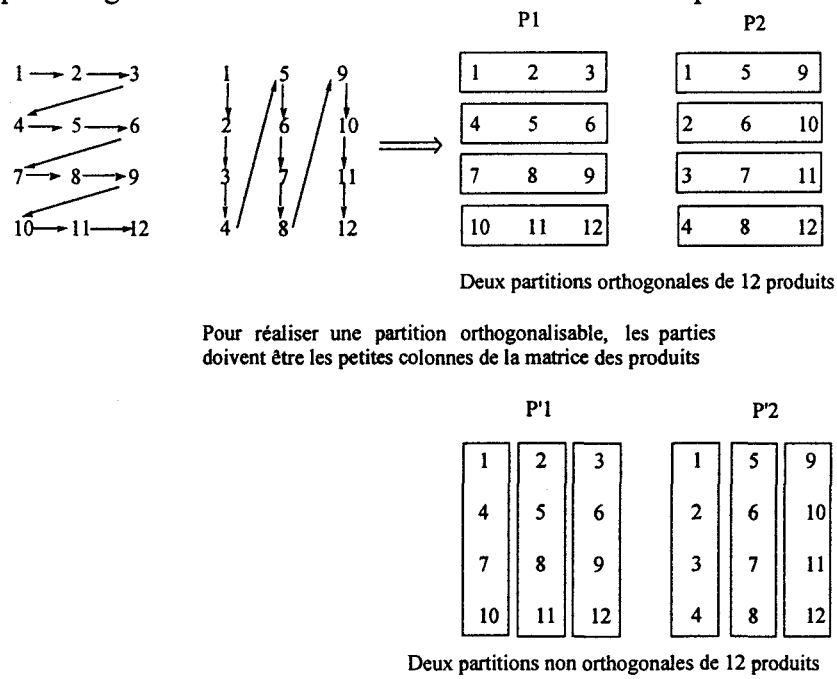


Figure 5 : Principe des répartitions orthogonales d'une chimiothèque comportant 12 composants.

Ceci est illustré dans la figure 5, dans un cas où une chimiothèque contenant 12 composés est partitionnée en 4 sous-chimiothèques de 3 composés chacune (3<4). Nous dirons que les deux partitions P1 et P2 sont « orthogonales » car deux composés d'une même sous-chimiothèque de P1 se trouvent dans deux sous-chimiothèques de P2 et réciproquement. Par contre, les deux partitions P'1 et P'2 ne sont pas orthogonales : chaque sous-chimiothèque de P'1 a *deux* composés en commun avec chaque chimiothèque de P'2.

Dans le cas de la figure 5, chacun des 3 composés d'une sous-chimiothèque de la partition P1 est trouvé dans une sous-chimiothèque *particulière* de la partition P2. La première étape consiste en un criblage des 4 sous-chimiothèques de l'une des deux partitions. Si l'une de ces 4 sous-chimiothèques est active, alors on procède à la deuxième étape qui consiste en un criblage de la deuxième partition pour déterminer laquelle des 4 sous-chimiothèques de la première partition est active. Puisqu'entre deux sous-chimiothèques

prises dans deux partitions orthogonales il n'y a qu'un composé désiré en commun, un composé actif peut être immédiatement identifié comme *le* composé en commun entre les deux sous-chimiothèques actives.

---

[1] Lam KS, Salmon SE, Hersch EM, Hruby, VJ, Kazmiierski WM, Knapp RJ, *Nature*, ***1991*** 91 p10779-10785.

[2] Pop IE, Dhalluins C, Déprez B, Melnyk P. Lippens G, and Tartar A. *Tetrahedron*, ***1996***, vol 52, 37, p 12209-12222

[3] Janda KD, *Proc. Nat. Acad. Sci USA* , ***1994***, 91 p10779-10785

[4] Pirrung MC, Chen J, J.Am. Chem. Soc, ***1995***, 117, p1240-1245.

[5] Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D, *Science*, ***1991***, 251, p767-773.

[6] Houghten RA, Pinilla C, Blondellé S, Appel RJ, Dooley CT, Cuervo JH, *Nature* ***1991***, 354, p84-86.

[7] Pinilla C, Appel RJ, Blondelle S, Dooley CT, Eichler J, Ostreh JM, Houghten RA, *Drug Development Research*, ***1994***, 33, p133-145.

[8] Dooley CT, Houghten RA, *Life Science* ***1993***, 52, p1509-1517.

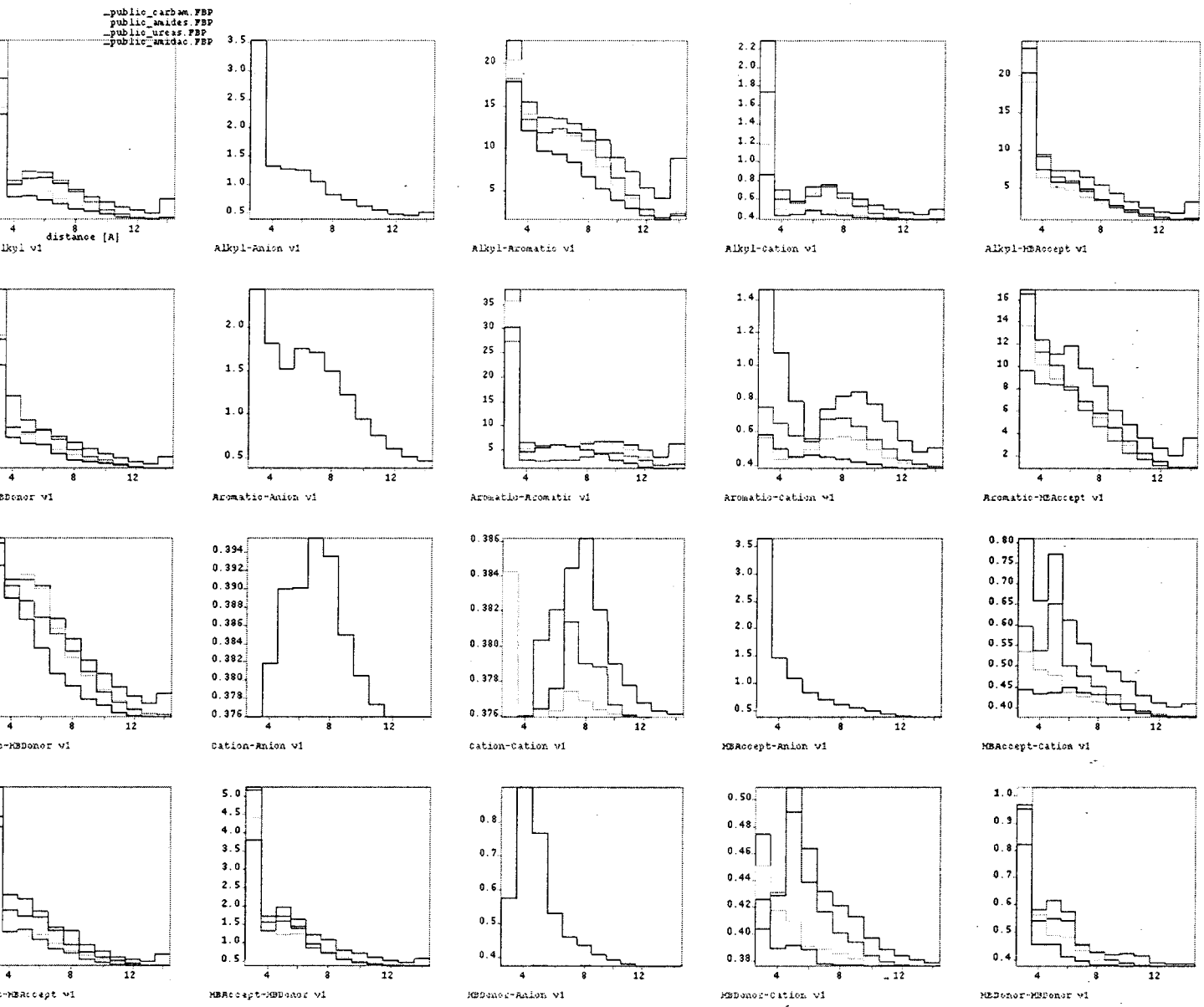
[9] Pirrung MC, Chen J, *J.Am. Chem. Soc*, ***1995***, 117, p1240-1245.

[10] Dooley CT, Houghten RA, *Life Sci.*, ***1993***, 52 p1509-1517.

[11] Déprez B., Williard X., Bourel L., Coste H., Hyafil F., Tartar A., Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries, J.Am.Chem.Soc., ***1995***, 117, pp 5405-5406.

- Annexe 2-

Exemple de FBPA.


_public_carbam.FBP
_public_amides.FBP
_public_ureas.FBP
_public_amidac.FBP
distance [A]
lkyl vl
Alkyl-Anion vl
Alkyl-Aromatic vl
Alkyl-Cation vl
Alkyl-HBAccept vl
BDonor vl
Aromatic-Anion vl
Aromatic-Aromatic vl
Aromatic-Cation vl
Aromatic-HBAccept vl
-HBDonor vl
Cation-Anion vl
Cation-Cation vl
HBAccept-Anion vl
HBAccept-Cation vl
-HBAccept vl
HBAccept-HBDonor vl
HBDonor-Anion vl
HBDonor-Cation vl
HBDonor-HBDonor vl

- Annexe 3-

Profil pharmacologique (% d'inhibition)

	A_1 (h)	A_{2A} (h)	A_3 (h)	α_1 (non-selective)	α_2 (non-selective)	β_1 (h)	β_2 (h)	NE uptake (h)	AT_1 (h)	AT_2 (h)	ANP	BZD (central)	BZD (peripheral)	Bombesin	B2 (h)
(95)		24	19			11						23	30		
(140)	16	14	38	48	23						41				
(139)			63	23	37						35	17			
(136)	25	11	68	21	14		10				40	26		10	
(158)	20	63	36	85	30						41				
(134)	84	45	96	95	37	18	22	84	20		34		96	14	
(135)	99	38	81	34							15		24		
(159)	11		27	30							37			18	10
(143)		15	19								38				
(142)		18	50	18	22						43		30	11	
(151)		22	20	11							12				
(148)	27	25	60			18		25			25		40		
(149)	43	28	96					45	22		46				
(150)		26	65					20		11	30		42		
(147)	30	20	40		10						45		19		
(141)	12	19	44	23	13			13			49		30		
(155)		18	28								47			12	
(156)	27	26	54	26							37				
(157)	25	50	40		10			35			46				
(146)	28	18	84			16		46			27		42		
(112)	42	42		31		22	26	43	18		60		43	21	13
(114)	16	27	61	22				27	36		36				
(110)		17	49	15				10			32		53		
(111)	11	12	45	28			16	32	19		31		10		11
(103)		16	28	78	33	11	30	20					21		
(104)	15		23	82	35	28	63	49							
(105)			36	73	26	13	10						10		
(106)			26	96	70	32	72	30					14		
(107)			18	98	43	23	23	26							
(108)	19		12	95	70	23	32	47					11		
(109)	21	12	28	76	42		27	12					12		
(145)		10	16	63	54	12		69					24		
(153)			13	84	47	63	24	40					20		
(154)	15	12	45	95	27	85	58	94					32		
(152)			18	73	76	62	24	55					16		
(144)	25		23	76	69	56	19	36				27	27		
(96)	12	21	88	93	39		15	66	19		20				
(131)	26	17	96	93	46	12	21	68	27		33				
(126)	21	17	98	92	22		19	55			31			17	
(127)	15	12	99	91	40			73			36			17	
(133)	12	39	83	99	34	16	43	93	18		23			17	
(132)	38	16	98	92	55		16	79	13		45		12	32	
(130)		17	45	58	17		10	36			33	+			
(128)			39	74	24		15	60		11	40	+		13	
(124)	15		87	18				44	16		39		10	18	
(125)	47		84	36	31			23	16		43	15	29		

	CGRP (h)	CB1 (h) (central)	CB2 (h) (peripheral)	CCK_A (h)	CCK_B (h)	D_1 (h)	D_2 (h)	D_3 (h)	$D_{4.4}$ (h)	D_5 (h)	DA uptake (h)	ET_A (h)	ET_B (h)	GABA (non-selective)	GAL1 (h)
(95)															
(140)		10				11	26	26	37						
(139)						20	14								
(136)		17				11	11				23		21		
(158)					13	26			51	30					
(134)	+	48	70			82	23	11	49	85	79	25			
(135)			10		16				25			26			11
(159)										13		19			17
(143)	18					10				32					
(142)		10			10	78	60	28	11	82	27				
(151)		11	15		15	13	23	11		22	10				
(148)		14	33		21	30				37	42				
(149)	+	46	44			54		24		73	90	18			
(150)		25	34			26	18	83	14	40	38				
(147)	26		10			23		33		30	23				
(141)			23				11		15	35	28				
(155)					19	30						16			
(156)		13	22	10					21	21		15			
(157)		34	10			22	12		17	41					
(146)	+	13	18		10	52				69	58				
(112)	30		38	+	38	26	29	16	27	42	44	10		11	
(114)			40		18	39				35	19	16			
(110)		26	35			17			10	26					
(111)			44		19	23		38	10	52	23	18	13		
(103)						32			24	14	28				
(104)						24		41	62	21	47				
(105)						27		17	83		91				
(106)		22				57	70	84	54	40	54				
(107)						82	69	46	102	57	16				
(108)						80	95	100	91	54	55				
(109)		11				23			24	19	34				
(145)						38	87	84	52	28	51				
(153)						22	99	101	80	22	42				
(154)		27				56	96	99	70	36	98				
(152)						19	97	99	84	16	40				
(144)			10			20	60	85	62	17	49				
(96)		21	29			98	90	100	98	91	94	12			
(131)	+	52	26		28	97	80	96	79	100	94	22			
(126)	+	67	14		11	77	89	97	100	84	92	25			
(127)		58	25			68	78	94	100	90	97				
(133)	+	81	11		21	103	103	98	98	95	100	13			
(132)	+	69	17		17	93	79	95	99	91	100	31			
(130)		24	16			53	35	78	56	60	10				12
(128)		21	11			68	39	74	81	57	62				
(124)	+	75	31		11		12	22	14	28	40				
(125)	+	20	31		30	78	44	12	19	56	67	17			

	PDGF	IL-8A (h)	CCR1 (h)	H_1 (central)	H_2	ML_1	M_1 (h)	M2 (h)	M_3 (h)	M_4 (h)	M_5 (h)	NK_1 (h)	NK_2 (h)	NK_3 (h)	Y_1 (h)
(95)							13	10					-1		
(140)					19			14		21		14	15	19	
(139)						14		17		16		10		24	10
(136)						10		16		10				24	
(158)						18		17		13		28			
(134)					23	89		53	11	53	43	33	86		13
(135)						36				12			28	23	21
(159)								24		35	10		41		
(143)						16				11					
(142)					12	57		32		22		23	34		
(151)										10			18	31	
(148)					21	38		24		20		54	52		
(149)					15	60		28		10		51	57		10
(150)						71		21		14		71	60	38	
(147)						21				17		21			
(141)			13			62		23		17		33	41		
(155)						69		10				30	29		
(156)						17				16			26		
(157)						14		24		18		30	56		
(146)	12					62		35		15	11	30	44		
(112)	25			18		18	35	32	23	32	24	20	59	23	
(114)						40	26	15		16		16	47		
(110)	11					46		15		10		19	42		
(111)	10					10	14		16	24	17	21	55	11	61
(103)					19		13			45	10	16	42	19	
(104)					24		96	74	16	85	73	14	38	11	
(105)					29		48	52		74	29	18	33		
(106)				17	47		93	93	29	97	84	13	27		
(107)					48		50	71		78	19				
(108)				22	61		85	85	20	91	50				
(109)					40					31			32	27	
(145)					69		42	57	14	86	39	23	61	18	
(153)					49			31		41	14	28	14		
(154)					92		60	82	28	69	31	44			
(152)					62		37	59	25	78	35	22	12		
(144)					74		19	37	27	61	19	50	22		
(96)				98	104	18	55	28		62	53	42	59	13	
(131)				87	99	55	35	54		39	26	95	91		
(126)				98	98	45	21	33		36	36	17	51		15
(127)				99	91	47	17	28		33	26		54	11	
(133)				96	114	45	70	80		67	32	36	75	24	
(132)				92	89	56	28	24		33	40	13	55		13
(130)				58	26	58	53	64	16	65	37	10	31		
(128)				97	42	16	32	51		52	28		39		
(124)					40	69		27		25	25	51	50		12
(125)					14	44		17		12	15	48	59		

	Y_2 (h)	Neurotensin (h)	μ (h)	δ (h)	κ (h)	ORL1 (h)	PACAP-null (h)	PCP	TXA_2/PGH_2	PGI_2 (h)	P_{2X}	P_{2Y}	$5\text{-}HT_{1A}$ (h)	$5\text{-}HT_{1B}$	$5\text{-}HT_{2A}$ (h)
(95)			85	20	20	-1	-1							26	19
(140)			90	58	95	24	0		20	17			50	79	45
(139)			94	-3	88		0			14			26	16	
(136)			21	16	30		0		11	12					
(158)			93	31	78		0		20				12	54	
(134)			100	95	100	67	+	46	56	56			91	103	57
(135)		14	54	44	86		0		14	23	23		64	27	22
(159)		10	28	8	86		0	26	13	24					
(143)		11	98	64	61	15	0		13	30					
(142)			100	90	98	58	0	38	41	32	17		11		16
(151)			28	14	71		0	19	17	14					
(148)			14	40	89		0	12	36	19			33	+	
(149)			32	47	78		+		50	33			85	+	64
(150)			91	33	97	73	0		22	44			51		36
(147)		12	64	22	62	20	0		10	25			32		17
(141)			48	28	53	20	0	29	24	28			50		15
(155)			19	46	65		0	25	24				33		
(156)			23	29	49		0	10	15	11			28	11	
(157)			21	30	54		0		21	16				11	
(146)			60	47	83	35	0	31	29				68	+	15
(112)		12	38	33	45	24	0	21	29	57	30	+	34	29	28
(114)			54	45	43		0	51	35	26	12		29	16	20
(110)	+		56	32	69		0	51	18	31			15	17	
(111)	24		49	31	34	17	0	67	12			42	19	55	30
(103)			100	97	101	75							27	22	
(104)			100	101	101	92							73	45	
(105)			101	96	101	93	17						44	18	
(106)			103	100	102	95	17						70	25	23
(107)			100	36	87	36							97	50	45
(108)			103	78	90	85							76	17	21
(109)			103	63	97	42							93	69	
(145)			101	101	99	96							33	10	
(153)			100	69	99	90							80	14	
(154)			100	79	100	86	32						98	38	24
(152)			101	89	103	87	18						86		
(144)			101	100	99	98							62	11	10
(96)			94	46	58	11	+	31	19	26			94	53	97
(131)			86	77	89	38	+	22	35	19			66	45	98
(126)			78	45	68	21	0	33	20	16			93	42	99
(127)			74	51	91	20	0	43	29	46			94	28	97
(133)			64	52	92	19	+	39		23			93	95	100
(132)			69	59	85	23	0	29	36	22			73	43	99
(130)			88	40	45		0		12	18			61		90
(128)			95	31	43		0	33	12	23			84		92
(124)			30	38	63		0	39	57	32			30		41
(125)			74	35	95		+	22	37	20				12	33

	$5\text{-}HT_{2C}$ (h)	$5\text{-}HT_3$ (h)	$5\text{-}HT_6$ (h)	$5\text{-}HT_7$ (h)	σ (non-selective)	Somatostatin	VIP (h)	V_{1a} (h)	Ca^{2+} channel (L, verapamil)	K^+ channel (Volt-dependent)	K^+ channel (Ca^{2+}-dependent)	Na^+ channel (site 2)	Cl^- ionophore
(95)					14								
(140)			10	17	36			37	72			79	18
(139)					+			33					
(136)					+							14	17
(158)			28	18				24				18	10
(134)	59		67	65	34			112	72	20		72	95
(135)	18		12	12	11				27			22	37
(159)									12			14	
(143)		16							11				10
(142)	61	25						32	10			21	27
(151)	17	28			+			45					
(148)	29		11	24	11			64				28	29
(149)	98		37	27	28			28	32	31		65	55
(150)	96		41	12	11			87	16			49	26
(147)	48				12			80	27			57	19
(141)	18	14						62	35			57	29
(155)		26		23				39				16	11
(156)				24				77		11		28	17
(157)	14	13	75					31				21	15
(146)	80	27	32	13				80				26	49
(112)	24	36	15	46	64			17	60			30	40
(114)	39	29					10					23	39
(110)		10			19			23				45	16
(111)	18	21		15	51	29	15	14				19	42
(103)	12	16		46	51			35				32	
(104)	14			93	63			35	19			65	56
(105)	10			38	74				14			56	
(106)	21			95	73			32	28	20		75	34
(107)	46	22	23	78	106				41	22		74	
(108)		18		94	75			35	48			81	
(109)		87		57	31				32			19	29
(145)				25	52				25			50	
(153)				19	64			10	34	18		72	
(154)	52			75	93				67	19		103	38
(152)				31	70				58	19		73	
(144)	16	11		17	88			14	33	19		80	
(96)	75		96	83	85			42	103	11		81	81
(131)	91		93	84	65		24	15	114	28		102	73
(126)	66		97	87	64			27	105	17	25	92	62
(127)	61	21	93	87	33		14	19	102			96	59
(133)	80	44	98	93	74	56	45	83	109	47		107	48
(132)	86	18	91	95	90				102			86	68
(130)	34		18	85	82			12	40			64	18
(128)	40		12	72	73			28	56			50	26
(124)	31		79	23	41			20	64			75	78
(125)	25	23	11	49	31			19	82			99	45

-Annexe 4-

Profil Pharmacologique (IC_{50})

	mu (h)	delta (h)	kappa (h)	ORL1 (h)	M_1 (h)	M_2 (h)	M_5 (h)	beta1 (h)	alpha1 (n.s.)	D1 (h)	D_2 (h)	D3 (h)	$D_{4.4}$ (h)	D_5 (h)	H_1 (central)	H_2	NK1 (h)	NK_2 (h)	5-HT1A (h)	$5\text{-}HT_{1B}$	$5\text{-}HT_{2A}$	$5\text{-}HT_{2C}$	$5\text{-}HT_3$	$5\text{-}HT_{5A}$ (h)	$5\text{-}HT_6$ (h)	5-HT7 (h)	ML_1	V_{1a} (h)	NE uptake (h)	DA uptake (h)	σ (n.s)	canal NaI (site 2)	canal Ca^{2+} L	canal Cl⁻ ionophor	BZDp	A_1 (h)	A_2 (h)	PCP	TXA2/PGH2	PGI2 (h)	P2X	P2Y	CCKA (h)	CCKB (h)	ETA (h)	ETB (h)	Bombesin	B2 (h)	Somatostatin	IL-8A (h)	CCR1 (h)	CGRP (h)	VIP (h)	GAL1 (h)	GABA (n.s)	CB1c (h)	CB2b (h)
	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	R-	T	T					R	R	RP	RP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C	C	C	C			
(95)	1100																																																								
(140)	1510	7730	785																																																						
(139)	2880		1330																																																						
(136)																																																									
(158)	1060		3700						2010																																																
(150)	1430		671									3180										345						5160																													
(143)	719	6570	7990																																																						
(142)	152	1590	355											3660																																										
(134)	133	1940	292						1340	7580				4890				4420	4650	708							1740	2220	3020					2380	1040	2640	1780																					
(135)	8950		3100																																	344	3330																				
(146)	18640		2610																			1830						6650									5470																				
(159)			2090																																																						
(151)			4260																																																						
(148)			1800																																																						
(149)	15240		2570																2080			652								2940							1510																				
(147)	5650		2530																									2010																													
(141)	10520		5070																																																						
(155)			5450																																																						
(156)			9270																																																						
(157)			8180																																																						
(112)	14510		7940																																																						
(114)	7910																																																								
(118)	7840		7260																																																						
(111)	9530		8900																																																						
(103)	2	227	26	50000																																50000																					
(109)	16	3300	398	50000															905				4420																																		
(153)	21	4490	102	758					4250		123	29	1880						2640																																						
(152)	14	1180	51	340							557	160	947						2280													1110																									
(154)	72	2500	105	2420		4540		3590	2830		538	149				496			301										2810	2250	1250	552																										
(108)	16	2150	198	1910	1780	1570			1150	2740	480	154	1690													849						1340																									
(104)	3	101	3	283	556				10000																	663						1710																									
(106)	1	34	6	38	630	518	1910		1330			1910														762																															
(145)	1	12	2	19							2120	1930																																												
(144)	2	77	7	97								2120																			581																									
(107)	218	50000	472	50000					174	2500			429						345												328																										
(105)	6	408	32	434									6550																	1520																										
(96)	1370		8170						1100	1120	2240	195	776	988	795	1030			1020		715			3380	2280	1440				996	702	1350	1720	3520			3480																				
(131)	2240	4410	2780						993	987	2890	341		1450	1820	757	839	5180			231	1420			800	2040				994		438	860				4180																				
(126)	3500		4230						1640		2620	456	338	1550	1280	1250			1140		1060	3450			1530	726				2000		1800	2730				4210																				
(127)	4360		3050						1170			977	716	3020	1660	1340			1110		1030				1350	1170				1280		737	4300				5080																				
(133)	6360	9760	2160			2210			417	376	551	538	543	513	454	368			985	3580	683	2760			427	996		3650	1140	781		165	284				5980																				
(132)	5140	7270	2610						2190	2750		758	280	1860	1930	1980					950			5520	7780	2130				954	482	539	2350				2460																				
(130)	1400		9610																		980					1430						2170																									
(128)	792												1410		280				1570		854																																					
(124)			6210																																		3750																				
(125)	3570		3580																													1480	4840																								

Abréviations-Glossaire

Abréviations

ACN	acetonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
Boc	tert-butyloxycarbonyle
CCM	chromatographie couche mince
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCM	dichlorométhane
DIEA	*N,N'*-diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
éq	équivalent
EtOH	éthanol
HOBt	*N*-hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide haute performance
%inh	pourcentage d'inhibition
LC/MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MeOH	methanol
Rend.	rendement
R_f	rapport au front (en CCM)
RMN	résonance magnétique nucléaire
	s singulet
	d doublet
	t triplet
	q quadruplet
	dd doublet de doublet
	dt doublet de triplet
	ddd doublet de doublet de doublet
	m multiplet
	J constante de couplage
SAR	relations structure-activité (structure-activity relationships)
THF	tétrahydrofurane
t_R	temps de rétention
QSAR	relations structure-activité quantitatives (quantitative structure-activity relationships)

Glossaire [1]

ADME : abréviation de Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (regroupe pour l'ensemble des caractéristiques pharmacocinétiques du produit par opposition aux caractéristiques pharmacodynamiques (effet pharmacologique)).

Affinité : l'affinité mesure la tendance de deux molécules à former un complexe. L'affinité d'un médicament est sa capacité de liaison à sa cible biologique (récepteur, enzyme, système transporteur, etc.). $\Delta G=-RT\ln Ki$; $Ki=e^{-(\Delta G/RT)}$.

Agoniste : un agoniste est une substance endogène ou un médicament qui peut interagir avec un récepteur et initier une réponses physiologique ou pharmacologique caractéristique de ce récepteur (contraction, relaxation, sécrétion, activation enzymatique, etc.).

Agoniste inverse : un agoniste inverse est un médicament qui agit sur le même récepteur qu'un agoniste mais en produisant un effet opposé. Il peut être appelé antagoniste négatif.

Agoniste partiel : agoniste incapable d'induire une activation maximale pour une population de récepteurs, quelque soit la quantité de composé appliqué.

Analogue : un analogue est un médicament dont la structure est reliée à celle d'un autre médicament mais dont les propriétés chimiques et biologiques peuvent être très différentes. Les analogues sont des substances qui sont analogues à l'agent prototype quant à la structure chimique.

Antagoniste : un antagoniste est un médicament ou un composé qui s'oppose aux effets physiologiques d'un autre. Au niveau d'un récepteur, il s'agit d'une entité chimique qui s'oppose aux réponses associées au récepteur qui sont normalement induites par un autre agent bioactif.

Bioisostère : un bioisostère est un composé résultant de l'échange d'un atome ou d'un groupe d'atomes avec un autre atome ou groupe d'atomes globalement similaire. L'objectif d'un remplacement bioisostérique est de créer un nouveau composé ayant des propriétés biologiques similaires au composé parent. Le remplacement isostérique peut être basé sur la physicochimie ou la topologie.

Chimie médicinale : discipline basée sur la chimie qui englobe également des aspects de sciences biologiques, médicales et pharmaceutiques. Elle est concernée par l'invention, la découverte, la conception, l'identification et la préparation de composés biologiquement actifs, l'étude de leur métabolisme, l'interprétation de leur mode d'action au niveau moléculaire et la construction des relations structure-activité.

CoMFA : comparative molecular field analysis. Il s'agit d'une méthode de QSAR tridimensionnel qui utilise les techniques de corrélation statistique pour l'analyse des relations quantitatives entre l'activité biologique d'un ensemble de composés avec un alignement spécifique, et leur propriétés électroniques et stériques. D'autres propriétés comme l'hydrophobicité et les liaisons hydrogènes peuvent aussi être incorporés à l'analyse.

Descripteurs pharmacophoriques : sont utilisés pour définir un pharmacophore, en incluant les possibilités de liaisons hydrogène, les sites d'interaction hydrophobiques et électrostatiques définis par des atomes, des centres de cycles et des points virtuels.

Enzyme : un enzyme est une macromolécule, généralement une protéine qui fonctionne comme un bio-catalyseur en augmentant la vitesse de réaction. En général, un enzyme catalyse seulement un type de réaction (sélectivité) et opère sur seulement un seul type de substrat (sélectivité de substrat).

Essai biologique : un essai biologique est une procédure pour déterminer la concentration, la pureté, et/ou l'activité biologique d'une substance (vitamine, hormone, facteur de croissance

des plantes, antibiotique, enzyme) en mesurant son effet sur un organisme, un tissu, une cellule, une enzyme ou un récepteur en comparaison avec une préparation standard.

Homologue : le terme homologue est utilisé pour décrire un composé appartenant à une série de composés différant entre eux par une unité répétée, comme un groupe méthylène, un résidu peptidique, etc.

IC_{50} : dans un test de liaison à un récepteur (comme μ opiacé), concentration causant 50% de l'inhibition de la liaison spécifique.

Isostères : molécules ou ions de taille similaire contenant le même nombre d'atomes et d'électrons de valence.

Lead Discovery : découverte de tête de série, processus d'identification des nouvelles entités chimiques actives qui par modifications ultérieures peut être transformé en un médicament utile cliniquement.

Lead Generation : génération de tête de série, terme appliqué aux stratégies développées en vue de l'identification des composés qui possèdent une activité biologique désirée mais non-optimisée.

Lead Optimization : optimisation de tête de série, modification synthétique d'un composé biologiquement actif, pour remplir tous les requis stéréoélectroniques, physicochimiques, pharmacocinétiques et toxicologiques pour l'utilisation clinique.

Lipophilie : représente l'affinité d'une molécule ou d'un groupe pour un environnement lipophilique. Elle est généralement mesurée par le comportement de distribution dans un système biphasique, soit liquide-liquide (coefficient de partition tampon aqueux à pH 7.4/octan-1-ol : LogD) ou solide-liquide (HPLC en phase inverse ou CCM).

Médicament : toute substance présentée pour traiter, guérir ou prévenir les maladies chez les êtres humains ou les animaux. Un médicament peut aussi être utilisé pour faire un diagnostic médical ou pour restaurer, corriger ou modifier les fonctions physiologiques.

Modélisation moléculaire : ensemble des techniques utilisées pour l'investigation des structures moléculaires et pour la prédiction de leurs propriétés, afin de fournir une représentation tridimensionnelle plausible dans un ensemble donné de circonstances.

Monomère: molécule organique de poids moléculaire généralement inférieur à 400 g/mol, possédant une fonction réactive pour un type de chimie. Sa structure doit être originale et apporter, de préférence, des éléments pharmacophoriques susceptibles de lier les récepteurs ou les protéines.

Pharmacophore : ensemble de caractéristiques stériques et électroniques nécessaires pour assurer les interactions supramoléculaires optimales avec une cible biologique spécifique et déclencher (ou bloquer) sa réponse biologique. Un pharmacophore ne représente pas une molécule réelle ou une association réelle de groupes fonctionnels mais un concept purement abstrait qui explique les capacités d'interactions moléculaires d'un groupe de composés envers la structure cible. Le pharmacophore peut être considéré comme le plus grand dénominateur commun partagé par un ensemble de molécules actives. Dans notre exposé,

nous avons utilisé le mot pharmacophore pour désigner l'ensemble des caractéristiques stériques et électroniques d'une molécule. Dans le cas où la molécule considérée est le ligand optimal, les deux définitions se recouvrent.

Puissance : dose requise d'un médicament pour produire un effet spécifique d'une intensité donnée comparée à un standard de référence.

Récepteur : molécule ou structure polymérique dans ou sur une cellule qui reconnaît spécifiquement et lie un composé agissant comme messager moléculaire (neurotransmetteur, hormone, médicament, ...)

Relations structure-activité : relations entre les structures chimiques et les activités pharmacologiques pour une série de composés.

Site de liaison allostérique : les sites allostériques sont présents dans beaucoup d'enzymes et de récepteurs. L'interaction avec un site allostérique modifie profondément la conformation du récepteur et peut altérer l'affinité du récepteur pour le ligand naturel. Comme conséquence de la liaison aux sites allostériques, l'interaction avec le ligand normal peut être soit augmentée soit réduite.

Synthèse combinatoire : la synthèse combinatoire est le processus de préparation de larges ensembles de composés organiques par combinaison d'ensembles de monomères (building blocks).

---

[1] C-G Wermuth, C.R. Ganellin, P. Lindberg, L.A. Mitscher, « Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1997), J.A. Bristol, Trends and Perspectives, Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol. 33, Academic Press, ***1998***, pp 385-395.

UNIVERSITE DES SC. ET TECHN. LILLE
BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE