

THÈSE

Présentée
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

Discipline : Chimie Organique

Spécialité : Pharmacochimie

Par

Maryline BOUROTTE

Synthèse d'inhibiteurs de protéines kinases : approches pharmacochimiques.

Soutenue le 22 juillet 2004 devant le jury composé de :

MM.

Pr. G.KIRSCH
Pr. A. MARSURA
Pr. F. COLOBERT
Dr. J.-J. BOURGUIGNON
Dr. M. SCHMITT

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse

*A mes parents,
A Philippe,
A Firmin.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire (Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur- Strasbourg I). Je tiens à remercier M. le Prof. CG. WERMUTH et M. le Prof. M. HIBERT, directeurs successifs du Laboratoire de Pharmacochimie, pour m'avoir accueillie au sein de leur unité.

J'adresse envers M. le Dr. Jean-Jacques BOURGUIGNON ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir confié ce projet de thèse qui m'a fait découvrir l'univers de la pharmacochimie.

Je remercie très chaleureusement Mme le Dr. Martine SCHMITT pour ses conseils, son encadrement et son aide précieuse en chimie.

Je souhaite remercier Mme le Prof. Françoise COLOBERT, M. le Prof. Gilbert KIRSCH et M. le Prof. Alain MARSURA pour l'honneur qu'ils me font d'accepter de juger ce travail.

Je tiens également à remercier M. le Prof Jacques HAIECH avec qui nous avons collaboré durant toutes ces années et plus particulièrement Mme le Dr. Claire PIGAULT et Mme le Dr. Anny FOLLENIUS-WUND qui ont réalisé toutes les mesures des caractéristiques photophysiques de nos composés fluorescents, Mme le Dr. Helena RAMSTRÖM ainsi que M. le Dr. Claude PHILIPPE qui ont testé l'ensemble de nos composés bis-cationiques sur l'HPrK/P.

Je remercie Cyril Antheaume pour le temps qu'il m'a consacré pour l'étude RMN de mes composés.

Je remercie particulièrement le Dr. Nadia Pellegrini pour tous les bons moments passés ensemble et pour l'aide et le soutien qu'elle m'a apporté durant mes années de thèse. Je remercie également le Dr. Saïd Oumouch pour sa sympathie et sa collaboration à cette thèse.

Enfin je remercie chaleureusement toutes les personnes de l'UMR 7081 qui m'ont accompagnée durant ces années de thèse et plus particulièrement Cécile pour son soutien, sa sympathie... mais aussi Claude, Isabelle S., Laurent, Nicolas, Bruno, Patricia, Anh, Evelyne, Rachel, Isabelle P., Romain, Dominique, Sébastien, Benoît, Emmanuelle, Christelle, Joao, Patrick, Gilles, Céline et tant d'autres... sans oublier Françoise et Marlyse, toujours indispensables...

Et pour finir, je n'oublie pas de remercier mes parents, toute ma famille mais aussi mon amie Corinne pour leur soutien et leurs encouragements pendant toutes ces années qui s'achèvent. Toute ma gratitude à Philippe qui a toujours cru en moi.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. LES PROTÉINES KINASES

A- La famille des protéines kinases comme cibles thérapeutiques et analyse de leurs principaux inhibiteurs 1

1. Introduction..... 1

2. Généralités 3

3. Classification des protéines kinases..... 3

3.1 Les Tyrosine Kinases 5

3.1.1 Les Tyrosine Kinases cytosoliques..... 5

3.1.2 Les Tyrosine Kinases membranaires ou récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK) 7

3.1.2.1 Le récepteur de l'insuline 7

3.1.2.2 Les récepteurs des facteurs de croissance (GFR) 9

3.2 Les Sérine/Thréonine Kinases (S/TK) 11

3.2.1 Les S/TK dépendantes des nucléotides cycliques..... 11

3.2.2 Les protéines kinases C..... 12

3.2.3 Les protéines kinases dépendantes du couple Ca^{2+} /calmoduline 13

3.2.3.1 La "myosin light chain kinase" ou MLCK 13

3.2.3.2 La CaMKII 13

3.2.3.3 La "death-associated protein kinase" ou DAPK..... 15

3.2.4 Autres Ser/Thr protéines kinases..... 15

3.2.4.1 Les protéines kinases dépendantes de la cycline (CDKs)..... 15

3.2.4.2 Les "Mitogen-Activated Protein Kinases" ou MAPK..... 17

3.3 Une nouvelle protéine kinase bactérienne: L'Histidin-containing Protein Kinase/Phosphatase ou l'HPrK/P 17

4. Les inhibiteurs de protéines kinases 19

4.1 Ligands compétitifs de l'ATP 21

4.2	Ligands compétitifs du substrat	25
B-	Introduction et objectifs des travaux de recherche	26
	Bibliographie du Chapitre I	29

CHAPITRE II. DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS DE PROTÉINES KINASES

A-	<u>L'Histidin-containing Protein Kinase/Phosphatase</u>	<u>32</u>
1.	<u>Approche rationnelle.....</u>	<u>32</u>
2.	<u>Criblage de la chimiothèque patrimoine</u>	<u>36</u>
2.1	<u>Touches sur l'HPK/P</u>	<u>36</u>
2.2	<u>Réactivité des amidines hétérocycliques.....</u>	<u>37</u>
2.3	<u>Optimisation structurale de la touche bis-cationique</u>	<u>43</u>
2.3.1	<u>Alkylation en N1 du 2-aminobenzimidazole</u>	<u>43</u>
2.3.2	<u>Accès aux bis-cations de 2-aminobenzimidazole</u>	<u>45</u>
2.3.3	<u>Préparation des chaînes halogénées</u>	<u>45</u>
2.3.3.1	<u>Chaînes portant un précurseur d'amines.....</u>	<u>45</u>
2.3.3.2	<u>Chaînes portant une fonction amide</u>	<u>47</u>
2.3.3.3	<u>Chaînes portant une fonction amide inversée</u>	<u>47</u>
2.3.3.4	<u>Chaînes portant une amine aromatique.....</u>	<u>48</u>
2.3.3.5	<u>Chaînes portant une guanidine.....</u>	<u>49</u>
2.3.4	<u>Accès aux mono-cations.....</u>	<u>49</u>
2.3.4.1	<u>Variations de la tête cationique.....</u>	<u>49</u>
2.3.4.2	<u>Introduction de chaînes fonctionnalisées.....</u>	<u>50</u>
2.3.4.3	<u>Stabilité des cations</u>	<u>52</u>
2.3.4.4	<u>Oxydation des alcools 105m-n.....</u>	<u>53</u>
2.3.4.5	<u>Déprotection des N-Boc 105r-t</u>	<u>54</u>
2.3.4.6	<u>Substitution des dérivés bromés 105o-q.....</u>	<u>55</u>
2.4	<u>Etudes des relations structure-activité.....</u>	<u>57</u>
2.4.1	<u>Caractéristiques inhibitrices du composé chef de file</u>	<u>57</u>

2.4.2	Optimisation	59
2.4.2.1	Importance de la tête cationique	59
2.4.2.2	Importance de la chaîne-espaceur	60
2.4.2.3	Importance du groupement benzylique en N1 du benzimidazole	61
2.4.2.4	Effet de l'introduction de groupements fonctionnels sur la chaîne latérale.....	63
2.5	Conclusion	67
B-	La CaMKII	68
1.	Criblage de la Chimiothèque : dérivé d'aminopyridazine	68
2.	Optimisation structurale	70
2.1	Les 3-aminopyridazines : données bibliographiques	70
2.1.1	Synthèse conventionnelle des 3-amino-6-arylpyridazines	71
2.1.2	Nouvelles voie d'accès aux pyridazines par couplage palladium	73
2.1.2.1	Introduction de diversité en position 6 des aminopyridazines.....	73
2.1.2.2	Introduction de diversité en position 5 des pyridazinones et des 3-chloropyridazines.....	73
2.1.2.3	Introduction de diversité en position 4 et/ou 5 des pyridazinones	74
2.2	Introduction de diversité en position 4	75
2.2.1	Préparation du synthon 3-amino-4-nitro-6-phénylpyridazine	76
2.2.2	Préparation des 4-bromo-6-phénylaminopyridazines	79
2.2.3	Réactions pallado-catalysées : accès à des pyridazines diversement substituées en position 4	80
2.2.3.1	Couplage de type Suzuki	80
2.2.3.2	Couplage de type Sonogashira.....	81
2.2.3.3	Déprotection des N-benzylaminopyridazines.....	82
2.2.3.4	Accès aux 4-alkylpyridazines.....	82
2.3	Construction des bis-cations.....	82
3.	Etude des relations structure activité.....	83

<u>C- Conclusion</u>	85
<u>Bibliographie du Chapitre II</u>	86

CHAPITRE III. FLUOROPHORES DERIVES DU CHROMOPHORE DE LA GREEN

FLUORESCENT PROTEIN

<u>A- Généralités sur la fluorescence</u>	89
<u>1. Le processus de fluorescence</u>	89
<u>2. Les principales sondes fluorescentes</u>	93
<u>3. La Green Fluorescent Protein</u>	93
<u>3.1 Introduction</u>	93
<u>3.2 La formation du chromophore de la GFP</u>	95
<u>3.3 Propriétés photophysiques</u>	97
<u>3.4 Classification des mutants de la GFP</u>	99
<u>B- Synthèse de dérivés du chromophore de la GFP</u>	102
<u>1. Les imidazolones</u>	102
<u>1.1 Au départ des 4-arylidène-5-oxazolones : voie A</u>	103
<u>1.1.1 Préparation des 4-arylidène-5-oxazolones</u>	103
<u>1.1.2 Utilisation de 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolones</u>	106
<u>1.1.3 Obtention des imidazolones</u>	107
<u>1.1.3.1 Préparation des 2-alkylimidazolones</u>	108
<u>1.1.3.2 Préparation des 2-arylimidazolones</u>	109
<u>1.1.3.3 Préparation des 5-(aryléthylidène)-4-imidazolones</u>	111
<u>1.1.4 Obtention des imidazolones par "Umpollung" : activation de la fonction</u> <u>amide</u>	112
<u>1.2 Au départ des amidines (Voie B)</u>	114
<u>1.2.1 Préparation des amidines</u>	116
<u>1.2.2 Obtention des imidazolones</u>	116
<u>1.2.2.1 Aldéhydes aromatiques</u>	116

1.2.2.2 Aldéhydes non aromatiques	118
1.2.2.3 Configuration des imidazolones	119
1.3 Au départ des iminoéthers (Voie C)	119
1.4 Alkylation en N1 des imidazolones	121
2. Préparation d'imidazolones par couplage palladium : nouvelle méthode de synthèse	122
2.1 A partir des 2-aminoimidazolin-4-ones	123
2.1.1 Préparation des 2-aminoimidazolin-4-ones	123
2.1.2 Préparation des dérivés halogénés	125
2.2 A partir des imidazolidine-2,4-diones	126
2.2.1 Préparation des triflates	128
2.2.2 Préparation des iminochlorures	129
2.3 A partir des S-méthylthioimidazolones	129
2.3.1 Données bibliographiques	129
2.3.2 Préparation des thioimidazolones	133
2.3.2.1 Couplage avec les acides boroniques	133
2.3.2.2 Couplage avec les organostannanes	136
3. Les composés isostères des imidazolones	137
3.1 Les buténolides	137
3.1.1 Synthèse des α -arylidène- γ -aryl- $\Delta^{B,Y}$ -buténolides	137
3.1.2 Configuration des buténolides	139
3.2 Les pyrrolinones	140
3.2.1 Synthèse des pyrrolinones	140
3.2.2 Configuration des pyrrolinones	144
3.2.2.1 Les pyrrolinones 186	144
3.2.2.2 Les pyrrolinones 187, 188 et 189	145
3.3 Les thiazolidinones	146
4. Les analogues structuraux	147
4.1 Les imidazopyridines	147

4.2 Les oxindoles	149
C- Propriétés photophysiques des dérivés	150
1. Introduction	150
2. Propriétés spectrales des imidazolones	151
2.1 Effet de substitution	153
2.1.1 Imidazolones dérivés du chromophore modèle	153
2.1.2 Imidazolones portant un groupement électrodonneur en R₂	155
2.1.3 Imidazolones portant un groupement électrodonneur en R₁	155
2.1.4 Imidazolones portant un groupement électroattracteur en R₁	157
2.1.5 Imidazolones portant un groupement sur l'atome d'azote (R ≠ H)	157
2.2 Effet de l'environnement	159
2.2.1 Effet de la température	159
2.2.2 Fluorescence des imidazolones dans l'eau	161
2.2.3 Fluorescence des imidazolones dans le glycérol	161
2.3 Conclusion	162
3. Propriétés spectrales des oxazolones	163
4. Propriétés spectrales des buténolides	165
5. Propriétés spectrales des pyrrolinones	167
6. Propriétés spectrales des thiazolidinones	169
7. Propriétés spectrales des analogues structuraux	171
8. Etude comparative des 4 classes principales de fluorophores synthétisés	171
8.1 Etude RMN	171
8.2 Comparaison des données photophysiques	173
D- Applications	177
E- Conclusion	177
Bibliographie du Chapitre III	179
CONCLUSION GENERALE	184

ANNEXES	186
PARTIE EXPÉRIMENTALE CHAPITRE II	196
PARTIE EXPÉRIMENTALE CHAPITRE III	241

Liste des abréviations

Ac	acétyle	IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
ADN	acide désoxyribonucléique	IL-1 β	Interleukine-1 β
ADP	adénosine diphosphate	iNOS	Nitric oxide synthase inductible
AMPc	adénosine monophosphate cyclique	IP ₃	Inositol trisphosphate
Ar	aryle	<i>i</i> -Pr	/sopropyle
ARN	acide ribonucléique	IR	infrarouge
ATP	adénosine trisphosphate	IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
B	base	JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Bn	benzyle	KHMDS	hexaméthylidisilazane de potassium
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
CaM	calmoduline	MEK	MAPK Kinase
CaMK	Kinase dépendante de la calmoduline	Me	Méthyle
CCM	chromatographie sur couche mince	MLCK	Myosin Light Chain Kinase
CCA	Carbon Catabolite Activation	NGF	Neuronal Growth Factor
CCR	Carbon Catabolite Repression	NMM	N-méthylmorpholine
CDI	Carbonyle diimidazole	NO	Oxyde nitrique
CDK	Cyclin-Dependant Kinase	Nu	Nucléophile
c-Hex	cyclohexyle	PCC	Pyridinium chlorochromate
cre	catabolite responsive element	PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Crh	Catabolite repression HPr	PEP	Phosphoénolpyruvate
CSF	Colony Stimulating Factor	Ph	Phényle
CuTC	Thiophène carboxylate de cuivre (I)	Pht	phtalimide
DAG	Diacylglycérol	PI3K	phosphoinositol-3 kinase
DAPK	Death Associated Protein Kinase	PIP ₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
DCC	dicyclohexylcarbodiimide	PIP ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
DCM	dichlorométhane	PK	protéine kinase
DIPCI	diisopropylcarbodiimide	PKA	protéine kinase A
DIEA	diisopropyléthylamine	PKC	protéine kinase C
DMA	diméthylacétamide	PLC	phospholipase C
DMAP	4-diméthylaminopyridine	PPA	acide polyphosphorique
DME	1,2-diméthoxyéthane	Pr	propyle
DMF	diméthylformamide	PTS	PEP: sugar phosphotransferase system
DMSO	diméthylsulfoxyde	R	Récepteur
EDC	chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide	RC	Répression catabolique
EGF	Epidermal Growth Factor	Rdt	rendement
EPA	éther/ <i>isopentane</i> /éthanol absolu (5/5/2)	Rins	récepteur de l'insuline
éq.	équivalent	RMN	résonance magnétique nucléaire
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase	RTK	récepteurs à activité tyrosine kinase
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate	SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor	SH2	Src Homology-2
FRET	transfert par résonance d'énergie de fluorescence	TA	température ambiante
FT	facteur de transcription	TBAB	bromure de tétrabutylammonium
GABA	acide gamma-aminobutyrique	TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
GF	Growth Factor, facteur de croissance	TEA	triéthylamine
GFP	Green Fluorescent Protein	TGF	Transforming Growth Factor
GMPc	guanosine monophosphate cyclique	TFA	acide trifluoroacétique
GPhK	Glycogen Phosphorylase Kinase	TFP	tris(2-furyl)phosphine
GTP	guanosine triphosphate	THF	tétrahydrofurane
HEK	hamster embryo kidney	TK	tyrosine kinase
HOBt	1-hydroxybenzotriazole	TMS	triméthylsilyle
HONSu	N-hydroxysuccinimide	TNF- α	tumor necrosis factor- α
HPLC	chromatographie liquide à haute performance		
HPr	Histidin-containing Protein		
HPrK/P	Histidin-containing Protein Kinase/ Phosphatase		
<i>i</i> -Bu	<i>isobutyle</i>		

Chapitre I :

Les Protéines kinases

Chapitre I. Les Protéines Kinases

A- La famille des protéines kinases comme cibles thérapeutiques et analyse de leurs principaux inhibiteurs

1. Introduction

La plupart des mécanismes de régulation intracellulaires impliquent des processus de phosphorylation/déphosphorylation par les kinases et les phosphatases.¹ La première phosphorylation de protéine a été identifiée dans le milieu des années 50 par Krebs et Fischer.² Depuis un grand nombre de phosphoprotéines a été caractérisé dans une grande variété d'organismes, de la levure aux mammifères. L'existence de protéines kinases et de protéines phosphatases chez les bactéries a seulement été mise en évidence à la fin des années 1970.³

Les kinases représentent un groupe ubiquitaire d'enzymes qui sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires. Par définition, le mot kinase est appliqué aux enzymes qui catalysent le transfert du groupement phosphate terminal de l'ATP vers un substrat qui peut être une petite molécule, un lipide ou une protéine. La plupart des kinases sont impliquées dans les différentes voies de transduction du signal, et en sont des composants essentiels. D'autres kinases ont un rôle important dans le métabolisme des glucides, des lipides, des nucléotides, des vitamines, etc..., d'autres encore participent à la régulation des gènes ou encore à la contraction musculaire. Du fait de leurs rôles dans les processus cellulaires, les kinases font partie des enzymes les plus étudiées au niveau structural, biochimique ainsi qu'au niveau cellulaire.

Les protéines kinases, plus particulièrement, représentent une des plus grandes familles de protéines, ce sont des enzymes comptant plus de 500 membres dans le génome humain.⁴ Ces protéines kinases (PK) sont impliquées dans la plupart des voies de transduction du signal régulant le fonctionnement cellulaire sous tous ses aspects. La plupart des cancers sont associés au dérèglement de protéines kinases, tels que des mutations génétiques qui conduisent à une sur-expression ou à une activation constitutive de ces protéines. Elles sont également impliquées dans de nombreuses autres pathologies.

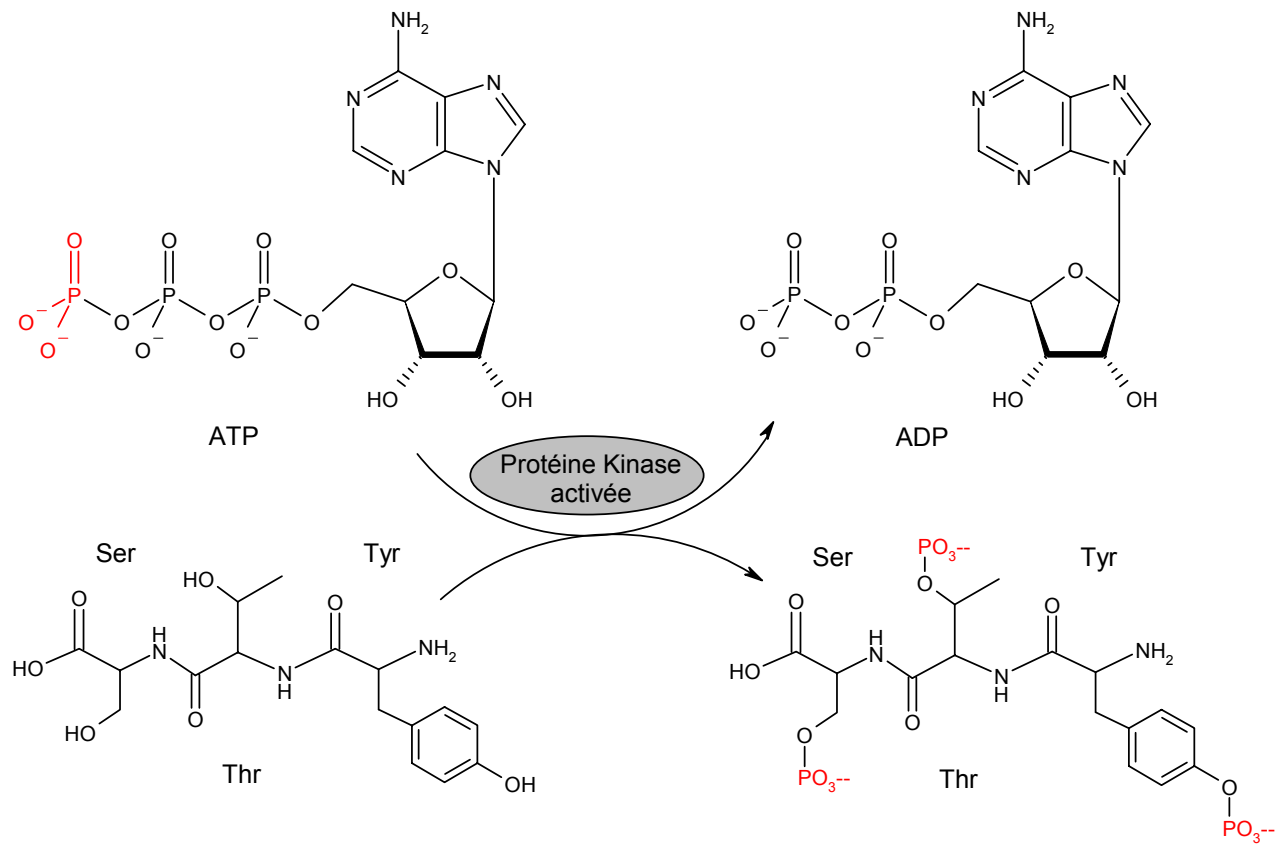


Figure 1 : Sites d'action des protéines Ser/Thr et Tyr kinases

La compréhension des mécanismes de contrôle des ces PK ainsi que la découverte d'inhibiteurs de PK sont devenus des points-clé pour la recherche de nouveaux agents thérapeutiques.

2. Généralités

La fonction catalytique commune des protéines kinases consiste en la phosphorylation covalente d'une protéine-substrat qui se fait par le transfert du groupement phosphate γ de l'ATP (plus rarement du GTP) à un résidu thréonine, sérine ou tyrosine du substrat (Figure 1).⁵ Cette fonction est assurée par le domaine catalytique des PK dont la structure et en particulier les aminoacides-clé, sont très conservés.⁶ Les PK possèdent toutes un site de liaison de Mg^{2+} -ATP, un site de liaison des protéine-substrats et divers sites régulateurs. Pour qu'un résidu Ser, Thr ou Tyr soit phosphorylé, il est nécessaire qu'il appartienne à une séquence de la protéine-substrat bien particulière, qui assure une conformation déterminée à cette partie de la protéine-substrat, compatible avec le site catalytique de la protéine kinase. Autrement dit, tous les résidus Ser, Thr et Tyr ne peuvent pas être phosphorylés, cependant une protéine-substrat peut avoir 1 à 100 sites de phosphorylation. Les PK peuvent être régulées par des protéines activatrices, des protéines inhibitrices (pseudosubstrat, autoinhibition), des cofacteurs, des seconds messagers. L'activité des PK peut également être contrôlée par phosphorylation, faite par elles-mêmes (autophosphorylation) ou par d'autres protéines kinases de sorte qu'il se crée des cascades de protéines kinases qui amplifient les signaux membranaires. Cette activité peut être également contrôlée simplement par la localisation des PK dans la cellule.

3. Classification des protéines kinases

Le classement des kinases peut s'effectuer en fonction de la structure, de la séquence des protéines.⁷ Les PK peuvent être classées selon leur localisation dans la cellule. Ils existent des PK cytosoliques et des PK membranaires qui présentent la propriété de récepteurs-enzymes. Les PK peuvent également être classées en fonction de l'acide aminé qu'elles phosphorylent, c'est cette classification que nous avons privilégiée. Il existe principalement deux grandes classes de protéines kinases, les 'Tyrosine Kinases' (TK) et les 'Sérine/Thréonine Kinases'.⁸

Protéines TK cytosoliques

Sous-familles	Protéines TK	Implication dans les voies de signalisation
Src	c-Src (protéine homologue de celle du virus du sarcome de Rous, v-Src) c-Yes (protéine homologue de celle du virus du sarcome de Yamaguchi, v-Yes) Fyn Lck Lyn...	Voie des facteurs de croissance
Abl	Abl (protéine homologue de celle du virus de la leucémie murine d'Abelson, v-Abl) Arg	Régulation du cycle cellulaire, couplage direct à l'ADN
Jak (Janus kinase) : :	Jak 1, 2, 3 Tyk2	Voie des cytokines (STAT), hématopoïèse

Tableau 1 : Principales familles de TK cytosoliques

Récepteurs à activité TK

Sous classes	Récepteurs	Implication dans les voies de signalisation
I	EGFR : ErbB2 ErbB3 ErbB4	Croissance cellulaire
II	InsR, IGF-1	Différenciation cellulaire, métabolisme
III	PDGFR : PDGFRa et b CSF-1R Flk2/Flt3 c-kit/SCFR	Croissance et différenciation cellulaire, régulation vasculaire et régulation des cytokines
VI	FGFR : FGFR2 FGFR3 FGFR4 Cek2...	Croissance et différenciation cellulaire

Tableau 2 : Principales sous classes de RTK

3.1 Les Tyrosine Kinases

Les Tyr kinases (TK) phosphorylent le groupement hydroxyle de certains résidus tyrosine de protéine-substrats. Certaines de ces protéines TK sont membranaires et présentent la propriété de récepteurs-enzymes, les autres sont cytosoliques.

3.1.1 Les Tyrosine Kinases cytosoliques

Les TK cytosoliques se situent au niveau de la surface interne de la membrane plasmique. Il existe plusieurs familles de TK cytosoliques (Tableau 1), comme par exemple la famille Src (isolé pour la première fois du virus 'Rous Sarcoma'), Abl.... La famille Src comprend plusieurs protéines telles que c-Src, c-Yes, Fyn.... Ces protéines sont activées par les facteurs de croissance par l'intermédiaire d'une association entre la protéine Src et les récepteurs aux facteurs de croissance. Cette association se fait via le domaine SH2 (Src Homology-2, domaine qui reconnaît de manière spécifique des séquences particulières contenant des tyrosines phosphorylées, découvert pour la première fois dans le produit du gène v-Src) de Src et les Tyr phosphorylées présentent sur la partie C-terminale du récepteur. Ces protéines sont nécessaires pour la réponse mitogénique induite par la plupart des facteurs de croissance. Elles phosphorylent les récepteurs à l'EGF, PDGF..., d'autres TK cytoplasmiques (Abl...), des protéines de signalisation (PI3K...) ou encore des protéines associées au cytosquelette, au niveau d'une séquence consensus : EEEIYG/EEFD. Elles sont régulées négativement par la phosphorylation du résidu Tyr527 en partie C-terminale ce qui entraîne un repliement de cette partie sur le domaine SH2.

Les récepteurs aux cytokines (interleukines, interférons...) sont très souvent associés aux protéines kinases cytosoliques telles que la Janus kinase (Jak). La TK Jak s'associe au récepteur et le phosphoryle sur des Tyr bien particulières qui sont alors reconnues par des facteurs de transcription (STAT) via des domaines SH2. La phosphorylation de ces FT les active et entraîne leur migration vers le noyau où ils vont activer l'expression génique.

Les TK cytosoliques interviennent dans différents processus cellulaires tels que la différenciation, la division cellulaire, la synthèse d'ADN, la migration cellulaire, activation lymphocytaire... c'est pourquoi leur dérèglement (surexpression par exemple) conduit à des maladies prolifératives telles que des cancers, des leucémies⁹, des maladies auto-immunes...¹⁰

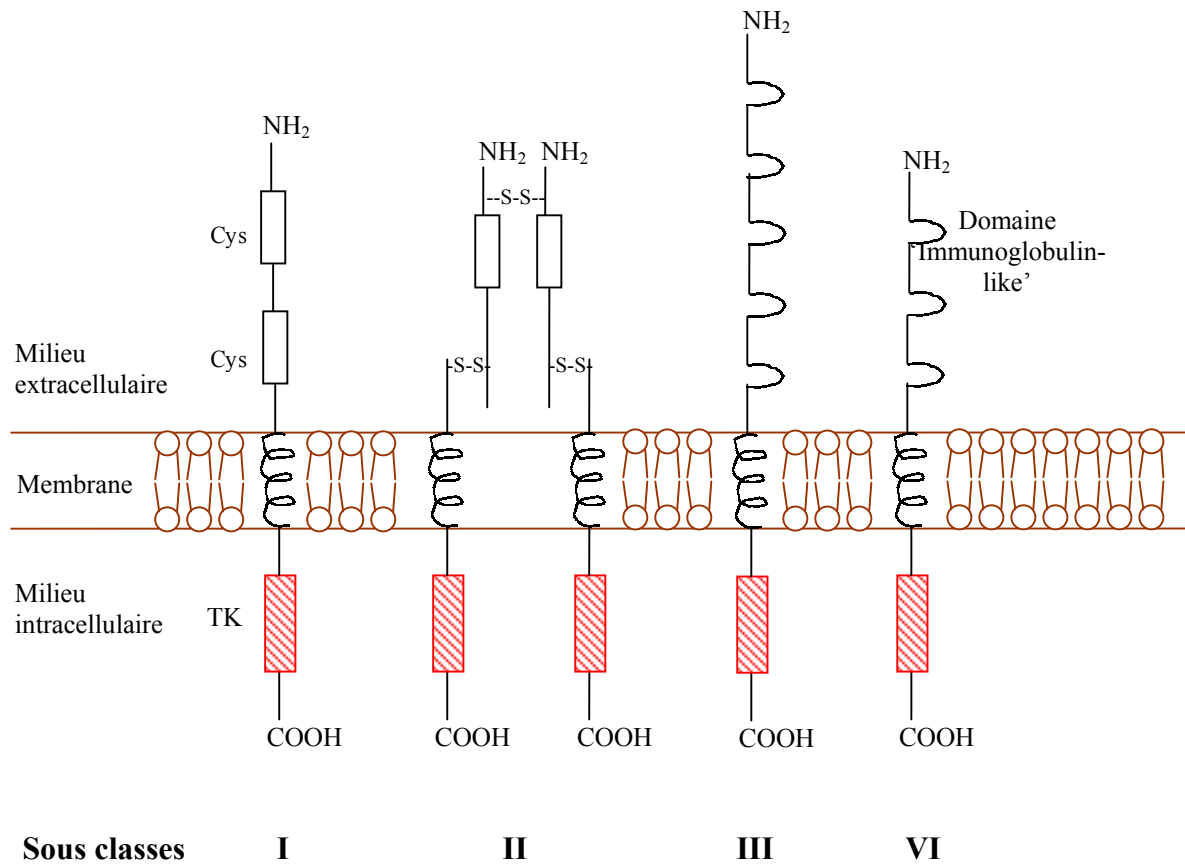


Figure 2 : Représentation schématique des différentes sous classes de RTK

3.1.2 Les Tyrosine Kinases membranaires ou récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK)

Ces récepteurs membranaires possèdent une activité TK intrinsèque stimulée par la liaison d'un ligand. Cette activité TK provoque une autophosphorylation du récepteur ainsi qu'une phosphorylation d'autres protéines cellulaires au niveau d'un résidu Tyr. Tous les récepteurs de cette famille sont caractérisés par un domaine extracellulaire qui comporte le site de liaison du médiateur, par la présence d'un unique segment transmembranaire par chaîne polypeptidique et par une extrémité cytoplasmique portant l'activité enzymatique. En général pour les RTK (sauf pour le récepteur de l'insuline), il semblerait que la liaison du ligand agoniste induise une dimérisation du récepteur. Cette dimérisation conduirait à un changement conformationnel qui stimulerait l'activité TK de la partie intracellulaire du récepteur et entraînerait donc l'autophosphorylation du récepteur (qui permettrait son couplage à divers effecteurs) et une phosphorylation de nombreuses protéines cytoplasmiques qui modifierait le métabolisme cellulaire.

Cette famille comprend les récepteurs de nombreux facteurs de croissance cellulaire protéiniques (le facteur de croissance de l'épiderme l'EGF, le facteur de croissance des plaquettes le PDGF, le facteur de croissance des fibroblastes le FGF...) et le récepteur de l'insuline (Figure 2).

3.1.2.1 Le récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline (Rins) a été un des premiers récepteurs à être solubilisé et purifié. Sa structure a été définie en 1980. Il comprend 4 sous unités : 2 sous unités α et 2 sous unités β . Ce récepteur appartient à la sous classe II des RTK.¹¹ Les sous unités α sont extracellulaires et possèdent des segments riches en cystéines. Des ponts disulfures relient les 2 chaînes α entre elles et les chaînes α aux chaînes β . Les sous unités β sont transmembranaires, elles portent le site enzymatique TK. Le site de liaison de l'insuline se situe sur les chaînes α du récepteur et chaque chaîne peut lier une molécule d'insuline. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne un changement de configuration de celui-ci, ce qui conduit à son autophosphorylation sur plusieurs résidus Tyr (notamment les Tyr jumelles 1162 et 1163) situés dans le domaine TK, mais aussi à la phosphorylation d'autres protéines cytosoliques.¹²

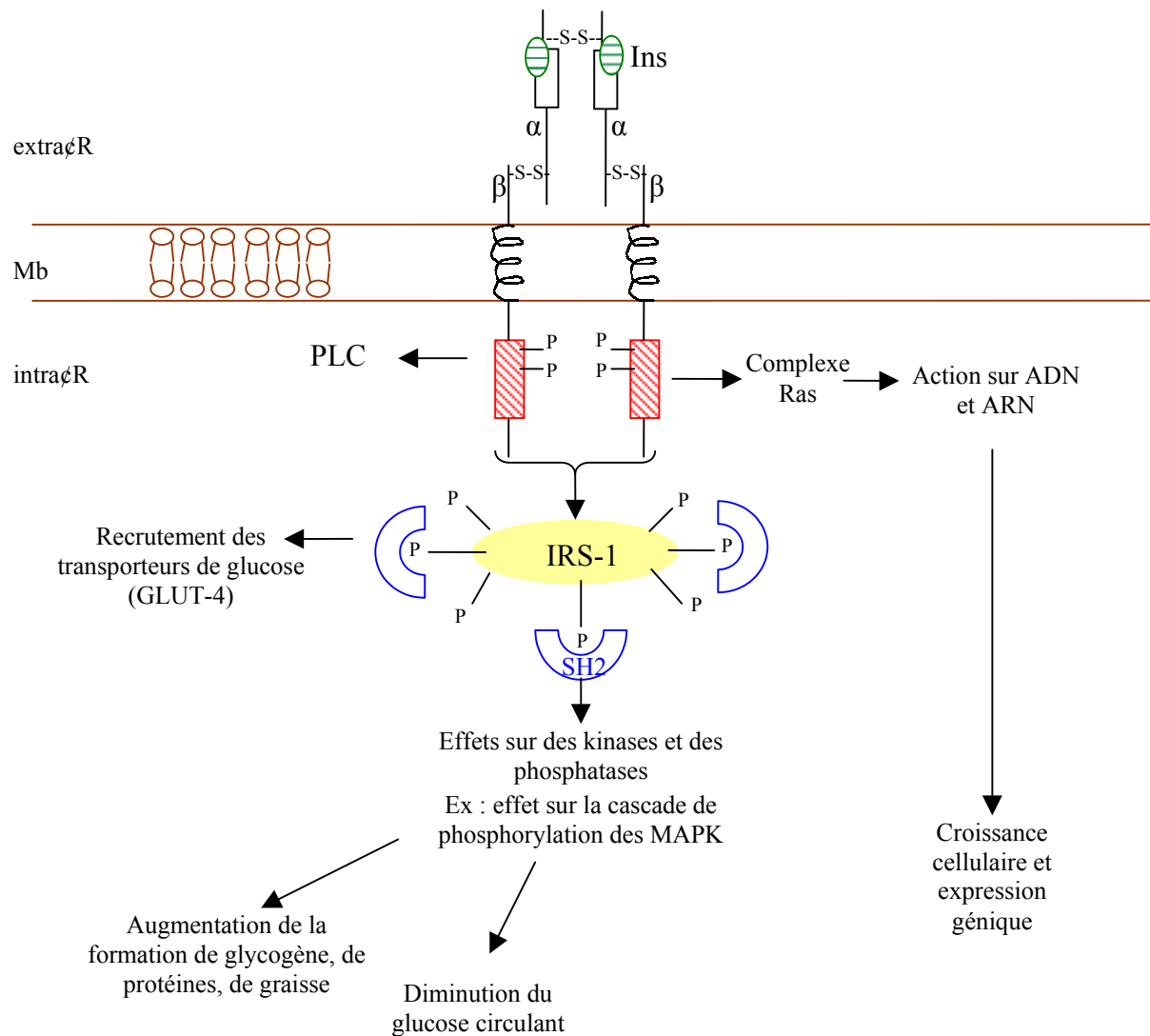


Figure 3 : Voies de signalisation de l'insuline. (Ins = insuline, IRS = insulín receptor substrate)

Les mécanismes de transduction du signal reliant la liaison Ins-R aux effets biologiques de l'insuline sont très complexes (Figure 3). On recense deux types d'action de l'insuline, les actions rapides (qui ont lieu de quelques secondes à quelques min après la liaison de l'insuline) : changements de flux ioniques, stimulation du transport du glucose (par translocation de GLUT 4), stimulation du renouvellement des phospholipides, activation ou inactivation d'enzymes clé impliquées dans les métabolismes glucidique et lipidique ; les actions lentes : transport des aminoacides, stimulation des synthèses lipidique et protéique, stimulation des synthèses d'ARN et d'ADN. Les actions métaboliques rapides font intervenir des kinases et des phosphatases activées par l'activité TK du Rins. Ces protéines vont modifier les cascades de phosphorylation d'enzymes clé, telles que les MAPK (traitées au paragraphe suivant). Les protéines-substrat du Rins (IRS) sont rapidement phosphorylées après la liaison de l'insuline ou de l'« insulin-like growth factor-1 » (IGF-1). La protéine-substrat la mieux caractérisée est l'IRS-1¹³ qui contient 22 Tyr qui peuvent être phosphorylées et être reconnues par de nombreuses protéines ayant un domaine SH2, il active ainsi différentes voies de signalisation (Figure 3). Les effets plus lents de l'insuline sont dus en partie à un complexe de signalisation faisant intervenir la protéine Ras¹⁴ (protéine GTP-like qui régule les cycles et la croissance cellulaires) qui initie une cascade de phosphorylation activant la voie des MAPK. Ceci conduit à l'activation des facteurs de transcription nucléaires et à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire.

3.1.2.2 Les récepteurs des facteurs de croissance (GFR)

Le rôle principal des facteurs de croissance (GF) est de stimuler la transcription de gènes particuliers. Ce sont de petites protéines qui jouent un rôle important dans la communication entre les cellules ou les organes. Ils contrôlent les multiples étapes du développement embryonnaire, de la différenciation des tissus, de leur fonctionnement normal. Ils peuvent stimuler ou inhiber la prolifération cellulaire ou encore provoquer des effets indépendants de cette prolifération (EGF inhibe la sécrétion de la lipase gastrique).

Les récepteurs des GF regroupent l'EGFR ou 'Epidermal Growth Factor Receptor', le PDGFR ou 'Platelet Derived Growth Factor R', l'IGF-IR ou 'Insulin-like Growth Factor R', le FGFR ou 'Fibroblast Growth Factor R', le TGF ou 'Transforming Growth Factor R', le CSF-1R ou 'Colony Stimulating Factor-1 R')...(Tableau 2).

Familles	Protéines Kinases	cofacteurs	Protéine-cibles
Dpdtes des nucléotides cycliques	PKA	AMPc	Très nombreuses. Synapsines, Canaux Ca^{2+} , MLCK, Phospholipase A_2 , Phospholipase C...
	PKG	GMPc	ss-unité régulatrice de PKA, histone, protéine G
Dpdtes du Ca^{2+}	PKC	DAG, Ca^{2+} , PS, céramides...	Canaux K^+ , Phospholipase A_2 , Phospholipase C, récepteur-canal NMDA, IP_3R , RTK...
Dpdtes du couple $\text{Ca}^{2+}/\text{Cam}$	CaMKI	$\text{Ca}^{2+}/\text{Cam}$	Résidu Ser. Synapsines...
	CaMKII		Résidu Ser/Thr dans une séquence : Arg-X-X-Ser/Thr-Glu-Asp. Phospholambane, ATPase, protéines neuronales, facteur de transcription CREB
	CaMKIII		Résidu Thr. Facteur d'élongation EF-2
	MLCK		Résidu Ser. Chaînes légères de la myosine.
	GPhK		Résidu Ser 14 de la glycogène phosphorylase, phospholambane...
	DAPK		
Autres	CDKs	Sous-unité régulatrice cycline	ARN polymérase II, histone H1...
	Caséine-kinases I et II		Glycogène synthase, antigène T SV40, troponine T, caséine...
	MAPK		MAPKAP, c-Raf-1, MEK, c-Myc, c-Jun, c-Fos, EGFR, Phospholipase A_2 ...
	HPrK/P		HPr et Crh

Tableau 3 : Principales protéines Ser/Thr kinases et quelques exemples de leurs cibles

Les récepteurs des GF, après leur dimérisation s'autophosphorylent sur des résidus Tyr, ceci va permettre l'interaction de ces récepteurs avec des protéines cytosoliques possédant des domaines SH2.

L'activité TK de certains récepteurs des GF phosphoryle la PLC γ_1 ceci conduit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol trisphosphate (IP₃) qui entraîne une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et en diacylglycérol (DAG) qui va activer une protéine kinase C. D'autres GF active la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) impliquée dans le métabolisme des phosphoinositides.¹⁵ Une autre voie de transduction du signal met en jeu la protéine Ras comme dans le cas du Rins. Ici, le RTK interagit avec une protéine à domaine SH2, la Grb2, qui après phosphorylation va activer une protéine Ras. Cette voie aboutie à l'activation des MAPK qui conduisent à l'expression de gènes particuliers.¹⁶

Les GFR sont surexprimés dans de nombreux cancers,¹⁷ comme les tumeurs pancréatiques, le cancer du poumon, les glioblastomes... c'est le cas pour l'EGFR. Les PDGFR et FGFR sont très impliqués dans les resténoses (rétrécissement des artères à la suite d'une angioplastie)¹⁰ ainsi que dans de nombreux cancers (cancer du sein, de la prostate...).¹⁸

3.2 Les Sérine/Thréonine Kinases (S/TK)

Les Ser/Thr kinases phosphorylent le groupement hydroxyle de certains résidus sérines et/ou thréonines de protéine-substrats, cependant il n'y a pas de séquence cible commune. Le substrat à phosphoryler s'aligne avec la kinase par plusieurs aminoacides-clé (par des interactions ioniques, hydrophobes), de ce fait une kinase est, la plupart du temps, spécifique d'une famille de substrat et non pas d'un seul et unique substrat. L'activité des PK est régulée par différents messagers intracellulaires : l'AMPc, le GMPc, le diacylglycérol (DAG), le Ca²⁺ ou encore le couple Ca²⁺/calmoduline.

3.2.1 Les S/TK dépendantes des nucléotides cycliques

La protéine kinase A (PKA) est activée par l'AMPc et est majoritairement cytosolique. Elle présente une spécificité de substrat très large. Elle phosphoryle un résidu Ser, ou, moins souvent, un résidu Thr à l'intérieur de séquences préférentielles contenant presque toujours 2

ou 3 Arg. La PKA a des fonctions de régulation des voies métaboliques, elle permet la régulation des grands flux tels que la glycogénolyse, la glycolyse. Elle joue également un rôle dans l'organisation du cytosquelette et dans le contrôle de la traduction de l'ARN en protéine.¹⁹ Des travaux ont montré que l'expression de la PKA est augmentée dans de nombreux cancers et que son activation conduirait à l'inhibition de l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans un grand nombre de types cellulaires.²⁰

La PKG est activée par le GMPc. Elle phosphoryle un résidu Ser précédé de 2 à 3 Arg ou Lys. Elle est impliquée dans la régulation de la relaxation du muscle lisse, le métabolisme du sperme, la division cellulaire... Cette protéine kinase présente de grandes homologues avec la PKA.

3.2.2 Les protéines kinases C

Les PKC sont activables par le diacylglycérol (DAG, produit de l'action des phospholipases). Leurs substrats protéiniques sont extrêmement divers. Ils existe onze isoformes connues de PKC qui peuvent être réparties en trois groupes selon leurs cofacteurs et leur structure.²¹ Il existe les PKC classiques α , β et γ . Elles sont calcium-dépendantes et nécessitent la présence de phosphatidylsérine (lipide membranaire) et de DAG pour être actives ; les nouvelles PKC : δ , ϵ , η et σ qui ne sont activées que par le DAG ; et les PKC atypiques : ζ , μ et ι/λ qui ont pour cofacteurs les céramides et le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃). Les PKC sont présentes dans tous les tissus mais les isoformes ont des localisations distinctes. Elles interviennent principalement dans 3 domaines : la régulation de l'expression génique et de la prolifération cellulaire, l'organisation intracellulaire du cytosquelette et le processus de transmission et de contrôle de l'excitation cellulaire (contrôle de la sensibilité des récepteurs, mécanisme de transduction membranaire, contrôle des canaux ioniques...).¹⁹

Il a été observé une hyperactivité des PKC dans la pathologie d'Alzheimer et dans la production des lésions neuronales consécutives à une ischémie. Récemment des études ont montré que les isoenzymes classiques et atypiques sont associées à la survie cellulaire alors que les nouvelles PKC sont proapoptotiques.²⁰

3.2.3 Les protéines kinases dépendantes du couple Ca^{2+} /calmoduline

Les protéines kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes (CaM kinases) sont des enzymes présentes dans de nombreuses cellules dont l'activité est liée au calcium porté par la calmoduline. Elles sont impliquées dans des organes variés mais principalement dans les muscles striés où elles agissent en synergie avec la protéine kinase A (contraction). Elles participent principalement au métabolisme énergétique. Leurs substrats sont des enzymes du métabolisme du glycogène (glycogène synthase, phosphorylase kinase...), du métabolisme des catécholamines (tyrosine hydroxylase)... Il existe plusieurs Ser/Thr kinases dont l'activation dépend du couple Ca^{2+} /calmoduline des CaMK spécialisées comme la MLCK ou des CaMK multifonctionnelles comme la CaMKII (Tableau 3).

3.2.3.1 La "myosin light chain kinase" ou MLCK

La kinase des chaînes légères de la myosine se distingue par sa forte dépendance au calcium et par sa spécificité de substrat : un résidu Ser près de l'extrémité N-terminale des chaînes légères de la myosine. Elle est phosphorylable par la PKA ce qui entraîne une diminution de son affinité pour le couple Ca^{2+} /calmoduline et par la CaMKII. La MLCK joue un rôle important dans la régulation de la contraction des muscles lisses. Des études récentes ont mis en évidence son implication dans les infections pulmonaires (lung injury).²²

3.2.3.2 La CaMKII

La CaMKII est présente dans de nombreux tissus mais elle est surtout localisée dans le cerveau. C'est un effecteur bien connu des voies de signalisation lié au calcium. La CaMKII active est une holoenzyme multimérique composée de 12 sous-unités comprenant les isoformes α , β , γ , δ associées différemment selon leur proportion dans la cellule.²³

La CaMKII phosphoryle un grand nombre de substrat, ainsi elle est impliquée dans de nombreux processus tels que la sécrétion de neurotransmetteurs, la régulation de facteurs de transcription, la régulation du métabolisme des lipides, des aminoacides, des sucres, l'organisation du cytosquelette...mais également dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire. Il semblerait que la CaMKII soit également impliquée dans les phénomènes d'inflammation neuronale rencontrés dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.²⁴

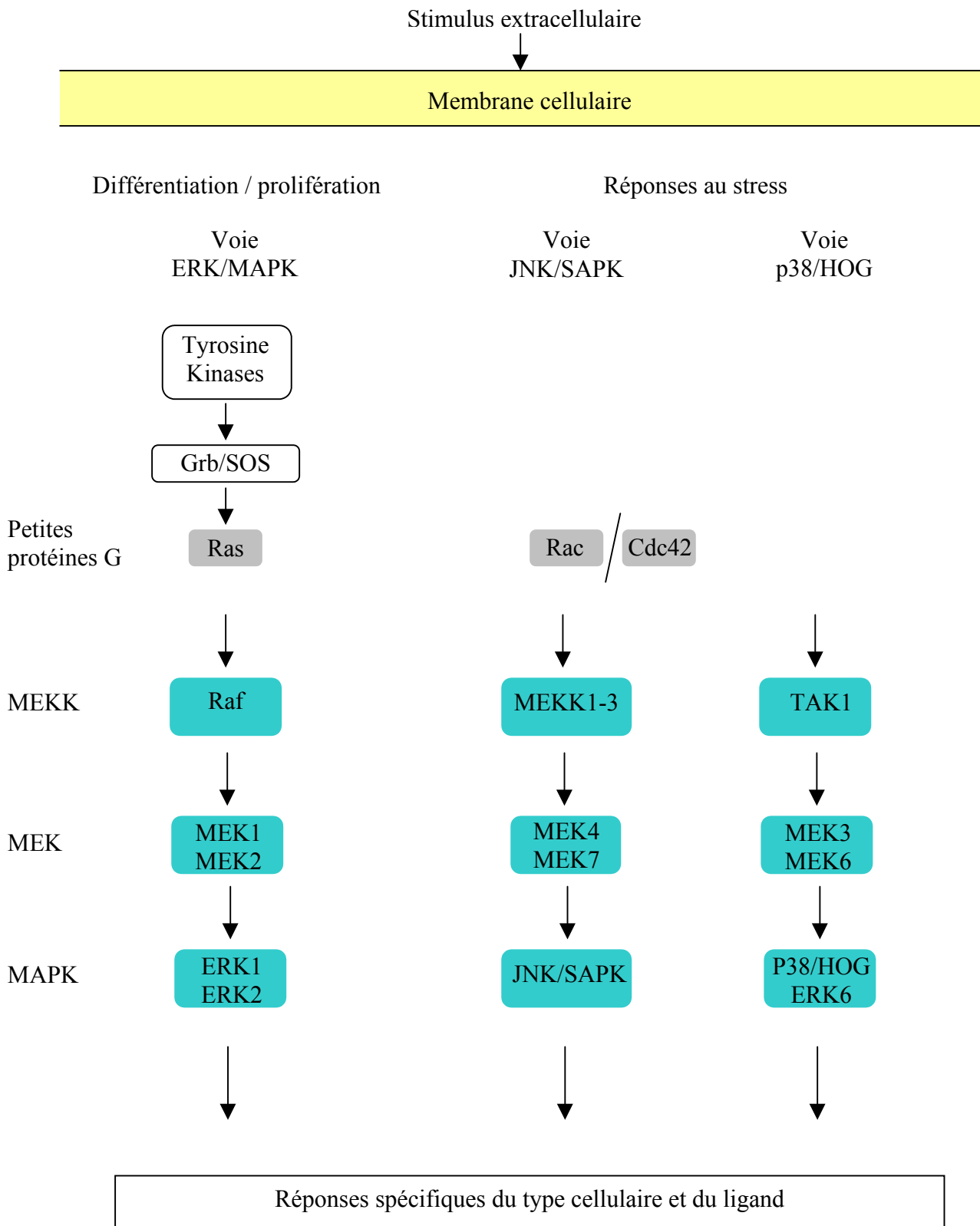


Figure 4 : Schéma simplifié des différentes cascades de signalisation des MAPKs activées par un signal extracellulaire.

3.2.3.3 La "death-associated protein kinase" ou DAPK

La DAPK est une nouvelle CaMK²⁵ impliquée dans l'apoptose, la suppression de tumeurs, la mort cellulaire neuronale induite par une ischémie... Elle possède plusieurs domaines : des P-loops, des motifs de liaison au cytosquelette, un "death domain" et un domaine catalytique qui possède de grandes homologies de séquence avec la MLCK.²⁶

Les substrats physiologiques de la DAPK n'ont pas encore été identifiés cependant il a été montré que la DAPK serait impliquée dans la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine-II.²⁷

3.2.4 Autres Ser/Thr protéines kinases

3.2.4.1 Les protéines kinases dépendantes de la cycline (CDKs)

Les CDKs sont des Ser/Thr kinases qui sont activées quand elles sont associées à leur sous unités régulatrices respectives appelées cyclines. Elles sont impliquées dans la progression des différentes phases du cycle de division cellulaire (phases G₁, Synthèse ADN, G₂ et Mitose) en phosphorylant des facteurs de transcription, des protéines "anti-tumeurs" et d'autres protéines importantes de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire. Les CDKs sont impliquées dans d'autres processus cellulaires tels que la régulation de la transcription, la différenciation cellulaire et la mort cellulaire.²⁸ La CDK1 (ou cdc2) associée à la cycline B est impliquée dans le passage de la phase G₂ à la phase de mitose, la CDK2/cycline A est impliquée dans la phase de synthèse de l'ADN. CDK7/cycline H et CDK9/cycline T activent l'élongation de l'ARN en phosphorylant l'ARN polymérase II. Il a été montré récemment que les CDKs sont nécessaires pour la réplication des virus capables de se répliquer dans des cellules qui ne sont pas en division (HIV-1, virus simple de l'herpès type 1 et 2 HSV-1 et HSV-2).

Ces kinases représentent une classe majeure de cibles pour la découverte de médicaments pour les maladies prolifératives comme le cancer mais également pour la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires...

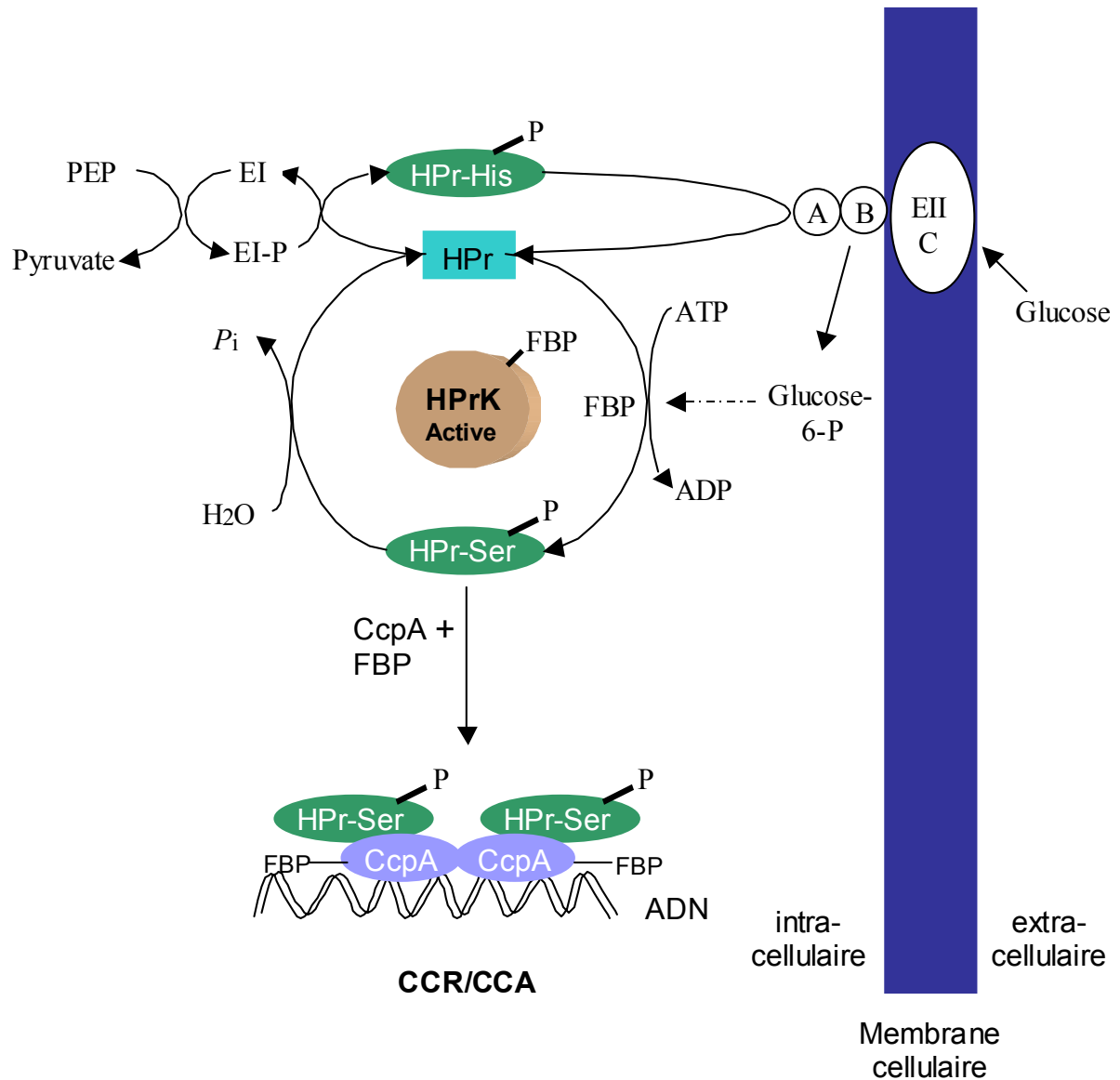


Figure 5 : Représentation schématisée du système de transfert de phosphate de PEP au sucre PTS et des mécanismes de répression et d'activation catabolique (CCR et CCA) chez les bactéries Gram-positives en présence de glucose

3.2.4.2 Les "Mitogen-Activated Protein Kinases" ou MAPK

Les MAPKs sont impliquées dans la régulation d'un grand nombre de réponse cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Elles jouent un rôle très important dans la transduction du signal chez les eucaryotes. Il existe au moins 3 voies de transduction du signal impliquant les MAPKs chez les mammifères qui sont organisés en modules de trois kinases, les MAPK, les MAPK kinases ou MEK et les MAPK kinase kinases ou MEK kinases ou MEKK (c-Raf-1, Ste II, c-Mos...).²⁹ Les 3 voies de transduction sont nommées d'après la MAPK qui leur est associée. Il existe une voie impliquant les kinases régulées par un signal extracellulaire ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), une autre impliquant les kinases activées par le stress et les kinases de la partie N-terminale de c-Jun (JNK/SAPK) et une dernière voie impliquant les kinases p38 (Figure 4).

Les MAPKs phosphorylent une grande variété de substrats tels que des protéines kinases et des facteurs de transcription.³⁰ Les MEKK phosphorylent les MEK sur des résidus Ser et Thr, les MEK ont une double spécificité et phosphorylent les MAPK sur des résidus Thr et Tyr. Les ERK1 et ERK2 ainsi que leurs activateurs MEK1 et MEK2 sont stimulés par les facteurs de transcription et de croissance (EGF, PDGF, NGF) via les RTK, les récepteurs couplés aux protéines G ou les récepteurs aux cytokines.¹ Les JNKs et les kinases p38 sont impliquées dans les réponses au stress cellulaire, dans l'inflammation et dans l'apoptose.²⁰

3.3 Une nouvelle protéine kinase bactérienne: L'Histidin-containing Protein Kinase/ Phosphatase ou l'HPrK/P

Les bactéries Gram-positives sont des microorganismes qui possèdent une membrane plasmique entourée d'un peptidoglycane mais qui ne possèdent pas de membrane externe comme les bactéries Gram-négatives, c'est pourquoi elles sont souvent plus sensibles aux antibiotiques. Elles peuvent être divisées en 2 groupes : les bactéries qui ont un taux élevé de guanine G et de cytosine C (70 %) dans leur ADN (*Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces*...) et les bactéries qui ont un taux plus bas de GC (30-40 %) dans leur ADN (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*...). Les *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* peuvent provoquer des infections des yeux, des poumons, des endocardites etc...

L'HPr (histidine containing protein) kinase fait partie d'une nouvelle famille de sérine kinases dépendantes de l'ATP que l'on trouve essentiellement chez les bactéries Gram positif.^{31,32} C'est une enzyme-clé de la répression catabolique chez les bactéries à Gram positif.^{33,34} Elle catalyse la phosphorylation ATP-dépendante de la Ser 46 d'HPr, une des protéine de la chaîne de transfert de phosphate du système PTS. L'analyse de la séquence des HPrK montre qu'elles ne possèdent pas les motifs fortement conservés qui caractérisent les Ser/Thr kinases eucaryotes. En revanche, elles possèdent un motif A de Walker (G/AxxxxGKT/S), formant une boucle caractéristique de la plupart des protéines liant l'ATP ou le GTP appelée le P-loop. Ce motif est caractéristique de la famille des protéines à P-loop (nucléotides kinases, protéines G, ATPases, etc.), c'est pourquoi les HPrK forment une nouvelle classe de protéine kinases.³⁵ L'HprK de *Bacillus subtilis* est activée par les intermédiaires de la glycolyse tels que le fructose-1,6-bisphosphate (FBP), qui favoriseraient une forme trimérique de la protéine associée à l'activité kinase. En l'absence de glucose et de tout autre sucre, les concentrations en ATP et en FBP diminuent alors que la concentration en Pi augmente. Dans ces conditions, l'HPrK/P semble être sous forme hexamérique, et l'activité kinase est presque totalement inhibée. On observe alors la déphosphorylation de HPr(Ser-P). L'enzyme de *Bacillus subtilis* est une enzyme bi-fonctionnelle qui présente une activité kinase dominante quand la bactérie se trouve dans un milieu riche en source de carbone alors que l'activité phosphatase est dominante en période de privation.

Chez *Bacillus subtilis* l'HPrK/P a pour substrats deux protéines appelées HPr (88 acides aminés) et Crh (catabolite répression Hpr, 85 aa). Ces deux protéines, qui présentent des séquences peptidiques très similaires, sont phosphorylées sur le résidu sérine 46 situé à l'intérieur d'une petite séquence conservée dans les deux protéines cibles³⁶ : ---KSIMG---

La protéine HPr a été identifiée dans plusieurs espèces bactériennes et la séquence protéique de ces protéines présente un haut degré de conservation autour de ces deux sites de phosphorylation : la Ser-46 et l'His-15.

L'HPr est impliquée dans le système de transfert de phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) vers les sucres, le PTS (Figure 5).³⁷ Ce système permet de faire entrer des éléments nutritifs à l'intérieur de la cellule. Il catalyse la phosphorylation et le transport concomitant des sucres à travers la membrane cellulaire. Le groupement phosphate provenant du PEP est transféré par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques : l'enzyme I (EI) et l'HPr puis via des protéines spécifiques des sucres liées à la membrane : les enzymes II (EIIs, avec 3 domaines

A, B et C) qui phosphoryle les sucres entrants. Dans ce système PTS, le groupement phosphate du PEP est transféré sur le résidu histidyle 15 de l'HPr.

L'HPr est phosphorylée sur la Ser-46 par l'HPrK dans les bactéries Gram-positives. Cette phosphorylation est impliquée dans le mécanisme principal de répression catabolique (carbon catabolite repression CCR) qui permet à la cellule d'utiliser les différentes sources de carbone de manière hiérarchisée.³⁸ Le CCR est un mécanisme par lequel l'expression de certains gènes cataboliques est réprimée en présence de source de carbone rapidement métabolisable telle que le glucose de façon à accélérer la croissance. Les enzymes nécessaires pour l'utilisation des sucres sont exprimées si, premièrement, le sucre est présent et deuxièmement si aucune source de carbone préférable n'est disponible.

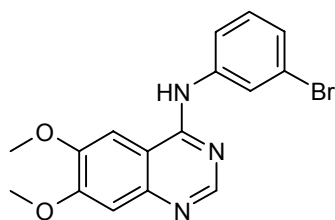
La phosphorylation du résidu Ser-46 de la protéine Crh par l'HPrK est également impliquée dans le mécanisme de répression catabolique chez *Bacillus subtilis*.³⁹ La Crh ne possède pas de résidu His en position 15 mais un résidu Gln, son implication dans le système PTS n'a pas été démontrée.

Après phosphorylation de la Ser-46, HPr et Crh interagissent avec CcpA une protéine régulatrice de la transcription. Le complexe formé se lie alors avec l'ADN au niveau de séquences *cre* (catabolite responsive element) ce qui conduit à la répression ou à l'activation catabolique (CCR ou CCA, voir Figure 5).

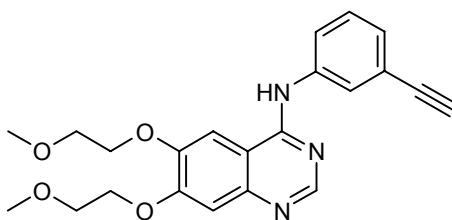
4. Les inhibiteurs de protéines kinases

Les protéines kinases jouent un rôle central dans la transduction du signal, elles régulent de nombreux aspects de la fonction cellulaire. Leur dysfonctionnement ou leur surexpression sont impliqués dans de nombreuses maladies, c'est pourquoi elles sont devenues des cibles particulièrement intéressantes pour la recherche de nouveaux agents thérapeutiques. Durant les deux dernières décennies, de nombreuses équipes de recherche se sont consacrées à l'identification et au développement d'inhibiteurs de kinases⁴⁰ et notamment aux inhibiteurs de Tyr kinases et de quelques Ser/Thr kinases.⁴¹

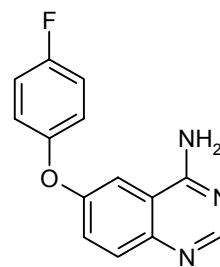
Dérivés de quinazoline



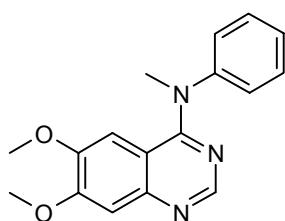
1
PD 153035/SU 5271



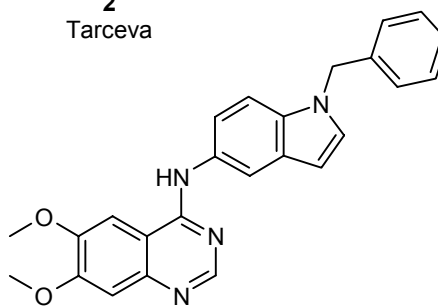
2
Tarceva



3

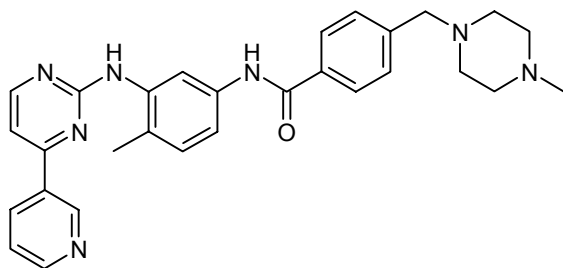


4
RPR-108514A

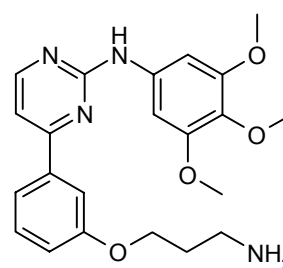


5

Dérivés de phénylamino-pyrimidine

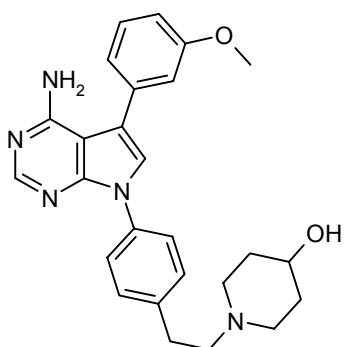


6
Gleevec

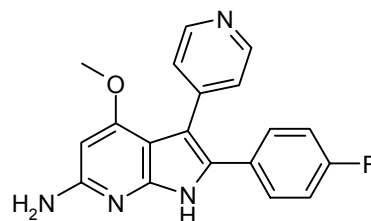


7

Dérivés de pyrrolopyrimidine et de pyrrolopyridine



8
CGP 77675



9
RWJ 68354

Figure 6 : Exemples d'inhibiteurs de Tyr et Ser/Thr kinases entrant en compétition avec l'ATP

4.1 Ligands compétitifs de l'ATP

La plupart des inhibiteurs de protéine kinases sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP qui présentent une structure chimique proche du noyau adénine. On trouve de nombreux composés hétérocycliques azotés tels que des quinazolines, des pyrimidines, des pyrrolopyrimidines, des pyrrolopyridines, des pyrazolopyrimidines, etc... (Figure 6). Parmi ces inhibiteurs compétitifs de l'ATP, nombreux sont ceux qui présentent une faible sélectivité du fait du haut degré de conservation du site de liaison à l'ATP à l'intérieur de la famille des protéine kinases. A titre d'exemple, Davies et coll.⁴² ont examiné la sélectivité de 28 produits commerciaux présentés comme des inhibiteurs relativement sélectifs de Ser/Thr kinase par rapport à d'autres protéines kinases. Les auteurs ont mis en évidence le manque de sélectivité de certains composés qui inhibent plusieurs protéines kinases parfois même mieux que leur cible présumée.

Bien que certains inhibiteurs compétitifs de l'ATP soient peu sélectifs, d'autres, au contraire, sont des inhibiteurs puissants et sélectifs^{4,43} comme par exemple l'Iressa (**1**, Figure 6) dérivé de quinazoline inhibant l'activité TK du récepteur à l'EGF avec une IC_{50} de 23-79 nM. Ce composé est utilisé dans le traitement du cancer des poumons. Un autre dérivé de quinazoline, le Tarceva (**2**), également inhibiteur de l'EGFR est actuellement en phase clinique III pour le traitement de cancers. Les dérivés de quinoxaline ont également été reportés comme inhibiteurs de Raf kinase (composé **3**), de CSF-1R (**4**) ou de erbB-2 (**5**) par exemple. Dans la classe des phenylamino-pyrimidines, le Gleevec (composé **6**) est un exemple représentatif. C'est un inhibiteur de la protéine kinase Abl ($IC_{50} = 38$ nM) utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (CML).⁴ Il présente une grande sélectivité par rapport à de nombreuses Tyr et Ser/Thr kinases cependant il inhibe avec la même efficacité le récepteur du PDGF et le récepteur c-Kit.⁴¹ Les domaines portant l'activité kinase des protéines Lck, Fyn, Csk, EGFR et PKC sont inhibés par des 2-anilinopyrimidines telles que le composé **7** qui inhibe la PKC avec une IC_{50} de 22 nM.⁴³

Le CGP 77675 (**8**) est un dérivé de pyrrolo[3,2-d]pyrimidine qui inhibe la phosphorylation de protéines par la kinase c-Src avec une grande sélectivité. Un dérivé de pyrrolo[2,3-b]pyridine a été identifié comme inhibiteur puissant de la kinase p38, le RWJ 68354 (**9**).

22

La série chimique des indolin-2-ones substituées en 3 a été caractérisée comme une nouvelle classe d'inhibiteurs de récepteurs à activité TK tels que le VEGFR, le FGFR, l'EGFR, le PDGFR. A titre d'exemple, le composé SU 5416 (**10**) est un inhibiteur puissant et sélectif de KDR/flk-1 avec une IC_{50} de 1 μ M qui est actuellement en développement clinique pour le traitement de cancers. Le SKF-86002 (**11**), dérivé de pyridinylimidazole, fait partie d'une nouvelle classe d'anti-inflammatoires qui inhibent la kinase p38.

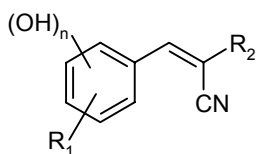
Les analogues de purines ont été caractérisés comme inhibiteurs de protéines kinases, en particulier les Ser/Thr kinases. L'olomoucine (**12**) et la roscovitine (**13**) sont des inhibiteurs modéré de Cdk1, Cdk2 et Cdk5, cibles pour le traitement de nombreux cancers.²⁸ Le purvalanol B (**14**) est un inhibiteur puissant et sélectif de Cdk2 (IC_{50} = 6nM).

Il existe de nombreuses autres classes d'inhibiteurs de protéine kinases. On peut encore citer le balanol (**15**) qui est un composé naturel inhibant des Ser/Thr kinases spécifiques (la plupart étant des PKC) et qui est inactif vis à vis des Tyr kinases. Le flavopiridol (**16**) est un flavonoïde qui inhibe la plupart des kinases dépendantes des cyclines (Cdk1, 2...), et qui stoppe la croissance de nombreuses lignées cellulaires tumorales. Il pourrait également jouer un rôle dans le traitement du virus HIV.⁴ Les dérivés de la staurosporine (alcaloïde microbien inhibiteur puissant mais non spécifique des protéines kinases) sont des inhibiteurs puissants et plus sélectifs que la staurosporine. Le PKC 412 (**17**) par exemple, inhibiteur de PKC (IC_{50} de 50 nM), montre une activité antitumorale à la fois *in vitro* et *in vivo*. Il est entré en essais cliniques pour le traitement de leucémies lymphoïdes chroniques.

Les dérivés de phtalazine ont été décrits comme inhibiteurs des récepteurs TK du VEGF et du PDGF. Une série de composés de cette classe inhibe, *in vivo*, la croissance de carcinomes humains ainsi que la microvascularisation. Comme par exemple, le composé PTK 787 (**18**).¹⁰ Dans la série des pyrazoles on trouve le composé BIRB796 (**19**), une diarylurée qui inhibe la MAPK p38, cible pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes. Ce composé est actuellement en essai clinique pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn.⁴

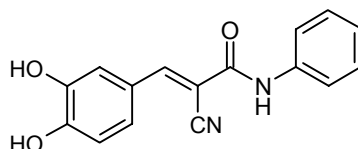
Il existe de nombreux inhibiteurs de kinases mimant la structure de l'ATP et peu d'entre eux sont sélectifs. De plus ces inhibiteurs doivent entrer en compétition, dans les cellules, avec des concentrations millimolaires d'ATP. Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP sont testés sur un nombre limité de Tyr et Ser/Thr kinases, ainsi ils sont souvent abandonnés lors des essais cliniques à cause de leur toxicité.⁴¹

Tyrphostines



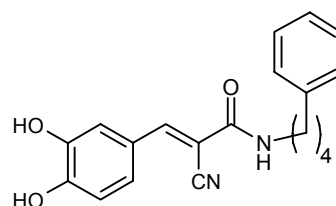
20

Benzylidène malonitriles



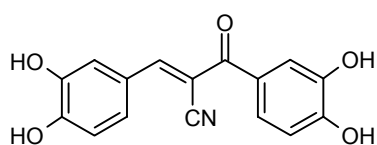
21

AG 490



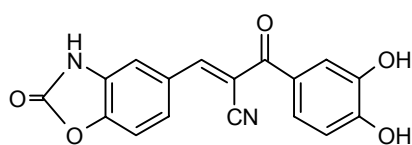
22

AG 556



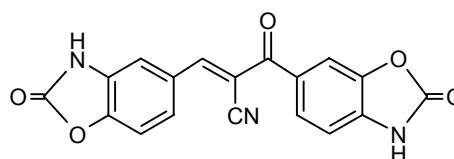
23

AG 538
IC₅₀ = 60 nM



24

IC₅₀ = 430 nM



25

IC₅₀ = 1370 nM

Inhibiteurs peptidiques

PKA : GRTGRRNAI

26

Rins : RRLEEEEEEA-(D-F₄-Tyr)-G

27

EGFR : KHKKLAEGSA-(3-IodoTyr)-EEV LAEGSA-(L-F₄-Tyr)-EE LAEGSA-(D-F₄-Tyr)-EE

28

29

30

Src : YI-(2')NaI-GSFKKKK

31

IC₅₀ = 1 μM

YI-(p-Cl)Tyr-GSFK

32

IC₅₀ = 363 μM

GI-(2')NaI-WHH-(2')NaI

33

IC₅₀ = 4,2 μM

EEI-(2')NaI-GEFF

34

IC₅₀ = 140 μM

Figure 8 : Exemples d'inhibiteurs de kinases compétitifs du substrat

4.2 Ligands compétitifs du substrat

Les inhibiteurs entrant en compétition avec le substrat endogène de la kinase sont moins toxiques puisqu'ils se lient à des domaines bien moins conservés que le domaine de liaison de l'ATP et donc interagissent moins avec d'autres protéines.

Les premiers inhibiteurs sélectifs de Tyr kinases découverts font partie de la famille des tyrphostines. Ces dérivés de benzyldènemalonitrile (Figure 8) bloquent efficacement l'EGFR. Ce sont des inhibiteurs entrant en compétition avec le substrat.⁴¹ D'autres tyrphostines ont été décrites telles que le composé AG 490 (**21**) qui bloque la protéine Jak-2 ou le composé AG 556 (**22**) qui possède des propriétés anti-inflammatoires. Ces composés possèdent un motif catéchol mimant le groupement phénolique de la Tyr. Ce motif porte des groupements hydroxyles qui ne sont pas très stables métaboliquement. A partir du composé AG 538 (**23**) qui est un inhibiteur compétitif de IGF1-R ($IC_{50} = 60$ nM), des inhibiteurs mimant le substrat ont été développés en remplaçant les hydroxyles par des fonction isostères (**24** et **25**).⁴⁴ Ces composés conservent leur capacité à entrer en compétition avec le substrat mais perdent en efficacité (Figure 8).

D'une manière générale, la plupart des inhibiteurs compétitifs du substrat sont des peptides basés sur la séquence peptidique du substrat ou d'un pseudosubstrat dans lesquels le résidu phosphorylable est remplacé par un autre acide aminé non phosphorylable comme l'alanine (dans le cas des Ser kinases) ou encore des dérivés de tyrosine (1- ou 2-naphtylalanine, p-fluoro-, p-guanidino-, p-chlorophénylalanine, D-tyrosine, 3-iodotyrosine, tétrafluorotyrosine..., dans le cas des Tyr kinases).^{45,46} De nombreux inhibiteurs de ce type ont été synthétisés et, pour certains d'entre eux, une très bonne affinité de l'inhibiteur pour la kinase a été déterminée (K_i de l'ordre du nanomolaire).⁴⁶ Pour la protéine kinase A par exemple, de nombreux inhibiteurs basés sur la structure du substrat ont été préparés.⁴⁷ Les peptides les plus puissants sont souvent longs (~17 aminoacides). Le plus petit et le plus puissant d'entre eux est un nonapeptide (composé **26**, Figure 8) avec un K_i de 0,036 μ M. Des peptides dérivés de la gastrine contenant un résidu tétrafluorotyrosine ont été décrits comme inhibiteurs de l'activité TK du récepteur de l'insuline,⁴⁸ le composé **27** représenté dans la Figure 8 est un compétiteur du substrat et présente un K_i de 20 μ M. Les trois peptides **28-30** dérivés du site de phosphorylation de la phospholipase C- γ 1 ont été décrits comme inhibiteurs de l'activité TK du récepteur à l'EGF.⁴⁹ L'affinité de ces composés pour l'enzyme varie selon le

groupement présent sur la tyrosine (**28** : $K_i = 622 \mu\text{M}$, **29** : $K_i = 67 \mu\text{M}$, **30** : $K_i = 18 \mu\text{M}$). De nombreux travaux, résumés par Al-Obeidi,⁴⁶ ont été consacrés au développement d'inhibiteurs de la protéine Src basés sur la structure de pseudosubstrats. La puissance d'inhibition de ces composés dépend du peptide parent (YIYGSFK, GIYWHHY, EEIYGEFF, EFEYAFF...) dont ils sont issus et de l'analogue de tyrosine utilisé (naphtylalanine (Nal), iodotyrosine, diiodotyrosine ...). Quelques exemples sont reportés dans la Figure 8 (composés **31** à **34**).

Les inhibiteurs peptidiques souffrent malheureusement de nombreuses limitations telles qu'une faible biodisponibilité par voie orale (mauvaise absorption), un faible stabilité métabolique face aux peptidases et protéases présentent au niveau gastro-intestinal. Cependant ils constituent de bons chefs de file pour la découverte d'inhibiteurs entrant en compétition avec le substrat et ils restent des outils inestimables pour les études du mécanisme d'action des enzymes.

B- Introduction et objectifs des travaux de recherche

Les protéine kinases représentent une des plus grande familles d'enzymes impliquées dans la transduction du signal intracellulaire ou encore dans sa régulation. Leur dysfonctionnement est à l'origine de nombreux cancers et autres pathologies, d'où l'intérêt d'obtenir des ligands sélectifs et puissants capables de moduler l'action de ces kinases dans un but thérapeutique ou dans un but plus fondamental (outil pharmacologique). De plus, le décryptage du génome humain a mis au jour de nouvelles kinases dont la fonction physiologique est encore mal définie. Pour comprendre cette fonction et l'implication pathologique de ces nouvelles protéines, il est nécessaire d'accéder aux premiers inhibiteurs avec un certain profil d'activité et donc de tester rapidement ces nouvelles kinases avec de nombreux composés. Une stratégie a été développée au sein du Pharmacopole d'Illkirch où des bibliothèques de protéine-cibles (récepteurs, enzymes) ont été constituées et sur lesquelles des chimiothèques de molécules (produits synthétisés dans les différents laboratoires) ont été criblées de manière systématique.

Le premier objectif du travail de recherche qui m'a été confié dans le cadre de cette thèse, s'articule principalement autour d'une cible pharmacologique originale, l'Histidin-

containing Protein (HPr) kinase/phosphatase. Comme l'HPrK/P est présente uniquement chez les procaryotes et que l'inactivation de cette enzyme chez *B. subtilis*, *Staphylococcus xylosus* et *Lactobacillus casei* provoque d'importants problèmes de croissance, des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme pourraient être à la base d'une nouvelle famille d'antibiotiques qui affaiblirait la bactérie et permettrait au système immunitaire de l'organisme infecté d'être plus efficace. La première partie de mon travail de thèse concerne la synthèse et l'identification d'inhibiteurs de l'enzyme bifonctionnelle HPrK/P de *B. subtilis*. Une première approche rationnelle a conduit à la synthèse de petits peptides basés sur la structure du ligand peptidique endogène, l'HPr. L'inhibition observée par ces petits peptides n'étant pas vraiment significative, une autre approche a été envisagée consistant à faire de l'optimisation structurale au départ d'un composé chef de file issu d'un criblage systématique de chimiothèques, et cela à haut débit. Le criblage a ainsi permis d'identifier un composé chef de file (bis-benzimidazole). A partir de ce composé bis-cationique dérivé de benzimidazole, nous avons effectué des variations structurales en différents points de la molécule afin de déterminer les requis structuraux nécessaires à l'obtention d'un inhibiteur intéressant.

Dans un deuxième temps notre attention s'est portée sur une autre kinase, la CaMKII pour laquelle une touche a été mise en évidence par le criblage systématique de la chimiothèque patrimoine. Un dérivé d'aminopyridazine a été identifié comme chef de file. Dans un objectif d'optimisation structurale de ce composé, une voie de synthèse a été envisagée afin d'introduire de la diversité en position 4 de cet hétérocycle.

Couplés à un groupement fluorescent, l'ensemble de ces inhibiteurs potentiels devrait permettre de mieux caractériser l'activité enzymatique des ces kinases et pourraient être utiles dans le criblage de chimiothèques. Dans le cadre de notre travail nous avons cherché à obtenir un petit fluorophore ayant des propriétés de fluorescence proches de celles de la "Green Fluorescent Protein". La GFP présente des propriétés de fluorescence intéressantes (absorption maximale à 395 et 475 nm ; émission maximale à 508nm), mais sa taille (238 aa, 27 kDa) constitue une limitation de son utilisation pour la greffer à un petit ligand peptidique ou hétérocyclique. Le mimétisme structural du chromophore et sa stabilisation pourraient conduire à un fluorophore très intéressant qui permettrait d'envisager le remplacement des radio-ligands dans les tests de criblage par des ligands fluorescents. La deuxième partie de mon travail de thèse repose sur l'étude et le développement de séries hétérocycliques fluorescentes proches du chromophore de la GFP.

Ces travaux présentaient un double intérêt, pharmacochimique d'une part, par la conception de nouveaux inhibiteurs de protéine kinases et synthétique d'autre part, par le développement de nouvelles voies synthétiques dans le domaine plus spécifique de la chimie hétérocyclique.

Bibliographie du Chapitre I

- ¹ Hunter T. Protein Kinases and Phosphatases: The Ying and Yang of Protein Phosphorylation and Signalling. *Cell*, **1995**, 80, 225-236.
- ² Krebs E., Fischer E.H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1956**, 20, 150-157.
- ³ Wang J.Y., Koshland D.E.J. Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 7605-7608.
- ⁴ Noble M. E. M., Endicott J. A., Johnson L. N. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science*, **2004**, 3003, 1800-1805.
- ⁵ Engh R.A., Bossemeyer D. The Protein Kinase Activity Modulation Sites: Mechanisms for Cellular Regulation-Targets for Therapeutic Intervention. *Advan. Enzyme Regul.*, **2001**, 41, 121-149.
- ⁶ Hanks S.K., Quinn A.M. Protein kinase catalytic domain sequence database, identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*, **1991**, 200, 38-62.
- ⁷ Cheek S., Zhang H., Grishin N.V. Sequence and Structure Classification of Kinases. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 320, 855-881.
- ⁸ Gies J.P. Les mécanismes de transduction des signaux membranaires. Seconde étape : Phosphorylation des protéines et ou intervention des calcioprotéines. Bases de pharmacologie moléculaire. Ed. ellipse, pp 105.
- ⁹ Warmuth M., Damoiseaux R., Liu Y., Fabbro D., Gray N. Src family kinases: potential targets for the treatment of human cancer and leukemia. *Curr. Pharm. Des.*, **2003**, 9, 2043-2049.
- ¹⁰ Lawrence D.S., Niu J. Protein Kinase inhibitors: The Tyrosine-Specific Protein Kinases. *Pharmacol. Ther.*, **1998**, 77, 81-114.
- ¹¹ Ullrich A., Schlessinger J. Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell*, **1990**, 61, 203-211.
- ¹² Frattali A.N., Treadway J.L., Pessin J.E. Transmembrane Signalling by the Human Insulin Receptor Kinase. Relationship between intramolecular β subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 19521-19528.
- ¹³ Sun X. J., Rothenberg P., Kahn C. R., Backer J. M., Araki E., Wilden P. A., Cahill D. A., Goldstein B. J., White B. F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, **1991**, 352, 73-77.
- ¹⁴ Marshall C.J. Ras Effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1996**, 8, 197-204.
- ¹⁵ Berridge M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **1993**, 361, 315-325.
- ¹⁶ Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, **2000**, 103, 211-225.
- ¹⁷ Hunter T. Tyrosine phosphorylation in cell signalling and disease. *Keio J. Med.*, **2002**, 51, 61-71.
- ¹⁸ Thompson A.M. et al. 3-(3,5-Dimethoxyphenyl)-1,6-naphthyridine-2,7-diamines and Related 2-Urea Derivatives are Potent and Selective Inhibitors of the FGF Receptor-1 Tyrosine Kinase. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 4200-4211.
- ¹⁹ Landry Y., Gies J.P. Les protéine-kinases et protéine-phosphatases (Ser, Thr). Pharmacologie moléculaire. arnette, pp 203.
- ²⁰ Cross T.G., Scheel-Toellner D., Henriquez N.V., Deacon E., Salmon M., Lord J.M. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. *Exp. Cell. Res.*, **2000**, 256, 34-41.
- ²¹ Jaken S. Protein Kinase C Isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1996**, 8, 168-173.

- ²² Wainwright M.S., Rossi J., Schavocky J., Crawford S., Steinhord D., Velentza A.V., Zasadzki M., Shirinsky V., Jia Y., Haiech J., Van Eldik L.J., Watterson D. M. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: Evidence from enzyme isoform genetic knockout and *in vivo* inhibitor treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 6233-6238.
- ²³ Hudmon A., Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.*, **2002**, *364*, 593-611.
- ²⁴ Watterson D. M., Mirzoeva S., Guo L., Whyte A., Bourguignon J. J., Hibert M., Haiech J., Van Eldik L.J. Ligand modulation of glial activation: cell permeable, small molecule inhibitors of serine-threonine protein kinases can block induction of interleukin 1 and nitric oxide synthase II. *Neurochem. Int.*, **2001**, *39*, 459-468.
- ²⁵ Cohen O., Feinstein E., Kimchi A. DAP-kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J.*, **1997**, *16*, 998-1008.
- ²⁶ Velentza A.V., Schumacher A.M., Weiss C., Egli M., Watterson D.M. A Protein Kinase Associated with Apoptosis and Tumor Suppression. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 38956-38965.
- ²⁷ Bialik S., Bresnick A.R., Kimchi A. DAP-kinase-mediated morphological changes are localization dependent and involve myosin-II phosphorylation. *Cell Death Differ.*, **2004**
- ²⁸ Knockaert M., Greengard P., Meijer L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2002**, *23*, 417-425.
- ²⁹ Davis R. J. The Mitogen-activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 14553-14556.
- ³⁰ Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1996**, *8*, 205-215.
- ³¹ Hueck C. J., Hillen W. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, **1995**, *15*, 395-401.
- ³² Saier M. H. Jr. Bacterial protein kinases that recognize tertiary rather than primary structure. *Res. Microbiol.*, **1994**, *145*, 647-650.
- ³³ Saier M. H. Jr., Chauvaux S., Deutscher J., Reizer J., Ye, J.J. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, *20*, 267-271.
- ³⁴ Reizer J., Hoischen C., Titgemeyer F., Rivelta C., Rabus R., Stülke J., Karamata D., Saier M. H. Jr., Hillen W. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **1998**, *27*, 1157-1169.
- ³⁵ Fieulaine S., Morera S., Poncet S., Monedero V., Gueguen-Chaignon V., Galinier A., Janin J., Deutscher J., Nessler S. X-ray structure of HPr kinase : a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J.*, **2001**, *20*, 3917-3927.
- ³⁶ Galinier A., Kravanja M., Engelmann R., Hengstenberg W., Kilhoffer M.C., Deutscher J. & Haiech J. New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 1823-1828.
- ³⁷ Reizer J., Saier M. H. Jr., Deutscher J., Grenier F., Thompson J., Hengstenberg W. The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransférase system in Gram-positive bacteria: properties, mechanism, and regulation. *Crit. Rev. Microbiol.*, **1988**, *15*, 297-338.
- ³⁸ Stulke J., Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1999**, *2*, 195-201.
- ³⁹ Galinier A., Deutscher J., Martin-Verstraete, I. Phosphorylation of either crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *J. Mol. Biol.*, **1999**, *286*, 307-314.

- ⁴⁰ McGovern S. L., Shoichet B. K. Kinase Inhibitors: Not Just for Kinases Anymore. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 1478-1483.
- ⁴¹ Levitzki A. Protein Kinase Inhibitors as a Therapeutic Modality. *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 462-469.
- ⁴² Davies S. P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, **2000**, *351*, 95-105.
- ⁴³ Garcia-Echeverria C., Traxler P., Evans D. B. ATP Site-Directed Competitive and Irreversible Inhibitors of Protein Kinases. *Med. Res. Rev.*, **2000**, *20*, 28-57.
- ⁴⁴ Blum G., Gazit A., Levitzki A. Development of New Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Kinase Inhibitors Using Catechol Mimics. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 40442-40454.
- ⁴⁵ Lou Q, Leftwich M. E., McKay R. T., Salmon S. E., Rychetsky L., Lam K. S. Potent pseudosubstrate-based inhibitors for p60(c-src) protein tyrosine kinase. *Cancer Res.*, **1997**, *57*, 1877-1881.
- ⁴⁶ Al-Obeidi F. A., Wu J. J., Lam K. S. Protein tyrosine kinases: structure, substrate specificity, and drug discovery. *Biopolymers*, **1998**, *47*, 197-223.
- ⁴⁷ Walsh D., Glass D. B. Utilization of the inhibitor protein of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase, and peptides derived from it, as tools to study adenosine cyclic monophosphate-mediated cellular processes. *Methods Enzymol.*, **1991**, *201*, 304-316.
- ⁴⁸ Yuan C. J., Jakes S., Elliott S. Graves D. J. A rationale for the design of an inhibitor of tyrosyl kinase. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 16205-16209.
- ⁴⁹ Fry D. W., McMichael A., Singh J., Dorusin E. M., McNamara D.J. Design of a potent peptide inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase utilizing sequences based on the natural phosphorylation sites of phospholipase C-1. *Peptides*, **1994**, *15*, 951-957.

Chapitre II :

Développement d'inhibiteurs de protéines kinases

Chapitre II. Développement d'inhibiteurs de protéines kinases

A- L'Histidin-containing Protein Kinase/Phosphatase

L'HPrK/P joue un rôle décisif chez les bactéries Gram-positifs à faible teneur en guanine et cytosine dans le contrôle de l'utilisation des sources de carbone mais aussi dans l'autorégulation de l'utilisation des carbohydrates dans une voie métabolique spécifique. Chez *Bacillus subtilis*, ces phénomènes impliquent la phosphorylation de deux protéines, l'HPr et la protéine Crh, par l'HPr kinase qui possède également une activité phosphatase. Cette kinase est une enzyme bifonctionnelle également retrouvée chez *Staphylococcus xylosus* et *Lactobacillus casei*. Le gène codant pour l'HPr kinase n'a pas été retrouvé chez les eucaryotes. En revanche, de nombreuses bactéries pathogènes présentent ce gène et donc possèdent probablement le mécanisme de répression catabolique faisant intervenir la phosphorylation de HPr.^{50,51}

Comme HPrK/P est présente uniquement chez les procaryotes et que l'inactivation de cette enzyme chez *B. subtilis*, *Staphylococcus xylosus* et *Lactobacillus casei* provoque d'importants problèmes de croissance,⁵² des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme pourraient être à la base d'une nouvelle famille d'antibiotiques qui affaibliraient la bactérie et permettrait au système immunitaire de l'organisme infecté d'être plus efficace. Les bactéries pathogènes sont de plus en plus résistantes face aux antibiotiques. Par exemple plus de 95 % des souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la pénicilline. La découverte de nouveaux antibiotiques visant une seule et unique cible dans la bactérie pourrait diminuer ce problème de résistance.

1. Approche rationnelle

Les critères de reconnaissance et de liaison des peptides à leurs récepteurs ou à leurs enzymes sont assez complexes. Afin de rendre compte de cette complexité, il a été évoqué,

notamment dans le cas des liaisons peptides-récepteurs, l'hypothèse que dans la succession d'acides aminés constituant un ligand peptidique, une partie du peptide servirait à atteindre la cible, constituant ainsi "l'adresse" du peptide, l'autre partie de la séquence serait nécessaire pour la liaison au site actif du récepteur rendant ainsi compte de la transmission d'une information ou "message". Ce concept de 'message-adresse' énoncé par Porthogese,⁵³ définit dans la séquence d'un peptide endogène une séquence nécessaire pour la reconnaissance et la liaison à une cible spécifique. En ce qui concerne les processus de reconnaissance des ligands peptidiques par leur cible (récepteurs ou enzymes) une approche relativement simple s'est montrée efficace dans plusieurs cas. Par la suite plusieurs auteurs et nous même au laboratoire avons montré que seul un nombre restreint de résidus acides aminés (2 à 4) sont généralement nécessaires pour une bonne affinité. Ces résidus peuvent être contigus ou non dans la structure primaire du peptide. Ils peuvent être localisés dans la partie C-terminale (cholecystokinine,⁵⁴ neuropeptide Y,⁵⁵ neuropeptide FF),⁵⁶ ou à l'intérieur de la séquence peptidique (substance P).⁵⁷

Ainsi nous avons fait l'hypothèse qu'un di- ou tripeptide contenant une sérine pourrait encore se lier à la kinase de manière significative. Une chimiothèque de composés basés sur la séquence peptidique de HPr/Crh autour du site de phosphorylation, la Ser-46 (Figure 9), spécifique de HPrK/P a été constituée au laboratoire.

HPr : -Leu-Lys-Ser-Ile-Met-

Crh : -Ala-Lys-Ser-Ile-Met-

Figure 9 : Acides aminés autour du site de phosphorylation Ser-46 dans HPr et Crh

Dans les substrats endogènes, le résidu Ser-46 est suivi par des acides aminés non polaires (Ile, Met) et est précédé par un acide aminé non polaire (Leu ou Ala) et un acide aminé basique, la Lys. Basée sur ces observations, une série de di- et tripeptides dérivés de la sérine a été préparée selon les méthodes classiques de synthèse peptidique : protection-couplage-déprotection (Schéma 1).⁵⁸ L'activation lors des étapes de couplage peptidique a été réalisée par l'action du cyclohexylcarbodiimide (DCC) et de l'hydroxybenzotriazole (HOBt, composés **38** à **42**) ou par la formation d'un intermédiaire stable par l'action du N-hydroxysuccinimide (HONSu) et du diisopropylcarbodiimide (DIPCI) sur le carboxyle terminal (composés **43** à **49**).

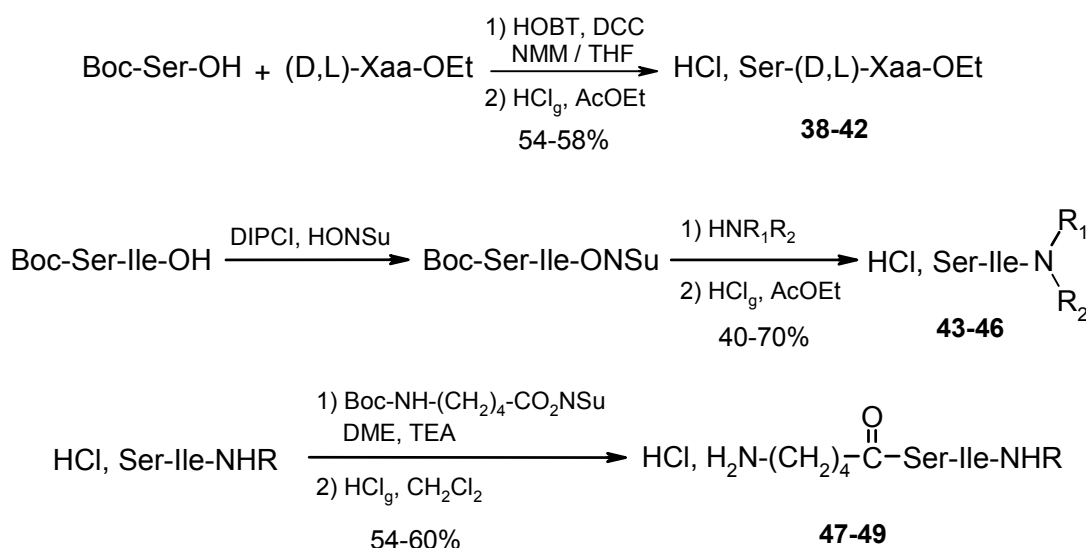


Schéma 1 : Synthèse des petits peptides dérivés de la sérine

Une analyse préliminaire menée en collaboration avec l'équipe de J. Haiech (Laboratoire de Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, Illkirch) avait mis en évidence que l'ester éthylique dérivé de Ser-(D,L)-IleOEt (composé **35**, Tableau 4) inhibait la kinase de manière significative. Autour du dipeptide Ser-Ile, trois points de diversité ont été introduits (Figure 10).

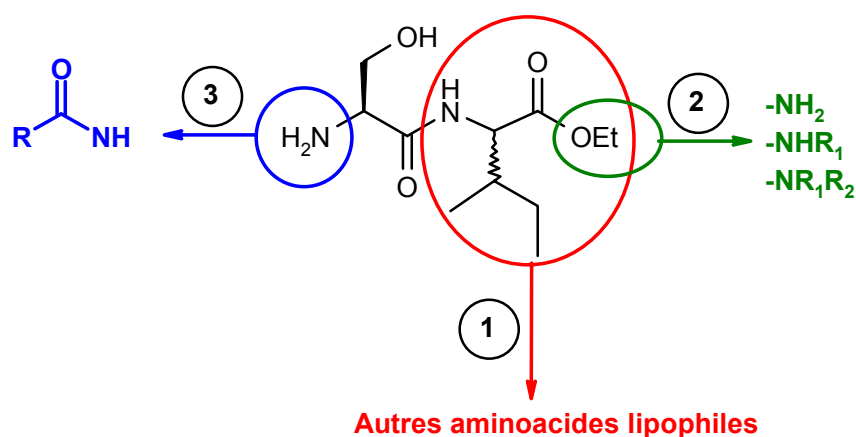


Figure 10 : Variations structurales autour du composé **35**

① L'importance de l'acide aminé C-terminal a été mise en évidence en faisant varier sa nature et sa chiralité. Dans un premier temps, les deux diastéréoisomères du dipeptide **35** ont été séparés et leur capacité à inhiber la phosphorylation de HPr et de Crh a été évaluée

(composés **36** et **37**). Par la suite, l'Ile a été remplacée par d'autres α -aminoacides lipophiles (composés **38** à **42**) : non aromatiques (Ala, Val, Leu) et aromatiques (Phe, Trp).

② La partie C-terminale a ensuite été explorée en remplaçant l'ester éthylique par différents amides primaires, secondaires et tertiaires (composés **43** à **46**).

③ Différents groupes N-acyles ont été introduits en position N-terminale afin de reproduire la séquence Lys-Ser-Ile conservée dans les protéines cibles de l'HPr kinase. L'amine en α de la lysine a été supprimée et l'importance de la chaîne latérale a été évaluée (composés **47** à **49**).

Les petits peptides synthétisés ont été évalués pour leur capacité à inhiber la phosphorylation de Crh par l'HPr kinase (Tableau 4). Cette inhibition de la phosphorylation a été estimée par la mesure de la quantité de phosphate radioactif incorporé dans le substrat endogène.

	composé	% de phosphorylation
Groupe 1	35 L-Ser-D,L-IleOEt	40
	36 L-Ser- L-IleOEt	15 (EC ₅₀ = 430 μ M)
	37 L-Ser- D-IleOEt	20 (EC ₅₀ = 13 mM)
	38 L-Ser-D,L-AlaOEt	30
	39 L-Ser-D,L-ValOEt	100
	40 L-Ser-D,L-LeuOEt	62
	41 L-Ser-D,L-PheOEt	55
	42 L-Ser-D,L-TrpOEt	80
Groupe 2	43 L-Ser-L-IleNH ₂	50
	44 L-Ser-L-IleNMe ₂	40
	45 L-Ser-L-IleNHPh	60
	46 L-Ser-L-IleNHBn	38
Groupe 3	47 H ₂ N-(CH ₂) ₄ -CO-L-Ser-L-IleNH ₂	38
	48 H ₂ N-(CH ₂) ₄ -CO-L-Ser-L-IleNHBn	17
	49 H ₂ N-(CH ₂) ₄ -CO-L-Ser-L-IleNMe ₂	25

Tableau 4 : Dipeptides dérivés de la sérine. Phosphorylation de la Crh (10 μ M) par l'HPr kinase en présence de 2,5 mM de ligand.

L'analyse des résultats met en évidence une inhibition faible de l'HPrK/P par l'ensemble des dipeptides synthétisés, le plus actif d'entre eux, le composé **36**, inhibant l'enzyme avec une

EC₅₀ de 430 μ M. Ce dipeptide de configuration naturelle est 30 fois plus puissant sur ce test d'inhibition que l'autre diastéréoisomère **37**, Ser-(D)-IleOEt (EC₅₀ = 13 mM). Toutefois, des études supplémentaires menées sur ce dipeptide ont mis en évidence sa capacité à inhiber à la fois l'activité kinase et phosphatase de l'enzyme. Il a également été montré qu'il n'entre pas en compétition avec l'ATP et qu'il n'a aucun effet sur la croissance bactérienne de *B. subtilis*.⁵²

La présence d'une chaîne aminée en partie N-terminale (composé **48**, Tableau 4) semble avoir un effet bénéfique sur l'activité inhibitrice, peut-être en mimant une interaction spécifique à la lysine présente dans HPr et Crh. Cependant, du fait de la faible activité des petits peptides synthétisés vis à vis de l'HPrK/P, la série des inhibiteurs peptidiques n'a pas été davantage développée.

2. Criblage de la chimiothèque patrimoine

Une autre stratégie mise à la disposition des pharmacochimistes pour développer des petites molécules comme ligands d'une cible donnée est l'optimisation structurale au départ d'un composé chef de file issu d'un criblage à haut débit de chimiothèques (banques de produits chimiques).

Au sein de la Faculté de Pharmacie d'Illkirch, une chimiothèque patrimoine a été constituée avec les molécules conservées depuis des années dans les laboratoires de chimie. Cette chimiothèque est composée de 1600 produits de structure chimique très variée (hétérocycles, amino-acides, arylamines, dérivés d'inositol, dérivés de peptides, composés polyinsaturés...). Les composés sont stockés de manière normalisée dans des plaques à 96 puits utilisées dans les essais de criblage robotisé.

2.1 Touches sur l'HPrK/P

Un criblage systématique de la chimiothèque a été effectué avec l'HPrK/P dans le but d'identifier une nouvelle série chimique susceptible de conduire à des inhibiteurs d'HPr kinase plus intéressants. Lors de ce criblage un composé bis-cationique initialement synthétisé dans le cadre d'un projet "antipaludique" (Figure 11)⁵⁹ s'est révélé intéressant.

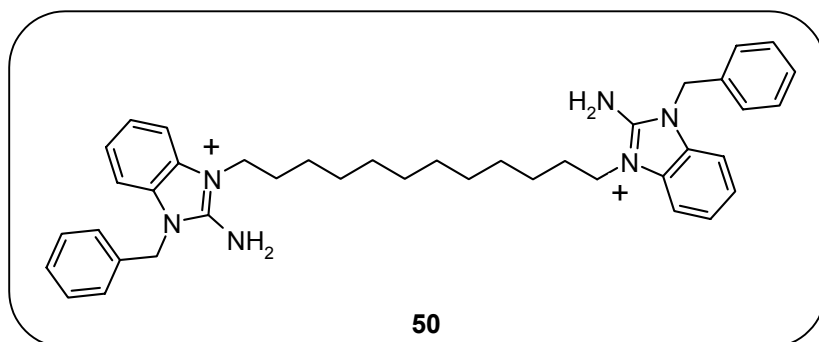


Figure 11 : Touche issue du criblage de la chimiothèque patrimoine

Cette touche ou "hit" (**50**), est composé d'une longue chaîne carbonée à 12 chaînons portant à chaque extrémité une "tête cationique" hétérocyclique, le 1-benzyl-2-aminobenzimidazole de la famille des amidines hétérocycliques.

2.2 Réactivité des amidines hétérocycliques

Les 2-aminobenzimidazoles font partie de la famille des amidines hétérocycliques comprenant également les 2-aminopyridines, les 2-aminopyrimidines, les 3-aminopyridazines, les aminophthalazines, les 2-aminoimidazoles, les 2-aminothiazoles, ... (Figure 12).

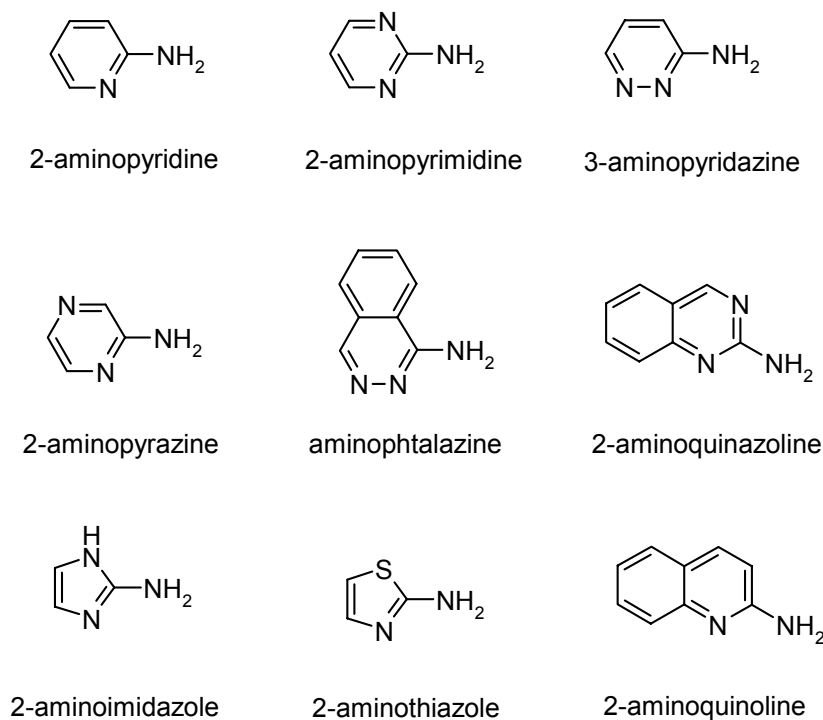


Figure 12 : Quelques exemples d'amidines hétérocycliques

Ces amidines hétérocycliques peuvent exister sous deux formes tautomères, la forme amino A ou imino B (Schéma 2).

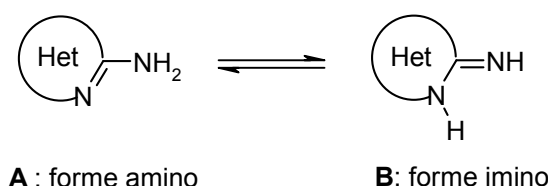


Schéma 2 : Formes tautomériques des amidines hétérocycliques

Il a été montré que la forme amine **A** est largement prédominante,^{59,60} celle-ci présente l'énergie la plus basse (forme totalement aromatique) cependant elle peut coexister avec la forme imine **B**.

Les amidines hétérocycliques sont plus ou moins basiques et si on les classe par ordre de basicité décroissante on trouve parmi les systèmes les plus basiques, le 2-aminoimidazole **51**, l'aminoisoquinoline **52** et la 2-aminoquinoline **53** (Tableau 5).⁶¹

N°	Hétérocycle	pKa
51	2-aminoimidazole	8,5
52	1-aminoisoquinoline	7,6
53	2-aminoquinoline	7,3
54	2-aminopyridine	6,8
55	1-aminophthalazine	6,6
56	2-aminothiazole	5,3
57	3-aminopyridazine	5,2
58	2-aminobenzothiazole	4,5
59	2-aminoquinazoline	4,4
60	2-aminopyrazine	2,9

Tableau 5 : Valeurs de pKa de quelques amidines hétérocycliques

Les 3-aminopyridazines **55** et **57** constituent les hétérocycles les plus basiques dans la série des composés à deux azotes sp². La 2-aminopyrazine **60** est l'hétérocycle le moins basique avec un pKa de 2,9.

La réactivité des amidines hétérocycliques a été largement étudiée dans la littérature et au laboratoire. Il a été montré qu'en présence d'halogénure d'alkyle primaire tel que l'iodure de méthyle, et quel que soit l'hétérocycle de base, l'alkylation a lieu exclusivement sur l'azote

endocylique.^{62,59} Cette endoalkylation régiosélective est attribuée à la stabilité de la forme aromatique qui ne nécessite pas la participation du doublet libre de l'azote endocylique à la formation du système aromatique.⁶³

Chayer⁵⁹ explique la réactivité des amidines hétérocycliques en terme de dureté et de mollesse au sens de Pearson. L'azote endocylique qui présente un caractère sp^2 très marqué va se comporter comme un centre mou et réagir avec un autre centre mou, l'iodure de méthyle par exemple. Cette règle va être modulée par la nature plus dure de l'électrophile (carbocation favorisé) et par l'encombrement stérique qui généralement en résulte. Dans ce cas on observe une alkylation plus ou moins préférentielle de l'azote exocylique. Dans une réaction de type SN1 (avec le bromure de triphénylméthyle), le carbocation stabilisé Ph_3C^+ va réagir avec l'azote exocylique considéré comme le centre dur du système amidine. Cette exoalkylation est favorisée dans les solvants protiques comme l'éthanol, qui est connu pour favoriser un mécanisme de type SN1.

Hunter et al⁶³ ont montré que l'alkylation du benzothiazole conduit à des résultats différents selon les conditions opératoires utilisées (Tableau 6).

61 produit N_{endo} **62** produit N_{exo}

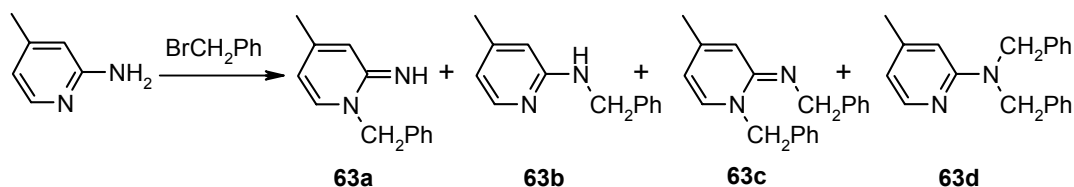
R	R ₁	Conditions opératoires	% 61	% 62
∀ R	H	neutres	100	0
Me	H	basiques	60	40
Cl	H	basiques	70	30
Br	H	basiques	80	20
H	Ph	neutres	88	12
H	Ph	basiques	30	70

Tableau 6 : Alkylation du benzothiazole par l'iodure de méthyle en milieu neutre et basique

En présence d'une base comme l'éthanolate de sodium dans l'éthanol, l'alkylation de l'azote exocylique, qui peut-être déprotoné, est observée. En milieu neutre, par contre, les auteurs n'observent pas de produits N-exoalkylés. La présence d'un aromatique sur l'azote exocylique entraîne une alkylation significative de ce dernier en milieu basique. Néanmoins,

c'est le produit endoalkylé **61** qui se forme de manière majoritaire dans des conditions opératoires neutres.

Chayer a étudié la réaction d'une 2-aminopyridine avec le bromure de benzyle dans différents solvants (Tableau 7).



Conditions opératoires	% 63a	% 63b	% 63c	% 63d	Rdt global (%)
2-butanone, 80°C	100	0	0	0	71
DMF, 50°C	100	0	0	0	66
MeOH, 65°C	0	83	0	17	46
Na ₂ CO ₃ , CHCl ₃ , 45°C	55	34	8	3	64

Tableau 7 : Réaction de la 2-aminopyridine avec le bromure de benzyle

Dans des solvants aprotiques tels que la butanone ou le DMF, seul le produit endoalkylé **63a** est obtenu. Par contre, la réaction en milieu protique (MeOH) conduit au produit exoalkylé **63b**. Lorsque la réaction est effectuée en présence de Na₂CO₃, celle-ci n'est plus sélective, elle conduit à un mélange de produits exo et endoalkylés. Ces produits ont été caractérisés par RMN du proton du groupement méthylène en α du groupe phényle. Les protons en α de l'azote endocyclique sont caractérisés par un singulet et sont plus déblindés (5,08 ppm) que leurs homologues en α de l'azote exocyclique (4,53 ppm).

En présence de bromure de benzyle fortement encombré (bromure de triphénylméthyle), seul le régioisomère exoalkylé est obtenu dans la DMF et dans le CHCl₃ en présence de Na₂CO₃. Ainsi l'alkylation dépend également de l'encombrement stérique de l'agent alkylant.

La réactivité des amidines hétérocycliques a également été étudiée en présence de diélectrophiles (Schéma 3). Différents types de réaction ont été étudiés : 1) type mou-mou (avec le dibromoéthane), 2) type dur-dur (avec les arylglyoxals) et 3) type mou-dur (avec les dérivés carbonylés α -halogénés).

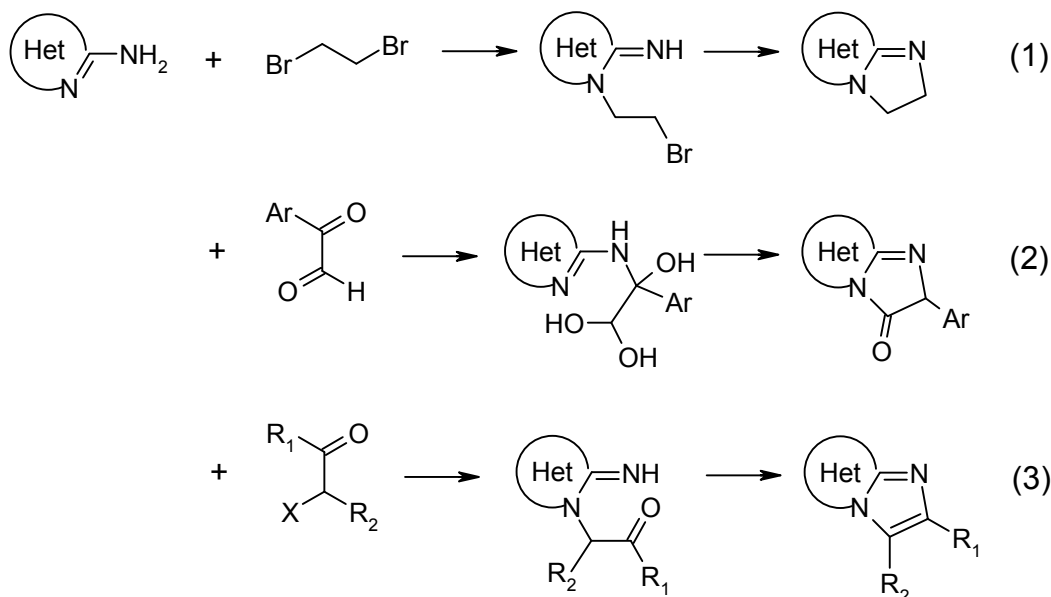


Schéma 3 : Réaction des amidines hétérocycliques avec les diélectrophiles de type mou-mou (1), dur-dur (2) et mou-dur (3)

L'exemple type de diélectrophile 1-2 mou-mou est le dibromoéthane. Au cours de cette réaction il y a d'abord alkylation du centre mou (endo) du nucléophile 1,3, puis cyclisation par attaque du second centre nucléophile (équation 1, Schéma 3). Les composés α -dicarbonylés représentent des modèles caractéristiques de diélectrophiles 1-2 de type dur-dur. En présence de phénylglyoxal, l'azote exocyclique de l'amidine va d'abord réagir avec le carbonyle puis avec l'aldéhyde pour conduire à la cyclisation du produit (équation 2, Schéma 3). Les dérivés carbonylés α -halogénés, diélectrophiles 1-2, possèdent à la fois un centre dur (le carbonyle) et un centre mou (le carbone halogéné). Dans ce cas la réaction est régiospécifique et ne conduit qu'aux dérivés imidazoliques par l'intermédiaire du produit N-endoalkylé (équation 3, Schéma 3).

Les 2-aminobenzimidazoles **64** sont également considérés comme des amidines hétérocycliques. Leur réactivité a été décrite par Rastogi et Sharma.⁶⁴ L'alkylation ou l'arylation de ces composés avec un halogénure d'alkyle ou un halogénure d'aryle conduit aux 2-aminobenzimidazoles **65** substitués en 1, aux 2-aminobenzimidazoles **66** substitués en 1 et en 3 ou aux 2-aminobenzimidazoles **67** substitués en 1, en 2 et en 3 (Schéma 4). En présence d'hydroxyde de potassium, l'azote N1 est déprotoné et on obtient le composé **65** substitué en 1. Par contre en milieu neutre et dans un solvant aprotique (sulfolane), on observe également l'alkylation de l'azote N1 mais aussi celle de l'azote endo N3. L'alkylation de l'azote

exocyclique est observée en présence de diméthylsulfate, dans ce cas il y a également méthylation des azotes endocycliques (composé **67**).

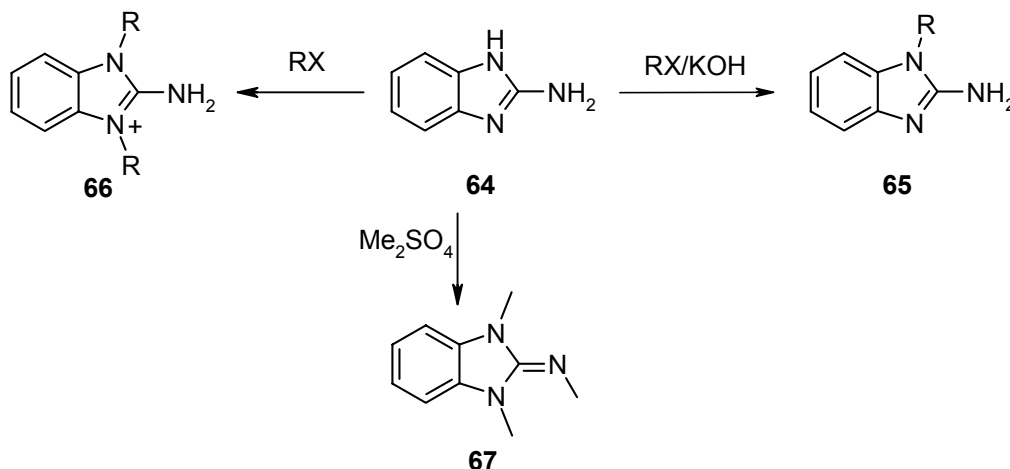


Schéma 4 : Alkylation/arylation des 2-aminobenzimidazoles

La réaction de **64** avec des carbonates d'alkyle **68** (centres durs) en présence d'une base ou avec l'éthylène carbonate **69** en présence d'une base et d'un alcool conduit au seul produit N-exoacylé **70** (Schéma 5). L'acylation des azotes endocycliques peut être obtenue par la mise en jeu de carbohalogénures d'alkyle **71**. Dans ce cas on obtient les composés mono- ou di substitués **72** et **73**, qui, traités par une base, conduisent au composé N-exoacylé **70**.

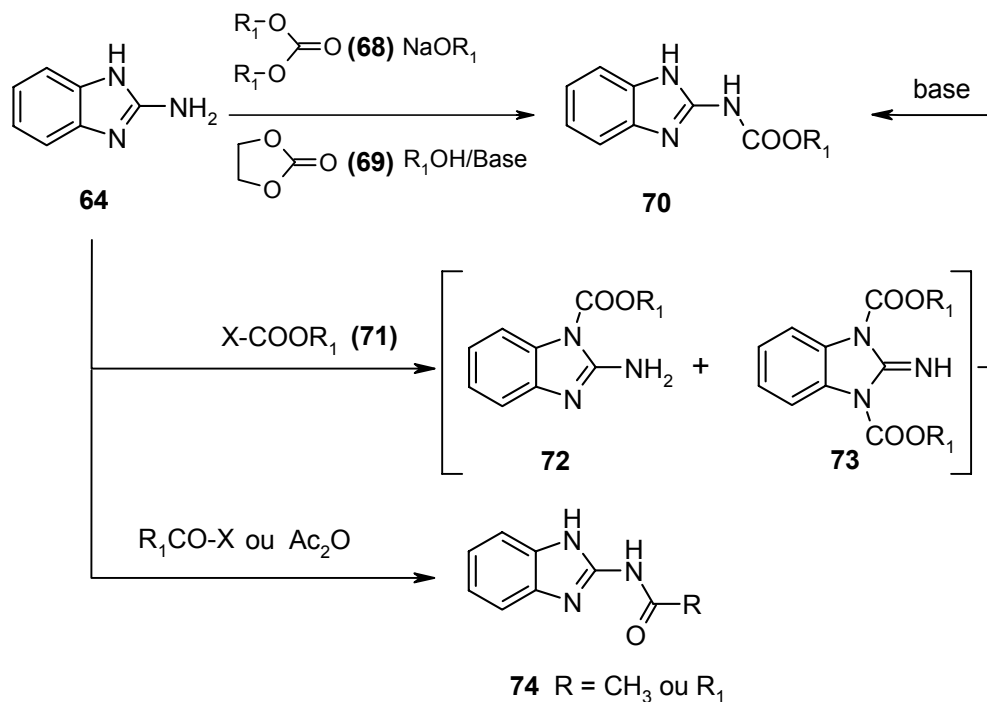


Schéma 5 : Acylation des 2-aminobenzimidazoles

Les 2-acylaminobenzimidazoles **74** peuvent être obtenus en traitant le benzimidazole **64** avec des halogénures d'acide ou même de l'anhydride acétique (Schéma 5).⁶⁴

2.3 Optimisation structurale de la touche bis-cationique

Dans un objectif d'optimisation structurale, nous avons effectué différentes variations autour de notre composé chef de file bis-cationique **50**. En particulier nous nous sommes intéressés à l'introduction de substituants sur le groupement phényle en N₃, à la modification de la longueur du bras espaceur entre les deux têtes cationiques, à la suppression d'une tête cationique et à l'introduction de groupements fonctionnels sur la chaîne en N₁, ceci afin d'obtenir la meilleure interaction possible avec le site de liaison de l'HPr kinase (Figure 13).⁶⁵

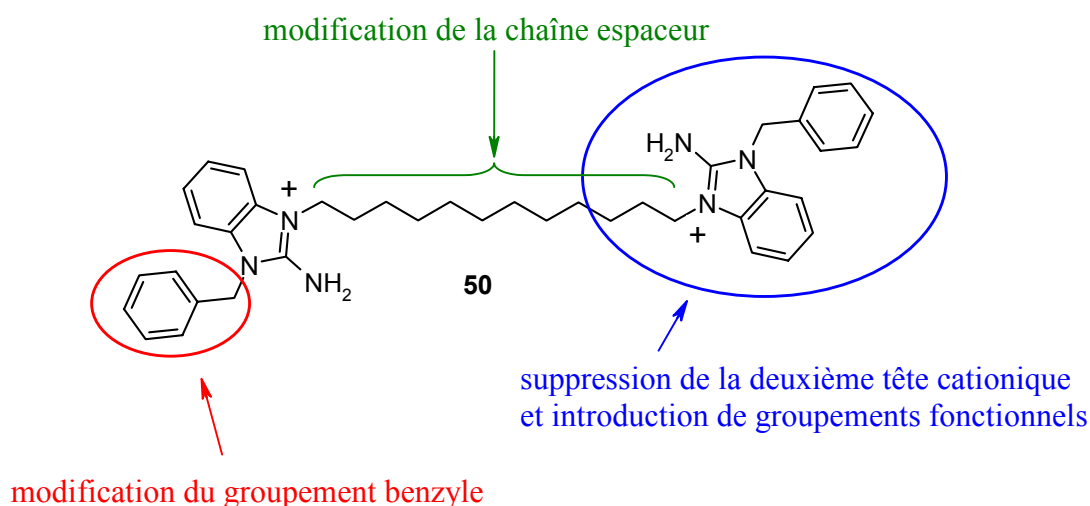
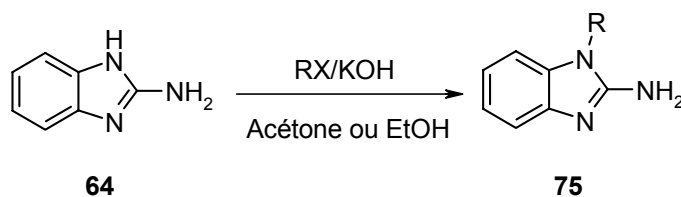


Figure 13 : Modifications structurales du composé chef de file **50**

2.3.1 Alkylation en N1 du 2-aminobenzimidazole

Pour la préparation des différents 2-aminobenzimidazoles substitués sur l'azote N1, nous avons repris les conditions décrites dans la littérature. L'alkylation des 2-aminobenzimidazoles se fait en présence d'hydroxyde de potassium et d'un agent alkylant approprié (Schéma 6).

Schéma 6 : Alkylation de l'azote N3 du 2-aminobenzimidazole **64**

composé	R	Rdt (%)
75a *	Me	55
75b	Bn	65
75c	(CH ₂) ₂ Ph	40
75d	(CH ₂) ₃ Ph	37
75e	4-CH ₃ PhCH ₂	58
75f	4-ClPhCH ₂	60
75g	3,4-ClPhCH ₂	55
75h	4-OCH ₃ PhCH ₂	51

* réaction effectuée dans l'acétone

Tableau 8 : Alkylation du benzimidazole **64**

La méthylation du 2-aminobenzimidazole commercial, décrite par Kikugawa avec un rendement de 75 %, ⁶⁶ est effectuée en présence de 1,1 équivalents d'iodure de méthyle et de 5 équivalents de KOH dans l'acétone. Dans ces conditions nous avons préparé le composé **75a** avec un rendement de 55 %. Malgré l'utilisation d'une quantité quasi stœchiométrique d'agent alkylant nous avons observé la formation de produits secondaires.

Pour la synthèse des 2-aminobenzimidazoles substitués en 1 par des groupes aralkyles ou aryles, nous avons repris les conditions opératoires décrites par Vlaovic et al ⁶⁷ mettant en jeu un agent alkylant approprié en présence de KOH dans l'éthanol. Nous avons alors préparé les composés **75b-h** avec des rendements de 37 à 65 % (Tableau 8). Dans tous les cas nous avons observé la formation de produits secondaires. Dans le cas des composés **75c** et **75d** (halogènes moins réactifs) l'alkylation est plus lente, nous avons récupéré dans les deux cas, près de 50% du 2-aminobenzimidazole de départ.

2.3.2 Accès aux bis-cations de 2-aminobenzimidazole

Nous avons réalisé la synthèse des bis-cations de benzimidazole en faisant réagir les dibromoalkanes en présence d'un excès de 2-aminobenzimidazole dans la butanone, selon les conditions opératoires décrites par Chayer.⁵⁹

Nous avons alors préparé les bis-cations **76a-c** avec de bons rendements (Schéma 7). Il est à noter que l'endoalkylation des 2-aminobenzimidazoles dans la butanone conduit à la formation des dérivés mono-cationiques correspondants qu'il est nécessaire de séparer par chromatographie sur silice. Nous avons joué sur la durée de la réaction pour minimiser la formation des mono-cations, et après 4 jours de chauffage à 100°C les bis-cations ont été obtenus avec des rendements de 50-72%. La réaction dans le sulfolane permet également d'améliorer les rendements en produits dialkylés. Ainsi le bis-cation **76c** a pu être obtenu par Chayer avec un rendement de 85 % après 70h à 110°C, alors qu'entre nos mains, dans la butanone, le rendement est de 50 %.

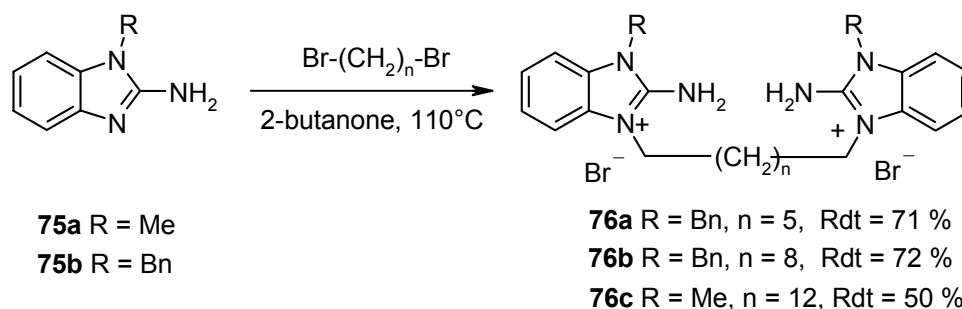


Schéma 7 : Accès aux bis-cations **76a-c**

2.3.3 Préparation des chaînes halogénées

Pour permettre l'introduction de chaînes fonctionnalisées sur le benzimidazole **75b** nous avons préparé différentes chaînes bromées portant des groupements accepteurs et/ou donneurs de liaisons hydrogènes tels que des amines ou des amides.

2.3.3.1 Chaînes portant un précurseur d'amines

Le bromhydrate de 3-bromopropylamine commercial **77** a été protégé sous forme de *tert*-butyloxycarbonyl (composé **78**) avec un rendement de 75 % (équation (1), Schéma 8).

D'autre part la fonction hydroxyle de la N-Boc-hexylamine **79** a été transformée en bromure correspondant par action de $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$ (équation (2), Schéma 8).

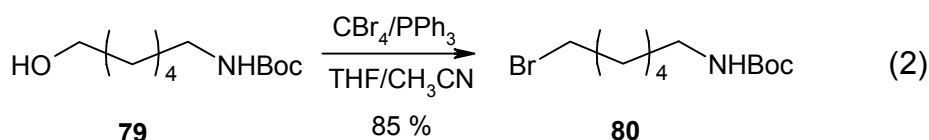
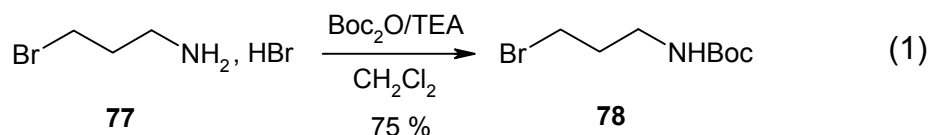


Schéma 8 : Préparation des chaînes bromoaminées **78** et **80**

Pour la préparation de la chaîne bromoaminée à onze carbones, quatre étapes ont été nécessaires. L'aminoundécanoate de méthyle **81** a d'abord été réduit en alcool correspondant **82** en présence de sodium métallique dans l'EtOH. Après avoir protégé l'aminoalcool par un carbamate de *tert*-butyle (composé **83**), celui-ci a été bromé en présence de $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$ avec un rendement de 85 % (Schéma 9).

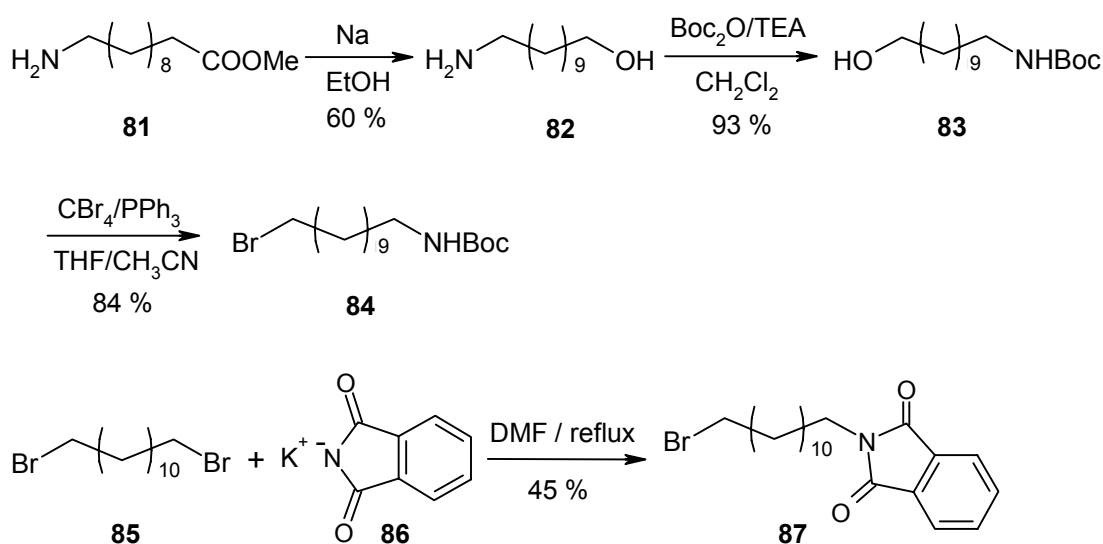


Schéma 9 : Préparation des longues chaînes aminées

Pour introduire un groupement aminé sur la plus longue chaîne carbonée il est possible d'utiliser la synthèse de Gabriel consistant à introduire un groupement phthalimide qui conduit à l'amine primaire après hydrolyse en milieu acide fort (HBr/AcOH).⁶⁸ Nous avons préparé la chaîne bromée portant un groupement phthalimide **87** au départ du dibromododécane **85** et du

phtalimide de potassium **86** avec un rendement moyen de 45 % (Schéma 8). La chaîne a été conservée sous cette forme, l'hydrolyse n'a pas été effectuée.

2.3.3.2 Chaînes portant une fonction amide

A partir de la chaîne aminée **77** nous avons envisagé la préparation d'amides. Nous avons dans un premier temps tenté d'acétyle la fonction amine en présence d'AcOH et d'anhydride acétique mais seul le produit de départ a été récupéré. Nous avons alors traité la 3-bromopropylamine avec du chlorure d'acétyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane dans ce cas nous avons obtenu un mélange de produits et nous n'avons pas isolé l'amide **88**. En milieu aqueux nous avons réussi à isoler le composé **88** mais en faible quantité probablement à cause de sa trop grande solubilité dans l'eau (Schéma 10). Par contre la 3-bromopropylamine **77** traitée par du chlorure de benzoyle en présence de NaOH 2N conduit à l'amide **89** avec un rendement de 90 %.

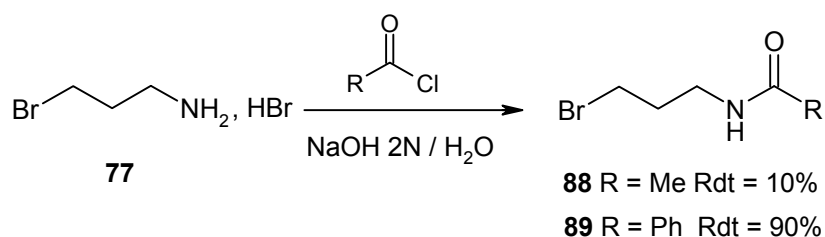
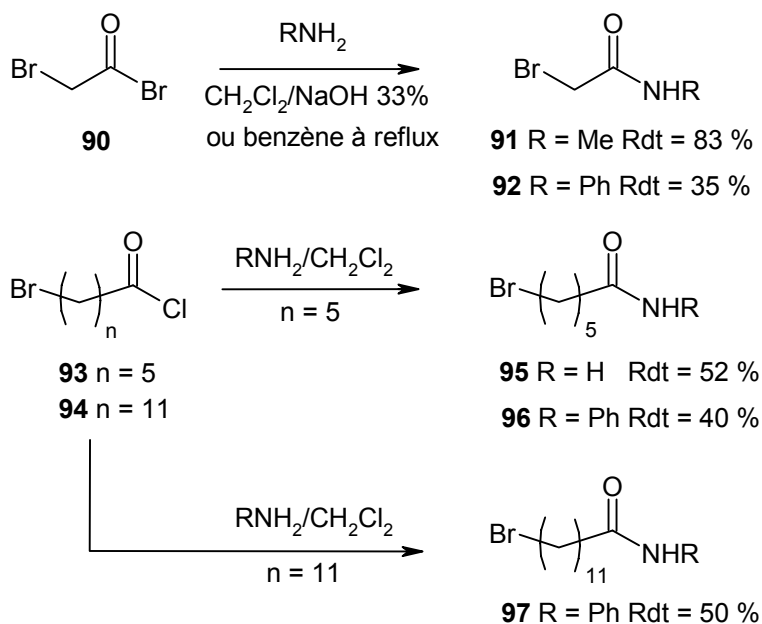


Schéma 10 : Préparation des amides **88** et **89**

2.3.3.3 Chaînes portant une fonction amide inversée

A partir des halogénures d'acides nous avons préparé quelques amides. Dans la série des chaînes à deux carbones, les amides **91** et **92** ont été préparés à partir du bromure de bromacétyle **90** (Schéma 11). Les chaînes à 6 et 12 carbones ont été préparées à partir des chlorures d'acides commerciaux (6 C) ou obtenues à partir de l'acide correspondant traité par SOCl_2 (12 C). Dans tous les cas les amides ont été obtenus avec des rendements faibles (composés **95**, **96** et **97**). La réaction se fait difficilement, probablement à cause de l'instabilité du chlorure d'acide.


Schéma 11 : Préparation des amides **91-92** et **95-97**

Le bromoundécanoate d'éthyle **98** a été obtenu quantitativement à partir de l'acide correspondant traité en milieu HCl 4N dans l'EtOH.

2.3.3.4 Chaînes portant une amine aromatique

Le groupement carbazole a été introduit sur la chaîne C12 dans les conditions de transfert de phase.⁶⁹ Le dibromododécane a été mis en réaction avec le carbazole en présence de bromure de tétrabutylammonium et d'hydroxyde de sodium à 50 % (Schéma 12). Dans ces conditions nous avons isolé la chaîne bromée **99** avec un rendement de 30%. Le rendement n'a pas été optimisé.

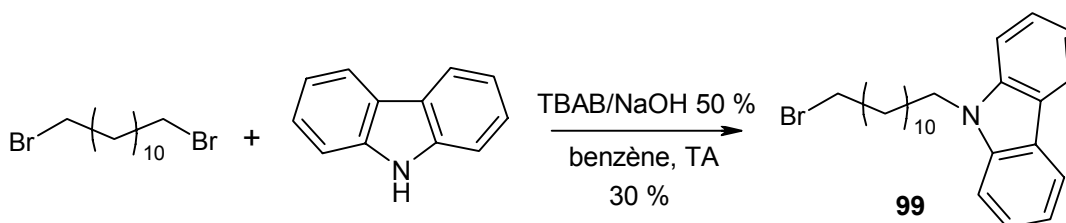


Schéma 12 : Introduction du groupement carbazole

2.3.3.5 Chaînes portant une guanidine

Nous avons essayé d'introduire d'autres groupements aminés sur la chaîne carbonée, tels qu'un groupement guanidine ou carbazole. Pour introduire un groupement guanidine sur la chaîne bromée à 6 carbones nous avons choisi une stratégie mettant en jeu la S-méthylthiourée diBoc **101**. Ainsi l'action de la S-méthylthiourée **101** sur le 6-aminohexanol **100** conduit à la guanidine **102** avec un rendement de 90 %. L'hydroxyle est comme précédemment transformé en bromure **103** par l'action de $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$ (Schéma 13).

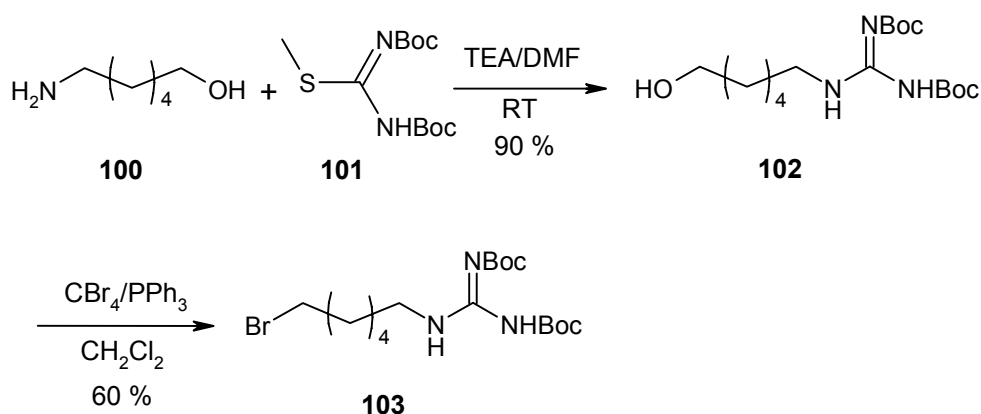


Schéma 13 : Introduction d'un groupement guanidine

2.3.4 Accès aux mono-cations

2.3.4.1 Variations de la tête cationique

A partir des benzimidazoles **75b-h** nous avons préparé une série de cations portant une longue chaîne alkyle. Dans un premier temps nous avons mis en réaction le N1-benzyl-2-aminobenzimidazole **75b** dans la 2-butanone en présence d'un nombre variable d'équivalents de bromododécane (1,2, 1,5 et 3 éq.). Dans les trois cas, nous avons isolé le cations **104b** avec le même rendement. Nous avons alors engagé les différents benzimidazoles **75c-h** dans les mêmes conditions en présence de 1,5 équivalent de dérivé bromé (Schéma 14) et nous avons obtenu les cations **104c-h** avec des rendements de 60 à 95 % (Tableau 9).

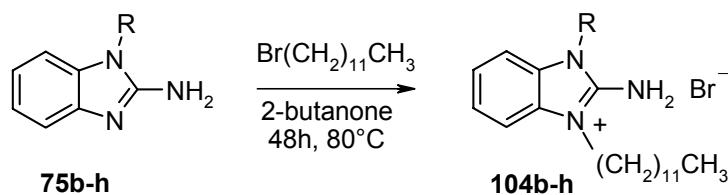


Schéma 14 : Synthèse des composés **104b-h**

composé	R	Rdt (%)
104b	Bn	67
104c	(CH ₂) ₂ Ph	60
104d	(CH ₂) ₃ Ph	78
104e	4-CH ₃ PhCH ₂	95
104f	4-ClPhCH ₂	71
104g	3,4-ClPhCH ₂	63
104h	4-OCH ₃ PhCH ₂	67

Tableau 9 : Préparation des cations **104b-h**

Les sels formés cristallisent à froid dans la butanone, ils sont alors récupérés par une simple filtration.

2.3.4.2 Introduction de chaînes fonctionnalisées

Les différentes chaînes fonctionnalisées synthétisées ou commerciales ont été introduites sur le benzimidazole **75b** dans les conditions décrites précédemment pour la synthèse des cations **104b-h**.

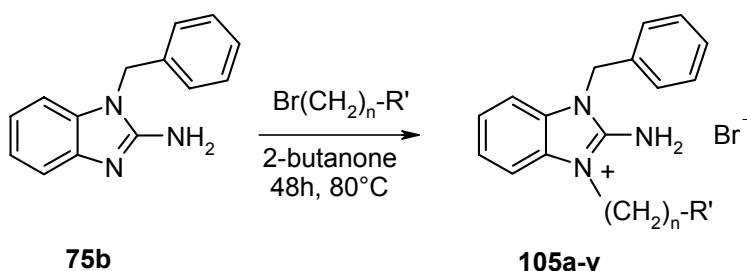
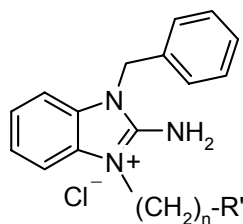


Schéma 15 : Introduction des chaînes fonctionnalisées

Dans ces conditions nous avons préparé par synthèse parallèle les composés **105a-v** (Schéma 15). Les résultats sont reportés dans le tableau 10.



Composé	n	R'	Rdt (%)
105a	2	Me	84
105b	4	Me	60
105c	7	Me	76
105d	1	Ph	83
105e	3	Ph	60
105f	1	COOH	62
105g	5	CONH ₂	52
105h	1	CONHMe	67
105i	1	CONHPh	60
105j	5	CONHPh	32
105k	11	CONHPh	31
105l	3	OH	51
105m	6	OH	52
105n	11	OH	54
105o*	5	Br	66
105p*	8	Br	76
105q*	12	Br	85
105r	3	NHBoc	58
105s	6	NHBoc	52
105t	11	NHBoc	62
105u	12		50
105v	12		43

* réaction effectuée avec 3 éq. de dibromoalcane

 Tableau 10 : Préparations des cations **105a-v**

La plupart des composés ont pu être obtenus après filtration avec des rendements de 31 à 88 %. La réaction d'alkylation de l'azote endocyclique se fait plus facilement avec les chaînes portant un groupement alkyle. En présence d'un groupement donneur et/ou accepteur de liaisons hydrogènes tel que les amides ou les alcools, on observe une chute des rendements, ce phénomène est assez marqué dans le cas des longues chaînes portant un groupement amide (composés **105k** et **105u-v**, Tableau 10). Ces longues chaînes grasses portant une tête polaire pourraient se replier sur elles-mêmes et ainsi diminuer la probabilité de rencontre entre l'amine endocyclique du benzimidazole et la chaîne halogénée.

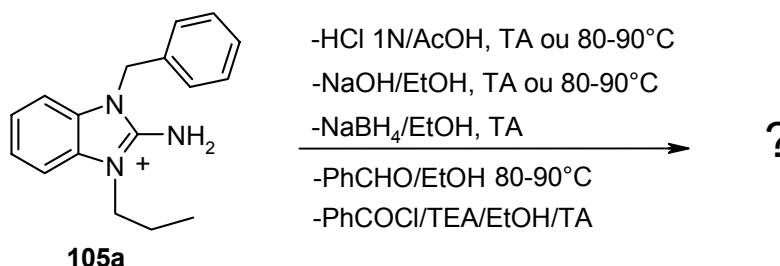
Dans les cas des chaînes courtes portant un groupe amide (chaînes **88** et **89**) la réaction d'alkylation n'a pas abouti, nous avons obtenu le produit départ accompagné par une faible quantité de produit attendu que nous avons identifié par spectrométrie de masse. Il en a été de même avec l'ester **98**. En présence de la chaîne portant le groupement guanidine protégé **103**, un grand nombre de produits a été formé que nous n'avons pas identifiés.

Les composés bromés ont été préparés en mettant en jeu 3 équivalents de chaîne dibromée afin de diminuer la formation du bis-cation correspondant observé quand la réaction est effectuée avec 1,5 équivalents de dibromoalcane. Dans ces conditions nous avons isolé les cations **105o-q** avec de bons rendements (Tableau 10).

Les composés synthétisés ont été obtenus avec une pureté satisfaisante (> 85 %), déterminée par HPLC analytique.

2.3.4.3 Stabilité des cations

Pour mettre en évidence la stabilité des cations synthétisés, nous avons effectué quelques expériences sur un cation modèle, le dérivé méthylé **105a** (Schéma 16). La stabilité de ce cation a été évaluée dans différents milieux : acide, basique, réducteur, en présence d'un aldéhyde et d'un chlorure d'acide. L'évolution des réactions a été suivie par chromatographie sur couche mince. En milieu acide (HCl 1N/AcOH), ou basique (NaOH 1N) et à température ambiante, nous n'avons observé aucune évolution même après 24h. Les milieux ont ensuite été chauffés à 80-90°C. En milieu basique aucune réaction n'a été observée, par contre en milieu acide, nous avons observé la formation d'un nouveau produit dont la masse molaire pourrait correspondre au produit débenzylé.

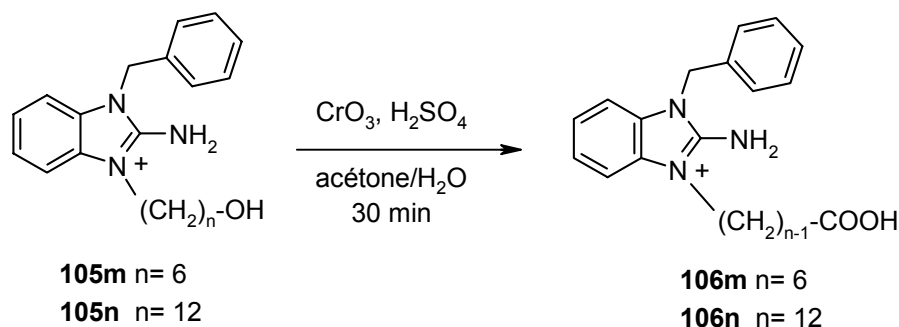
Schéma 16 : Tests de stabilité du cation **105a**

En milieu réducteur, aucune réaction n'a été observée à température ambiante. De plus, même en présence d'un aldéhyde et d'un chlorure d'acide, le cation **105a** est retrouvé inchangé. Quand le benzimidazole est substitué sur les deux azotes endocycliques, l'azote exocyclique ne semble plus disponible pour réagir avec un chlorure d'acide. Leur stabilité en milieu oxydant est mise en évidence dans le paragraphe 2.3.4.4.

Les cations dérivés du benzimidazole semblent être des composés relativement stables dans les conditions réactionnelles classiques (acides, basique, réductrices, oxydantes).

2.3.4.4 Oxydation des alcools **105m-n**

La réaction du benzimidazole avec l'acide 3-bromoacétique a conduit à la formation du cation **105f** (Tableau 10) avec un bon rendement. Par contre en présence de chaînes bromoacides plus longues (4 et 6 C), nous n'avons pas réussi à isoler les cations correspondants. Nous avons observé la formation de plusieurs produits que nous n'avons pas identifiés. Nous avons alors préparé les cations portant une chaîne acide à partir des alcools correspondants **105m** et **105n** qui ont été oxydés en présence de CrO₃ (Schéma 17). Les acides **106m-n** étant des composés très polaires, ils ont été purifiés par HPLC semi-préparative. Dans ces deux cas les rendements n'ont pu être calculés, cependant nous avons déterminé la pureté des produits bruts, avant purification, par HPLC, 73 % pour **106m** et 55 % pour **106n**. Les produits secondaires formés lors de l'oxydation n'ont pas été identifiés.


 Schéma 17 : Préparation des cations **106m-n**

Nous avons également engagé les alcools dans des réactions d'oxydation en présence de DMSO et de chlorure d'oxalyde ou de PCC afin d'obtenir les aldéhydes correspondants mais dans tous les cas nous n'avons récupéré que l'alcool de départ.

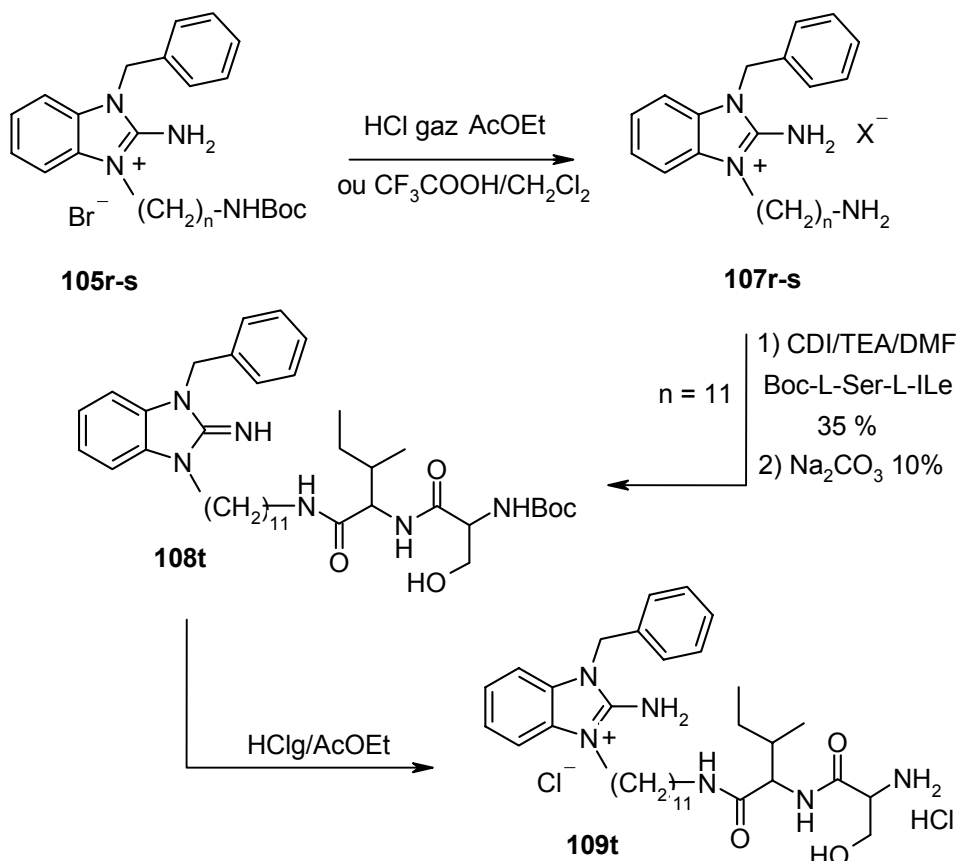
2.3.4.5 Déprotection des N-Boc **105r-t**

Les amines protégées par des groupements *tert*-butyloxycarbonyles **105r-t** ont été utilisées comme intermédiaires pour la préparation des amines **107r-t**. La déprotection de **105r-t** est facilement réalisée dans une solution saturée d'HCl dans l'acétate d'éthyle ou encore dans un mélange de CH_2Cl_2 et d'acide trifluoroacétique 1/1 (Schéma 18). Les amines **107r-t** ont été obtenues avec des rendements de 88 à 95 % (Tableau 11).

Au départ de l'amine primaire **107t**, nous avons préparé le cation portant le dipeptide N-Boc-serine-isoleucine de configuration L par un couplage peptidique mettant en jeu le diisopropylcarbodiimide (Schéma 18). Après déprotection du composé *t*-butyloxycarbonyle **108t** dans une solution saturée d'HCl dans l'AcOEt, nous avons obtenu le cation **109t** en petite quantité, après purification par HPLC semi-préparative.

composé	n	Rdt (%)
107r	3	92
107s	6	88
107t	11	95

 Tableau 11 : Préparation des dérivés aminés **107r-t**


 Schéma 18 : Préparation des amines **107r-t** et couplage peptidique de **107t** avec un dipeptide

 $\text{X}^- = \text{Cl}^- \text{ ou } \text{CF}_3\text{COO}^-$

2.3.4.6 Substitution des dérivés bromés **105o-q**

A partir des dérivés bromés **105o-q** nous avons préparé différentes amines par synthèse parallèle.

Dans un premier temps nous avons mis en réaction le composé bromé **105q** ($n = 12$) avec 1,4 ou 3 équivalents de pipéridine dans l'acétonitrile à $80-90^\circ\text{C}$ et dans le diméthylformamide à $90-100^\circ\text{C}$. Dans le premier cas (CH_3CN) nous avons isolé par filtration le produit attendu avec un rendement de 70 %. Dans le DMF, nous avons également observé la formation du produit, mais sa récupération est rendue plus difficile à cause de sa solubilité dans le DMF alors que dans l'acétonitrile le cation formé précipite à froid.


 Schéma 19 : Préparation des amines **110a-k**

Nous avons repris ces conditions pour préparer les autres cations aminés (Schéma 19), les résultats sont reportés dans le Tableau 12.

Composé	n	-NR ₁ R ₂	Rdt (%)
110a	5		56*
110b	12		68*
110c	12	NHPh	69
110d	5	NHCH ₂ Ph	40
110e	12	NHCH ₂ Ph	43
110f	12		76
110g	5		45
110h	8		59
110i	12		67
110j	12		30
110k	12		53

* rendement estimé

 Tableau 12 : Préparation des dérivés aminés **110a-k**

Nous avons ainsi obtenu les dérivés aminés avec des rendements variant entre 30 et 75 % selon les cas. Les composés cristallisant généralement dans le milieu réactionnel refroidi sont récupérés par simple filtration puis traités par un lavage acido-basique. On remarque que les meilleurs rendements sont obtenus avec les cations portant une longue chaîne carbonée, ces composés moins solubles, précipitent alors plus facilement dans le milieu réactionnel, à

l'exception du composé **110j**. Dans le cas des réactions mettant en jeu la pipéridine, nous avons obtenu les amines tertiaires **110a-b** contaminées par le dérivé bromé de départ et la pipéridine. Cette dernière a été éliminée par des lavages successifs avec différents solvants (AcOEt, éther) puis par un lavage acido-basique. Cependant le dérivé bromé de départ n'a pas pu être séparé de l'amine **110**, la grande polarité de ces composés rendant difficile leur purification. La pureté des cations **110a-k**, déterminée par HPLC, est supérieure à 85% dans la plupart des cas.

2.4 Etudes des relations structure-activité

2.4.1 Caractéristiques inhibitrices du composé chef de file

Les cations synthétisés ont été évalués pour leur capacité à inhiber la phosphorylation de HPr/Crh (concentration = 10 μ M) par l'HPrK/P (concentration = 100nM) à des concentrations de 10 et 100 μ M. Les tests de phosphorylation ont été réalisés in vitro à pH 8 en présence d'ATP marqué ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$), de MgCl_2 et de fructose-1,6-bisphosphate (FBP) par Helena Ramström du Laboratoire de Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires (Illkirch).⁶⁵

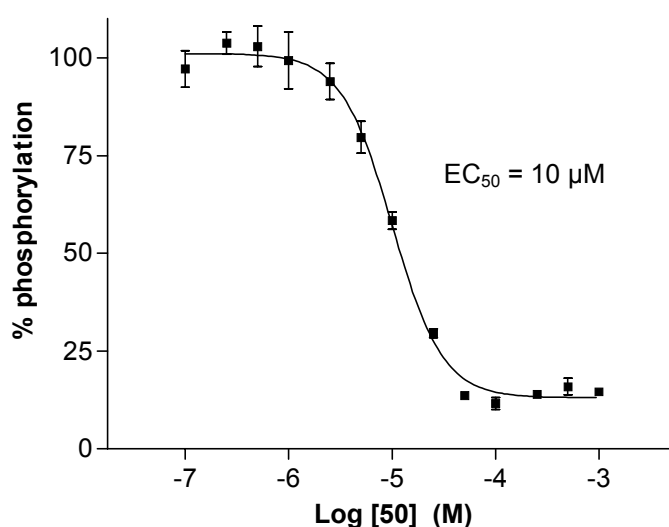


Figure 14 : Phosphorylation de HPr (10 μ M) par HPrK/P en fonction de la concentration du composé **50**

Le composé chef de file bis-cationique **50**, issu du criblage de la chimiothèque patrimoniale a été soumis à différents tests. Dans les tests de phosphorylation de HPr par l'HPrK/P, le bis-cation **50** inhibe la kinase avec une EC_{50} de 10 μ M (Figure 14) et une valeur semblable (21 μ M) a été obtenue dans un test de phosphorylation avec Crh (Tableau 13).

La substance de référence a ensuite été soumise à un test de compétition avec l'ATP afin de déterminer si le bis-cation **50** est un inhibiteur compétitif de l'ATP. Des tests de phosphorylation ont alors été réalisés avec **50** (10 μ M) et des concentrations croissantes d'ATP. A l'issue de cette expérience, il a été mis en évidence que l'augmentation de la concentration en ATP n'influe pas sur le degré de phosphorylation, et par conséquent que notre substance de référence n'entre pas en compétition avec le site de liaison de l'ATP dans ces conditions. Pour conforter cette observation, un test de compétition a été réalisé avec l'ADP (utilisé comme compétiteur de l'ATP) et le composé **50**, afin de mettre en évidence si les deux inhibiteurs agissent en synergie ou en compétition. L'ADP seul présente un EC_{50} de 4 mM. Dans un test de compétition avec le composé bis-cationique, les EC_{50} de l'ADP et du bis-cation **50** sont divisées par deux (EC_{50} = 2 mM et 5 μ M, respectivement). A partir des données obtenues par cette expérience, les relations dose-effet ont été analysées et ont mis en évidence un effet additionnel des deux composés et leur action sur des sites distincts.

Test de phosphorylation		
	EC_{50} μ M (intervalle de confiance)	
Inhibiteur	HPr	Crh
50	10 (8.6 to 12)	21 (17 to 25)
ADP	4300 (2400 to 7800)	7400 (6400 to 8700)
50	5.2 (4.8 to 5.6)	12 (11 to 13)
+	+	+
ADP	2100 (1900 to 2200)	4200 (3800 to 4600)
Test de déphosphorylation		
50	16 (14 to 19)	14 (8.5 to 23)

Tableau 13 : Inhibition de la phosphorylation de HPr/Crh par **50** seul, ADP seul et **50** + ADP.

L'HPrK/P étant une enzyme bifonctionnelle qui en plus de son activité kinase possède une activité phosphatase, le bis-cation de référence **50** a été testé à différentes concentrations en présence de phosphate inorganique (1mM) déclenchant l'activité phosphatase, et de HPr/Crh phosphorylés. Ce test a permis de mettre en évidence une inhibition significative de la déphosphorylation de HPr(Ser-P) et de Crh(Ser-P) en présence du composé **50** avec un EC_{50} de 16 et 14 μ M, respectivement (Tableau 13).

Pour obtenir des indications sur la sélectivité du composé **50**, des tests d'inhibition ont été réalisés avec trois autres Ser/Thr kinases, la DAPK, la MLCK et la CaMKII. Notre bis-cation de référence n'a présenté aucune activité inhibitrice vis à vis de la DAPK, par contre il inhibe la MLCK avec une EC_{50} de 60 μ M et la CaMKII avec une EC_{50} de 5 μ M comparable à celle obtenue avec l'HPrK/P.

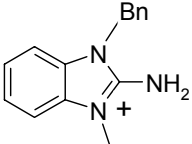
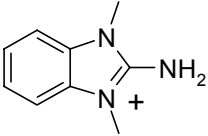
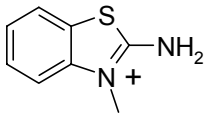
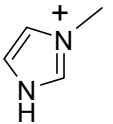
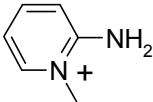
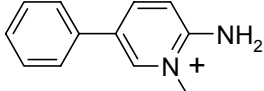
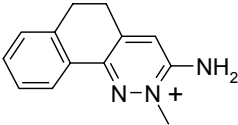
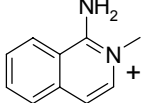
L'addition de **50** à une culture cellulaire de *Bacillus subtilis* (bactérie Gram-positive) entraîne l'inhibition de la croissance cellulaire, par contre aucun effet n'a été observé avec *E. coli* (bactérie Gram-négative). Les expériences similaires menées sur une culture de *B. subtilis* possédant une HPrK/P inactivée ont mis en évidence une inhibition de la croissance cellulaire. De plus, additionné à une culture de cellules eucaryotes, le bis-cation **50** provoque un effet cytotoxique, il inhibe la croissance avec une EC_{50} de 1 μ M.

2.4.2 Optimisation

2.4.2.1 Importance de la tête cationique

Afin de mettre en évidence l'importance de la tête cationique du composé de référence pour l'inhibition de HPrK/P, une série de bis-cations disponibles au laboratoire (composés **111**) a été testée. Les résultats sont reportés dans le Tableau 14.

On remarque que le remplacement du benzimidazole par d'autres hétérocycles (pyridines **111c** et **111d**, pyridazine **111e**, imidazole **111b**, isoquinoline **111f**, benzothiazole **111a**) conduit à des composés inactifs. Ces résultats soulignent le rôle critique joué par le cycle benzimidazole dans l'inhibition de HPrK. De plus, le groupement benzyle présent sur l'azote N1 du benzimidazole semble également d'une grande importance puisque sa substitution par un groupement méthyle entraîne une chute du pourcentage d'inhibition de HPrK (comparer **50** et **76c**).

Het-(CH ₂) ₁₂ -Het			
Composé	Hétérocycle ^a	Nature du sel	% inhibition at 100 μM
50		B	88
76c		A	64
111a		B	<5
111b		B	<5
111c		A	<5
111d		A	<5
111e		A	<5
111f		A	<5

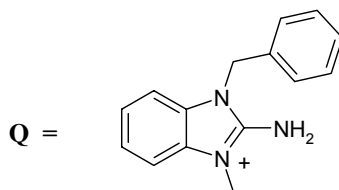
^a A, bromhydrate; B, oxalate

Tableau 14 : Importance de la partie hétérocyclique dans l'inhibition de la phosphorylation de HPr par HPrK/P.

2.4.2.2 Importance de la chaîne-espaceur

L'importance de la longueur de la chaîne entre les deux têtes cationiques dans l'inhibition de HPrK/P a été étudiée et les résultats sont reportés dans le Tableau 15.

On observe que la diminution de la chaîne-espaceur conduit à une augmentation de la valeur de l' EC_{50} . Par exemple, le dérivé pentyle **76a** est dix fois moins puissant que le composé de référence **50**. Il est à noter également que lorsqu'on supprime la deuxième tête cationique, tout en conservant la même chaîne lipophile (composé **104b**), on multiplie par 3 la valeur de l' EC_{50} , cependant le mode d'action de ce mono-cation **104b** semble différent comme le montre la grande différence entre leur coefficient de Hill (Tableau 15).



Composé		EC ₅₀ μM (intervalles de confiance)		Coefficient de Hill (intervalles de confiance)	
		HPr	Crh	HPr	Crh
50	Q(CH₂)₁₂Q	10 ± 2	21 ± 4	1.8 ± 0.4	2.4 ± 0.9
76b	Q(CH₂)₈Q	20 ± 4	71 ± 8	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.4
76a	Q(CH₂)₅Q	93 ± 20	210 ± 30	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3
104b	Q(CH₂)₁₁CH₃	29 ± 3	32 ± 4	5.3 ± 2.5	6.4 ± 2.5

Tableau 15 : Corrélation entre la longueur de la chaîne-espaceur et les valeurs de EC_{50} dans l'inhibition de HPrK/P par **50** et ses homologues.

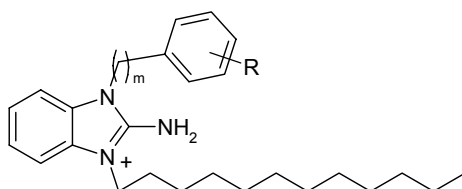
Des concentrations plus grandes en inhibiteur sont nécessaires quand les tests sont réalisés avec Crh. Cependant ceci s'explique par le comportement de Crh en solution qui semble exister sous forme de dimère.

2.4.2.3 Importance du groupement benzylique en N1 du benzimidazole

L'effet de la modification du groupement benzylique (présent sur la tête cationique du mono-cation de référence) est reporté dans le Tableau 16.

L'introduction de carbones supplémentaires entre l'azote N1 du benzimidazole et le groupement aromatique (composés **104c-d**) conduit à des composés plus actifs que le composé de référence **104b**, notamment dans le cas du composé **104d** (voir inhibition à 10 μ M, Tableau 16). On remarque également que la présence d'un groupement méthoxy sur le phényle dans le composé **104h** semble avoir un effet bénéfique alors que la présence d'un groupement méthyle est plutôt défavorable (composé **104e**). Ceci peut-être du à des interactions additionnelles de type liaisons hydrogènes avec l'oxygène du groupement méthoxy dans **104h**.

L'effet de ces composés sur la croissance cellulaire a été évalué sur une culture de *B. subtilis*, seul le mono-cation **104h** a présenté un effet inhibiteur sur *Bacillus subtilis*, alors qu'aucune inhibition n'a été observée avec le mono-cation **104d**.



Cposé	m	R	% inhibition à 100 μ M (SEM)	% inhibition à 10 μ M (SEM)	Degré d'inhibition de la croissance de <i>B. subtilis</i> ^a
104b	1	H	90 ($\pm$ 1)	18 ($\pm$ 2)	-
104c	2	H	98 ($\pm$ 1)	0 ($\pm$ 2)	-
104d	3	H	96 ($\pm$ 1)	38 ($\pm$ 4)	-
104e	1	4-CH ₃	23 ($\pm$ 4)	0 ($\pm$ 2)	-
104f	1	4-Cl	21 ($\pm$ 4)	17 ($\pm$ 4)	-
104g	1	3,4-Cl	51 ($\pm$ 8)	9 ($\pm$ 4)	-
104h	1	4-OCH ₃	95 ($\pm$ 1)	34 ($\pm$ 2)	++

^a (-) : pas d'inhibition, (++) : inhibition observée

Tableau 16 : Effet de la substitution en N1 sur l'inhibition de la phosphorylation de HPr par **104b** et ses dérivés

2.4.2.4 Effet de l'introduction de groupements fonctionnels sur la chaîne latérale

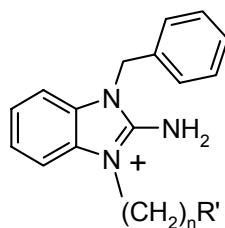
La seconde tête cationique du composé chef de file **50** a été remplacée par différents groupements, des cations (composés **107** et **110**), des anions (**105f**, **106**), des groupes hydrophobes (**105d-e**) et des systèmes accepteurs/donneur de liaisons H (**105g-n** et **105r-u**). Les résultats sont reportés dans le Tableau 17.

L'ensemble des données reportées dans le Tableau 17 nous permet de faire les commentaires suivants :

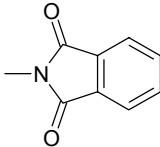
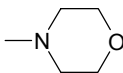
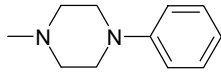
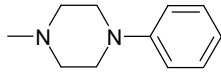
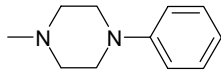
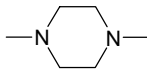
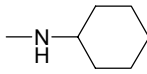
- (i) parmi les composés lipophiles **104b** et **105a-e**, seul le composé avec la longue chaîne ($n = 12$) conserve une activité inhibitrice significative ;
- (ii) l'introduction d'anions (acides carboxyliques **105f**, **106m-n**) et de systèmes accepteurs/donneurs de liaisons H (amides **105g-i**, **105r-t** et alcools **105l-n**) conduit à des composés inactifs. Seul le phthalimide **105u** et l'aniline **110c** présente une inhibition semblable au composé de référence **50**, avec une EC_{50} d'environ 10 μ M ;
- (iii) l'introduction d'une seconde tête cationique non hétérocyclique sur la chaîne latérale semble avoir un effet bénéfique sur l'inhibition.

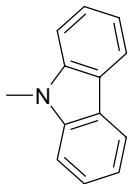
Premièrement, les bis-cations résultant des amines primaires (**107r-t**), secondaires (**110d**) ou tertiaires (**110g**) avec une chaîne relativement courte ($n < 6$) sont inactifs. Cependant à l'intérieur de la série de composés avec une longue chaîne ($n = 11, 12$) on observe une augmentation significative de l'inhibition lorsque l'amine porte un cycle aromatique (comparer **107t** avec **110d** et **110e**). On remarque que la deuxième tête cationique peut être remplacée par d'autres systèmes cationiques tels que la benzylamine (**110e**), la morpholine (**105f**), les N-méthyl- et N-phenylpipérazines (**110j** et **110i**). Cependant la présence d'un cycle aromatique sur la tête cationique semble produire un effet bénéfique, on observe une meilleure activité pour les composés **110e** et **110i** comparé aux composés **107t**, **110f**, **110j** et **110k**. Le dérivé d'aniline **110c**, qui n'est probablement pas protoné à pH 8, présente une activité inhibitrice significative. Il est probable qu'il participe à une interaction de type liaison H, tout comme le dérivé non-cationique phthalimide **105u**. Aucune inhibition de l'HPrK/P n'a été observée avec le composé **110v**. Le motif carbazole très encombrant empêche la liaison du cation dans la poche protéique. Par contre une augmentation de 20 % de la phosphorylation de

HPr par l'HPrK en présence de ce cation **110v** a été observée, celui-ci jouerait donc plutôt un rôle d'activateur.



Cposé	n	R'	% inhibition à 100 μ M (SEM), n=3	% inhibition à 10 μ M (SEM), n=3	inhibition de la croissance de <i>B. subtilis</i> ^a
50	12		88 ($\pm$ 1)	50 ($\pm$ 1)	++
105a	2	Me	14 ($\pm$ 2)	13 ($\pm$ 5)	-
105b	4	Me	32 ($\pm$ 2)	12 ($\pm$ 3)	-
105c	7	Me	55 ($\pm$ 22)	9 ($\pm$ 7)	-
104b	11	Me	90 ($\pm$ 1)	18 ($\pm$ 2)	-
105d	1	Ph	33 ($\pm$ 3)	13 ($\pm$ 4)	-
105e	3	Ph	20 ($\pm$ 7)	11 ($\pm$ 2)	-
105f	1	COOH	3 ($\pm$ 9)	2 ($\pm$ 3)	-
106m	5	COOH	10 ($\pm$ 2)	3 ($\pm$ 4)	-
106n	10	COOH	39 ($\pm$ 3)	2 ($\pm$ 2)	-
105g	5	CONH ₂	11 ($\pm$ 3)	3 ($\pm$ 5)	-
105h	1	CONHMe	7 ($\pm$ 5)	7 ($\pm$ 4)	-
105i	1	CONHPh	16 ($\pm$ 4)	13 ($\pm$ 2)	-

105l	3	OH	6 ($\pm$ 6)	4 ($\pm$ 7)	-
105m	6	OH	5 ($\pm$ 4)	13 ($\pm$ 2)	-
105n	11	OH	37 ($\pm$ 2)	9 ($\pm$ 3)	-
105r	3	NHBoc	12 ($\pm$ 5)	18 ($\pm$ 6)	-
105s	6	NHBoc	14 ($\pm$ 1)	9 ($\pm$ 5)	-
105t	11	NHBoc	96 ($\pm$ 1)	14 ($\pm$ 2)	+
105u	12		97 ($\pm$ 1)	40 ($\pm$ 2)	-
107r	3	NH ₂	24 ($\pm$ 10)	18 ($\pm$ 6)	-
107s	6	NH ₂	33 ($\pm$ 3)	12 ($\pm$ 5)	-
107t	11	NH ₂	62 ($\pm$ 2)	24 ($\pm$ 5)	-
110c	12	NHPh	96 ($\pm$ 1)	46 ($\pm$ 6)	-
110d	5	NHCH ₂ Ph	53 ($\pm$ 1)	12 ($\pm$ 2)	-
110e	12	NHCH ₂ Ph	96 ($\pm$ 1)	50 ($\pm$ 1)	++
110f	12		90 ($\pm$ 1)	31 ($\pm$ 4)	++
110g	5		34 ($\pm$ 2)	13 ($\pm$ 4)	-
110h	8		86 ($\pm$ 1)	33 ($\pm$ 8)	-
110i	12		96 ($\pm$ 1)	41 ($\pm$ 1)	++
110j	12		93 ($\pm$ 6)	35 ($\pm$ 5)	-
110k	12		93 ($\pm$ 1)	11 ($\pm$ 4)	-

110v	12		0	0	nt
-------------	----	---	---	---	----

^a (-) : pas d'inhibition, (++) : inhibition observée, nt : non testé

Tableau 17 : Inhibition de la phosphorylation de HPr par **50** et par ses dérivés

L'ensemble des données pharmacologiques fait ressortir les composés **105u**, **110c**, **110e** et **110i** comme étant les inhibiteurs les plus puissants de la série. Finalement l'activité inhibitrice du composé mono-cationique **105u** met en évidence que la seconde tête cationique présente dans le composé **50** n'est pas absolument indispensable pour inhiber l'HPrK. Cependant la présence d'un cycle aromatique à l'intérieur du groupement R' semble être favorable pour l'activité inhibitrice. L'amine ou l'amide servent de point d'ancrage pour introduire l'aromatique (Figure 15) qui peut établir des interactions hydrophobes additionnelles dans le site de liaison du cation dans l'HPrK.

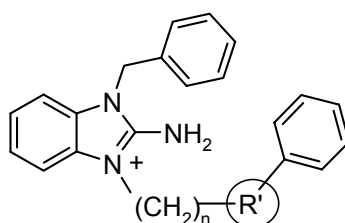


Figure 15 : Pharmacophore modèle pour les inhibiteurs d'HPrK/P.

n = 11, 12 ; R' = amine ou amide

Les cations **108t** et **109t** sur lesquels nous avons greffé un des peptides, L-Ser-L-Ile ($EC_{50} = 430 \mu M$), issu du criblage de la série peptidique présentée dans le paragraphe précédent (§ A.1), ont également été évalués dans un test de phosphorylation de HPr par l'HPrK/P. Les EC_{50} des deux composés sont comparables ($73 \mu M$ avec HPr et $138 \mu M$ avec Crh pour **108t**, et $95 \mu M$ avec HPr et $186 \mu M$ avec Crh pour **109t**), mais plus élevées que celle du composé de référence **50**. L'incorporation d'une tête peptidique sur le cation de référence conduit à un composé peu actif, bien que portant deux motifs favorables pour l'inhibiteur de l'HPrK.

L'effet des différents composés sur la croissance bactérienne a été évalué dans une culture de *B. subtilis* et de *E. coli*. Un effet inhibiteur a été observé avec les composés **105t**,

108t, **109t**, **110e**, **110f** et **110i** sur la culture de *B. subtilis*, par contre aucune inhibition n'a été observée sur la croissance de *E. coli*.

2.5 Conclusion

Contrairement à la plupart des inhibiteurs de protéines kinases qui sont compétitifs de l'ATP, le composé chef de file **50** issu du criblage de la chimiothèque patrimoine inhibe l'HPrK/P indépendamment de la concentration en ATP, ce qui suggère un autre mécanisme d'inhibition. En plus de l'inhibition de l'activité kinasique, le bis-cation **50** inhibe l'activité phosphatase de l'enzyme, ceci suggère une association étroite entre les deux activités. Une telle association entre les deux activités mettant en évidence le même site catalytique a été décrite pour l'HPrK/P de *B. subtilis*.^{70,71} De plus le composé **50** bis-cationique suggère un contact bivalent entre le composé et l'enzyme, et la longueur de la chaîne a été démontrée comme étant un paramètre critique. Quand la chaîne-espaceur est diminué de 12 à 5 carbones (Tableau 15), l' EC_{50} est multipliée par dix. Le modèle à deux sites de liaison est conforté par l'augmentation de la valeur de l' EC_{50} observé pour le monomère **104b**.

Le type d'interaction entre le composé **50** et l'HPrK/P n'est pas connu mais la structure du bis-cation inhibiteur indique qu'au moins un des sites de liaison doit être chargé négativement et contenir des groupements lipophiles. On peut également envisager l'existence d'une interaction de type π -cation entre le cation et des résidus aromatiques dans HPrK/P comme il a déjà été observé dans d'autres systèmes.⁷² Les composés actifs soulignent l'importance de la partie N-benzyl-2-aminobenzimidazole contenant une chaîne d'au moins 8 carbones. De plus, comme il a été montré dans les tableaux 16 et 17, les composés les plus actifs (pourcentage d'inhibition de plus de 40 % à 10 μ M) présentent différents motifs portant un cycle aromatique. L'activité des mono-cations **104b** et **105u** supporte le fait qu'au moins un des sites de liaison impliquant un cycle benzimidazole lipophile est le minimum requis pour la liaison à l'HPrK/P. De plus la découverte d'un activateur de la phosphorylation de HPr (composé **110v**) permet d'appuyer le fait que ces inhibiteurs cationiques dérivés de benzimidazoles ne sont pas des compétiteurs de l'ATP. Ce cation n'entre donc pas non plus en compétition avec le substrat. On peut donc faire l'hypothèse qu'il joue un rôle de modulateur

au niveau des interactions entre les différentes sous-unités favorisant la dissociation de l'hexamère (associé à l'activité phosphatase) en trimère (associé à l'activité kinase) et par le fait l'activité kinase.

Les N-benzyl-2-aminobenzimidazoles substitués en 1 représentés par le pharmacophore de la Figure 15, fait partie de la classe des amidines hétérocycliques symétriques liées par leur azote endocyclique. Ces bis-cations sont connus pour leurs effets pharmacologiques variés (antimicrobiens,⁷³ antifongique⁷⁴). De plus, ils agissent sur différentes cibles telles que des récepteurs (récepteurs muscariniques,⁷⁵ récepteurs-canaux⁷⁶) et des enzymes (protéine kinase C⁷⁷). Un criblage de la chimiothèque patrimoine avec une autre kinase, la CaMKII,⁷⁸ a fait ressortir un autre composé bis-cationique **111e** (Tableau 14). Il est intéressant de noter que l'optimisation au départ de la bispyridazine **111e** a mis en évidence le remplacement possible de la deuxième tête cationique par un groupement non cationique portant un cycle aromatique (voir § suivant).⁷⁹

En conclusion, au départ d'une touche bis-cationique dérivée de 3-benzyl-2-aminobenzimidazole, une première analyse des relations structure-activité identifie clairement cet hétérocycle comme une caractéristique spécifique nécessaire à l'inhibition de l'HPrK. La seconde tête cationique peut-être remplacée par un groupe non cationique portant un cycle aromatique. Des études supplémentaires permettraient d'optimiser la nature du point d'ancrage et du cycle aromatique. Ces composés, n'entrant pas en compétition avec l'ATP, pourraient fournir des informations très utiles pour le design d'inhibiteurs de protéines kinases puissants et plus sélectifs.

B- La CaMKII

1. Criblage de la Chimiothèque : dérivé d'aminopyridazine

Une des grandes thématiques de l'Institut Fédératif Gilbert Laustriat (IFR 85) dont notre laboratoire fait partie, consiste à développer un axe chimiothèque-ciblothèque-criblage comprenant : 1) le développement d'une collection académique de molécules collectées dans les laboratoires, stockées et référencées dans un format qui les rend propre à être utilisées facilement dans des tests biologiques (Chimiothèques dont celle de la Faculté de Pharmacie); 2) le développement d'une collection de cibles moléculaires (Ciblothèques) comprenant des

récepteurs couplés aux protéines G (neurokinines NK2, muscarinique M1, chemokines, NP-Y1-5, récepteurs orphelins), des cibles impliquées dans l'inflammation (Cytokines, NO synthases, cyclooxygénases, facteurs de transcription), des phosphodiesterases, des protéines kinases (MLCK, HPrK/P...); et 3) le développement d'une plate-forme de criblage et des tests de criblage permettant de tester les chimiothèques sur les cibles biologiques disponibles au sein de l'IFR ou sur des cibles venant de laboratoires extérieurs à l'IFR. La famille des protéines kinases a été utilisée pour valider ce projet et deux touches ont été obtenues, une première sur l'HPrK/P bactérienne (cf. § précédent), et une deuxième sur une kinase eucaryote, la CaMKII.

Le criblage de la chimiothèque avec la CaMKII a été effectué dans le cadre d'un projet mené par le Pr. Watterson (Northwestern University, Chicago) sur la neuroinflammation, caractéristique commune des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.⁷⁸ La neuroinflammation est un processus qui résulte de la présence de cellules gliales (astrocytes et microglia) activées de manière chronique dans le cerveau. L'activation des cellules gliales induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β) ou le TNF- α (tumor necrosis factor- α), et des enzymes liées au stress oxydatif telles que la "nitric oxide synthase" inducible (iNOS). Cette dernière génère l'oxyde nitrique (NO) et des espèces neurotoxiques dérivées du NO (peroxynitrite) qui contribuent aux dommages neuronaux associés à l'inflammation et au stress oxydatif. Il a été mis en évidence que les anti-inflammatoires qui modulent l'expression de iNOS dans les cellules gliales sont également des inhibiteurs compétitifs des Ser/Thr kinases dépendantes de la calmoduline, les CaMKs qui sont présentes dans les cellules gliales. Le criblage de chimiothèque par la CaMKII a été effectué dans le but de trouver une nouvelle classe de composés anti-inflammatoires.

A l'issue de ce criblage, un composé bis-cationique dérivé de pyridazine a été sélectionné pour son activité inhibitrice vis-à-vis de la CaMKII (Figure 16).

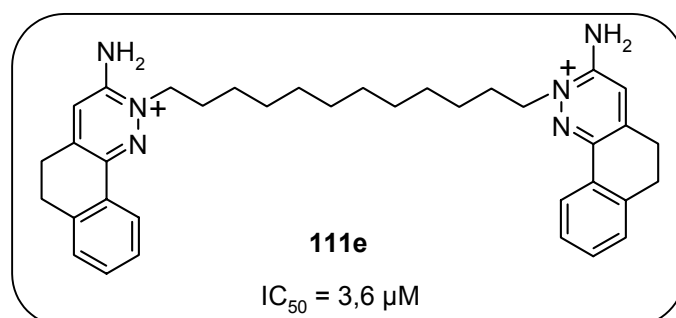


Figure 16 : touche sur la CaMKII

L'optimisation au départ de la bispyridazine **111e** a mis en évidence le remplacement possible de la deuxième tête cationique par un groupement non cationique portant un cycle aromatique (Figure 17). Le meilleur composé **112a** inhibe la CaMKII avec une EC_{50} de 9,7 μ M et présente une bonne sélectivité vis-à-vis d'autres protéines kinases telles que la p38 MAPK, la PKA et la PKC ($IC_{50} > 100 \mu$ M), et aucune inhibition n'est observée avec une CaMK apparentée à la CaMKII, la MLCK ($IC_{50} > 100 \mu$ M).⁷⁹ Le composé **112b** dans lequel le pont carboné entre les deux aromatiques a été supprimé a donné des résultats similaires.

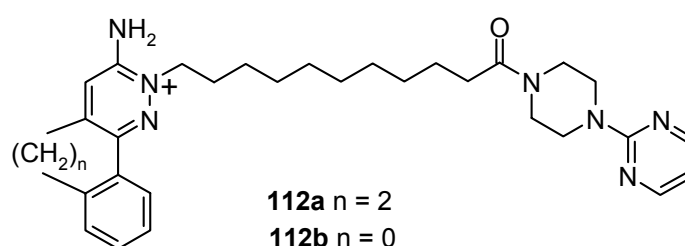
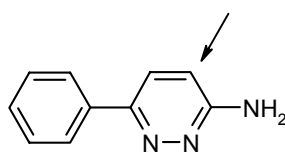


Figure 17 : Optimisation de **111e**

Dans le cadre d'une collaboration avec le "Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry" dirigé par le Pr. Watterson à Chicago, nous avons entrepris pour notre part, l'exploration de la tête cationique en introduisant de la diversité en position 4 du cycle pyridazine.



2. Optimisation structurale

2.1 Les 3-aminopyridazines : données bibliographiques

Les 3-aminopyridazines font partie de la grande famille des amidines hétérocycliques présentée au paragraphe A.2 précédent. De nombreuses aminopyridazines possèdent des propriétés pharmacologiques très intéressantes. Parmi elles, la minaprine (Cantor®, Figure

18), un antidépresseur développé au laboratoire par l'équipe du Pr. Wermuth, est un des plus important représentant de cette famille hétérocyclique.

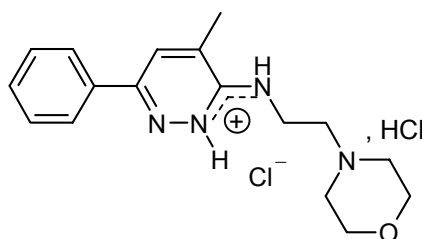


Figure 18 : Structure de la minaprine

2.1.1 Synthèse conventionnelle des 3-amino-6-arylpyridazines

La synthèse conventionnelle des 3-amino-6-arylpyridazines **116** met en œuvre trois réactions (Schéma 20).

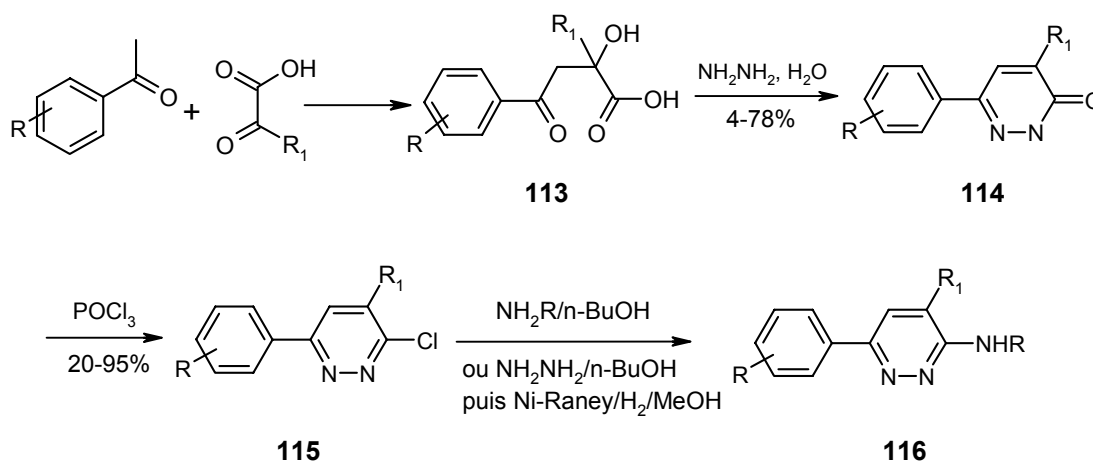


Schéma 20 : Synthèse conventionnelle des 3-amino-6-arylpyridazines

La première étape est conditionnée par l'obtention de 6-arylpyridazinones diversement substituées **114**. Une préparation en une seule étape ("one-pot"), développée par Coates,⁸⁰ a été largement utilisée au laboratoire.^{81,82} À partir de l'acétophénone désirée, l'acide γ -céto- α -hydroxycarboxylique correspondant **113** est formé par condensation aldolique thermique sur les acides α -cétocarboxyliques. Puis, sans aucun isolement, les étapes de cyclisation et de déshydratation s'effectuent en présence d'un excès d'hydrazine. Les rendements globaux varient entre 4 et 78 % en fonction des substituants présents.

Dans un deuxième temps, les 3-chloro-6-arylpuridazines **115** sont obtenues à partir des puridazinones correspondantes, par action de l'oxychlorure de phosphore. Les rendements varient en fonction des substituants entre 20 et 95 %.

Enfin, l'accès aux aminopuridazines est basé sur une réaction de substitution nucléophile aromatique entre une 3-chloro-6-arylpuridazine et une amine primaire.

La réaction de substitution nucléophile aromatique est souvent assimilée à une réaction d'addition-élimination. En général, ce type de réaction n'est possible que sur des systèmes aromatiques électroniquement appauvris, tels qu'un benzène désactivé par des groupes électroattracteurs ou un hétérocycle aromatique π -déficient. Cette réaction peut se décomposer en deux étapes. Dans un premier temps, le nucléophile attaque l'hétérocycle aromatique. Bien que le cycle puridazinique soit appauvri en électrons, les effets électroniques contrariants des deux atomes d'azote vicinaux gênent cette réaction.⁸³ En effet, l'addition nucléophile est favorisée en série purimidinique par un effet mésomère. En revanche, en série puridazinique, l'attaque du nucléophile est contrariée par un effet mésomère donneur de l'imine vicinale (N-1) (Figure 19).

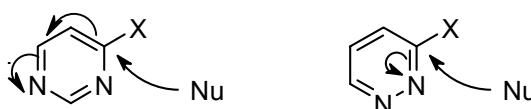


Figure 19 : Addition nucléophile en série purimidinique et puridazinique

Ainsi, l'attaque nucléophile par l'amine primaire aboutit à la formation d'un intermédiaire anionique dont l'existence est défavorisée par la localisation des densités électroniques des atomes voisins. L'élimination d'une molécule de HX conduit dans un deuxième temps à la réaromatisation du cycle puridazinique (Figure 20).

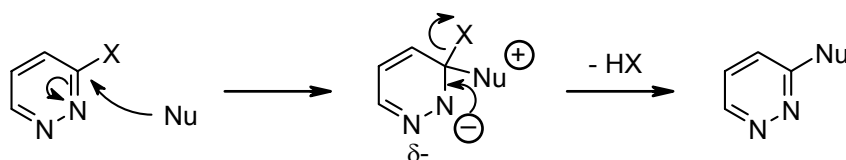


Figure 20 : Substitution nucléophile aromatique sur une 3-halogénopuridazine

La réaction de la puridazinone avec l'hydrate d'hydrazine a été très utilisée au laboratoire et donne des rendements > 70 %.⁸⁴ Cependant l'accès aux 3-aminopuridazines correspondantes par hydrogénation reste difficile. De meilleurs rendements ont été décrits par

Simtamze⁸⁴ en présence de Ni-Al, cependant le succès de la réaction dépend fortement de la qualité de l'alliage mis en jeu.

En conclusion, l'accès aux aminopyridazines est long (plusieurs étapes de réaction) et nécessite souvent des extractions fastidieuses. De plus cette synthèse est non convergente puisque le substituant R₁ est introduit dès la première étape. Nous nous sommes alors intéressés à des méthodes de synthèses convergentes mettant en jeu des réactions de couplage catalysées par le palladium.

2.1.2 Nouvelles voie d'accès aux pyridazines par couplage palladium

Récemment plusieurs auteurs ont décrit des réactions de couplage catalysées par le palladium permettant l'introduction de divers substituants aromatiques et hétéroaromatiques, en position 6 du noyau 3-aminopyridazine.^{85,86,87,88}

2.1.2.1 Introduction de diversité en position 6 des aminopyridazines

Guéry⁸⁷ et Maes⁸⁸ ont développé une voie de synthèse en une étape au départ de la 3-amino-6-chloropyridazine non substituée sur l'azote exocyclique **117**, permettant de préparer rapidement des 3-amino-6-(hétéro)arylpypyridazines **118** à partir d'acides boroniques (couplage de Suzuki) et de stannanes (couplage de Stille) avec de bons rendements (40-95 %, Schéma 21).

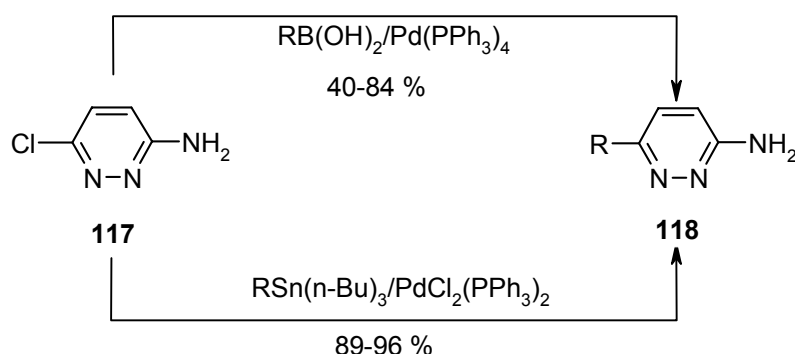


Schéma 21 : Couplage palladium sur la 3-amino-6-chloropyridazine

2.1.2.2 Introduction de diversité en position 5 des pyridazinones et des 3-chloropyridazines

Par la suite ce type de couplage a été appliqué à la synthèse de pyridazinones substituées en position 5^{89,90} à partir de 5-bromo-6-phénylpyridazinones **119** N2-protégées par un groupement méthoxyméthyle (R' = Me) ou d'hydroxyméthyle (R' = H), la présence du NH libre inhibant totalement la réaction de couplage catalysée par le palladium. Des réactions de type Suzuki, Heck, Stille et Sonogashira ont été réalisées (Schéma 22) et ont conduit aux pyridazinones **120** substituées en position 5 par des groupements variés avec des rendements de 70-93 %.

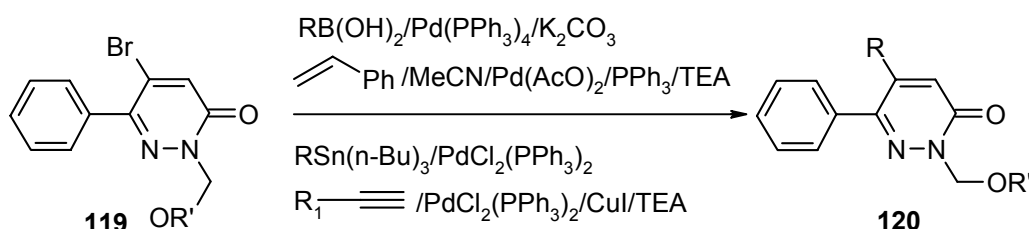


Schéma 22 : Introduction de diversité en position 5 des pyridazinones

Une alternative à la protection des pyridazinones a été décrite par Sotelo.⁹¹ Ces auteurs ont développé une réaction de couplage régiosélective basée sur la réactivité différenciée des halogènes. Ils ont ainsi introduit, dans les conditions de Suzuki des groupements aromatiques et hétéroaromatiques en position 4 de la 4-bromo-6-chloro-3-phénylpyridazine **121** (Schéma 23).

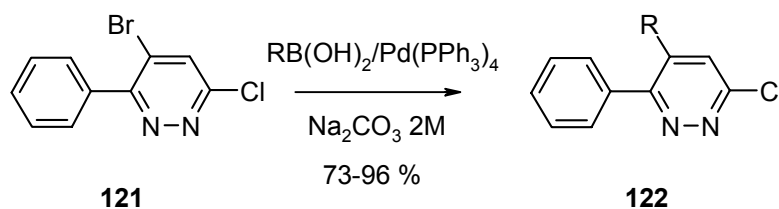
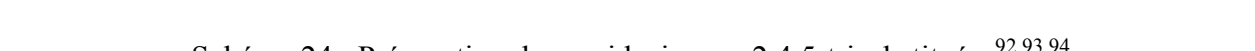


Schéma 23 : Réaction pallado-catalysée régiosélective de Sotelo

2.1.2.3 Introduction de diversité en position 4 et/ou 5 des pyridazinones

Des réactions de couplage catalysées au palladium sélectives permettant l'obtention de pyridazinones 2,4,5-trisubstituées **123** ont également été décrites.^{92,93,94} Les auteurs qui ont



C'est pourquoi nous avons envisagé la préparation des 3-amino-6-phénylpyridazines

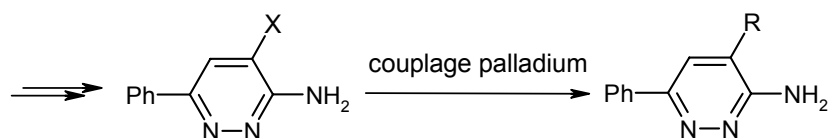


Schéma 25 : Stratégie d'introduction de diversité en position 4 des 2-aminopyridazines

Notre point de départ a été une observation faite au laboratoire par Françoise Bécart⁹⁵ lors de la synthèse d'un analogue de la minaprine portant en position 4 un groupement nitro.⁸² De manière inattendue lors de la formation du chlorhydrate de la 3-morpholinoéthylamino-4-nitro-6-phénylpyridazine **126** dans une solution acide méthanolique, un léger chauffage a entraîné la formation de l'analogue chloré en position 4 (composé **127**, Schéma 26).

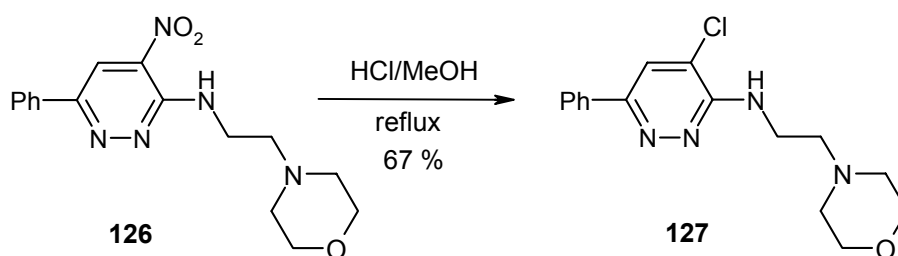


Schéma 26 : Synthèse de la 4-chlorominaprine

La substitution de ce groupement nitro avait également été observée de manière inattendue lors de la réaction de la 3-(méthylthio)-4-nitro-6-phénylpyridazine **128** avec la morpholinoéthylamine (Schéma 27). Ceci est dû au fait que, dans certaines réactions de substitution nucléophiles aromatiques, le groupe nitro peut-être un bon nucléofuge.

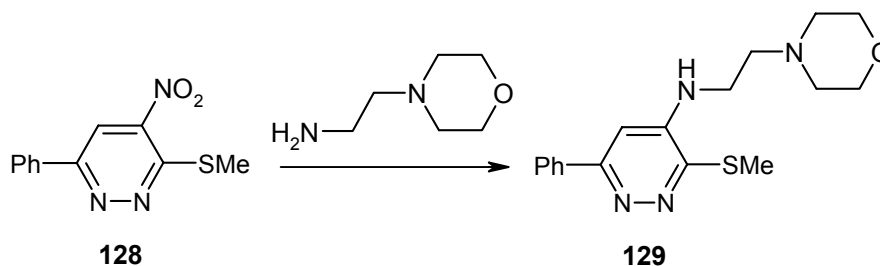


Schéma 27 : Réaction de la morpholinoéthylamine sur la 3-(méthylthio)-4-nitropyridazine

2.2.1 Préparation du synthon 3-amino-4-nitro-6-phénylpyridazine

Nous avons donc entrepris la synthèse de la 3-amino-4-nitro-6-phénylpyridazine protégée en position 3 par un groupement benzyle ou un groupement 2,4-diméthoxybenzyle

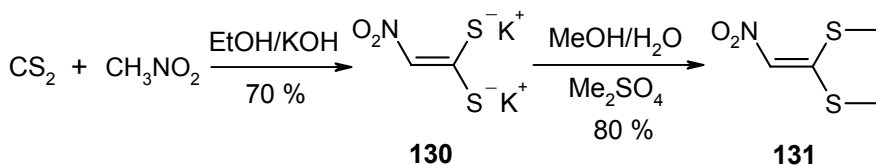
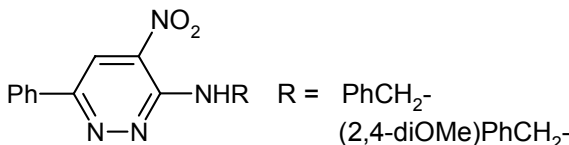
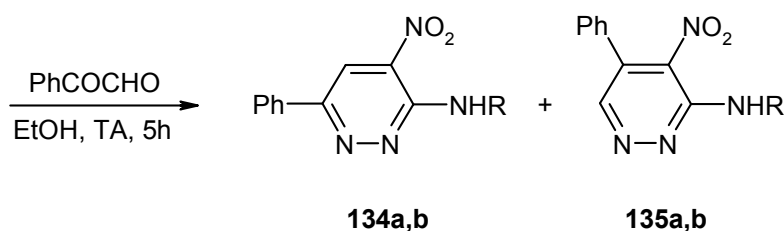
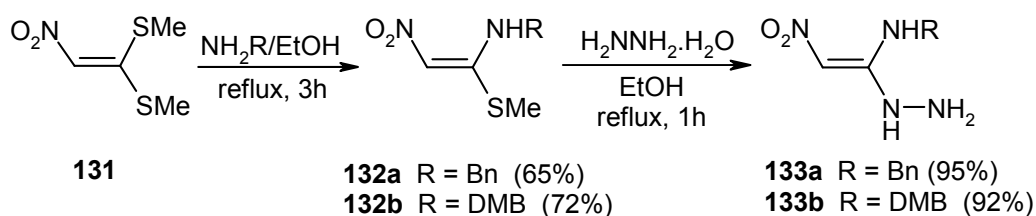
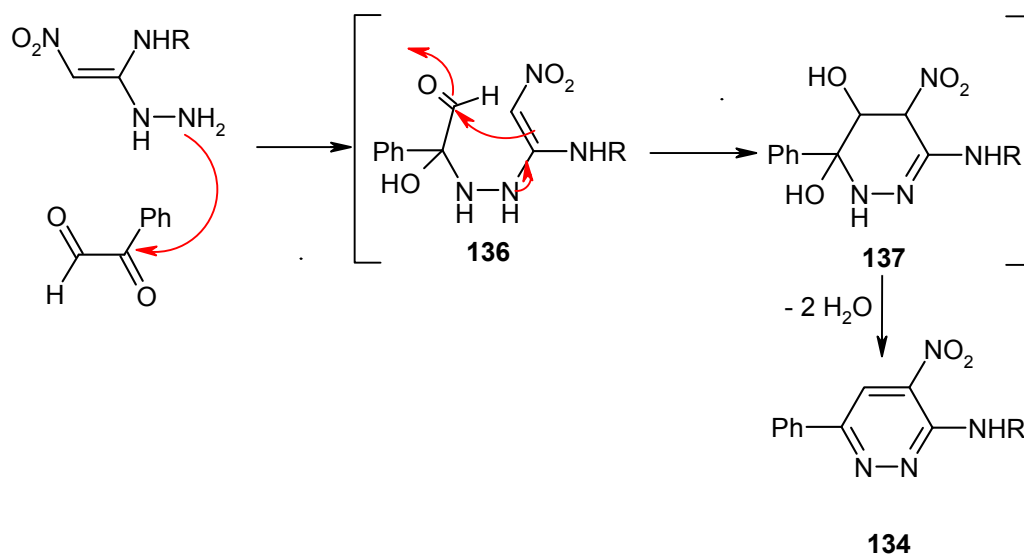
Schéma 28 : Préparation du 1,1-bis(méthylthio)-2-nitroéthylène **131**

Schéma 29 : Préparation des 4-nitroaminopyridazines **134a-b**

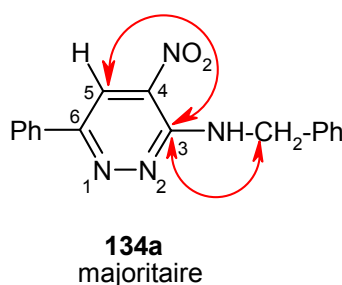
Des essais de substitution du composé dithiométhylé **131** par l'hydrazine hydrate, dans un premier temps, puis par la benzylamine, n'ont pas donné de résultats satisfaisants, nous avons observé la formation de produits secondaires. La réaction de cyclisation du composé **133a** avec le phénylglyoxal (diélectrophile 1,1) a été réalisée dans l'éthanol à température ambiante.^{82,95} Dans ces conditions nous avons observé la formation de deux produits de masse identique, les régioisomères 5-phényl- et 6-phénylbenzylaminopyridazine **134a** et **135a**. L'isomère **134** qui nous intéresse est obtenu par l'attaque de l'amine primaire de l'hydrazine sur le carbonyle cétonique du phénylglyoxal conduisant à une imine **136** (Figure 21). Par délocalisation électronique du système énamine, le carbone portant le groupe nitro peut attaquer le deuxième carbonyle électrophile de l'aldéhyde (formellement l'aldéhyde du glyoxal). Le composé formé **137** se réaromatise rapidement pour donner la 6-phénylpyridazine **134**.

Figure 21 : Mécanisme proposé pour la formation de **134**

L'isomère **135** est obtenu par l'attaque initiale de l'amine primaire de l'hydrazine sur le carbonyle aldéhydique. La formation de ce régioisomère est normalement favorisée quand la réaction de cyclisation est réalisée en présence d'une base. Cette observation a été faite par Bécart lors de la préparation de la 2-morpholinoéthylamino-4-nitro-phénylpyridazine.⁹⁵

Ces deux régioisomères présentent des propriétés physiques différentes. L'isomère le moins polaire (R_f de 0,7 dans AcOEt/hexane 1/2) précipite dans le milieu réactionnel et est

récupéré par filtration avec un rendement de 53 % alors que le deuxième, plus polaire, est isolé des eaux mères par chromatographie sur colonne de silice (23 %). Afin de déterminer la structure des deux composés obtenus, nous avons réalisé différentes analyses RMN du proton et du carbone et RMN à deux dimensions. Le composé le moins polaire présente un singulet, caractéristique du proton présent sur l'hétérocycle, à 8,40 ppm contre 8,79 ppm pour le composé le plus polaire. Des expériences hsqc permettant de déterminer l'existence de couplages carbone-proton à distance (3J) ont été réalisées par Cyril Antheaume. Pour le composé le moins polaire, des corrélations entre le carbone C3 et les protons benzyliques ont été observées, ainsi qu'une corrélation de C3 avec le proton de l'hétérocycle alors qu'aucune corrélation n'a pu être observée entre C3 et le proton hétérocyclique pour le deuxième composé. Le produit majoritaire formé est donc le régioisomère portant le groupement phényle en position 6.



Composé	R	Rdt (%)	Proportion 134/135
134a/135a	Bn	76	70/30
134b/135b	DMB	70	60/40

Tableau 18 : Préparation des composés **134** et **135**

La réaction de cyclisation du dérivé diméthoxylé **133b** avec le phénylglyoxal donne des résultats sensiblement identiques, la proportion en composé 6-phényle **134b** étant légèrement inférieure (60%, Tableau 18).

2.2.2 Préparation des 4-bromo-6-phénylaminopyridazines

Un premier traitement de la 4-nitropyridazine **134a** avec HBr aqueux (48 %) nous a permis d'obtenir le dérivé 4-bromo correspondant **138a** avec un rendement de 30%. Dans ces conditions la réaction n'est pas totale, nous avons récupéré une grande partie du produit de départ (50 %). La réaction réalisée avec une solution d'HBr dans l'acide acétique a conduit au même résultat. Dans des conditions plus dures, c'est à dire sous pression (tube scellé à 90 °C), nous avons pu améliorer nettement les rendements et les dérivés bromés **138a** et **138b** ont été obtenus avec des rendements de 50 et 75 %, respectivement. Dans ces conditions, nous avons observé la déprotection de l'amine 2,4-diméthoxybenzylée conduisant ainsi à la 3-amino-4-bromopyridazine **138b** (Schéma 30).

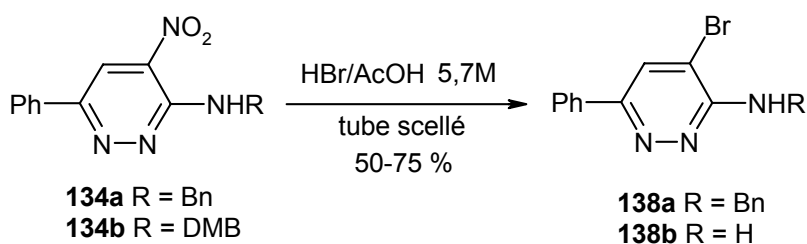


Schéma 30 : Synthèse des 4-bromopyridazines **138a-b**

Contrairement aux résultats observés précédemment à partir du dérivé nitré S-méthylé **128** en présence d'amine nucléophile, un essai de déplacement du groupement nitro du composé **134b** par la benzylamine dans le butanol à reflux a laissé le produit de départ inchangé même après 48 h de réaction.

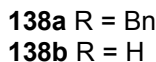
2.2.3 Réactions pallado-catalysées : accès à des pyridazines diversement substituées en position 4

2.2.3.1 Couplage de type Suzuki

A notre connaissance, aucune réaction de couplage palladium en position 4 des 3-aminopyridazines n'est décrite dans la littérature. Nous nous sommes donc intéressées à la faisabilité de ce couplage pallado-catalysé entre nos composés 4-bromopyridazines **138a-b** et des acides phénylboroniques diversement substitués. Nous avons alors repris les conditions

138a R = Bn
138b R = H

139 R = Bn
140 R = H

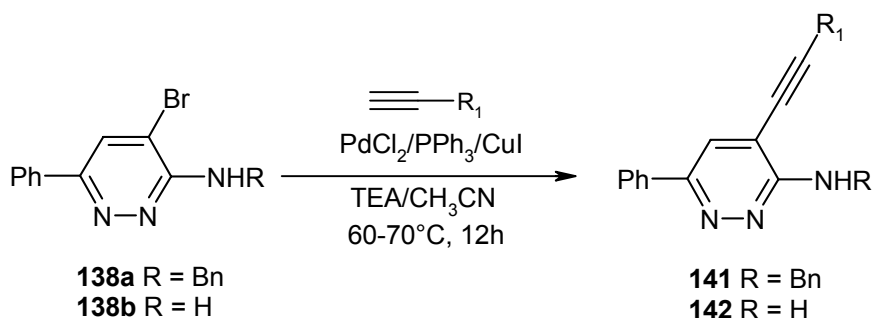


Dans ces conditions nous avons obtenu les composés **139b-c** et **140a-f** avec de bons rendements (60-92 %, Tableau 19).

- : réaction non réalisée

La présence de l'amine primaire non protégée sur le composé bromé **138b** n'a pas perturbé le couplage avec les acides arylboroniques, et des rendements tout à fait satisfaisants sont obtenus avec les acides boroniques encombrés (2-OMe, 2-Br).

Suite à ces résultats encourageants nous avons engagé nos dérivés bromés **138a-b** dans des conditions classiques de Sonogashira mettant en jeu des dérivés acétyléniques, une quantité catalytique (0,1 éq.) de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ et de CuI . Les composés **141** et **142** ont été obtenus avec des rendements variant de 40 à 88 % (Tableau 20).



Composé	R ₁	Rdt en composé 141 (%)	Rdt en composé 142 (%)
142a	TMS	-	88
141b-142b	Ph	79	65
141c-142c	(CH ₂) ₃ OBn	40	45
142d	CH ₂ NHBoc	-	60

- : réaction non réalisée

Tableau 20 : Préparation de 4-alkyne-2-aminopyridazines **141-142**

2.2.3.3 Déprotection des N-benzylaminopyridazines

Les N-benzyl-6-phénylaminopyridazines **139b-c** et **141b-c** nécessitent une étape supplémentaire de déprotection afin de conduire aux aminopyridazines correspondantes.

Les essais de déprotection par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon, de dihydroxyde de palladium sur charbon ou de nickel de Raney n'ont pas permis de déplacer le groupement benzylique. Le traitement de ces benzylaminopyridazines en présence d'AlCl₃/DMA laisse également le produit de départ inchangé.

2.2.3.4 Accès aux 4-alkylpyridazines

Les 4-alkynylpyridazines **142c-d** ont été transformées en 4-alkylpyridazines correspondantes par hydrogénation catalytique.

Un premier essai avec 10 % (masse/masse) de Pd/C dans un mélange éthanol/dichlorométhane à 55 psi a laissé le produit de départ inchangé. Les alkylpyridazines **143b** et **143d** ont pu être obtenues par hydrogénation catalytique en présence de 30 % Pd/C sous une pression de 75 psi avec de bons rendements de 75 et 50 %, respectivement.

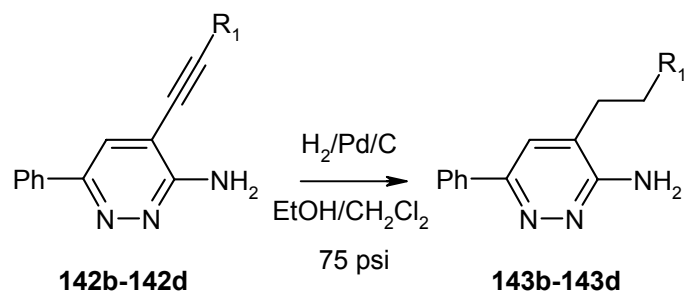


Schéma 32 : Hydrogénation catalytique des alkynylpyridazines **142b** et **142d**

2.3 Construction des cations dérivés de 3-aminopyridazines

Les cations dérivés des aminopyridazines ont été synthétisés par l'équipe américaine du Pr. Watterson selon les conditions décrites par Mirzoeva et al⁷⁹ et reportées dans le Schéma 33.

Les pyridazines **140** et **143** sont alkylées par le 11-bromoundécanoate d'éthyle dans la DMF puis, après l'hydrolyse de l'ester, les acides correspondants **144** sont couplés à la 1-(2-pyrimidyl)pipérazine en présence de HOBT/EDC⁹⁶ pour conduire aux cations **145** (les rendements ne nous ont pas été communiqués).

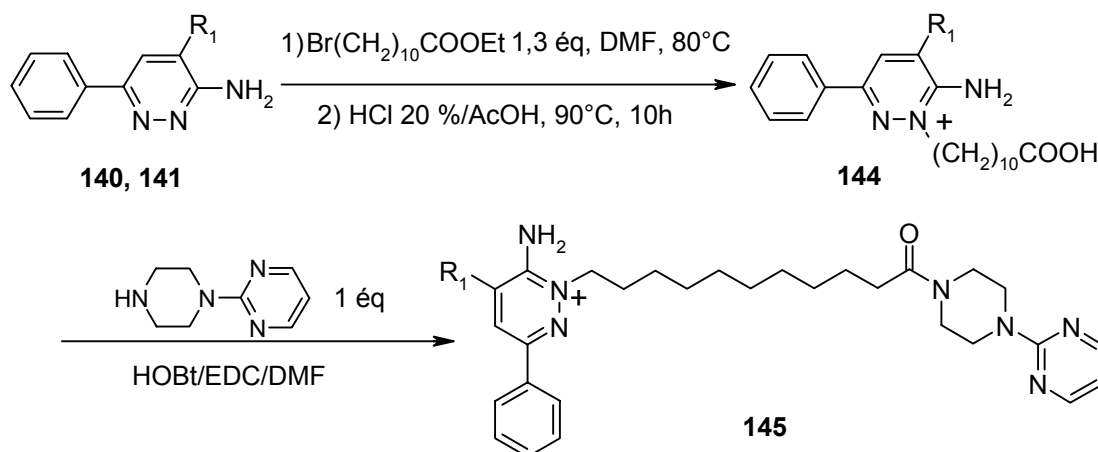
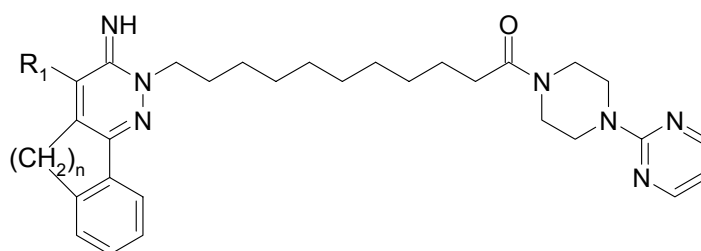


Schéma 33 : Préparation des cations dérivés des aminopyridazines

3. Etude des relations structure activité

L'incorporation d'un aromatique en position 4 de l'aminopyridazine a entraîné un effet défavorable sur l'activité inhibitrice du cation de référence (27 μ M pour **145a** contre 9,7 μ M pour **112a**) ainsi qu'au niveau de sa sélectivité puisqu'il inhibe la MLCK avec une IC₅₀ de 15 μ M (Tableau 21).

Dans un test d'inhibition sur une culture de cellules gliales, qui répondent à l'addition de lipopolysaccharides par une augmentation de iNOS et de IL-1 β , on observe un effet inhibiteur important de **145a**, cependant cette inhibition n'est pas uniquement liée à l'inhibition de la CaMKII puisqu'une inhibition de la voie des p38 MAPK (impliquée dans les phénomènes inflammatoires)⁷⁸ est également observée en présence de notre composé **145a**. La substitution de la position 4 du noyau aminopyridazine entraîne une diminution nette de la sélectivité. Cependant on déplace l'activité inhibitrice vers la MLCK. Le motif 6-phénylaminopyridazine ponté trouvé dans le composé **112a** est donc un requis structural nécessaire pour inhiber la CaMKII. Suite à ces résultats les autres composés **145** n'ont pas été testés.



IC ₅₀ (μ M)							
Composé	R ₁	n	CaMKII	p38 MAPK	MLCK	PKC	PKA
112a	H	2	9,7	> 100	> 100	> 100	> 100
145a	Ph	0	27	Voie de signalisation inhibée (résultats par western blot)	15	> 100	> 100
Test BV-2 (inhibition de l'activation des cellules gliales)							
145a	Ph	0	IC ₅₀ = 0,9 μ M				

Tableau 21 : Activité inhibitrice de **145a** vis-à-vis de CaMKII et sélectivité

La modification de la chaîne latérale entraîne également un changement dans le profil d'inhibition des cation dérivés des aminopyridazine. En effet, une optimisation de la chaîne latérale du bis-cation de référence **111e** a permis d'obtenir un composé **146** (Figure 22) inhibant une autre kinase régulée par la CaM, la kinase associée à la mort cellulaire : la DAPK, avec une IC₅₀ de 13 μ M et présentant une bonne sélectivité vis-à-vis de la CaMKII, de

la PKA et de la PKC ($IC_{50} > 100\mu M$).⁹⁶ La modification du cycle pyridazine a également mis en évidence l'importance du noyau aminopyridazine ponté pour l'inhibition de la DAPK, puisque la suppression de ce pont carboné ainsi que la suppression du groupement aromatique en position 6 du noyau aminopyridazine conduit à des composés peu ou pas actifs sur la DAPK mais inhibant la protéine kinase C. Une évaluation de l'activité inhibitrice de nos composés sur cette kinase est en cours afin de mettre en évidence l'effet de substitution de la position 4 sur l'activité inhibitrice de ces cations.

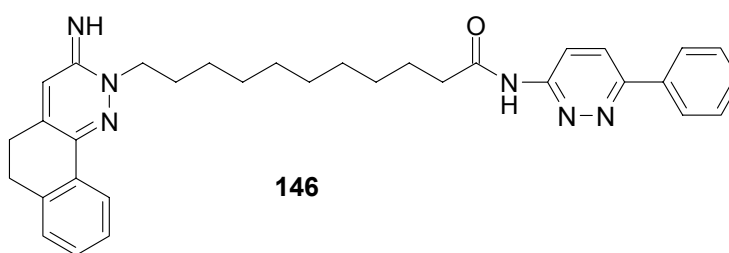


Figure 22 : Inhibiteur de la DAPK

Des inhibiteurs puissants de la DAPK pourraient conduire à une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des attaques cérébrales aiguës.

C- Conclusion

L'étude pharmacologique des bis-cations s'est révélée plutôt décevante puisque aucun des composés synthétisés ne possède d'activité inhibitrice supérieure aux composés chefs de file desquels ils sont dérivés. Cependant dans la recherche d'inhibiteurs pour l'HPrK/P, l'étude des relations structure-activité a permis de déterminer les requis structuraux nécessaires pour obtenir un inhibiteur puissant. De plus la découverte d'un activateur permet de mieux comprendre le mode d'action de cette famille cationique dérivée des aminobenzimidazoles.

En ce qui concerne les cations dérivés des aminopyridazines, peu de résultats ont été obtenus, cependant l'importance de la tête cationique aminopyridazine pontée pour l'inhibition de la CaMKII a été mise en évidence. Une évaluation de nos composés avec la MLCK permettrait peut-être de découvrir de nouveaux inhibiteurs pour cette kinase.

De manière plus générale, les composés symétriques ou dissymétriques de type bis-cations et présents dans notre chimiothèque ont été aussi identifiés comme hits sur des cibles variées (RCPG muscariniques et NK', récepteur nicotinique, enzymes (AChE), apamine) et

des essais cellulaires. Ce grand manque de sélectivité des bis-cations restreint malheureusement leur intérêt comme agents thérapeutiques intéressants par leur toxicité potentielle. Il en demeure pas moins vrai qu'ils constituent des outils pharmacologiques efficaces pour mieux comprendre le rôle physiologique de cibles originales, lorsque aucun ligand agissant sur ces cibles n'est connu.

Bibliographie du Chapitre II

- ⁵⁰ Saier M. H. Jr., Chauvaux S., Deutscher J., Reizer J., Ye, J.J. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, 20, 267-271.
- ⁵¹ Galinier A., Kravanja M., Engelmann R., Hengstenberg W., Kilhoffer M.C., Deutscher J. & Haiech J. New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, 95, 1823-1828.
- ⁵² Ramström H. (2002). Caractérisation de l'enzyme HPr kinase/phosphatase de *Bacillus subtilis* et recherche d'inhibiteurs spécifiques. Thèse de doctorat. Laboratoire de Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, Illkirch. Université Louis Pasteur Strasbourg.
- ⁵³ Porthogese P.S. Bivalent ligands and the message-address concept in the design of selective opioid antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1989**, 10, 230-235.
- ⁵⁴ Horwell, D.C. The design and biological properties of 'dipeptoid' antagonists. *Medicinal Chemistry: Principles and Practice*. **1994** Ed. RSC., Chap.17, 255-264.
- ⁵⁵ Rudolf K., Eberlein W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck-Sickinger A.G., Doods H.N. The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY & receptor antagonist: BIBP3226. *Eur. J. Pharmacol.*, **1994**, 271, R11-R13.
- ⁵⁶ Schilling W., Bittiger H. Approaches towards the design and synthesis of non-peptidic substance-P antagonists. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, **1993** Ed. VCH, 209-220.
- ⁵⁷ Travaux effectués au laboratoire.
- ⁵⁸ Bourotte M. (1999). Synthèse de petits peptides dérivés de la sérine comme inhibiteurs de l'HPrK. Rapport dans le cadre du Diplôme d'Etudes Approfondies. Laboratoire de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire, Illkirch. Université Louis Pasteur Strasbourg.
- ⁵⁹ Chayer S. (1998). Nouveaux aspects de la réactivité des amidines hétérocycliques : analyse entre leurs structures et leurs activités pharmacologiques. Thèse de doctorat. Laboratoire de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire, Illkirch. Université Louis Pasteur Strasbourg.
- ⁶⁰ Steck E. A., Ewing G. W. Absorption Spectra of Heterocyclic Compounds. II. Amino-Derivatives of Pyridine, Quinoline and Isoquinoline. *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 3397.
- ⁶¹ Forlani L., Maria P. D. Tautomerism of aminothiazole. pKBH⁺ values of 2-aminothiazoles and of some model imines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1982**, 5, 535-537. Stewart R., Harris M. G. Comparison of the acidities and basicities of amino-substituted nitrogen heterocycle. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 3123-3126. Lumma W. C., Randall W. C., Cresson E. L., Huff J. R., Hartman R. D., Lyon T. F. Piperazinylimidazo[1,2-a]pyrazines with selective affinity for in vitro α -adrenergic receptor subtypes. *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 357-363.
- ⁶² Harris W., Singleton UJ., Coburn M. D. *J. Het. Chem.*, **1973**, 167.
- ⁶³ Hunter R. F., Perken E. R., Short E. M. Unsaturation and tautomeric mobility of heterocyclic compounds. XIII. Methylation of aminothiazoles. *J. Chem. Soc.*, **1959**, 784-788.
- ⁶⁴ Rastogi R., Sharma S. 2-Aminobenzimidazoles in Organic Syntheses. *Synthesis*, **1983**, 861-882.
- ⁶⁵ Ramström H., Bourotte M., Philippe C., Schmitt M., Haiech J., Bourguignon J. J. Heterocyclic bis-cations as starting hits for design of inhibitors of the bifunctional enzyme, HPr kinase/phosphatase, from *Bacillus subtilis*. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 2264-2275.
- ⁶⁶ Kikugawa Y. A facile N-Alkylation of Imidazoles and Benzimidazoles. *Synthesis*, **1981**, 124-125.

- ⁶⁷ Vlaovic D., Canadanovic-Brunet J., Balaz J., Juranic I., Djokovic D., Mackenzie K. Synthesis, Antibacterial, and Antifungal Activities of Some New Benzimidazoles. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56, 199-206.
- ⁶⁸ Ruzicka L., Salomon G., Meyer K. E. Many-membered heterocyclic compounds. XI. Preparation of 14-, 15- and 17-membered cyclic imines from aliphatic bromoamines. Survey of the properties of many-membered cyclic imines. *Helv. Chim. Acta*, **1937**, 20, 109-128
- ⁶⁹ Li X., Mintz E. A., Bu X. R., Zehnder O., Bosshard C., Günter P. Phase Transfer Catalysis for Tandem Alkylation of Azo Dyes for the Synthesis of Novel Multifunctional Molecules. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 5785-5791.
- ⁷⁰ Hanson K. G., Steinhauer K., Reizer J., Hillen W., Stülke, J. HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: Expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology*, **2002**, 148, 1805-1811.
- ⁷¹ Galinier A., Lavergne J. P., Geourjon C., Fieulaine S., Nessler S. *et al.* A new family of phosphotransferases with a P-loop motif. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 16, 16.
- ⁷² Dougherty D. A. Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, **1996**, 271, 163-168.
- ⁷³ Bailey D. M., DeGrazia C. G., Hoff S. J., Schulenberg P. L., O'Connor J. R. *et al.* Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque. *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 1457-1464.
- ⁷⁴ Del Poeta M., Schell W. A., Dykstra C. C., Jones S., Tidwell R. R. *et al.* Structure-in vitro activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42, 2495-2502.
- ⁷⁵ Ilien B., Franchet C., Bernard P., Weill C., Bourguignon J. J. *et al.* Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and identify biologically active compounds. *Submitted*.
- ⁷⁶ Galanakis D., Ganellin C. R., Malik S., Dunn P. M. Synthesis and pharmacological testing of dequalinium analogues as blockers of the apamin-sensitive $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated K^+ channel: variation of the length of the alkylene chain. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 3592-3595.
- ⁷⁷ Qin D., Sullivan R., Berkowitz W. F., Bittman R., Rotenberg S. A. Inhibition of Protein Kinase C alpha by Dequalinium Analogues: Dependence on Linker Length and Geometry. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 1413-1417.
- ⁷⁸ Watterson D. M., Mirzoeva S., Guo L., Whyte A., Bourguignon J. J. *et al.* Ligand modulation of glial activation: cell permeable, small molecule inhibitors of serine-threonine protein kinases can block induction of interleukin 1 beta and nitric oxide synthase II. *Neurochem. Int.*, **2001**, 39, 459-468.
- ⁷⁹ Mirzoeva S., Sawkar A., Zasadzki M., Guo L., Velentza A. V. *et al.* Discovery of a 3-amino-6-phenyl-pyridazine derivative as a new synthetic antineuroinflammatory compound. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 563-566.
- ⁸⁰ Coates W. J., McKillop A.. One-pot preparation of 6-substituted 3(2H)-pyridazinones from ketones. *Synthesis*, **1993**, 3, 334-342.
- ⁸¹ Wermuth C. G., Schlewer G., Bourguignon J. J., Maghioros G., Bouchet M. J., Moire C., Kan J. P., Worms P., Biziere K.. 3-Aminopyridazine derivatives with atypical antidepressant, serotonergic, and dopaminergic activities. *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 528-537.
- ⁸² Contreras J. M., Rival Y. M., Chayer S., Bourguignon J. J., Wermuth C. G. Aminopyridazines as Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 730-741.
- ⁸³ Restlé S., Wermuth C. G. Introduction de chaînes latérales alkylidéniques en position 3 de pyridazines. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 50, 4837-4850.
- ⁸⁴ Sitamze J. M., Schmitt M., Wermuth C. G. A General and Convenient Synthesis of 3-Aminopyridazines. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 3257-3258.

- ⁸⁵ Turck A., Plé N., Mojovic L., Quéguiner G. Diazines VII. Nouvelle voie de synthèse d'un antidépresseur en série pyridazinique, la minaprine, utilisant les réactions de métallation ortho dirigée et de couplage de Suzuki. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1993**, 130, 488-92.
- ⁸⁶ Parrot I., Rival Y., Wermuth C.G. *Synthesis* **1999**, 1163.
- ⁸⁷ Guery S., Parrot I., Rival Y., Wermuth C.G. Efficient one-step synthesis of 3-amino-6-arylpyridazines. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2115-2117.
- ⁸⁸ Maes B.U.W., Lemiere G.L.F., Dommissie R., Augustyns K., Haemers A. A New Approach Towards the Synthesis of 3-Amino-6-(hetero)arylpyridazines Based on Palladium Catalysed Cross-coupling Reactions. *Tetrahedron* **2000**, 56, 1777-1781.
- ⁸⁹ Estévez I., Coelho A., Ravina E. Pyridazines XVII: An Efficient Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reaction for the synthesis of 5-Substituted 6-Phenyl-(2*H*)-pyridazin-3-ones. *Synthesis*, **1999**, 1666-1670.
- ⁹⁰ Coelho A., Ravina E., Sotelo E. Pyridazines. Part 30: Palladium-Catalysed Synthesis of 5-Substituted 6-Phenyl-3(2*H*)-pyridazinones Assisted by a Retro-Ene Transformation. *Synlett*, **2002**, 12, 2062-2064.
- ⁹¹ Sotelo E., Ravinia E. Pyridazines. Part 26: Efficient and Regioselective Pd-Catalysed Arylation of 4-Bromo-6-chloro-3-phenylpyridazine. *Synlett*, **2002**, 2, 223-226.
- ⁹² Maes B. U. W., R'kyek O., Kosmrlj J., Lemiere G. L. F., Esmans E., Rozenski J., Dommissie R., Haemers A. Suzuki reactions on chloropyridazinones : an easy approach towards arylated 3(2*H*)-pyridazinones. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 1323-1330.
- ⁹³ Maes B. U. W., Monsieurs K., Loones K. T. J., Lemiere G. L. F., Dommissie R., Matyus P., Riedl Z., Hajos G. Synthesis of 4-aryl-5-hydroxy- and 5-aryl-4-hydroxypyridazin-3(2*H*)-ones and their use in the preparation of 4,5-diarylpyridazin-3(2*H*)-ones and hitherto unknown isochromeno[3,4-*d*]pyridazinediones. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9713-9721.
- ⁹⁴ R'kyek O., Maes B. U. W., Jonckers T. H. M., Lemiere G. L. F., Dommissie R. New enediyne derivatives: synthesis of symmetrically and unsymmetrically disubstituted 4,5-dialkynyl-3(2*H*)-pyridazinones. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 10009-10016.
- ⁹⁵ Bécart F. **1987**. Contribution à l'étude du mécanisme moléculaire d'action de la minaprine : synthèse d'amino-3-pyridazines fonctionnalisées en position 4 et d'imidazo(1,2-*b*)pyridazines. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- ⁹⁶ Velentza A. V., Wainwright M. S., Zasadzki M., Mirzoeva S., Schumacher A. M., Haiech J., Focia P. J., Egli M., Watterson D. M. An Aminopyridazine-Based Inhibitor of a Pro-apoptotic Protein Kinase Attenuates Hypoxia-Ischemia Induced Acute Brain Injury. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3465-3470.

Chapitre III :

Fluorophores dérivés du chromophore de la Green Fluorescent Protein

Chapitre III. Fluorophores dérivés du chromophore de la Green Fluorescent Protein

A- Généralités sur la fluorescence

1. Le processus de fluorescence⁹⁷

Quand un composé absorbe de la lumière, donc de l'énergie, les électrons passent d'un état singulet (fondamental) à un état excité. Ils peuvent retourner à leur état initial par différents processus : radiatif, par émission d'un photon ou non radiatif (chaleur par exemple).

La fluorescence résulte d'un processus triphasique qui s'opère sur certaines molécules, généralement polyaromatiques ou hétérocycliques, appelées fluorophores ou sondes fluorescentes. Le processus responsable de la fluorescence est illustré Figure 23 par un diagramme d'états électroniques, le diagramme de Jablonski.

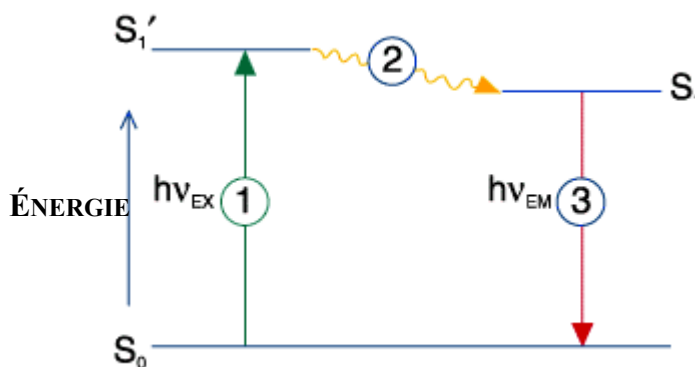


Figure 23 : Diagramme de Jablonski illustrant le processus de fluorescence. **Phase 1**, excitation. **Phase 2**, durée de vie de l'état excité. **Phase 3**, émission de fluorescence.

À température ambiante, les molécules sont essentiellement dans l'état vibrationnel de plus basse énergie, l'état fondamental S_0 . Durant la phase d'excitation, phase 1, un photon d'énergie $h\nu_{\text{ex}}$ est appliqué par une source externe (lampe incandescente ou laser) et absorbé par le fluorophore, le faisant ainsi passer à un état électronique excité singulet S_1' en 10^{-15} secondes environ. Ce processus distingue la fluorescence de la chemiluminescence, dans laquelle l'état excité est créé par une réaction chimique.

L'état excité a une durée de vie limitée (1 à 10^{-9} sec.). Durant cette phase 2, le fluorophore subit des changements conformationnels et est sujet à une multitude d'interactions avec son environnement moléculaire. Par conséquent, certains phénomènes comme l'extinction collisionnelle, le transfert de fluorescence ou le croisement inter-systèmes peuvent contribuer à dépeupler l'état S_1 et empêcher les molécules initialement excitées de retourner à leur état initial S_0 . Mais, l'énergie de l'état S_1 peut également partiellement se dissiper et donner lieu à un état excité singulet relaxé S_1 d'où émergera la fluorescence. Un photon d'énergie $h\nu_{em.}$, énergie plus faible que celle du photon absorbé et de longueur d'onde d'émission plus grande ($\lambda_{em.} > \lambda_{ex.}$), sera émis, faisant revenir le fluorophore à son état initial S_0 . La différence d'énergie ou de longueur d'onde observée, représentée par $(h\nu_{ex.} - h\nu_{em.})$, est appelée « Stoke's shift » ou déplacement de Stoke. Quant au rendement quantique de la fluorescence qui est le rapport entre le nombre de photons émis (phase 3) et le nombre de photons absorbés (phase 1), il représente une mesure de l'efficacité de la fluorescence en compétition avec les autres phénomènes susceptibles de se produire pendant la courte durée de vie de l'état excité.

Sous illumination intense, la destruction irréversible du fluorophore à l'état excité, nommé photoblanchiment, est le seul facteur limitant la détection de la fluorescence. Ce phénomène a pour origine un état excité triplet créé à partir de l'état singulet S_1 , via un phénomène d'état excité appelé croisement intersystème. En évitant le photoblanchiment, par augmentation de la sensibilité de détection et diminution de l'intensité d'excitation, le même fluorophore peut être excité et détecté indéfiniment.

Pour les molécules polyatomiques en solution, les transitions électroniques discrètes représentées par $h\nu_{ex.}$ et $h\nu_{em.}$ dans la figure 1 sont alors remplacées par des spectres larges d'énergie, appelés respectivement spectre d'émission de fluorescence et spectre d'excitation ou d'absorption. La largeur des bandes de ces spectres sera un paramètre important dans les applications où deux ou plusieurs fluorophores sont simultanément détectés (Figure 24).

En solution diluée, à quelques rares exceptions, le spectre d'émission d'un fluorophore est indépendant de la longueur d'onde d'excitation, ce qui est dû à la dissipation partielle de l'énergie d'excitation pendant la durée de vie de l'état excité. Par contre, l'intensité d'émission est, elle, proportionnelle à l'amplitude du spectre d'excitation à la longueur d'onde d'excitation (Figure 24).

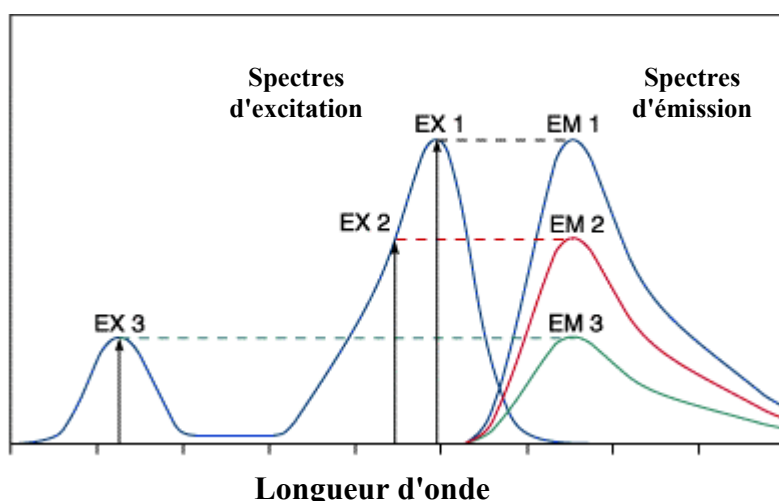


Figure 24 : L'excitation d'un fluorophore à trois longueurs d'ondes différentes (EX 1, EX 2, EX 3) ne change pas le profil d'émission, mais produit une variation de l'intensité d'émission de fluorescence (EM 1, EM 2, EM 3) qui correspond à l'amplitude du spectre d'excitation.

L'intensité de fluorescence est quantitativement dépendante de paramètres tels que l'absorbance (définie par la loi de Beer-Lambert $D.O. = \epsilon.l.c$), le rendement quantique de fluorescence (Φ), l'intensité de la source d'excitation et l'efficacité de mesure de fluorescence de l'instrumentation.

Le spectre de fluorescence et le rendement quantique semblent être généralement plus dépendants de l'environnement que du spectre d'absorption ou du coefficient d'extinction molaire. L'interaction entre deux fluorophores adjacents (observée pour de fortes concentrations), ou entre un fluorophore et une molécule environnante, peut induire une variation des paramètres définissant la fluorescence. Ainsi, le phénomène d'autoextinction est défini par l'extinction d'un fluorophore par un autre de même nature. Cette extinction de fluorescence peut être définie comme un processus bimoléculaire qui diminue le rendement quantique sans affecter le spectre d'émission de la fluorescence. Elle est créée par l'interaction des états excités transitoires ou par la formation d'espèces non fluorescentes à l'état S_0 .

D'autres facteurs environnementaux peuvent affecter les spectres de fluorescence. Les trois facteurs environnementaux les plus importants sont : la polarité du solvant, la proximité et la concentration en espèces extinctives et le pH du milieu aqueux. Ainsi, les spectres de fluorescence sont très sensibles aux variations de solvant. Cette caractéristique est notamment observée pour les fluorophores possédant un moment dipolaire large à l'état excité. En milieu polaire, leur spectre de fluorescence se déplace vers des longueurs d'ondes plus grandes.

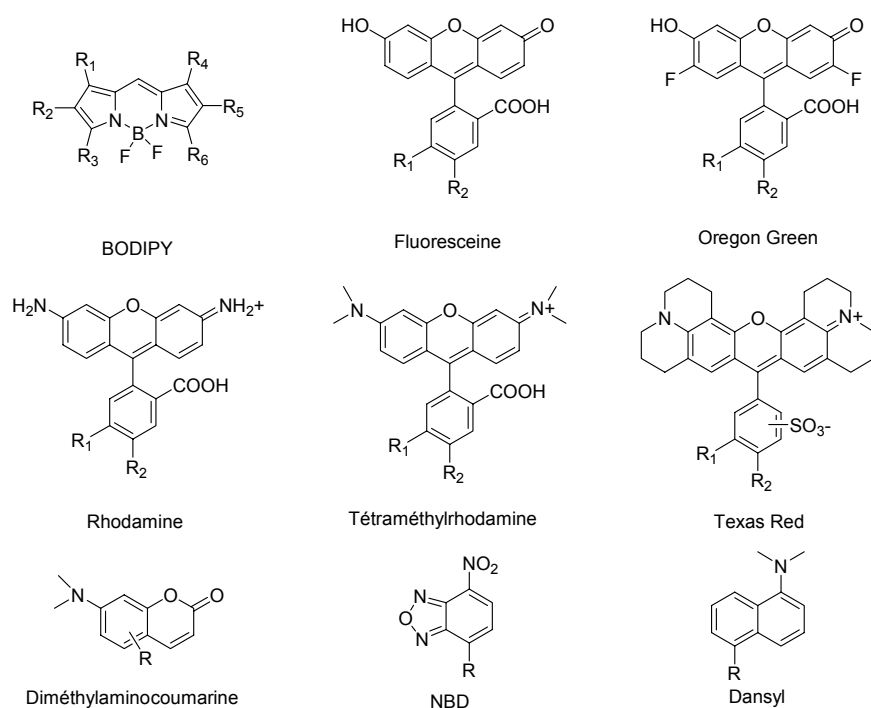


Figure 25 : Structure des principales sondes fluorescentes.

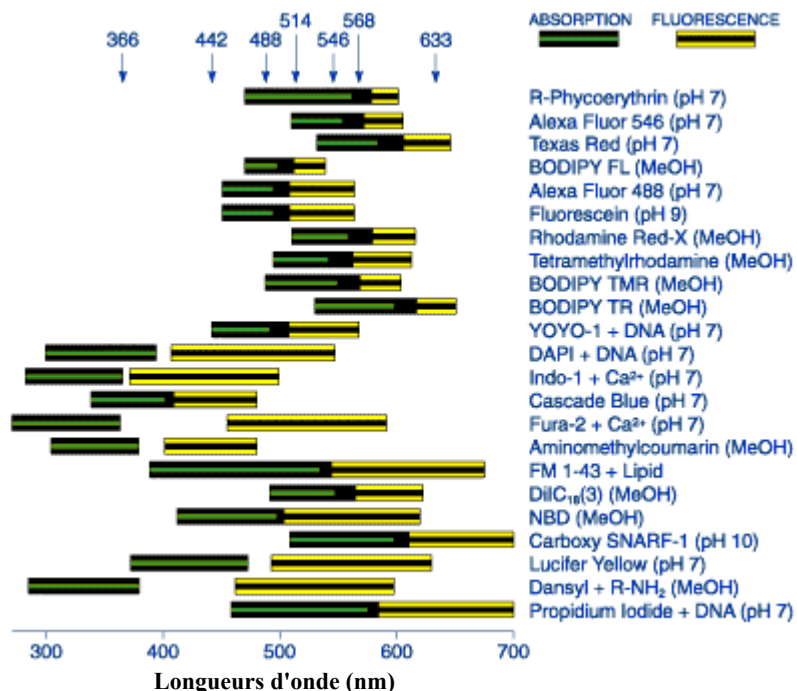


Figure 26 : Caractéristiques spectrales de 22 sondes fluorescentes rangées verticalement dans l'ordre décroissant de leur intensité fluorescente dans le MeOH, ou dans un tampon aqueux. Certaines longueurs d'onde de sources d'excitation sont indiquées sur l'axe horizontal en haut de la figure.

En pratique, cette propriété peut être utilisée pour démontrer la polarité de l'environnement moléculaire d'un fluorophore, ou pour quantifier la liaison d'un ligand marqué par une sonde fluorescente à son récepteur.^{98,99} Des extincteurs (ou quenchers) de fluorescence extrinsèques, dont les plus omniprésents sont les espèces paramagnétiques comme l'oxygène et les métaux comme l'iode, diminuent quant à eux le rendement quantique d'une manière concentration-dépendante. On peut également observer une extinction de fluorescence de certains fluorophores par des protéines. A titre d'exemple, nous pouvons citer, le NBD (nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole), la fluorescéine et le BODIPY, où un transfert de charge avec les résidus aromatiques des acides aminés est responsable de l'extinction de la fluorescence en milieu protéique. Quant aux fluorophores hautement dépendants du pH, ils peuvent être utilisés comme indicateurs de pH physiologiques.

2. Les principaux fluorophores

La production de fluorescence par une molécule donnée dépend de son efficacité à absorber et à émettre des photons, et de sa capacité à permettre la répétition de cycles excitation/émission. Les performances d'absorption et d'émission sont quantifiées en terme de coefficient d'extinction molaire (ϵ) pour l'absorption et de rendement quantique pour la fluorescence. La valeur du coefficient d'extinction est déterminée à la longueur maximale d'absorption. L'intensité de fluorescence est proportionnelle au produit du coefficient d'extinction par le rendement quantique et permet de classer les principaux fluorophores (Figure 25 et Figure 26).

3. La Green Fluorescent Protein⁹⁸

3.1 Introduction

Il existe des organismes bioluminescents dans des environnements très différents. Ainsi il existe, parmi d'autres, des insectes, des poissons, des calmars, des crevettes, des méduses qui utilisent cette émission de lumière comme moyen de défense, d'attaque ou même de communication.

La green Fluorescent Protein (GFP) est une protéine fluorescente extraite de la méduse *Aequorea victoria* et qui a été découverte par Shimomura.¹⁰⁰ Cette protéine a la particularité d'émettre de la fluorescence sous UV sans l'ajout de substrat ou de co-facteurs. Le clonage du gène de la GFP et l'étude de son expression dans des organismes tels que les bactéries ou même des organismes plus complexes¹⁰¹ ont ouvert de nombreuses perspectives dans l'utilisation de cette protéine en biologie cellulaire et en génétique moléculaire. La GFP est une protéine très stable qui ne nécessite pas de cofacteurs pour émettre de la fluorescence c'est pourquoi elle est largement utilisée comme gène-rapporteur pour mesurer l'expression d'un autre gène dans les cellules vivantes ou encore comme marqueur moléculaire pour visualiser, dans une cellule vivante, la dynamique d'une protéine fusionnée à la GFP. De plus, dans la majorité des cas, la fusion de la GFP à une protéine n'altère en rien la localisation ni la fonction de cette protéine.

Récemment l'équipe dirigée par le Docteur Galzi (UPR 9050, CNRS, Strasbourg) a mis au point une méthode originale d'utilisation de la GFP pour la détection d'interactions entre une protéine cible et son ligand¹⁰². Celle-ci réside notamment dans la préparation de protéines cibles, de récepteurs, rendus fluorescents par fusion avec la GFP, et dans leur utilisation pour la détection d'interactions avec un ligand marqué par fluorescence. Cette technique permet d'évaluer l'affinité d'un ligand pour son récepteur sans avoir recours à l'utilisation de la radioactivité. Ainsi, il s'agit d'utiliser un récepteur connu, rendu fluorescent par fusion de son gène avec celui de la GFP, et un ligand affiné pour ce récepteur, préalablement marqué par une sonde fluorescente. Le principe consiste à détecter une interaction spécifique entre le récepteur et son ligand, par transfert par résonance d'énergie de fluorescence (FRET) sur cellules entières ou fragments de membrane.

Après expression d'un dérivé de la GFP fusionné à une protéine cible, deux utilisations sont alors envisageables : soit la GFP est donneur d'énergie de fluorescence et le ligand marqué (par un fluorophore ou un extincteur de fluorescence approprié) absorbe la lumière émise par la GFP; soit la GFP est accepteur d'énergie de fluorescence et le ligand marqué est donneur. Dans le premier cas, le spectre d'excitation de la molécule ligand doit recouvrir le spectre d'émission de la GFP, dans le second cas, c'est le spectre d'émission de la molécule ligand qui doit chevaucher le spectre d'excitation de la GFP (Figure 27). Pour l'EGFP par exemple, la sonde fluorescente porté par le ligand sera de type BODIPY, tétraméthylrhodamine, Texas Red quand il est accepteur d'énergie de fluorescence, ou de type

coumarine, fluorescamine, 6-(*N*-méthylanilino)naphthalène quand il est donneur d'énergie de fluorescence.

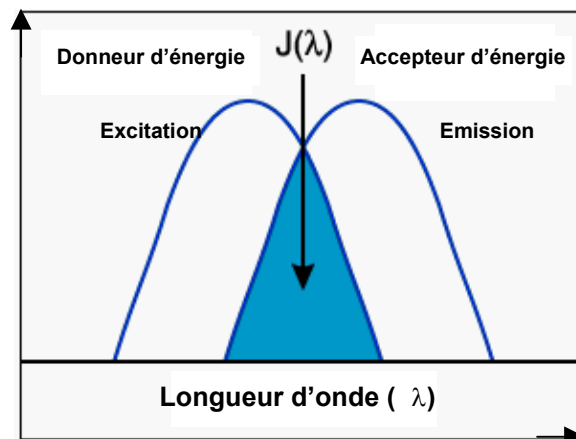


Figure 27 : Représentation schématique du recouvrement spectral permettant des expériences de FRET.

3.2 La formation du chromophore de la GFP

La GFP est une protéine monomérique, soluble, de 238 acides aminés (27-30 kDa) dont le gène a été décodé en 1992 par l'équipe de D.C. Prasher.¹⁰³ D'après sa structure cristalline,¹⁰⁴ la GFP est constituée de 11 feuillets β parallèles qui forment un tonneau β proche de la perfection dans lequel est enfermée une hélice α contenant le groupement chromophore. Des boucles et des petites hélices, aux deux extrémités du cylindre, forment le couvercle du « β -can » (Figure 28).

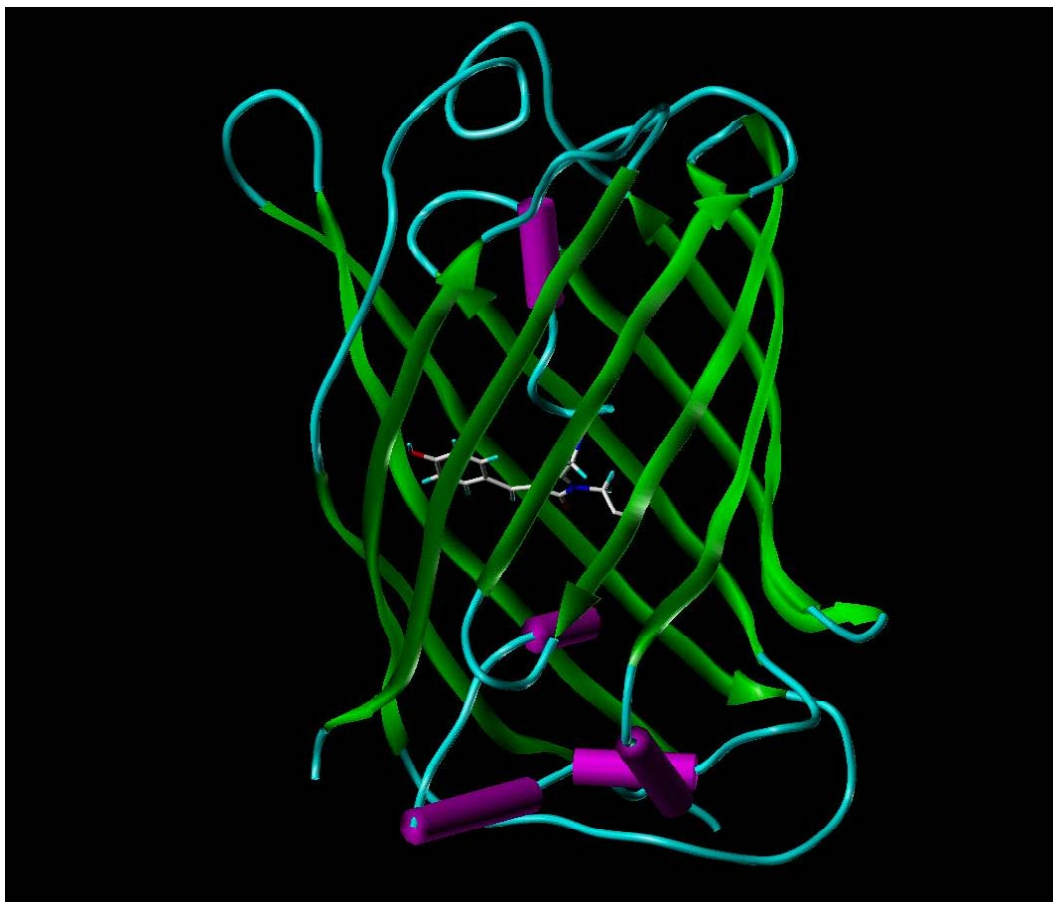


Figure 28: Représentation tridimensionnelle du squelette de la GFP
(hélice α en rose, feuillets β en vert).

La GFP acquiert ses propriétés de fluorescence selon un mécanisme autocatalytique de formation du chromophore qui ne peut avoir lieu qu'après le repliement de la protéine en β -can, et en présence d'oxygène.¹⁰⁵ La fluorescence de la GFP est due à la cyclisation post-traductionnelle du tripeptide –Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷- de la chaîne protéique. Ce chromophore présente une structure de type 4-(4-hydroxyphényl)méthylèneimidazol-5-one qui a été mise en évidence par Shimomura en 1979.¹⁰⁶ Le mécanisme détaillé de formation du chromophore de la GFP n'est pas connu, cependant un mécanisme a été proposé par Tsien^{107,108} et est reporté dans la Figure 29.

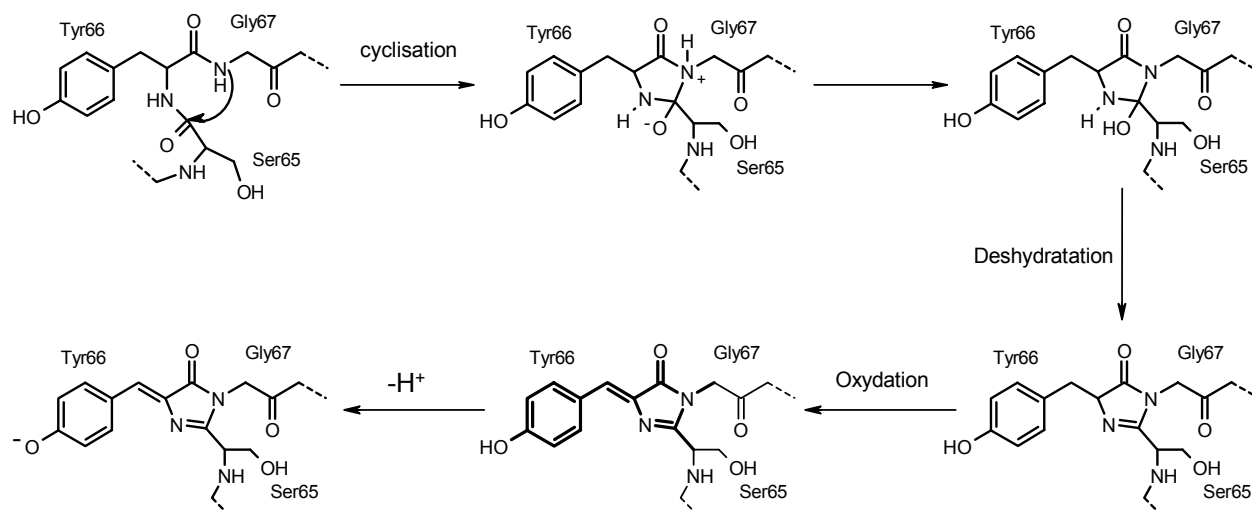


Figure 29 : Mécanisme proposé par Tsien pour la formation du chromophore de la GFP

La première étape de ce processus est rapide ($k = 2,44.10^{-3} \text{ s}^{-1}$), c'est le repliement de la protéine. Dans un deuxième temps vient l'étape de cyclisation du chromophore ($k = 3,8.10^{-3} \text{ s}^{-1}$) qui est suivie par l'étape lente d'oxydation ($k = 1,51.10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Cette cyclisation est possible par la présence de conformations de basse énergie qui se traduisent par de très courtes distances intramoléculaires entre le carbonyle de la sérine 65 et l'azote de la glycine 67. De plus des acides aminés de la protéine (Arg96 et Gln94) forment des liaisons hydrogènes avec l'oxygène du carbonyle de la sérine 65 activant ainsi l'attaque de l'azote de la Gly67 sur le carbonyle de la Ser65.

3.3 Propriétés photophysiques

La GFP (de type sauvage) présente un spectre complexe avec deux maxima d'absorption.¹⁰⁸ Un pic majoritaire à 395 nm et un pic minoritaire à 475 nm présentant un petit épaulement vers le rouge (Figure 30). Elle émet de la lumière verte à 508 nm avec un rendement quantique de 0,72-0,85.^{98,109} Ces deux pics d'absorption semblent être associés à deux formes du chromophore qui peuvent être sous forme stable ou sous forme excitée. L'absorption à 395 nm est attribuée à la forme neutre et celle à 475 nm à la forme anionique du chromophore, deux formes dont le ratio dépend des conditions telles que le pH, la température et la force ionique.¹¹⁰ Niwa¹¹¹ a montré que la forme anionique à l'état singulet excité du chromophore serait responsable de la fluorescence verte de la GFP.

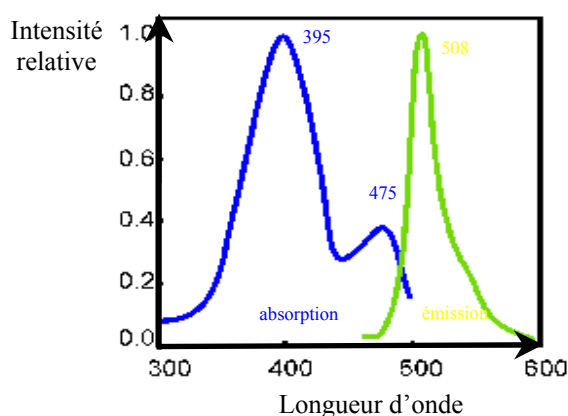


Figure 30 : Représentation des spectres d'absorption (bleu) et d'émission (vert) de la GFP sauvage

La cage protéique joue un rôle important dans l'existence de cette fluorescence en stabilisant la forme phénolate du chromophore par de nombreuses liaisons hydrogènes,¹⁰⁹ comme cela est illustré dans la Figure 31. En effet, c'est tout un réseau de liaisons hydrogènes qui existe entre le chromophore et les résidus aminoacides environnants tels que l'histidine 148 qui participe à la stabilisation du phénolate ou encore l'arginine 96 qui stabilise le carbonyl de l'imidazolone¹¹².

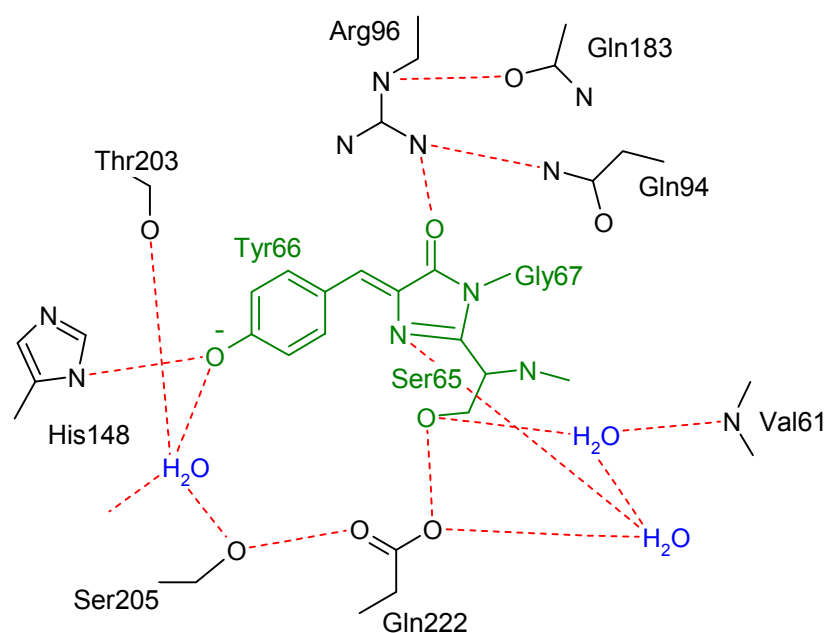


Figure 31 : Aperçu du réseau de liaisons hydrogènes (H) dans l'entourage immédiat du chromophore.

3.4 Classification des mutants de la GFP

La GFP sauvage est une protéine très fluorescente mais elle présente quelques inconvénients comme une mauvaise maturation à des températures supérieures à 37°C et à de trop fortes concentrations en GFP et elle présente également 2 pics d'excitation, celui dans l'UV (à 395 nm) étant le pic majoritaire et l'excitation dans l'UV pose quelques problèmes (on observe plus de diffusion, d'autofluorescence et même de dommages cellulaires). De nombreuses études ont été menées afin de modifier les propriétés spectrales de la GFP sauvage principalement en utilisant les méthodes conventionnelles de mutagenèse (mutagenèse aléatoire ou dirigée).

De nombreuses mutations effectuées sur cette protéine montrent que la modification de résidus proches du fluorophore entraîne de grands changements dans les spectres d'absorption et/ou d'émission. Ainsi, en 1997, Tsien¹⁰⁸ classe les différentes GFPs en 7 groupes basés sur la nature du résidu 66 du chromophore (Tableau 22). Les classes 1 à 4 possèdent un résidu Tyr en position 66 et les classes 5 à 7 possèdent un résidu Trp, His et Phe en cette position.

Les protéines fluorescentes de la classe 1 sont les plus utilisées pour les études cellulaires, notamment la EGFP, parce qu'elles présentent à la fois une grande efficacité de fluorescence ($\Phi \times \epsilon$) et des spectres avec une seule longueur d'onde maximum d'excitation et d'émission. La mutation de la sérine 65 par une thréonine dans la classe 2, favorise la forme ionisée du chromophore et donc on observe la disparition du pic d'excitation à 395 nm. Ce résultat montre que la Ser65, par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes avec la Glu222, semble jouer un rôle important dans le maintien du chromophore sous sa forme neutre. A l'inverse dans la classe 3, la mutation de la thréonine 203 par une isoleucine conduit à un chromophore non chargé et donc à la disparition du pic d'excitation à 475 nm. L'incorporation d'un aromatique en position 203 qui va 'stacker' le phénol de la Tyr66 combinée à la mutation S65T conduit à des protéines fluorescentes jaunes (YFPs) présentant des spectres d'absorption et d'émission complètement déplacés vers le rouge. La substitution du groupement phénol de la tyrosine 66 par un indole conduit à des protéines cyan (CFPs) qui présentent des spectres d'absorption et d'émission compris entre les chromophores neutre et anionique. La mutation de la Tyr66 par une Histidine donne des protéines émettant dans le bleu (~450 nm, BFPs) mais avec un rendement quantique bien inférieur à la protéine native.

Mutations	Résidu 66 du chromophore	Nom commun	λ_{exc} ($\epsilon \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{em} (Φ)
Classe 1				
Aucune	Mélange phénol/ phénolate	Sauvage	395-397 (25-30) 470-475 (9,5-14)	508 (0,79)
F99S, M153T, V163A		Cycle 3	397 (30) 475 (6,5-8,5)	506 (0,79)
Classe 2				
	phénolate			
S65T			489 (52-58)	509-511 (0,64)
F64L, S65T		EGFP	488 (55-57)	507-509 (0,60)
F64L, S65T, V163A			488 (42)	511 (0,58)
S65T, S72A, N149K, M153T, I167T		Emerald	487 (57,5)	509 (0,68)
Classe 3				
	phénol			
S202F, T203I		H9	399 (20)	511 (0,60)
T203I, S72A, Y145F		H9-40	399 (29)	511 (0,64)
Classe 4				
	Phénolate 'stacker' par un aromatique	Yellow Fluorescent Proteins (YFPs)		
S65g, S72A, T203F			512 (65,5)	522 (0,70)
S65g, S72A, T203H			508 (48,5)	518 (0,78)
S65g, V68L, Q69K, S72A, T203Y		10C Q69K	516 (62)	529 (0,71)
S65g, V68L, S72A, T203Y		10C	514 (83,4)	527 (0,61)
S65g, S72A, K79R, T203Y		Topaz	514 (94,5)	527 (0,60)
Classe 5				
	indole	Cyan Fluorescent Proteins (CFPs)		
Y66W			436	485
Y66W, N146I, M153T, V163A		W7	434 (23,9) 452	476 (0,42) 505
F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A		W1B ou ECFP	434 (32,5) 452	476 (0,4) 505
S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A		WIC	435 (21,2)	495 (0,39)
Classe 6				
	imidazole	Blue Fluorescent Proteins (BFPs)		
Y66H		BFP	384 (21)	448 (0,24)
Y66H, Y145F		P4-3	382 (22,3)	446 (0,3)
F64L, Y66H, Y145F		EBFP	380-383 (26,3-31)	440-447 (0,17-0,26)
Classe 7				
	phényle			
Y66F			360	442

Tableau 22 : Caractéristiques spectrales des principales classes de GFPs

Récemment de nouveaux mutants ont été développés en incorporant des aminoacides non naturels dans la protéine à la place de la Tyr66.¹¹³ Les auteurs ont introduit dans la séquence peptidique de la GFP, des analogues de la Tyr portant en position para de l'aromatique différents groupements (amino, méthoxy, iodo, bromo). Les propriétés spectrales de ces mutants présentent une bonne corrélation avec les propriétés électroniques des

substituants. L'introduction de groupements moins électrodonneurs que le phénolate entraîne un déplacement des longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission vers le bleu, donc vers les longueurs d'ondes plus faibles et également une diminution du rendement quantique de fluorescence (Tableau 23).

Aminoacide en position 66	λ_{exc} (nm)	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	Φ
Tyr	397/475	25	506	0,76
<i>p</i> -amino-Phe	435	31	498	0,43
<i>p</i> -méthoxy-Phe	394	27	460	0,37
<i>p</i> -iodo-Phe	381	16	438	0,013
<i>p</i> -bromo-Phe	375	20	428	0,014

Tableau 23 : Propriétés spectrales des GFPs mutantes portant des acides aminés non naturels

On retrouve un seul pic d'émission et d'absorption maximale pour ces composés traduisant le fait que ces acides aminés ne peuvent être sous différents états de charges. Pour le *p*-méthoxy qui est forcément sous forme neutre, on retrouve un pic d'absorption à 394 nm qui est en accord avec les données de la GFP sauvage.

Le simple changement d'un ou de quelques aminoacides entraîne des changements considérables dans les propriétés spectrales de la protéine verte. Il a également été montré que la dénaturation de la GFP native conduit à une perte de fluorescence qui est rétablie après renaturation de celle-ci. Le bon repliement de la protéine et les interactions qui existent entre les aminoacides environnants et le chromophore semblent jouer un rôle prépondérant dans le phénomène de fluorescence observé chez la GFP.¹¹⁴ De plus des études menées sur des fragments de GFP contenant le chromophore et sur des molécules modèles^{111,115} ont montré une absence de fluorescence dans les deux cas à température ambiante alors qu'ils fluorescent à 77K. Cette absence de fluorescence peut s'expliquer en partie par une possible rotation autour de la double liaison exo, isomérisation qui semble empêchée à l'intérieur de l'architecture rigide que forme la GFP.¹¹² Certains facteurs environnementaux ont déjà été évoqués par certains auteurs, comme l'effet de quenching par l'oxygène ou par l'eau,¹¹⁶ ou encore une modification du flux électronique à l'intérieur du chromophore à cause de l'absence du réseau de liaisons hydrogènes.¹⁰⁴

B- Synthèse de dérivés du chromophore de la GFP

Dans le but de restaurer la fluorescence du chromophore isolé à température ambiante et de mieux comprendre comment la fluorescence apparaît dans la GFP, nous avons synthétisé des dérivés du chromophore modèle étudié par Kojima en 1998,¹¹⁵ dans un premier temps en gardant la structure imidazolone de base puis en synthétisant des dérivés isostères. Enfin quelques analogues structuraux ont été envisagés pour reproduire une fluorescence comparable à celle de la GFP.

1. Les imidazolones

Les imidazolin-5-ones insaturées et disubstituées en 2 et en 4 forment une classe très importante de composés hétérocycliques. En effet ces imidazolin-5-ones peuvent être converties en aminoacides et en leurs dérivés avec de bons rendements.^{117, 118} De ce fait, de nombreux travaux ont été menés sur cette famille hétérocyclique depuis la fin du XIXème siècle. Les méthodes générales les plus utilisées pour synthétiser les imidazolones sont celles mettant en jeu les oxazolones (voie A, Schéma 34), les amidines (voie B) ou encore les iminoéthers (voie C). Ces différentes méthodes ont été étudiées au laboratoire.

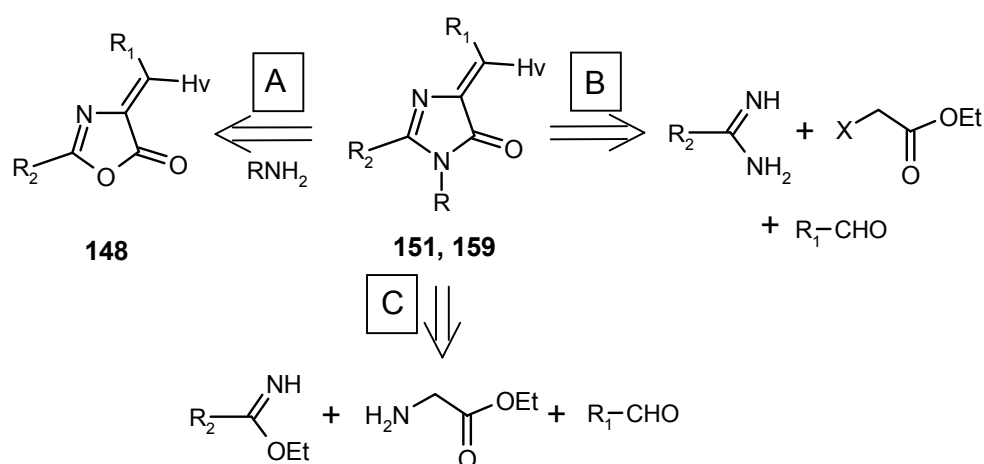


Schéma 34 : Voies classiques d'obtention des imidazolones **151** et **159**. Hv = H vinylique

1.1 Au départ des 4-arylidène-5-oxazolones : voie A

Cette première méthode consiste en l'ouverture des 4-arylidène-5(4H)-oxazolones substituées en position 2 par des amines, suivie de la cyclisation en imidazolones.

1.1.1 Préparation des 4-arylidène-5-oxazolones

De nombreuses publications décrivent la chimie des oxazolones qui, en fait, constituent un point de départ pratique pour la synthèse de divers composés tels que les α -aminoacides ou les α -cétoacides.^{119, 120}

Ces oxazolones insaturées **148** sont préparées facilement à partir de N-acylglycine et d'un aldéhyde approprié en présence d'anhydride acétique et d'acétate de sodium en accord avec la méthode décrite par Erlenmeyer (Schéma 35).¹¹⁹ Dans un premier temps il y a formation de l'oxazolone **147** par action de l'anhydride acétique sur l'acylglycine. Cet intermédiaire **147** contient un groupement méthylène très réactif, et en présence d'AcONa **147** se condense avec l'aldéhyde pour donner l'oxazolone insaturée **148**.

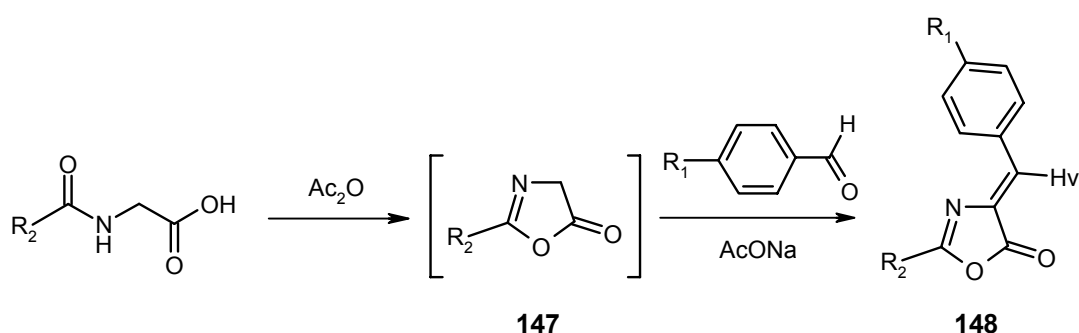


Schéma 35 : Préparation des oxazolones

Il a été montré que cette méthode conduit presque toujours à la formation de l'isomère thermodynamiquement le plus stable, l'isomère Z. On observe cependant dans quelques cas, un mélange des 2 isomères Z et E (Figure 32).

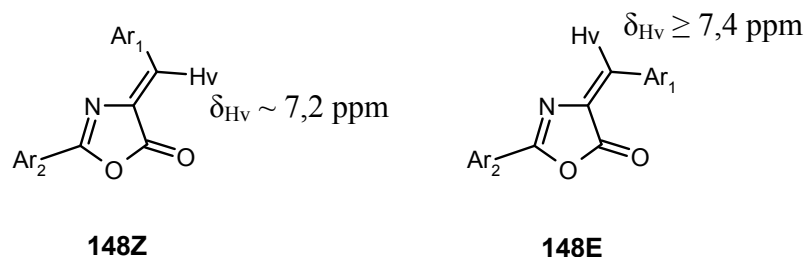


Figure 32 : Isomères de configuration des oxazol-5-ones

L'isomère E peut-être obtenu par exemple par l'isomérisation de l'oxazolone Z en présence d'acide bromhydrique concentré (solution d'acide bromhydrique à 48 % saturée avec HBr gaz).¹²¹ Cependant cet isomère E est thermolabile et s'isomérisse facilement en présence d'amine tertiaire (pyridine, 15 min à température ambiante). Les oxazolones de configuration E peuvent aussi être obtenues par condensation d'un aldéhyde avec une N-acylglycine en présence d'acide polyphosphorique (PPA).¹²² Des analyses RMN ont été réalisées pour confirmer la structure des oxazolones. Les spectres RMN montrent le déblindage du proton vinylique pour l'isomère E ($\geq 7,4$ ppm), alors que dans le cas de l'isomère Z on observe l'influence du cône de blindage du carbonyle sur le déplacement chimique du proton vinylique ($\sim 7,2$ ppm). Les constantes de couplage entre le carbone du carbonyle de l'oxazolone et le proton vinylique ont également été mesurées afin de confirmer la stéréochimie des composés ($^3J_{C5-Hv} = 5,5$ Hz pour les composés Z et $^3J_{C5-Hv} = 12,5$ Hz pour les composés E).¹²³

Par la méthode d'Erlenmeyer, nous avons préparé les oxazolones reportées dans le Tableau 24. Les rendements varient entre 40 et 90% et sont fonction de la nature de R₂. La réaction se fait plus facilement lorsque R₂ est un aromatique (comparer **148a** avec **148b** et **148h** avec **148i**). La cyclocondensation de la glycine avec le *p*-hydroxybenzaldéhyde conduit à des oxazolones O-acétylées (**148a-c**) par réaction du phénol avec l'anhydride acétique. Dans tous les cas nous n'avons isolé qu'un seul isomère stable, correspondant à l'oxazolone de configuration Z.

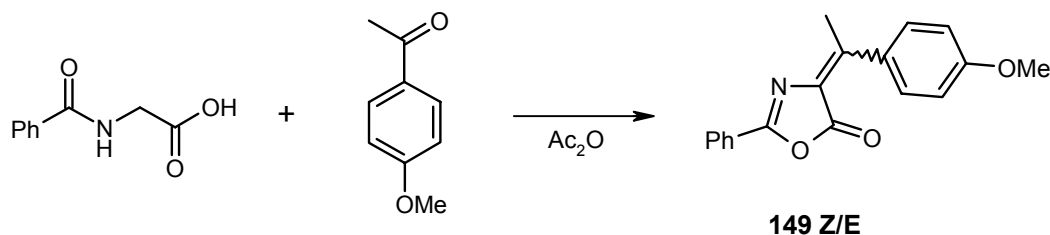
L'essai de déméthylation du groupement méthoxy de l'oxazolone **148o** en présence de BBr₃ 1M n'a pas abouti. Le signal ¹H-RMN du groupement méthoxy était toujours présent, cependant nous avons observé le déblindage du proton vinylique qui est passé de 7,36 ppm à 7,73 ppm. Ces conditions nous ont conduit à l'isomérisation de l'oxazolone **148o** de configuration Z, en oxazolone **148o'** de configuration E, confirmant là encore la configuration des oxazolones obtenues.

Composés	Ar ₁ = 4-R ₁ Ph R ₁	R ₂	Rdt (%)
148a	OAc	Me	50
148b	OAc	Ph	70
148c	OAc	3,4-diOMePh	70
148d	H	Ph	70
148e	H	3,4-diOMePh	90
148f	N(Me) ₂	Ph	60
148g	N(Me) ₂	3,4-diOMePh	62
148h	CN	Me	40
148i	CN	Ph	84
148j	CN	3,4-diOMePh	90
148k	CN	4-NHAcPh	75
148l	COOMe	Ph	60
148m	COOMe	3,4-diOMePh	72
148n	H, 2-OMe	Ph	59
148o	OMe	Ph	52
148p	OMe, 2-OMe	Ph	67
148q	N-(Ac)indol-3-yl*	3,4-diOMePh	50

* Ar₁ = N-(Ac)indol-3-yl

Tableau 25 : Préparation des oxazolones par la méthode d'Erlenmeyer

En parallèle à ces oxazolones nous avons préparé les 5-(aryléthylidène)-4-oxazolones **149**, selon les méthodes décrites dans la littérature. Ces méthodes utilisent la 4-méthoxyacétophénone et l'acide hippurique en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré ¹²⁴ ou en présence d'anhydride acétique et d'acétate de plomb (Schéma 36).¹²⁵

Schéma 36 : Préparation des 5-(aryléthylidène)-4-oxazolones **149**

Les premiers essais de cyclisation en présence d'acétate de plomb ont conduit à l'oxazolone attendue avec un rendement de 5% sous la forme d'un mélange des deux isomères Z/E dans des proportions 70/30. Par contre en milieu acide concentré, un rendement de 70% a été obtenu. Dans ce cas nous avons obtenu un mélange des deux isomères Z/E dans des proportions 10/90 après cristallisation dans l'éthanol. Un enrichissement en isomère Z a été obtenu dans la pyridine (Z/E : 85/15). La configuration des 5-(aryléthylidène)-4-oxazolones a été déterminée par RMN du proton en accord avec les données de la littérature. Dans le cas de l'isomère Z, le groupement méthyle se trouve en position cis par rapport au carbonyle, son signal est alors déblindé (δ_{CH_3} 2,8 ppm) par rapport au signal obtenu pour le groupement méthyle du composé E (δ_{CH_3} 2,66 ppm).

1.1.2 Utilisation de 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolones

Récemment, la préparation de 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolones (Schéma 37) a été décrite par Mazurkiewicz et al.¹²⁶ D'après les auteurs, ces composés sont des équivalents d'ylures de phosphore (avec des caractéristiques spectroscopiques –RMN ^{13}C et ^{31}P - identiques aux ylures classiques) capables de réagir aisément sur des agents alkylants.¹²⁷

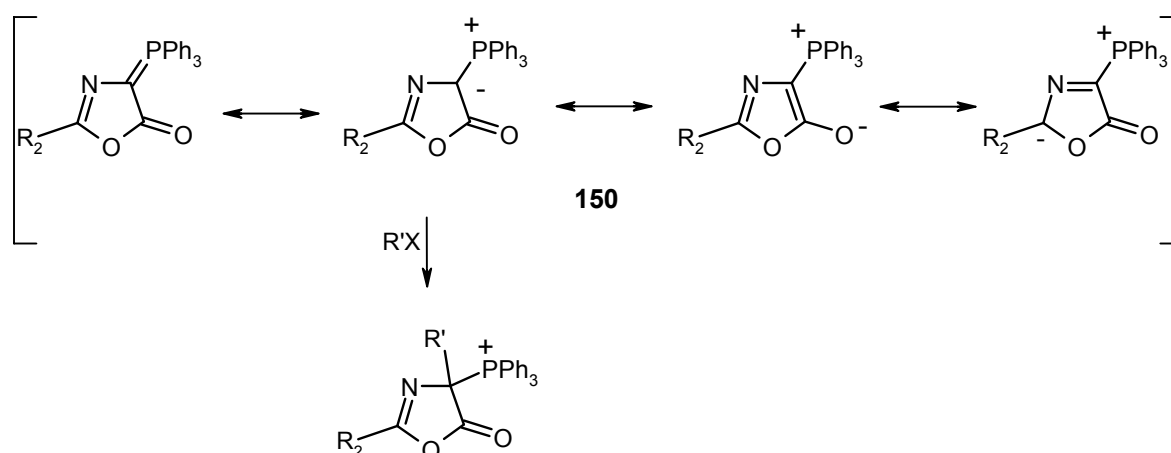


Schéma 37 : Réactivité des 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolones
vis à vis des agents alkylants

A partir de ces travaux, nous avons pensé à une méthode plus convergente de préparation des oxazolones mettant en jeu ces 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolones sur

lesquels divers aldéhydes commerciaux seraient introduits. Afin de vérifier la propriété d'ylures, l'oxazolone a été engagée dans une réaction classique de Wittig. Pour cela la 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolone **150** ($R_2 = \text{Ph}$) a été préparée afin de la faire réagir avec différents aldéhydes. L'oxazolone a été obtenue en faisant réagir dans un premier temps, le DCC sur l'acide hippurique à température ambiante puis en traitant le produit obtenu par PPh_3/Br_2 en présence de TEA (Schéma 38).

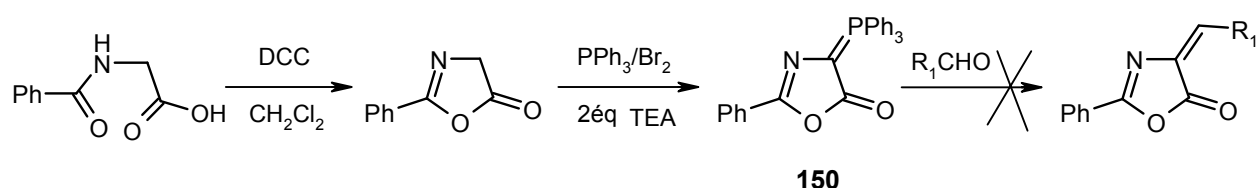


Schéma 38 : Préparation de la 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolone **150**

Des essais de condensation avec le benzaldéhyde dans le toluène à reflux ont laissé le produit de départ inchangé et ceci quelles que soient les conditions opératoires utilisées. Cette voie de synthèse a été abandonnée.

1.1.3 Obtention des imidazolones

Le traitement des 4-arylidène-5-oxazolones avec des amines conduit généralement à une ouverture de cycle donnant des amides **152** qui, dans certains cas, peuvent être recyclisées en 4-arylidène-imidazolin-5-ones disubstituées en 1,2 (composés **151**) correspondantes en présence d' AcOH/AcONa ^{128,129} ou en présence de POCl_3 .¹³⁰ Cependant certains auteurs décrivent l'obtention des imidazolones directement par réaction entre les oxazolones et les amines en présence de zinc¹³¹ ou de K_2CO_3 ¹¹⁵ (Schéma 39).

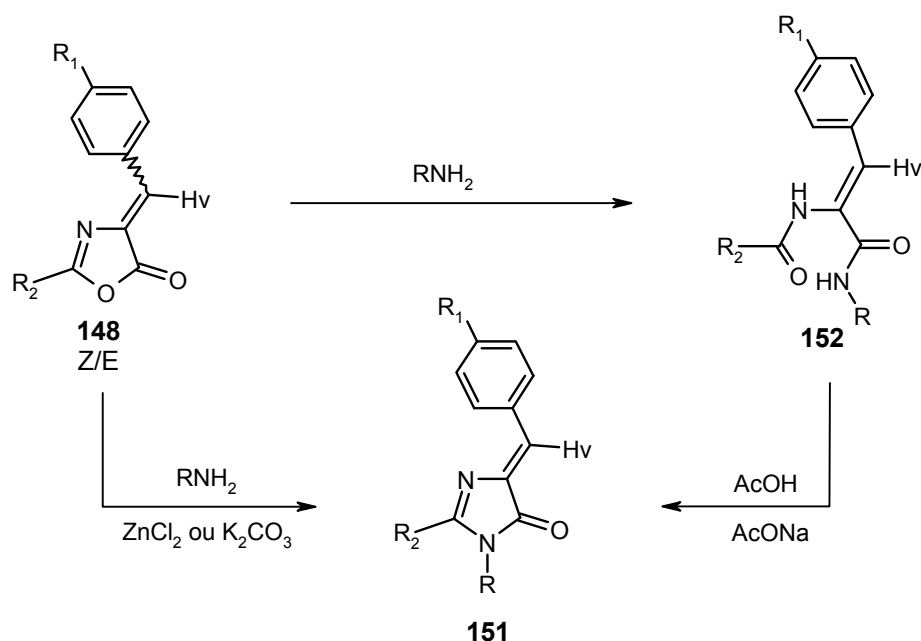


Schéma 39 : Préparation des imidazolones

La cyclisation des 2-acylaminoacrylamides obtenues par l'ouverture des oxazolones *Z* conduit aux imidazolones de configuration *Z*. La stéréochimie de la double liaison exocyclique est conservée durant ces 2 étapes d'aminolyse et de cyclisation.¹²⁹ Des auteurs ont également montré que la cyclisation d'amides de forme *Z* ou *E* conduisait à la formation d'imidazolones de configuration *Z*.¹³⁰

1.1.3.1 Préparation des 2-alkylimidazolones

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés au premier terme de la série, la 1,2-diméthyl-4-(4-hydroxybenzylidène)imidazol-5-one **151a**, chromophore modèle ($R_1 = OH$ et $R = R_2 = Me$).

Le traitement de l'oxazolone **148a** par la méthylamine dans les conditions de la littérature (Méthode A : K_2CO_3 , EtOH) conduit à l'imidazolone **151a** avec un rendement moyen de 42%. La réaction de cette même oxazolone avec la butylamine conduit à un mélange, dont le produit principal est du à l'ouverture de l'oxazolone par l'éthanol.

Afin d'améliorer le rendement obtenu, nous avons effectué la réaction dans des conditions plus dures, en tube scellé et nous avons remplacé l'EtOH par du THF (Méthode B :

tube scellé/THF/K₂CO₃/amine). Dans ces conditions, la cyclisation en imidazolone est fonction de la nature de R₂ (Tableau 26 et Tableau 27).

Composé	R	R ₁	R ₂	Rdt (%)
151a	Me	OH	Me	70
151b	Bu	OH	Me	50
151c	CH ₂ CO ₂ Me	OH	Me	-

Tableau 26 : Imidazolones préparés par la Méthode B

En effet, lorsque R₂ est un groupement aliphatique, le traitement de l'oxazolone **148a** avec la méthylamine ou la butylamine conduit aux imidazolones **151a** et **151b** avec des rendements corrects (70% et 50%, respectivement, Tableau 26). Par contre la réaction de **148a** avec le glycinate de méthyle n'a pas permis d'obtenir l'imidazolone **151c** attendue mais des produits polaires non identifiés.

1.1.3.2 Préparation des 2-arylimidazolones

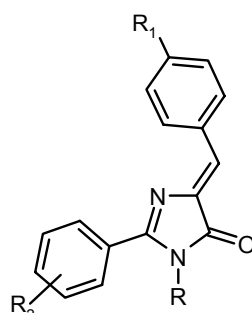
Ces mêmes conditions ont été utilisées avec les oxazolones substituées en R₂ par un groupement aromatique (Tableau 27). Dans ce cas la réaction d'ouverture/cyclisation de l'oxazolone **148** se fait difficilement.

entrée	R	R ₁	R ₂	composé	Rdt	composé	Rdt
					151 (%)		152 (%)
1	Me	OH	3,4-diOMePh	151d	16	152d	55
2	Me	H	3,4-diOMePh	151e	30	152e	a
3	Me	OH	Ph	151f	0	152f	55
4	Ph	H	Ph	151g	0	152g	65
5	Me	NMe ₂	Ph	151h	0	152h	100

a : non isolé

Tableau 27 : Imidazolones avec R₂ = Ar, préparées par la Méthode B

Nous avons observé la formation de l'imidazolone dans 2 cas (composé **151d** et **151e**) pour lesquels l'aromatique R_2 est substitué par des groupements électrodonneurs. Les rendements sont cependant faibles (16-30%). Dans tous les cas le produit majoritaire formé est l'amide intermédiaire **152**, obtenue avec de bons rendements (55-100%). En présence d'hydrate d'hydrazine, l'ouverture de l'oxazolone **148b** ($R_2 = \text{Ph}$, et $R_1 = 4\text{-OAcPh}$) dans les conditions décrites dans la littérature,¹³² a conduit à un mélange de produits non identifiées, il en a été de même avec le chlorhydrate de guanidine.¹³³



Composé	R	R_1	R_2	Méthode	Rdt (%)
151d	Me	OH	3,4-diOMe	Ph-O-Ph/AcONa/270°C	16*
				(Ph) ₂ O/270°C	37*
				SiCl ₄ /TEA/CH ₂ Cl ₂	0
151f	Me	OH	H	AcOH/AcONa	0*
				TFA/Toluène	0*
151g	Ph	H	H	AcOH/AcONa	32*
				AcOH/AcONa/ PhNH ₂ 3 éq ¹³⁰	75
151h	Me	NMe ₂	H	HCl 3N	0
				POCl ₃	0
151i	OH	H	H	HCl 3N	30

* formation d'oxazolone et reste d'amide

Tableau 28 : Essais de cyclisation des amides **152** en imidazolones correspondantes **151**

Différents essais de cyclisation des amides **152** ont été effectués, et les résultats sont reportés dans le Tableau 28. Les amides **152a-d** ont été traités en présence d'acides forts ou dans des conditions thermiques. Dans la plupart des cas, la cyclisation des amides **152** en imidazolones **151** se fait difficilement voire pas du tout (Rdt = 0-37%), et on observe très

souvent la formation de l'oxazolone de départ. La cyclisation de l'amide **152g** ($R = \text{Ph}$) en milieu AcOH/AcONa , conduit à l'imidazolone **151g** avec un rendement de 32%, qui est augmenté par l'ajout d'aniline dans le milieu réactionnel. Il semblerait qu'il existe un équilibre entre l'oxazolone et l'amide, qui serait, dans ce cas, déplacé dans le sens de la formation de l'amide conduisant par cyclisation à l'imidazolone correspondante (Schéma 40). La cyclisation en excès de méthylamine n'a pas conduit à un résultat satisfaisant.

Pour que la cyclisation de l'amide en imidazolone ait lieu, il faut que l'amide se trouve dans une conformation particulière positionnant les deux fonctions amides correctement l'une par rapport à l'autre afin que l'azote de l'amide portant le groupement R puisse attaquer le carbonyle du benzamide. Cette conformation, représentée sur le Schéma 40, n'est pas favorisée pour des raisons stériques, ce qui peut expliquer les problèmes rencontrés lors des essais de cyclisation.

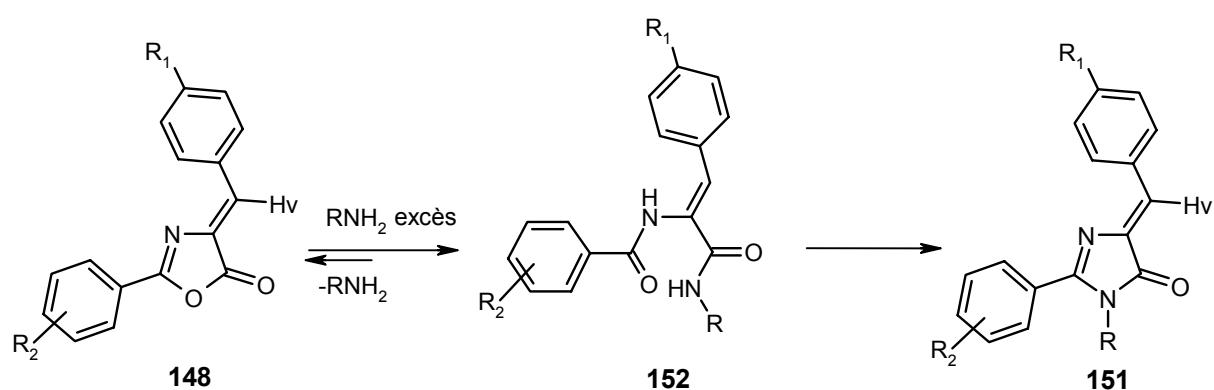
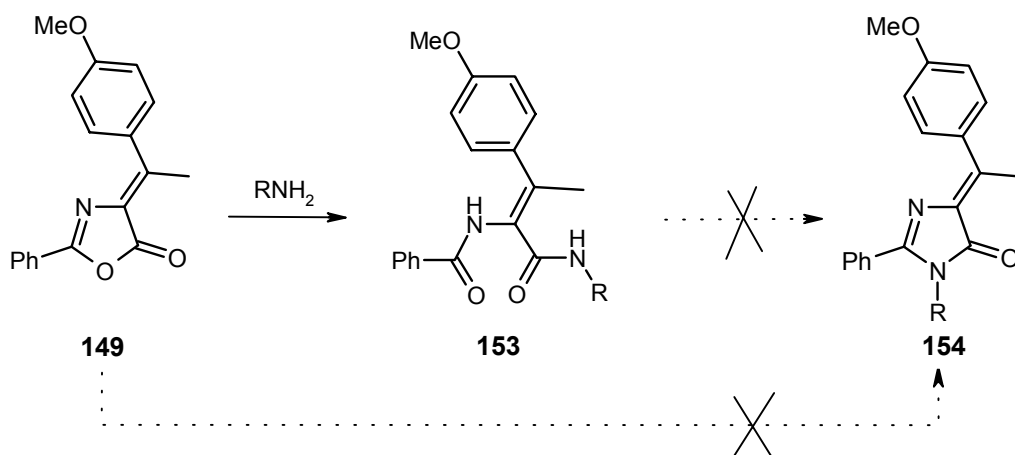


Schéma 40 : Equilibre entre la forme cyclisée oxazolone **148** et la forme ouverte amide **152**

1.1.3.3 Préparation des 5-(aryléthylidène)-4-imidazolones

A partir des phényléthylidène-5-oxazolones **149**, la cyclisation en imidazolone est encore plus difficile (Schéma 41). Cativiela et al.^{130,134} décrivent l'ouverture de la 2-phényl-4-(α -phényléthylidène)-5(4H)-oxazolone Z et E par l'aniline en acide benzamidocinnamique de configuration Z et E respectivement, ainsi que la cyclisation de cet amide, en milieu AcOH/AcONa , en imidazolone de configuration Z avec un rendement faible (30%).

Schéma 41 : Synthèse de 2-aryl-5-(aryléthylidène)-4-imidazolones **154**

Nous avons effectué, dans un premier temps, l'ouverture de l'oxazolone **149** par la MeNH_2 et l'aniline dans le benzène. Les amides correspondants **153** ont été obtenues avec de bons rendements (~65 %). Différentes conditions ont été utilisées pour cycliser ces amides, AcOH/AcONa , diphényl éther à 270°C , aniline à 120°C et aniline/benzène (dans le cas où $\text{R} = \text{Ph}$). Dans tous les cas, nous avons obtenu le produit de départ inchangé et nous avons observé la formation de l'oxazolone correspondante **149** mais jamais la formation d'imidazolone **154**. La présence d'un méthyle sur la partie vinylique des amides **153** bloque ces dernières dans une conformation particulière du fait de l'encombrement stérique engendré par ce groupe méthyle (Schéma 41). Ceci rend encore plus difficile leur cyclisation en imidazolones. Tous les essais de cyclisation ayant échoué, nous avons décidé d'abandonner cette série de composés.

1.1.4 Obtention des imidazolones par "Umpollung" : activation de la fonction amide

L'étape de cyclisation des amidoamides **152**, obtenus par ouverture des oxazolones, met en jeu l'attaque de l'azote d'une fonction amide qui n'est pas très réactif, sur le carbonyle d'une autre fonction amide également peu réactive. La cyclisation n'étant pas favorisée, nous avons pensé activer le carbonyle de l'amide en le transformant en iminochlorure **156** ou en iminotriflate **157** (Figure 33). Ces composés, après réaction avec une amine primaire,

pourraient former une amidine suffisamment réactive pouvant rapidement se cycliser en imidazolones.

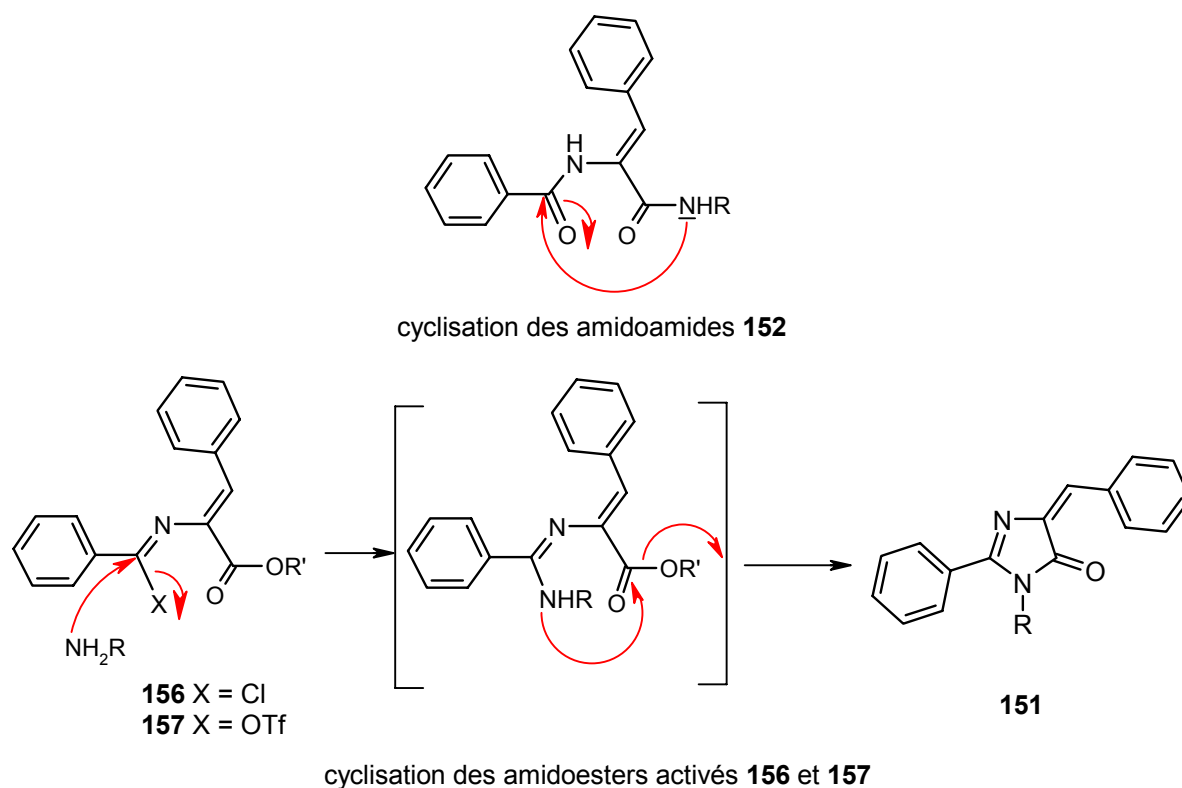


Figure 33 : Mécanisme de cyclisation des amidoamides **152** et des amidoesters activés **156** et **157**

Nous avons alors préparé les amidoesters **155** au départ des oxazolones comme illustré dans le Schéma 42. L'amide ainsi obtenu a été traité en milieu SOCl_2 ou PCl_5 , cependant nous n'avons pas réussi à isoler l'iminochlorure correspondant. Nous l'avons alors mis en réaction sans purification préalable en présence d'ammoniaque ou de propylamine. Parmi les différentes conditions utilisées, une seule a permis d'obtenir l'imidazolone correspondante **151i** (ii : $\text{SOCl}_2/\text{DMF}/50^\circ\text{C}$; iii : NH_3 gaz/ MeOH) avec un rendement $\leq 50\%$, cependant cette méthode n'a pu être appliquée à d'autres oxazolones.

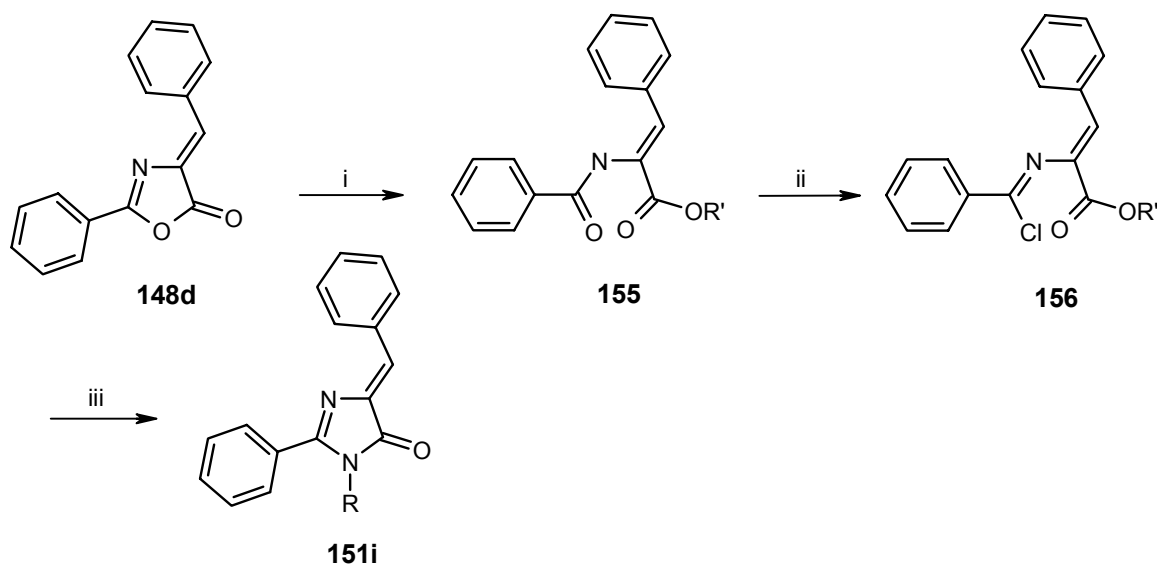


Schéma 42 : Préparation de l'imidazolone **151i** par activation des amides ($R' = \text{Me}$ ou Et) sous forme d'iminochlorures. i : NaOH/ MeOH ou EtOH. ii : a) SOCl₂/DMF/50°C ; b) SOCl₂/ CH₂Cl₂/30-40°C ; c) SOCl₂ ; d) PCl₅/CH₂Cl₂/pyridine. iii : a) iPrOH/NH₃g ; b) THF/NH₃g ; c) MeOH/NH₃g ; d) THF/propylamine.

Les triflates sont également connus pour leur grande réactivité. Nous avons donc envisagé la synthèse d'imino-triflates à partir de la forme ouverte de l'oxazolone. En présence d'anhydride trifluoroacétique et de pyridine, l'intermédiaire ouvert **155** donne l'imino-triflate **157** correspondant qui est mis directement en réaction avec la méthylamine. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation de l'imino-triflate, de l'amidine ou de l'imidazolone correspondante. De ce fait, cette réaction a été abandonnée.

1.2 Au départ des amidines (Voie B)

Au vu de ces résultats peu encourageants, une autre méthode au départ de dérivés de benzamidine a été envisagée. Cette méthode décrite pour la première fois par Devasia¹³⁵ est une réaction à trois composants qui met en jeu le chlorhydrate de la benzamidine avec le chloroacétate d'éthyle et un aldéhyde aromatique en présence d'hydrogénocarbonate de sodium dans le n-propanol. Cette réaction conduit aux imidazolones avec des rendements moyens (30-55%, Schéma 43). D'autres essais avec le chlorure de chloroacétyle n'ont pas conduit à de meilleurs résultats.¹³⁶ Plus tard¹³⁷ Devasia montre que l'utilisation de proportions différentes en réactifs (1 éq. d'aldéhyde/~2,5 éq. de chloroacétate d'éthyle/~1,7 éq. de

benzamidine) ainsi que l'utilisation du bromoacétate d'éthyle au lieu du chloroacétate permet d'améliorer les rendements (33-97%).

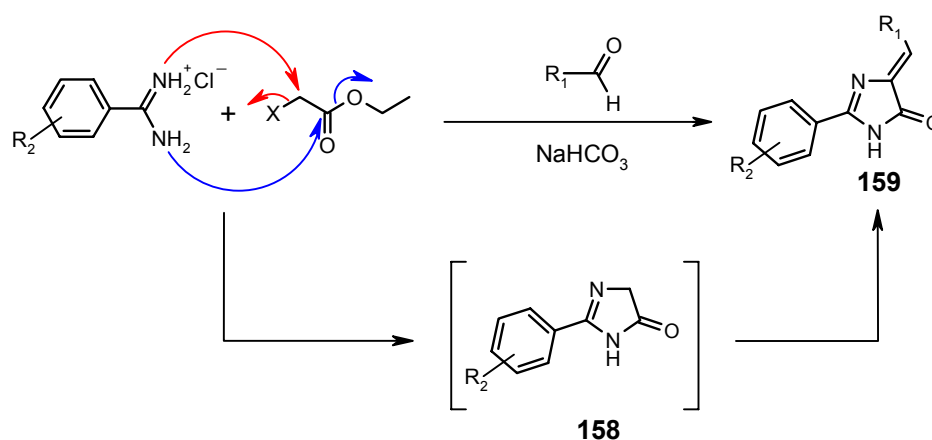


Schéma 43 : Méthode de Devasia pour la préparation des imidazolones

D'après les auteurs, la synthèse des imidazolones dans ces conditions réactionnelles mettrait en jeu un intermédiaire réactif, la 2-aryl-2-imidazolin-5-one **158** (Schéma 43). Cet intermédiaire est formé à partir du dinucléophile, ici l'amidine aromatique, et du diélectrophile, le chloroacétate d'éthyle. Il présente un groupe méthylène réactif qui pourrait ensuite se condenser avec l'aldéhyde. Le bon rendement de la réaction serait donc directement lié à la rapidité de formation de l'intermédiaire **158**. Les faibles rendements peuvent s'expliquer par la possible condensation entre l'aldéhyde aromatique et l'amidine formant des dérivés arylidènes.¹³⁸ De meilleurs rendements sont donc logiquement obtenus en présence d'halogénoacétate d'éthyle plus réactif comme le bromo ou l'iodoacétate. Cependant une dialkylation (symétrique ou dissymétrique) de la benzamidine peut avoir lieu et conduire à la formation de produits secondaires. De plus l'intermédiaire **158** étant très réactif, il peut s'oxyder rapidement et conduire facilement à des composés très colorés comme la glyoxaline (Figure 34). Cette oxydation peut également largement influencer sur le rendement de la réaction.

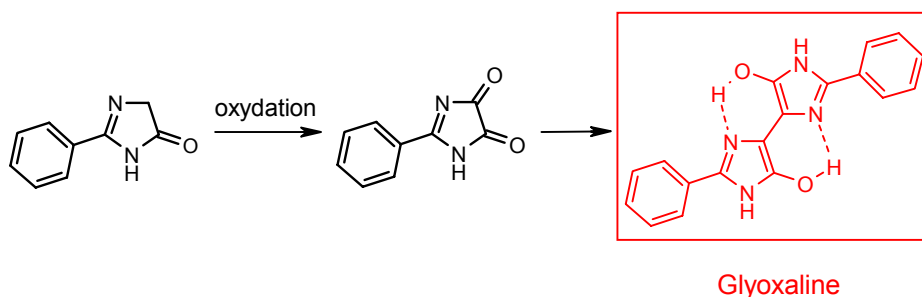
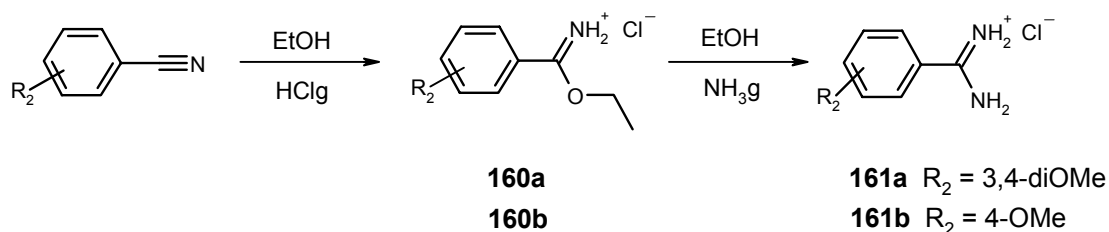


Figure 34 : Oxydation du 2-imidazolin-5-one en glyoxaline rouge

1.2.1 Préparation des amidines

Cette méthode a été reprise au laboratoire. Pour cela il nous a fallu au préalable préparer les benzamidines **161** non commerciales (Schéma 44).

Schéma 44 : préparation des amidines **161a-b**

Ces dernières sont préparées en 2 étapes au départ des benzonitriles correspondants. Les iminoéthers intermédiaires **160** sont isolés puis traités avec NH₃g dans l'EtOH. Les rendements sont de l'ordre de 50% pour les deux étapes. D'autres méthodes ont été essayées (en présence d'acétylcystéine et d'acétate d'ammonium)¹³⁹ mais n'ont pas permis d'obtenir l'amidine correspondante.

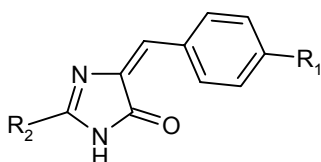
1.2.2 Obtention des imidazolones

Une première série de 2-aryl-4-arylidène-2-imidazolin-5-ones a été synthétisée dans différentes conditions. Nous avons mis en réaction l'amidine et l'aldéhyde en présence de NaHCO_3 et d'iodoacétate d'éthyle (Méthode A) ou de chloroacétate d'éthyle (Méthode B). La réaction a également été réalisée en faisant varier le couple base/solvant : iodoacétate d'éthyle / EtONa / EtOH (Méthode C). Les résultats sont reportés dans le Tableau 29.

1.2.2.1 Aldéhydes aromatiques

Les méthodes A et B ont été utilisées suivant la nature des partenaires mis en jeu. En particulier nous avons montré l'efficacité de la méthode B lorsque l'amidine mise en jeu porte un groupement électrodonneur (composés **159b** et **159h**). Dans ce cas, la benzamidine étant plus réactive, nous avons diminué la réactivité de l'électrophile en utilisant le chloroacétate

d'éthyle à la place de l'iodoacétate d'éthyle. Par contre cette méthode B s'est avérée moins efficace en présence d'un aldéhyde portant un groupement électroattracteur. Les rendements de ces réactions restent cependant modérés voire faibles (10-50 %). Ces faibles rendements peuvent s'expliquer par la difficulté de purification des imidazolones inhérente à leur forte insolubilité.



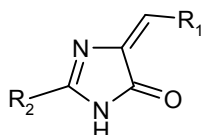
Composé	R ₁	R ₂	Méthode	Rdt (%)
159a	H	Ph	A	77
159b	H	3,4-diOMePh	A	27
			B	40
159c	H	4-OMePh	A	42
159d	OCH ₂ CO ₂ Et	Ph	A	70
159e	OTs	3,4-diOMePh	A	2
			C	17
159f	H, 2-OMe	Ph	A	5
159g	OMe	Ph	A	62
159h	NMe ₂	3,4-diOMePh	A	0
			B	68
159i	NMe ₂	Me	B	36
159j	NMe ₂	Ph	B	68
159k	NMe ₂	4-OMePh	B	15
159l	CN	Ph	B	10
159m	CN	4-OMePh	B	50
159n	CN	3,4-diOMePh	B	10
159o	CF ₃	Ph	B	35
159p	NO ₂	Ph	B	0
159q	CO ₂ Me	Ph	B	17

Tableau 29 : Préparation des imidazolones **159a-q**.

Afin d'obtenir l'imidazolone portant un groupement hydroxyle en R₁, nous avons réalisé la réaction avec le 4-hydroxybenzaldehyde, cependant, celui-ci a été alkylé in situ par l'iodoacétate d'éthyle et nous avons obtenu le composé **159d**. Une protection a donc été envisagée et nous avons utilisé l'anisaldéhyde afin d'obtenir le composé **159g**, qui après déméthylation en présence de BBr₃ conduit à la 2-phényl-4-(4-hydroxybenzylidène)-imidazolin-5-one **162** avec un rendement de 73%. Ce type de protection est facile d'accès car l'aldéhyde est commercial, cependant elle n'est pas envisageable si l'aromatique en position 2 de l'imidazolone porte des groupements méthoxy. Nous avons donc, dans un premier temps, essayé de protéger le 4-hydroxybenzaldehyde avec le TBDMSCl, mais cette protection n'est pas stable dans ces conditions réactionnelles. Un autre type de protection plus stable a donc été nécessaire, le groupement tosyle, introduit facilement sur l'aldéhyde en présence de chlorure de tosyle. Dans ce cas, le composé **159e**, a été obtenu à l'état de trace (2%, Tableau 29). Nous avons alors essayé de changer le couple base/solvant constitué de NaHCO₃/*i*-PrOH par le couple EtONa/EtOH. Nous avons pu observer une amélioration du rendement, mais qui reste cependant très faible.

1.2.2.2 Aldéhydes non aromatiques

En présence d'aldéhydes non aromatiques, moins réactifs que les aldéhydes aromatiques, la réaction se fait difficilement, avec des rendements de 10 % (**159r** et **159s**). L'utilisation d'autres bases comme l'EtONa (Méthode C) n'a donné aucun résultat. Nous avons observé une forte polymérisation lors de l'utilisation de l'isobutyraldéhyde avec la benzamidine et K₂CO₃ dans le DMF en présence d'iodoacétate d'éthyle (Méthode D), et nous n'avons isolé le produit désiré qu'en très faible quantité (Tableau 30).



Composé	R ₁	R ₂	Méthode	Rdt (%)
159r	i-Pr	3,4-diOMePh	A	-
			C	-
			D	10
159s	c-Hex	3,4-diOMePh	A	10
			C	-

Tableau 30 : Préparation des imidazolones **159r-s**

1.2.2.3 Configuration des imidazolones

Peu de travaux décrivent la configuration des imidazolones, cependant on trouve la plupart du temps les imidazolones représentées avec une configuration Z (le phényle du benzylidène par rapport à l'azote 3 de l'imidazolone). Cette configuration est décrite comme étant la plus stable selon Dalla Croce et La Rosa.¹⁴⁰ Ces auteurs montrent que l'irradiation à 3650 Å des imidazolones obtenues conduit à un mélange 7:3 du composé Z et de son isomère E. Le proton vinylique de l'isomère E présente un déplacement chimique aux alentours de 6,8 ppm et s'isomérisse rapidement par chauffage ou par chromatographie sur gel de silice. Quand le proton est en cis par rapport au carbonyle de l'imidazolone ce dernier exerce un déblindage du proton oléfinique qui présente un déplacement chimique aux alentours de 7,1 ppm. Dans le cas de nos imidazolones **159a-s**, nous avons obtenu un seul isomère défini comme étant de configuration Z, par comparaison avec les données RMN de la littérature.

1.3 Au départ des iminoéthers (Voie C)

Des travaux de Kjaer en 1953,¹⁴¹ décrivent l'obtention d'imidazolones en condensant, dans un premier temps, l'ester éthylique de la glycine avec du benzimide d'éthyle pour donner la 2-phényl-2-imidazolin-5-one **163** (Schéma 44). En traitant de ce dernier avec des

aldéhydes aromatiques, Kjaer a mis en évidence la formation des 2-phényl-4-arylidène-5-imidazolones.

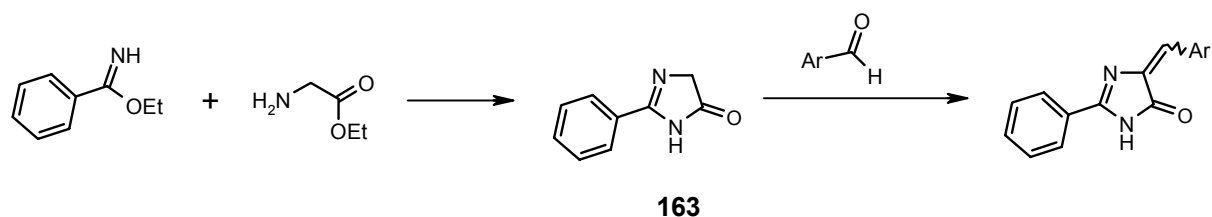


Schéma 44 : Méthode de Kjaer

Kidwai et Devasia¹¹⁷ ont montré par la suite, que les imidazolones pouvaient être obtenues directement en condensant l'aldéhyde, l'iminoéther et l'ester de la glycine en présence de NaHCO_3 (Schéma 45). On évite ainsi d'isoler l'intermédiaire **163** qui est un composé très réactif qui s'oxyde rapidement (Figure 34).

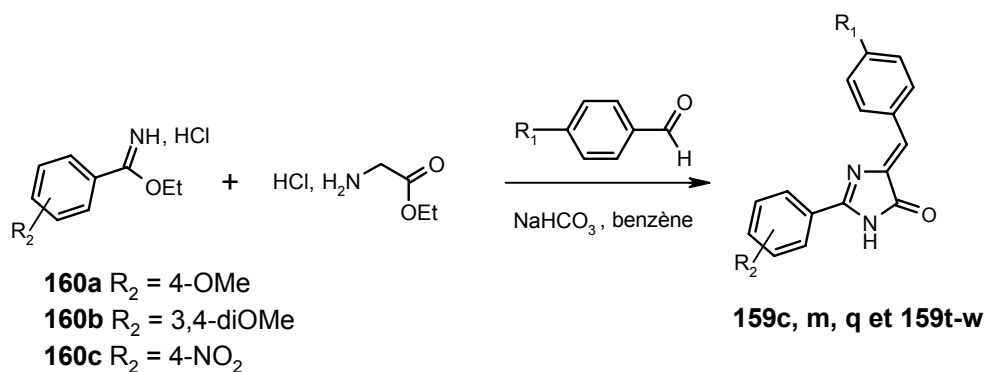


Schéma 45 : Synthèse des imidazolones selon la méthode de Kidwai et Devasia

Cette méthode de synthèse comparée aux méthodes précédentes (cf. § B.1.1 et B.1.2), présente l'avantage d'être rapide, du fait de la facilité de préparation de l'iminoéther de départ. Ce dernier est obtenu facilement à partir des benzonitriles correspondants en milieu acide (cf. 1^{ère} étape de la synthèse des benzamidines **161**, § B.1.2.1).

Nous avons donc utilisé cette voie de synthèse pour élargir notre exploration en R_1 et R_2 des imidazolones. Dans un premier temps, nous avons fait réagir l'iminoéther **160a** en présence de *p*-méthoxybenzaldéhyde et avons obtenu l'imidazolone **159c** avec un rendement de 77% (Tableau 31) contre 42% au départ de la benzamidine (§ B.1.2). Par contre l'imidazolone **159m** portant un groupement cyano en R_1 , a été obtenue avec un rendement nettement moins bon (30 % contre 50 % à partir de l'amidine).

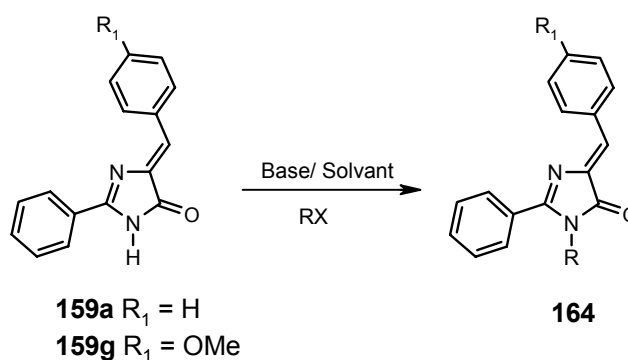
Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
159c	H	4-OMe	77
159m	CN	4-OMe	30
159t	CN	4-NO ₂	25
159q	COOMe	H	16
159u	COOMe	3,4-diOMe	35
159v	COOMe	4-NO ₂	41
159w	OMe	4-NO ₂	15

Tableau 31 : Préparation des imidazolones

Cependant, nous avons pu obtenir les produits désirés même si les rendements restent faibles. La récupération des imidazolones reste toujours le problème majeur, en effet leur grande insolubilité en fait des produits difficiles à manipuler et à purifier.

1.4 Alkylation en N1 des imidazolones

Contrairement à la méthode passant par les oxazolones, la synthèse d'imidazolones à partir des amidines ou des iminoéthers ne permet pas d'obtenir des composés alkylés en N1. L'alkylation des imidazolones **159a** et **159g** a donc été effectuée par la voie classique, c'est à dire en présence d'une base forte et d'un halogénure (Schéma 46).

Schéma 46 : Alkylation des imidazolones **159**

Composé	R ₁	Base/ Solvant	RX	Rendement (%)
164a	H	NaH/ DMF	MeI	30
		NaH/ THF	MeI	71
		NaH/ Acétonitrile	MeI	72
164b	OMe	NaH/ Acétonitrile	MeI	31
		<i>t</i> -BuOK/ DMF	MeI	30
164c	OMe	NaH/ DMF	EtOOCCH ₂ Br	39
164d	OMe	NaH/ DMF	BnBr	42

Tableau 32 : Alkylation des imidazolones **159a** et **159g**.

Les différentes conditions utilisées sont reportées dans le Tableau 32. L'alkylation de l'imidazolone **159a** a été effectuée dans différents solvants en présence de NaH. La réaction se fait avec un bon rendement dans l'acétonitrile et le THF, et avec un rendement nettement moins bon dans le DMF. Cependant ceci est principalement dû à un problème de récupération du produit. L'alkylation de l'imidazolone **159g** a donc été effectuée dans l'acétonitrile mais celle-ci n'a pas donné un rendement satisfaisant, le composé **159g** n'étant pas très soluble dans l'acétonitrile. L'utilisation du *tert*-butanolate de potassium dans le DMF n'a pas permis d'améliorer le rendement. Les composés **164c** et **164d** ont été obtenus avec des rendements moyens (~40%). La présence d'un groupement électrodonneur sur **159g** rend le proton de NH moins acide et surtout augmente l'insolubilité du produit, entraînant une perte de ce dernier lors de la purification par flash-chromatographie.

Une étude plus approfondie de cette alkylation serait nécessaire afin de déterminer les conditions optimales.

2. Préparation d'imidazolones par couplage palladium : nouvelle méthode de synthèse

Parallèlement à ces trois méthodes classiques peu efficaces, nous avons tenté une toute autre approche synthétique consistant dans un premier temps à construire le cycle imidazolin-5-one portant un groupement halogène ou triflate en position 2, afin d'y introduire de la diversité par couplage palladium en particulier des groupements aromatiques (Schéma 47).

Pour introduire un halogène ou un groupement triflate en position 2 de nos imidazolones, nous avons envisagé deux stratégies: la première au départ des 2-aminoimidazolones (voie A) et la deuxième au départ des imidazolidine-2,4-diones (voie B).

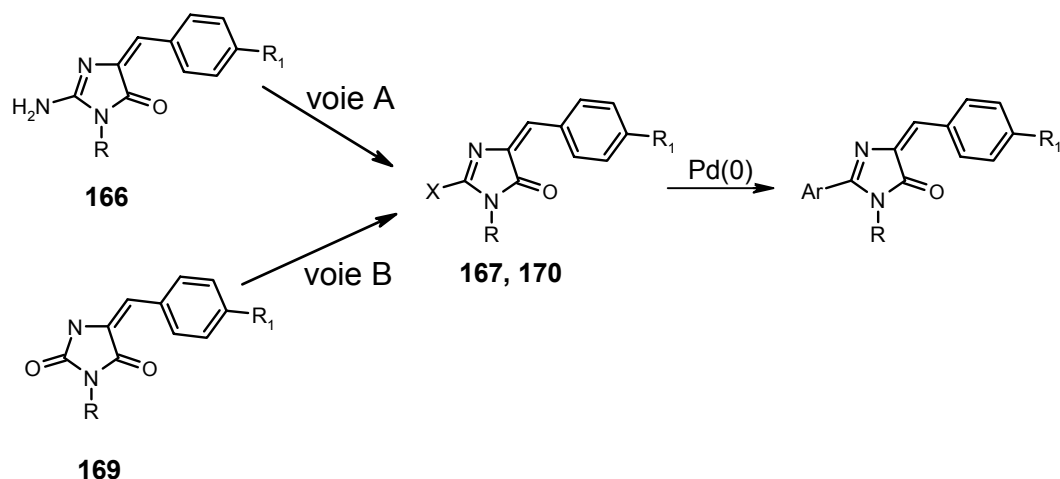


Schéma 47 : Introduction d'aromatiques en position 2 des imidazolones,
X = Cl, OTf

2.1 A partir des 2-aminoimidazolin-5-ones

2.1.1 Préparation des 2-aminoimidazolin-5-ones

Nous nous sommes d'abord intéressés à une première voie de synthèse décrite par Roué et Bergman¹⁴² permettant de synthétiser rapidement la leucettamine B (Figure 35), un médiateur de l'inflammation.

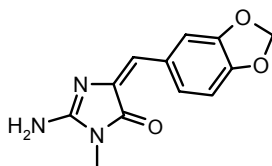


Figure 35 : Leucettamine B

Cette voie de synthèse met en jeu la condensation d'aldéhydes aromatiques avec la méthylglycocyamidine **165** obtenue à partir du bromhydrate de la N-méthyl-S-éthyl isothiourée. Nous avons repris cette méthode en utilisant comme produit de départ

l'iodhydrate de la N-méthyl-S-méthyl isothiourée obtenue quantitativement à partir de N-méthylthiourée. La réaction de la glycine avec la N-méthyl-S-méthyl isothiourée en milieu basique suivie d'un traitement dans des conditions acides conduit au sel **165** avec un rendement de 75 % (Schéma 48).

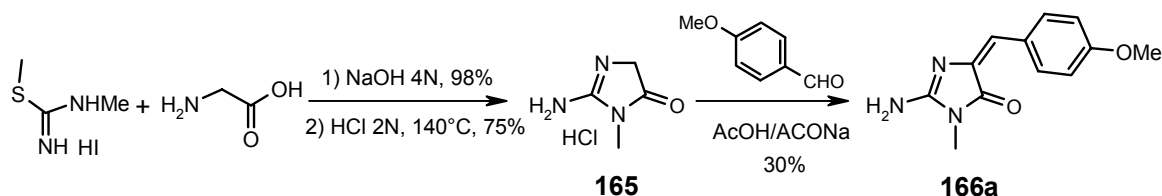


Schéma 48 : Synthèse des 2-aminoimidazolin-5-ones

La condensation du chlorhydrate de glycoxyamidine **165** avec l'anisaldéhyde en présence d'AcOH et d'AcONa nous a permis d'obtenir le dérivé aryldène **166a** correspondant mais avec un faible rendement (30 %).

Nous nous sommes alors intéressés à une autre méthode décrite par Mukerjee et al.¹⁴³ qui présente l'avantage d'utiliser les oxazolones comme substrat de départ, composés intermédiaires pour la synthèse des imidazolones (§ B.1.1). A partir des oxazolones **148o** et **148i**, on obtient, par réaction avec le chlorhydrate de S-benzylisothiuronium, les 2-aminoimidazolin-5-ones **166b** et **166c** correspondantes en une seule étape (Schéma 49).

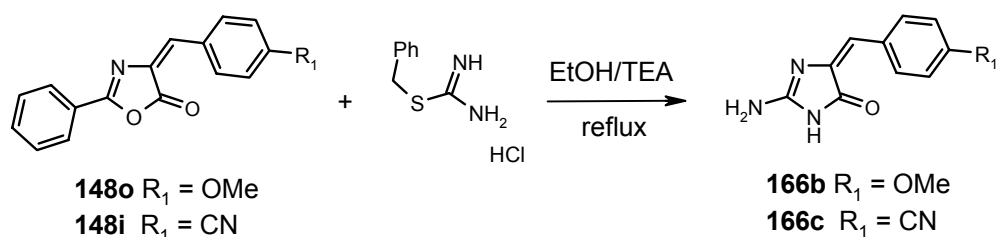
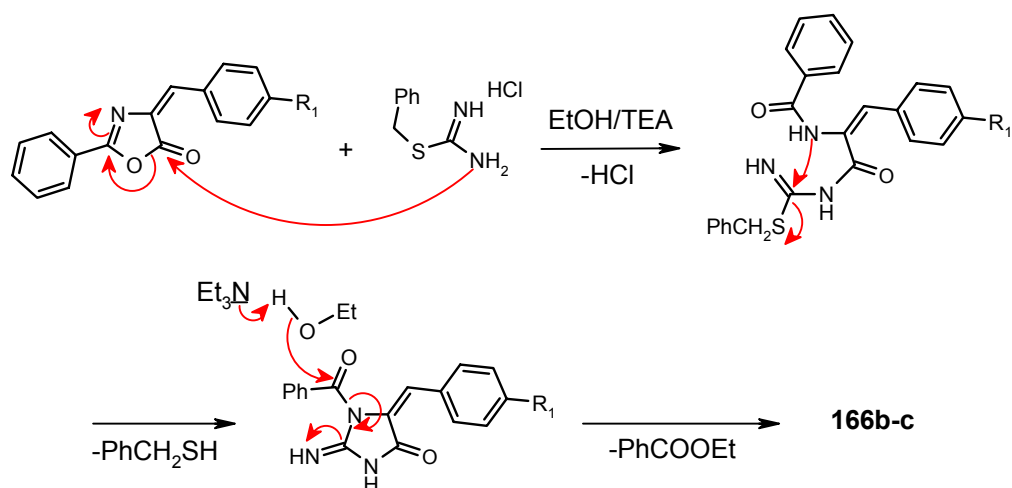


Schéma 49 : Synthèse de la 2-aminoimidazolin-5-one **166b** et **166c**

La formation de l'aminimidazolone passe en premier lieu par une ouverture de la liaison 1-5 de l'oxazolone par l'isothiourée suivie d'une attaque de l'amide sur l'isothiourée conduisant à la formation du cycle imidazolone (Schéma 50). Une dernière étape de débenzoylation catalysée par la triéthylamine conduit aux 2-aminoimidazolin-5-ones **166b-c** non substituée en N1.

Schéma 50 : Mécanisme de formation de **166b-c**

Nous avons ainsi préparé les dérivés **166b** et **166c** avec des rendements de 65 et 96 % respectivement.

2.1.2 Préparation des dérivés halogénés

A partir de ces 2-aminoimidazolin-5-ones **166** nous avons envisagé d'obtenir les composés halogénés correspondants **167** par une réaction de diazotation classique. Aucun travail n'étant publié sur la diazotation des 2-aminoimidazolin-5-ones nous nous sommes intéressés à des hétérocycles de structure proche c'est à dire portant le motif "guanidine". De nombreux travaux décrivent des diazotations sur les 2-aminoimidazoles,¹⁴⁴ les 2-aminobenzimidazoles^{145,146} ou les 2-aminopurines.^{147,148} Il apparaît que les conditions classiques en présence d'HCl concentré ne sont pas les plus favorables. L'halogénéation se fait avec des rendements moyens en milieu aqueux avec $\text{CuX}_2/\text{NaNO}_2$, mais avec de bons rendements en milieu non aqueux en présence d'alkyl nitrite.

La réaction de diazotation du composé **166b** en présence de $\text{CuBr}_2/\text{NaNO}_2$ dans l'eau conduit à un grand nombre de produits que nous n'avons pas pu identifier. Nous avons alors engagé ce composé dans une réaction de diazotation en milieu organique^{147,148} (*t*-butylnitrite, CuI , I_2 , CH_2I_2 dans le THF, Schéma 51). Dans ces conditions, le dérivé halogéné n'a pas été obtenu, cependant aucune dégradation ni formation de produit secondaire n'a été observée.

Seul le produit de départ a été récupéré. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le composé **166c**.

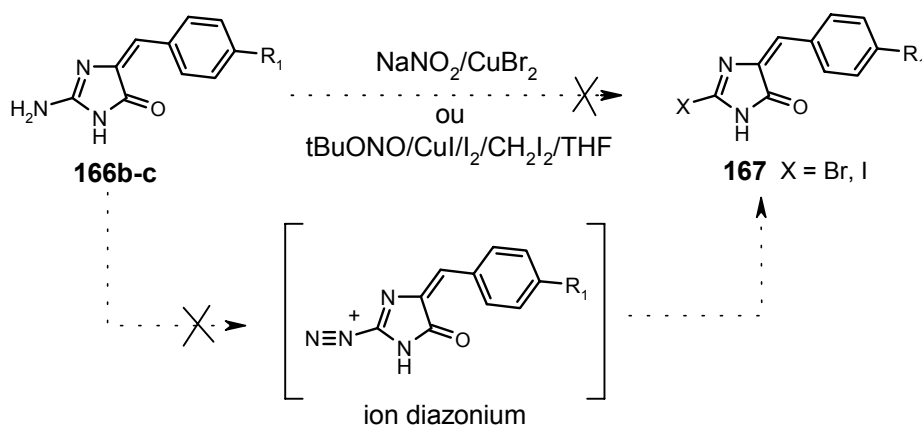


Schéma 51 : Introduction d'un halogène en position 2

Une troisième méthode consistant à préparer un ion diazonium piégé sous la forme d'un triazène a été explorée. Ce triazène peut ensuite conduire au dérivé halogéné correspondant par la mise en jeu de TMSI¹⁴⁹ ou de ZnI₂.¹⁵⁰ Nous avons repris les conditions opératoires utilisées par Foster¹⁵¹ (Schéma 52), mais au départ de **166b** le triazène n'a pas été isolé. Nous n'avons observé que la formation du sel de pyrrolidine et ceci quel que soit le solvant utilisé (AcOH, MeOH). Cette voie de synthèse a été abandonnée.

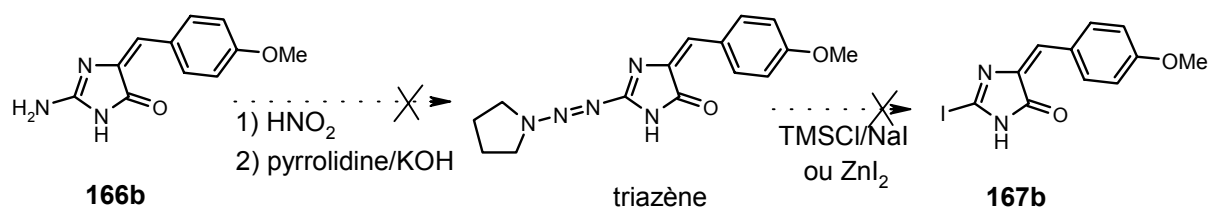


Schéma 52 : Préparation du pyrrolidine-triazène

2.2 A partir des imidazolidine-2,4-diones

Une autre stratégie consiste à construire les imidazolones à partir de l'hydantoïne **168** (Figure 36). Elle met en jeu un iminotriflate **170a** ou un iminochlorure **170b** ($X = \text{OTf}, \text{Cl}$) résultant de l'activation de l'hydantoïne **169** convenablement protégée.

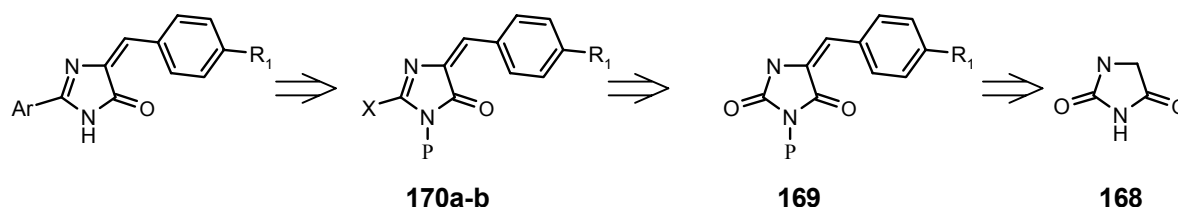


Figure 36 : Schéma rétro synthétique d'obtention des imidazolones à partir de l'hydantoïne

Les hydantoïnes **169** ont été obtenues par une réaction classique consistant à mettre en réaction l'hydantoïne **168** avec un aldéhyde en présence d'AcONa dans l'AcOH.

Deux voies sont possibles au départ de l'hydantoïne (Schéma 53) :

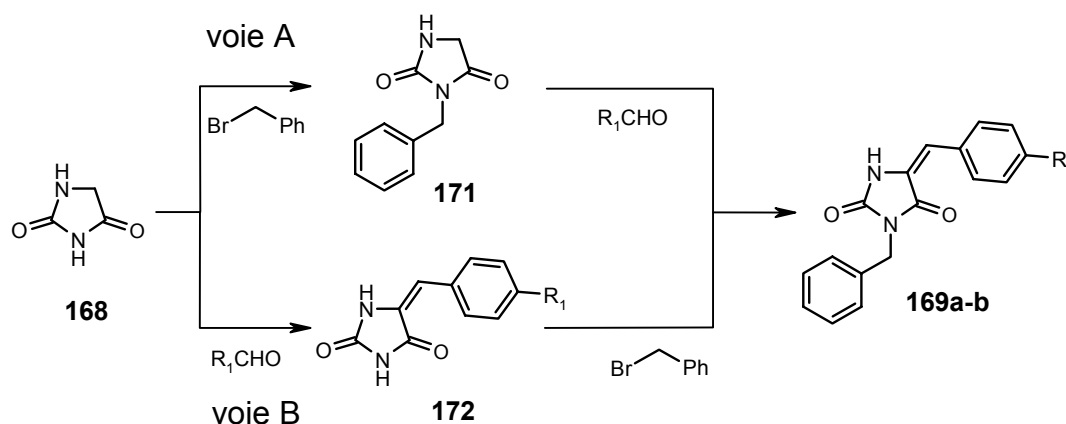


Schéma 53 : Préparation de l'hydantoïne **169**

La première voie (voie A) consiste dans un premier temps, à protéger l'imidazolidine-2,4-dione par l'action du bromure de benzyle puis de la condenser avec l'aldéhyde approprié. A l'inverse, la voie B consiste à condenser l'hydantoïne avec l'aldéhyde et ensuite à protéger l'amide par l'action du bromure de benzyle.

Les 2 voies de synthèse ont été réalisées au laboratoire et les résultats sont reportés dans le Tableau 33.

Voie A Rdt (%)		Voie B Rdt (%)	
171	169	172	169

R ₁ = OMe	a	58	67	46	15
R ₁ = H	b	58	28 (38*)	-	-

* Réaction réalisée sous micro-ondes

Tableau 33 : Préparation des hydantoïnes **169a** et **169b**

L'hydantoïne **169a** a été préparée selon les deux méthodes. Elle a été obtenue avec un rendement global de 40% par la voie A et avec un rendement global de 7% par la voie B. La méthode A a donc été retenue pour synthétiser l'hydantoïne **169b**. La condensation du benzaldéhyde avec l'hydantoïne protégée **171**, a conduit à **169b** avec un rendement de 28%. Une amélioration a pu être apportée en effectuant la réaction de condensation sous micro-ondes (38%).

2.2.1 Préparation des triflates

A partir de l'hydantoïne **169a**, nous avons tenté d'introduire un groupement trifluorométhanesulfonate (Tf) sur l'oxygène de l'amide libre (Schéma 54).

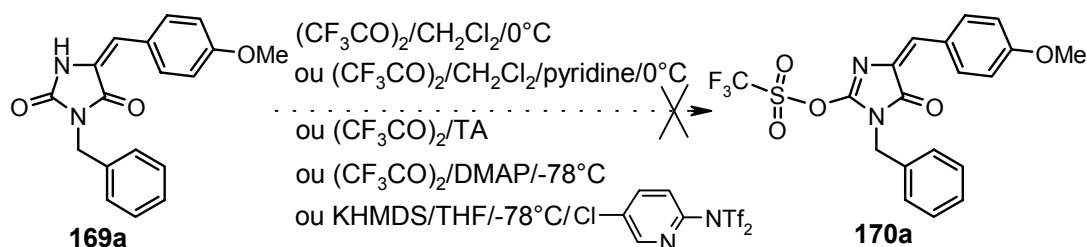


Schéma 54 : Différentes conditions de préparation de la 4-benzylidène-2-OTf-imidazol-5-one **170a**

Pour cela nous avons d'abord utilisé des conditions classiques utilisées pour former des O-triflates sur des pyrroles¹⁵² ou des pyrrolines.¹⁵³ Nous avons donc mis l'imidazolidine-2,4-dione **169a** en réaction avec l'anhydride triflique dans le CH₂Cl₂ à 0°C, en présence ou non de pyridine, ou encore dans l'anhydride triflique en large excès à température ambiante. Ces trois essais n'ont pas permis d'obtenir l'iminotriflate attendu mais uniquement le produit de départ. Nous avons alors essayé d'autres conditions comme l'anhydride triflique en présence de DMAP¹⁵⁴ ou le KHMDS en présence d'un agent de triflation tel que le chloropyridyltriflimide dans des conditions anhydres à -78°C.¹⁵⁵ Mais là encore nous n'avons récupéré que le produit

de départ. Nous n'observons pas de dégradation lors de ces réactions ni la formation de nouveaux produits. Les groupements O-triflates étant de très bons groupes partants, il se peut que le produit soit hydrolysé très rapidement dès sa formation.

2.2.2 Préparation des iminochlorures

En parallèle à la synthèse des iminotriflates nous avons décidé de préparer les iminochlorures **170b**.

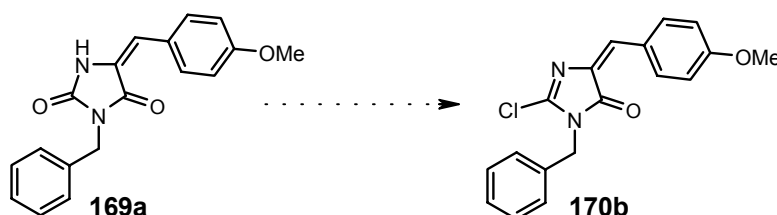


Schéma 55 : Préparation de 4-benzylidène-2-chloroimidazol-5-one **170b**

Bien que moins réactifs que les triflates, les chlorures sont souvent utilisés dans les réactions de couplage catalysées par le palladium.¹⁵³ Pour les préparer, il existe plusieurs méthodes mais on utilise classiquement des conditions très acides (POCl_3 , SOCl_2 ...). Dans ces conditions à température ambiante aucune réaction n'a lieu avec l'hydantoïne **169a**. Par contre en chauffant, nous avons observé une dégradation du produit. Dans des conditions neutres donc plus douces ($\text{PPh}_3/\text{CCl}_4$) on retrouve le produit de départ inchangé.

Lors de ces essais nous nous sommes heurtés à un gros problème de réactivité. En effet, soit on récupère le produit de départ, soit on observe une dégradation. Même si l'iminochlorure se forme, tout comme l'iminotriflate, il n'est pas du tout stable et redonne par hydrolyse l'amide de départ. Ces composés ne sont donc pas de bons partenaires pour effectuer des réactions de couplage palladium.

2.3 A partir des S-méthylthioimidazolones

2.3.1 Données bibliographiques

La réaction de couplage catalysée par le palladium permettant de former des liaisons de type carbone-carbone, est devenue une réaction majeure en chimie organique. Elle est compatible avec de nombreux groupements électrodonneurs ou électroattracteurs, avec des composés stériquement encombrés et se fait dans des conditions douces, la plupart du temps.¹⁵⁶ Lors de réactions de couplage catalysées au palladium, telles que les réactions de Stille ou de Suzuki, les organostannanes, les acides boroniques vont le plus souvent de paire avec des halogénures ou des triflates.

Récemment, une équipe américaine a développé une méthode de couplage catalysé par le palladium entre des acides boroniques et des composés organiques soufrés.^{157,158,159} Ce processus synthétique implique la coupure d'une liaison carbone-soufre et la formation d'une liaison carbone-carbone dans des conditions douces, ceci par l'intermédiaire de l'addition oxydative du composé organosoufré sur le palladium. Cette étape entraîne la formation d'une liaison très stable entre l'atome de soufre et le métal (Schéma 56). La clé de cette nouvelle voie de synthèse réside donc dans l'activation de cette liaison de manière à favoriser la transmétallation de l'acide boronique sur l'intermédiaire "métal-thiolate" qui n'a pas lieu dans des conditions classiques de Suzuki, mais également la régénération du catalyseur.

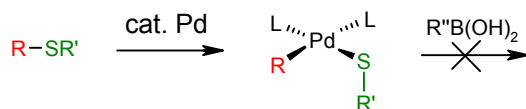


Schéma 56 : Addition oxydative d'un composé organosoufré sur le Pd(0).

Liebeskind et al montrent, dans leurs travaux, que le couplage entre un thioester et un acide boronique en présence de catalyseurs au palladium n'est pas possible. Par contre la présence d'une chaîne halogénée sur le thioester rend ce couplage possible et même efficace. La présence de la chaîne halogénée permet, après l'addition oxydative, la formation d'un intermédiaire sulfonium (Schéma 57) qui affaiblit la liaison métal-soufre et donc favorise la transmétallation, c'est "l'activation alkylante".¹⁵⁷

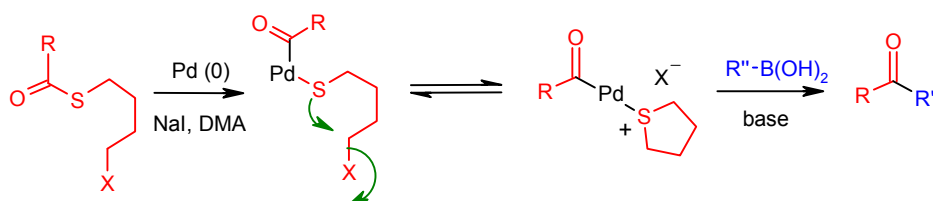


Schéma 57 : Couplage de thioesters par la méthode d'activation alkylante

Parallèlement les mêmes auteurs ont développé une méthode de synthèse de cétones à partir de thioesters par couplage palladium avec des acides boroniques, en présence de carboxylate de Cu(I) et en l'absence de base.¹⁵⁸ Dans ce cas il semblerait que l'activation de la transméallation $B \rightarrow Pd$ se fasse par l'intermédiaire du thiophène carboxylate de cuivre (CuTC). Ce dernier, formant un complexe avec le thioester (Schéma 58), est essentiel à la réaction. CuX ou CuCN étant eux totalement inefficaces tout comme les carboxylates de Zn(II), pourtant activateurs dans les réactions de couplage de composés soufrés avec des organozinciques catalysées par le nickel.¹⁶⁰

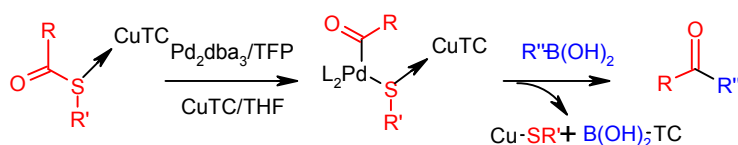


Schéma 58 : Couplage de thioesters catalysé par le Pd en présence de Cu(I)

Récemment Liebeskind et Srogl ont étendu cette stratégie de synthèse aux hétérocycles aromatiques.¹⁵⁹ Les composés hétérocycliques portant des halogénures ou des triflates étant difficiles à obtenir, la fonctionnalisation de ceux-ci par des réactions de couplage n'a pas été complètement explorée. Les travaux de Liebeskind et Srogl décrivent le couplage catalysé au palladium, en présence de CuTC et en absence de base, d'acides boroniques avec des thioéthers hétéroaromatiques (Schéma 59). Ces derniers présentent l'avantage d'être facilement accessibles et stables.

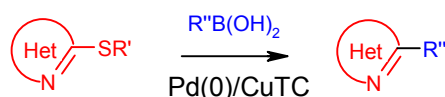


Schéma 59 : Synthèse de Liebeskind et Srogl

De nombreux thioéthers hétéroaromatiques (pyridine, pyrimidine, pyrazine, benzothiazole, tétrazole...) ont été couplés avec différents acides boroniques et les meilleurs rendements ont été obtenus avec Pd_2dba_3 /tris(2-furyl)phosphine (TFP) pendant 18h à 50°C dans le THF et en présence de 1,2 à 1,3 équivalents de CuTC (aucune réaction n'a été observée dans les conditions classiques de Suzuki : $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , dioxane). Dans la majorité des cas, les couplages ont été effectués avec les SMe thioéthers, apparemment suffisamment réactifs. Dans les autres cas, les SMe thioéthers peu réactifs ont été remplacés

par des groupements $\text{SCH}_2\text{CONH}_2$ ou $\text{SCH}_2\text{CONMe}_2$, ou encore un ajout de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ s'est montré indispensable mais dans tous les cas de bons rendements ont pu être obtenus.

Dans cette réaction de couplage des thioéthers avec les acides boroniques, la présence du carboxylate de cuivre (I) est essentielle (Schéma 60). Comme dans le cas des thioesters précédemment cités, le CuTC permet de favoriser la transmétallation d'une part en polarisant la liaison Pd-S (liaison de coordination entre le Cu et le S) et d'autre part en activant le bore (liaison de coordination entre le carboxylate et le B).

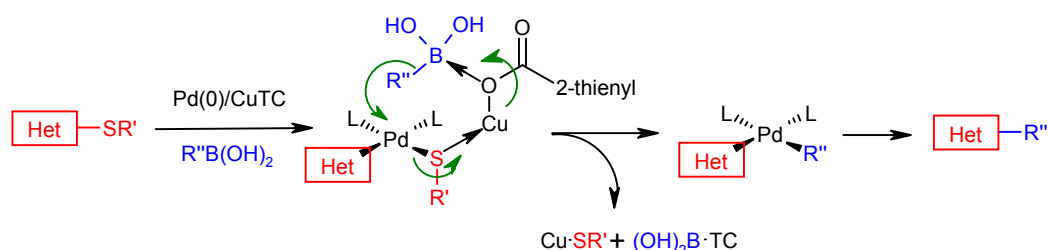


Schéma 60 : Mécanisme du couplage thioéthers-acides boroniques assisté par le CuTC

En 2003, Liebeskind¹⁶¹ et une équipe française, Guillaumet et al,¹⁶² ont étendu cette méthode au couplage des thioéthers hétérocycliques avec les organostannanes. La présence de cuivre dans ce type de couplage est également indispensable, cependant le contre-ion carboxylate peut-être remplacé. En effet, Guillaumet montre que l'utilisation de 2,2 éq. de $\text{CuBr.Me}_2\text{S}$ à la place du carboxylate de Cu conduit à de meilleurs rendements (90 % avec le $\text{CuBr.Me}_2\text{S}$ contre 60% avec le carboxylate de Cu). L'inutilité du contre-ion carboxylate dans ce couplage thioéthers-organostannanes semble confirmer l'existence d'une coordination entre le carboxylate et le Bore dans le couplage précédent. Les auteurs suggèrent ici que le cuivre ne serait pas essentiel à l'étape d'addition oxydative de l'arylthioéther sur le palladium. Par contre, il permettrait de favoriser l'étape de transmétallation en activant la liaison Pd-S et en intervenant dans une étape parallèle de transmétallation entre l'étain et le cuivre (Schéma 61).

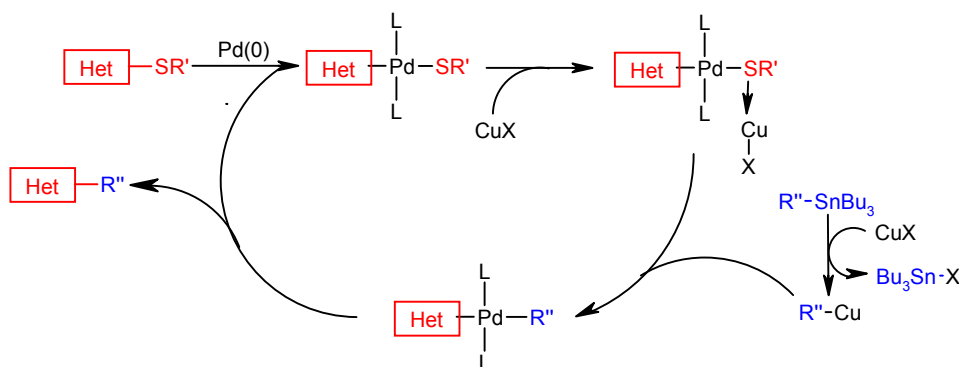


Schéma 61 : Cycle catalytique de couplage thioéther-organostannane proposé par Guillaumet et al

Par ailleurs, Egi et Liebeskind décrivent les couplages entre des thioéthers hétéroaromatiques et des stannanes (alkényle, aryle et hétéroarylstannanes) en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et du 3-méthylsalicylate de Cu(I) avec de très bons rendements (36-100%).

Ces réactions de couplage étant efficaces avec divers hétérocycles proches des imidazolones, nous avons décidé de l'appliquer à notre système hétérocyclique.¹⁶³

2.3.2 Préparation des thioimidazolones

La synthèse de méthylthioimidazolones décrite par Hénichart¹⁶⁴ met en jeu les thiohydantoïnes (composés **173-174**, Schéma 62) préparées facilement à partir d'un isothiocyanate approprié et de glycinate d'éthyle. Ces thiohydantoïnes sont ensuite condensées avec un aldéhyde en présence d'acide acétique et d'acétate de sodium pour former les thiohydantoïnes insaturées (composés **175** et **176**). L'alkylation en présence de méthanolate de Na et de CH_3I conduit aux méthylthioimidazolones **177** et **178** avec de bons rendements.

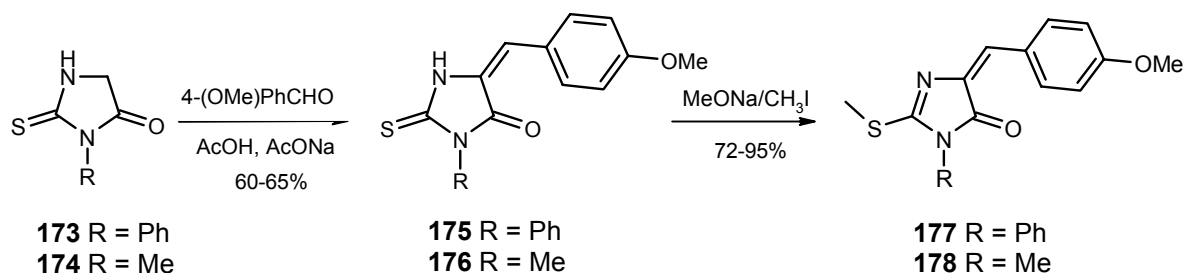
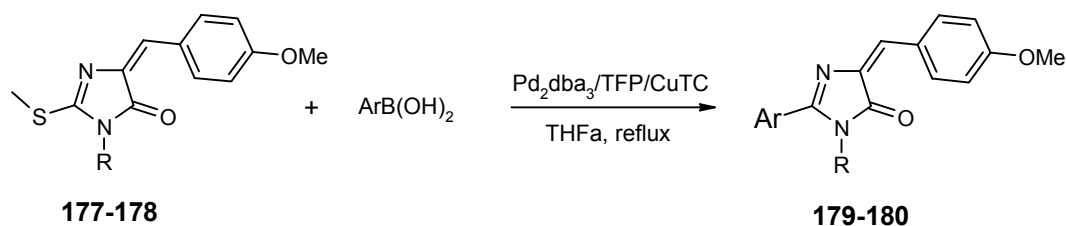


Schéma 62 : Préparation des méthylthioimidazolinones **177** et **178**

Nous avons ainsi préparé les deux méthylthioimidazolinones **177** et **178** que nous avons par la suite engagées dans des réactions de couplage catalysées par le palladium.

2.3.2.1 Couplage avec les acides boroniques

Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés au couplage thioéthers-acides boroniques décrit par Liebeskind.¹⁵⁹ Nous avons donc d'abord engagé les composés **177** et **178** dans les conditions de couplage utilisées par Liebeskind sur divers hétérocycles, c'est à dire en présence de Pd_2dba_3 /tris-furylphosphine (TFP)/thiophène carboxylate de cuivre et de différents acides boroniques dans le THF anhydre à reflux (Schéma 63).

Schéma 63 : Synthèse des imidazolinones **179-180** selon Liebeskind

Nous avons réalisé des essais avec trois acides phénylboroniques différents (Tableau 33) substitués par un groupement donneur (OMe), attracteur (CN) ou non substitué, afin de déterminer les possibilités et les limitations de la méthode. Nous avons obtenu des résultats encourageants avec les acides phénylboronique et 4-méthoxyphénylboronique cependant la présence d'un groupement cyano désactivant est défavorable dans ces conditions de couplage et nous n'avons pas pu isoler ni **179c** ni **180c**. Dans tous les cas la réaction n'est pas totale, on récupère près de 50% de produit de départ.

Composé	R	Ar	Rdt (%)
179a	Ph	Ph	40
179b	Ph	4-OMePh	35
179c	Ph	4-CNPh	0
180a	Me	Ph	31

180b	Me	4-OMePh	40
180c	Me	4-CNPh	0

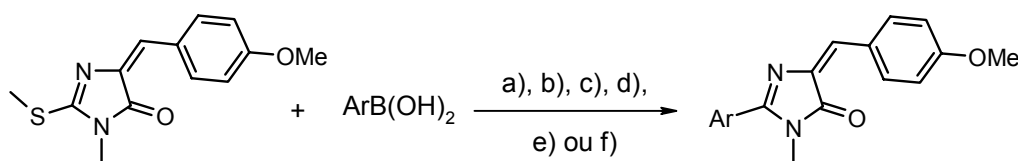
Tableau 34 : Préparation des imidazolones **179a-c** et **180a-c**

Suite à ces résultats encourageants, nous avons repris cette réaction dans différentes conditions :

- réaction effectuée dans un tube scellé sous micro-ondes ou chauffage thermique
- variation du catalyseur
- variation du solvant

Ces différentes expériences ont été réalisées au laboratoire en collaboration avec le Dr Saïd Oumouch.¹⁶³ Les résultats sont reportés dans le Tableau 35.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ dans le DMF sous irradiations micro-ondes ou par chauffage thermique en tube scellé (rdt > 66%, entrées 3, 7, 8, 12 et 13 du Tableau 35). Dans ces conditions les rendements et les temps de réactions sont nettement améliorés. Avec l'acide 4-cyanophénylboronique, alors qu'aucune réaction n'est observée à reflux dans le THF même après 48h, on obtient 38 % de l'imidazolone **180c** en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ dans le DMF et 68% si la réaction est réalisée sous irradiations micro-ondes. Avec des acides 2-phénylvinylboroniques la réaction est également très efficace, on obtient les imidazolones **180d-e** correspondantes avec des rendements > 75% (entrées 14 et 15).



Entrée	Cposé	Ar	Méthode	Temps de réaction (h)	Rdt (%)
1	180a	Ph	a	18	31
2			b	0.25	40
3			f	0.25	65
4	180b	4-OMePh	a	20	40
5			b	0.25	50

6			c	18	54
7			e	0.25	68
8			f	0.25	70
9	180c	4-CNPh	a	48	0
10			b	0.25	10
11			d	0.25	38
12			e	0.25	66
13			f	0.25	68
14	180d	Ph-CH=CH	f	0.25	75
15	180e	4-OMePh-CH=CH	f	0.25	80

Tableau 35 : a: $\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{TFP}/\text{CuTC}/\text{THF}/\text{reflux}$, b: $\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{TFP}/\text{CuTC}/\text{THF}/\mu\omega$, c: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{CuTC}/\text{THF}/\text{reflux}$, d: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{CuTC}/\text{DMF}/\text{reflux}$, e: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{CuTC}/\text{DMF}/\text{tube scellé}/130^\circ\text{C}$, f: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{CuTC}/\text{DMF}/130^\circ\text{C}/\mu\omega$

2.3.2.2 Couplage avec les organostannanes

Etant donnés les bons résultats obtenus pour le couplage S-méthylthioimidazolone-acides boroniques, le couplage avec les organostannanes a été envisagé selon les conditions décrites par Liebeskind¹⁶¹ et Guillaumet.¹⁶²

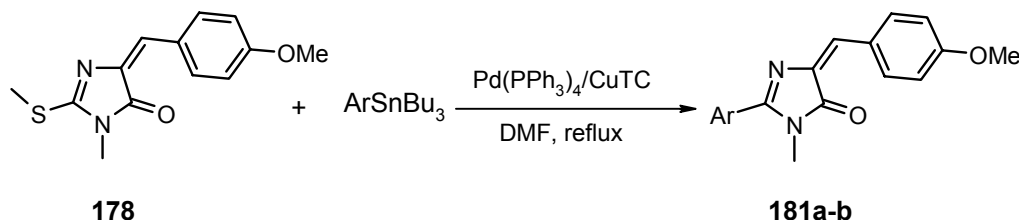


Schéma 64 : Couplage méthylthioimidazolinone-organostannanes

Nous avons engagé la 2-méthylthioimidazolone **34** dans une réaction de couplage avec des arylstannanes commerciaux en présence du catalyseur $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et de CuTC comme source de Cu(I) (Schéma 64).¹⁶³ Les résultats sont reportés dans le Tableau 36.

Cposé	Ar	Température (°C)	Temps de réaction (min)	Rdt (%)
181a	Ph	80	120	82

181b	Furyl	25	5	80
-------------	-------	----	---	----

Tableau 36 : Couplage méthylthioimidazolinone-organostannanes

La thioimidazolone **178** réagit rapidement avec le 2-furylstannane à température ambiante pour conduire à l'imidazolone **181b** avec un très bon rendement (80 %). Avec un stannane moins réactif (phénylstannane) la réaction est plus lente mais l'imidazolone **181a** est obtenue avec un rendement de 82 % après chauffage à 80°C dans le DMF pendant 2h.

Les réactions de couplage des thioimidazolones avec les acides boroniques et avec les organostannanes ont donné de très bons résultats en présence notamment, de Pd(PPh₃)₄ et de CuTC dans le DMF. La réaction avec les organostannanes se fait dans des conditions plutôt douces (basse température), alors que le couplage avec les acides boroniques se fait plus aisément sous pression et sous irradiation micro-onde. Ces résultats sont une bonne illustration de l'utilisation de groupements thioéthers comme groupements partants dans les réactions de couplage catalysées par le palladium quand les dérivés halogénés ou O-triflates correspondants ne sont pas accessibles. Cette voie de synthèse constitue une bonne alternative aux voies classiques de préparation des imidazolones. Elle permet d'obtenir des imidazolones substituées en position 2 par des groupements variés (aryles, hétéroaryles...) et par des chaînes insaturées (composés **180d-e**), difficilement, voire pas du tout accessibles par les voies classiques.

3. Les composés isostères des imidazolones

Parallèlement à la synthèse des imidazolones, nous nous sommes intéressés à la préparation de composés isostères de ces imidazolones : les buténolides, les pyrrolinones et les thiazolones (Figure 37).

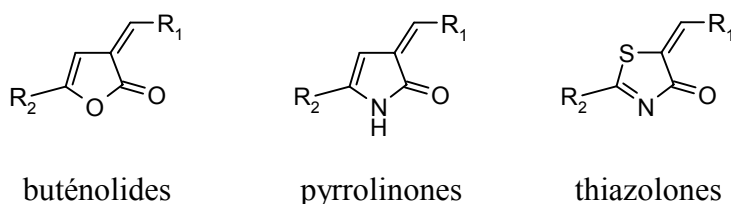


Figure 37 : Les isostères des imidazolones

3.1 Les buténolides

3.1.1 Synthèse des α -arylidène- γ -aryl- $\Delta^{\beta,\gamma}$ -buténolides

Les α -arylidène- γ -aryl- $\Delta^{\beta,\gamma}$ -buténolides sont des lactones structuralement proches des 4-arylidène-5-oxazolones présentées au § B.1.1.1. Ce sont des intermédiaires très intéressants en synthèse organique. Le cycle lactone très réactif peut être facilement ouvert par des nucléophiles tels qu'une amine ou un alcool.¹⁶⁵ Ils réagissent également facilement dans les conditions de Friedel-Crafts.¹⁶⁶

Ces buténolides sont facilement préparés selon les conditions de Perkin, par réaction d'un aldéhyde avec un acide β -aroylpropionique **182** en présence d'anhydride acétique et d'AcONa. Dans ces conditions il semblerait qu'il y ait d'abord lactonisation puis condensation avec l'aldéhyde (Schéma 60).^{167, 168}

Par cette méthode, nous avons préparé les buténolides **183a-s** diversement substitués (Tableau 37) à partir d'acides β -aroylpropioniques **182** disponibles au laboratoire.

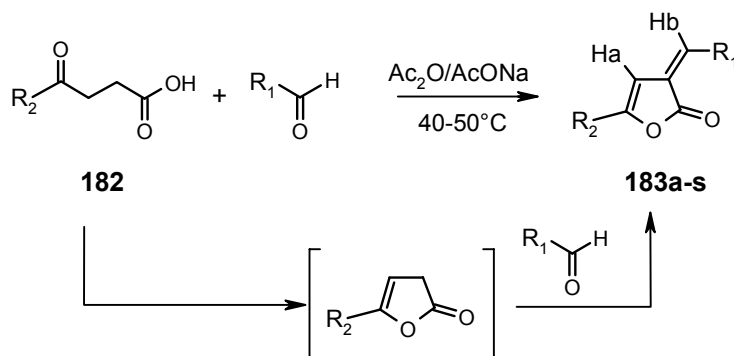


Schéma 65 : Synthèse des buténolides dans les conditions de Perkin

Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
183a	Ph	Ph	25
183b	Ph	3,4-diOMePh	53
183c	4-OAcPh	Ph	27
183d	4-NMe ₂ Ph	Ph	31
183e	4-CNPh	Ph	55

183f	4-CNPh	4-OMePh	82
183g	4-CNPh	3,4-diOMePh	87
183h	4-CNPh	4-NHAcPh	60
183i	4-CO ₂ MePh	Ph	60
183j	4-CO ₂ MePh	3,4-diOMePh	77
183k	4-CO ₂ MePh	4-NO ₂ Ph	63
183l	4-CO ₂ MePh	4-CNPh	60
183m	4-CO ₂ MePh	2-thiényl	10
183n	4-CO ₂ MePh	2-(CO ₂ Me)indol-5-yl	61
183o	4-BrPh	Ph	53
183p	4-NO ₂ Ph	Ph	60
183q	4-NO ₂ Ph	4-OHPh	45
183r	4-NO ₂ Ph	4-OMePh	87
183s	PhCH=CH	Ph	54

Tableau 37 : Préparation des buténolides **183**

Nous avons donc introduit des groupements aromatiques en R₁ et en R₂ avec des groupements donneurs (OAc, OMe, NMe₂, NHAc) et attracteurs (CN, COOMe, NO₂, Br). Les buténolides ont été obtenus avec des rendements de 10 à 87%. La présence de groupements électroattracteurs en para du benzaldéhyde augmente le rendement de la réaction, en accentuant le caractère électrophile du carbonyle de l'aldéhyde. Comme dans le cas des oxazolones, cette réaction ne nous a conduit qu'à un seul isomère de configuration.

3.1.2 Configuration des buténolides

Selon les travaux de thèse de Leibenguth,¹⁶⁹ la lactone formée par déshydratation d'un acide α -hydroxy- γ -cétonique serait la lactone la moins encombrée, donc celle dont le phényle est en position trans par rapport au carbonyle, l'isomère E (Figure 38).

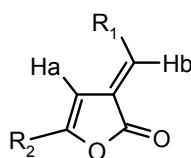
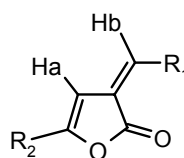
**183E****183Z**

Figure 38 : Configuration des buténolides

Le déplacement chimique de Ha dans le cas où $R_1 = R_2 = \text{Ph}$ est décrit à 6,9 ppm et le signal de Hb est confondu avec le massif des aromatiques. Dans notre cas nous observons pour ce buténolide **183a** un déplacement chimique pour Ha de 7,41 ppm et 7,65 ppm pour Hb. Pour tous les autres buténolides le déplacement chimique de Ha est compris entre 6,9 et 7,6 ppm. On pourrait donc en déduire que nos composés sont de configuration Z, cependant l'ouverture-cyclisation de ces buténolides conduit aux E-pyrrolinones correspondantes (§ 3.2.2). Nous avons donc décidé de confirmer la configuration de ces buténolides par des expériences de RMN à 2 dimensions. Pour cela nous avons réalisé une expérience qui permet de mettre en évidence des corrélations entre des protons non pas vicinaux mais qui sont proches dans l'espace (NOESY), avec l'aide de Cyril Antheaume, responsable de la plateforme RMN. Nous avons observé une corrélation de Ha avec les protons aromatiques H15 et H19 et surtout une corrélation de Ha et Hb avec les mêmes protons aromatiques, H9 et H13 (Figure 39). De plus nous n'observons pas de corrélation entre Ha et Hb. Les buténolides obtenus sont visiblement de configuration E bien que nous ayons des déplacements chimiques très différents des E-buténolides décrits dans la littérature.

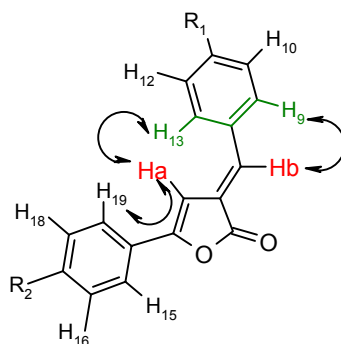


Figure 39 : Corrélations protons-protons observées par NOESY dans les buténolides

3.2 Les pyrrolinones

3.2.1 Synthèse des pyrrolinones

Les pyrrolinones sont des composés isostères des imidazolones précédemment décrites au § B.1. La synthèse des pyrrolinones est décrite classiquement en deux étapes : par action

d'amines primaires sur les buténolides conduisant aux amides γ -cétoniques¹⁷⁰ qui peuvent être ensuite cyclisés en pyrrolinones.¹⁷¹ Filler et al ont fait agir la benzylamine sur la lactone **183a** (Schéma 66) pour obtenir l'amide correspondant **184** ($R = \text{CH}_2\text{Ph}$), qui est ensuite cyclisé en pyrrolinone **186**.⁵¹

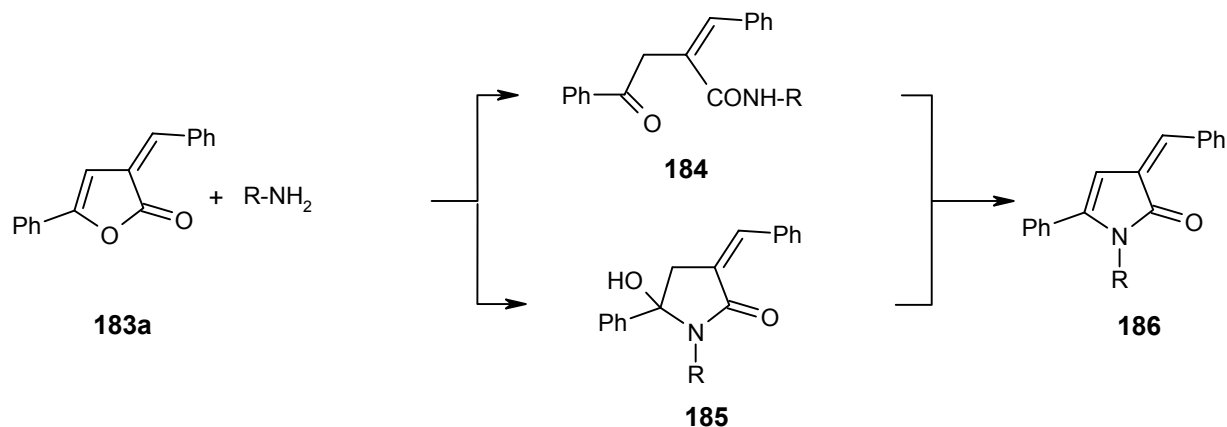
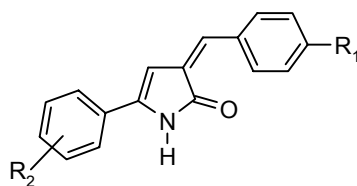


Schéma 66 : Synthèse des pyrrolinones

D'autres auteurs^{172,173} ont émis l'hypothèse que l'intermédiaire de réaction est sous la forme cyclique **185**, d'autres encore décrivent l'existence d'un équilibre entre les 5-hydroxypyrrolidinones et les amides γ -cétoniques.¹⁷⁴ Dans ces travaux de thèse, Leibenguth a effectué une étude sur l'ouverture des buténolides avec différentes amines primaires et dans différents solvants. Il conclut également à l'obtention de la forme cyclique d'après les spectres IR et RMN du proton. Cependant il décrit l'obtention directe des pyrrolinones, si la réaction est effectuée dans l'acide acétique.

A partir des buténolides précédemment synthétisés nous avons donc entrepris la synthèse des pyrrolinones diversement substituées reportées dans les Tableaux 38 et 39.

Dans un premier temps, nous avons effectué l'ouverture des buténolides en présence d'ammoniaque concentrée et d'acétate d'ammonium afin d'obtenir les pyrrolinones non substituées en N1 (Tableau 38). Dans ces conditions nous n'avons jamais isolé l'amide linéaire ou l'intermédiaire cyclique mais directement la pyrrolinone avec des rendements satisfaisants excepté dans le cas de **186c**. La synthèse de **186c** se fait au départ du buténolide **183c** présentant un groupement acétate sur l'oxygène en para du benzylidène ($R_1 = \text{OAc}$). Ce groupement acétate se déprotège en milieu fortement basique pour conduire à la pyrrolinone **186c**.



Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
186a	H	H	61
186b	H	3,4-diOMe	84
186c	OH	H	25
186e	CN	H	40
186g	CN	3,4-diOMe	73
186h	CN	4-AcNH	61
186i	CO ₂ Me	H	87
186j	CO ₂ Me	3,4-diOMe	90
186o	Br	H	61

Tableau 38 : Préparation des pyrrolinones **186** non substituées en N1.

Nous avons également envisagé la synthèse de pyrrolinones substituées en N1 par des groupements alkyles et plus particulièrement par un groupement isobutyle (Tableau 39). Dans les conditions de Leibenguth, la réaction du buténolide **183h** dans l'AcOH avec l'isobutylamine ne nous a pas permis d'isoler la pyrrolinone **187h** correspondante. Seuls les produits de départ ont été récupérés, la formation d'un sel entre l'acide acétique et l'amine bloquant ainsi toute possibilité de réaction. Dans l'EtOH en tube scellé (Méthode A) nous avons observé la formation de la pyrrolinone en faible quantité. La réaction du buténolide **183c** (R₁ = 4-OAcPh) dans les mêmes conditions nous a conduit à un mélange de produits contenant du buténolide **183c** déprotégé en majorité.

En l'absence d'acide, la pyrrolinone est formée mais en faible quantité, la réaction étant probablement arrêtée à la première étape c'est à dire à l'amide γ -cétonique. Lors de l'ouverture des buténolides **183k** et **183l** dans l'acétonitrile et en tube scellé (Méthode B), nous avons isolé un composé intermédiaire non coloré auquel nous avons attribué, après analyse du spectre RMN du proton, la forme 2-hydroxypyrrolidinone **185** (Schéma 67). En effet nous avons observé un singulet échangeable proche de 4 ppm correspondant à l'hydroxyle ainsi que l'existence d'un faible couplage entre le CH₂ de la pyrrolinone et le

proton vinylique H β observé par Leibenguth.¹⁶⁹ Cet intermédiaire **185k-l** a été déshydraté par la suite en pyrrolinone **187k-l** par chauffage dans l'acide acétique.

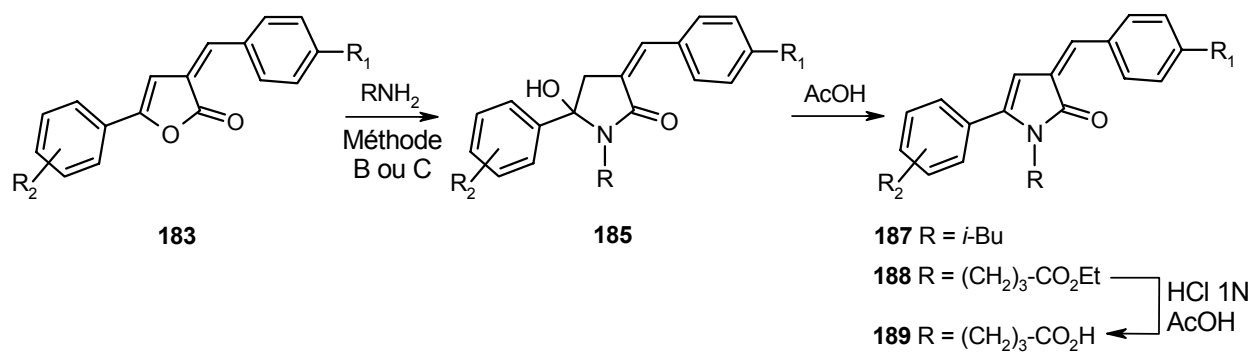
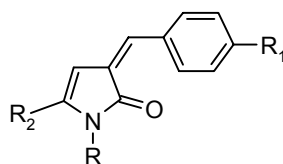


Schéma 67 : Synthèse des pyrrolinones **187**, **188** et **189**



Composé	R ₁	R ₂	R	Méthode	Rdt (%)
187h	CN	4-AcNHPh	<i>i</i> -Bu	Leibenguth	0
				A	20
187e	CN	Ph	<i>i</i> -Bu	A	10
187k	CO ₂ Me	4-NO ₂ Ph	<i>i</i> -Bu	B	28
187l	CO ₂ Me	4-CNPh	<i>i</i> -Bu	B	23
				C	62
187n	CO ₂ Me	2-(CO ₂ Me)indol-5-yl	<i>i</i> -Bu	B	25
187o	Br	Ph	<i>i</i> -Bu	C	45
187p	NO ₂	Ph	<i>i</i> -Bu	B	30
				C	67
187q	NO ₂	4-OMePh	<i>i</i> -Bu	C	76
187e	CN	Ph	(CH ₂) ₃ CO ₂ Me	C	52
187g	CN	3,4-diOMePh	(CH ₂) ₃ CO ₂ Me	B	50

Leibenguth : AcOH à reflux, A : EtOH, tube scellé, 100-110°C, B : CH₃CN, tube scellé, 90-100°C, puis AcOH à

 reflux, C : CH₃CN/AcOH/ $\mu\omega$, tube scellé

Tableau 39 : Préparation des pyrrolinones N-substituées

Pour les autres composés obtenus par la Méthode B, nous n'avons pas caractérisé l'intermédiaire. Nous l'avons isolé puis engagé directement dans la réaction de déshydratation avec l'AcOH. Au vu des résultats obtenus (Rdt = 23 à 50%) nous avons tenté d'améliorer les rendements. Pour cela nous avons soumis le milieu réactionnel contenant le buténolide et l'amine dans l'acétonitrile, à une irradiation par des micro-ondes (puissance 400W) pendant 10 min. Après ces 10 min, nous avons observé par suivi CCM, la disparition du produit de départ et la formation d'un produit incolore correspondant à la 2-hydroxypyrrolidinone intermédiaire. Pour obtenir la pyrrolinone correspondante nous avons donc, comme précédemment, effectué la déshydratation de la pyrrolidinone dans l'AcOH mais sous irradiations micro-ondes pendant 5 min (Méthode C). Nous avons alors réussi à isoler rapidement les pyrrolinones **187l** et **187n-p** et **187r** avec des rendements satisfaisants (45 à 76%, Tableau 39).

Nous avons utilisé ces mêmes conditions pour introduire une chaîne butanoate d'éthyle sur les pyrrolinones. A partir de **183e/183g** et l'aminobutyrate d'éthyle nous avons obtenu les pyrrolinones **188e** et **188g** avec des rendements de 50 à 52%. L'hydrolyse de ces composés dans un mélange HCl 1N/AcOH (1/1) conduit aux acides correspondants **189e** et **189g** avec de bons rendements (60-70%, Schéma 67).

3.2.2 Configuration des pyrrolinones

3.2.2.1 Les pyrrolinones 186

Dans tous les cas, la synthèse des pyrrolinones **186** n'a conduit qu'à un seul isomère (avec Ha ~ 6,8-6,9 ppm et Hb ~ 7,1-7,2 ppm). Pour connaître la configuration de nos pyrrolinones, nous avons réalisé des expériences de RMN 2D. Nous avons donc étudié les spectres RMN 2D de 2 composés différents **186c** et **186h** l'un portant un groupement donneur en R₂ et l'autre portant un groupement attracteur, respectivement. Nous nous sommes intéressés à l'existence ou non d'une corrélation entre les hydrogènes Ha et Hb. Nous avons observé dans les 2 cas, une corrélation de Ha avec les protons aromatiques de Ar₂ (H15 et H19) et surtout une corrélation de Ha et de Hb avec les mêmes protons aromatiques, qui ne

peuvent être que les protons aromatiques H9 et H13. De plus nous n'observons pas de corrélation entre Ha et Hb, ce qui est possible uniquement si la pyrrolinone se trouve sous la forme E (Figure 40). Nous en avons donc conclu en accord avec les données de la littérature,¹⁷¹ à l'obtention de pyrrolinones de configuration E.

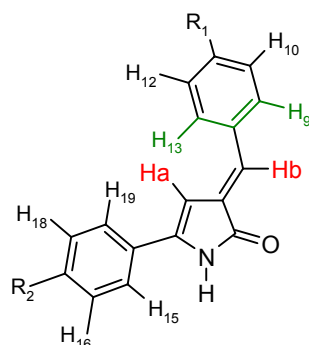
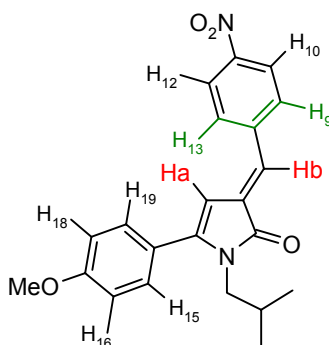


Figure 40 : Configuration E des pyrrolinones **186**

3.2.2.2 Les pyrrolinones **187**, **188** et **189**

La synthèse des pyrrolinones N-substituées a conduit comme précédemment à l'obtention d'un seul isomère. A partir des E-buténolides nous pourrions conclure directement à la formation de E-pyrrolinones mais les déplacements chimiques des protons Ha et Hb des pyrrolinones N-substituées étant très différents des pyrrolinones non substituées, nous avons entrepris de vérifier la configuration de l'isomère obtenu. En effet, dans ce cas on observe un blindage important des protons vinyliques ($6,09 < \text{Ha} < 6,49$ et $7,31 < \text{Hb} < 7,56$). Pour savoir si cet effet est provoqué par la présence d'un groupement sur l'atome d'azote de la pyrrolinone, nous avons réalisé les mêmes expériences RMN que précédemment sur le composé **187r**. Les mêmes observations ont été faites concernant l'absence de corrélation entre Ha et Hb. Cette expérience NOESY nous a également permis d'attribuer les différents pics aux aromatiques et ainsi montrer qu'il existe une corrélation de Ha avec les protons aromatiques du cycle *p*-méthoxyphényle (H15/H19), mais aussi avec le *p*-nitrobenzylidène (H9/H13). Une corrélation est également observée entre le CH₂ de l'isobutyle et les aromatiques H15/H19.


Figure 41 : Configuration de **187r**

Les composés **187-189** obtenus se trouvent également sous la forme E (Figure 41) qui semble être la configuration la plus stable pour les pyrrolinones.

3.3 Les thiazolidinones

Les thiazolones sont des isostères soufrés des imidazolones. Ces thiazolones sont généralement obtenues à partir de benzamide et d'acide chloroacétique¹⁷⁵ ou bien à partir de benzonitrile et d'acide mercaptoacétique.¹⁷⁶ La deuxième voie de synthèse (Schéma 68) met en jeu des produits commerciaux, nous l'avons donc préférée à la première.

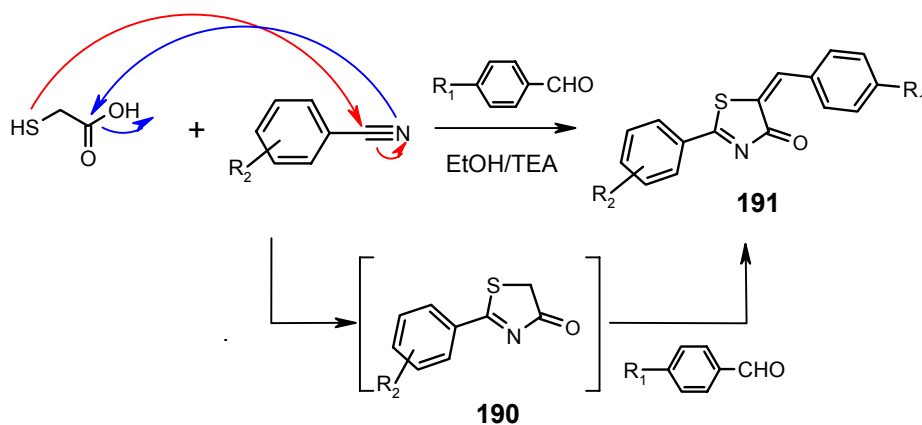


Schéma 68 : Synthèse des thiazolones

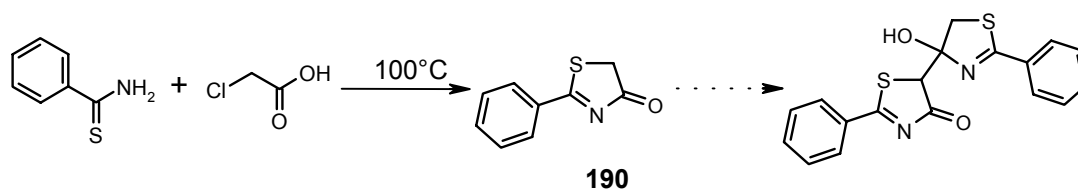
Un mécanisme possible pourrait, comme représenté dans le Schéma 68, consister en une première attaque du soufre sur le carbone électrophile du nitrile suivie d'une seconde de l'imine formée sur le carbonyle de l'acide mercaptoacétique conduisant à la thiazolone **190**. La présence d'un méthylène réactif sur la thiazolone **190** favorise ainsi la condensation de cette dernière avec l'aldéhyde présent dans le milieu.

La thiazolone **191a** dans ces conditions a été obtenue avec un rendement très médiocre (Tableau 40). Nous avons alors utilisé des conditions plus dures, c'est à dire en réalisant la réaction dans un tube scellé, nous avons obtenu les composés **191b-c** avec des rendements légèrement supérieurs mais qui ne dépassent pas les 20%.

Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
191a	H	H	5
191b	H	3,4-diOMe	13
191c	OMe	H	20

Tableau 40 : Préparation des thiazolones

Nous observons dans tous les cas la formation de nombreux produits secondaires ainsi que des goudrons. Nous avons alors envisagé d'isoler la thiazolone **190** afin d'éviter toute réaction préalable avec l'aldéhyde. Nous avons repris les conditions décrites par Jensen et Crossland¹⁷⁵ à partir de thiobenzamide et d'acide chloroacétique (Schéma 69), mais nous n'avons pas réussi à isoler la thiazolone **190**, celle-ci pouvant rapidement se dimériser.

Schéma 69 : Dimérisation de la thiazolone **190**

Etant donné les difficultés que nous avons rencontrées pour la synthèse des thiazolones et leurs propriétés photophysiques décevantes, nous avons décidé d'abandonner cette série isostère des imidazolones.

4. Les analogues structuraux

Il nous a paru intéressant de synthétiser, en plus des isostères d'imidazolones, des analogues structuraux rigidifiés tels que les pyridazolones et les oxindoles.

4.1 Les imidazopyridines

Les imidazopyridines **192** ou pyridazolones peuvent être associées à des imidazolin-5-ones présentant le groupement phényle en 2 accolé au cycle imidazolone.

Etant donné l'analogie de structure nous avons tenté d'obtenir ces imidazopyridines **192** dans les mêmes conditions que les imidazolones (Méthode A, § 1.2).

Nous avons alors fait réagir, dans un premier temps, la 2-aminopyridine en présence d'iodoacétate d'éthyle et du benzaldéhyde dans l'isopropanol à reflux en présence de NaHCO_3 (Schéma 70). Dans ces conditions, nous avons observé la formation d'un grand nombre de produits. En l'absence de NaHCO_3 et à température ambiante, nous avons isolé un solide blanc soluble dans l'eau. Le remplacement de l'iodoacétate d'éthyle par le bromoacétate d'éthyle moins réactif a conduit au même résultat. Ce composé blanc, soluble dans l'eau nous a laissé supposer qu'il s'agissait d'un sel. Après l'étude du spectre RMN, nous avons pensé avoir obtenu un produit intermédiaire **193** pouvant correspondre à la substitution de l'halogène par l'aminopyridine. Nous avons alors repris ce sel **193** et nous l'avons mis en réaction avec le benzaldéhyde en présence de NaHCO_3 mais là encore nous avons observé la formation de nombreux produits que nous n'avons pas réussis à identifier.

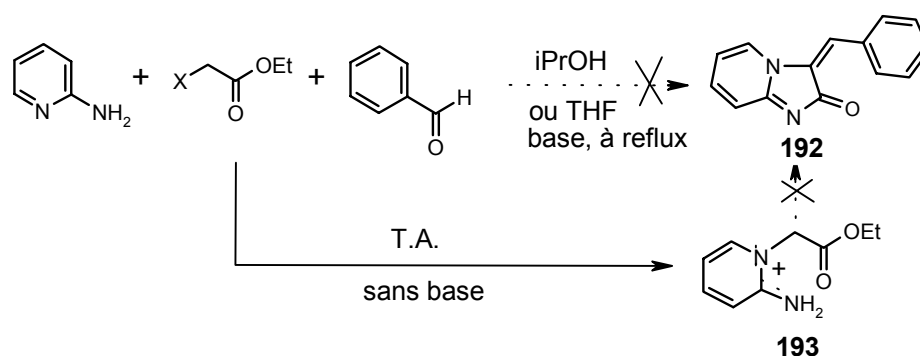


Schéma 70 : Essais de synthèse des imidazopyridines

Suite à ces résultats nous avons décidé de synthétiser les imidazopyridines en deux étapes comme décrit par Van Dormael¹⁷⁷ en isolant dans un premier temps l'imidazopyridine **194** (Schéma 71).

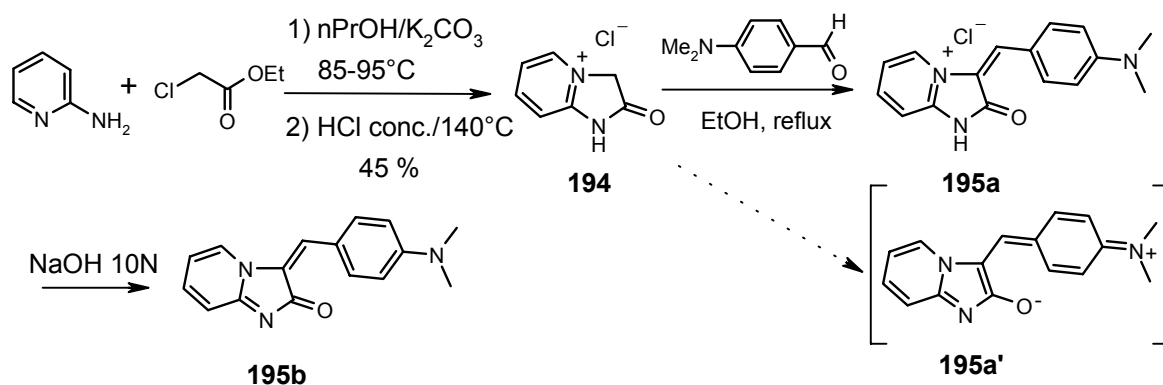


Schéma 71 : Synthèse des imidazo[1,2-a]pyridines

Van Dormael décrit la synthèse du colorant styrylique **195a** avec un rendement de 43 %. Nous avons reproduit la réaction dans les mêmes conditions et, après traitement par la soude, nous avons obtenu le composé non chargé **195b** avec un rendement de 27 %. On observe par ailleurs une coloration violette de l'imidazopyridine lorsque celle-ci se trouve sous la forme chargée décrite par Van Dormael (**195a**). Cette coloration violette pourrait aussi être attribuée à une forme zwitterionique **195a'** représentée dans le Schéma 71, obtenue par délocalisation électronique du groupement diméthylamino vers l'oxygène du carbonyle. Cette couleur violette varie dès le passage en milieu basique : le composé **195b** est orangée ce qui traduit une modification du courant électronique dans la molécule.

L'extension de cette réaction à d'autres aldéhydes (benzaldéhyde, anisaldéhyde) n'a pas permis d'obtenir les imidazopyridines correspondantes. Nous avons dans les deux cas, observé la formation de plusieurs produits polaires que nous n'avons pas réussi à séparer.

4.2 Les oxindoles

Les imidazopyridines n'étant pas intéressantes en tant que molécules fluorescentes, nous nous sommes intéressés à d'autres composés analogues des imidazolones, les 3-benzylidène-oxindoles ou indolin-2-ones. Ces 3-benzylidène-oxindoles sont classiquement

obtenus^{178,179} par condensation d'indolin-2-one et d'un aldéhyde approprié en présence de pipéridine (Schéma 72).

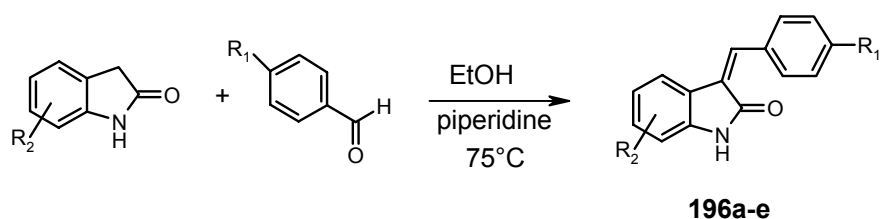


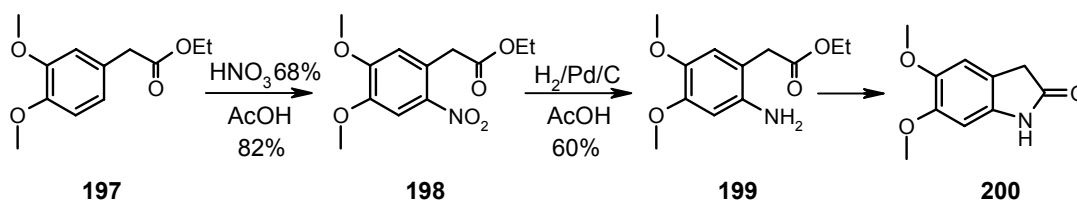
Schéma 72 : Synthèse des oxindoles

Nous avons alors synthétisé les oxindoles **196a-d** avec des rendements corrects (35-80%, Tableau 41) à partir de l'indolin-2-one non substituée ($R_2 = H$) commerciale. Nous avons ainsi introduit différents groupements benzyldènes sans substituant (**196a**), ou portant des substituants électrodonneurs (**196b-c**) ou des substituants électroattracteurs (**196d-e**).

Composé	R_1	R_2	Rdt (%)
196a	H	H	45
196b	OH	H	70
196c	NMe ₂	H	80
196d	CN	H	60
196e	CN	3,4-diOMe	35

Tableau 41 : Préparation des oxindoles

Pour accéder au composé **196e** nous avons dû préparer la 5,6-diméthoxyindol-2-one **200** au départ 3,4-diméthoxyphénylacétate d'éthyle **197** (Schéma 73) comme décrit par Walker.¹⁸⁰

Schéma 73 : Préparation du 5,6-diméthoxy-1,3-dihydro-2H-indol-2-one **200**

Nous avons dans un premier temps effectué la nitration du composé **197** en présence d'acide nitrique à 68% dans l'AcOH à 0°C. Cette nitration a lieu sur la position ortho la moins encombrée c'est à dire en position 6 du phénylacétate avec un rendement de 82%. L'hydrogénation du nitroester **198** en présence de palladium sur charbon donne dans un premier temps l'aminoester **199**. Celui-ci, en présence d'AcOH, est cyclisé en oxindole **200** lors de la distillation du solvant.

C- Propriétés photophysiques des dérivés

1. Introduction

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des propriétés photophysiques des imidazolones et de leurs analogues. Une étude sur les propriétés photophysiques de quelques oxazolones et imidazolones a été effectuée par une équipe russe en 1982.¹⁸¹ Les auteurs montrent, dans cet article, l'existence d'une relation entre la structure électronique des composés et leurs propriétés spectroscopiques. Plus récemment, You et al¹⁸² ont étudié quelques oxazolones et une imidazolone, et comparé leurs propriétés spectroscopiques aux propriétés de la GFP. Ces travaux sont focalisés sur l'étude du chromophore de la GFP et donc sur la synthèse de quelques imidazolones dérivées de ce chromophore, notamment le 4-hydroxybenzylidène-2,3-diméthylimidazolin-5-one^{111,115,182,183} Dans tous les cas, les produits synthétisés présentent une fluorescence négligeable voire nulle. La GFP est une protéine aux propriétés fluorescentes très intéressantes qui a trouvé de très nombreuses applications en biologie moléculaire. Isoler et stabiliser le motif responsable de sa fluorescence, son chromophore, pourrait conduire à l'obtention d'un fluorophore très intéressant.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés à l'influence de différents paramètres sur la fluorescence des composés dérivés des imidazolones que nous avons synthétisé, afin de mieux comprendre le processus de fluorescence de la GFP mais aussi pour obtenir de nouveaux composés fluorescents.

Dans chacune des séries, nous avons synthétisé des composés portant des groupements électrodonneurs ou électroattracteurs et nous avons observé l'effet de ces modifications sur les paramètres photophysiques. Nous avons ainsi réalisé une étude des relations « structure-activité de fluorescence ». Ce travail a été mené en étroite collaboration avec l'équipe du Professeur Jacques Haïech (Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, UMR 7034). Les composés synthétisés : les imidazolones,^{184,185} les oxazolones, les buténolides, les pyrrolinones,¹⁸⁶ les thiazolones, les imidazopyridines ainsi que les oxindoles ont été évalués pour leur capacité à émettre de la fluorescence par les Dr Anny Follenius-Wund et Claire Pigault. Ainsi, pour chacun des composés, les caractéristiques photophysiques ont été mesurées principalement dans le dioxane, qui est un solvant aprotique avec une constante diélectrique faible ($\epsilon = 2,2$ à 25°C) qui permet de mimer au mieux

l'environnement hydrophobe du chromophore dans la cage protéique. Les données sont reportées dans les Tableaux 42 à 47.

2. Propriétés spectrales des imidazolones

Dans cette étude, le 4-hydroxybenzylidène-2,3-diméthylimidazolin-5-one **151a** constitue notre composé de référence. En effet, il représente le chromophore modèle, la plus petite partie de la GFP responsable de la fluorescence (Figure 42).

Nous avons effectué un grand nombre de variations autour de ce composé modèle, en R, R₁ et R₂, plus particulièrement en introduisant des groupements aromatiques en R₁ pour essayer de restaurer l'environnement hydrophobe dans lequel le chromophore se trouve, au sein de la GFP. L'hydroxyle présent sur le groupement R₂ a été remplacé par un proton, puis par différents groupements électrodonneurs ou électroattracteurs pour modifier les courants électroniques à l'intérieur du chromophore. Les propriétés photophysiques des imidazolones ont été déterminées principalement dans le dioxane, mais aussi dans des milieux de viscosité et de polarité différentes tels que l'eau ($\xi = 80$ à 25°C) ou le glycérol ($\xi = 40$ à 25°C).¹⁸⁵

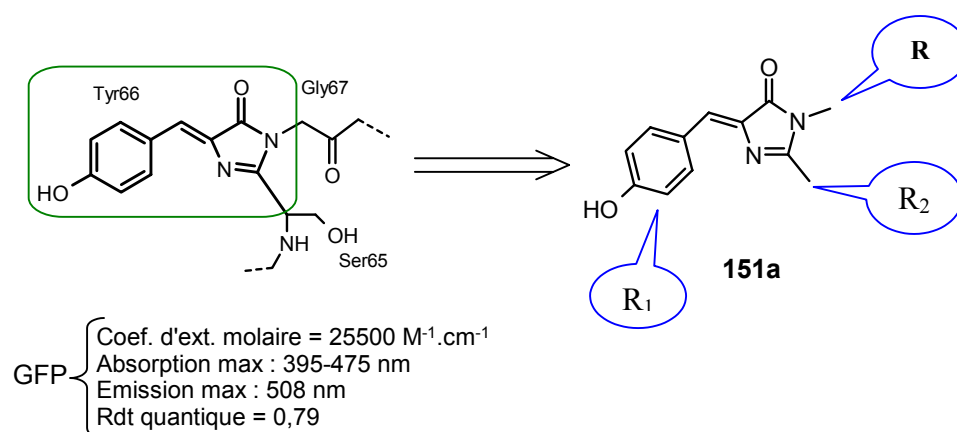
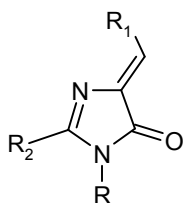


Figure 42 : Chromophore modèle **151a**



Cposé	R ₁	R ₂	R	solvant	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max ém}}$ (nm)*	ϕ à 20°C
151a	4-OHPh	CH ₃	CH ₃	dioxane	25525	370	440	<0,0001
				H ₂ O	-	369	-	0
				NaOH	-	435	-	0
151b	4-OHPh	CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	dioxane	26578	372	436 (406)	<0,0001
				H ₂ O	-	371	455	<0,0001
				NaOH	-	428	495	<0,0001
162	4-OHPh	Ph	H	dioxane	32552	399	467 ép443,500	~0,0002
				H ₂ O	30072	397	509	<0,0001
				NaOH	33000	450	539	~0,0001
151d	4-OHPh	3,4-diOMePh	CH ₃	dioxane	28690	398	476	~0,0002
				H ₂ O	34870	398	485	0
				NaOH	13630	456	456	0
159a	Ph	Ph	H	dioxane	13067	384	444 ép421,471	0,0017
				H ₂ O	12664	380	448 ép421	<0,0001
				NaOH	8328	404	502	0,0017
159s	cyclohexyl	Ph	H	dioxane	20470	339	405	0,052
				H ₂ O	-	342	525	-

* ép = épaulement, - : non déterminé

Tableau 42 : Caractéristiques photophysiques des imidazolones

2.1 Effet de substitution

2.1.1 Imidazolones dérivés du chromophore modèle

La première série d'imidazolones représentée dans le Tableau 42 a été étudiée dans le dioxane, dans l'eau et en milieu basique.

Si on observe les propriétés du chromophore modèle **151a**, on remarque que les longueurs d'onde des maxima d'absorption et d'émission sont assez différentes de celles de la GFP. Cependant dans le dioxane, un seul pic d'absorption est observé à 370 nm. Cette valeur, bien que différente, est plus proche du pic d'absorption du chromophore non chargé de la GFP ($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 395$ nm). Par contre en milieu basique, **151a** étant anionique (phénolate), le $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (435 nm) est décalé vers les plus grandes longueurs d'onde et est plus proche du pic

d'absorption du chromophore ionisé de la GFP ($\lambda_{\max}^{\text{abs}} = 475 \text{ nm}$). Il en est de même pour le composé **151b**.

L'introduction de groupements aromatiques en R_2 (composés **162** et **151d**, Tableau 42) confère aux composés des propriétés spectrales plus proches de celles de la GFP qu'une chaîne alkyle. En effet les spectres d'absorption de **162** et **151d** sont plus proches de celui de la GFP, aussi bien en milieu basique (forme ionisée) qu'en milieu neutre (non ionisée). Les spectres d'émission sont, par contre, différents de celui de la GFP. En milieu basique, le $\lambda_{\max}^{\text{émis}}$ est plus élevé, dans ces conditions on favorise la forme ionisée du composé et donc la forme ionisée à l'état excité, responsable de la fluorescence de la GFP.¹¹⁰

Quand on remplace l'hydroxyle du groupement R_1 par un hydrogène (comparer **159a** et **162**) le composé ne peut plus être sous la forme anionique, de ce fait l'effet produit en milieu basique est moins important ($\lambda_{\max}^{\text{abs}} / \lambda_{\max}^{\text{émis}} = 404/502$ pour **159a** $\lambda_{\max}^{\text{abs}} / \lambda_{\max}^{\text{émis}} = 450/539$ pour **162**). En milieu apolaire cependant, on observe une diminution du coefficient d'extinction molaire et des $\lambda_{\max}$ de **159a** par rapport à ceux de **162**. Cependant dans tous les cas, on observe des rendements quantiques de fluorescence peu élevés.

Quand on remplace le benzyldène par un alkylidène tel que le cyclohexylidène (composé **159s**), on observe un décalage important des $\lambda_{\max}$ vers des longueurs d'onde plus courtes, dans le domaine proche de l'absorption intrinsèque des protéines.

Cposé*	R_1	R_2	Solvant	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	$\lambda_{\max}^{\text{ém}}$	ϕ à 20°C
159a	Ph	Ph	dioxane	13067	384	444 ép421,471	0.0017
			H ₂ O	12664	380	448 ép421	<0.0001
159c	Ph	4-OMePh	dioxane	26056	387	452 ép426,478	0.028
			H ₂ O	-	388	570	0.0028
159b	Ph	3,4-diOMePh	dioxane	23000	390	457 (433,485)	0.034
			H ₂ O	13460	390	554	0.0001

* R = H

Tableau 43 : Caractéristiques photophysiques des imidazolones
Effet de groupements électrodonneurs en R_2 .

Cposé*	R ₁	R ₂	Solvant	ε (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$	$\lambda_{\text{max ém}}$	ϕ à 20°C
159a	Ph	Ph	dioxane H ₂ O	13067 12664	384 380	444 ép421,471 448 ép421	0.0017 <0.0001
159d	4- (OCH ₂ CO ₂ Et)Ph	Ph	dioxane H ₂ O	>7084 11040	397 395	461 ép436,490 478	0.0003 <0.0001
159g	4-OMePh	Ph	dioxane H ₂ O	15368 9251	398 398	464 ép440,500 478	0.0002 <0.0001
159f	2-OMePh	Ph	dioxane	26279	400	465 (439)	0.0022
159i	4-N(CH ₃) ₂ Ph	Me	dioxane H ₂ O	39920 -	415 -	483 530	0.0008 0.0005
159j	4-N(CH ₃) ₂ Ph	Ph	dioxane	38769	454	520	0.0018
159k	4-N(CH ₃) ₂ Ph	4-OMePh	dioxane	37006	450	507	0.0023
159h	4-N(CH ₃) ₂ Ph	3,4- diOMePh	dioxane H ₂ O	50254 -	455 -	515 569	0.0023 0.0009
159w	4-OMePh	4-NO ₂ Ph	dioxane	22160	428	573	0.055

* R = H, - : non déterminé

Tableau 44 : Caractéristiques photophysiques des imidazolones
Effet de groupements électrodonneurs en R₁

Suite à ces premiers résultats nous avons décidé de garder un groupement aromatique en R₁ et en R₂ sur lesquels nous avons introduit différents substituants.

2.1.2 Imidazolones portant un groupement électrodonneur en R₂

Les propriétés photophysiques des imidazolones portant des groupements électrodonneurs en R₂ sont reportées dans le Tableau 43. Si on compare à **159a**, on remarque que les groupements méthoxy, qui sont donneurs par effet électronique et donc augmentent la densité électronique de l'imidazolone, entraînent un faible déplacement des λ_{max} d'absorption et d'émission vers les plus grandes longueurs d'onde mais également une augmentation du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de fluorescence (ϕ multiplié par

18). L'effet est plus important pour le composé **159b** disubstitué en 3 et en 4 par des groupements méthoxy.

2.1.3 Imidazolones portant un groupement électrodonneur en R₁

L'introduction de groupements donneurs en R₁, donne des résultats différents qui sont reportés dans le Tableau 44. On observe un déplacement plus important des λ des maxima d'absorption (> 397 nm) et d'émission (> 461 nm) vers les hautes longueurs d'onde.

Dans le cas des composés **159d** et **159g**, l'effet du groupement donneur est modéré, un effet légèrement plus important est observable quand le groupement méthoxy se trouve en position 2 du benzylidène.

Le groupement diméthylamino, qui présente un caractère électrodonneur plus marqué, provoque un déplacement encore plus important des λ_{max} d'absorption et d'émission vers les grandes longueurs d'onde avec une nette augmentation du coefficient d'extinction molaire. L'introduction de groupements donneurs en R₂ accentue cet effet (composé **159h**), ainsi l'augmentation du coefficient d'extinction molaire est corrélée avec l'augmentation de la densité électronique de l'imidazolone. Un groupement nitro désactivant en R₂ conduit à une augmentation de l'absorption (**159w** comparé à **159g**), on observe dans ce cas, un décalage très important du $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$ ($\Delta\lambda \approx +110\text{nm}$) et une augmentation du rendement quantique. Dans cette série, les rendements quantiques sont globalement faibles.

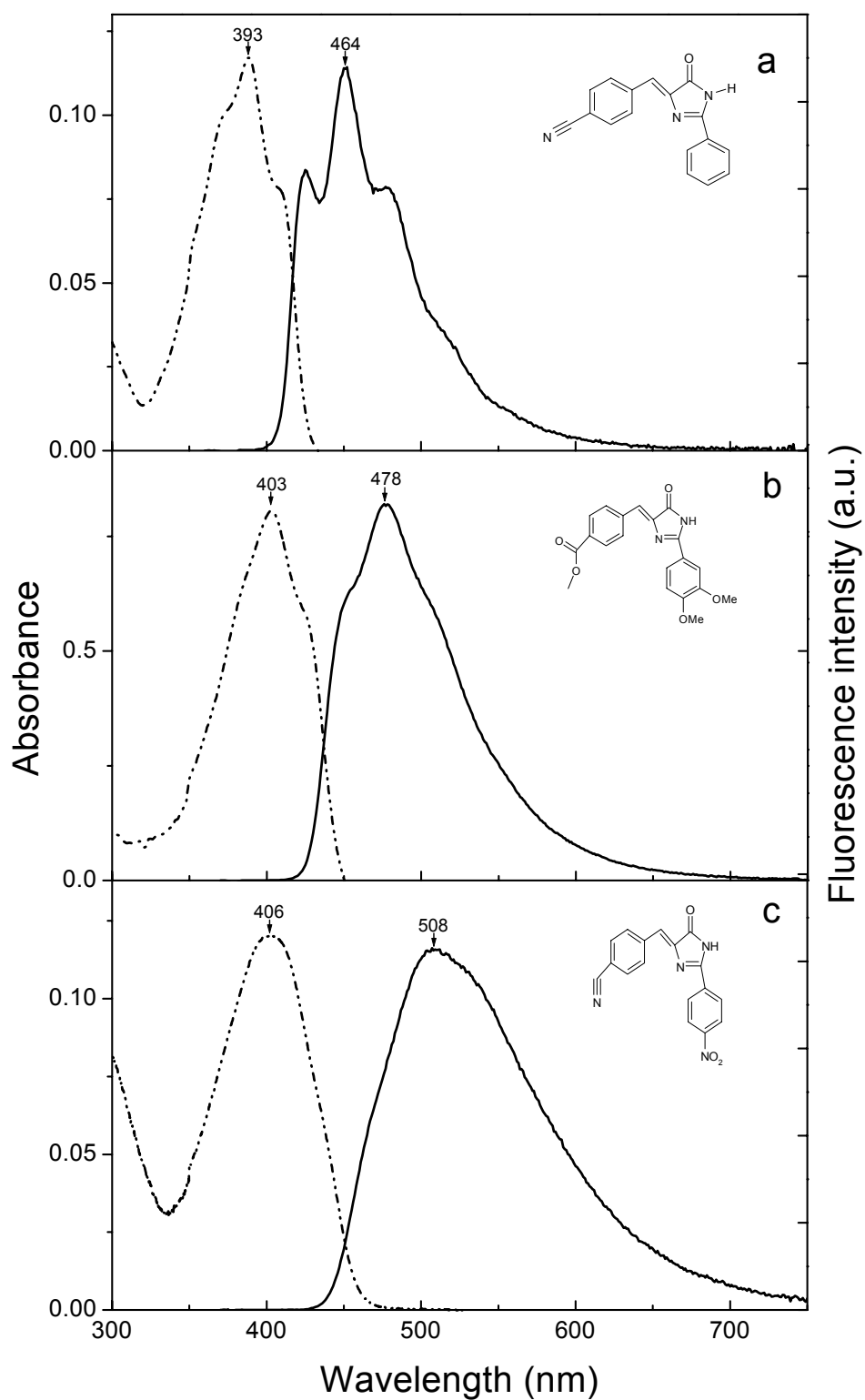


Figure 43 : Spectres d'absorption (pointillé) et d'émission de fluorescence (continue) des dérivés de la GFP dans le dioxane : **159l** (a), **159u** (b) et **159t** (c). Les spectres d'absorption et de fluorescence ont été approximativement normalisés à la même amplitude

2.1.4 Imidazolones portant un groupement électroattracteur en R₁

L'étude des spectres d'absorption et d'émission des composés portant un groupement électroattracteur en R₁ (Tableau 45) a permis de définir trois classes de dérivés, selon l'allure de leurs spectres (Figure 43).¹⁸⁵ Ainsi la première classe regroupe les composés avec un groupe Ph en R₂ : **159o**, **159l** et **159q**. Ils présentent des spectres d'absorption et d'émission structurés, présentant un pic principal et deux épaulements de part et d'autre de ce pic (Figure 43a). La seconde regroupe les composés avec un groupement électrodonneur en R₂ : **159m**, **159n** et **159u**. Dans ce cas les spectres d'absorption et d'émission sont moins structurés (Figure 43b). La dernière classe regroupe les composés avec un groupement électroattracteur en R₂ : **159t** et **159v**, qui présentent des spectres d'absorption et d'émission plus du tout structurés et qui sont décalés vers le rouge avec un maximum d'émission vers 508 nm (Figure 43c).

Les données photophysiques de ces composés sont reportés dans le Tableau 45. Quand l'hydroxyle présent sur l'aromatique R₁ est remplacé par un groupement électroattracteur, on observe l'effet inverse de celui observé en présence d'un groupement donneur d'électrons. En effet, on observe peu de variation au niveau de l'absorption, par contre, même si le $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$ varie peu, l'émission de fluorescence devient significative (composés **159o**, **159l** et **159q**) avec des rendements quantiques de fluorescence supérieurs à 0,13. Si on ajoute des groupements électrodonneurs en R₂, on observe alors un shift des $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ au-dessus de 400 nm accompagné d'une augmentation du ϵ . On remarque également un décalage des $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$ vers 480 nm et un rendement quantique $\geq 0,16$ (**159m-n**) et proche de 0,3 pour **159u**. Si on remplace le groupement donneur en R₂ par un autre groupement électroattracteur, on désactive fortement le cycle, cependant les caractéristiques photophysiques de **159t** et **159v** restent intéressantes, avec des ϵ voisins de 20-25000 M⁻¹.cm⁻¹ et des $\phi > 0,22$. La variation la plus importante se situant au niveau des $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$, qui se trouvent déplacés vers 508 nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$ de la GFP native.

2.1.5 Imidazolones portant un groupement sur l'atome d'azote (R ≠ H)

Nous nous sommes également intéressés à l'effet produit par la présence de groupements sur l'azote 1 de l'imidazolin-5-one (Tableau 46).

Cposé*	R ₁	R ₂	solvant	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$	$\lambda_{\text{max ém}}$	ϕ à 20°C
159a	Ph	Ph	dioxane	13067	384	444 ép421,471	0.0017
			H ₂ O	12664	380	448 ép421	<0.0001
159o	4-CF ₃ Ph	Ph	dioxane	21985	383	451 (424)	0.135
			H ₂ O	-	-	494	0.003
159l	4-CNPh	Ph	dioxane	>4848	393	464 ép440,490	0.158
			H ₂ O	-	-	465	0.003
159m	4-CNPh	4-OMePh	dioxane	29209	401	482 ép453,508	0.159
			H ₂ O	-	-	506	0.0019
159n	4-CNPh	3,4-diOMePh	dioxane	26451	405	482 ép457	0.189
			H ₂ O	-	395	600	0.0006
159t	4-CNPh	4-NO ₂ Ph	dioxane	20674	406	508	0.22
			H ₂ O	-	-	-	0.0015
159q	4-CO ₂ MePh	Ph	dioxane	28824	394	461	0.159
			H ₂ O	-	-	-	0.0016
159u	4-CO ₂ MePh	3,4-diOMePh	dioxane	32218	403	478 (453)	0.295
			H ₂ O	-	383	603	0.0015
159v	4-CO ₂ MePh	4-NO ₂ Ph	dioxane	25284	405	510	0.258
			H ₂ O	-	-	-	0.0006

* R = H, - : non déterminé

Tableau 45 : Caractéristiques photophysiques des imidazolones
Effet de groupements électroattracteurs en R₁

Cposé	R ₁	R ₂	R	solvant	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$	$\lambda_{\text{max ém}}$	ϕ à 20°C
159a	Ph	Ph	H	dioxane	13067	384	444 ép421,471	0.0017
				H ₂ O	12664	380	448 ép421	<0.0001
151i	Ph	Ph	OH	dioxane	19650	385	443	0.0002
				H ₂ O	-	376	-	-
151g	Ph	Ph	Ph	dioxane	19490	380	453	0.001
				H ₂ O	-	375	-	-
159b	Ph	3,4-diOMePh	H	dioxane	23000	390	457 (433,485)	0.034
				H ₂ O	13460	390	554	0.0001
151e	Ph	3,4-diOMePh	CH ₃	dioxane	25862	386	470 (448,505)	0.045
				H ₂ O	-	382	470	0.0001
159g	4-OMePh	Ph	H	dioxane	15368	398	464 ép440,500	0.0002
				H ₂ O	9251	398	478	<0.0001
164b	4-OMePh	Ph	CH ₃	dioxane	>3819	394	471 ép447	0.0002
				H ₂ O	4064	392	475 ép450	0.0002
164c	4-OMePh	Ph	CH ₂ COOEt	dioxane	25924	389	465	0.0002
				H ₂ O	42755	390	476	<0.0001

164d	4-OMePh	Ph	Bn	dioxane H ₂ O	20553 8070	393 396	468 552	0.0002 0.0005
-------------	---------	----	----	-----------------------------	---------------	------------	------------	------------------

- : non déterminé

Tableau 46 : Caractéristiques photophysiques des imidazolones

Effet de l'introduction de groupements en R sur l'azote N1

Si on compare rapidement **159a** avec **151i** et **151g**, **159b** avec **151e** et **159g** avec **164b**, **164c** et **164d**, on observe dans la plupart des cas une augmentation du coefficient d'extinction molaire mais globalement la présence de groupements aryle, alkyle, hydroxyle ou même aralkyle ne modifie pas significativement les propriétés spectrales des imidazolones. Ceci permet de conclure que l'azote des imidazolones constitue un point d'ancrage potentiel sur un autre résidu structural (outil pharmacologique, immobilisation sur résine, etc.)

2.2 Effet de l'environnement

Quand le chromophore de la GFP est isolé de la cage protéique, on observe une extinction de sa fluorescence qui peut être due à la rotation autour de la double liaison exo, à un quenching par l'oxygène ou par l'eau ou encore à une modification du flux électronique à l'intérieur du chromophore à cause de l'absence du réseau de liaisons hydrogènes. Pour comprendre ce phénomène, il est intéressant d'étudier l'influence de l'environnement (polarité, viscosité) sur les propriétés de fluorescence des imidazolones synthétisées. Les rendements quantiques de fluorescence de quelques composés ont été mesurés à basse température (Figure 44). Ils ont également été mesurés dans deux solvants de polarité et de viscosité différentes, l'eau et le glycérol et comparés à ceux obtenus dans le dioxane (Tableau 47).

2.2.1 Effet de la température

Des expériences à basses températures ont été réalisées dans l'EPA (éther/*isopentane*/éthanol absolu, 5/5/2)¹⁸⁵ par les Dr Follenius-Wund et Pigault (UMR 7034) avec le composé de référence **151a** qui n'est pas fluorescent dans le dioxane à 20°C et avec deux composés fluorescents **159q** et **159u**, (Figure 44). Les rendements quantiques de ces composés ont été mesurés à différentes températures. On observe que le rendement quantique de ces composés augmente progressivement au fur et à mesure de la diminution de la température (de 293 à 83 K). Le rendement quantique du composé **151a**, augmente fortement à partir de 133K mais n'atteint pas un maximum à 83K. Il atteint un maximum de 0,42 pour **159u** et 0,78 pour **159q**,

atteignant ainsi celui de la GFP. A très basse température, les composés se trouvent piégés dans un milieu très visqueux, ce qui diminue la probabilité de rotation et favorise une conformation plutôt plane des composés.

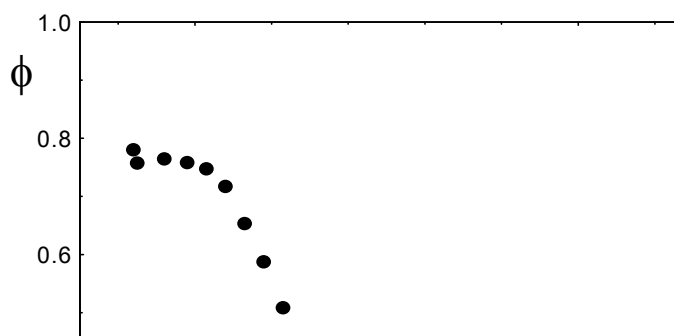


Figure 44 : Effet de la température sur les rendements quantiques de fluorescence de **151a** (■), **159q** (●) et **159u** (▽). Les mesures ont été réalisées dans l'EPA.

Classe	Cposé*	R ₁	R ₂	ϕ_{eau} ($\xi = 80$)	ϕ_{glycerol} ($\xi = 40$)	ϕ_{dioxane} ($\xi = 2$)	$\phi_{\text{diox}}/\phi_{\text{gly}}$
A	159o	CF ₃	Ph	0.003	0.118	0.135	1.14
	159l	CN	Ph	0.003	0.139	0.158	1.14
	159q	COOMe	Ph	0.0016	0.156	0.159	1.02
B	159n	CN	3,4-OdiMePh	0.0006	0.069	0.189	2.74
	159u	COOMe	3,4-OdiMePh	0.0015	0.100	0.295	2.95
C	159t	CN	4-NO ₂ Ph	0.0015	0.023	0.220	9.56
	159v	COOMe	4-NO ₂ Ph	0.0006	0.014	0.258	18.4

* R = H

Tableau 47 : Rendements quantiques de fluorescence dans l'eau, le dioxane et le glycérol.

Ceci explique l'augmentation de fluorescence à basse température et permet de supposer que la fluorescence de la GFP est due en partie au fait que son chromophore, au sein de la cage protéique, est maintenu sous cette conformation plane. Le rendement quantique de **159q** atteint celui de la GFP, mettant ainsi en valeur l'importance des pertes non radiatives qui ont lieu à température ambiante.

2.2.2 Fluorescence des imidazolones dans l'eau

Les caractéristiques photophysiques de toutes les imidazolones ont été mesurées en milieu aqueux (Tableaux 42 à 46). On remarque concernant cette série hétérocyclique, une nette diminution de la fluorescence dans l'eau.

Les rendements quantiques de fluorescence pour les composés les plus fluorescents sont reportés dans le Tableau 47. Les spectres obtenus sont globalement décalés de 50 à 100 nm vers les grandes longueurs d'onde, cependant les rendements quantiques n'excèdent pas 0,003. Ceci peut s'expliquer par l'existence de nombreuses liaisons hydrogènes qui peuvent se former entre l'eau et les hétéroatomes (O, N) des imidazolones. D'ailleurs l'addition d'eau, même minime (1,4 % v/v), dans une solution d'imidazolone **159u** dans le dioxane entraîne immédiatement une chute du rendement quantique de 30 %.

2.2.3 Fluorescence des imidazolones dans le glycérol

Les rendements quantiques de fluorescence pour les composés les plus fluorescents ont également été déterminés dans un solvant très visqueux, le glycérol ($\eta = 40$). Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 47.

Dans tous les cas on observe une augmentation des ϕ de 15 à 100 fois par rapport à ceux obtenus dans l'eau, mais une diminution de la fluorescence par rapport aux résultats obtenus dans le dioxane. On remarque que les composés de la classe A, qui sont les moins

fluorescents dans le dioxane ont, dans le glycérol, des ϕ plus élevés que ceux de la classe B et C.

Il semblerait que la présence de substituants donneurs/accepteurs de liaisons H sur le phényle en R₂, entraîne une diminution de la fluorescence dans le glycérol. Les liaisons hydrogènes qui peuvent se former entre les imidazolones des classes B et C et le solvant ont un effet opposé à celui induit par la viscosité, elles paraissent favoriser l'augmentation des processus non radiatifs.

2.3 Conclusion

A la suite de cette étude des relations structure-fluorescence des imidazolones nous avons fait quelques observations :

- 1- l'introduction de groupements électrodonneurs en R₂ entraîne une augmentation du rendement quantique de fluorescence,
- 2- un effet très bénéfique est observé sur la valeur du rendement quantique de fluorescence quand on introduit un groupement électroattracteur en R₁,
- 3- l'association des règles 1 et 2 conduit à des composés aux propriétés spectrales très intéressantes.

Dans ces conditions on enrichit le cycle imidazolone d'un côté et on le désactive de l'autre : le flux électronique semble traverser la molécule tout entière, du groupement électrodonneur (D) vers le groupement électroattracteur (A). Ce phénomène pourrait alors favoriser une conformation plane et plus rigide de la molécule et donc diminuer les pertes non radiatives liées aux possibles rotations autour des différentes liaisons sigma et ainsi augmenter la fluorescence.

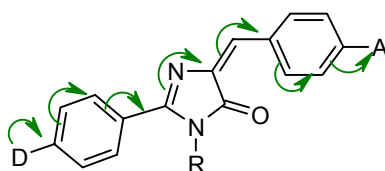


Figure 45 : Déplacement proposé des électrons, du donneur d'électrons D à l'accepteur A

La réduction ou le blocage des rotations autour de la double liaison exo des imidazolones en augmentant la viscosité du solvant ou en diminuant la température favorisent également la diminution des pertes non radiatives et conduisent à une augmentation des rendements quantiques de fluorescence de tous les composés.

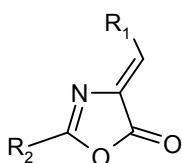
Le composé **159u** présente les meilleures caractéristiques photophysiques de la série avec un $\varepsilon > 32000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et un rendement quantique de fluorescence proche de 0,3. Cependant **159t** et **159v**, portant un groupement électroattracteur en R_2 , présentent des caractéristiques photophysiques semblables à celle de la GFP ($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 405\text{-}406 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}} = 508\text{-}510 \text{ nm}$) et notamment à ses mutants existant uniquement sous la forme neutre (cf. § A-3.4, mutants H9 et H9-40, $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 399 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}} = 511 \text{ nm}$). On peut alors supposer que la rigidité et la distribution électronique de ces composés sont similaires à celles du chromophore dans la cage protéique.

3. Propriétés spectrales des oxazolones

Les caractéristiques photophysiques des oxazolones, isostères oxygénés des imidazolones ont été déterminées dans le dioxane et sont reportées dans le Tableau 48. Si l'on s'intéresse dans un premier temps aux oxazolones **148a** à **148e**, comportant un groupement O-acétate faiblement donneur ou pas de groupement sur le benzylidène (R_1), on remarque que leurs spectres d'absorption et d'émission sont décalés vers les courtes longueurs d'onde par rapport à ceux de la GFP, et qu'ils présentent un rendement quantique de fluorescence très faible. On observe cependant que l'introduction de groupements électrodonneurs en R_2 , comme dans le cas des imidazolones, permet d'augmenter ce rendement quantique. La présence de groupements très électrodonneurs en R_1 , tel que le groupe diméthylamino, conduit à des composés très peu fluorescents (composés **148f** et **148g**) mais présentant des spectres d'absorption et d'émission décalés vers les plus grandes longueurs d'onde, plus proches des spectres de la GFP sauvage. On remarque également l'augmentation notable du coefficient d'extinction molaire ($\sim 57\text{-}58000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Dans le cas des oxazolones, l'introduction d'un groupement électroattracteur en R_1 ne suffit pas à obtenir des composés très fluorescents. En effet si on s'intéresse aux composés **148h**, **148i** et **148l**, on remarque que la présence d'un groupement cyano ou carboxylate sur le

benzylidène entraîne un shift important des $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ et $\lambda_{\max}^{\text{émis}}$ vers les courtes longueurs d'onde, cependant le rendement quantique de fluorescence est faible. Par contre la présence d'un groupement électroattracteur en R₁ associée à l'introduction d'un groupement électrodonneur en R₂, conduit à des composés présentant une absorption et une émission de fluorescence élevées composés **148j**, **148k** et **148m**).



Cposé	R ₁	R ₂	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	$\lambda_{\max}^{\text{ém}}$	ϕ à 20°C
148a	4-OAcPh	CH ₃	26923	334	465	0.0001
148b	4-OAcPh	Ph	39880	368(350,387)	425	0.001
148c	4-OAcPh	3,4-diOMePh	42014	382	446	0.0109
148d	Ph	Ph	31970	365	447	0.0018
148e	Ph	3,4-diOMePh	37064	378	447	0.020
148f	4-N(CH ₃) ₂ Ph	Ph	56816	462	514	0.0025
148g	4-N(CH ₃) ₂ Ph	3,4-diOMePh	58662	462	509	0.0025
148h	4-CNPh	CH ₃	31862	369	427(403,453)	0.025
148i	4-CNPh	Ph	34160	369	426	0.028
148j	4-CNPh	3,4-diOMePh	38090	393(412)	489	0.421
148k	4-CNPh	4-NHAcPh	33000	389	461	0.540
148l	4-CO ₂ MePh	Ph	41635	370(353,390)	Non fluorescent	0
148m	4-CO ₂ MePh	3,4-diOMePh	40000	391(411)	474	0.348
148q	N-(Ac)indol-3-yl	3,4-diOMePh	30174	410	460,490	0.0002

Tableau 48 : Caractéristiques photophysiques des oxazolones

La délocalisation électronique sur toute l'oxazolone semble ici nécessaire pour obtenir des fluorophores intéressants. La mesure des propriétés photophysiques des oxazolones a été effectuée en milieu aqueux et montre, comme les imidazolones, une diminution brutale de la fluorescence (les résultats ne sont pas reportés).

En conclusion, la série des oxazolones présente quels que soient R_1 et R_2 , un coefficient d'extinction molaire élevé et les composés les plus fluorescents présentent un groupement électroattracteur en R_1 associé à un groupement électrodonneur en R_2 (dérivés 3,4-diméthoxy **148j** et **148m** et dérivé 4-NHAc, **148k**).

4. Propriétés spectrales des buténolides

Les données photophysiques de la série des buténolides sont reportées dans le Tableau 49. D'après les résultats obtenus avec les deux séries précédentes, nous nous sommes principalement intéressés, dans cette série, aux composés portant un groupement électroattracteur en R_1 .

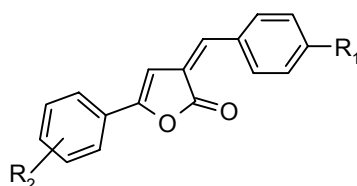
Globalement on remarque deux points essentiels :

1- si $R_2 = H$, le composé correspondant présente une fluorescence très faible quel que soit le groupement présent en R_1 ,

2- les spectres d'absorption et d'émission sont décalés vers de plus grandes longueurs d'onde ($\lambda_{\max}^{\text{abs}} > 393 \text{ nm}$ et $\lambda_{\max}^{\text{émis}} > 493 \text{ nm}$).

Comme dans le cas des oxazolones, l'introduction d'un groupement électroattracteur en R_1 ne suffit pas pour obtenir un composé fluorescent. En effet la présence d'un groupement électrodonneur en R_2 est nécessaire (comparer **183e** avec **183f-h** et **183i** avec **183j**). On observe dans ces cas, des composés avec des rendements quantiques de fluorescence allant jusqu'à 0,413 et des spectres d'émission décalés vers les grandes longueurs d'onde ($\lambda_{\max}^{\text{émis}} >$

520 nm). Par contre, l'introduction d'un groupement électroattracteur en R₂ sur les buténolides entraîne une perte de fluorescence (**183k-l**). L'introduction d'un groupement très électroattracteur en R₁ tel que le groupement NO₂ entraîne un décalage plus important des spectres d'absorption et d'émission vers les grandes longueurs d'onde mais conduit à des composés qui ne fluorescent quasiment plus (**183p** et **183r**).



Pdt	R ₁	R ₂	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max ém}}$ (nm)	ϕ à 20°C
183a	H	H	23450	442	493	0.0073
183b	H	3,4-diOMe	30965	406	495	0.004
183c	OAc	H	12769	393	497	0.0003
183e	CN	H	30113	400	494	0.0268
183f	CN	4-OMe	33776	422	519	0.270
183g	CN	3,4-diOMe	31065	428	531	0.413
183h	CN	4-NHAc	31175	424	521	0.40
183i	CO ₂ Me	H	24783	401	495	0.0072
183j	CO ₂ Me	3,4-diOMe	31135	423	522	0.355
183k	CO ₂ Me	4-NO ₂	38251	411	493	0.002
183l	CO ₂ Me	4-CN	34714	404	501	0.0019
183n	CO ₂ Me		32672	421	515	0.289
183p	NO ₂	H	22300	416	518	0.0834
183r	NO ₂	4-OMe	30300	438	550	0.043
183s			42440	411 (391,435)	533	0.0046

Tableau 49 : Caractéristiques photophysiques des buténolides

Quand on augmente la délocalisation électronique par l'introduction d'insaturations supplémentaires (composé **183s**), on remarque une augmentation de l' ϵ ainsi qu'un décalage du spectre d'émission vers les grandes longueurs d'onde mais le rendement quantique est diminué.

Comme pour les imidazolones et les oxazolones, nous avons observé un phénomène d'inhibition de l'émission de fluorescence quand les caractéristiques photophysiques des buténolides sont mesurées dans l'eau. Les rendements quantiques de fluorescence sont alors divisés par 100.

En conclusion, la série des buténolides présente quels que soient R_1 et R_2 , un coefficient d'extinction molaire élevé ainsi que des spectres d'absorption et d'émission vers les grandes longueurs d'ondes. On retiendra principalement ici les composés **183g-h** et **183j** portant un groupement électroattracteur en R_1 associé à un groupement électrodonneur en R_2 et qui présentent les meilleures caractéristiques photophysiques de cette série.

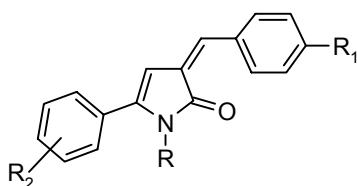
5. Propriétés spectrales des pyrrolinones

Les caractéristiques photophysiques des pyrrolinones, carbaisostères des imidazolones dans le dioxane sont reportées dans le Tableau 50.

Dans cette série hétérocyclique, l'introduction d'un groupement électroattracteur tel que le $-\text{CN}$ et le $-\text{COOMe}$ sur la partie benzylidène du chromophore, entraîne une augmentation importante du rendement quantique de fluorescence. L'augmentation du ϵ reste plutôt modérée (composés **186e** et **186i**, $\epsilon < 19000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mais est renforcée par la présence d'un groupement électrodonneur en R_2 (composés **186g-h** et **186j**, $\epsilon > 19000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les pyrrolinones présentent dans l'ensemble, des spectres d'absorption et d'émission très décalés vers les grandes longueurs d'onde, notamment les spectres d'émissions qui présentent dans tous les cas, des maxima d'émission à des $\lambda > 540 \text{ nm}$.

Contrairement aux imidazolones, l'introduction d'un groupement alkyle sur l'azote N1 des pyrrolinones, a un effet négatif sur ses propriétés photophysiques. En effet, on observe une chute du ϵ de l'ordre de $8000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ainsi qu'une diminution du rendement quantique de fluorescence (comparer **186e** avec **187k** et **186h** avec **187h**). La substitution de cet azote induit également un décalage du $\lambda_{\text{max}}^{\text{émis}}$ de 22 à 29 nm.



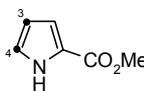
Cposé	R ₁	R ₂	R	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max ém}}$ (nm)	ϕ à 20°C
186a	H	H	H	14612	422	539(446)	0.012
186b	H	3,4-diOMe	H	18571	431	542	0.099
186c	OH	H	H	9103	429	563	<0.001
186e	CN	H	H	18934	438	569	0.270
187e	CN	H	<i>i</i> -Bu	10577	440	598	0.140
186g	CN	3,4-diOMe	H	19063	457	585	0.172
186h	CN	4-NHAc	H	19890	456	584	0.24
187h	CN	4-NHAc	<i>i</i> -Bu	13035	450	606	0.20
186i	CO ₂ Me	H	H	15200	437	544	0.10
186j	CO ₂ Me	3,4-diOMe	H	19000	454	574	0.333
187k	CO ₂ Me	4-NO ₂	<i>i</i> -Bu	14425	442	594	0.225
187l	CO ₂ Me	4-CN	<i>i</i> -Bu	12982	438	589	0.176
187n	CO ₂ Me		<i>i</i> -Bu	6923	442	595 (482)	0.254
187p	NO ₂	H	<i>i</i> -Bu	12700	456	601	0.033
187q	NO ₂	4-OMe	<i>i</i> -Bu	12500	465	616	0.0175

Tableau 50 : Caractéristiques photophysiques des pyrrolinones dans le dioxane

Comme dans le cas des buténolides, l'introduction d'un groupement très électroattracteur sur les pyrrolinones tel que le groupement NO₂ entraîne un décalage important des spectres d'absorption et d'émission vers les plus grandes longueurs d'onde (comparer **187e** et **187p**) et à une diminution importante du rendement quantique de fluorescence. Par contre la présence d'électroattracteurs en R₁ et en R₂, n'affecte pas les propriétés photophysiques des pyrrolinones. On obtient dans ces cas (composés **187k** et **187l**) des composés présentant une absorption et une fluorescence semblables au composé **187h**. La substitution du groupement phényle en R₂ par un indole (**187n**) conduit à une chute du coefficient d'extinction molaire ($< 7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mais le produit **187n** présente tout de même un rendement quantique de fluorescence important ($\phi = 0,254$).

Le phénomène d'inhibition de l'émission de fluorescence dans l'eau observé dans les 3 séries précédentes, est retrouvé avec les pyrrolinones.

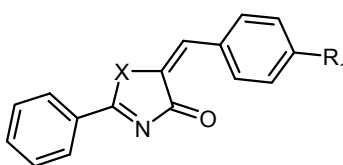
En conclusion, la série des pyrrolinones présente quels que soient R₁ et R₂, un coefficient d'extinction molaire peu élevé ainsi que des spectres d'absorption et d'émission très décalés vers les grandes longueurs d'ondes. Afin d'obtenir les meilleures caractéristiques photophysiques, on retiendra principalement la nécessité d'avoir un groupement électroattracteur en R₁ associé à un groupement quelconque en R₂, ceci sur un hétérocycle pyrrolinone non substitué sur l'azote N1. Les composés **186e**, **186h** et **186j** présentent les meilleures caractéristiques photophysiques de cette série.

6. Propriétés spectrales des thiazolidinones

La famille des thiazolidinones, isostères soufrés des imidazolones, n'a pas été entièrement explorée du fait des résultats médiocres obtenus en synthèse. Si on compare les thiazolidinones à leurs analogues dans la série imidazolones (Tableau 51), on remarque un

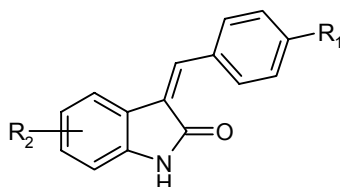
décalage important des spectres d'absorption et d'émission vers les plus grandes longueurs d'onde. Les rendements quantiques de fluorescence sont peu significatifs, probablement du fait de l'absence de substituants aromatiques adéquats sur R₁ et R₂.

Une exploration plus importante serait à envisager dans cette série. Il serait notamment intéressant de voir l'effet obtenu sur les caractéristiques photophysiques des thiazolidinones par l'introduction de groupements électroattracteurs sur le benzylidène combinés avec l'effet donneur sur l'aromatique R₂ tel qu'observé dans les autres séries.



Produits	X	R ₁	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max ém}}$ (nm)	ϕ à 20°C
191a	S	H	12201	398	472,ép 446	0.0005
159a	N	H	13067	384	444 ép421,471	0.0017
191c	S	OMe	24344	421	500	0.0016
159g	N	OMe	15368	398	464 ép440,500	0.0002

Tableau 51 : Caractéristiques photophysiques des thiazolidinones dans le dioxane comparées aux imidazolones



Cposé	R ₁	R ₂	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max ém}}$ (nm)	ϕ à 20°C
196a	H	H	-	320	-	-
196b	OH	H	-	348	-	-

196c	NMe ₂	H	32181	433	-	0.0003
196d	CN	H	10178	323	-	-
196e	CN	3,4-diOMe	4930	-	-	-

- : non déterminé

Tableau 52 : Caractéristiques photophysiques des oxindoles

7. Propriétés spectrales des analogues structuraux

La plupart des analogues structuraux des imidazolones a été évaluée uniquement pour leur capacité à absorber de la lumière et les résultats des oxindoles sont reportés dans le Tableau 52. Cette famille de produits présente des maxima d'absorption à des longueurs d'onde proche de la fluorescence intrinsèque des protéines (320-360 nm), c'est pourquoi elle a été rapidement abandonnée. Le seul composé absorbant à des longueurs d'ondes plus élevées, le composé **196c**, ne présente pas de fluorescence.

8. Etude comparative des 4 classes principales de fluorophores synthétisés

Les quatre grandes classes de fluorophores synthétisés regroupent les imidazolones, les oxazolones, les buténolides ainsi que les pyrrolinones. Ces composés les plus fluorescents présentent des caractéristiques photophysiques particulières mais qui présentent des similitudes, c'est pourquoi il nous a paru intéressant d'effectuer une comparaison entre ces différentes classes.¹⁸⁶

8.1 Etude RMN

Les quatre classes de composés ont été caractérisées par résonance magnétique nucléaire du proton principalement et particulièrement par la présence d'un pic caractéristique, le H vinylique.

Des caractéristiques générales apparaissent si on regroupe les composés les plus intéressants (portant un groupement électroattracteur en R_1) en 2 classes, la **classe I** comprenant les imidazolones **159** et leurs isostères oxygénés ($X = O$), les oxazolones **148**, la **classe II** comprenant les pyrrolinones **186-187** et leurs isostères oxygénés, les buténolides **183** (Figure 46).

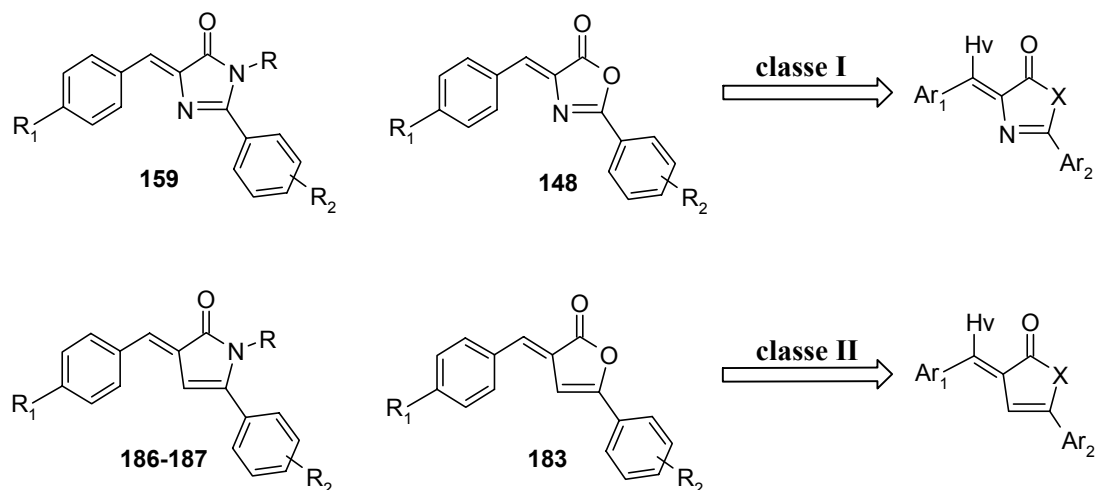


Figure 46 : Les imidazolones **159** et leurs isostères, les oxazolones **148**, les pyrrolinones **186-187** et les buténolides **183**

Classe I			Classe II		
X	Hv	Ar1 AB	X	Hv	Ar1 AB
NH (imidazolones 159)	7,02 ± 0,12	8,0-8,4	NH (pyrrolinones 186)	7,15 ± 0,05	8,0-8,1
O (oxazolones 148)	7,33 ± 0,08		N- <i>i</i> Bu (pyrrolinones 187)	7,45 ± 0,07	
			O (buténolides 183)	7,65 ± 0,07	

Tableau 53 : Caractéristiques ^1H -RMN des composés des classes I et II

Dans chaque série de composés, le proton vinylique apparaît comme une caractéristique commune, le déplacement chimique de celui-ci varie peu pour les composés d'une même série (Tableau 53). Il en est de même pour les systèmes AB des aromatiques Ar1 quand ceux ci peuvent être identifiés dans la région complexe des protons aromatiques.

Quand on compare les classes **I** et **II** (remplacement d'un azote sp^2 par un CH sp^2), on observe un déblindage du proton vinylique de 0,13 ppm dans la série azotée (composés **159** et **186-187**) et un décalage plus marqué dans la série oxygénée (composés **148** et **183**, $\Delta = +0,32$ ppm). Un déblindage important du proton vinylique est également observé quand on compare les imidazolones avec les oxazolones ($\Delta = +0,31$ ppm).

On retrouve un effet similaire mais plus prononcé, si on compare les pyrrolinones avec les buténolides ($\Delta = +0,50$ ppm). L'introduction d'un groupement alkyle sur l'azote des pyrrolinones entraîne également un déblindage significatif du proton vinylique. Dans la série des buténolides un déblindage impressionnant est observé quand on introduit un deuxième groupement électroattracteur en R_2 (composés **183k** et **183l**), en effet le signal du proton vinylique est alors déplacé à 7,98 ppm sous l'effet combiné des 2 groupements électroattracteurs. Ce déblindage du proton vinylique est corrélé avec des coefficients d'extinction molaire plus élevés dans le cas des buténolides ($\epsilon = 34700$ et $38300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour les composés **183l** et **183k**, respectivement).

Dans les deux classes, le déplacement chimique du proton vinylique est influencé principalement par la nature de l'hétérocycle ($\text{X} = \text{O}$ ou NR) et plus probablement par le dipôle carbonyle qui, lui-même, dépend de X.

8.2 Comparaison des données photophysiques

Après avoir étudié chacune des séries, nous avons envisagé une étude comparative des composés les plus fluorescents (Tableau 54).

Une première analyse de la série de composés basés sur la structure de la GFP, les imidazolones, nous a conduit à faire quelques conclusions sur les requis structuraux nécessaires à l'obtention d'un fluorophore intéressant.

Cposé	classe	R	R ₁	R ₂	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	ϕ	$\epsilon \cdot \phi \cdot 10^{-3}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
159a	Imidazolones	H	H	H	13.1	384/444	0.001	0.02
159l		H	CN	H	24.8	393/464	0.158	3.92
159q		H	CO ₂ Me	H	28.8	394/461	0.159	4.58
159b		H	H	3,4-diOMe	23.0	390/455	0.034	0.78
159n		H	CN	3,4-diOMe	26.5	405/482	0.189	5.01
159u		H	CO ₂ Me	3,4-diOMe	32.2	403/478	0.295	9.49
159v		H	CO ₂ Me	4-NO ₂	25.3	405/510	0.258	6.53
148d	Oxazolones	-	H	H	32.0	363/447	0.002	0.06
148i		-	CN	H	34.2	369/426	0.028	0.96
148l		-	CO ₂ Me	H	41.6	370/nf ^a	0	0
148e		-	H	3,4-diOMe	37.1	378/447	0.020	0.74
148j		-	CN	3,4-diOMe	38.1	393/489	0.421	16.0
148m		-	CO ₂ Me	3,4-diOMe	40.0	391/474	0.348	13.9
148k		-	CN	4-AcNH	33.0	389/461	0.540	17.8
186a	Pyrrolinones	H	H	H	14.6	422/539	0.012	0.17
186e		H	CN	H	18.9	438/569	0.294	5.55
186i		H	CO ₂ Me	H	15.2	437/544	0.100	1.52
186b		H	H	3,4-diOMe	18.6	431/542	0.108	2.01
186g		H	CN	3,4-diOMe	19.1	457/585	0.188	3.59
186j		H	CO ₂ Me	3,4-diOMe	19.0	454/574	0.363	6.89
187k		<i>i</i> Bu	CO ₂ Me	4-NO ₂	14.4	442/594	0.245	3.53
187l		<i>i</i> Bu	CO ₂ Me	4-CN	13.0	438/589	0.192	2.49
186h		H	CN	4-AcNH	19.9	456/584	0.26	5.17
187h		<i>i</i> Bu	CN	4-AcNH	13.0	450/606	0.218	2.83
183a	Butenolides	-	H	H	23.4	442/493	0.007	0.16
183e		-	CN	H	30.1	400/494	0.027	0.81
183i		-	CO ₂ Me	H	24.8	401/495	0.007	0.17
183b		-	H	3,4-diOMe	31.0	406/495	0.004	0.12
183g		-	CN	3,4-diOMe	31.1	428/531	0.450	14.0
183j		-	CO ₂ Me	3,4-diOMe	31.1	423/522	0.355	11.0
183k		-	CO ₂ Me	4-NO ₂	38.3	411/493	0.002	0.08
183l		-	CO ₂ Me	4-CN	34.7	404/501	0.002	0.07
183h		-	CN	4-AcNH	31.2	424/521	0.437	13.6

Tableau 54 : Comparaison des propriétés photophysiques de quelques composés des 4 classes, imidazolones, oxazolones, pyrrolinones et buténolides

Si on compare l'imidazolone non substituée en R_1 et en R_2 (**159a**) avec les imidazolones portant un substituant en para d'un aromatique (**159l** et **159q**) ou un substituant en para des deux aromatiques (**159n**, **159u** et **159v**) on observe une augmentation significative et simultanée du coefficient d'extinction molaire et des longueurs d'onde aux maxima d'absorption et d'émission. Le rendement quantique de fluorescence est augmenté de près de 300 fois, ce qui conduit à des fluorophores ayant une efficacité de fluorescence $\varepsilon \cdot \phi$ de 3,9 à $9,5 \cdot 10^3$. Le meilleur effet de substitution a été observé avec le dérivé 3,4-diméthoxyphényle **159u**.

Si on considère la série des pyrrolinones, on remarque des coefficients d'extinction molaires plus faibles que les imidazolones et qui ne sont pas augmentés d'une manière importante, quand on introduit des substituants sur les aromatiques, mais présentent des spectres d'absorption et d'émission très décalés vers les grandes longueurs d'ondes. L'introduction de substituants sur les Ar_1 entraîne un décalage important des longueurs d'ondes d'absorption vers les plus grandes longueurs d'ondes et cet effet est encore plus marqué si un deuxième substituant est introduit sur Ar_2 . De plus toutes les substitutions représentées dans le Tableau 54 conduisent à des composés fluorescents avec des $\phi > 0,1$, les plus intéressants présentant une efficacité de fluorescence allant jusqu'à $6,9 \cdot 10^3$ (composé **186j**). Contrairement aux imidazolones, la substitution de l'azote N1 des pyrrolinones, entraîne une chute importante des ε et des ϕ (comparer **186h** et **187h**).

La série des oxazolones fait ressortir des coefficients d'extinction molaire élevés $> 30000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ mais des ϕ élevés uniquement dans les cas où R_1 = électroattracteur et R_2 = électrodonneur, les spectres d'absorption et d'émission étant plus proches des imidazolones mais légèrement décalés vers les plus petites longueurs d'ondes. Le meilleur candidat de cette

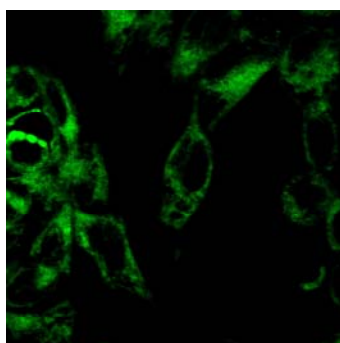
série présente un ϵ proche de $33000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et une efficacité de fluorescence proche de 18.10^3 (composé **148k**).

Des caractéristiques similaires aux oxazolones (R_1 = électroattracteur et R_2 = électrodonneur) sont nécessaires pour obtenir des buténolides très fluorescents avec une efficacité de fluorescence significative (**183j**, **183k** et **183h**). On observe dans cette série des spectres d'absorption et d'émission vers les hautes longueurs d'ondes plus proches des pyrrolinones mais légèrement décalés vers le bleu.

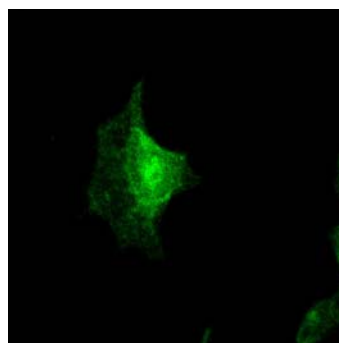
Cposé	R ₁	R ₂	Solvant	ϵ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max ém}}$ (nm)	ϕ^* à 20°C
159h	4-N(CH ₃) ₂ Ph	3,4-diOMePh	a	50254	455	515	0.0023
			b	-	-	534	0.012
159m	4-CNPh	4-OMePh	a	29209	401	482 ép453,508	0.159
			b	-	-	490	0.158
159n	4-CNPh	3,4-diOMePh	a	26451	405	482 ép457	0.189
			b	-	402	502	0.047
159u	4-CO ₂ MePh	3,4-diOMePh	a	32218	403	478	0.295
			b	-	392	495	0.06
148f	4-N(CH ₃) ₂ Ph	Ph	a	56816	462	514	0.0025
			b	-	-	533	0.0098
148g	4-N(CH ₃) ₂ Ph	3,4-diOMePh	a	58662	462	509	0.0025
			b	-	-	523	0.0118
148j	4-CNPh	3,4-diOMePh	a	38090	393(412)	489	0.421
			b	-	-	535	0.007
183g	4-CNPh	3,4-diOMePh	a	31065	428	531	0.413
			b	-	418	541	0.031
186e	4-CNPh	Ph	a	18934	438	569	0.270
			b	-	-	582	0.008
186g	4-CNPh	3,4-diOMePh	a	19063	457	585	0.172
			b	-	456	600	0.003
186h	4-CNPh	4-NHAcPh	a	19890	456	584	0.24
			b	-	-	600	0.021

a : dioxane, b : Liposomes PC ou PG, - : non déterminé, * rendement apparent

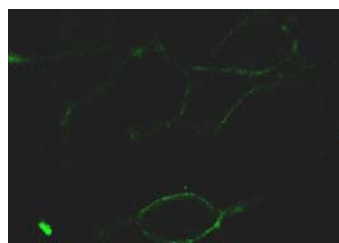
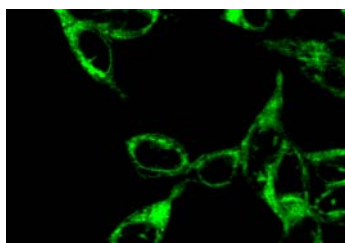
Tableau 55 : Caractéristiques photophysiques de quelques composés dans les liposomes.



A



C



B

D

Figure 47 : Visualisation de la répartition cellulaire de la molécule

A : **159n**, B : **159u**, C : **183g**, D : FM® 4-64

D- Applications

La particularité des imidazolones et de ses isostères de fluorescer en milieu apolaire et non en milieu aqueux, nous a conduit à tester ces composés comme marqueurs membranaires. Des mesures de fluorescence de quelques composés ont été effectuées dans des liposomes afin d'observer leur comportement en présence de modèles membranaires. Ce travail a été réalisé par les Dr C.Pigault et A.Wund.

On remarque que les spectres d'émission sont, dans tous les cas, décalés vers les plus grandes longueurs d'ondes mais également que les rendements quantiques de fluorescence sont globalement diminués, notamment quand R_1 est électroattracteur. On remarque cependant que le composé **159m** conserve ses propriétés de fluorescence. A l'inverse les composés portant un groupement électrodonneur en R_1 (composés **159h**, **148f** et **148g**) ont un comportement différent. Leur ϕ augmente après leur incorporation aux liposomes, mais reste très faible. Cependant les rendements quantiques reportés sont des rendements quantiques de fluorescence apparents, il ne tiennent pas compte des composés libres en solution qui n'émettent pas de fluorescence.

Avec quelques-uns de ces composés (**159n**, **159u** et **183g**), des essais d'incorporation membranaire ont été réalisés in vitro et ont été suivis par microscopie confocale (Figure 47). Ainsi, après la préparation d'une culture cellulaire de HEK293, le composé fluorescent sélectionné est additionné sur les cellules en culture. Au départ, celui-ci se trouve en milieu aqueux, et donc ne fluoresce pas. Rapidement on observe l'apparition de fluorescence aussi bien au niveau de la membrane cellulaire que dans le cytoplasme,

contrairement au marqueur membranaire de référence, le FM® 4-64. Les composés étudiés ici ne présentent pas de sélectivité membranaire.

E- Conclusion

A l'intérieur de ces 4 séries de composés, de très bons candidats fluorescents ont été obtenus. Nous avons synthétisé de nouveaux analogues du chromophore de la GFP présentant de très bons rendements quantiques de fluorescence (de 0,15 à 0,54) et un large panel de longueurs d'ondes d'émission (de 461 à 594 nm). Les composés présentant les meilleures caractéristiques spectrales sont trouvés dans la série des oxazolones (**148j**, **148m** et **148k**) et dans celle des buténolides (**183g**, **183j** et **183h**). Certains d'entre eux pourraient servir de point de départ pour la conception de marqueurs de matériel biologique hydrophobes fluorescents apportant des renseignements précieux sur les propriétés membranaires des cellules ou encore sur le microenvironnement à l'intérieur des poches protéiques hydrophobes.

Ces dérivés de la GFP pourraient également être utilisés comme fluorophores liés à des ligands, dans les études d'interactions ligands-récepteurs (ou enzymes) utilisant le transfert d'énergie de fluorescence (FRET) entre des ligands fluorescents et des récepteurs ou enzymes rendus fluorescents par fusion avec la GFP (voir le paragraphe A.3 du Chapitre III).

Bibliographie du Chapitre III

- ⁹⁷ Haugland R.P, Johnson I.D. Introduction to fluorescent techniques. *Handbook of Fluorescent probes and Research Chemicals*, **2001**, Vol. Sixth Edition.
- ⁹⁸ Zimmer M. Green Fluorescent Protein (GFP) : Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759-781.
- ⁹⁹ Georget V., Nicolas J.C, Sultan C. La green fluorescent protein : application à la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens. *Médecine/sciences*, **1999**, *15*, 45-55.
- ¹⁰⁰ Shimomura O, Jonhson FH, Saiga Y. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1962**, *59*, 223-239.
- ¹⁰¹ Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, **1994**, *263*, 802-805.
- ¹⁰² a) On the use of a fluorescent protein to detect target protein-ligand interactions. Inventors: Galzi, J.L. Alix P. French Patent n° 97.06977, **1997**. b) Sandra Lecat, Bernard Bucher, Yves Mely, and Jean-Luc Galzi. Mutations in the Extracellular Amino-terminal Domain of the NK2 Neurokinin Receptor Abolish cAMP Signaling but Preserve Intracellular Calcium Responses. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 42034-42048. c) Brigitte Ilien, Christelle Franchet, Philippe Bernard, Séverine Morisset, Claire Odile Weill, Jean-Jacques Bourguignon, Marcel Hibert and Jean-Luc Galzi. Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and drug binding properties. *Journal of Neurochemistry*, **2003**, *85*, 768.
- ¹⁰³ Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, **1992**, *111*, 229-233.
- ¹⁰⁴ Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Groo L. A., Tsien R. Y., Remington S. J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, **1996**, *273*, 1392-1395.
- ¹⁰⁵ Inouye S., Tsuji F. I. Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.*, **1994**, *351*, 211-214.
- ¹⁰⁶ Shimomura O. Structure of the chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.*, **1979**, *104*, 220-222.
- ¹⁰⁷ Heim R., Prasher D. C. and Tsien R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, *91*, 12501-12504.
- ¹⁰⁸ Tsien Roger Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, 509-544.
- ¹⁰⁹ Brejc K., Sixma T. K., Kitts P. A., Kain S. R., Tsien R. Y., Ormö M. and Remington J. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, *94*, 2306-2311.
- ¹¹⁰ Chattoraj M., King B. A., Bublitz G. U. and Boxer S. G. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, *93*, 8362-8367.
- ¹¹¹ Niwa H., Inouye S., Hirano T., Matsuno T., Kojima S., Kubota M., Ohashi M. and Tsuji F. I. Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, *93*, 13617-13622.
- ¹¹² Helms V., Straatsma T. P., McCammon J. A. Internal Dynamics of Green Fluorescent Protein. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 3263-3269.
- ¹¹³ Wang L., Xie J., Deniz A. A., Schultz P. G. Unnatural Amino Acid Mutagenesis of Green Fluorescent Protein. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 174-176.
- ¹¹⁴ Kojima S., Hirano T., Niwa H., Ohashi M., Inouye S. and Tsuji F. I. Mechanism of the Redox Reaction of the *Aequorea* Green Fluorescent Protein (GFP). *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2875-2878.
- ¹¹⁵ Kojima S., Ohkawa H., Hirano T., Maki S., Niwa H., Ohashi M., Inouye S. and Tsuji F. I. Fluorescent Properties of Model Chromophores of Tyrosine-66 Substituted Mutants of *Aequorea* Green Fluorescent Protein (GFP). *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5239-5242.

- ¹¹⁶ Prendergast, F. G. Biophysics of the Green Fluorescent Protein. *Methods Cell Biol.* **1999**, 58, 1-18.
- ¹¹⁷ Kidwai A. R and Devasia G. M. A New Method for the synthesis of Amino Acids. Synthesis of Amino Acids and Their Derivatives through 2,4-Disubstituted 2-Imidazolin-5-ones. *J. Org. Chem.*, **1962**, 27, 4527-4531.
- ¹¹⁸ Devasia G. M., Shafi P. M. Synthesis of Acylamino Acids and Acylamino Acid Amides by Simultaneous Reduction and Hydrolysis of Unsaturated 2,4-Disubstituted 2-Imidazolin-5-ones. *Indian J. Chem.*, **1986**, 25B, 204-206.
- ¹¹⁹ Carter H.E. *Organic reactions*, Vol 3, John Wiley & Sons, New York, **1947**, p. 198-239.
- ¹²⁰ Schmidt U., Häusler J., Öhler E., Poisel H. Dehydroamino Acids, α -Hydroxy- α -amino Acids and α -Mercapto- α -amino Acids. *Fortsch. Chem. Org. Natust.* **1979**, 37, 251.
- ¹²¹ Rao Y. S. and Filler R. Geometric Isomers of 2-Aryl(Aralkyl)-4-arylidene(alkylidene)-5(4H)-oxazolones. *Synthesis*, **1975**, 749-764.
- ¹²² Rao Y. S. A New Stereospecific Synthesis of the E Isomers of 2-phenyl-4-arylmethylidene-2-oxazolin-5-ones. *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 722-725.
- ¹²³ Prokof'ev E. P., Karpeiskaya E. I. The proton coupled ¹³C NMR direct determination of Z,E-configuration of 4-benzyliden-2-phenyl(methyl)- Δ^2 -oxazolin-5-ones and products of their solvolysis. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 8, 737-740.
- ¹²⁴ Tourwé D., Mannekens E., Nguyen Thi Diem T., Verbeyden P., Jaspers H., Toth G., Péter A., Kertesz I., Torok G., Chung N. N., Schiller P. W. Side Chain Methyl Substitution in the δ -Opioid Receptor Antagonist TIPP Has an Important Effect on the Activity Profile. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 5167-5176.
- ¹²⁵ Cativiela C., Melendez E. Geometric Isomers of 2-Phenyl-4-(α -arylethylidene)-5(4H)-oxazolones. *Synthesis*, **1978**, 832-834.
- ¹²⁶ Mazurkiewicz R., Pierwocha A.W. 4-Phosphoranylidene-5(4H)-oxazolones. A Novel Synthesis and Properties. *Monatsh.*, **1996**, 127, 219-225.
- ¹²⁷ Mazurkiewicz R., Pierwocha A.W. 4-Phosphoranylidene-5(4H)-oxazolones.II. Reacions with Alkylating Agents. *Monatsh.*, **1997**, 128, 893-900.
- ¹²⁸ Kumar P., Mukerjee A. K. Synthesis of 4-arylidene-1,2-disubstituted- Δ^2 -imidazolin-5-ones. *Indian J. Chem.*, **1981**, 20B, 416-418.
- ¹²⁹ Tripathy P. K., Mukerjee A. K. A facile synthesis of N-substituted 2-acylamino-2-alkenamides. *Synthesis*, **1985**, 285-288.
- ¹³⁰ Cativiela C., Chueca J., Garcia J. I., Melendez E. On the synthesis of unsaturated 4(5H)-imidazolones. *Heterocycles*, **1984**, 22, 2775-2781.
- ¹³¹ Badr M. Z. A., El-Sherief H. A. H., Tadros M. E. Synthesis of 1,2-disubstituted 4-benzylidene-2-imidazolin-5-ones and their thiones derivatives. *Indian J. Chem.*, **1979**, 18B, 240-242.
- ¹³² Deshmukh M. B., Chavan P. B. Selective aziridination of olefins. *Indian J. Chem.*, **1996**, 35B, 1337-1339.
- ¹³³ Kumar A., Verma M., Saxena A. K., Shanker K. New Heterocyclic Derivatives of Amino Acids and Their Antiinflammatory Activity. *Indian J. Chem.*, **1988**, 27B, 301-304.
- ¹³⁴ Cativiela C., Garcia J. I., Jaime C., Mayoral J. A., Melendez E. On the synthesis of unsaturated 4(5H)-imidazolones.2. Semi-empirical SCF-MO (MNDO) study on geometric factors influencing the reaction course. *Heterocycles*, **1985**, 23, 2685-2692.
- ¹³⁵ Devasia G.M. A new method for the synthesis of unsaturated 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 7, 571-572.
- ¹³⁶ Devasia GM, Shafi M. Synthesis of 4-arylidene-2-phenyl-2-imidazolin-5-ones. *Indian J. Chem.*, **1979**, 17B, 526-527.

- ¹³⁷ Devasia G.M., Shafi M. A convenient synthesis of unsaturated 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones. *Indian J. Chem.*, **1981**, 20B, 657-660.
- ¹³⁸ Shafi P. M. Quantitative synthesis of 2-aryl-4-arylidene-2-imidazolin-5-ones. *Current science*, **1985**, 54, 1231-1232.
- ¹³⁹ Udo E. W. Lange, Bernd Schäfer, Dorit Baucke, Ernst Buschmann and Helmut Mack. A New Mild Method for the Synthesis of Amidines. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 7067-7070.
- ¹⁴⁰ Dalla Croce P., La Rosa C. Synthesis, Steric Configuration, and Reactivity of 4-Arylidene-2-methyl-1,4-dihydroimidazol-5-ones. *J. Chem. Research*, **1985**, 360-361.
- ¹⁴¹ Kjaer A. Reactions between Imino Esters and α -Amino Acid Esters. III. 2-Phenyl-5(4)-imidazolone and its Reactions. *Acta Chem. Scand.*, **1953**, 7, 1030-1035.
- ¹⁴² Roué N. and Bergman J. Synthesis of the Marine Alkaloid Leucettamine B. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 14729-14738.
- ¹⁴³ Mukerjee A. K., Joseph K., Homami S-S., Tikdari A. M. *Heterocycles*, **1991**, 32, 1317-1325.
- ¹⁴⁴ Coad E. C., Liu H., Rasmussen P. G. Synthesis and Characterization of Derivatives and Dimers of 4,5-Dicyanoimidazole. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 2811-2826.
- ¹⁴⁵ Townsend L. B., Devivar R. V., Turk S. R., Nassiri M. R., Drach J. C. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Certain 2,5,6-trihalo-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazoles. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4098-4105.
- ¹⁴⁶ Zou R., Drach J. C., Townsend L. B. Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of 2-Substituted 4,5-Dichloro- and 4,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazoles as Potential Agents for Human Cytomegalovirus Infections. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 802-810.
- ¹⁴⁷ Matsuda A., Shinozaki M., Yamaguchi T., Homma H., Nomoto R., Miyasaka T., Watanabe Y., Abiru T. Nucleosides and Nucleotides. 103. 2-Alkynyladenosines : A Novel Class of Selective Adenosine A₂ Receptor Agonists with Potent Antihypertensive Effects.. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 241-252.
- ¹⁴⁸ Legraverend M., Ludwig O., Bisagni E., Leclerc S., Meijer L., Giocanti N., Sadri R., Favaudon V. Synthesis and In Vitro Evaluation of Novel 2,6,9-Trisubstituted Purines Acting as Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1281-1293.
- ¹⁴⁹ Ku H., Barrio J. R. Convenient Synthesis of Aryl Halides from Arylamines via Treatment of 1-Aryl-3,3-dialkyltriazenes with Trimethylsilyl Halides. *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 5239-5241.
- ¹⁵⁰ Patrick T. B., Juehne T., Rebb E., Hennessy D. Zinc (II) promoted conversion of aryltriazenes to aryl iodides and aryl nitriles. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 3553-3554.
- ¹⁵¹ Foster N. I. Aryl Iodides from Anilines via Triazene Intermediates. *Synthesis*, **1980**, 572-573.
- ¹⁵² D'Alessio R., Rossi, A. Short synthesis of undecylprodigiosine. A new route to 2,2'-bipyrrolyl-pyrromethene systems. *Synlett*, **1996**, 513-514.
- ¹⁵³ Jacobi P. A., Liu H. Iterative Synthesis of Semicorrins, Tripyrrolines, and Higher Analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1958-1959.
- ¹⁵⁴ Davis F. A., Fang T. Goswami R. Assymetric Synthesis of Substituted Prolines from d-Amino b-Ketoesters. Methyl (2*S*, 5*R*)-(+)-5-Phenylpyrrolidine-2-carboxylate. *Org. Lett.*, **2002**, 4, 1599-1602.
- ¹⁵⁵ Koskinen A. M. P., Schwerdtfeger J., Edmonds M. A Simple Route to 4-Substituted-3,4-Didehydroprolines. Mechanistic Probes for the Inhibition of Prolyl-4-Hydroxylase. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 5399-5402.

- ¹⁵⁶ Hassan J., Sévignon M., Gozzi C., Schulz E., Lemaire M. Aryl-Aryl Bond Formation One Century after the Discovery of the Ullmann Reaction. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1359-1469.
- ¹⁵⁷ Savarin C., Srogl J., Liebeskind L. S. Thiol Ester-Boronic Acid Cross-Coupling. Catalysis Using Alkylative Activation of the Palladium Thiolate Intermediate. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 3229-3231.
- ¹⁵⁸ Liebeskind L. S., Srogl J. Thiol Ester-Boronic Acid Coupling. A mechanistically Unprecedented and General Ketone Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 11260-11261.
- ¹⁵⁹ Liebeskind L. S., Srogl J. Heteroaromatic Thioether-Boronic Acid Cross-Coupling under Neutral Reaction Conditions. *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 979-981.
- ¹⁶⁰ Srogl J., Liu W., Marshall D., Liebeskind L. S. Bio-organometallic Organosulfur Chemistry. Transition Metal-Catalysed Cross-Coupling Using Coenzyme M or Thioglycolic Acid as the Leaving Group. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 9449-9450.
- ¹⁶¹ Egi M., Liebeskind L. S. Heteroaromatic Thioether-Organostannane Cross-Coupling. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 801-802.
- ¹⁶² Alphonse F.-A., Suzenet F., Keromnes A., Lebreton B., Guillaumet G. Copper(I)-Promoted Palladium-Catalysed Cross-Coupling of Unsaturated Tri-*n*-butylstannane with Heteroaromatic Thioether. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 803-805.
- ¹⁶³ Oumouch S., Bourotte M., Schmitt M., Bourguignon J. J. Expeditive Synthesis of 2,5-Disubstituted imidazolin-4-ones. *Tet. Lett.*, **2004**, *submitted*.
- ¹⁶⁴ Henichart J. P., Bernier J. L. A Convenient Method for the Preparation of ω -Dialkylaminoalkyl Isothiocyanates. *Synthesis*, **1980**, 311-312.
- ¹⁶⁵ Filler R., Hebron L. M. Chemistry of Lactones. III. Reactions of α -Benzylidene- γ -phenyl- $\Delta^{\beta,\gamma}$ -butenolide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 391-393.
- ¹⁶⁶ Filler R., Leipold H. A. Lactones. IX. Reactions of Highly Conjugated Butenolides under Friedel-Crafts conditions. Synthesis of Polynuclear and Aryl-substituted Butadiene Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.*, **1962**, *27*, 4440-4443.
- ¹⁶⁷ Schueler F. W., Hanna C. Unsaturated Lactones. II. The Relationship between Chemical Constitution and Absorption Spectra in a Group of Crotonolactones. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 3528-3530.
- ¹⁶⁸ Rothe J., Zimmer H. Substituted γ -Lactones. III. A General Route to β -Substituted γ -Butyrolactones. *J. Org. Chem.*, **1959**, *24*, 586-589.
- ¹⁶⁹ Antoine Leibenguth, (1974). Hétérocycles issus d'acides α -hydroxy γ -cétoniques : furanones-2 et pyrrolidinones-2. Thèse de doctorat en pharmacie. UFR Sciences Pharmaceutiques de Strasbourg, Illkirch.
- ¹⁷⁰ Chiron R., Graff Y. Etudes des amides d'acides γ -cétoniques. *Bull. Soc. Chim.*, **1970**, 575-583.
- ¹⁷¹ Khan M. S. Y., Husain A. Syntheses and reactions of some new 2-arylidene-4-(biphenyl-4-yl)-but-3-en-4-olides with a study of their biological activity. *Pharmazie*, **2002**, *57*, 448-452.
- ¹⁷² Chiron R., Graff Y. Etudes des amides d'acides γ et δ -cétoniques. II. Effet de l'allongement de la chaîne et d'une C-substitution. *Bull. Soc. Chim.*, **1971**, 2145-2153.
- ¹⁷³ Jolly V. S., Singh S. P., Shrivastava A. K. Synthesis of 1-Substituted Phenyl-2-hydroxy-2-phenyl-4-(*p*-NN-bis-2'-cyanoethylaminobenzylidene)-5-pyrrolinones. *J. Indian Chem. Soc.*, **1983**, *60*, 612-613.
- ¹⁷⁴ Cromwell N. H., Cook K. E. γ -Keto and γ -Hydroxy- γ -phenylbutyramides. Synthesis, Absorption Spectra and Structure Studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 4573-4577.

- ¹⁷⁵ Jensen K. A., Crossland I. Studies of Thioacids and Their Derivatives. VII. On 2-Phenyl-4(5H)-Thiazolone. *Acta Chem. Scand.*, **1963**, 17, 144-162.
- ¹⁷⁶ Zayed E. M., Elbannany A. A., Ghozlan S. A. S. Studies on thiazolin-4-one : Synthesis of some pyrano[2,3-b]thiazole derivatives. *Pharmazie*, **1985**, 40, 194-196.
- ¹⁷⁷ Van Dormael A. Colorants polyméthiniques dérivés du noyau de la pyrimidazolone. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1949**, 58, 167-182.
- ¹⁷⁸ Andreani A., Leoni A., Locatelli A., Morigi R., Rambaldi M., Pietra C., Villetti G.-Aminopyridine derivatives with antiamnesic activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 77-82.
- ¹⁷⁹ Daisley R.W., Walker J. Substituted oxindoles. Part II. Correlation of Rate Constants with Hammett's Substituent Constants and Chemical Shifts for the 3-Position of some Substituted Oxindoles. *J. Chem. Soc.*, **1969**, 146-148.
- ¹⁸⁰ Walker G.N. Synthesis of 5,6-Dimethoxyindoles and 5,6-Dimethoxyoxindoles. A New Synthesis of Indoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 3844-3850.
- ¹⁸¹ Krasovitskii B.M., Afanasiadi L.Sh., Lysova I.V., Stryukov M.B., Lyubarskaya A.E. The Luminescence Spectroscopic Properties and the Electronic Structure of Certain Derivatives of Azlactones and Azlactams. *Russian J. Phys. Chem.*, **1982**, 56, 1519-1522.
- ¹⁸² You Y., He Y., Burrows P.E., Forrest S.R., Petasis N.A., Thompson M.E. Fluorophores Related to the Green Fluorescent Protein and Their Use in Optoelectronic Devices. *Adv. Mater.*, **2000**, 12, 1678-1681.
- ¹⁸³ Bell A.F., He X., Watcher R.M., Tonge P.J. Probing the Ground State Structure of the Green Fluorescent Protein Chromophore Using Raman Spectroscopy. *Biochem.*, **2000**, 39, 4423-4431.
- ¹⁸⁴ Didier P., Guidoni L., Schwalbach G., Bourotte M., Follenius-Wund A., Pigault C., Bigot J.-Y.. Ultrafast gain dynamics of the green fluorescent protein. *Chemical Physics Letters*, **2002**, 364, 503-510
- ¹⁸⁵ Follenius-Wund A., Bourotte M., Schmitt M., Iyice F., Lamy H., Bourguignon J. J., Haiech J., Pigault C. Fluorescent derivatives of the GFP chromophore give a new insight into the GFP fluorescence process. *Biophys. J.*, **2003**, 85, 1839-1850.
- ¹⁸⁶ Bourotte M., Schmitt M., Follenius-Wund A., Pigault C., Haiech J., Bourguignon J. J. Fluorophores related to the Green Fluorescent Protein. *Tet. Lett.*, soumis

Conclusion générale

L'ambition de ce travail de thèse était placée dans un triple objectif : physico-chimique, chimique et pharmacochimique.

Sur le plan pharmacochimique, à partir d'un composé chef de file issu d'un criblage systématique de chimiothèques avec l'"Histidin-containing Protein" (HPr) kinase/phosphatase, nous avons entrepris une phase d'optimisation structurale d'un bis-cation dérivé de benzimidazole. Bien que tous les composés synthétisés n'aient pas présenté une activité inhibitrice supérieure au composé bis-cationique de départ, l'étude des relations structure-activité que nous avons menée a permis de déterminer les requis structuraux nécessaires à l'obtention d'un inhibiteur d'HPrK/P. De plus la découverte d'un activateur donne quelques informations sur le mode d'action de cette famille d'inhibiteurs non compétitifs de l'ATP. Une étude plus approfondie de la liaison de cet activateur avec l'HPrK/P pourrait mettre en évidence une interaction possible des cations au niveau de l'association des monomères régulant l'activité kinase (trimère) et phosphatase (hexamère) de l'enzyme.

En ce qui concerne les cations dérivés des aminopyridazines, peu de résultats biologiques ont été obtenus. Cependant l'importance de la tête cationique aminopyridazine pontée pour l'inhibition de la "Calmodulin-dependant protein kinase II" CaMKII a été mise en évidence. Une évaluation de nos composés vis à vis de la MLCK permettrait peut-être de découvrir de nouveaux inhibiteurs pour cette kinase.

De manière plus générale, les composés symétriques ou dissymétriques de type bis-cations et présents dans notre chimiothèque ont été aussi identifiés comme hits sur des cibles variées (RCPG muscariniques et NK', récepteur nicotinique, enzymes (AChE), apamine) et des essais cellulaires. Ce grand manque de sélectivité des bis-cations restreint malheureusement leur intérêt comme agents thérapeutiques intéressants par leur toxicité potentielle. Il en demeure pas moins vrai qu'ils constituent des outils pharmacologiques efficaces pour mieux comprendre le rôle physiologique de cibles originales, lorsque aucun ligand agissant sur ces cibles n'est connu.

D'un point de vue synthétique, nous avons abordé des problèmes de chimie principalement hétérocyclique. Dans la série hétérocyclique des 3-aminopyridazines, très

étudiée au laboratoire, nous avons mis au point une nouvelle méthode efficace, en faisant appel aux réactions de couplage catalysées par le palladium, afin d'introduire rapidement de la diversité en position 4 des 3-aminopyridazines à partir des dérivés 4-bromo correspondants. Dans la série des 2-aryl-4-arylidène imidazolin-5-ones, les méthodes décrites dans la littérature n'étant pas très efficaces, nous avons mis au point une nouvelle voie d'accès pour ce type de composés. A partir d'un synthon (2-méthylthioimidazolin-5-one) nous avons introduit différents groupements aromatiques et hétéroaromatiques par des réactions pallado-catalysées.

Enfin, nous avons également réussi à obtenir des résultats prometteurs dans le domaine de la fluorescence. Dans le cadre de ce projet, nous avons synthétisé et étudié les propriétés photophysiques de plusieurs familles hétérocycliques dérivées du chromophore de la Green Fluorescent Protein (GFP). Certains de ces composés pourraient servir de point de départ pour la conception de marqueurs hydrophobes fluorescents de matériel biologique apportant des renseignements précieux sur les propriétés membranaires des cellules ou encore sur le microenvironnement à l'intérieur des poches protéiques hydrophobes.

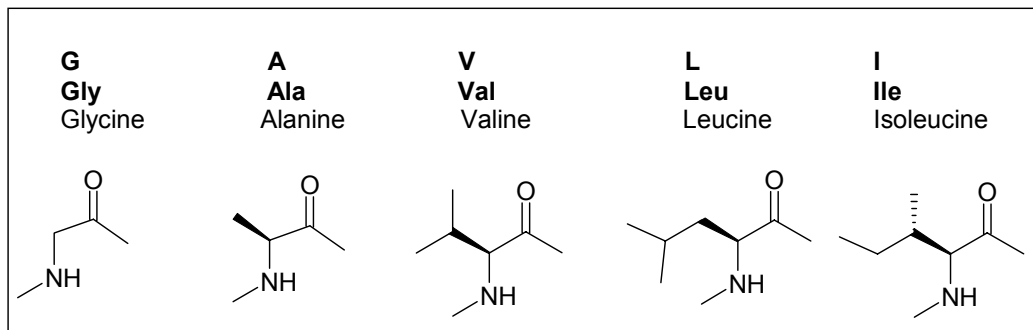
Ces dérivés de la GFP pourraient également être utilisés comme fluorophores liés à des ligands, dans les études d'interactions ligands-récepteurs (ou enzymes) utilisant le transfert d'énergie de fluorescence (FRET) entre des ligands fluorescents et des récepteurs ou enzymes rendus fluorescents par fusion avec la GFP.

Annexes

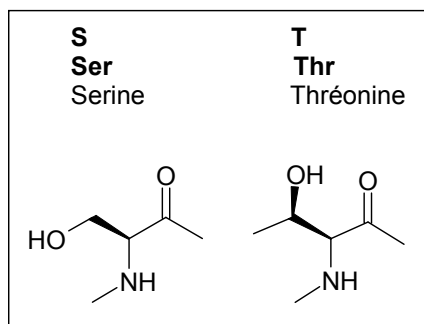
ANNEXE 1 : les acides aminés naturels

Les structure, symbole en une lettre, abréviation en trois lettres et nom complet des 20 acides aminés sont donnés:

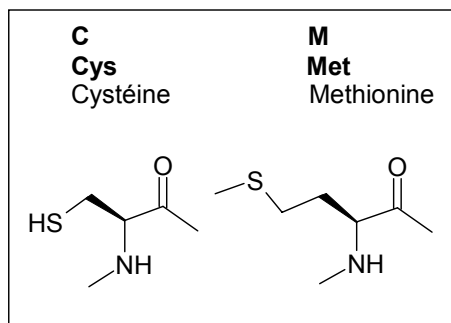
↳ Acides aminés à chaîne aliphatique :



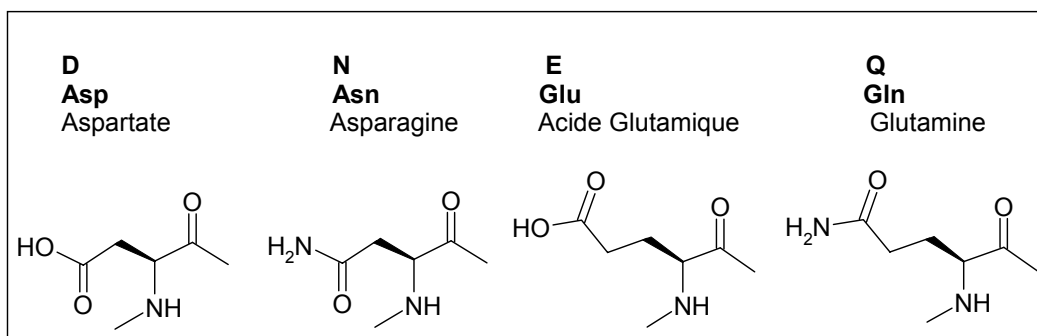
↳ Acides aminés à chaîne hydroxylée :



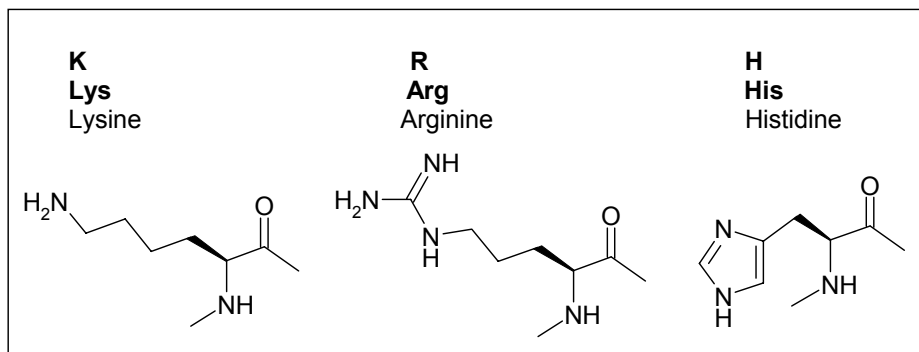
↳ Acides aminés à chaîne soufrée :



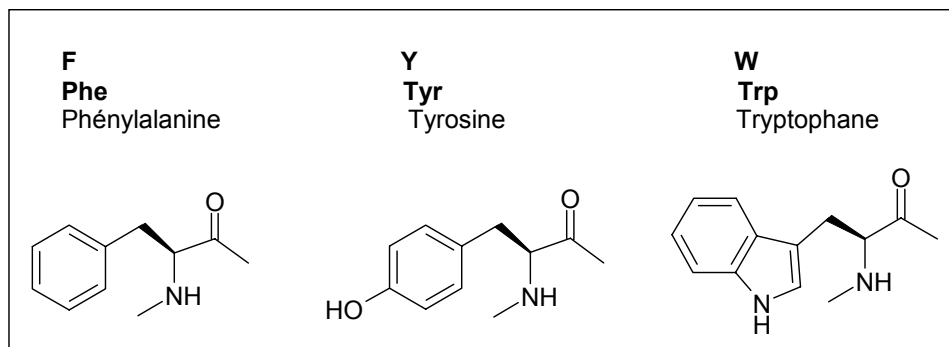
↳ Acides aminés à chaîne carboxylée ou amide :



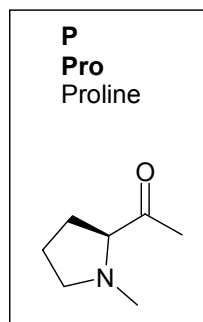
↳ Acides aminés à chaîne aminée :



↳ Acides aminés à chaîne aromatique :



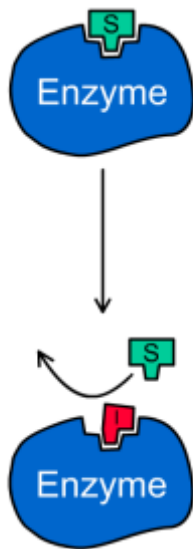
↳ Acide aminé cyclique :



ANNEXE 2 : Les Inhibiteurs

Un **inhibiteur** est une substance qui diminue la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme. En se liant sur une enzyme, un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif, ou provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive. L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition K_i , qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés. Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que le K_i est petit. Cette constante d'inhibition, exprimée en mole par litre correspond aussi à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

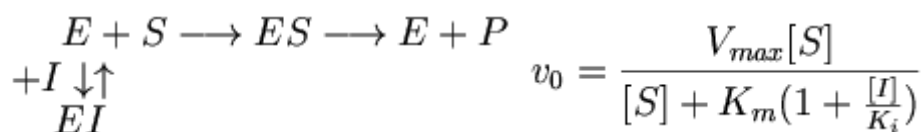
Inhibiteur compétitif



Un inhibiteur **compétitif** possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le *même* site enzymatique. La réaction enzymatique est bloquée, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformé par l'enzyme, soit parce que la position de groupement chimique sur l'inhibiteur rend impossible sa reconnaissance par le site actif.

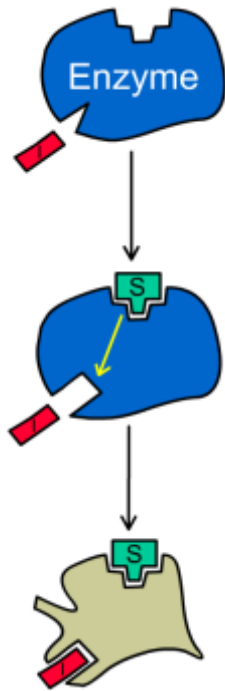
Certains inhibiteurs compétitifs ne sont pas des analogues du substrat, et leur mode d'action est différent. L'inhibiteur ne se fixe pas sur le site actif, mais sur un autre site de liaison de l'enzyme. La fixation de l'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site de liaison du substrat, empêchant la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Inversement, la liaison du substrat sur l'enzyme empêche la fixation de l'inhibiteur : ces deux molécules s'excluent mutuellement.

Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition compétitive



Par rapport à l'équation classique de Michaelis-Menten, la vitesse maximale de la réaction reste inchangée, mais l'affinité de l'enzyme pour le substrat diminue car ce dernier ne peut pas se lier au complexe enzyme-inhibiteur. Dans le cas d'une inhibition compétitive, il est possible de lever l'inhibition en saturant l'enzyme en substrat.

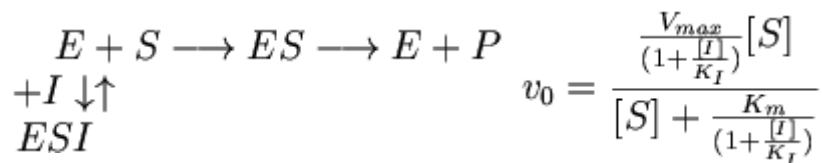
Inhibiteur incompétitif



Un inhibiteur **incompétitif** ne se lie sur l'enzyme qu'après fixation du substrat et empêche la formation des produits. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.

Comme son nom l'indique, un inhibiteur incompétitif n'entre pas en compétition avec un substrats sur *son* site de fixation. En revanche, dans les réactions enzymatiques à plusieurs substrats, les inhibiteurs incompétitifs peuvent se fixer sur le site de liaison d'un des substrats.

Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition incompétitive :

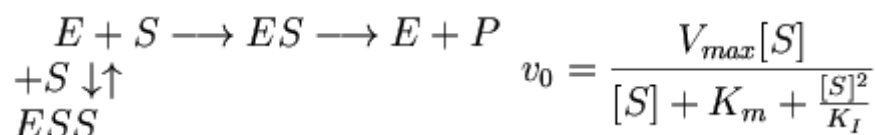


La vitesse maximale de la réaction diminue, mais l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat augmente. En effet, la formation du complexe enzyme-substrat-inhibiteur diminue le nombre de complexes ES et, d'après la Loi d'action de masse, favorise la liaisons du substrat sur l'enzyme. Les effets d'un inhibiteur incompétitif ne se manifestent pas pour de faibles concentrations en substrat, l'enzyme étant majoritairement sous forme libre. Ainsi, ce type d'inhibition ne peut pas être levé en augmentant la concentration du substrat.

Inhibition par le substrat

L'inhibition par le **substrat** est un cas particulier de l'inhibition incompétitive où deux molécules de substrat peuvent se lier à l'enzyme, mais ne peuvent pas être transformées en produit.

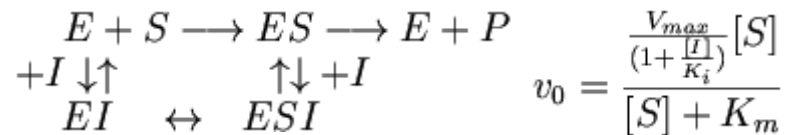
Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition par le substrat :



Inhibiteur non compétitif

Un inhibiteur **non compétitif** peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat.

Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition non compétitive :



La fixation d'un inhibiteur non compétitif diminue la vitesse maximale de la réaction, mais ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour le substrat, car ce dernier se lie aussi bien à l'enzyme libre qu'au complexe EI.

Une inhibition non compétitive ne peut pas être levée par une augmentation de la concentration en substrat, puisque l'inhibiteur se lie aussi bien sur l'enzyme libre que sur le complexe ES.

ANNEXE 3 : Définitions

CI₅₀ ou IC₅₀ : concentration inhibitrice 50, concentration en compétiteur froid qui déplace 50 % de la liaison spécifique en ligand radiomarqué.

Equation de Cheng et Prusoff :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{(L)}{K_d}}$$

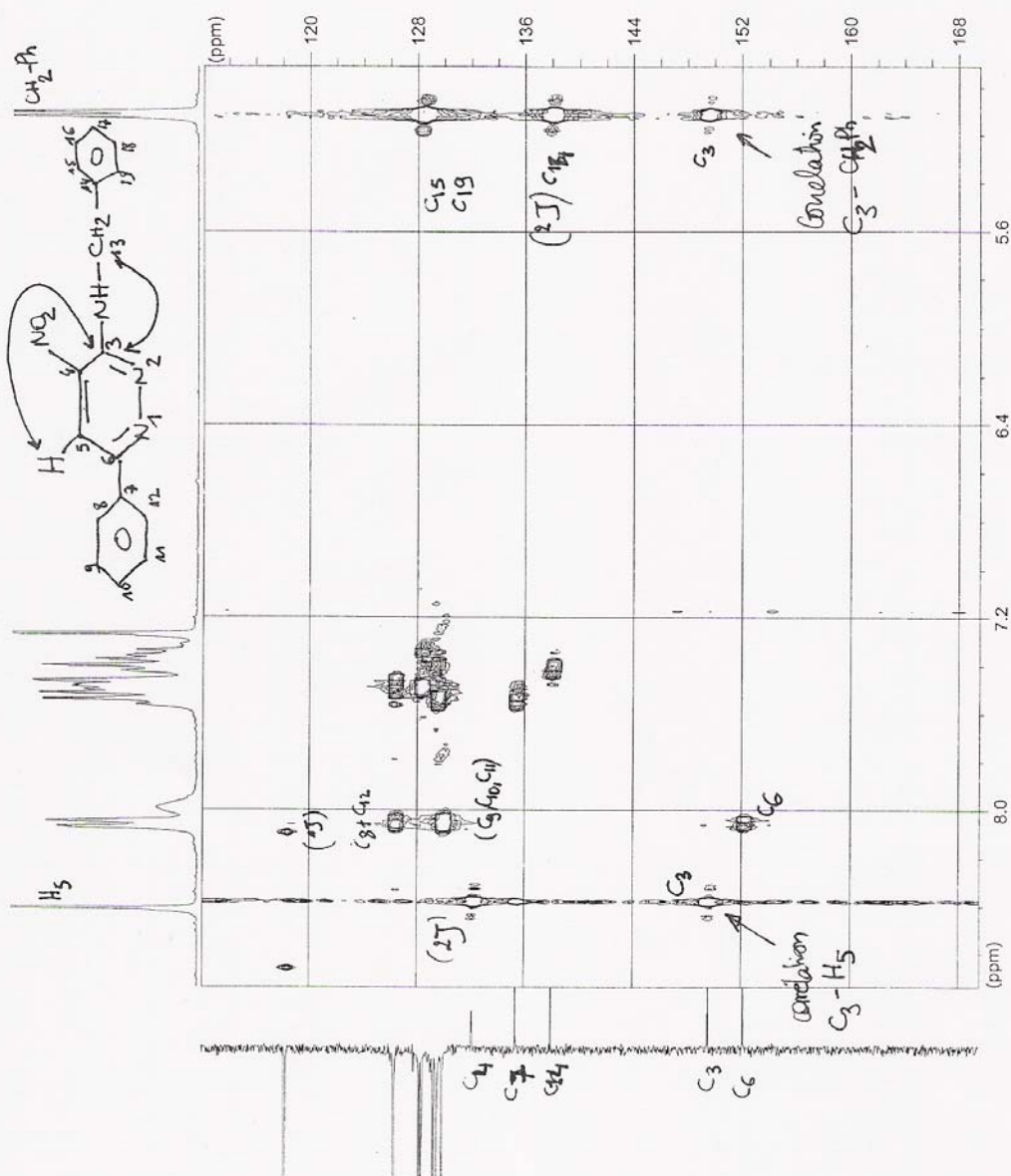
Cheng et Prusoff ont déterminé en 1973 la relation qu'il existe entre le K_d, le K_i et l'IC₅₀ (Cheng Y. and WH. Prusoff. *Biochem. Pharmacol.*, **1973**, 22, 3099-3108).

- K_i = constante de dissociation à l'équilibre pour le compétiteur froid.
- K_d = constante de dissociation à l'équilibre pour le ligand radiomarqué (affinité).
- [L] = [L*] = concentration de radioligand libre.

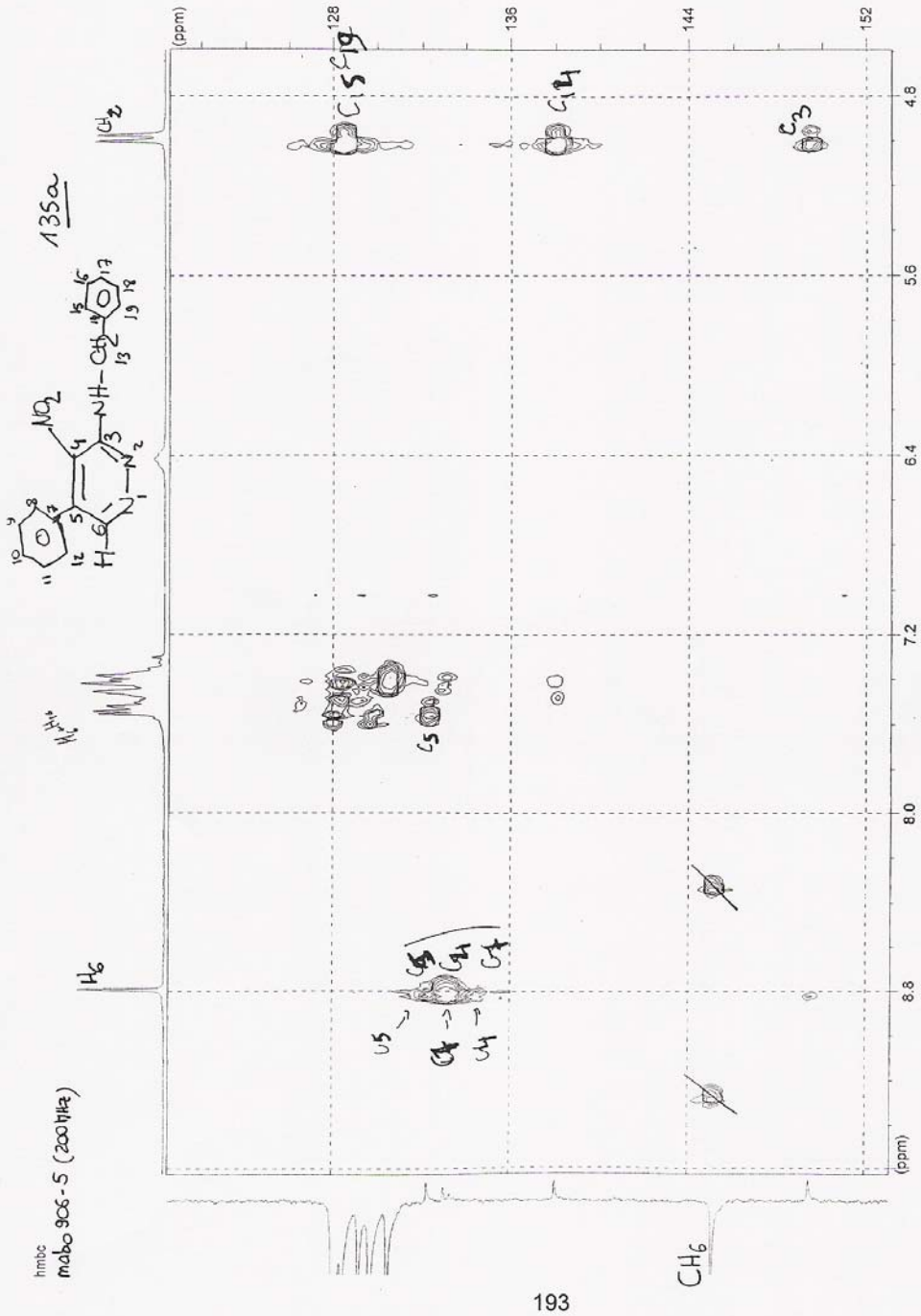
CE₅₀ ou EC₅₀ : concentration efficace 50, concentration de ligand nécessaire pour obtenir la moitié de la réponse maximale

ANNEXE 4 : RMN 2D composé 134a

134a



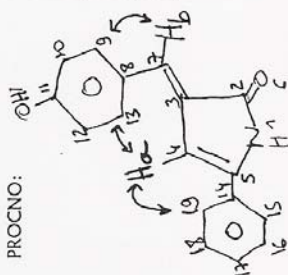
ANNEXE 5 : RMN 2D composé 135a



ANNEXE 6 : RMN 2D composé 186c

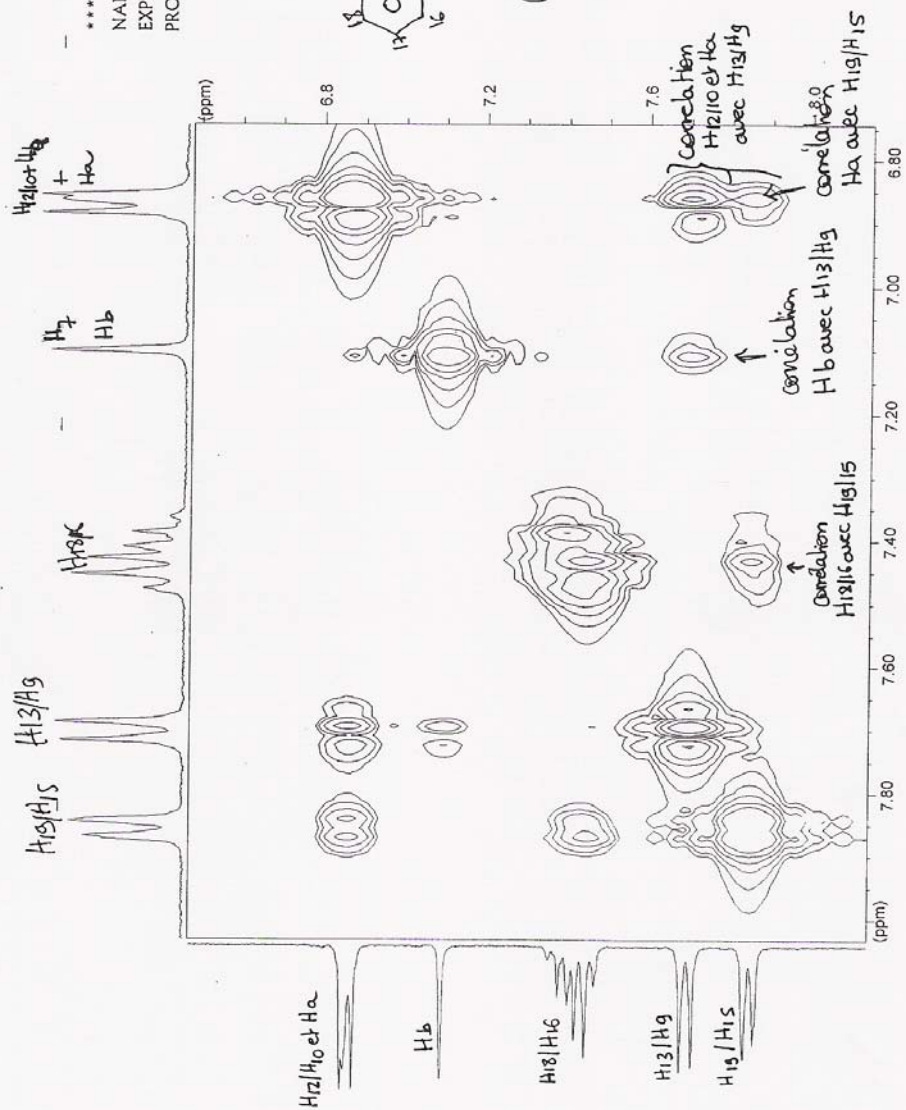


*** Current Data Parameters
NAME : mabo451
EXPNO : 3
PROCNO :

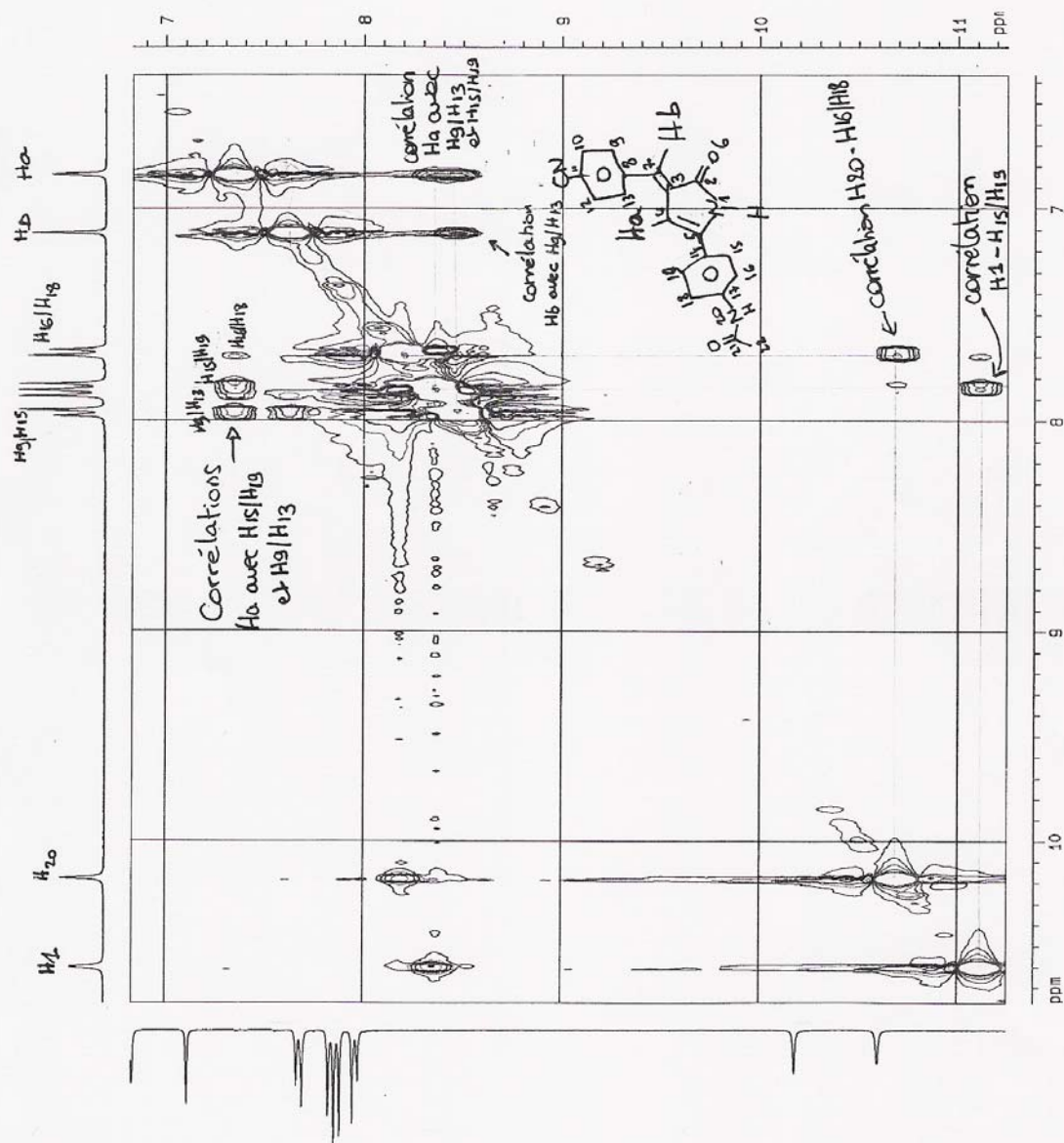


186c

NOESY



ANNEXE 7 : RMN 2D composé 186h



Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été effectuées en utilisant des feuilles d'aluminium CCM (gel de silice 60 F₂₅₄) MERCK. Les révélations ont été effectuées à l'UV et au cérium.

Les chromatographies d'élution sur colonnes ont été effectuées en utilisant de la silice Kieselgel 60 (230-400 mesh).

Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil Mettler FP62 et ne sont pas corrigés.

Les spectres RMN du proton et du carbone ont été enregistrés soit sur un appareil Bruker AC 200 à 200 MHz ou DPX-300-Avance à 300 MHz à température ambiante. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, et les constantes de couplage (J) en Hz. Les abréviations s, d, t, q et m sont relatives à des singulets, des doublets, des triplets, des quadruplés et des multiplets respectivement. L'abréviation éch. signifie échangeable.

Les spectres de masse (MS) ont été réalisés en mode électrospray sur un spectromètre Perseptive-Biosystem Mariner. Seules les masses (m/z) des pics moléculaires sont rapportées.

Les chromatographies liquides hautes performances (HPLC) ont été réalisées sur un système Gilson avec détecteur UV réglé à 220 nm.: colonne Eclipse XDB-C18. Les composés ont été dissous dans le MeOH ou un mélange MeOH/H₂O (6:4) et injecté dans une boucle de 50 µL. Les systèmes d'élution utilisés sont les suivants : A (H₂O/AcOH, 100:0,1) et B (MeOH). Les temps de rétention HPLC (HPLC t_r) ont été obtenus, à un débit de 0,5 mL/min, en utilisant les 3 conditions suivantes : I : gradient de 0% à 70% de B pendant 20 min, puis jusqu'à 100% pendant les 4 min suivantes et B reste à 100% pendant 10 min. II : gradient de 30% à 100% de B pendant 20 min puis B reste à 100% pendant 12 min. III : gradient de 20% à 100% de B pendant 30 min puis B reste à 100% pendant 10 min.

L'HPLC semi-préparative a été réalisée sur un système Dionex avec détecteur UV réglé à 254 nm. Les composés ont été dissous dans un mélange MeOH/H₂O (6:4) et injecté dans une boucle de 200 µL et ont été purifiés sur une colonne C18 Dionex 218 TPTM. Les systèmes d'élution utilisés sont les suivants : A (H₂O/TFA, 100:0,1) et B (MeOH). L'HPLC a été réalisée à un débit de 11,4 mL/min, en utilisant un gradient de 98:2 à 0:100 de A:B pendant 42 min.

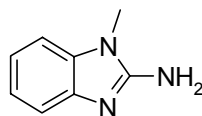
Les réactions faites sous irradiations micro-ondes ont été réalisées dans un appareil NORMATRON[®] 112 (référence 41500, NORMALAB ANALYSIS S.A.).

Partie expérimentale :

Chapitre II

Mode opératoire général pour l'alkylation du 2-aminobenzimidazole :

A une solution de 0,85g de KOH (18 mmoles, 1,8 éq.) dans 15 mL de solvant, sont ajoutés 1,33g de 2-aminobenzimidazole (10 mmoles, 1 éq.) puis 12 mmoles d'agent alkylant préalablement dissout ou dilué dans 10mL de solvant. Le mélange est agité à T.A. pendant 5h. Après évaporation du solvant, 30 mL d'eau sont ajoutés et le produit est extrait avec 30 mL de CH₂Cl₂. Après séchage sur Na₂SO₄, filtration et évaporation de la phase organique, le solide obtenu est trituré dans l'éther puis filtré.

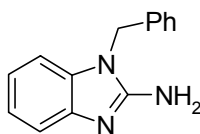
2-amino-1-méthyl-1H-benzimidazole 75a

C₈H₉N₃
 147,18 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rf (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%) : 0,19
 Rdt : 55 %
 PF = 197-201°C

Solvant : acétone, agent alkylant : CH₃I.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,49 (s, 3H, CH₃) ; 6,40 (s large, 2H, NH₂ éch.) ; 6,8-7,0 (m, 2H, ArH) ; 7,0-7,2 (m, 2H, ArH).

2-amino-1-benzyl-1H-benzimidazole 75b

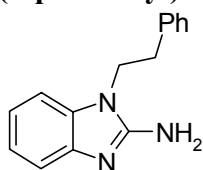
C₁₄H₁₃N₃
 223,28 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rf (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%) : 0,30
 Rdt : 65 %
 PF = 187-195°C

Solvant : EtOH, agent alkylant : BrBn.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 5,27 (s, 2H, CH₂) ; 6,55 (s large, 2H, NH₂ éch.) ; 6,8-7,4 (m, 9H, ArH).

2-amino-1-(2-phényéthyl)-1H-benzimidazole 75c

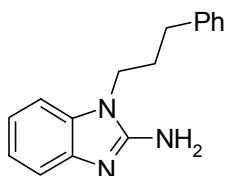


$C_{15}H_{15}N_3$
 237,31 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rf (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%) : 0,30
 Rdt : 40 %

Solvant : EtOH, agent alkylant : Br(CH₂)₂Ph.

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :
 δ 3,07 (t, J = 7,1, 2H, CH₂) ; 3,07 (t, J = 7,1, 2H, CH₂) ; 6,9-7,4 (m, 9H, ArH).

2-amino-1-(3-phénylpropyl)-1H-benzimidazole 75d

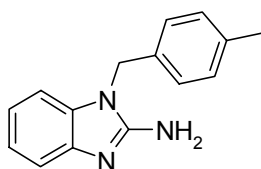


$C_{16}H_{17}N_3$
 251,33 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rdt : 37 %

Solvant : DMF/K₂CO₃, agent alkylant : Br(CH₂)₃Ph.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 2,07 (m, 2H, CH₂) ; 2,68 (t, J = 7,5, 2H, CH₂Ph) ; 4,03 (t, J = 7,3, 2H, NCH₂) ; 6,9-7,4 (m, 9H, ArH).

2-amino-1-(4-méthylbenzyl)-1H-benzimidazole 75e

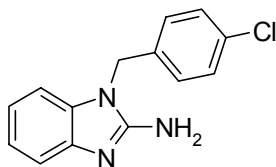


$C_{15}H_{15}N_3$
 237,31 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rdt : 58 %
 PF = 169-171°C

Solvant : EtOH, agent alkylant : 4-MePhCH₂Br.

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :
 δ 2,31 (s, 3H, CH₃) ; 5,22 (s, 2H, CH₂) ; 6,9-7,4 (m, 9H, ArH).

2-amino-1-(4-chlorobenzyl)-1H-benzimidazole 75f

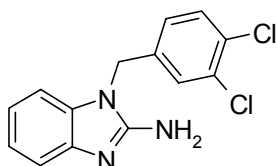


$C_{14}H_{12}ClN_3$
 257,72 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rdt : 60 %
 PF = 185-187°C

Solvant : EtOH, agent alkylant : 4-ClPhCH₂Br.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :
 δ 4,39 (s large, 2H, NH₂ éch.) ; 5,13 (s, 2H, CH₂) ; 7,0-7,5 (m, 8H, ArH).

2-amino-1-(3,4-dichlorobenzyl)-benzimidazole 75g

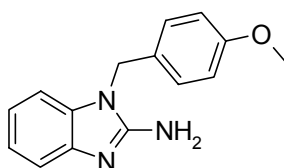


$C_{14}H_{11}Cl_2N_3$
 292,17 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rdt : 55 %

Solvant : EtOH, agent alkylant : 3,4-Cl₂PhCH₂Br.

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :
 δ 5,29 (s, 2H, CH₂) ; 6,9-7,1 (m, 4H, ArH) ; 7,2-7,4 (m, 2H, ArH) ; 7,5-7,6 (m, 1H, ArH).

2-amino-1-(4-méthoxybenzyl)-1H-benzimidazole 75h



$C_{15}H_{15}N_3O$
 253,31 g.mol⁻¹
 solide écru
 Rdt : 51 %

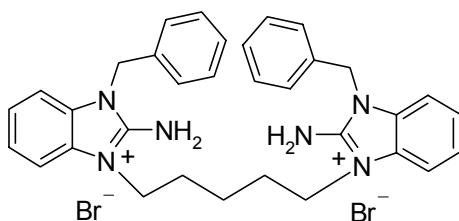
Solvant : EtOH, agent alkylant : 4-OMePhCH₂Br.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 3,71 (s, 3H, OCH₃) ; 5,18 (s, 2H, CH₂) ; 6,52 (s large, 2H, NH₂ éch.) ; 6,8-6,95 (m, 4H, ArH) ; 7,0-7,25 (m, 4H, ArH).

Méthode générale pour la préparation des bis-cations **76a-c** :

A une solution de benzimidazole (3 mmol) dans la 2-butanone (100 mL) sont ajoutés 1.5 mmoles de dibromoalkanes. Le mélange est ensuite chauffé à 80°C pendant 4 jours. Après refroidissement, le précipité formé est filtré puis lavé avec de la 2-butanone (2x30 mL) puis purifié par chromatographie sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%). Les dibromures **76a-c** sont ensuite recristallisés dans l'isopropanol.

Dibromure de N,N'-Bis (2-amino-1-benzylbenzimidazol-3-yl)-1,5-pentane **76a**



C₃₃H₃₆Br₂N₆

676,50 g.mol⁻¹

solide blanc

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%) : 0,2

Rdt : 71 %

PF = 299-301°C

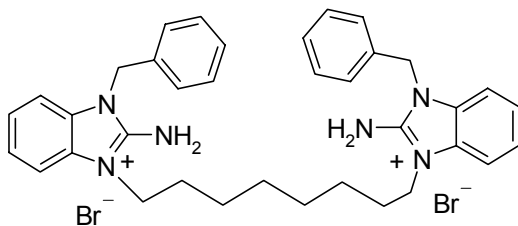
Le composé **76a** a été préparé à partir de 2-amino-1-benzylbenzimidazole **75b** et de 1,5-dibromopentane.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,51 (m, 2H, CH₂); 1,80 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 4,23 (t, 4H, J = 7,1, 2 CH₂N); 5,51 (s, 4H, 2 CH₂Ph); 7,52 (m, 18H, ArH); 9,03 (s large, 4H, NH₂ éch.).

Microanalyse : calculée C% 58,59 H% 5,36 N% 12,42
 trouvée C% 58,95 H% 5,02 N% 12,62

Dibromure de N,N'-Bis (2-amino-1-benzylbenzimidazol-3-yl)-1,8-octane 76b



$C_{36}H_{42}Br_2N_6$
 718,58 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rf (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%) : 0,2
 Rdt : 72 %
 PF = 302°C (décomp.)

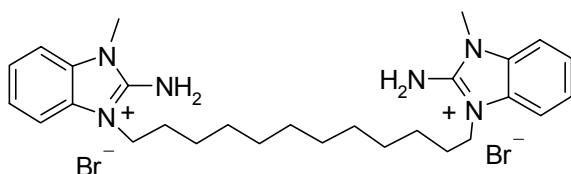
Le composé **76a** a été préparé à partir de 2-amino-1-benzylbenzimidazole **75b** et de 1,8-dibromooctane.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO)

δ 1,28 (m, 9H, 3 CH₂), 1,69 (m, 4H, 2 CH₂); 4,16 (t, 4H, J = 7,2, 2 CH₂N); 5,51 (s, 4H, 2 CH₂Ph); 7,33 (m, 18H, ArH); 8,92 (s large, 4H, NH₂ éch.).

Microanalyse : calculée C% 60,17 H% 5,89 N% 11,69
 trouvée C% 59,91 H% 5,80 N% 11,96

Dibromure de N,N'-Bis (2-amino-1-méthylbenzimidazol-3-yl)-1, 12-dodecane 76c



$C_{28}H_{42}Br_2N_6$
 622,49 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rf (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9/1/1%) : 0,3
 Rdt : 50 %
 PF = 181-183°C

Le composé **76c** a été préparé à partir de N-méthyl-2-aminobenzimidazole **75a** et de 1,12-dibromododécane.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO)

δ 1,28 (m, 9H, 3 CH_2), 1,69 (m, 4H, 2 CH_2); 4,16 (t, 4H, $J = 7,2$, 2 CH_2N); 5,51 (s, 4H, 2 CH_2Ph); 7,33 (m, 18H, ArH); 8,92 (s large, 4H, NH_2 éch.).

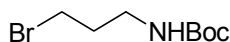
Microanalyse : calculée C% 54,03 H% 6,80 N% 13,50
 trouvée C% 54,33 H% 6,68 N% 13,63

Mode opératoire général 1. Protection par le groupement *tert*-butyloxycarbonyl :

A une solution de 2,67 mmoles d'amine dans 35 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés 37 µL de TEA (2,67 mmol, 1 éq). Le mélange est refroidit dans un bain de glace puis 582 mg de (Boc)₂O (2,67 mmol, 1 éq) dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés, goutte à goutte. La solution est ensuite agitée à température ambiante pendant une nuit. Après évaporation du CH₂Cl₂, le résidu obtenu est repris dans 20 mL d'eau + 40 mL d'AcOEt. Après extraction, la phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est séché sous vide.

Mode opératoire général 2. Bromation des alcools :

A une solution de 2,44 mmoles d'alcool dans 12 mL de THF sont ajoutés 639 mg de triphénylphosphine (2,44 mmoles, 1 éq). Une solution de 808 mg de CBr₄ (2,44 mmoles, 1 éq) dans 4 mL de CH₃CN est ensuite ajoutée goutte à goutte au mélange. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 jours puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/4).

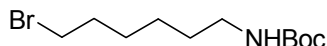
***tert*-butyl 3-bromopropylcarbamate 78**

C₈H₁₆BrNO₂
 238,13 g.mol⁻¹
 huile qui cristallise lentement
 Rdt : 75 %

Mode opératoire général 1. Le composé **78** a été préparé à partir du bromhydrate de la 3-bromopropylamine **77**. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/4).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

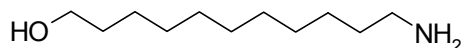
δ 1,37 (s, 9H, 3 CH₃) ; 1,85-1,95 (m, 2H, CH₂) ; 2,95-3,05 (m, 2H, CH₂N) ; 3,49 (t, J = 6,6, 2H, CH₂Br) ; 6,88 (s large, 1H, NH).

6-bromohexylcarbamate de *tert*-butyle 80

$C_{11}H_{25}BrNO_2$
 280,21 g.mol⁻¹
 huile qui cristallise lentement
 Rdt : 85 %

Mode opératoire général 2. Le composé **80** a été préparé à partir du 6-hydroxyhexylcarbamate de *tert*-butyle **79**.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 1,2-1,4 (m, 13H, 2 CH₂ + 3 CH₃) ; 1,6-1,7 (m, 4H, 2 CH₂) ; 3,0-3,1 (m, 2H, CH₂N) ;
 3,47 (t, J = 6,5, 2H, CH₂Br) ; 6,83 (s large, 1H, NH).

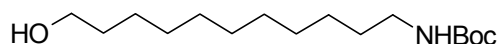
11-aminoundecan-1-ol 82

$C_{11}H_{25}NO$
 187,33 g.mol⁻¹
 solide beige
 Rdt : 60 %
 PF= 74-77 °C

A une solution de 2 g de chlorhydrate de 11-aminoundécanoate de méthyle (7,9 mmoles, 1 éq) dissous dans un minimum d'eau sont ajoutés 20 mL de CH₂Cl₂. La solution est refroidie à 0°C puis 7,9 mL de NaOH 1N (7,9 mmoles, 1 éq) y sont additionnés. Après saturation de la phase aqueuse avec K₂CO₃, la phase organique est extraite, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est séché sous vide. L'ester **81** est dissout dans 50 mL d'EtOH absolu. A la solution maintenue sous atmosphère inerte, sont additionnés, petit à petit, 28 g de sodium métallique (126 mmoles, 16 éq) de façon à maintenir un reflux. Après refroidissement, 25 mL d'eau sont ajoutés au milieu, l'EtOH est évaporé et la solution est extraite avec 2x25 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :
 δ 1,1-1,7 (m, 18H, 9 CH₂) ; 2,67 (t, J = 6,6, 2H, CH₂N) ; 3,62 (t, J = 6,4, 2H, CH₂OH).

11-hydroxyundecylcarbamate de *tert*-butyle 83



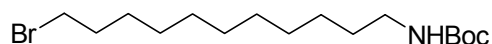
$C_{16}H_{33}NO_3$
 287,45 g.mol⁻¹
 huile jaune qui cristallise
 Rdt : 93 %

Mode opératoire général 1. Le composé **83** a été préparé à partir de l'amine **82**.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) :

δ 1,1-1,4 (m, 27H, 3 CH₃ + 9 CH₂) ; 3,02 (t, J = 6,8, 2H, CH₂N) ; 3,54 (t, J = 6,6, 2H, CH₂OH).

11-bromoundecylcarbamate de *tert*-butyle 84



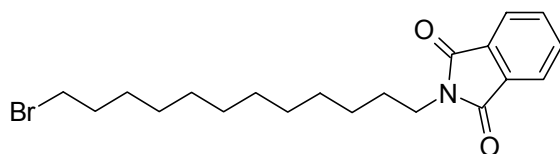
$C_{16}H_{32}BrNO_2$
 350,34 g.mol⁻¹
 huile jaune
 Rdt : 84 %

Mode opératoire général 2. Le composé **84** a été préparé à partir de l'alcool **83**.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,1-1,5 (m, 25H, 3 CH₃ + 8 CH₂) ; 1,71-1,82 (m, 2H, CH₂) ; 2,82-2,93 (m, 2H, CH₂N) ; 3,51 (t, J = 6,8, 2H, CH₂Br) ; 6,73 (s large, 1H, NH).

N-(12-bromododecyl)phtalimide 87



$C_{20}H_{28}BrNO_2$
 394,36 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 45 %

A une suspension de 2 g de 1,12-dibromododécane (6,1 mmoles, 2,6 éq) dans 5 mL de DMF sont ajoutés 376 mg de phtalimide de potassium (2,32 mmoles, 1 éq). La solution est chauffée à reflux pendant 1 heure. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/5).

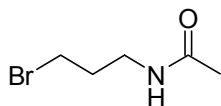
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,2-1,5 (m, 16H, 8 CH₂) ; 1,60-1,75 (m, 2H, CH₂) ; 1,8-2,0 (m, 2H, CH₂) ; 3,44 (t, J = 6,8, 2H, CH₂Br) ; 3,71 (t, J = 6,8, 2H, CH₂N) ; 7,7-7,8 (m, 2H, ArH) ; 7,85-7,95 (m, 2H, ArH).

Préparation des amides **88** et **89** :

A une solution de 4g de bromhydrate de bromopropylamine **77** (18,2 mmoles, 1 équ) dans 20 mL d'eau refroidie à 0°C sont ajoutés en parallèle 18 mL de NaOH 2N (36,4 mmoles, 2 équ) et 9,1 mmoles de chlorure d'acyle (1 équ). Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau puis séché sous vide.

N-(3-bromopropyl)acetamide **88**



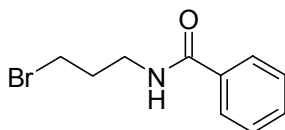
C₅H₁₀BrNO
180,05 g.mol⁻¹
huile jaune
Rdt : 10 %

Aucun précipité n'étant formé, le solvant est évaporé et le résidu est trituré dans l'AcOEt. Après filtration des sels, l'AcOEt est évaporé à sec et l'huile obtenue est séchée sous vide.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,9-2,1 (m, 5H, CH₃ + CH₂) ; 3,3-3,5 (m, 2H, CH₂N) ; 3,59 (t, J = 6,4, 2H, CH₂Br) ; 6,62 (s large, 1H, NH).

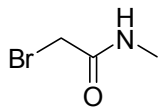
N-(3-bromopropyl)benzamide **89**



C₁₀H₁₂BrNO
242,12 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 90 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 2,1-2,3 (m, 2H, CH₂) ; 3,51 (t, J = 6,6, 2H, CH₂Br) ; 3,55-3,7 (m, 2H, CH₂N) ; 6,41 (s large, 1H, NH) ; 7,4-7,6 (m, 3H, ArH) ; 7,7-7,8 (m, 2H, ArH).

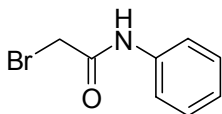
2-bromo-*N*-méthylacétamide 91

C_3H_6BrNO
 $151,99 \text{ g.mol}^{-1}$
 huile qui cristallise
 Rdt : 83 %

A une solution refroidie à 0°C de 4 g de chlorhydrate de méthylamine (59,2 mmoles, 1 éq) dans 45 mL de CH_2Cl_2 et 15 mL de NaOH 33 % sont ajoutés, goutte à goutte, 5,15 mL de bromure de bromacétyle **90** (59,2 mmoles, 1 éq) dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 . Le mélange est agité à T.A. pendant 1h30 et, après filtration des sels, la phase organique est extraite, séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est séché sous vide.

1H -RMN (200 MHz, $CDCl_3$) :

δ 2,90 (d, $J = 5$, 3H, $NHCH_3$) ; 3,92 (s, 2H, CH_2) ; 6,61 (s large, 1H, NH).

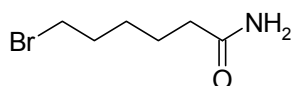
2-bromo-*N*-phénylacétamide 92

C_8H_8BrNO
 $214,06 \text{ g.mol}^{-1}$
 solide blanc
 Rdt : 35 %

Une solution de 2,16 mL de bromure de bromacétyle **90** (24,77 mmoles, 1 éq) et de 2,25 mL d'aniline dans 90 mL de benzène est chauffée à reflux pendant 5h. Après refroidissement le mélange est lavé avec de l'eau, une solution de $NaHCO_3$ saturée puis avec une solution d'HCl 1N. La phase organique est ensuite séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. Le résidu obtenu est séché sous vide.

1H -RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 4,05 (s, 2H, CH_2Br) ; 7,15-7,25 (m, 1H, ArH) ; 7,3-7,45 (m, 2H, ArH) ; 7,5-7,6 (m, 2H, ArH) ; 8,17 (s large, 1H, NH).

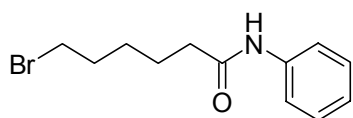
6-bromohexanamide 95

C₆H₁₂BrNO
 194,07 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 52 %

Un mélange de 1,53 mL de chlorure de 6-bromohexanoyl **93** (10 mmoles) et de 20 mL de CH₂Cl₂ refroidit dans un bain de glace, est saturé avec NH₃ gaz. Après 12 h à T.A. la solution est filtrée et le CH₂Cl₂ est évaporé. Le résidu obtenu est trituré avec de l'éther, filtré, trituré avec de l'AcOEt, filtré puis séché.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 1,48-1,56 (m, 2H, CH₂) ; 1,64-1,74 (m, 2H, CH₂) ; 1,85-1,95 (m, 2H, CH₂) ; 2,25 (t, J = 7,2, 2H, CH₂) ; 3,42 (t, J = 7,2, 2H, CH₂) ; 5,57 (s large, 2H, NH₂).

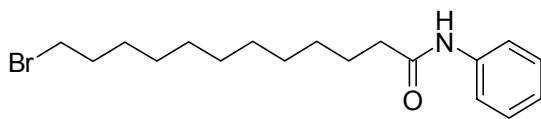
6-bromo-*N*-phénylhexanamide 96

C₁₂H₁₆BrNO
 270,17 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 40 %

Un mélange de 1,53 mL de chlorure de 6-bromohexanoyl **93** (10 mmoles, 1 éq), 0,912 mL d'aniline (10 mmoles, 1 éq) et de 40 mL de benzène est chauffé à 100°C pendant 12 h. Après refroidissement le mélange est lavé avec de l'eau, une solution de NaHCO₃ saturée puis avec une solution d'HCl 1N. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. Le résidu obtenu est trituré avec de l'éther, filtré puis séché sous vide.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,35-1,45 (m, 2H, CH₂) ; 1,50-1,65 (m, 2H, CH₂) ; 1,75-1,85 (m, 2H, CH₂) ; 2,30 (t, J = 7,2, 2H, CH₂) ; 3,53 (t, J = 6,8, 2H, CH₂) ; 7,2-7,35 (m, 3 H, ArH) ; 7,58 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 9,85 (s large, 1H, NH).

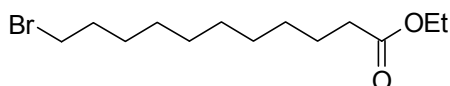
12-bromo-*N*-phényldodécanamide 97

$C_{18}H_{28}BrNO$
 354,33 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 50 %

Une solution de 0,5 g d'acide 12-bromododécanoïque (1,8 mmol, 1 éq) dans 2 mL de SOCl₂ (18 mmol, 10 éq) est chauffée à reflux pendant 2 h. Après évaporation du chlorure de thionyle, l'huile jaune obtenue est séchée sous vide pendant 48 h. Le chlorure d'acide **94** obtenu est dissout dans 10 mL de CH₂Cl₂ puis 0,16 mL d'aniline (1,8 mmol, 1 éq) sont ajoutés. Après 12 h à reflux la solution est filtrée et le CH₂Cl₂ est évaporé. Le résidu obtenu est trituré avec de l'éther, filtré, puis séché.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,2-1,45 (m, 14H, 7 CH₂) ; 1,48-1,65 (m, 2H, CH₂) ; 1,70-1,92 (m, 2H, CH₂) ; 2,31 (t, J = 7,1, 2H, CH₂) ; 3,50 (t, J = 6,4, 2H, CH₂) ; 7,2-7,4 (m, 3 H, ArH) ; 7,60 (d, J = 7,8, 2H, ArH) ; 9,85 (s large, 1H, NH).

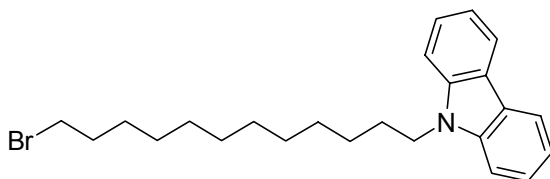
11-bromoundécanoate d'éthyle 98

$C_{13}H_{25}BrO_2$
 293,25 g.mol⁻¹
 huile jaune
 Rdt : 50 %

A une solution de 1 g d'acide 11-bromoundécanoïque (3,77 mmol, 1 éq) dans 30 mL d'EtOH sont ajoutés 0,95 mL d'une solution d'HCl 4N (3,77 mmol, 1 éq). La solution est chauffée à 80°C pendant 48 h puis évaporée à sec. Le résidu est repris dans 30 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec une solution saturée de Na₂CO₃, extraite, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. L'huile obtenue est séchée sous vide.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 1,15-1,48 (m, 15H, 6 CH₂ + CH₃) ; 1,50-1,68 (m, 2H, CH₂) ; 1,70-1,85 (m, 2H, CH₂) ; 2,30 (t, J = 7,5, 2H, CH₂) ; 3,55 (t, J = 6,8, 2H, CH₂) ; 4,14 (q, J = 7,2, 2H, CH₂CH₃).

9-(12-bromododecyl)-9H-carbazole 99

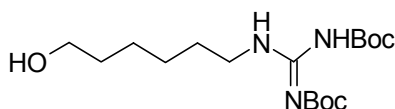
$C_{24}H_{32}BrN$
 414,43 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 30 %

A un mélange de 80 mg de bromure de tétrabutylammonium (0,25 mmoles, 0,042 éq) et de 3 mL d'une solution aqueuse de NaOH à 50% est additionnée une solution de 1 g de carbazole (6 mmoles, 1 éq) et de 5,9 g de dibromododécane (18 mmoles, 3 éq) dans 3 mL de benzène. Le mélange est agité à T.A. pendant 12 h, précipité dans l'eau puis extrait avec 3x25 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 25 mL d'eau, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : CH₂Cl₂/hexane 1/5).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,1-1,6 (m, 16H, 8 CH₂) ; 1,8-2,1 (m, 4H, 2 CH₂) ; 3,47 (t, J = 6,8, 2H, CH₂Br) ; 4,36 (t, J = 7,1, 2H, CH₂N) ; 7,2-7,35 (m, 2H, ArH) ; 7,4-7,6 (m, 4H, ArH) ; 8,18 (d, J = 7,6, 2H, ArH).

ESMS m/z : 414 (M+H, ⁷⁹Br), 416 (M+H, ⁸¹Br).

***N*-(6-hydroxyhexyl)-*N'*, *N''*-di-*tert*-butyloxycarbonylguanidine 102**

$C_{17}H_{33}N_3O_5$
 359,47 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 90 %

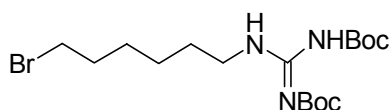
A une solution de 0,3 g de 6-aminohexanol **100** (2,56 mmoles, 1 éq) et de 355 μL de triéthylamine (2,56 mmoles, 1 éq) dans 3 mL de DMF est ajoutée une solution de 0,74 g de *N*,*N'*-di-*tert*-butyloxycarbonyl S-méthylthiourée **101** dans 5 mL de DMF. La solution est agitée à T.A. pendant 12 heures, puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est repris dans

20 mL d'eau et extrait avec 2x20 mL d'éther. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 1,3-1,8 (m, 26H, 4 CH₂ + 6 CH₃) ; 3,3-3,5 (m, 2H, CH₂N) ; 3,65 (t, J = 6,3, 2H, CH₂OH) ; 8,31 (s large, 1H, NH) ; 11,50 (s large, 1H, NHBoc).

***N*-(6-bromohexyl)-*N'*, *N''*-di-*tert*-butyloxycarbonylguanidine 103**



C₁₇H₃₂N₃O₄
 422,37 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 60 %

Mode opératoire général 2. La chaîne **103** a été préparée à partir du composé **102**.

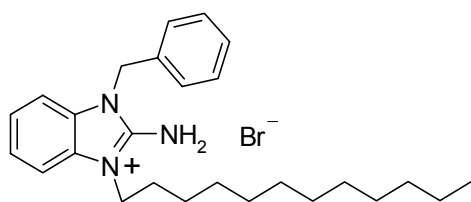
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 1,3-1,8 (m, 24H, 3 CH₂ + 6 CH₃) ; 1,8-2,0 (m, 2H, CH₂) ; 3,3-3,6 (m, 4H, CH₂N + CH₂Br) ; 8,32 (s large, 1H, NH) ; 11,51 (s large, 1H, NHBoc).

Méthode générale pour la préparation des mono-cations :

A une solution de 4 mmoles (1 éq) de 2-aminobenzimidazole **75b-h** dans 100 mL de 2-butanone sont ajoutées 6 mmoles (1,5 éq) de bromoalkane. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 48 heures. Après refroidissement, le précipité formé est filtré et lavé 2 fois avec de la 2-butanone (2x 30 mL) puis avec de l'éther (30 mL) pour donner une poudre blanche.

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-dodecyl-1H-3,1-benzimidazole 104b



$C_{26}H_{38}BrN_3$
 472,51 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 67 %
 PF = 232-234°C

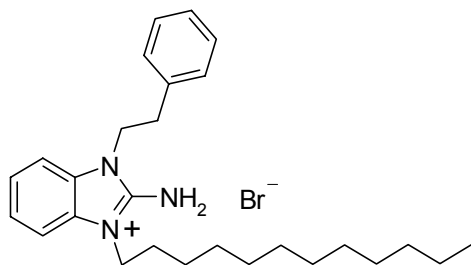
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 0,85 (t, 3H, J = 7, CH₃) ; 1,22 (m, 18H, 9 CH₂) ; 1,71 (m, 2H, CH₂) ; 4,19 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N) ; 5,47 (s, 2H, CH₂Ph) ; 7,2-7,5 (m, 8H, ArH) ; 7,63 (d, 1H, J = 7,5, ArH) ; 8,91 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 96,03%, t_r 27,49 min; HPLC (II) P_{HPLC} 98,21%, t_r 21,29 min

ESMS m/z : 392 (M⁺-Br)

Bromure de 2-amino-3-dodécyl-1-(2-phényléthyl)-1H-3,1-benzimidazole 104c



$C_{27}H_{40}BrN_3$
 486,54 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 60 %
 PF = 269-271°C

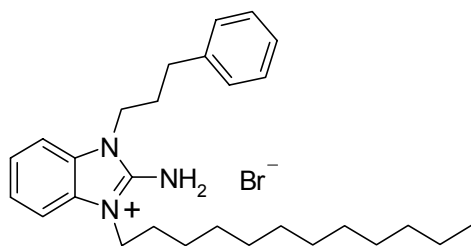
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 0,86 (t, 3H, J = 7, CH₃) ; 1,26 (m, 18H, 9 CH₂) ; 1,34 (m, 2H, CH₂) ; 3,03 (t, 3H, J = 7, -CH₂Ph) ; 4,15 (t, 3H, J = 7, NCH₂CH₂Ph) ; 4,46 (t, 2H, J = 7, CH₂N) ; 7,1-7,7 (m, 9H, ArH) ; 8,73 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 90,01%, t_r 23,60 min; HPLC (II) P_{HPLC} 94,08%, t_r 21,64 min

ESMS m/z : 406 (M⁺-Br)

Bromure de 2-amino-3-dodécyl-1-(3-phénylpropyl)-1H-3,1-benzimidazole 104d



$C_{28}H_{42}BrN_3$
 500,57 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 78 %
 PF = 227-229°C

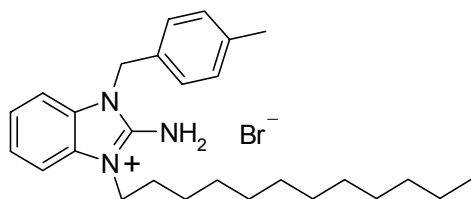
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 0,84 (t, 3H, J = 7, -CH₃); 1,21 (m, 18H, 9 -CH₂); 1,65 (m, 2H, -CH₂); 2,03 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂Ph); 2,68 (t, 2H, J = 7, NCH₂CH₂CH₂Ph); 4,15 (t, 3H, J = 7, NCH₂CH₂CH₂Ph); 4,25 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 7,1-7,4 (m, 7H, ArH); 7,58 (m, 2H, ArH); 8,81 (s large, 2H, NH₂)

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 28,15 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 22,38 min

ESMS m/z : 420 ($M^+ - \text{Br}$).

Bromure de 2-amino-3-dodécyl-1-(4-méthylbenzyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 104e



$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{BrN}_3$
 486,64 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 95 %
 PF = 242-244°C

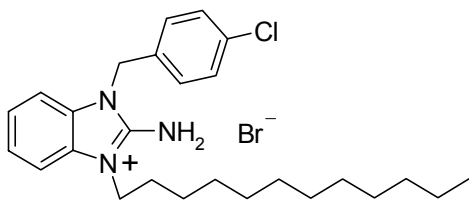
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 0,85 (m, 3H, CH_3); 1,22 (m, 18H, 9 CH_2); 1,70 (m, 2H, CH_2); 2,26 (s, 3H, CH_3); 4,18 (t, 2H, $J = 7$, CH_2N); 5,41 (s, 2H, CH_2Ph); 7,2-7,7 (m, 8H, ArH); 8,91 (s large, 2H, NH_2).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 24,06 min; HPLC (II) P_{HPLC} 95%, t_r 21,90 min

ESMS m/z : 406 ($M^+ - \text{Br}$).

Bromure de 2-amino-1-(4-chlorobenzyl)-3-dodécyl-1*H*-3,1-benzimidazole 104f



$C_{26}H_{37}ClBrN_3$
 506,96 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 71 %
 PF = 271-272°C

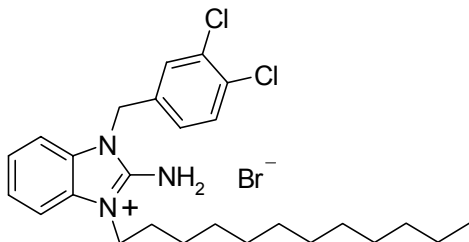
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 0,84 (m, 3H, CH₃); 1,21 (m, 18H, 9 CH₂); 1,70 (m, 2H, CH₂); 4,18 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,5 (m, 7H, ArH); 7,63 (d, 2H, J = 7,5, ArH); 8,92 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 27,84 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 21,99 min

ESMS m/z : 426 (³⁵Cl), 428 (³⁷Cl).

Bromure de 2-amino-1-(3,4-dichlorobenzyl)-3-dodécyl-1*H*-3,1-benzimidazole 104g



$C_{26}H_{36}Cl_2BrN_3$
 541,40 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 63 %
 Pf = 274-275°C

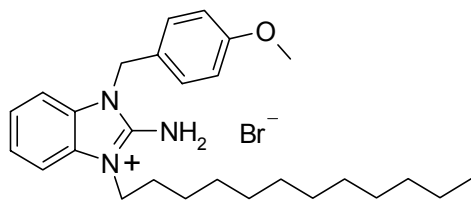
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 0,84 (t, 3H, J = 7, CH₃); 1,22 (m, 18H, 9 CH₂); 1,69 (m, 2H, CH₂); 4,17 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 7H, ArH); 8,88 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 28,07 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 22,44 min

ESMS m/z : 460 (³⁵Cl), 462 (³⁷Cl).

Bromure de 2-amino-3-dodécyl-1-(4-méthoxybenzyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 104h



C₂₇H₄₀BrN₃O
 502,54 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 67 %
 PF = 262-264°C

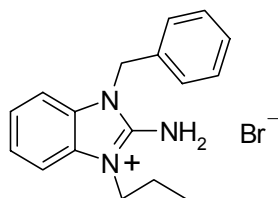
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 0,85 (t, 3H, J = 7, CH₃); 1,21 (m, 18H, 9 CH₂); 1,68 (m, 2H, CH₂); 3,71 (s, 3H, OCH₃); 4,17 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,38 (s, 2H, CH₂Ph); 6,91 (d, 2H, J = 8, H12 et H16); 7,26 (d, 2H, J = 8, H13 et H15); 7,29 (m, 2H, H5 et H6); 7,47 (d, 1H, J = 7, H4); 7,47 (d, 1H, J = 7, H7); 8,92 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 28,07 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 21,14 min

ESMS m/z : 422 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-propyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105a



C₁₇H₂₀BrN₃
 346,27 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 84 %
 PF = 305-306°C

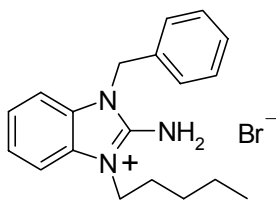
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 0,93 (t, 3H, J = 7,4, CH₃); 1,74 (m, 2H, CH₂); 4,19 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N); 5,89 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,4 (m, 7H, ArH); 7,45 (d, 1H, J = 7,2, ArH); 7,65 (d, 1H, J = 7,4, ArH); 8,99 (s large, 2H, NH₂)

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 19,60 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 9,60 min

ESMS m/z : 266 (M⁺-Br)

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-pentyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105b



C₁₉H₂₄BrN₃
 374,32 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 60 %
 PF = 310°C (décomp.)

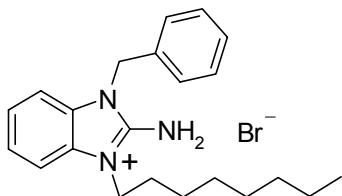
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 0,88 (t, 3H, J = 7, CH₃); 1,34 (m, 4H, 2 CH₂); 1,72 (m, 2H, CH₂); 4,24 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N); 5,51 (s, 2H, CH₂Ph); 7,3-7,7 (m, 9H, ArH); 8,99 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 91,02%, t_r 22,15 min; HPLC (II) P_{HPLC} 89,23%, t_r 13,58 min

ESMS m/z : 294 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-octyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105c



C₂₂H₃₀BrN₃
 416,40 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 76 %
 PF = 277-279°C

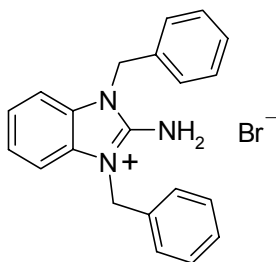
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 0,83 (t, 3H, J = 7, CH₃); 1,21 (m, 10H, 5 CH₂); 1,67 (m, 2H, CH₂); 4,19 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 8,93 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 25,59 min; HPLC (II) P_{HPLC} 95,60%, t_r 17,09 min

ESMS m/z : 336 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1,3-dibenzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105d



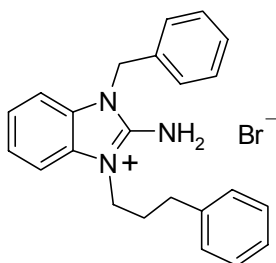
C₂₁H₂₀BrN₃
 394,31 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 83 %
 PF= 309°C (décomp.)

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 5,55 (s, 4H, 2 CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 14H, ArH); 9,21 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,19%, t_r 20,95 min; HPLC (II) P_{HPLC} 96,37%, t_r 10,78 min

ESMS m/z : 314 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(3-phénylpropyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 105e



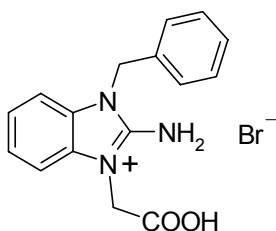
C₂₃H₂₄BrN₃
 422,37 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 60 %
 PF = 293-294°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 2,06 (m, 2H, CH₂); 2,73 (m, 2H, CH₂); 4,31 (t, 2H, J = 7,1, CH₂N); 5,49 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,4 (m, 13H, ArH); 7,63 (d, 1H, J = 7,3, ArH); 9,03 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 97,14%, t_r 23,14 min; HPLC (II) P_{HPLC} 96,98%, t_r 14,60 min

ESMS m/z : 342 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(carboxymethyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 105f



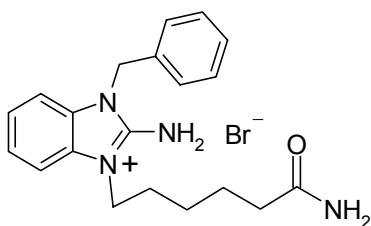
$C_{16}H_{16}BrN_3O_2$
 362,22 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 62 %
 PF = 159-161°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 4,91 (s, 2H, CH₂COOH); 5,54 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH); 9,10 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 20,92 min; HPLC (II) P_{HPLC} 98,47%, t_r 9,86 min

ESMS m/z : 304 (M⁺ + Na).

Bromure de 2-amino-3-(6-amino-6-oxohexyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105g



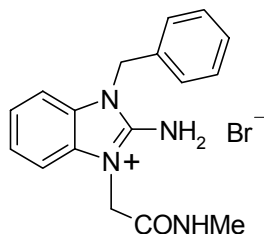
$C_{20}H_{25}BrN_4O$
 417,35 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 52 %
 PF = 262-264°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 1,34 (m, 2H, CH₂); 1,52 (m, 2H, CH₂); 1,71 (m, 2H, CH₂); 2,03 (t, 2H, J = 7,2, CH₂CONH₂); 4,20 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N); 5,48 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,5 (m, 8H, ArH); 7,63 (d, 1H, J = 7,5, ArH); 8,98 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 97,53%, t_r 18,68 min; HPLC (III) P_{HPLC} 92,31%, t_r 11,44 min

ESMS m/z : 337 (M^+ -Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-[2-(méthylamino)-2-oxoéthyl]-1*H*-3,1-benzimidazole 105h



$C_{17}H_{19}BrN_4O$
 375,27 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 67 %
 PF = 271-273°C

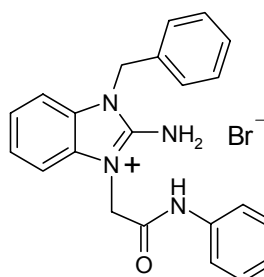
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 2,67 (d, 3H, J = 4,6, NHCH₃); 4,94 (s, 2H, CH₂CONHCH₃); 5,52 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,5 (m, 9H, ArH); 8,34 (q, 1H, J = 4,8, NH); 9,05 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 17,26 min; HPLC (III) P_{HPLC} 96,93%, t_r 8,88 min

ESMS m/z : 295 (M^+ -Br).

Bromure de 2-amino-3-(2-anilino-2-oxoéthyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105i



$C_{22}H_{21}BrN_4O$
 437,34 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 60 %
 PF = 295-297°C

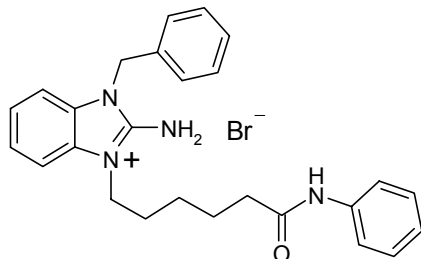
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 5,17 (s, 2H, CH₂CONHPh); 5,54 (s, 2H, CH₂Ph); 7,0-7,7 (m, 14H, ArH); 9,05 (s large, 1H, NH); 10,57 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 21,28 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 11,89 min

ESMS m/z : 357 ($M^+ - Br$).

Bromure de 2-amino-3-(2-anilino-2-oxohexyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105j



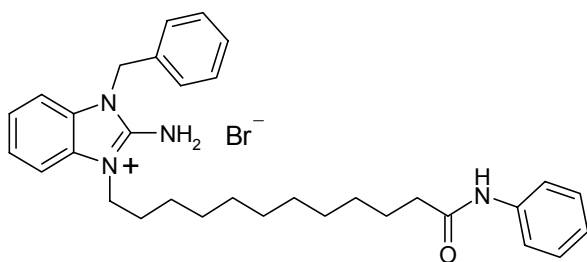
$C_{29}H_{29}BrN_4O$
 493,45 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 32 %

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,39 (m, 2H, CH₂); 1,58-1,80 (m, 4H, 2 CH₂); 2,31 (t, 2H, J = 7,1, CH₂CONHPh); 4,21 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 7,0-7,7 (m, 14H, ArH); 8,95 (s large, 2H, NH₂); 9,88 (s large, 1H, NH).

ESMS m/z : 413 ($M^+ - Br$).

Bromure de 2-amino-3-(2-anilino-2-oxododécyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 105k



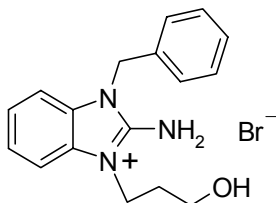
$C_{32}H_{41}BrN_4O$
 577,61 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 31 %

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,15-1,45 (m, 14H, 7 CH₂); 1,5-1,80 (m, 4H, 2 CH₂); 2,29 (t, 2H, J = 7,1, CH₂CONHPh); 4,21 (t, 2H, J = 7,1, CH₂N); 5,44 (s, 2H, CH₂Ph); 7,0-7,7 (m, 14H, ArH).

ESMS m/z : 497 (M^+ -Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(3-hydroxypropyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 105l



$C_{17}H_{20}BrN_3O$
 362,27 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 51 %
 PF = 246-247°C

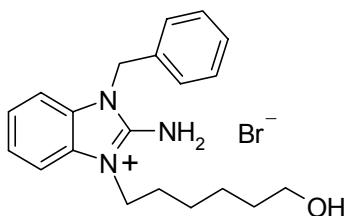
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,91 (m, 2H, CH₂); 3,49 (m, 2H, CH₂); 4,27 (m, 2H, CH₂); 4,75 (s large, 1H, OH); 5,48 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH); 8,92 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,72%, t_r 18,25 min; HPLC (III) P_{HPLC} 93,09%, t_r 10,94 min

ESMS m/z : 282 (M^+ -Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(6-hydroxyhexyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 105m



$C_{20}H_{26}BrN_3O$
 404,35 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 52 %
 PF = 273-275°C

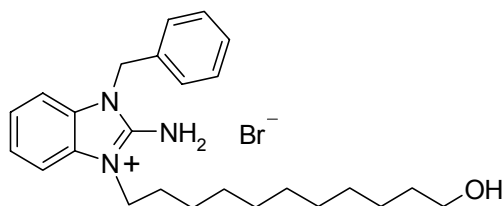
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,34 (m, 6H, 3 CH₂); 1,72 (m, 2H, CH₂); 3,36 (m, 2H, CH₂); 4,20 (m, 2H, CH₂); 4,34 (t, 1H, J = 4,5, OH); 5,48 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,5 (m, 8H, ArH); 7,64 (d, 1H, J = 7,5, ArH); 8,96 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 19,71 min; HPLC (II) P_{HPLC} 98,03%, t_r 9,18 min

ESMS m/z : 324 (M^+ -Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(11-hydroxyundécyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 105n



C₂₅H₃₆BrN₃O
 474,49 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 54 %
 PF = 178-180°C

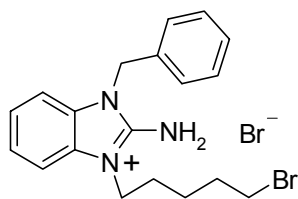
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,24 (m, 18H, 9 CH₂); 1,70 (m, 2H, CH₂); 3,34 (m, 2H, CH₂); 4,18 (t, 2H, J = 7,5, CH₂); 5,45 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,4 (m, 8H, ArH); 7,61 (d, 1H, J = 7,5, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 94,38%, t_r 25,72 min; HPLC (II) P_{HPLC} 95,27%, t_r 19,64 min

ESMS m/z : 394 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(5-bromopentyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 105o



C₁₉H₂₄Br₂N₃
 454,23 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 66 %
 PF = 287°C (décomp.)

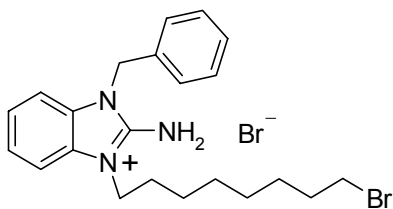
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,2-1,8 (m, 6H, 3 CH₂); 3,56 (t, 2H, J = 7, CH₂Br); 4,26 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,52 (s, 2H, CH₂Ph); 7,3-7,8 (m, 9H, ArH); 9,02 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,49%, t_r 22,04 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 13,31 min

ESMS m/z : 372 (M⁺, ⁷⁹Br), 374 (M⁺, ⁸¹Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(8-bromooctyl)-1H-3,1-benzimidazole 105p



$C_{22}H_{30}Br_2N_3$
 496,31 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 76 %
 PF = 256-258°C

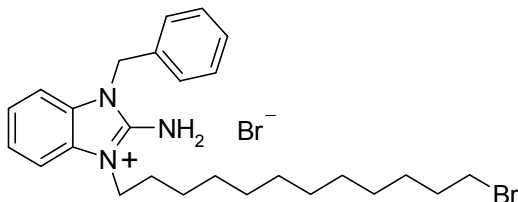
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,1-1,8 (m, 12H, 6 CH₂); 3,53 (t, 2H, J = 7, CH₂Br); 4,25 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,53 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 9,02 (s large, 2H, NH₂)

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 25,22 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 16,64 min

ESMS m/z : 414 (M⁺, ⁷⁹Br), 416 (M⁺, ⁸¹Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(12-bromododecyl)-1H-3,1-benzimidazole 105q



$C_{26}H_{38}Br_2N_3$
 552,42 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 85 %
 PF= 239-241°C

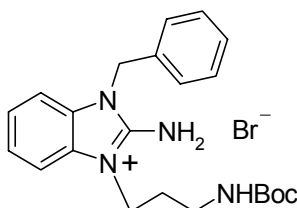
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,35 (m, 16H, 8 CH₂); 1,75 (m, 4H, CH₂CH₂Br et CH₂CH₂N); 3,52 (t, 2H, J = 7, CH₂Br); 4,20 (t, 2H, J = 7, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 7,32 (m, 7H, ArH); 7,45 (d, 1H, J = 8, ArH); 7,63 (d, 1H, J = 8, ArH); 8,93 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 98,88%, t_r 27,57 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 20,15 min

ESMS m/z : 470 (M⁺, ⁷⁹Br), 472 (M⁺, ⁸¹Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-{3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propyl}-1*H*-3,1-benzimidazole 105r



C₂₂H₂₉BrN₄O₂
 461,40 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 58 %
 PF= 237-239°C

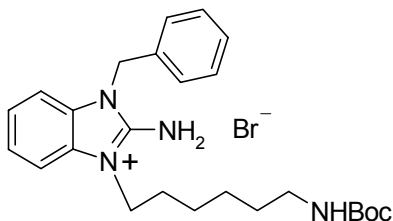
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,37 (s, 9H, 3 CH₃); 1,86 (m, 2H, CH₂); 3,03 (m, 2H, CH₂NHBoc); 4,19 (t, 2H, J = 7,1, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 6,95 (s large, 1H, NHBoc); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 8,96 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 97,98%, t_r 22,32 min; HPLC (II) P_{HPLC} 97,71%, t_r 21,79 min

ESMS m/z : 381 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-{6-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]hexyl}-1*H*-3,1-benzimidazole 105s



C₂₅H₃₅BrN₄O₂
 503,48 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 52 %
 PF= 229-232°C

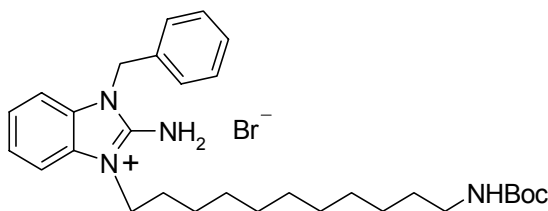
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,29 (m, 6H, 2 CH₂); 1,35 (s, 9H, 3 CH₃); 1,66 (m, 2H, CH₂); 2,86 (m, 2H, CH₂NHBoc); 4,19 (m, 2 H, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 6,73 (s large, 1H, NHBoc); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 8,94 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 93,09%, t_r 23,91 min; HPLC (II) P_{HPLC} 94,08%, t_r 15,53 min

ESMS m/z : 423 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-{11-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]undécyl}-1*H*-3,1-benzimidazole 105t



$C_{30}H_{45}BrN_4O_2$
 573,62 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 88 %
 PF = 215-217°C

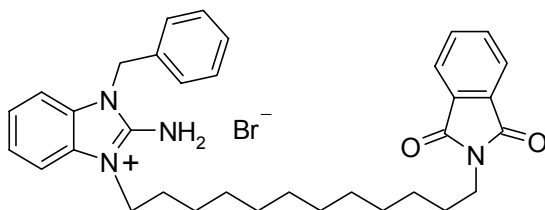
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,21 (m, 18H, 9 CH₂); 1,35 (s, 9H, 3 CH₂); 1,71 (m, 2H, CH₂); 2,87 (m, 2H, CH₂NHBoc); 4,20 (t, 2 H, J = 6,8, CH₂N); 5,48 (s, 2H, CH₂Ph); 6,74 (s large, 1H, NHBoc); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 8,94 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 26,50 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 18,80 min

ESMS m/z : 493 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-[12-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)dodécyl]-1*H*-3,1-benzimidazole 105u



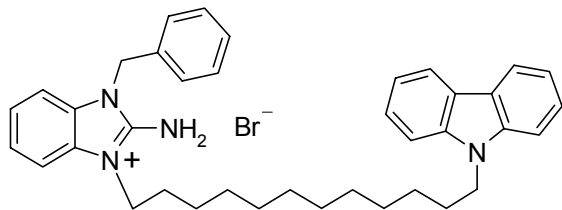
$C_{34}H_{41}BrN_4O_2$
 617,63 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 50 %
 PF = 198-201°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,1-1,7 (m, 20H, 10 CH₂); 3,53 (t, 2H, J = 7,1, CH₂NPhthal.); 4,18 (t, 2H, J = 7,3, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 7,83 (s, 4H, ArH Phthal.); 8,93 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,61%, t_r 19,34 min; HPLC (II) P_{HPLC} 98,90%, t_r 22,97 min

ESMS m/z : 537 (M⁺-Br).

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-[12-(9H-carbazol-9-yl)dodecyl]-1H-3,1-benzimidazole 105v

$C_{38}H_{45}BrN_4$
 637,71 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 43 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

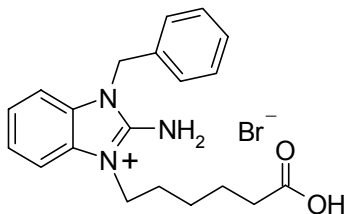
δ 1,0-1,5 (m, 16H, 8 CH₂); 1,6-1,8 (m, 4H, 2 CH₂); 4,21 (t, 2H, J = 6,9, CH₂Ncarbazole); 4,40 (t, 2H, J = 6,8, CH₂N); 5,49 (s, 2H, CH₂Ph); 7,1-7,7 (m, 15H, ArH); 8,16 (d, 2H, J = 7,8, ArH); 8,96 (s large, 2H, NH₂).

ESMS m/z : 557 (M⁺-Br).

Mode opératoire général d'oxydation des alcools 105m et 105n :

Une solution aqueuse saturée de Na₂CO₃ (10 mL) est additionnée à une solution d'alcool **105m** ou **105n** (0,25 mmol) dans l'AcOEt (10 mL). La phase organique est extraite, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. Le produit brut obtenu est dissout dans l'acétone (50 mL), la solution est refroidie dans un bain de glace puis le réactif de Jones (2,6M, 0,38 mmol) est additionné lentement. La solution est agitée pendant 30 min à 0°C puis 3 mL d'isopropanol sont ajoutés. Après 20 min d'agitation à T.A., 100 mg de MgSO₄ sont additionnés et le mélange est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé et l'huile obtenue est triturée avec de l'éther. Le précipité vert formé est filtré, lavé 2 fois avec de l'éther et purifié par HPLC semi-préparative.

Bromure de 2-amino-1-benzyl-3-(5-carboxypentyl)-1*H*-3,1-benzimidazole 106m



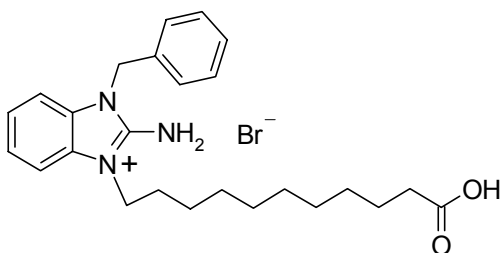
$C_{20}H_{24}BrN_3O_2$
 418,33 g.mol⁻¹
 solide blanc
 P_{HPLC} 73%, t_r 29.04 min

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,4-2,1 (m, 6H, 3 CH₂); 2,31 (t, 2H, J = 7,1, CH₂COOH); 4,24 (t, 2H, J = 7,1, CH₂); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH).

ESMS m/z : 338 (M⁺-Br).

2-amino-1-benzyl-3-(10-carboxydodécyl)-1*H*-3,1-benzimidazole bromide 106n



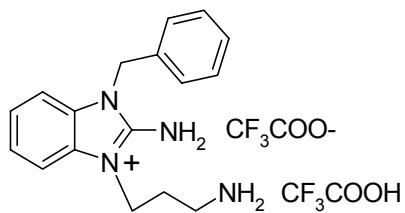
$C_{25}H_{34}BrN_3O_2$
 488,47 g.mol⁻¹
 solide blanc
 P_{HPLC} 55%, t_r 33.41 min

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) :

δ 1,4-1,6 (m, 16H, 8 CH₂); 1,86 (m, 2H, CH₂); 2,25 (t, 2H, J = 7,3, CH₂COOH); 4,24 (t, 2H, J = 7,1, CH₂); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH).

ESMS m/z : 408 (M⁺-Br).

2-amino-3-(3-aminopropyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole bistrifluoroacétate 107r



$C_{21}H_{22}F_6N_4O_4$

508,42 g.mol⁻¹

solide blanc

Rdt : 92 %

PF = 158-161°C

L'amine protégée **105r** (1,14 mmol) est mise en suspension dans 10 mL d'un mélange CH₂Cl₂/acide trifluoroacétique (50/50) La solution est agitée à T.A. pendant 12h puis évaporée à sec. Le résidu est trituré dans l'éther, filtré puis séché sous vide.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 2,03 (m, 2H, CH₂); 2,92 (m, 2H, CH₂); 4,27 (t, 2H, J = 7,8, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH); 7,80 (s large, 2H, NH₂); 9,04 (s large, 2H, NH₂).

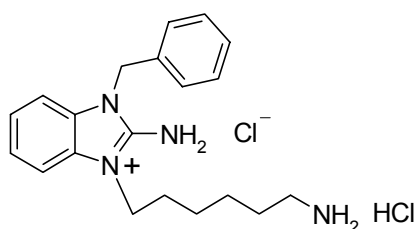
HPLC (I) P_{HPLC} 98,8%, t_r 13,22 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 3,28 min

ESMS m/z : 281 (M⁺).

Mode opératoire général pour la déprotection des N-Boc amines 105s-t :

L'amine protégée (**105s** ou **105t**, 1,14 mmol) est mise en suspension dans 20 mL d'AcOEt et refroidie dans un bain de glace puis HCl gaz est additionné au mélange pendant 5 min. Le précipité formé est filtré et lavé trois fois avec de l'éther.

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-3-(6-aminohexyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 107s



C₂₀H₂₈Cl₂N₄
395,37 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 88 %
PF = 223-226°C

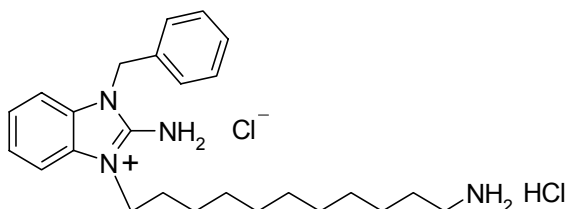
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,49 (m, 4H, 2 CH₂); 1,68 (t, 2H, J = 6,8, CH₂); 1,89 (t, 2H, J = 6,8, CH₂); 2,94 (t, 2H, J = 7,5, CH₂NH₂); 4,27 (t, 2H, J = 7,5, CH₂N); 5,48 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 98,3%, t_r 15,13min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 3,37 min

ESMS m/z : 162 (m/2), 323 (M⁺ -Cl, -HCl).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-3-(11-aminoundécyl)-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazole 107t



C₂₅H₃₈Cl₂N₄
465,51 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 95 %
PF = 173-176°C

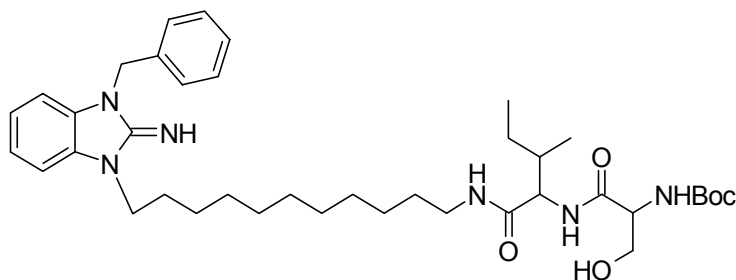
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,32 (m, 14H, 7 CH₂); 1,64 (m, 2H, CH₂); 1,85 (m, 2H, CH₂); 2,91 (t, 2H, J = 7,3, CH₂); 4,24 (t, 2H, J = 7,1, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 9H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 100%, t_r 19,65 min; HPLC (II) P_{HPLC} 100%, t_r 8,24 min

ESMS m/z : 393 (M⁺ -Cl, -HCl).

N*-(*tert*-butoxycarbonyl)séryl-*N*¹-[11-(2-amino-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazol-3-yl)-undécyl]isoleucinamide **108t*



C₃₉H₆₁N₆O₅
692,95 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 35 %

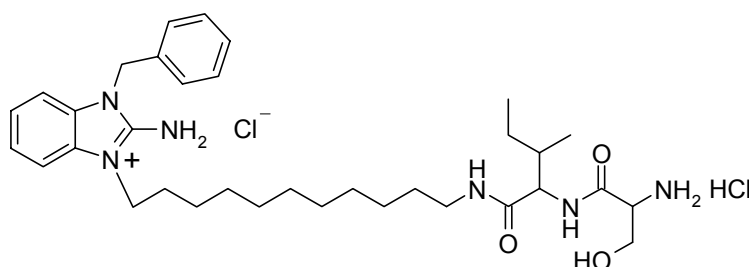
A une solution sous argon de 68 mg de N-Boc-Ser-IleOH (0,215 mmoles, 1 éq) dans 1 mL de DMF anhydre sont ajoutés 36,5 mg de carbonyle diimidazole (0,255 mmoles, 1,05 éq). Le mélange est agité à T.A. pendant 1 h puis une solution de 0,1 g de cation **107t** (0,215 mmoles, 1 éq) et de 30 μ L de TEA (0,215 mmoles, 1 éq) dans 1 mL de DMF anhydre est ajoutée. La solution est agitée à 80°C pendant 4 h puis le DMF est évaporé à sec. Le résidu est repris dans 5 mL d'une solution aqueuse de Na₂CO₃ à 10 %. Après 10 min d'agitation, la solution est extraite avec 10 mL d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 10 mL d'eau, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est trituré avec de l'éther, filtré puis séché sous vide.

^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) :

δ 0,9-1,1 (m, 6H, 2 CH_3 Ile); 1,2-1,6 (m, 27H, 9 CH_2 + 3 CH_3 Boc); 1,8-2,0 (m, 3H, CH_2 + CH Ile); 3,1-3,3 (m, 2H, CH_2); 3,7-3,8 (m, 1H, CH); 4,1-4,5 (m, 5H, 2 CH_2 + CH); 5,49 (s, 2H, CH_2Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH).

ESMS m/z : 693 ($M + H$).

Chlorhydrate de chlorure de séryl- N^1 -[11-(2-amino-1-benzyl-1*H*-3,1-benzimidazol-3-ium-3-yl)undécyl]isoleucinamide 109t



$\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_3$

665,75 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide blanc

P_{HPLC} 55%, t_r 33.41 min

Le composé **108t** est dissout dans une solution saturée d'HCl dans l'AcOEt et la solution est agitée à T.A. pendant 1h. Le précipité formé est filtré puis lavé à l'éther. Le produit obtenu est purifié par HPLC semi-préparative.

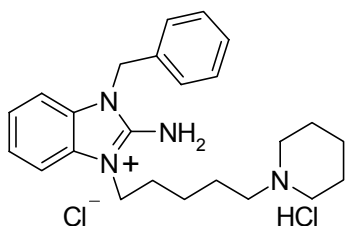
^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) :

δ 0,9-1,1 (m, 6H, 2 CH_3 Ile); 1,2-1,5 (m, 18H, 9 CH_2); 1,9-2,1 (m, 3H, CH_2 + CH Ile); 3,2-3,4 (m, 2H, CH_2); 3,7-3,8 (m, 1H, CH); 4,2-4,7 (m, 5H, 2 CH_2 + CH); 5,48 (s, 2H, CH_2Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH).

ESMS m/z : 297 ($m/2$), 593 ($M^+ - \text{Cl}$, $-\text{HCl}$).

Mode opératoire général pour la préparation des cations 110a-k :

Le dérivé bromé (**105o**, **105p** ou **105q**, 0,55 mmol) est mis en suspension dans l'acétonitrile (5 mL) et l'amine approprié est additionnée (1,65 mmol, 3 éq). La solution est chauffée à 90°C pendant 48 h. Après refroidissement à 0°C, le précipité est filtré, lavé avec de l'éther (10 mL), avec de l'eau (10 mL) et à nouveau avec de l'éther (10 mL) pour donner une poudre blanche. Le produit est dissout dans une solution d'HCl 1N (10 mL) et la phase aqueuse est lavée avec de l'AcOEt (10 mL). La solution acide est basifiée avec une solution saturée de Na₂CO₃ (10 mL) et extraite avec de l'AcOEt (10 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. L'huile obtenue est dissoute dans une solution saturée d'HCl dans l'AcOEt. La solution est agitée à T.A. pendant 10 min et est évaporée. Le produit blanc obtenu est trituré dans l'éther, filtré puis séché sous vide.

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-3-(5-piperidinopentyl)-1-benzyl-1H-3,1-benzimidazole 110a

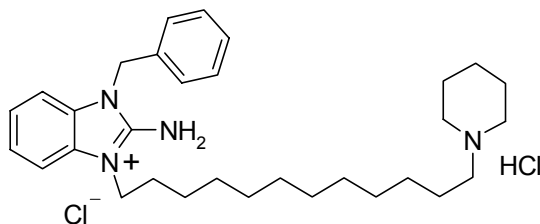
C₂₄H₃₄Cl₂N₄
 449,47 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 56%

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,45-1,65 (m, 4 H, 2 CH₂); 1,8-2,1 (m, 8H, 4 CH₂); 2,8-3,0 (m, 2H, CH₂); 3,05-3,2 (m, 2H, CH₂); 3,5-3,6 (m, 2H, CH₂); 4,29 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH).

ESMS m/z : 188 (m/2), 377 (M⁺ -Cl, -HCl).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-3-(12-piperidinododécyl)-1-benzyl-1H-3,1-benzimidazole 110b



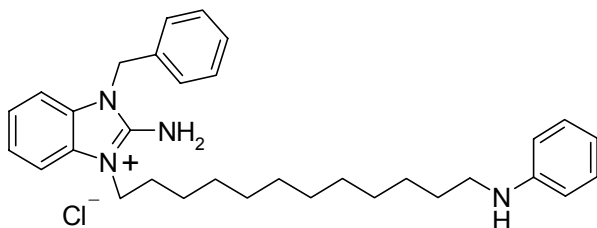
$C_{31}H_{48}Cl_2N_4$
 547,66 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 68 %

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,2-1,6 (m, 18H, 9 CH₂); 1,7-2,1 (m, 8H, 4 CH₂); 2,85-3,15 (m, 4H, 2 CH₂); 3,45-3,65 (m, 2H, CH₂); 4,28 (t, 2H, J = 7,1, CH₂N); 5,51 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH).

ESMS m/z : 238 (m/2), 475 (M⁺ -Cl, -HCl)

Chlorure de 2-amino-3-(12-anilinododécyl)-1-benzyl-1H-3,1-benzimidazole 110c



$C_{32}H_{43}ClN_4$
 519,18 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 69 %
 PF = 125-126°C

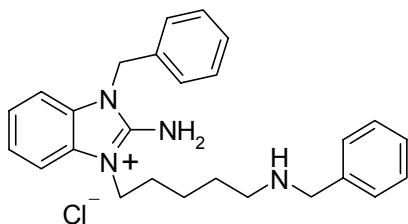
¹H RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,1-1,5 (m, 16H, 8 CH₂); 1,80 (m, 4H, 2 CH₂); 3,38 (m, 2H, CH₂); 4,24 (t, 2H, J = 6,8, CH₂N); 5,47 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 14H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 91,02%, t_r 20,07 min; HPLC (II) P_{HPLC} 88,99%, t_r 20,46 min

ESMS m/z : 483 (M⁺ -Cl).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[5-(benzylamino)pentyl]-1H-3,1-benzimidazole 110d



$C_{26}H_{31}ClN_4$
 471,47 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 40 %
 Pf = 105-108°C

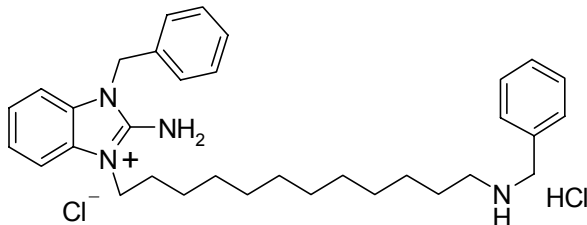
¹H RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,42 (m, 2H, CH₂); 1,72 (m, 4H, 2 CH₂); 2,81 (m, 2H, CH₂); 4,11 (s, 2H, CH₂Ph); 4,24 (t, 2H, J = 7,5, CH₂N); 5,51 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 14H, ArH); 9,21 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 90,65%, t_r 17,04 min; HPLC (II) P_{HPLC} 93,58%, t_r 3,80 min

ESMS m/z : 399 (M⁺-Cl)

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[12-(benzylamino)dodécyl]-1H-3,1-benzimidazole 110e



$C_{33}H_{46}Cl_2N_4$
 569,66 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 43 %
 PF = 158-160°C

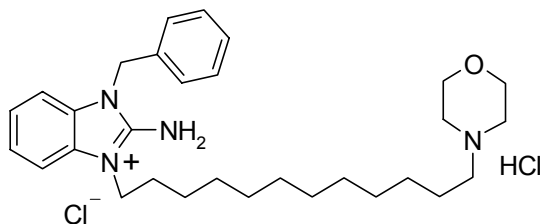
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) :

δ 1,2-1,5 (m, 16H, 8 CH₂); 1,79 (m, 4H, 2 CH₂); 3,04 (t, 2H, J = 7,8, CH₂); 4,21 (s, 2H, CH₂Ph); 4,25 (t, 2H, J = 6,9, CH₂N); 5,48 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,6 (m, 14H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 90,02%, t_r 21,39 min; HPLC (II) P_{HPLC} 91,14%, t_r 12,80 min

ESMS m/z : 249 (m/2), 497 (M⁺-Cl, -HCl)

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-(12-morpholin-4-yl-dodécyl)-1H-3,1-benzimidazole 110f



$C_{30}H_{46}Cl_2N_4$
 549,63 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 76 %
 PF = 221-223°C

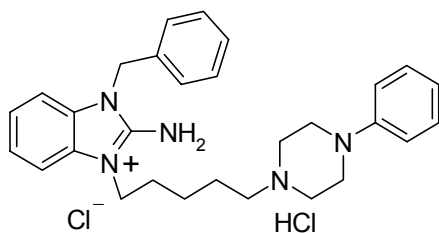
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,25 (m, 16H, 8 CH₂); 1,71 (m, 4H, 2 CH₂); 3,02 (m, 4H, 2 CH₂); 3,39 (m, 2H, CH₂); 3,93 (m, 4H, 2 CH₂); 4,26 (t, 2H, J = 6,6, CH₂N); 5,55 (s, 2H, CH₂Ph); 7,2-7,7 (m, 9H, ArH); 9,36 (s large, 2H, NH₂).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,22%, t_r 23,82 min; HPLC (II) P_{HPLC} 90,14%, t_r 20,45 min

ESMS m/z : 238 (m/2).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[5-(4-phénylpipérazin-1-yl)pentyl]-1H-3,1-benzimidazole 110g



$C_{29}H_{37}Cl_2N_5$
 526,55 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 45 %
 PF = 219°C (décomp.)

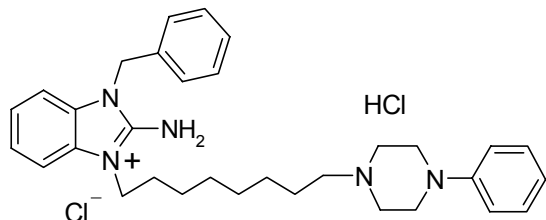
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,4-1,7 (m, 4H, 2 CH₂); 1,91 (m, 2H, CH₂); 2,43 (m, 2H, CH₂); 2,61 (t, 4H, J = 5,1, 2 CH₂ piperazine); 3,15 (t, 4H, J = 4,9, 2 CH₂ piperazine); 4,25 (t, 2H, J = 7,3, CH₂N); 5,45 (s, 2H, CH₂Ph); 6,8-7,7 (m, 14H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,39%, t_r 17,20 min; HPLC (II) P_{HPLC} 97,22%, t_r 4,08 min

ESMS m/z : 227 (m/2), 454 ($M^+ - Cl$, $-HCl$).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[8-(4-phénylpipérazin-1-yl)octyl]-1H-3,1-benzimidazole 110h



$C_{32}H_{43}Cl_2N_5$
 568,64 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 59 %
 PF = 127-130°C

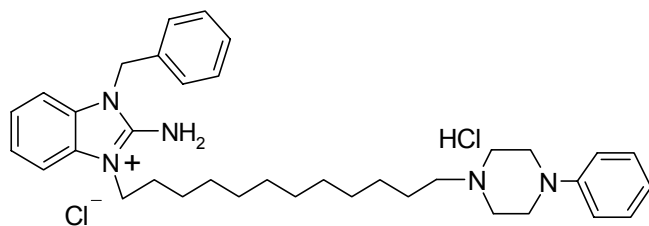
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,3-1,6 (m, 10H, 5 CH₂); 1,87 (m, 2H, CH₂); 2,43 (m, 2H, CH₂); 2,64 (m, 4H, 2 CH₂ piperazine); 3,20 (m, 4H, 2 CH₂ piperazine); 4,25 (m, 2H, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 6,8-7,6 (m, 14H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 90,23%, t_r 19,17 min; HPLC (II) P_{HPLC} 89,14%, t_r 9,72 min

ESMS m/z : 248 (m/2).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[12-(4-phénylpipérazin-1-yl)dodécyl]-1H-3,1-benzimidazole 110i



$C_{36}H_{51}Cl_2N_5$
 624,74 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 67 %
 PF = 210-213°C

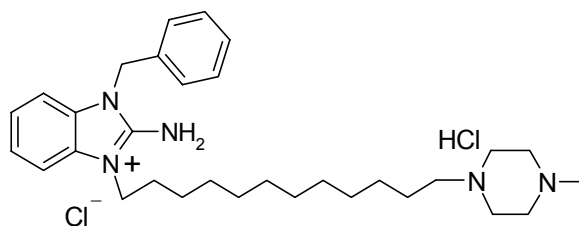
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,30 (m, 16H, 8 CH₂); 1,55 (m, 2H, CH₂); 1,85 (m, 2H, CH₂); 2,45 (t, 2H, J = 7,5, CH₂); 2,68 (t, 4H, J = 5,4, 2 CH₂ piperazine); 3,21 (t, 4H, J = 5,1, 2 CH₂ piperazine); 4,24 (t, 2H, J = 7,3, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 6,8-7,6 (m, 14H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 89,31%, t_r 21,91 min; HPLC (II) P_{HPLC} 90,80%, t_r 13,38 min

ESMS m/z : 276 (m/2).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[12-(4-methylpiperazin-1-yl)dodecyl]-1H-3,1-benzimidazole 110j



C₃₁H₄₉Cl₂N₅
 562,67 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 30 %
 PF = 123-126°C

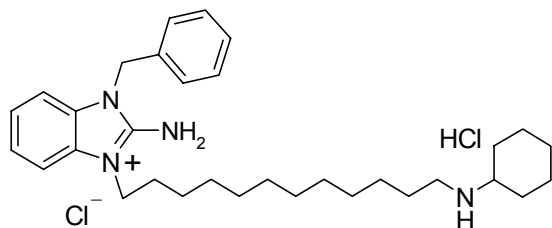
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) :

δ 1,35 (m, 20H, 10 CH₂); 1,84 (m, 4H, 2 CH₂ piperazine); 3,04 (s, 3H, CH₃); 3,37 (m, CH₂N); 3,74 (m, 4H, 2 CH₂ piperazine); 4,27 (t, 2H, J = 7,2, CH₂N); 5,49 (s, 2H, CH₂Ph); 7,1-7,7 (m, 9H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 90,12%, t_r 20,82 min; HPLC (II) P_{HPLC} 91,04%, t_r 12,45 min

ESMS m/z : 245 (m/2).

Chlorhydrate de chlorure de 2-amino-1-benzyl-3-[12-(cyclohexylamino)dodecyl]-1H-3,1-benzimidazole 110k



$C_{32}H_{50}Cl_2N_4$
 561,68 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 53 %
 PF= 170-173°C

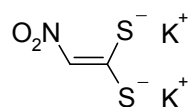
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,30 (m, 20H, 10 CH₂); 1,5-1,9 (m, 8H, 4 CH₂ cyclohexyl); 2,11 (m, 2H, CH₂ cyclohexyl); 2,97 (m, 3H, CH₂N and CH cyclohexyl); 4,23 (t, 2H, J = 7,3, CH₂N); 5,46 (s, 2H, CH₂Ph); 7,1-7,6 (m, 9H, ArH).

HPLC (I) P_{HPLC} 95,03%, t_r 21,65 min; HPLC (II) P_{HPLC} 91,14%, t_r 17,45 min

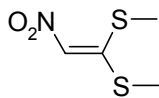
ESMS m/z : 245 (m/2).

2-nitroéthylène-1,1-dithiolate de dipotassium 130



$C_2HK_2NO_2S_2$
 213,36 g.mol⁻¹
 solide rouille
 Rdt : 70 %
 PF = 215-217°C

A une solution de nitrométhane (17,75 mL, 0,327 mol, 1 éq.) dans 50 mL d'EtOH sont ajoutés 30 mL de disulfure de carbone (0,498 mol, 1,5 éq.) puis, au goutte à goutte, 300 mL d'une solution de KOH éthanolique (0,713 mol, 2,2 éq.) en maintenant le milieu à 35°C (T°C interne). Le mélange est agité à T.A. pendant 1 h. Le précipité est filtré puis lavé avec 2 x 50 mL d'EtOH et avec 2 x 50 mL d'éther.

1,1-bis(méthylthio)-2-nitroéthylène 131

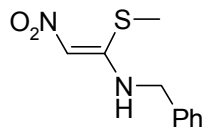
$C_4H_7NO_2S_2$
 $165,23 \text{ g.mol}^{-1}$
 solide ocre
 Rdt : 76 %
 PF = 126-127°C

Une solution de 20g de dithiolate de potassium **130** (93,73 mmol, 1 éq.) dans 100 mL de MeOH et 150 mL d'eau est refroidie dans un bain de glace puis 17,75 mL de diméthylsulfate (186,46 mmol, 2 éq.) sont ajoutés au goutte à goutte. La solution est agitée à T.A. pendant 1,5 h puis 1L d'eau est ajouté. Le précipité est filtré, lavé avec 2 x 50 mL d'eau puis séché sous vide.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) :
 δ 2,54 (s, 3H, CH_3) ; 2,55 (s, 3H, CH_3) ; 7,08 (s, 1H, CH-NO_2).

Mode opératoire général pour la préparation des composés **132a et **132b** :**

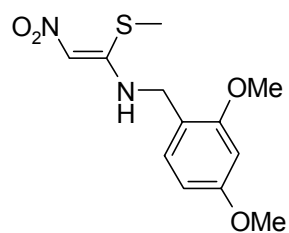
A une solution de 3g de 1,1-bis(méthylthio)-2-nitroéthylène **131** (18,16 mmol, 1 éq.) dans 80 mL d'EtOH sont ajoutés 18,16 mmol d'amine (1 éq.). La solution est chauffée à 90°C pendant 3,5 h. Après refroidissement, le précipité formé est filtré, lavé avec 2 x 5 mL d'EtOH puis séché sous vide.

N-benzyl-1-(méthylthio)-2-nitroéthylèneamine 132a

$C_{10}H_{12}N_2O_2S$
 $224,28 \text{ g.mol}^{-1}$
 solide beige
 Rdt : 65 %

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) :
 δ 2,46 (s, 3H, CH_3) ; 4,64 (d, $J = 5,9$, 2H, CH_2Ph) ; 6,62 (s, 1H, CH-NO_2) ; 7,3-7,4 (m, 5H, ArH) ; 10,76 (s large, 1H, NH).

N-(2,4-diméthoxybenzyl)-1-(méthylthio)-2-nitroéthylèneamine 132b



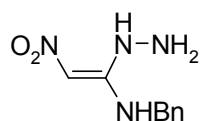
$C_{12}H_{16}N_2O_4S$
284,34 g.mol⁻¹
solide beige
Rdt : 72 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 2,46 (s, 3H, **CH₃**) ; 3,84 (s, 3H, **OCH₃**) ; 3,89 (s, 3H, **OCH₃**) ; 4,56 (d, J = 6,1, 2H, **CH₂Ph**) ; 6,46 (d, J = 2,2, 1H, Ar-H3) ; 6,51 (m, 1H, Ar-H5) ; 6,60 (s, 1H, **CH-NO₂**) ; 7,16 (d, J = 8,1, 1H, Ar-H6) ; 10,86 (s large, 1H, **NH**).

Mode opératoire général pour la préparation des composés 133a et 133b :

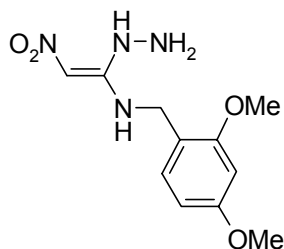
A une solution de 6,69 mmoles de 1-méthylthio-2-nitroéthylène **132a** ou **132b** (1 éq.) dans 10 mL d'EtOH sont ajoutés 0,326 mL d'hydrate d'hydrazine (6,69 mmol, 1 éq.). La solution est chauffée à 90°C pendant 1 h. Après refroidissement, le précipité formé est filtré, lavé avec 2 x 10 mL d'éther puis séché sous vide.

N-benzyl-1-hydrazino-2-nitroéthylèneamine 133a

C₉H₁₂N₄O₂
 208,22 g.mol⁻¹
 solide beige
 Rdt : 95 %

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 4,30 (d, J = 5,9, 2H, CH₂Ph) ; 6,50 (s, 1H, CH-NO₂) ; 7,3-7,4 (m, 5H, ArH).

N-(2,4-diméthoxybenzyl)-1-hydrazino-2-nitroéthylèneamine 133b

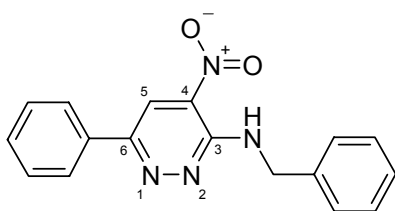
C₁₁H₁₆N₄O₄
 268,27 g.mol⁻¹
 solide beige
 Rdt : 92 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,81 (s, 3H, OCH₃) ; 3,84 (s, 3H, OCH₃) ; 4,20 (d, J = 5,9, 2H, CH₂Ph) ; 6,44 (d, J = 2,2, 1H, Ar-H3) ; 6,48 (s, 1H, CH-NO₂) ; 6,65 (m, 1H, Ar-H5) ; 6,84 (s large, 1H, NH) ; 7,11 (d, J = 8,1, 1H, Ar-H6) ; 10,72 (s large, 1H, NH).

Mode opératoire général pour la préparation des aminopyridazines **134a et **134b** :**

A une suspension de 2,4 mmoles de nitroéthylèneamine **133a** ou **133b** (1 éq.) dans 5 mL d'EtOH est ajoutée, goutte à goutte, une solution de 0,386g de phénylglyoxal (2,88 mmoles, 1,2 éq.) dans 6 mL d'EtOH. Le mélange est agité à T.A. pendant 12 h. Le précipité orange formé est filtré (composé **134**) et les eaux mères sont évaporées. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/2) pour donner le composé **135** qui est séché sous vide.

4-nitro-6-phényl-3-benzylaminopyridazine **134a**

$C_{17}H_{14}N_4O_2$
306,33 g.mol⁻¹

solide orange

Rdt : 53 %

Rf = 0,7 (AcOEt/hexane 1/2)

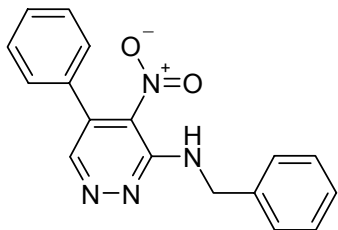
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 5,11 (d, J = 5,6, 2H, CH₂Ph); 7,3-7,6 (m, 8 H, ArH); 7,99 (m, 1H, NHBn); 8,06 (m, 2 H, ArH); 8,40 (s, 1H, H5).

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 46,24 (CH₂); 118,29 (C5); 126,37 (2 CHAr); 128,27 (CHAr); 128,44 (2 CHAr); 129,29 (2 CHAr); 129,54 (2 CHAr); 129,95 (CHAr); 132,14 (C4); 135,39 (CAr); 138,00 (CAr); 149,57 (C3); 152,13 (C6).

4-nitro-5-phényl-3-benzylaminopyridazine 135a



$C_{17}H_{14}N_4O_2$
 306,33 g.mol⁻¹
 huile orange
 Rdt : 23 %
 R_f = 0,3 (AcOEt/hexane 1/2)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 4,98 (d, J = 5,4, 2H, CH₂Ph); 6,42 (m, 1H, NHBn); 7,3-7,6 (m, 10 H, ArH); 8,79 (s, 1H, H6).

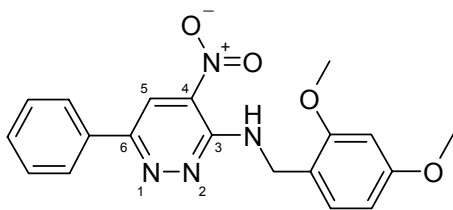
¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 46,56 (CH₂); 128,06 (2 CHAr); 128,25 (2 CHAr); 128,49 (2 CHAr); 129,26 (CHAr); 129,76 (2 CHAr); 130,55 (CHAr); 132,29 (C5); 133,06 (CAr); 133,34 (C4); 138,05 (CAr); 145,11 (C6); 149,46 (C3).

HSQC :

de fortes correlations ont été observées entre C3 et CH₂Ph et entre C3 and C5-H pour le composé **134a**, alors qu'aucune corrélation n'a été observée entre C3 and C6-H pour le composé **135a**.

4-nitro-6-phényl-3-(2,4-diméthoxybenzylamino)pyridazine 134b



$C_{19}H_{18}N_4O_4$
 366,38 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 42 %
 R_f = 0,55 (AcOEt/hexane 1/2)

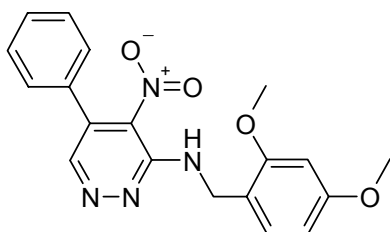
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 3,81 (s, 3H, OCH₃); 3,91 (s, 3H, OCH₃); 5,05 (d, J = 5,6, 2H, CH₂Ph); 6,46 (dd, J_o = 8,1, J_m = 2,2, 1H, ArH); 6,52 (d, J_m = 2,2, 1H, ArH); 7,39 (d, J_o = 8,1, 1H, ArH); 7,42-7,58 (m, 3 H, ArH); 8,03 (m, 2 H, ArH); 8,26 (m, 1H, NH); 8,34 (s, 1H, H5).

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 39,72 (CH_2); 53,85 (2 CH_3); 97,22 (CHAr); 102,34 (CHAr); 116,32 (CHAr); 116,57 (C); 124,33 (2 CHAr); 127,52 (2 CHAr); 127,77 (CHAr); 129,43 (CHAr); 129,92 (C); 133,62 (C); 147,78 (C); 149,39 (C); 157,38 (C); 159,31 (C).

4-nitro-5-phényl-3-(2,4-diméthoxybenzylamino)pyridazine 135b



$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$

366,38 g.mol^{-1}

huile orange qui cristallise

Rdt : 26 %

$R_f = 0,2$ (AcOEt/hexane 1/2)

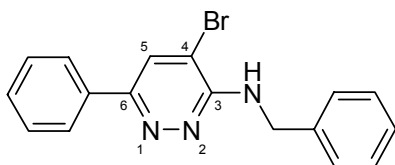
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 3,80 (s, 3H, OCH_3); 3,89 (s, 3H, OCH_3); 4,92 (d, $J = 5,6$, 2H, CH_2Ph); 6,5-6-8 (m, 2H, ArH); 6,71 (m, 1H, NH); 7,3-7,8 (m, 6 H, ArH); 8,77 (s, 1H, H6).

Mode opératoire général pour la préparation des 4-bromopyridazines 138a et 138b :

A une solution de 3-amino-4-nitro-6-phénylpyridazine **134a-b** (1,36 mmol) dans l'acide acétique (8 mL) sont additionnés 720 mL d'une solution 5,7M d'HBr dans l'AcOH (4,10 mmol, 3 éq.). Le mélange est chauffé à 90°C dans un tube scellé pendant 3 h. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (AcOEt/hexane 1/2).

3-benzylamino-4-bromo-6-phénylpyridazine 138a



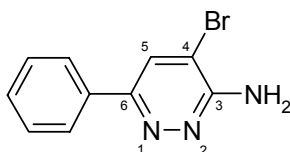
$C_{17}H_{14}BrN_3$
 340,23 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 53 %
 Rf = 0,6 (AcOEt/hexane 1/2)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 4,92 (d, J = 5,4, 2H, CH₂Ph); 5,41 (m, 1H, NHBn); 7,3-7,6 (m, 8 H, ArH); 7,94 (s, 1H, H5); 7,95-8,05 (m, 2 H, ArH).

ESMS m/z: 340 (M⁺, ⁷⁹Br), 342 (M⁺, ⁸¹Br).

3-amino-4-bromo-6-phénylpyridazine 138b



$C_{10}H_8BrN_3$
 250,10 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 75 %
 Rf = 0,7 (AcOEt/hexane 1/2)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 5,61 (s large, 2H, NH₂); 7,3-7,5 (m, 3H, ArH); 7,80 (s, 1H, H5); 7,8-7,9 (m, 2H, ArH).

¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

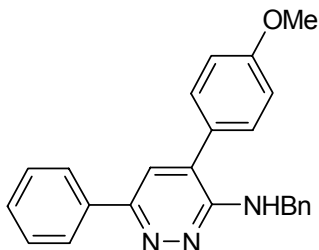
δ 115,28 (CAr); 126,65 (2 CHAr); 129,04 (CHAr); 129,32 (2 CHAr); 129,58 (CHAr); 136,10 (CAr); 153,17 (CAr); 157,42 (CAr).

ESMS m/z : 250 (M^+ , ^{79}Br), 252 (M^+ , ^{81}Br).

Méthode générale des réactions de couplage pallado-catalysées de type Suzuki :

Une suspension de **138a** ou **138b** (0,60 mmol, 1 éq.), d'acide phénylboroniques (0,69 mmol, 1,15 éq.), de Na_2CO_3 2M (0,64 mL, 1,27 mmol, 2,12 equiv.) dans un mélange de toluène (1,8mL) / d'EtOH (0,2 mL) est agitée sous argon pendant 30 min. Le catalyseur $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,027 mmol, 0,045 equiv.) est ensuite ajouté et le mélange est chauffé à 110°C pendant 20 h. Le toluène est évaporé, le résidu obtenu est repris dans H_2O et extrait avec de l'AcOEt (3x5 mL). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , évaporée sous vide et le résidu est purifié par chromatographie sur silice (composés **139**: AcOEt/hexane 1/2; composés **140**: AcOEt/hexane 1/1, TEA 2%).

3-benzylamino-4-(4-méthoxyphényl)-6-phénylpyridazine **139b**

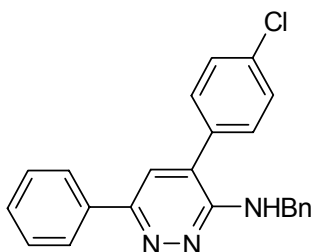


$\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$
 367,45 g.mol⁻¹
 huile jaune qui cristallise
 Rdt : 78 %
 Rf = 0,25 (AcOEt/hexane 1/2)

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,87 (d, J = 5,6, 2H, CH_2Ph); 5,06 (m, 1H, NH); 7,02 (d, J = 8,7 Hz, 2H, ArH); 7,2-7,5 (m, 11H, ArH + H5); 8,04 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH).

3-benzylamino-4-(4-chlorophényl)-6-phénylpyridazine 139c



$C_{23}H_{18}ClN_3$

371,87 g.mol⁻¹

huile jaune

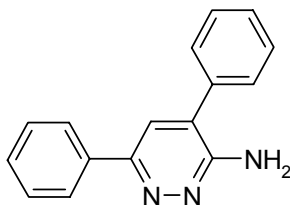
Rdt : 78 %

Rf = 0,45 (AcOEt/hexane 1/2)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 4,83 (d, J = 5,6, 2H, CH₂Ph); 5,05 (m, 1H, NH); 7,2-7,5 (m, 13H, ArH + H₅); 8,01 (d, J = 8,5 Hz, 2H, ArH).

3-amino-4,6-diphénylpyridazine 140a



$C_{16}H_{13}N_3$

247,30 g.mol⁻¹

solide beige

Rdt : 85 %

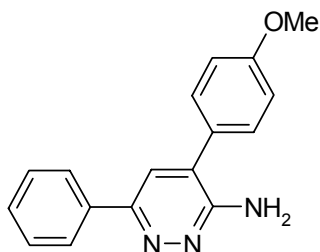
PF = 195-197°C

Rf = 0,1 (AcOEt/hexane/TEA 1/1/2%)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 4,97 (s large, 2H, NH₂); 7,3-7,6 (m, 9H, ArH et H₅); 7,91 (m, 2H, ArH).

3-amino-4-(4-méthoxyphényl)-6-phénylpyridazine 140b

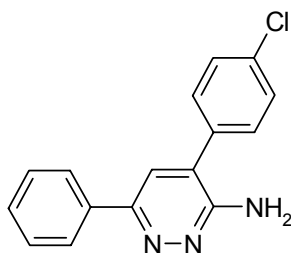


$C_{17}H_{15}N_3O$
 $277,33 \text{ g.mol}^{-1}$
 solide beige
 Rdt : 70 %
 PF = 167-169°C
 Rf = 0,25 (AcOEt/hexane 1/2)

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) :

δ 3,93 (s, 3H, OCH_3); 5,02 (s large, 2H, NH_2); 7,10 (d, $J = 8,3$, 2H, ArH); 7,4-7,5 (m, 5H, ArH); 7,55 (s, 1H, H5); 8,04 (d, $J = 8,2$, 2H, ArH).

3-amino-4-(4-chlorophényl)-6-phénylpyridazine 140c



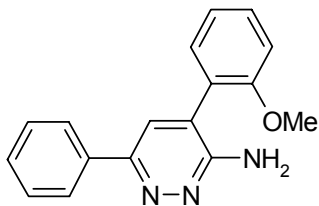
$C_{16}H_{12}\text{ClN}_3$
 $281,75 \text{ g.mol}^{-1}$
 solide jaune
 Rdt : 70 %
 PF = 225-227°C
 Rf = 0,1 (AcOEt/hexane 1/2)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) :

δ 4,96 (s large, 2H, NH_2); 7,4-7,6 (m, 8H, ArH et H5); 8,00 (d, $J = 7,2$, 2H, ArH).

ESMS m/z : 282 ($M + H$).

3-amino-4-(2-méthoxyphényl)-6-phénylpyridazine 140d



$C_{17}H_{15}N_3O$

277,33 g.mol⁻¹

solide beige

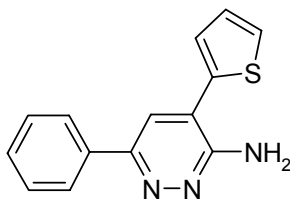
Rdt : 63 %

Rf = 0,12 (AcOEt/hexane/TEA 1/1/2%)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,85 (s, 3H, OCH₃); 4,83 (s large, 2H, NH₂); 6,95-7,15 (m, 2H, ArH); 7,2-7,35 (m, 1H, ArH); 7,38-7,52 (m, 4H, ArH); 7,56 (s, 1H, H5); 8,04 (m, 2H, ArH).

3-amino-4-(2-thiophényl)-6-phénylpyridazine 140e



$C_{14}H_{11}N_3S$

253,33 g.mol⁻¹

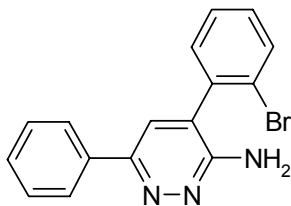
solide beige

Rdt : 60 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 5,24 (s large, 2H, NH₂); 7,2-7,3 (m, 1H, ArH); 7,4-7,6 (m, 5H, ArH); 7,67 (s, 1H, H5); 7,95-8,05 (m, 2H, ArH).

3-amino-4-(2-bromophényl)-6-phénylpyridazine 140d



$C_{16}H_{13}BrN_3$
 326,20 g.mol⁻¹
 solide beige
 Rdt : 92 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

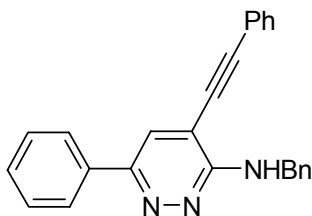
δ 4,94 (s large, 2H, NH₂); 7,2-7,7 (m, 8H, ArH et H5); 7,9-8,0 (m, 2H, ArH).

ESMS m/z: 326 (M⁺, ⁷⁹Br), 328 (M⁺, ⁸¹Br).

Méthode générale des réactions de couplage pallado-catalysées de type Sonogashira :

Un mélange sous argon de **138a** ou **138b** (0,76 mmol, 1 éq.), d'alkyne (1,14 mmol, 1,5 éq.), de Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,076 mmol, 0,1 éq.), de CuI (0,076 mmol, 0,1 éq.) et de TEA anhydre (0,158mL, 1,14 mmol, 1,5 éq.) dans l'acétonitrile anhydre (5 mL) est dégazé pendant 5 min. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 12 h. Le solvant est évaporé et le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (composés **141**: AcOEt/hexane 1/3; composés **142**: AcOEt/hexane 1/1, TEA 2%).

3-benzylamino-6-phényl-4-(phényléthynyl)pyridazine 141b

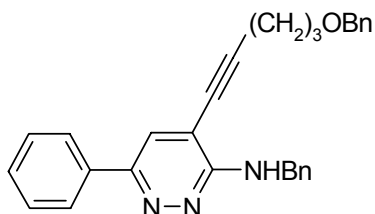


$C_{25}H_{19}N_3$
 361,45 g.mol⁻¹
 huile marron qui cristallise
 Rdt : 79 %
 Rf = 0,55 (AcOEt/hexane 1/2)

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 5,02 (d, $J = 5,6$, 2H, NHCH_2Ph); 5,06 (t, $J = 5,6$, 1H, NH); 7,20-7,70 (m, 13H, ArH); 7,77 (s, 1H, H5); 8,08 (d, $J = 8,6$, 2H, ArH).

3-benzylamino-4-[5-(benzyloxy)pent-1-ynyl]-6-phénylpyridazine 141c



$\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$

433,56 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

huile marron qui cristallise

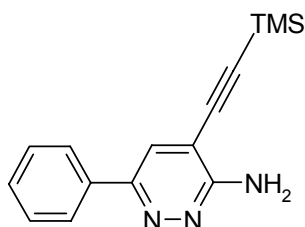
Rdt : 40 %

Rf = 0,45 (AcOEt/hexane 1/2)

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 1,93 (m, 2H, CH_2); 2,64 (t, $J = 6,9$, 2H, CH_2); 3,59 (t, $J = 5,9$, 2H, CH_2); 4,49 (s, 2H, OCH_2Ph); 4,90 (d, $J = 5,6$, 2H, NHCH_2Ph); 5,50 (t, $J = 5,6$, 1H, NH); 7,30-7,50 (m, 13H, ArH); 7,59 (s, 1H, H5); 8,00 (d, $J = 8,1$, 2H, ArH).

3-amino-6-phényl-4-(phényléthynyl)pyridazine 142b



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{Si}$

268,42 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

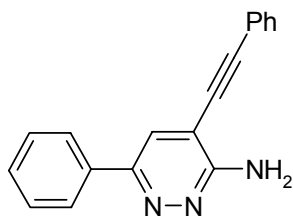
poudre marron

Rdt : 88 %

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 0,32 (s, 9H, 3 CH_3); 5,33 (s large, 1H, NH_2); 7,35-7,55 (m, 3H, ArH); 7,67 (s, 1H, H5); 7,90-8,00 (m, 2H, ArH).

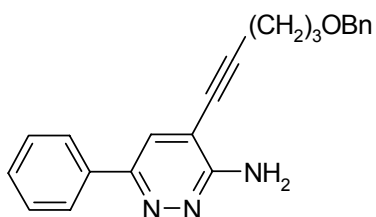
3-amino-6-phényl-4-(phényléthynyl)pyridazine 142b



$C_{18}H_{13}N_3$
 271,32 g.mol⁻¹
 poudre marron
 Rdt : 65 %

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :
 δ 6,07 (s large, 2H, NH₂); 7,2-7,6 (m, 8H, ArH); 7,73 (s, 1H, H5); 7,97 (d, J = 7,2, 2H, ArH).

3-amino-4-[5-(benzyloxy)pent-1-ynyl]-6-phénylpyridazine 142c

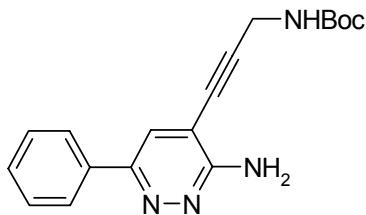


$C_{22}H_{21}N_3O$
 343,43 g.mol⁻¹
 huile jaune
 Rdt : 45 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :
 δ 2,01 (m, 2H, CH₂); 2,69 (t, J = 6,9, 2H, CH₂); 3,67 (t, J = 5,9, 2H, CH₂); 4,59 (s, 2H, OCH₂Ph); 5,54 (s large, 2H, NH₂); 7,2-7,55 (m, 8H, ArH); 7,60 (s, 1H, H5); 8,00 (m, 2H, ArH).

ESMS m/z : 344 (M + H).

***tert*-butyl 3-(3-amino-6-phénylpyridazin-4-yl)prop-2-ynylcarbamate 142d**



$C_{18}H_{20}N_4O_2$
 324,39 g.mol⁻¹
 huile marron
 Rdt : 60 %

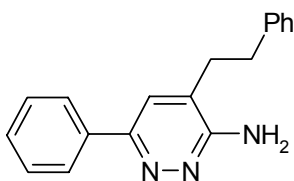
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 1,46 (s, 9H, 3 CH₃); 4,16 (s, 2H, CH₂); 5,98 (s large, 3H, NH₂ et NH); 7,3-7,5 (m, 3H, ArH); 7,54 (s, 1H, H5); 8,00 (m, 2H, ArH).

Méthode générale d'hydrogénation des 4-alkynylaminopyridazines 142b-d :

A une solution de 0,44 mmoles d'aminopyridazine **142b** ou **142d** dans 50 mL d'EtOH et 5 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés 36 mg de Pd/C. La solution est agitée sous atmosphère d'hydrogène et sous pression (75 psi) pendant 20 h. Après filtration du catalyseur puis évaporation du solvant, le résidu obtenu est trituré dans l'éther puis évaporé à sec.

3-amino-6-phényl-4-(3-phénylpropyl)pyridazine 143b

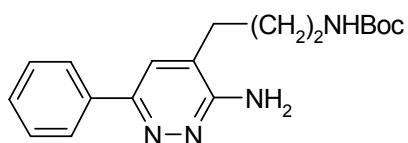


$C_{18}H_{17}N_3$
 275,36 g.mol⁻¹
 poudre beige
 Rdt : 75 %

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 2,9-3,2 (m, 4 H, 2 CH₂); 6,78 (s large, 2H, NH₂); 7,1-7,6 (m, 9H, ArH et H5); 7,7-7,9 (m, 2H, ArH).

***tert*-butyl 3-(3-amino-6-phénylpyridazin-4-yl)propylcarbamate 143d**



C₁₈H₂₄N₄O₂
 328,42 g.mol⁻¹
 poudre beige
 Rdt : 50 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,49 (s, 9H, 3 CH₃); 1,94 (m, 2H, CH₂); 2,57 (t, J = 7,6, 2H, CH₂); 3,28 (m, 2H, CH₂); 5,03 (s large, 1H, NH); 5,19 (s large, 2H, NH₂); 7,4-7,6 (m, 4H, ArH et H5); 7,97 (m, 2H, ArH).

Partie expérimentale :

Chapitre III

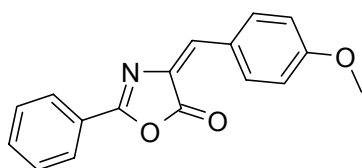
Mode opératoire général pour la préparation des oxazolones 148 :

Un mélange de 30 mmoles d'aldéhyde, 30 mmoles de N-acétylglycine ou N-aroyleglycine et 30 mmoles d'AcONa dans 12 mL d'anhydride acétique est chauffé jusqu'à ce que la solution soit limpide. La solution est agitée 100°C pendant 2 h, puis 50 mL d'EtOH sont ajoutés. Le mélange est agité 12h à T.A., le précipité est filtré et lavé avec 10 mL d'EtOH glacé puis avec 10 mL d'eau chaude. Le produit obtenu est séché sous vide.

Voir le Tableau 1.

Isomérisation de l'oxazolone 148o :

Une suspension de 0,2 g d'oxazolone **148o** (0,72 mmol) dans 5 mL de CH₂Cl₂ anhydre est refroidie à -78°C. Une solution de BBr₃ 1M (2,15 mL, 2,15 mmol, 3 éq) est alors ajoutée au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est ensuite agité à -78°C pendant 1/2h, puis à 0°C pendant 2h. Le mélange réactionnel est alors basifié avec une solution de NaOH 1N puis acidifié avec une solution d'HCl 1N, et extrait avec 10 mL d'AcOEt. La phase organique est évaporée à sec et l'oxazolone **148o'** obtenue est séchée sous vide.

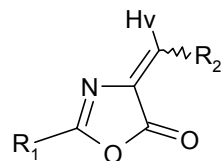
(4E)-4-(4-méthoxybenzylidene)-2-phényl-1,3-oxazol-5(4H)-one 148o'

C₁₇H₁₃NO₃
279,30 g.mol⁻¹
solide jaune

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,86 (s, 3H, OCH₃); 7,11 (d, J = 8,8, 2H, ArH); 7,5-7,7 (m, 3H, ArH); 7,73 (s, 1H, CHv-Ph); 7,9-8,1 (m, 2H, ArH); 8,28 (d, J = 8,8, 2H, ArH)

ESMS m/z : 280 (M+H).



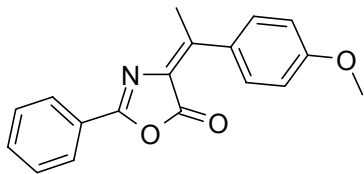
Cposé (code gfp)	R ₁	R ₂	Rdt %	PF °C (lit)	Données analytiques
148a (10-99)	4-OCOMePh	Me	50	130-131	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 2,32 (s, 3H, COCH ₃); 2,41 (s, 3H, CH ₃); 7,11 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,18 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 8,11 (d, J = 8,7, 2H, ArH)
148b (6-99)	4-OCOMePh	Ph	70	171-174	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 2,35 (s, 3H, COCH ₃); 7,2-7,3 (m, 3H, ArH); 7,5-7,7 (m, 3H, ArH); 8,1-8,3 (m, 4H, ArH)
148c (9-99)	4-OCOMePh	3,4-diOMePh	70	175-178	jaune ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 2,35 (s, 3H, COCH ₃); 4,00 (s, 3H, OCH ₃); 4,01 (s, 3H, OCH ₃); 7,00 (d, J = 8,6, 1H, ArH); 7,2-7,3 (m, 3H, ArH et CH _v -Ph); 7,64 (m, 1H, ArH); 7,84 (m, 1H, ArH); 8,22 (m, 2H, ArH)
148d (5-99)	Ph	Ph	70	168-171 (168)	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 7,37 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,5-7,7 (m, 6H, ArH) ; 8,2-8,3 (m, 4H, ArH) ¹³ C-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 126,54 (C) ; 129,34 (2 CHAr) ; 129,89 (4 CHAr) ; 132,17 (CHAr) ; 132,76 (CHAr) ; 133,44 (3 CHAr) ; 134,23 (C) ; 134,32 (CHAr) ; 134,47 (C) ; 164,62 (C) ; 168,62 (C)
148e (30-99)	Ph	3,4-diOMePh	87	165-167 (169)	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 4,02 (s, 3H, OCH ₃) ; 4,05 (s, 3H, OCH ₃) ; 7,03 (d, J = 9, 1H, ArH) ; 7,24 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,4-7,7 (m, 4H, ArH) ; 7,8-7,9 (m, 1H, ArH); 8,1-8,3 (m, 2H, ArH). Calculé C% 69,89 H% 4,89 N% 4,53; trouvé C% 69,65 H% 5,16 N% 4,43.

148f (33-99)	4-N(Me) ₂ Ph	Ph	60	218-221	Orange ¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 3,12 (s, 6H, N(CH ₃) ₂) ; 6,75 (d, J = 9, 1H, ArH) ; 7,23 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,4-7,6 (m, 3H, ArH) ; 8,1-8,2 (m, 4H, ArH)
148g (34-99)	4-N(Me) ₂ Ph	3,4-diOMePh	62	226-229	Orange ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 3,10 (s, 6H, N(CH ₃) ₂) ; 3,97 (s, 3H, OCH ₃) ; 4,00 (s, 3H, OCH ₃) ; 6,75 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 6,97 (d, J = 8, 1H, ArH) ; 7,16 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,53 (d, J = 2, 1H, ArH) ; 7,78 (dd, J = 2 et 8, 1H, ArH) ; 8,12 (d, J = 9, 2H, ArH)
148h (59-00)	4-CNPh	Me	40	194-196	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, DMSO) δ 2,41 (s, 3H, CH ₃) ; 7,27 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,94 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 8,31 (d, J = 8,3, 2H, ArH)
148i (58-00)	4-CNPh	Ph	84	287-289 (226)	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, DMSO) δ 7,39 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,5-7,8 (m, 3H, ArH) ; 7,97 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 8,13 (d, J = 8,3, 2H, ArH) ; 8,43 (d, J = 8,1, 2H, ArH). Calculé C% 74,44 H% 3,67 N% 10,22; trouvé C% 74,47 H% 3,67 N% 10,25.
148j (60-00)	4-CNPh	3,4-diOMePh	90	245-249	Jaune ¹ H-RMN (300 MHz, DMSO) δ 3,89 (s, 6H, 2 OCH ₃) ; 7,22 (d, J = 8,4, 1H, H5 de 3,4-diOMePh) ; 7,30 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,58 (s, 1H, H2 de 3,4-diOMePh) ; 7,79 (d, J = 8,4, 1H, H6 de 3,4-diOMePh) ; 7,96 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 8,43 (d, J = 8,4, 2H, ArH). Calculé C% 68,26 H% 4,22 N% 8,38; trouvé C% 68,30 H% 4,22 N% 8,48.
148k (95-04)	4-CNPh	4-NHAcPh	75	242-244	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, DMSO) δ 2,10 (s, 3H, NHCOCH ₃) ; 7,29 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,82 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 7,93 (d, J = 8,5, 2H, ArH) ; 8,07 (d, J = 8,8, 2H, ArH) ; 8,42 (d, J = 8,3, 2H, ArH) ; 10,43 (s large, 1H, NH). Calculé avec 0,3 H ₂ O C% 67,77 H% 4,07 N% 12,48; trouvé C% 67,73 H% 4,04 N% 12,50.

148l (76-01)	4-COOMePh	Ph	60	193-195	Jaune ¹ H-RMN (300 MHz, DMSO) δ 3,88 (s, 3H, CH ₃); 7,39 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,5-7,9 (m, 3H, ArH); 8,06 (d, J = 8,4, 2H, ArH); 8,16 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 8,41 (d, J = 8,4, 2H, ArH). Calculé C% 70,13 H% 4,26 N% 4,56; trouvé C% 70,38 H% 4,35 N% 4,61.
148m (77-01)	4-COOMePh	3,4-diOMePh	72	206-208	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, DMSO) δ 3,96 (s, 3H, CH ₃); 4,00 (s, 3H, OCH ₃) ; 4,01 (s, 3H, OCH ₃) ; 7,01 (d, J _o = 8,6, 1H, H5 de 3,4-diOMePh); 7,18 (s, 1H, CH _v -Ph) ; 7,65 (d, J _m = 2, 1H, H2 de 3,4-diOMePh); 7,86 (dd, J _o = 8,6 et J _m = 2, 1H, H6 de 3,4-diOMePh); 8,13 (d, J = 8,6, 2H, ArH); 8,25 (d, J = 8,6, 2H, ArH). Calculé C% 65,39 H% 4,66 N% 3,81; trouvé C% 65,30 H% 4,76 N% 3,79.
148n	2-OMePh	Ph	59	nd	Jaune ¹ H-RMN (300 MHz, DMSO) δ 3,90 (s, 3H, OCH ₃); 7,1-7,2 (m, 2H, ArH); 7,4-7,7 (m, 5H, ArH); 8,0-8,2 (m, 2H, ArH); 8,7-8,8 (m, 1H, ArH)
148o	4-OMePh	Ph	52	nd	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, DMSO) δ 3,88 (s, 3H, OCH ₃); 7,14 (d, J = 8,8, 2H, ArH); 7,36 (s, 1H, CH _v -Ph); 7,6-7,8 (m, 3H, ArH); 8,14 (m, 2H, ArH); 8,33 (d, J = 8,8, 2H, ArH)
148p	2,4-diOMePh	Ph	67	nd	Jaune ¹ H-RMN (300 MHz, DMSO) δ 3,88 (s, 3H, OCH ₃); 3,92 (s, 3H, OCH ₃); 6,67 (d, J _m = 2,5, 1H, ArH); 6,75 (dd, J _o = 9, J _m = 2,5, 1H, ArH); 7,51 (s, 1H, CH _v -Ph); 7,5-7,7 (m, 3H, ArH); 8,08 (m, 2H, ArH); 8,78 (d, J = 9, 1H, ArH)
148q (8-99)	N-(Ac)indol-3-yl	3,4-diOMePh	50	224-226	Jaune ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) δ 2,81 (s, 3H, COCH ₃); 4,00 (s, 6H, 2 OCH ₃); 7,02 (d, J = 8,7, 1H, ArH); 7,4-7,5 (m, 3H, ArH); 7,62 (d, J = 1,9, 1H, ArH); 7,8-7,9 (m, 2H, ArH); 8,47 (m, 1H, ArH); 8,77 (m, 1H, ArH)

nd : non déterminé

Tableau 1: Caractéristiques analytiques des oxazolones **148**

4-[1-(4-méthoxyphényl)éthylidène]-2-phényl-1,3-oxazol-5(4H)-one 149

$C_{18}H_{15}NO_3$
 293,33 g.mol⁻¹
 solide jaune

Synthèse en présence d'acétate de plomb :

Un mélange de 8,38 g de *p*-méthoxyacétophénone (56 mmoles, 10 équ), 1 g d'acide hippurique (5,6 mmoles, 1 équ), 1,58 ml d'anhydride acétique (16,8 mmoles, 3 équ) et 1,24 g de Pb(OAc)₄ (2,8 mmoles, 0,5 équ) dans 5 mL de THF anhydre est porté à reflux pendant 24 h. Après ajout de 60 mL d'eau glacée, le mélange est extrait avec 3 x 50mL de trichlorométhane. Après lavage avec 20 mL de NaHCO₃, séchage sur sulfate de sodium, filtration, évaporation de la phase organique, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/Hexane 1/6).

Rdt = 5 % (E/Z = 30/70).

Synthèse en présence d'acide sulfurique :

A un mélange de 5,37 g (30 mmoles, 1 équ) d'acide hippurique et 8,51 ml (90 mmoles, 3 équ) d'anhydride acétique refroidit à 10°C sont ajoutés, goutte à goutte, 3,22 ml d'acide sulfurique concentré, puis 5,07 g (33 mmoles, 1,1 équ) de *p*-méthoxyacétophénone. Après avoir laisser revenir à T.A., le mélange est chauffé à 60°C pendant 15 min puis laissé 12 heures à T.A.. L'huile marron obtenue est précipitée dans un mélange glace/eau (50 ml). Le précipité jaune formé est filtré puis lavé avec 20 ml d'eau glacée puis 20 ml d'eau bouillante et enfin recristallisé dans l'EtOH. (E/Z = 90/10).

Rdt = 70%

(4E)-4-[1-(4-méthoxyphényl)éthylidène]-2-phényl-1,3-oxazol-5(4H)-one 149E (gfp22-99)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 2,66 (s, 3H, CH₃); 3,87 (s, 3H, OCH₃); 6,96 (d, J = 7, 2H, ArH); 7,4-7,6 (m, 5H, Ar) ; 8,11 (d, J = 7, 2H, Ar).

^{13}C -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 23,17 (CH_3) ; 55,74 (OCH_3) ; 113,91 (2 CHAr) ; 126,50 (C) ; 128,11 (2 CHAr) ; 129,23 (2 CHAr) ; 129,60 (C) ; 130,77 (2 CHAr) ; 131,32 (C) ; 132,89 (CHAr) ; 152,86 (C) ; 160,40 (COMe) ; 161,53 (C) ; 164,91 (CO).

(4Z)-4-[1-(4-méthoxyphényl)éthylidène]-2-phényl-1,3-oxazol-5(4H)-one 149Z (gfp21-99)

Un mélange 0,3g de **149E** dans 15 ml de pyridine est agité 15 min à T.A. puis est précipité dans 20 ml d' HCl 0,6M et 30 g d'un mélange eau/glacé. Le précipité est filtré et dissout dans l' EtOH chaud. A la solution chaude obtenue, 5 mL d'eau sont ajoutés et le précipité obtenu est filtré. (E/Z = 15/85).

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 2,80 (s, 3H, CH_3) ; 3,91 (s, 3H, OCH_3) ; 7,02 (d, J = 7, 2H, ArH) ; 7,4-7,6 (m, 3H, ArH) ; 8,01 (d, J = 7, 2H, ArH) ; 8,09 (d, J = 7, 2H, ArH).

^{13}C -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 18,29 (CH_3) ; 55,82 (OCH_3) ; 114,01 (2 CHAr) ; 126,42 (C) ; 128,20 (2 CHAr) ; 129,17 (2 CHAr) ; 131,55 (C) ; 132,58 (2 CHAr) ; 132,85 (CHAr) ; 149,13 (C) ; 153,07 (C) ; 160,40 (C) ; 161,60 (C) ; 165,70 (CO).

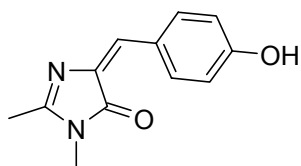
Préparation des imidazolones **151 et/ou des amides **152** à partir des oxazolones **148** :**

Méthode A : A un mélange de 3,3 mmoles d'oxazolone **148** (1 équ.) et de 0,91 g de K_2CO_3 (6,6 mmoles, 2 équ.) dans 10 mL d' EtOH , sont ajoutés 0,42 mL de MeNH_2 (13,2 mmoles, 4 équ.). La solution est chauffée à reflux pendant 12 h. Après refroidissement, le solvant est évaporé, le résidu est dissous dans 10 mL d'eau puis lavé avec 10 mL d' AcOEt . La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH 4 et extraite à l' AcOEt . Après séchage sur Na_2SO_4 , filtration puis évaporation, le solide obtenu est séché sous vide.

Méthode B : Dans un tube scellé, 3,3 mmoles d'oxazolone **148** (1 équ.) et 0,91 g de K_2CO_3 (6,6 mmoles, 2 équ.) sont mis en suspension dans 10mL de THF et 0,42 mL de MeNH_2 (13,2 mmoles, 4 équ.) sont ajoutés. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 h.

Traitement pour les composés **151a**, **151b**, **151d** et **152f** : après refroidissement, le solvant est évaporé, le résidu est dissous dans 10 mL d'eau puis lavé avec 10 mL d' AcOEt . La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH 4 et extraite à l' AcOEt . Après séchage sur Na_2SO_4 , filtration puis évaporation, le solide obtenu est séché sous vide.

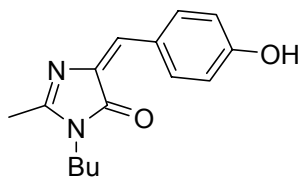
4-(4-hydroxybenzylidène)-1,2-diméthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 151a (gfp1-99)



$C_{12}H_{12}N_2O_2$
 216,24 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 42% (Méthode A)
 70% (Méthode B)
 PF = 230°C (décomp.)

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 2,26 (s, 3H, CH₃); 3,08 (s, 3H, CH₃); 6,79 (d, J = 8,6, 2H, ArH); 6,94 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,91 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 9,32 (s large, 1H, OH).

1-butyl-4-(4-hydroxybenzylidène)-2-méthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 151b (gfp2-99)

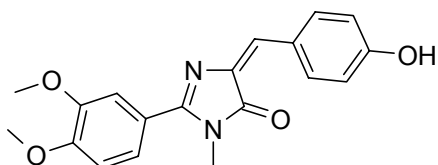


$C_{15}H_{18}N_2O_2$
 258,32 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 50 % (Méthode B)
 PF = 123-125°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO + ε CD₃OD) :
 δ 0,96 (t, J = 7,1, 3H, CH₃) ; 1,2,1-4 (m, 2H, CH₂) ; 1,5-1,7 (m, 2H, CH₂) ; 2,96 (s, 3H, CH₃) ; 3,61 (t, J = 7,3, 2H, CH₂) ; 6,85 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 7,08 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 8,01 (d, J = 8,7, 2H, ArH)

Microanalyse : calculée C% 69,74 H% 7,02 N% 10,84
 trouvée C% 69,53 H% 7,22 N% 10,58

2-(3,4-diméthoxyphényl)-4-(4-hydroxybenzylidène)-1-méthyl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 151d (gfp25-99)



$C_{19}H_{18}N_2O_4$
 338,37 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 16% (Méthode B)
 Rf (AcOEt/hexane 1/1) = 0,5

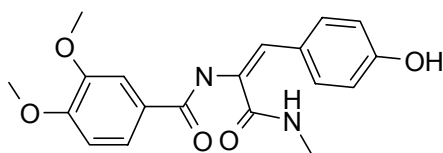
Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) :

δ 3,29 (s, 3H, NCH₃) ; 3,89 (s, 3H, OCH₃) ; 3,90 (s, 3H, OCH₃) ; 6,82 (m, 2H, ArH) ;
 6,89 (d, Jortho = 8,3, 1H, ArH) ; 7,12 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,29 (d, Jméta = 2,3, 1H, ArH) ; 7,32 (m, 1H, ArH) ; 8,05 (m, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 67,44 H% 5,36 N% 8,28
 trouvée C% 67,49 H% 5,39 N% 8,31

N-{2-(4-hydroxyphényl)-1-[(méthylamino)carbonyl]vinyl}-3,4-diméthoxybenzamide 152d



$C_{19}H_{20}N_2O_5$
 356,38 g.mol⁻¹
 solide blanc (Méthode B)
 Rdt : 55 %

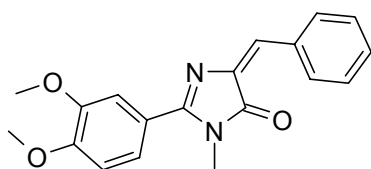
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 2,72 (s, 3H, NHCH₃) ; 3,78 (s, 3H, OCH₃) ; 3,80 (s, 3H, OCH₃) ; 6,63 (d, J = 6,7, 2H, ArH) ; 6,94 (d, J = 8,3, 1H, ArH) ; 7,17 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,31 (d, J = 6,8, 2H, ArH) ; 7,4-7,6 (m, 2H, ArH).

¹³C RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 27,34 (NHCH₃) ; 56,88 (2 OCH₃) ; 112,38 (CH) ; 112,73 (CH) ; 116,95 (2 CH) ;
 123,19 (CH) ; 126,96 (C) ; 127,44 (C) ; 127,78 (C) ; 132,81 (CH) ; 132,99 (2 CH) ;
 150,66 (C) ; 154,36 (C) ; 160,40 (C) ; 169,48 (C) ; 169,66 (C).

4-benzylidène-2-(3,4-diméthoxyphényl)-1-méthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 151e
(gfp46-99)



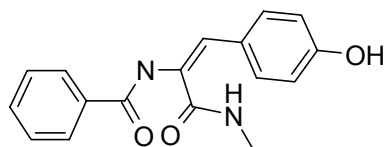
C₁₉H₁₈N₂O₃
322,37 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt = 30 % (Méthode B)

Après refroidissement, le milieu est filtré et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/1).

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 3,34 (s, 3H, NCH₃) ; 3,89 (s, 6H, OCH₃) ; 7,14-7,21 (m, 3H, ArH + CH_v-Ph) ; 7,43-7,61 (m, 5H, ArH) ; 8,30 (m, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 70,79 H% 5,63 N% 8,69
trouvée C% 70,47 H% 5,61 N% 8,64

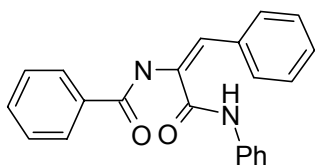
N-{2-(4-hydroxyphényl)-1-[(méthylamino)carbonyl]vinyl}benzamide 152f



C₁₇H₁₆N₂O₃
296,33 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 55 % (Méthode B)
Rf (AcOEt) = 0,26

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :
δ 2,65 (d, J = 4,5, 3H, NHCH₃) ; 6,69 (d, J = 8,8, 2 H, ArH) ; 7,18 (s, 1 H, CH_v-Ph) ; 7,39 (d, J = 8,8, 2 H, ArH) ; 7,52 (m, 3H, ArH) ; 7,9-8,1 (m, 3H, ArH) ; 9,77 (s large, 2H, NH éch.).

***N*-[1-(anilincarbonyl)-2-phénylvinyl]benzamide 152g**

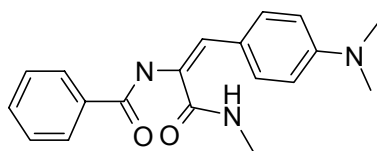


$C_{22}H_{18}N_2O_2$
 342,40 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 65 %
 Rf (AcOEt/hexane 1/3) = 0,2

Dans un tube scellé, dissoudre 0,5g (2 mmoles) d'oxazolone **148d** dans 12 mL de benzène anhydre et ajouter 0,55 mL (6 mmoles, 3 éq) d'aniline. Chauffer à reflux pendant 20h. Laisser refroidir et filtrer le précipité obtenu. Le laver avec du benzène et le sécher sous vide.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :
 δ 7,01 (m, 1H, ArH) ; 7,1 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,1-7,3 (m, 5H, ArH) ; 7,3-7,6 (m, 7H, ArH) ; 7,82 (m, 2H, ArH).

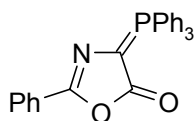
***N*-{2-[4-(diméthylamino)phényl]-1-[(méthylamino)carbonyl]vinyl}benzamide 152h**



$C_{19}H_{21}N_3O_2$
 323,40 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 100 % (Méthode B)
 Rf (AcOEt) = 0,25

Après refroidissement le précipité formé est filtré, lavé à l'eau puis à l'éther et séché sous vide.

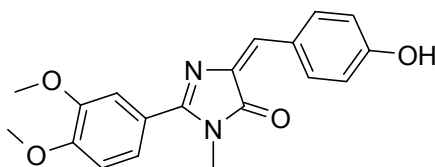
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 2,65 (d, J = 4, 3H, NHCH₃) ; 2,88 (s, 6H, NH(CH₃)₂) ; 6,62 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 7,21 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,40 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 7,5-7,6 (m, 3H, ArH) ; 7,7-7,8 (m, 1H, NHCH₃) ; 7,5-7,6 (m, 3H, ArH) ; 8,0-8,1 (m, 2H, ArH) ; 9,69 (s, 1H, NHCOPh).

Synthèse du 4-phosphoranylidène-5(4H)-oxazolone 150 :

$C_{27}H_{20}NO_2P$
 421,44 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 71%
 PF = 180-182°C (lit. = 186-187°C).

A une suspension de 9,6 mmoles de N-benzoylglycine dans 20 mL de CH₂Cl₂, sont ajoutés 8 mmoles de DCC. Le mélange est agité pendant 3h. La dicyclohexylurée formée est filtrée et le CH₂Cl₂ est évaporé à sec. L'oxazolone obtenue est dissoute dans 10 mL de CH₂Cl₂. Une solution de 9,6 mmoles de Br₂ dans 5 mL de CH₂Cl₂ à 0°C est ajoutée à un mélange de 9,6 mmoles de PPh₃ dans 30 mL de CH₂Cl₂. La suspension est agitée à TA pendant 30 min puis refroidie à 0°C avant l'ajout de 24 mmoles de TEA et de la solution d'oxazolone préalablement préparée. Le mélange est agité pendant 12 h à TA, puis 30 mL de benzène sont ajoutés. Après filtration, le filtrat est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris dans 10 mL d'eau et extrait 3 fois avec 10 mL de benzène chaud. La phase organique est évaporée à sec et le produit jaune obtenu est recristallisé dans le benzène.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 7,2-7,9 (m, 20H, Ar).

Cyclisation des amides**2-(3,4-diméthoxyphényl)-4-(4-hydroxybenzylidène)-1-méthyl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 151d (gfp25-99)**

$C_{19}H_{18}N_2O_4$
 338,37 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 37%
 Rf (AcOEt/hexane 2/1) = 0,5

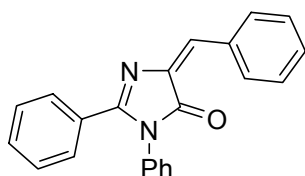
Dans un ballon, 20 mg d'amide sont mis en suspension dans 1 mL de diphényl'éther. Chauffer à 270°C pendant 15 min dans un bain de wood. Laisser refroidir puis filtrer. Ajouter 2 mL d'hexane au filtrat et filtrer le précipité obtenu. Chromatographier le produit obtenu sur silice (éluant : AcOEt/hexane 2/1).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 3,39 (s, 3H, NCH_3) ; 3,98 (s, 3H, OCH_3) ; 3,99 (s, 3H, OCH_3) ; 6,31 (s large, 1H, OH) ; 6,90 (m, 2H, ArH) ; 7,00 (d, Jortho = 8,3, 1H, ArH) ; 7,22 (s, 1H, CHv-Ph) ; 7,40 (d, Jméta = 2,3, 1H, ArH) ; 7,43 (m, 1H, ArH) ; 8,16 (m, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 67,44 H% 5,36 N% 8,28
trouvée C% 67,49 H% 5,39 N% 8,31

4-benzylidène-1,2-diphényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one **151g** (gfp28-00)



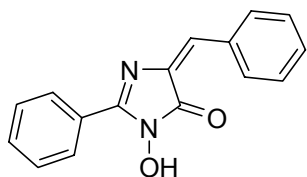
$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$
324,39 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 32 % (sans PhNH_2)
Rdt : 74 % (avec PhNH_2)
 R_f (AcOEt/hexane 1/3) = 0,65
PF = 175-178°C

Dans un ballon sec et sous argon, dissoudre 200 mg (0,58 mmole) d'amide dans 2 mL d'acide acétique et ajouter 52 mg (0,63 mmole, 1,1 éq) d'AcONa fusionné et 0,158 mL d'aniline (1,74 mmoles, 3 éq). Chauffer à reflux pendant 20h. Evaporer l'acide acétique, ajouter 5 mL d'eau et extraire avec 5 mL d'AcOEt. Evaporer à sec puis chromatographier le produit obtenu sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/3).

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 7,24 (m, 2H, ArH) ; 7,31 (s, 1H, CH-Ph) ; 7,31-7,52 (m, 9H, ArH) ; 7,63 (m, 2H, ArH) ; 8,34 (m, 2H, ArH).

4-benzylidène-1-hydroxy-2-phényl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 151i (gfp29-99)



C₁₆H₁₂N₂O₂
 264,29 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 30%
 PF = 208-210°C

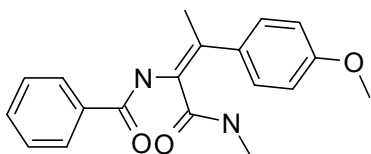
Une suspension de 200 mg d'amide (0,75 mmole) dans 6 mL d'HCl 3N est chauffée à reflux pendant 30 min puis agitée à T.A. pendant une nuit. Le précipité obtenu est filtré puis recristallisé dans l'EtOH.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) :
 δ 7,21 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,3-7,5 (m, 6H, ArH) ; 8,1-8,3 (m, 4H, ArH).

Mode opératoire général pour la préparation des amides 153a-b :

Sous atmosphère d'argon, à une solution de 0,682 mmole (1éq) d'oxazolone **149Z/E** (70/30) dans 10 ml de benzène anhydre sont ajoutés 4,09 mmoles (6 éq) d'amine. La solution est chauffée à reflux pendant 20 h. Après refroidissement, le précipité formé est filtré, lavé au benzène puis à l'éther et séché sous vide.

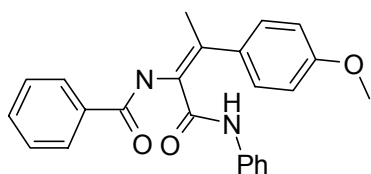
N-{2-(4-méthoxyphényl)-1-[(méthylamino)carbonyl]prop-1-enyl}benzamide 153a



C₁₉H₂₀N₂O₃
 324,38 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 64 % (mélange Z/E 70/30)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :
 δ 2,14 (s, 3H, (E) CH₃) ; 2,25 (s, 3H, (Z) CH₃) ; 2,60 (d, J = 5, 3H, (E) NCH₃) ; 2,97 (d, J = 5, 3H, (Z) NCH₃) ; 3,80 (s, 3H, (E) OCH₃) ; 3,83 (s, 3H, (Z) OCH₃) ; 6,87 (d, J = 7, 2H, ArOMe) ; 7,1-7,6 (m, 7H, Ar).

***N*-[1-(anilincarbonyl)-2-(4-méthoxyphényl)prop-1-enyl]benzamide 153b**



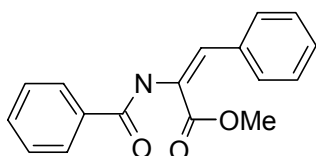
$C_{24}H_{22}N_2O_3$
 386,45 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 62 % (mélange Z/E 70/30)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) :
 δ 2,15 (s, 3H, (E) CH₃) ; 2,25 (s, 3H, (Z) CH₃) ; 3,73 (s, 3H, (E) OCH₃) ; 3,75 (s, 3H, (Z) OCH₃) ; 6,82 (m, 2H, ArH) ; 7,1-7,6 (m, 10H, Ar) ; 7,90 (m, 2H, ArH).

Mode opératoire général pour la préparation des esters 155a-b :

A une suspension de 1g d'oxazolone **148d** dans 20 mL d'EtOH ou de MeOH sont ajoutés 3,64 mL de NaOH 1N. La solution est agitée à TA pendant 2h puis acidifiée jusqu'à pH 1. Le solide blanc formé est filtré et séché sous vide (Rdt quantitatif).

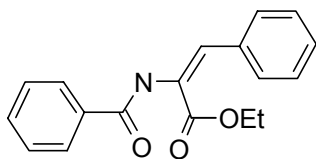
2-(benzoylamino)-3-phénylacrylate de méthyle 155a



$C_{17}H_{15}NO_3$
 281,31 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 100 %

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :
 δ 3,74 (s, 3H, CH₃) ; 7,16 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,2-7,5 (m, 10H, ArH).

2-(benzoylamino)-3-phénylacrylate d'éthyle 155b



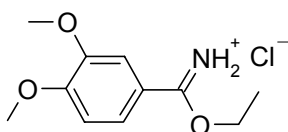
$C_{18}H_{17}NO_3$
295,34 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 100 %

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 1,39 (t, J = 7, 3H, CH₃); 4,38 (q, J = 7, 2H, CH₂); 7,15 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,2-7,5 (m, 10H, ArH).

Mode opératoire général pour la préparation des iminoéthers 160 :

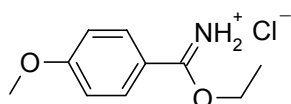
Une solution de 12,26 mmoles de nitrile dans un mélange d'EtOH absolu et de benzène anhydre (50/50), est refroidie dans un bain de glace puis HClg est additionné au milieu pendant 30 minutes. Le mélange est agité 12 heures à 0°C, 8 h à T.A. puis 30 mL d'éther anhydre sont ajoutés et le précipité obtenu est filtré.

chlorhydrate de 3,4-diméthoxybenzèncarboximidoate d'éthyle 160a

$C_{11}H_{16}ClNO_3$
 245,71 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 92 %

¹H-RMN (200 MHz, D₂O) :

δ 1,47 (t, J = 7, 3H, OCH₂CH₃); 3,79 (s, 3H, OCH₃) ; 3,82 (s, 3H, OCH₃) ; 4,48 (q, J = 7, OCH₂CH₃); 7,01 (d, Jortho = 9, 1H, H2); 7,30 (d, Jméta = 2, 1H, H5); 7,56 (dd, Jméta = 2, Jortho = 9, 1H, H6)

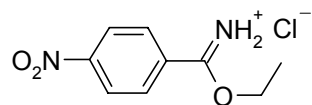
chlorhydrate de 4-méthoxybenzèncarboximidoate d'éthyle 160b

$C_{10}H_{14}ClNO_2$
 215,68 g.mol⁻¹
 solide rosé
 Rdt : 89 %

¹H-RMN (200 MHz, D₂O) :

δ 1,51 (t, J = 6,8, 3H, CH₃) ; 3,87 (s, 3H, OCH₃) ; 4,54 (q, J = 7, 2H, OCH₂) ; 7,08 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 7,92 (d, J = 9, 2H, ArH).

chlorhydrate de 4-nitrobenzèncarboximidoate d'éthyle 160c



$C_9H_{11}ClN_2O_3$
230,65 g.mol⁻¹
solide blanc
Rdt : 50 %

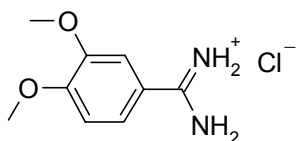
¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) :

δ 1,65 (t, J = 7 , 3H, OCH₂CH₃) ; 4,70 (q, J = 6,9, 2H, OCH₂) ; 8.27 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 8.48 (d, J = 9, 2H, ArH).

Mode opératoire général pour la préparation des benzamidines 161 :

Dans un ballon sec, 6,1 mmoles d'iminoéther sont mises en suspension dans 40 ml d'EtOH puis NH_3g est additionné au milieu pendant 10 minutes. Le mélange est chauffé à 35-40°C pendant 12 heures. Après refroidissement, le précipité formé est filtré.

chlorhydrate de 3,4-diméthoxybenzamidine 161a

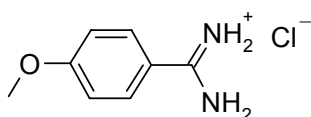


$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$
 216,67 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 55 %
 PF = 245-247°C

¹H-RMN (300 MHz, D₂O) :

δ 3,80 (s, 3H, OCH₃) ; 3,83 (s, 3H, OCH₃) ; 7,03 (d, J = 9, 1H, H2); 7,23 (d, J = 2, 1H, H5); 7,35 (dd, Jméta = 2, Jortho = 9, 1H, H6)

chlorhydrate de 4-méthoxybenzamidine 161b



$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$
 186,64 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 58 %

¹H-RMN (200 MHz, D₂O) :

δ 3,88 (s, 3H, OCH₃) ; 7,10 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 7,56 (d, J = 9, 2H, ArH).

Préparation des imidazolones 159 à partir des amidines 161.

Méthode A

Une solution de 2,5 mL de chloroacétate d'éthyle (0,024 mole, 2,4 équ.) et 3,6g de NaI (0,024 mole, 2,4 équ.) est portée à reflux dans 5 mL d'isopropanol pendant 1 h. Après refroidissement 1,6 équ. de benzamidine **161**, 1 équ. d'aldéhyde, 5 équ. d'hydrogénocarbonate de sodium et 15 mL d'isopropanol sont ajoutés au mélange. Celui-ci est porté à reflux pendant 1 h. Le précipité formé est filtré et lavé 3 fois avec 10 mL d'éthanol puis 3 fois avec de l'eau et enfin à nouveau avec de l'éthanol puis il est séché sous vide.

Méthode B

A une solution de 16 mmoles (1,6 équ.) de benzamidine **161**, 10 mmoles (1 équ.) d'aldéhyde, 40 mmoles (4 équ.) de NaHCO₃ dissous dans 20 mL de n-propanol sont ajoutés 2,5 mL (23 mmoles, 2,3 équ.) de chloroacétate d'éthyle. La solution est chauffée à reflux pendant 1h. Les cristaux formés lors du refroidissement sont filtrés puis lavés avec 5 mL d'EtOH, avec 10 mL d'eau et à nouveau avec 5 mL d'EtOH puis il est séché sous vide.

Méthode C

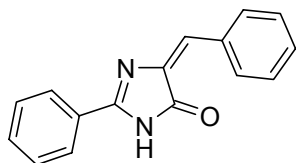
Une solution de 2,5 mL de chloroacétate d'éthyle (0,024 mole, 2,4 équ.) et 3,6g de NaI (0,024 mole, 2,4 équ.) dans 5 mL d'EtOH est portée à reflux pendant 1 h. Après refroidissement 1,6 équ. de benzamidine **161**, 1 équ. d'aldéhyde, 5 équ. d'éthanolate de sodium et 15 mL d'EtOH sont ajoutés au mélange. Celui-ci est porté à reflux pendant 12 h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié sur chromatographie sur silice (éluant : AcOEt/hexane 1/1).

Méthode D

Une solution de 2,5 mL de chloroacétate d'éthyle (0,024 mole, 2,4 équ.) et 3,6g de NaI (0,024 mole, 2,4 équ.) dans 5 mL de DMF est chauffée à 110°C pendant 1 h. Après refroidissement 1,6 équ. de benzamidine **161**, 1 équ. d'aldéhyde, 5 équ. de K₂CO₃ et 10 mL de DMF sont ajoutés au mélange. Celui-ci est chauffé à 110°C pendant 12 h. Après refroidissement 100 mL d'eau et 100 mL d'éther sont ajoutés au milieu. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée à sec. Le solide obtenu est trituré dans l'AcOEt, filtré puis séché sous vide.

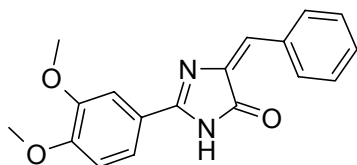
Préparation des imidazolones 159 à partir des iminoéthers 160.**Méthode E**

A une suspension de 2,48 mmoles (1,5 éq.) de chlorhydrate de glycinate d'éthyle, 1,86 mmoles (1,13 éq.) d'iminoéther **160** et 4,84 mmoles (2,93 éq.) de NaHCO₃ agitée jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène, sont ajoutés 5 mL de benzène anhydre puis 1,65 mmoles (1 éq.) d'aldéhyde. Le mélange est chauffé à 70-80°C pendant 1,5h. Après refroidissement le précipité formé est filtré et lavé avec 5 mL d'EtOH chaud puis avec 5 mL d'eau et à nouveau avec 5 mL d'EtOH chaud puis séché sous vide.

4-benzylidène-2-phényl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159a (gfp17-99)

C₁₆H₁₂N₂O
 248,29 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 77 % (Méthode A)
 PF = 263-264°C (lit : 274°C)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 6,98 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,4-7,6 (m, 6H, ArH); 8,17 (d, J = 6, 2H, ArH); 8,29 (d, J = 7, 2H ArH).

4-benzylidène-2-(3,4-diméthoxyphényl)-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159b (gfp19-00)

C₁₈H₁₆N₂O₃
 308,34 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 27% (Méthode A)
 Rdt = 40% (Méthode B)
 PF = 231-234°C

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,93 (s, 6H, OCH₃) ; 7,00 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,23 (d, J = 6, 2H, ArH) ; 7,4-7,6 (m, 3H, ArH) ; 7,78 (d, J = 2, 1H, ArH) ; 7,88 (dd, J = 9, 2H, ArH) ; 8,35 (d, J = 5, 1H, ArH).

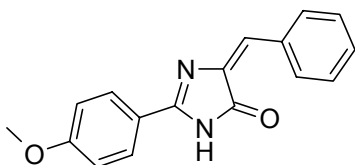
¹³C-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 56,08 (OCH₃) ; 56,13 (OCH₃) ; 110,65 (CH_v-Ph) ; 112,13 (CHAr) ; 120,51 (CHAr) ; 121,77 (CHAr) ; 123,90 (CHAr) ; 129,07 (2 CHAr) ; 130,03 (C) ; 132,21 (2 CHAr) ; 134,91 (CHAr) ; 141,01 (C) ; 149,21 (C) ; 152,93 (C) ; 161,02 (C) ; 172,47 (C).

Microanalyse : calculée C% 69,31 H% 5,30 N% 8,98 (+0,2 H₂O)

trouvée C% 69,30 H% 5,34 N% 8,89

4-benzylidène-2-(4-méthoxyphényl)-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 159c (gfp32-00)



C₁₇H₁₄N₂O₂

278,31 g.mol⁻¹

solide jaune

Rdt = 42% (Méthode A)

Rdt = 77% (Méthode E)

PF = 295-297°C

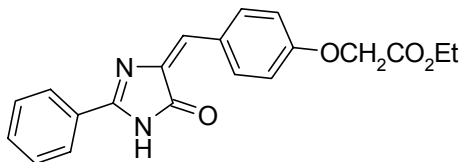
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,87 (s, 3H, OCH₃) ; 6,93 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,12 (d, J = 7, 2H, ArH) ; 7,4-7,6 (m, 3H, ArH) ; 8,14 (d, J = 7, 2H, ArH) ; 8,27 (d, J = 8, 2H, ArH) ; 11,85 (s large, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 69,75 H% 5,37 N% 9,57

trouvée C% 69,34 H% 4,96 N% 9,44

{4-[(5-oxo-2-phényl-1,5-dihydro-4H-imidazol-4-ylidène)méthyl]phénoxy}acétate d'éthyle 159d (gfp7-99)



C₂₀H₁₈N₂O₄

350,38 g.mol⁻¹

solide jaune

Rdt : 70 % (Méthode A)

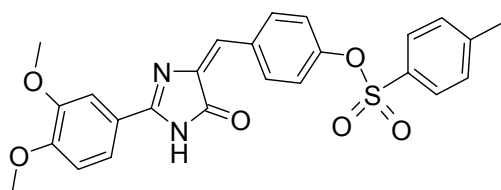
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,29 (t, $J = 10,6$, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,21 (q, $J = 10,6$, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,91 (s, 2H, OCH_2); 7,0-7,1 (m, 3H, ArH); 7,5-7,7 (m, 3H, ArH); 8,1-8,2 (m, 2H, ArH); 8,3-8,4 (m, 2H, ArH)

^{13}C -RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 14,4 (CH_3); 61,1 (CH_2); 65,0 (CH_2); 115, 3 (CH Ar); 116,7 (CH Ar); 127,6 (2 CH Ar); 129,3 (2 CH Ar); 132,6 (CH); 134,9 (2 CH Ar); 128,16 (C); 128,58 (C); 139,33 (C); 159,42 (C); 160,43 (C); 172,62 (CO); 168,81 (CO)

4-méthylbenzènesulfonate de 4-[(5-oxo-2-phényl-1,5-dihydro-4H-imidazol-4-ylidène)méthyle]phényle 159e



$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$

478,53 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide jaune

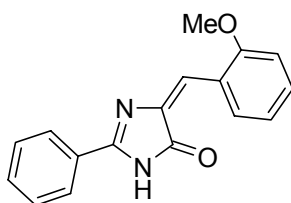
Rdt = 2% (Méthode A)

Rdt = 17% (Méthode C)

^1H -RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 2,45 (s, 3H, CH_3); 3,89 (s, 6H, 2 OCH_3); 6,92 (s, 1H, CHv-Ph); 7,17 (m, 3H, ArH); 7,50 (m, 2H, ArH); 7,72-7,85 (m, 4H, ArH); 8,32 (m, 2H, ArH).

4-(2-hydroxybenzylidène)-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 159f (gfp88-01)



$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

278,31 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide jaune

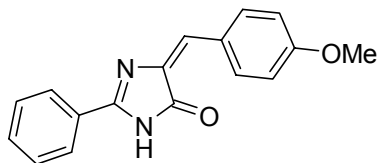
Rdt = 5% (Méthode A)

^1H -RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,94 (s, 3H, OCH_3); 7,14 (m, 2H, ArH); 7,42-7,47 (m, 2H, ArH et CHv-Ph); 7,61-7,68 (m, 3H, ArH); 8,18 (m, 2H, ArH); 8,93 (m, 1H, ArH); 11,81 (s large, 1H, NH éch.).

ESMS m/z : 279 ($\text{M}+\text{H}$).

4-(4-méthoxybenzylidène)-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 159g (gfp11-99)



$C_{17}H_{14}N_2O_2$
 278,31 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 62 % (Méthode A)
 Pf = 274-276°C

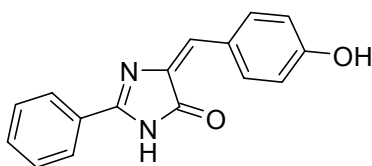
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,83 (s, 3H, OCH₃) ; 6,95 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,06 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 7,5-7,7 (m, 2H, Ar) ; 8,16 (m, 2H, Ar) ; 8,29 (d, J = 9, 2H, Ar).

¹³C-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 55,69 (CH₃) ; 114,73 (CH) ; 124,78 (CH) ; 127,58 (2 CH) ; 129,25 (3 CH) ; 132,37 (CH) ; 134,24 (2 CH) ; 139,72 (C) ; 161,00 (2 C) ; 161,62 (C) ; 173,66 (C).

4-(4-hydroxybenzylidène)-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 162 (gfp11b-99)



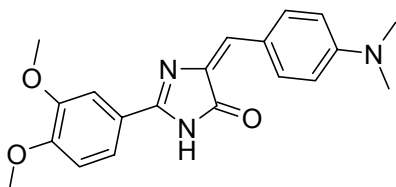
$C_{16}H_{12}N_2O_2$
 264,29 g.mol⁻¹
 solide jaune très peu soluble
 Rdt : 73 %

A une suspension de 0,262g d'imidazolone **159g** (0,94 mmole, 1 éq.) dans 5 mL de CH₂Cl₂ anhydre refroidit à -78°C, 3 mL de BBr₃ 1M/CH₂Cl₂ (3 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant ½ h à -78°C puis 2h à 0°C, puis 5 mL de NaOH 1N sont ajoutés et la phase organique est extraite. La phase aqueuse est acidifiée avec HCl 1N jusqu'à pH 4, extraite avec 5 mL d'AcOEt, puis la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ évaporée à sec.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 6,90 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 6,98 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,5-7,7 (m, 3H, ArH) ; 8,1-8,3 (m, 4H, ArH) ; 10,18 (s large, 1H, NH éch.) ; 12,00 (s, 1H, OH).

2-(3,4-diméthoxyphényl)-4-[4-(diméthylamino)benzylidène]-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159h (gfp39-00)



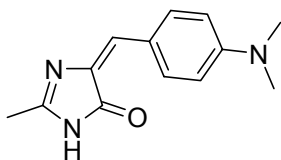
C₂₀H₂₁N₃O₃
 351,41 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 68 % (Méthode B)
 Rf (AcOEt) : 0,6
 PF = 288-291°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,03 (s, 6H, N-(CH₃)₂) ; 3,86 (s, 3H, OCH₃) ; 3,87 (s, 3H, OCH₃) ; 6,79 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 6,84 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,13 (d, J = 8,7, 1H, ArH) ; 7,68 (d, J = 1,9, 1H, ArH) ; 7,74 (dd, 1H, ArH) ; 8,14 (d, J = 8,7, 2H, ArH) ; 11,73 (s large, 1H, NH éch.).

ESMS m/z : 352 (M+H), 374 (M+Na).

4-[4-(diméthylamino)benzylidène]-2-méthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159i (gfp36-00)



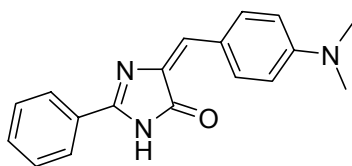
C₁₃H₁₅N₃O
 229,28 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 36 % (Méthode B)
 PF = 244°C (décomp.)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 2,19 (s, 3H, CH₃) ; 2,99 (s, 6H, N-(CH₃)₂) ; 6,73 (m, 3H, ArH et CH_v-Ph) ; 8,02 (d, J = 8,7, 2H, ArH).

ESMS m/z : 230 (M+H), 252 (M+Na).

4-[4-(diméthylamino)benzylidène]-2-phényl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159j
(gfp35-00)

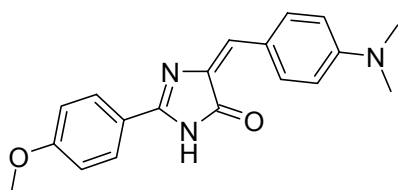


$C_{18}H_{17}N_3O$
291,36 g.mol⁻¹
solide orange peu soluble
Rdt : 68 % (Méthode B)
PF = 282-285°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,06 (s, 6H, N-(CH₃)₂) ; 6,79 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 6,96 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,59 (m, 3H, ArH) ; 8,14 (m, 2H, ArH) ; 8,20 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 11,81 (s large, 1H, NH éch.).

4-[4-(diméthylamino)benzylidène]-2-(4-méthoxyphényl)-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159k
(gfp40-00)



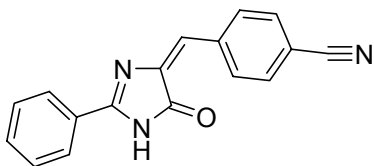
$C_{19}H_{19}N_3O_2$
321,38 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt : 15 % (Méthode B)
PF = 310°C (décomp.)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,05 (s, 6H, N-(CH₃)₂) ; 3,88 (s, 3H, OCH₃) ; 6,81 (d, J = 8,8, 2H, ArH) ; 6,88 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,14 (d, J = 8,8, 2H, ArH) ; 8,09 (d, J = 8,8, 2H, ArH) ; 8,17 (d, J = 8,8, 2H, ArH) ; 11,76 (s large, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 71,01 H% 5,96 N% 13,08
 trouvée C% 70,90 H% 5,96 N% 13,05

4-[4-cyanobenzylidène]-2-phényl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159l (gfp38-00)



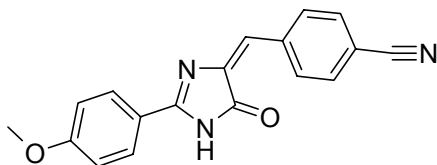
C₁₇H₁₁N₃O
273,30 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 10 % (Méthode B)
Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,5
PF = 285°C (décomp.)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃+CD₃OD) :

δ 7,07 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,58 (m, 3H, ArH) ; 7,72 (m, 2H, ArH) ; 8,10 (m, 2H, ArH) ; 8,35 (m, 2H, ArH).

ESMS m/z : 274 (M+H), 296 (M+Na).

4-[4-cyanobenzylidène]-2-(4-méthoxyphényl)-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159m (gfp42-00)



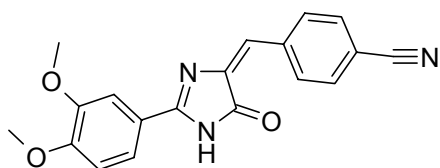
C₁₈H₁₃N₃O₂
303,32 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 50 % (Méthode B)
Rdt : 30 % (Méthode E)
Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,2
PF = 265°C (décomp.)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,92 (s, 3H, OCH₃) ; 7,00 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,21 (d, J = 8,3, 2H, ArH) ; 7,95 (d, J = 7,5, 2H, ArH) ; 8,21 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 8,50 (d, J = 7,5, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 68,04 H% 4,63 N% 13,23 (+ 0,8 H₂O)
trouvée C% 67,99 H% 4,30 N% 13,15

4-[4-cyanobenzylidène]-2-(3,4-diméthoxyphényl)-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159n
(gfp47-00)

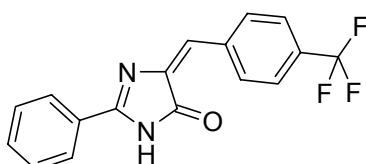


C₁₉H₁₅N₃O₃
333,35 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt = 10% (Méthode B)
Rf (AcOEt/Hexane, 1/1) : 0,42
PF = 298-300°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 3,87 (s, 3H, OCH₃) ; 6,96 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,19 (d, J = 8,3, 1H, ArH) ; 7,72 (m, 1H, ArH) ; 7,82 (m, 1H, ArH) ; 7,90 (d, J = 8,3, 2H, ArH) ; 8,45 (d, J = 8,3, 2H, ArH) ; 12,13 (s large, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 68,46 H% 4,54 N% 12,61
trouvée C% 67,80 H% 4,52 N% 12,42

2-phényl-4-[4-(trifluorométhyl)benzylidène]-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159o
(gfp48-00)

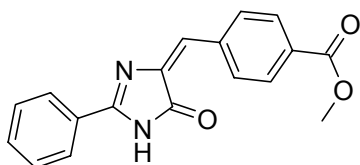


C₁₇H₁₁F₃N₂O
316,29 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt = 35 % (Méthode B)

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 7,11 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,55-7,74 (m, 3H, ArH) ; 7,85 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 8,25 (m, 2H, ArH) ; 8,53 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 12,11 (s large, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 64,56 H% 3,51 N% 8,86
trouvée C% 64,19 H% 3,50 N% 8,95

4-[(5-oxo-2-phényl-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-ylidène)méthyl]benzoate de méthyle 159q (gfp78-01)



$C_{18}H_{14}N_2O_3$

306,32 g.mol⁻¹

solide jaune

Rdt = 17% (Méthode B et E)

Rf (AcOEt/Hexane, 1/1) : 0,3

PF = 262-265°C

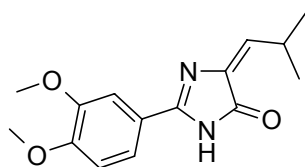
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,88 (m, 3H, OCH₃) ; 7,06 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,59-7,68 (m, 3H, ArH) ; 8,03 (d, J = 8,3, 2H, ArH) ; 8,21 (d, J = 7,2, 2H, ArH) ; 8,43 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 12,22 (s large, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 70,58 H% 4,61 N% 9,15

trouvée C% 70,06 H% 4,54 N% 9,02

2-(3,4-diméthoxyphényl)-4-(2-méthylpropylidène)-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 159r



$C_{15}H_{18}N_2O_3$

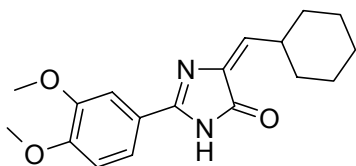
274,32 g.mol⁻¹

solide jaune

Rdt : 10 % (Méthode D)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,18 (s, 3H, CH₃) ; 1,22 (s, 3H, CH₃) ; 3,3-3,5 (m, 1H, CH) ; 3,97 (s, 3H, OCH₃) ; 4,03 (s, 3H, OCH₃) ; 6,42 (d, J = 10, 1H, CH_v-Ph) ; 7,00 (d, J = 8, 1H, H5) ; 7,58 (dd, J = 2 et 8, 1H, H6) ; 7,68 (d, J = 2, 1H, H2) ; 10,88 (s large, 1H, NH éch.).

4-(cyclohexylméthylène)-2-(3,4-diméthoxyphényl)-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 159s (gfp31-00)

$C_{18}H_{22}N_2O_3$
 314,39 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 10 % (Méthode A)
 PF = 227-230°C

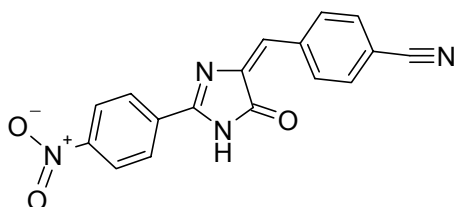
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,1-1,9 (m, 10H, **CH**₂ cyclohexyl) ; 3,07 (m, 1H, **CH** cyclohexyl) ; 3,95 (s, 3H, OCH₃) ; 4,02 (s, 3H, OCH₃) ; 6,42 (d, J = 10, 1H, **CH**_v-Ph) ; 6,98 (d, J = 8, 1H, H5) ; 7,63 (dd, J = 2 et 8, 1H, H6) ; 7,63 (d, J = 2, 1H, H2) ; 11,68 (s large, 1H, **NH** éch.).

¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 25,73 (2 CH₂) ; 26,25 (CH₂) ; 32,59 (2 CH₂) ; 37,53 (CH) ; 55,53 (2 CH₃) ; 109,99 (CH) ; 111,30 (CH) ; 121,13 (CH) ; 140,50 (CH) ; 141,52 (C) ; 149,75 (2 C) ; 152,87 (C) ; 158,34 (C) ; 173,29 (C).

ESMS m/z : 315 (M+H), 337 (M+Na).

4-[4-cyanobenzylidène]-2-(4-nitrophényl)-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 159t (gfp63-00)

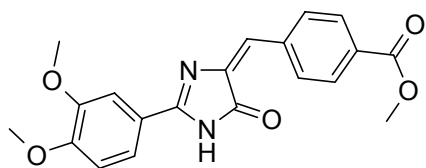
$C_{17}H_{10}N_4O_3$
 318,29 g.mol⁻¹
 solide vert
 Rdt = 25% (Méthode E)
 Rf (AcOEt/Hexane, 1/1) : 0,4

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 7,20 (s, 1H, **CH**_v-Ph) ; 7,85 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 8,3-8,8 (m, 6H, ArH) ; 11,88 (s large, 1H, **NH** éch.).

Microanalyse : calculée C% 58,52 H% 3,87 N% 16,06 (+ 1,7 H₂O)
 trouvée C% 57,85 H% 3,12 N% 16,11

4-{[2-(3,4-diméthoxyphényl)-5-oxo-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-ylidène]méthyl}benzoate de méthyle 159u (gfp57-00)



C₂₀H₁₈N₂O₅
 366,38 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 35% (Méthode E)
 Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,27
 PF = 272-274°C

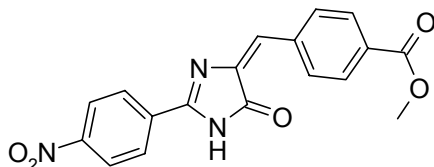
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,87 (m, 9H, 2 OCH₃ et COOCH₃) ; 6,93 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 7,18 (d, Jortho = 8,3, 1H, ArH) ; 7,76 (d, Jméta = 1,9, 1H, ArH) ; 7,84 (m, 1H, ArH) ; 8,03 (d, J = 8,6, 2H, ArH) ; 8,45 (d, J = 8,4, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 63,08 H% 5,19 N% 7,36 (+ 0,8 H₂O)
 trouvée C% 62,85 H% 4,74 N% 7,38

ESMS m/z : 389 (M+Na)

4-{[2-(4-nitrophényl)-5-oxo-1,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-ylidène]méthyl}benzoate de méthyle 159v (gfp68-01)

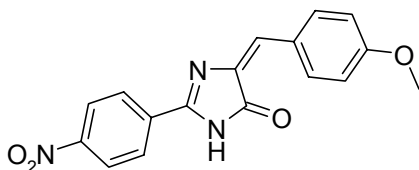


C₁₈H₁₃N₃O₅
 351,32 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 41% (Méthode E)
 Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,3
 PF = 302-304°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,87 (m, 3H, OCH₃) ; 7,14 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 8,02 (d, J = 8,1, 2H, ArH) ; 8,42 (m, 6H, ArH).

4-(4-méthoxybenzylidène)-2-(4-nitrophényl)-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 159w (gfp87-01)



$C_{17}H_{13}N_3O_4$
 323,31 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 15% (Méthode E)

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,84 (s, 3H, OCH₃) ; 7,07 (d, J = 8,8, 2H, ArH) ; 7,12 (s, 1H, CH_v-Ph) ; 8,31 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 8,40 (m, 4H, ArH) ; 12,19 (s large, 1H, NH éch.).

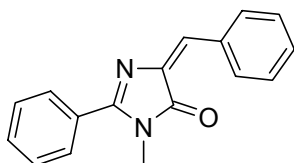
Microanalyse : calculée C% 57,69 H% 4,67 N% 11,87 (+ 1,7 H₂O)
 trouvée C% 57,81 H% 4,55 N% 11,94

ESMS m/z : 324 (M+H).

Alkylation des imidazolones 159a-b :

Une solution de 0,001 mole de **159a-b** (1 éq.) dans 5 mL de solvant est refroidie à 0°C, puis 0,0012 mole d'agent alkylant (1,2 éq.) et 0,048 g de d'hydruure de sodium à 60 % dans l'huile (0,0012 mole, 1,2 éq.) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 2 h puis une nuit à T.A. Après évaporation du solvant, l'huile est reprise avec de l'eau puis extraite avec 50 mL d'AcOEt. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée, puis évaporée à sec.

4-benzylidène-1-méthyl-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 164a (gfp18-99)



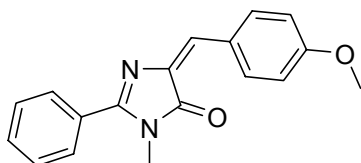
$C_{17}H_{14}N_2O$
 262,31 g.mol⁻¹
 solide jaune très peu soluble
 Rdt : 72 %

Le produit obtenu est chromatographié sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 1/2).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 3,38 (s, 3H, N-CH_3) ; 7,18 (s, 1H, $\text{CH}_v\text{-Ph}$) ; 7,32-7,51 (m, 6H, ArH) ; 7,77-7,82 (m, 2H, ArH) ; 8,14-8,23 (m, 2H, ArH).

4-(4-méthoxybenzylidène)-1-méthyl-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 164b



$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

292,34 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide jaune peu soluble

Rdt : 34 %

PF = 192-197°C

Le produit obtenu est chromatographié sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 1/1).

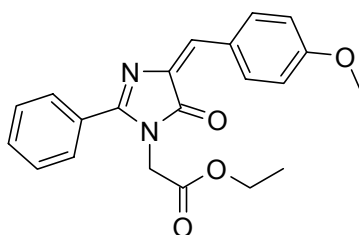
^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 3,36 (s, 3H, NCH_3) ; 3,86 (s, 3H, OCH_3) ; 6,96 (d, $J = 7$, 2H, ArH) ; 7,24 (s, 1H, CH-Ph) ; 7,5-7,6 (m, 3H, ArH) ; 7,8-7,9 (m, 2H, ArH) ; 8,23 (d, $J = 7$, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 73,96 H% 5,52 N% 9,58

trouvée C% 73,38 H% 5,79 N% 9,02

[4-(4-méthoxybenzylidène)-5-oxo-2-phényl-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl]acétate d'éthyle 164c (gfp12-99)



$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$

364,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide jaune peu soluble

Rdt : 39 %

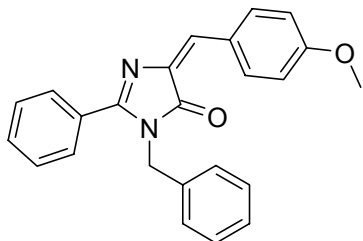
PF = 125-127°C

Le produit obtenu est chromatographié sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 1/1).

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) :

δ 1,21 (t, $J = 7$, 3H, OCH_2CH_3); 3,85 (s, 3H, OCH_3); 4,18 (q, $J = 7$, 2H, OCH_2CH_3); 4,50 (s, 2H, NCH_2COOEt); 6,95 (d, $J = 7$, 2H, ArH) ; 7,27 (s, 1H, $\text{CH}_v\text{-Ph}$) ; 7,5-7,6 (m, 3H, ArH) ; 7,7-7,8 (m, 2H, ArH) ; 8,21 (d, $J = 8$, 2H, ArH).

1-benzyl-4-(4-méthoxybenzylidène)-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 164d



$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$

368,44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide jaune peu soluble

Rdt : 45 %

PF = 151-155°C

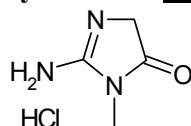
Le produit obtenu est chromatographié sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 1/2).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 3,78 (s, 3H, OCH_3); 4,88 (s, 2H, CH_2Ph); 6,88 (d, $J = 8$, 2H, ArH) ; 7,06 (m, 2H, ArH) ; 7,12-7,28 (m, 4H, ArH + $\text{CH}_v\text{-Ph}$) ; 7,3-7,5 (m, 3H, ArH) ; 7,55-7,65 (m, 2H, ArH) ; 8,15 (d, $J = 8$, 2H, ArH).

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 45,19 (CH_2Ph) ; 55,29 (OCH_3) ; 114,28 (CHPh) ; 126,66 (CHAr) ; 127,19 (C) ; 127,46 (CHAr) ; 128,53 (CHAr) ; 128,61 (CHAr) ; 128,70 (CHAr) ; 129,35 (CHAr) ; 129,51 (C) ; 131,11 (CHAr) ; 136,60 (C) ; 136,83 (C) ; 161,38 (C) ; 161,53 (C) ; 171,64 (C).

Préparation des 2-aminoimidazolin-5-ones 166 à partir de la glycoxyamidine :**chlorhydrate de 2-amino-1-méthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one ou 3-méthylglycoxyamidine 165**

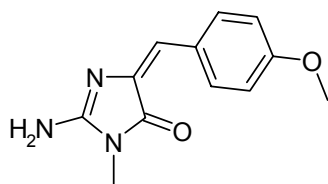
C₄H₈ClN₃O
 149,58 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 75 %
 PF = 293 °C (décomp.)

Une solution de 2 g de S-méthylisothiourée (8,62 mmoles, 1 éq.) dans 5 mL d'eau est ajoutée doucement à un mélange de 0,71 g de glycine (9,47 mmoles, 1,1 éq.) dans 2,37 ml de NaOH 4N (9,47 mmoles, 1,1 éq.) refroidit dans un bain de glace. La solution est agitée à T.A. pendant 12 h, puis évaporée à sec. L'acide aminé formé est récupéré quantitativement.

L'acide aminé dissout dans 15 mL d'HCl 2N est ensuite chauffé à 140°C pendant 18h. Après évaporation de l'eau, le composé est redissout dans de l'EtOH chaud puis précipité avec de l'éther. Le sel obtenu est filtré puis séché sous vide.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 3,04 (s, 3H, NCH₃); 4,14 (s, 2H, CH₂); 9,42 (s large, 2H, NH₂)

ESMS m/z : 114 (M+H).

2-amino-4-(4-méthoxybenzylidène)-1-méthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 166a

C₁₂H₁₃N₃O₂
 231,26 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 30 %

A une solution de 0,4 g de glycoxyamidine **165** (2,67 mmoles, 1éq) et de 0,658 g d'AcONa (8,02 mmoles, 3 éq) dans 2,5 mL d'AcOH, sont ajoutés 325 µL de *p*-méthoxybenzaldéhyde (2,67 mmoles, 1éq). Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 h. Après évaporation du

solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 95/5). Le produit le plus polaire est récupéré et séché sous vide.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

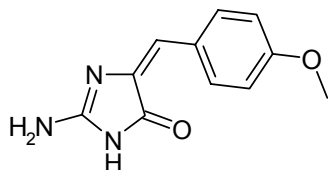
δ 3,06 (s, 3H, NCH₃); 3,80 (s, 3H, OCH₃); 6,39 (s, 1H, CH_v-Ph); 6,95 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,47 (s large, 2H, NH₂); 8,04 (d, J = 9, 2H, ArH).

ESMS m/z : 232 (M+H).

Préparation des 2-aminoimidazolin-5-ones **166** à partir des oxazolones :

A une solution de S-benzylisothiuronium (1,43 mmoles, 1 éq.) et d'oxazolone **148o** ou **148i** (1,43 mmoles, 1 éq.) dans 40 mL d'EtOH à 95%, sont ajoutés 595 µL de TEA (4,3 mmoles, 3 éq.). La solution est chauffée à reflux pendant 4h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans 10 mL d'EtOH. Le solide est filtré et lavé 2x avec 5 mL d'EtOH puis séché sous vide.

2-amino-4-(4-méthoxybenzylidène)-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one **166b**



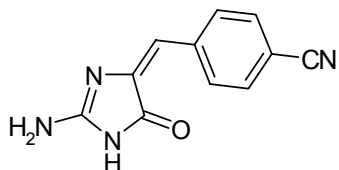
C₁₁H₁₁N₃O₂
 217,23 g.mol⁻¹
 solide jaune pâle
 Rdt : 65 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO+ TFA) :

δ 3,84 (s, 3H, OCH₃); 6,83 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,06 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,66 (d, J = 9, 2H, ArH); 9,07 (s large, 1H, NH); 9,70 (s large, 1H, NH).

ESMS m/z : 218 (M+H).

2-amino-4-(4-cyanobenzylidène)-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 166c



C₁₁H₈N₄O
212,21 g.mol⁻¹
solide jaune pâle
Rdt : 96 %

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 6,26 (s, 1H, **CH**-Ph); 7,57 (s large, 2H, **NH**₂); 7,77 (d, J = 8,4, 2H, ArH); 8,20 (d, J = 8,4, 2H, ArH); 10,86 (s large, 1H, **NH**).

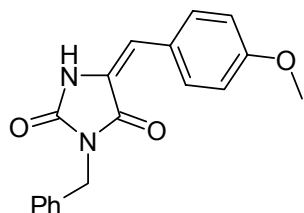
ESMS m/z : 213 (M+H).

Préparation des imidazolidine-2,4-diones 169**Mode opératoire général de condensation de l'hydantoïne avec l'aldéhyde :**

A une suspension de 20 mmoles d'hydantoïne **168** ou **172** (1 éq.) dans 20 mL de DMF anhydre, agitée à TA pendant 30 min, sont ajoutés 2,61 mL de bromure de benzyle (22 mmoles, 1,1 éq.). Le mélange est agité sous argon et à 50°C pendant 12h. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu est repris dans l'eau puis extrait avec de l'AcOEt.

Mode opératoire général de condensation de l'hydantoïne avec l'aldéhyde :

A une solution d'hydantoïne protégée **171** ou non protégée **168** (3,3 mmoles, 1 éq.) et de 1 g d'acétate de sodium (12,2 mmoles, 3,6 éq.) dans 5,2 mL d'AcOH, est ajouté l'aldéhyde (3,6 mmoles, 1,1 éq.). Le mélange est chauffé à 140-150°C sous argon pendant une nuit. Après refroidissement le précipité formé est filtré, lavé à l'eau puis plusieurs fois avec de l'éther et enfin séché sous vide.

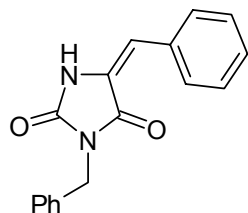
3-benzyl-5-(4-méthoxybenzylidène)imidazolidine-2,4-dione 169a

C₁₈H₁₆N₂O₃
 308,34 g.mol⁻¹
 solide
 Rdt voie A: 67 %
 Rdt voie B: 15 %

¹H RMN (200 MHz, DMSO) :

3,82 (s, 3H, OCH₃); 4,67 (s, 2H, CH₂Ph); 6,56 (s, 1H, CH-Ph); 6,94 (d, J = 8,8, 2H, ArH); 7,2-7,5 (m, 5H, ArH); 7,58 (d, J = 8,8, 2H, ArH).

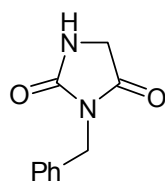
3-benzyl-5-benzylidèneimidazolidine-2,4-dione 169b



$C_{17}H_{14}N_2O_2$
 278,31 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 28 %

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 4,65 (s, 2H, CH₂Ph); 6,49 (s, 1H, CH^v-Ph); 7,2-7,7 (m, 10H, ArH).

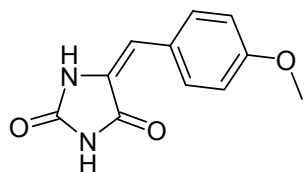
3-benzylimidazolidine-2,4-dione 171



$C_{10}H_{11}N_2O_2$
 190,20 g.mol⁻¹
 solide
 Rdt : 58 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :
 δ 4,01 (s, 2H, CH₂ hydantoïne); 4,70 (s, 2H, CH₂Ph); 6,14 (s large, 1H, NH); 7,34 (m, 5H, ArH).

5-(4-méthoxybenzylidène)imidazolidine-2,4-dione 172



$C_{11}H_{10}N_2O_3$
 218,21 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt : 46 %

¹H RMN (200 MHz, DMSO) :

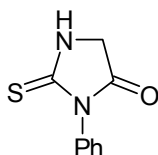
3,80 (s, 3H, OCH₃); 6,36 (s, 1H, CH-Ph); 6,94 (d, J = 8,8, 2H, ArH); 7,58 (d, J = 8,8, 2H, ArH).

Préparation des imidazolones 179-180 par couplage palladium

Préparation des thioxoimidazolidin-4-one 173 et 174 :

A un mélange de 3 g de chlorhydrate de glycinate d'éthyle (21,65 mmoles, 1 équ.) dans 400 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés 3 mL de TEA (21,65 mmoles, 1 équ.). Le mélange est agité à TA pendant 10 min avant l'ajout au goutte à goutte de 21,65 mmoles d'isothiocyanate dissout dans 40 mL de CH₂Cl₂. La solution est chauffée à reflux pendant 3 h puis évaporée à sec. Le résidu est repris dans 150 mL d'AcOEt, et après avoir filtré la partie insoluble, la solution est évaporée à sec afin de récupérer une huile (thiourée). L'huile est alors dissoute dans 15 mL d'HCl 1N puis chauffée à reflux pendant 3 h. Après refroidissement, les cristaux formés sont filtrés, lavés avec 10 mL d'eau puis séchés sous vide.

3-phényl-2-thioxoimidazolidin-4-one 173

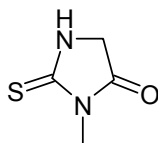


C₉H₈N₂OS
192,24 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 60 %
Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,35

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 4,32 (s, 2H, CH₂); 7,2-7,35 (m, 2H, ArH); 7,4-7,55 (m, 3H, ArH); 10,40 (s large, 1H, NH éch.).

3-méthyl-2-thioxoimidazolidin-4-one **174**



C₄H₆N₂OS
130,17 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 63 %
Rf (AcOEt) : 0,45

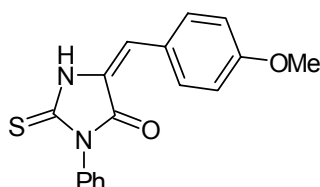
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,25 (s, 3H, CH₃); 4,10 (s, 2H, CH₂); 7,61 (s large, 1H, NH éch.).

Préparation des composés **175** et **176** :

A un mélange de 0,92 mmole de thiohydantoïne **173** ou **174** dans 20 mL d'AcOH, sont ajoutés 3,03 g d'AcONa (3,69 mmole, 3 équ.) puis 1,12 mL d'anisaldéhyde (0,92 mmole, 1 équ.). La solution est chauffée à 130-140°C pendant 5 h. Après refroidissement, les cristaux formés sont filtrés et lavés abondamment à l'eau.

5-(4-methoxybenzylidene)-3-phenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one **175**



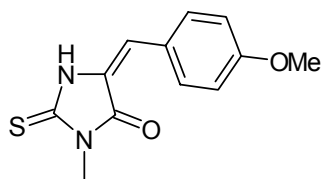
C₁₇H₁₄N₂O₂S
310,38 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 60 %

Recristallisé dans EtOH/H₂O (96/4).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,83 (s, 3H, OCH₃); 6,67 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,02 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 7,3-7,55 (m, 5H, ArH); 7,83 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 12,51 (s large, 1H, NH éch.).

5-(4-methoxybenzylidene)-3-methyl-2-thioxoimidazolidin-4-one 176



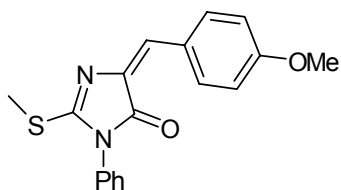
C₁₂H₁₃N₂O₂S
249,31 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 65 %
Rf (AcOEt/hexane 1/2) : 0,55

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :
δ 3,38 (s, 3H, CH₃); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,74 (s, 1H, CH_v-Ph); 6,99 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,41 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,76 (s large, 1H, NH éch.).

Préparation des méthylthioimidazolones 177 et 178 :

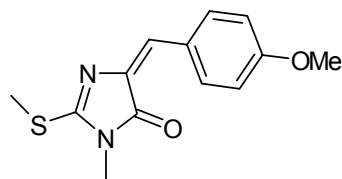
A une solution de 25 mL de méthanolate de sodium (93 mg de Na, 4,03 mmoles) sont ajoutés 4,03 mmoles de 5-*p*-methoxybenzylidenethioxoimidazolidin-4-one **175** ou **176** puis 0,38 mL de CH₃I (6,05 mmoles, 1,5 éq.) au goutte à goutte. La solution est agitée à T.A. pendant 3h. Le précipité formé est filtré puis lavé à l'eau.

5-(4-méthoxybenzylidène)-2-(méthylthio)-3-phényl-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-one 177



C₁₈H₁₆N₂O₂S
324,40 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 95 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 2,53 (s, 3H, SCH₃); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 6,97 (s, 1H, CHPh); 7,08 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,4-7,6 (m, 5H, ArH); 8,28 (d, J = 9, 2H, ArH).

5-(4-méthoxybenzylidène)-2-(méthylthio)-3-méthyl-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-one 178

$C_{13}H_{14}N_2O_2S$
 262,33 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 72 %
 Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,44

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 2,74 (s, 3H, SCH₃); 3,17 (s, 3H, NCH₃); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 6,94 (s, 1H, CHPh);
 6,95 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,14 (d, J = 9, 2H, ArH).

Couplage palladium :**Méthode a-b :**

A un mélange de 0,5 mmole de méthylthioimidazolone **177** ou **178** (1éq), 0,55 mmole d'acide phénylboronique (1,1 éq), 18,3 mg de Pd₂dba₃ (0,02 mmol, 0,04 éq), 18,6 mg de tris(2-furyl)phosphine (0,08 mmol, 0,16 éq) et 124 mg de thiophène carboxylate de cuivre (0,65 mmol, 1,3 éq) mis sous flux d'argon pendant 10 min, sont ajoutés 5 mL de THF anhydre. Le mélange est agité à 50°C pendant 18h (ou sous irradiation micro-onde à 300 W pendant 15 min, Méthode b) puis 50 ml d'éther sont ajoutés. La solution est lavée avec 15 mL de NH₄OH à 10% puis la phase organique est évaporée à sec. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant AcOEt/hexane : 1/3).

Méthode f :

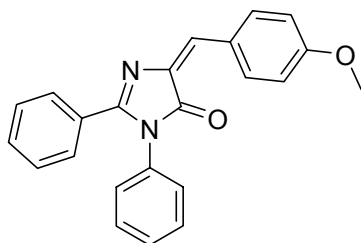
A un mélange de méthylthioimidazolone **178** (120mg, 0,458mmole), de Pd(PPh₃)₄ (26mg, 0,022mmole), de thiophène carboxylate de cuivre (114mg, 0,595mmole), d'acide p-cyanophénylboronique placé dans un tube scellé, sont ajoutés 3mL de DMF anhydre. Le mélange est agité sous irradiation microonde (300 watts) pendant 15min. La solution est évaporée et une solution saturée de NaHCO₃ est ajoutée. La phase aqueuse est extraite trois fois avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée, évaporée à sec et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant: AcOEt/hexane 1/3).

Les procédures pour les Méthodes c, d et e sont les mêmes que la Méthode f, seuls les solvants et le chauffage diffèrent.

Méthode de couplage avec les stannanes, Méthode g :

2-(tributylstannyl)furan (65.7 μ L, 0.21 mmole) was added to a solution of CuTC (79 mg, 0.41 mmole), Pd(Ph₃)₄ (11 mg, 5 mol %) and compound **7** (50mg, 0.19 mmole) in DMF (4 mL). The reaction mixture was stirred at RT during 5 min, then saturated solution of NaHCO₃ was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄. Purification by flash chromatography on silica gel (eluant: AcOEt/Hex: 1/3)

4-(4-méthoxybenzylidène)-1,2-diphényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 179a



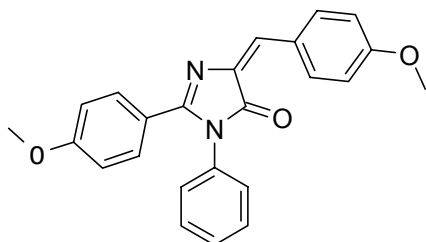
C₂₃H₁₈N₂O₂
 354,41 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 40 % (Méthode a)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,8-7,1 (m, 2H, ArH); 7,2-7,7 (m, 11H, ArH); 8,31 (d, J = 9, 2H, ArH).

ESMS m/z : 355 (M+H).

4-(4-méthoxybenzylidène)-2-(4-méthoxyphényl)-1-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 179b



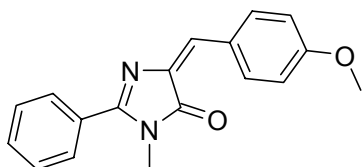
$C_{24}H_{20}N_2O_3$
 384,44 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 40 % (Méthode a)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 3,81 (s, 3H, OCH₃); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,82 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 7,00 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 7,21 (d, J = , 2H, ArH); 7,26 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,3-7,5 (m, 3H, ArH); 7,54 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 8,29 (d, J = 8,7, 2H, ArH).

ESMS m/z : 385 (M+H).

4-(4-méthoxybenzylidène)-1-méthyl-2-phényl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 180a-181a

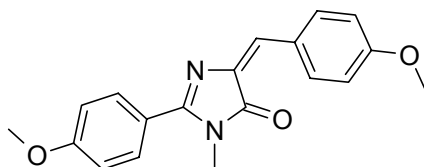


$C_{18}H_{16}N_2O_2$
 292,34 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 31 % (Méthode a)
 Rdt : 65 % (Méthode f)
 Rdt : 82 % (Méthode g)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 3,37 (s, 3H, NCH₃); 3,77 (s, 3H, OCH₃); 6,97 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 7,25 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,5-7,7 (m, 3H, ArH); 7,8-7,9 (m, 2H, ArH); 8,24 (d, J = 8,7, 2H, ArH).

4-(4-méthoxybenzylidène)-2-(4-méthoxyphényl)-1-méthyl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 180b

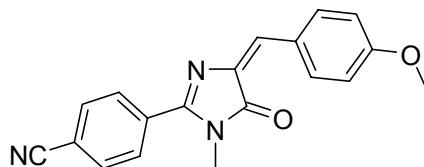


$C_{19}H_{18}N_2O_3$
 322,37 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 40 % (Méthode a)
 Rdt : 70 % (Méthode f)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 3,38 (s, 3H, NCH₃); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,90 (s, 3H, OCH₃); 6,96 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,05 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,19 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,86 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 8,23 (d, J = 8,7, 2H, ArH).

4-(4-méthoxybenzylidène)-2-(4-cyanophényl)-1-méthyl-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 180c



$C_{19}H_{15}N_3O_2$
 317,35 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 68 % (Méthode f)
 PF = 156-158°C

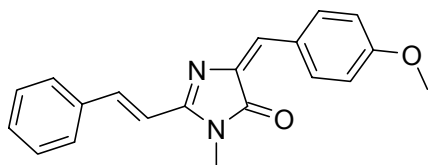
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,3 (s, 3H, NCH₃); 3,8 (s, 3H, OCH₃); 6,9 (d, J = 8,7, 2H, ArH); 7,3 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,8 (d, J = 8,2, 2H, ArH); 8,0 (d, J = 8,2, 2H, ArH); 8,1 (d, J = 8,7, 2H, ArH).

¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 29,4 (CH₃); 55,8 (CH₃); 114,8 (2 CH); 115,0 (C); 118,4 (C); 127,4 (C); 129,5 (2 CH); 131,1 (CH); 132,9 (2 CH); 134,0 (C); 135,2 (2 CH); 137,1 (C); 159,4 (C); 162,3 (C); 171,5 (C).

4-(4-méthoxybenzylidène)-1-méthyl-2-(2-phénylvinyl)-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 180d



$C_{20}H_{18}N_2O_2$
 318,38 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 75 % (Méthode f)

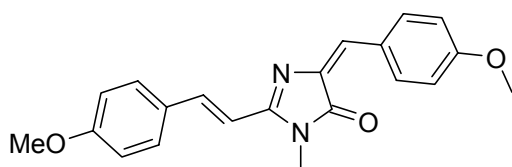
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,34 (s, 3H, NCH₃); 3,89 (s, 3H, OCH₃); 6,84 (d, J = 16, 1H, ArH); 6,99 (d, J = 8,9, 2H, ArH); 7,16 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,41 (m, 3H, ArH); 7,63 (m, 2H, ArH); 8,09 (d, J = 16, 1H, ArH); 8,1 (d, J = 9, 2H, ArH).

¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 25,6 (CH₃); 54,3 (CH₃); 111,8 (CH); 113,3 (2 CH); 126,4 (CH); 126,7 (C); 126,9 (2 CH); 127,9 (2 CH); 129,1 (CH); 133,3 (2 CH); 134,2 (C); 136,7 (C); 139,6 (CH); 157,6 (C); 160,3 (C); 169,9 (C).

5-(4-méthoxybenzylidène)-1-méthyl-2-[2-(4-méthoxyphényl)vinyl]-1,4-dihydro-4H-imidazol-5-one 180e

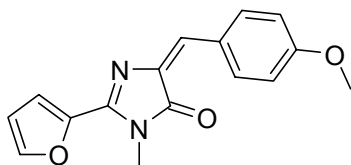


$C_{21}H_{20}N_2O_3$
 348,41 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt : 75 % (Méthode f)

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,32 (s, 3H, NCH₃); 3,87 (s, 3H, OCH₃); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,70 (d, J = 16, 1H, ArH); 7,00 (m, 4H, ArH); 7,12 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,60 (d, 2H, ArH); 8,06 (d, J = 16, 1H, ArH); 8,22 (d, J = 9, 2H, ArH).

2-(2-furyl)-4-(4-méthoxybenzylidène)-1-méthyl-1,4-dihydro-4*H*-imidazol-5-one 181b



$C_{16}H_{14}N_2O_3$

282,30 g.mol⁻¹

solide jaune

Rdt : 80 % (Méthode g)

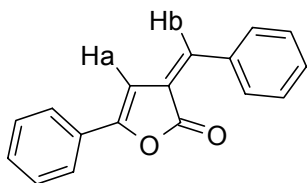
PF = 128-130°C

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 3,5 (s, 3H, NCH₃); 3,9 (s, 3H, OCH₃); 7,0 (d, J = 8, 2H, ArH); 6,7 (dd, J = 4 et J = 1,7, 1H, Hfuryl); 7,2 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,4 (d, J = 4, 1H, Hfuryl); 7,7 (m, 1H, Hfuryl); 8,2 (d, J = 8, 2H, ArH).

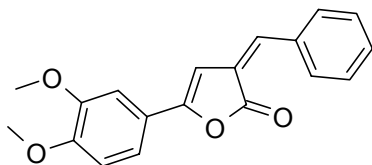
Mode opératoire général pour la préparation des buténolides 183 :

Un mélange de 10 mmoles d'acide β -aroylpropionique, 10 mmoles d'aldéhyde, 10 mmoles d'AcONa fraîchement fusionné et 4 mL d'Ac₂O est chauffé jusqu'à dissolution des réactifs. La solution est ensuite chauffée à 50-60°C jusqu'à l'apparition d'un précipité (~1h). Le chauffage est maintenu pendant 3h puis la solution est versée dans 10 mL d'eau. Après filtration, le précipité obtenu est lavé avec 3x10 mL d'eau puis 3x10 mL d'EtOH. Le solide obtenu est porté à ébullition dans l'EtOH puis filtré à chaud.

3-benzilidène-5-phényl furan-2-one 183a (gfp80-00)

C₁₇H₁₂O₂
 248,28 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 25 %
 PF = 151-153°C (lit : 155°C)

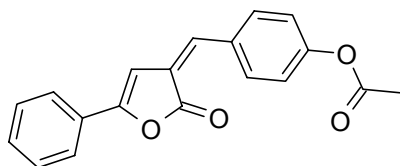
¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 7,41 (s, 1H, Ha); 7,45-7,6 (m, 6H, ArH); 7,65 (s, 1H, Hb); 7,8-8,0 (m, 4H, ArH).

3-benzilidène-5-(3,4-dimethoxyphényl) furan-2-one 183b (gfp81-00)

C₁₉H₁₆O₄
 308,34 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 53 %
 PF = 148-149°C (lit : 147°C)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 3,83 (s, 3H OCH₃); 3,86 (s, 3H OCH₃); 7,09 (d, J = 8,7, 1H, ArH); 7,32 (s, 1H, Ha); 7,4-7,6 (m, 6H, ArH et Hb); 7,87 (m, 2H, ArH).

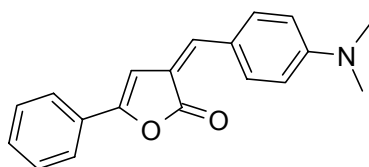
3-(p-AcO-benzilidène)-5-phényl furan-2-one 183c (gfp54-00)



$C_{19}H_{14}O_4$
 306,32 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 30 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :
 δ 2,34 (s, 3H, CH₃); 6,92 (s, 1H, Ha); 7,1-7,3 (m, 3H, Hb et ArH); 7,3-7,5 (m, 4H, ArH); 7,5-7,9 (m, 3H, ArH).

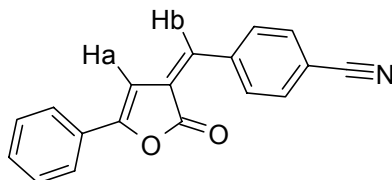
3-(p-diméthylaminobenzilidène)-5-phényl furan-2-one 183d



$C_{19}H_{17}NO_2$
 291,35 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 31 %

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
 δ 3,06 (s, 6H, N(CH₃)₂); 6,79 (d, J = 7,2, 2H, ArH); 7,28 (s, 1H, Ha); 7,4-7,6 (m, 3H, ArH); 7,58 (s, 1H, Hb); 7,7-7,9 (m, 4H, ArH).

3-(p-cyanobenzylidène)-5-phénylfuran-2-one 183e (gfp50-00)

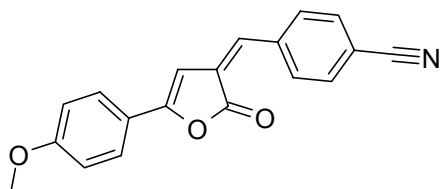


$C_{18}H_{11}NO_2$
 273,29 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 55 %
 PF = 272-274°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO à chaud) :
 δ 7,45 (s, 1H, Ha); 7,5-7,6 (m, 3H, ArH); 7,70 (s, 1H, Hb); 7,9-8,1 (m, 6H, Ar).

Microanalyse : calculée C% 79,11 H% 4,06 N% 5,13
trouvée C% 79,31 H% 4,04 N% 5,28

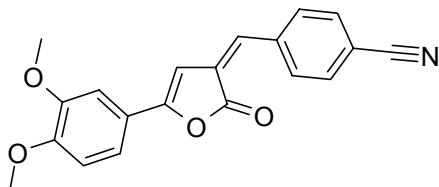
3-(p-cyanobenzylidène)-5-(4-méthoxyphényl)furan-2-one 183f (gfp79-00)



$C_{19}H_{13}NO_3$
303,32 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 82 %

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
δ 3,84 (s, 3H, OCH₃); 7,10 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,33 (s, 1H, Ha); 7,53 (s, 1H, Hb);
7,87 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,92 (d, J = 8,4, 2H, ArH de 4-CNPh); 8,02 (d, J = 8,4, 2H,
ArH de 4-CNPh).

3-(p-cyanobenzylidène)-5-(3,4-diméthoxyphényl)furan-2-one 183g (gfp51-00)

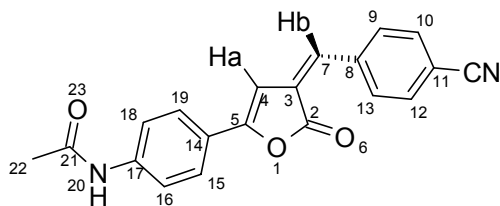


$C_{20}H_{15}NO_4$
333,35 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 80 %
PF = 230-233°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :
δ 3,84 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 3H, OCH₃); 7,11 (d, J = 8,2, 1H, ArH); 7,33 (s, 1H,
Ha); 7,4-7,5 (m, 2H, ArH); 7,56 (s, 1H, Hb); 7,94 (d, J = 8,3, 2H, ArH de 4-CNPh);
7,94 (d, J = 8,3, 2H, ArH de 4-CNPh).

Microanalyse : calculée C% 72,06 H% 4,54 N% 4,20
trouvée C% 72,46 H% 4,40 N% 4,25

3-(p-cyanobenzilidène)-5-(4-N-acétylaminophényl) furann-2-one 183h (gfp61-00)



$C_{20}H_{14}N_2O_3$
 330,35 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 60 %
 PF = 283-285°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

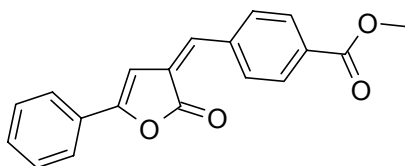
δ 2,11 (s, 3H, CH₃); 7,39 (s, 1H, Ha); 7,58 (s, 1H, Hb); 7,76 (d, J = 8,7, 2H, H15 et H19); 7,88 (d, J = 8,6, 2H, H10 et H12); 7,95 (d, J = 8,7, 2H, H16 et H18); 8,05 (d, J = 8,6, 2H, H9 et H13); 10,28 (s, 1H, NHAc).

NOESY :

Corrélation H10/12 avec H9/13, H9/13 avec Hb, H9/13 avec Ha, H15/19 avec Ha ;
 pas de corrélation Ha avec Hb → forme trans

Microanalyse : calculée C% 69,31 H% 4,60 N% 8,09 (+0,9 H₂O)
 trouvée C% 69,27 H% 4,58 N% 8,19

4-{{2-oxo-5-phenylfuran-3(2H)-ylidène]methyl}benzoate de méthyle 183i (gfp65-00)



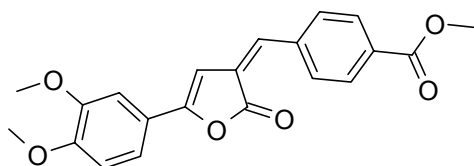
$C_{19}H_{14}O_4$
 306,32 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 60 %
 PF = 178-182°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,88 (s, 3H, CH₃); 7,44 (s, 1H, Ha); 7,5-7,6 (m, 3H, ArH); 7,67 (s, 1H, Hb); 7,8-8,0 (m, 2H, ArH); 8,0-8,1 (m, 4H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 74,50 H% 4,61 O% 20,89
 trouvée C% 74,02 H% 4,86 O% 20,95

4-{[2-oxo-5-(3,4-dimethoxyphenyl)furan-3(2H)-ylidène]methyl}benzoate de méthyle 183j (gfp82-00)



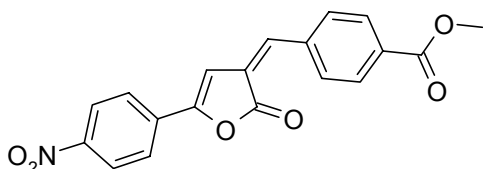
$C_{21}H_{18}O_6$
 366,37 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 77 %
 PF= 187-191°C

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,87 (s, 3H, OCH₃); 3,90 (s, 3H, OCH₃); 3,91 (s, 3H, CO₂CH₃); 7,15 (d, J = 8,8, 1H, ArH); 7,37 (s, 1H, Ha); 7,4-7,55 (m, 2H, ArH); 7,58 (s, 1H, Hb); 8,00 (d, J = 8,6, 2H, ArH); 8,07 (d, J = 8,6, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 68,85 H% 4,95 O% 26,20
 trouvée C% 68,41 H% 4,96 O% 26,41

4-{[2-oxo-5-(4-nitrophenyl)furan-3(2H)-ylidène]methyl}benzoate de méthyle 183k (gfp70-00)

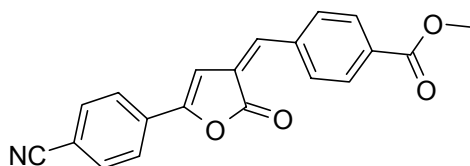


$C_{19}H_{13}NO_6$
 351,32 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 63 %
 PF= 292-295°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,89 (s, 3H, CH₃); 7,59 (s, 1H, Ha); 7,98 (s, 1H, Hb); 8,0-8,1 (m, 4H, ArH); 8,16 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,37 (d, J = 9, 2H, ArH).

4-{[2-oxo-5-(4-cyanophenyl)furan-3(2H)-ylidène]methyl}benzoate de méthyle 183l
gfp69-00

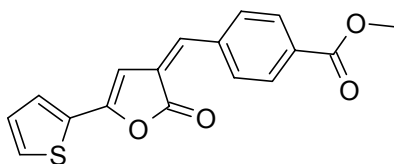


$C_{20}H_{13}NO_4$
331,33 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt = 60 %
PF = 275-277°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 3,88 (s, 3H, CH₃); 7,55 (s, 1H, Ha); 7,90 (s, 1H, Hb); 7,95-8,15 (m, 8H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 72,50 H% 3,95 N% 4,23
 trouvée C% 72,50 H% 3,86 N% 4,25

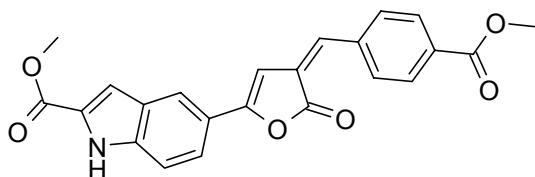
4-{[2-oxo-5-(2-thiophenyl)furan-3(2H)-ylidène]methyl}benzoate de méthyle 183m



$C_{17}H_{12}O_4S$
312,15 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 10 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 3,88 (s, 3H, CH₃); 7,2-7,3 (m, 1H, H4 thiophène); 7,39 (s, 1H, Ha); 7,46 (s, 1H, Hb);
7,80 (d, J = 4,7, 1H, H3 thiophène); 7,80 (d, J = 5,1, 1H, H5 thiophène); 7,96 (d, J =
8,1, 2H, ArH); 8,03 (d, J = 8,1, 2H, ArH).

methyl 5-{[4-(methoxycarbonyl)phenyl]methylidene}-5-oxofuran-2(5H)-yl]-1H-indole-2-carboxylate 183n (gfp71-00)

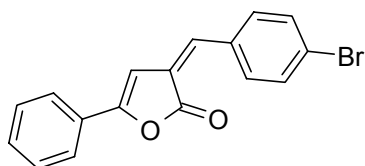


$C_{23}H_{17}NO_6$
 403,40 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 61 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,92 (s, 6H, 2 CH₃); 7,31 (s, 1H, H4 indole); 7,37 (s, 1H, Ha); 7,59 (d, J = 8,7, 1H, H6 indole); 7,61 (s, 1H, Hb); 7,91 (d, J = 8,7, 1H, H7 indole); 8,0-8,1 (m, 4H, ArH); 8,24 (s, 1H, H3 indole); 12,32 (s, 1H, NH éch.).

3-(p-bromobenzilidène)-5-phényl furan-2-one 183o



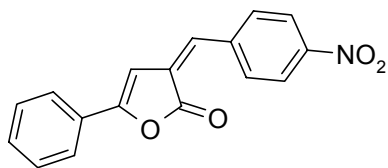
$C_{17}H_{11}BrO_2$
 327,18 g.mol⁻¹
 solide jaune
 Rdt = 53 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 7,42 (s, 1H, Ha); 7,5-7,6 (m, 3H, ArH); 7,68 (s, 1H, Hb); 7,74 (d, J = 8,3, 2H, ArH); 7,8-8,0 (m, 4H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 62,41 H% 3,39
 trouvée C% 62,11 H% 3,41

3-(p-nitrobenzylidène)-5-phénylfuran-2-one 183p (gfp91-03)



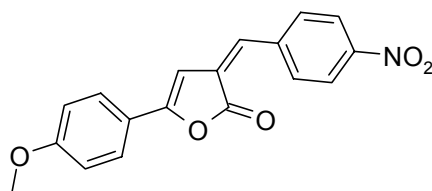
C₁₇H₁₁NO₄
 293,28 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 60 %
 PF = 287-290°C (lit : 294°C)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 7,51 (s, 1H, Ha); 7,5-7,6 (m, 3H, ArH); 7,72 (s, 1H, Hb); 7,9-8,0 (m, 2H, ArH); 8,14 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,30 (d, J = 9, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 69,62 H% 3,78 N% 4,78
 trouvée C% 69,75 H% 3,81 N% 4,88

3-(p-nitrobenzylidène)-5-(4-methoxyphényl)furan-2-one 183r (gfp92-03)



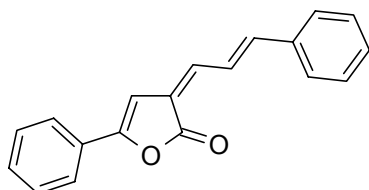
C₁₈H₁₃NO₅
 323,31 g.mol⁻¹
 solide violet
 Rdt = 78 %
 PF = 274-276°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,85 (s, 3H, OCH₃); 7,11 (d, J = 9, 2H, ArH); 7,39 (s, 1H, Ha); 7,52 (s, 1H, Hb); 7,87 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,09 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,28 (d, J = 9, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 66,87 H% 4,05 N% 4,33
 trouvée C% 66,90 H% 4,12 N% 4,49

5-phényl-3-(-3-phénylprop-2-énylidène)furan-2-one 183s (gfp72-00)



C₁₉H₁₄O₂
274,32 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 54 %

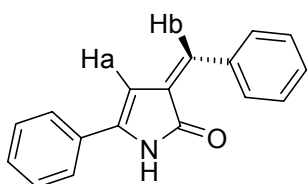
¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
δ 7,1-7,8 (m, 14H, ArH).

Microanalyse :	calculée	C% 82,65	H% 5,18	O% 12,17 (+ 0,1 H ₂ O)
	trouvée	C% 82,64	H% 5,45	O% 11,98

Mode opératoire général pour la préparation des pyrrolinones 186 :

A un mélange de 2,2 mmoles de furanone **183**, 203 mg d'acétate d'ammonium anhydre (2,64 mmoles) dans 3 mL de MeOH, sont ajoutées 0,32 mL de NH₄OH concentrée à 30% (2,64 mmoles). Le mélange est chauffé à reflux pendant 5h. Après évaporation du MeOH, 10 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés, le solide formé est filtré puis lavé avec 3x10 mL d'eau et 10 mL d'EtOH.

3-benzilidène-5-phénylpyrrolin-2-one 186a (gfp83-01)



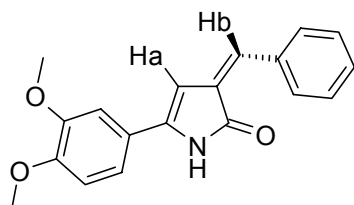
C₁₇H₁₃NO
247,30 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt = 61 %
PF= 220-222°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 6,89 (s, 1H, Ha); 7,17 (s, 1H, Hb); 7,3-7,6 (m, 6H, ArH); 7,8-8,0 (m, 4H, ArH); 10,54 (s, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 81,38 H% 5,38 N% 5,58 (+0,2 H₂O)
trouvée C% 81,10 H% 5,26 N% 5,80

3-benzilidène-5-(3,4-diméthoxyphényl)pyrrolin-2-one 186b (gfp84-00)



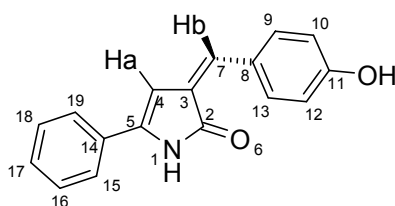
C₁₉H₁₇NO₃
307,35 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 77 %
Pf = 230-232°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,80 (s, 3H, OCH₃); 3,84 (s, 3H, OCH₃); 6,78 (s, 1H, Ha); 7,03 (d, J = 8,6, 1H, ArH); 7,09 (s, 1H, Hb); 7,3-7,6 (m, 5H, ArH); 7,79 (d, J = 7,1, 2H, ArH); 10,49 (s, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 73,39 H% 5,64 N% 4,51 (+0,2 H₂O)
trouvée C% 73,50 H% 5,68 N% 4,66

3-(p-hydroxybenzylidène)-5-phényl pyrrolin-2-one **186c** (gfp55-00)



C₁₇H₁₃NO₂
263,30 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 25 %

Une solution d'HCl 1N est ajoutée au solide formé. Après filtration le solide est lavé avec 3x10 mL d'eau et 10 mL d'EtOH.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 7,0-7,1 (m, 3H, ArH et Ha); 7,31 (s, 1H, Hb); 7,5-7,7 (m, 3H, ArH); 7,91 (d, J = 8,6, 2H, ArH); 8,06 (m, 2H, ArH); 10,65 (s, 1H, NH éch.).

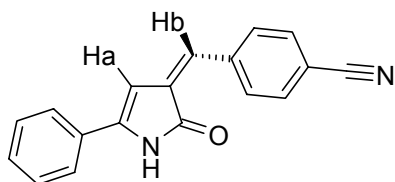
¹³C-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 97,86 (CHa); 116,42 (2 CHAr); 125,63 (2 CHAr); 126,98 (C); 128,19 (C); 129,07 (2 CHAr); 129,56 (CH); 130,23 (C); 131,02 (CH); 132,86 (2 CHAr); 144,31 (C); 159,60 (C); 171,44 (C).

NOESY :

Corrélation H10/12 avec H9/13, H9/13 avec Hb, H9/13 avec Ha, H15/19 avec Ha; pas de corrélation Ha avec Hb → forme trans

3-(p-cyanobenzylidène)-5-phénylpyrrolin-2-one 186e (gfp52-00)



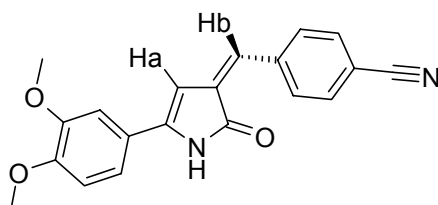
$C_{18}H_{12}N_2O$
 272,31 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 40 %
 PF= 223-225°C

Recristallisation dans le MeOH.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 6,97 (s, 1H, Ha); 7,21 (s, 1H, Hb); 7,4-7,6 (m, 3H, ArH); 7,8-8,1 (m, 6H, ArH);
 10,70 (s, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 79,39 H% 4,44 N% 10,29
 trouvée C% 79,09 H% 4,41 N% 10,11

3-(p-cyanobenzylidène)-5-(3,4-diméthoxyphényl)pyrrolin-2-one 186g (gfp53-00)

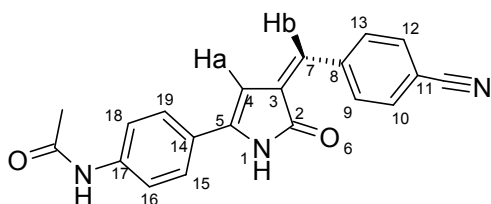


$C_{20}H_{16}N_2O_3$
 332,36 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 73 %
 PF = 299-301°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :
 δ 3,85 (s, 3H, OCH₃); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,85 (s, 1H, Ha); 7,0-7,2 (m, 2H, Hb et ArH); 7,4-7,7 (m, 2H, ArH); 7,90 (d, J = 8,4, 2H, ArH de 4-CNPh); 7,99 (d, J = 8,5, 2H, ArH de 4-CNPh); 10,65 (s, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 71,50 H% 4,92 N% 8,34 (+0,2 H₂O)
 trouvée C% 71,48 H% 4,74 N% 8,43

3-(p-cyanobenzylidène)-5-(4-N-acétylaminophényl) pyrrolin-2-one 186h (gfp62-00)



$C_{20}H_{15}N_3O_2$
 329,36 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 61 %
 PF= 278-281°C

¹H RMN (200 MHz, DMSO) :

2,07 (s, 3H, CH₃); 6,83 (s, 1H, Ha); 7,10 (s, 1H, Hb); 7,67 (d, J = 8,8, 2H, H16 et H18); 7,83 (d, J = 8,8, 2H, H15 et H19); 7,86 (d, J = 8,4, 2H, H10 et H12); 7,96 (d, J = 8,4, 2H, H9 et H13); 10,17 (s, 1H, NH éch.); 10,59 (s, 1H, NH éch.).

¹³C RMN (300 MHz, DMSO) :

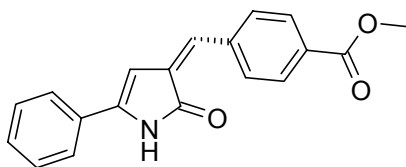
25,0 (CH₃); 96,7 (CHa); 111,5 (C); 119,6 (2 CHAR); 119,7 (C); 124,6 (C); 126,8 (CHb); 127,5 (2 CHAR); 131,4 (2 CHAR); 133,5 (2 CHAR); 134,3 (C); 141,1 (C); 142,0 (C); 148,7 (C); 169,5 (C); 171,7 (C).

NOESY :

Corrélation H9/13 avec Hb, H9/13 avec Ha, H15/19 avec Ha; pas de corrélation Ha avec Hb → forme trans

Microanalyse : calculée C% 70,62 H% 4,80 N% 12,36 (+0,6 H₂O)
 trouvée C% 70,66 H% 4,64 N% 12,44

4-[(Z)-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-ylidene)méthyle]benzoate de méthyle 186i (gfp85-01)



$C_{19}H_{15}NO_3$
 305,34 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 87 %

PF = 227-229°C

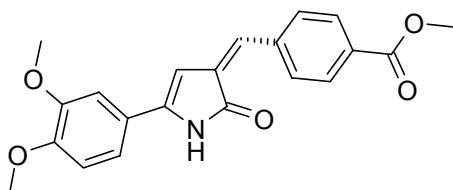
Recristallisation dans le MeOH.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,88 (s, 3H, CO₂CH₃); 6,94 (s, 1H, Ha); 7,20 (s, 1H, Hb); 7,4-7,6 (m, 3H, ArH); 7,85-7,92 (m, 2H, ArH); 7,95 (d, J = 8,6, 2H, ArH); 8,01 (d, J = 8,6, 2H, ArH); 10,65 (s, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 74,30 H% 4,99 N% 4,56 (0,1 H₂O)
trouvée C% 74,35 H% 5,02 N% 4,66

4-[(Z)-(2-oxo-5-(3,4-diméthoxyphényl)-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-ylidène)méthyl] benzoate de méthyle 186j (gfp86-01)

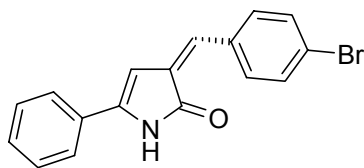


C₂₁H₁₉NO₅
365,39 g.mol⁻¹
solide rouge
Rdt = 90 %
PF= 269-271°C

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,81 (s, 3H, OCH₃); 3,84 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 3H, CO₂CH₃); 6,82 (s, 1H, Ha); 7,0-7,2 (m, 2H, Hb et ArH); 7,4-7,6 (m, 2H, ArH); 7,91 (d, J = 8,3, 2H, ArH); 8,00 (d, J = 8,3, 2H, ArH); 10,59 (s, 1H, NH éch.).

Microanalyse : calculée C% 67,70 H% 5,36 N% 3,76 (+0,4 H₂O)
trouvée C% 67,56 H% 5,28 N% 3,90

3-(p-bromobenzylidène)-5-phénylpyrrolin-2-one 186o

$C_{17}H_{12}BrNO$
326,20 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 61 %

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 6,88 (s, 1H, Ha); 7,13 (s, 1H, Hb); 7,4-7,6 (m, 3H, ArH); 7,6-8,0 (m, 6H, ArH); 10,59 (s, 1H, NH éch.).

Préparation des pyrrolinones 187 :**Méthode A :**

Un mélange de 0,33 mmole de buténolide **183** (1 éq.) et de 0,44 mmole d'amine (1,2 éq.) dans 7mL d'EtOH est placé dans un tube scellé et est chauffé à 100-110°C pendant 1 h.

Méthode B :

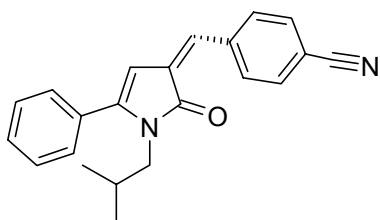
Un mélange de 0,5 mmole de buténolide **183** (1 éq.) et de 0,6 mmole d'isobutylamine (1,2 éq.) dans 3 mL de CH₃CN est placé dans un tube scellé. Après 4 h de chauffage à 90-100°C, 1 mL d'AcOH est ajouté et la solution est à nouveau chauffée à 90-100°C pendant 1 h. Après refroidissement, les cristaux formés sont filtrés et lavés avec 5 mL d'Et₂O. Le coton blanc récupéré (pyrrolidinone **185**) est mis en suspension dans 3 mL d'AcOH et chauffé à reflux pendant 4-5h. Après filtration le solide (pyrrolinone **187**) est lavé avec 5 mL d'eau puis avec 3 mL d'EtOH.

Méthode C :

Un mélange de 1,52 mmoles de buténolide **183** (1 éq.) et de 1,86 mmoles d'isobutylamine (1,2 éq.) dans 5 mL de CH₃CN est placé dans un tube scellé. Le mélange est chauffé à l'aide d'un four micro-onde (puissance ~350W) pendant 10 min. Après l'évaporation du solvant, 3 mL d'AcOH sont ajoutés et la solution est à nouveau chauffée sous irradiation micro-onde

(puissance ~350W) pendant 5 min. Après évaporation partielle de l'AcOH, 53 mL d'EtOH sont ajoutés et le solide est filtré, lavé avec 2x3mL d'EtOH et séché sous vide.

N1-isobutyl-3-(4-cyanobenzylidène)-5-phényl-1H-pyrrolin-2-one 187e (gfp66-00)



C₂₂H₂₀N₂O
 328,42 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 10 % (Méthode A)
 PF= 138-140°C

Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans 5 mL d'AcOEt. La solution est lavée avec 3 mL d'une solution d'HCl 1N. Après séchage et évaporation de la phase organique, une huile jaune est obtenue, celle-ci cristallise lentement. Le solide obtenu est recristallisé dans le MeOH.

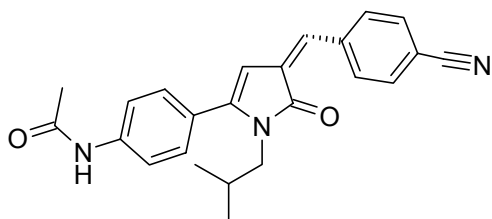
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 0,74 (d, J = 6,8, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,66 (m, 1 H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,55 (d, J = 7,5, 2H, CH₂CH(CH₃)₂); 6,12 (s, 1H, Ha); 7,39 (s, 1H, Hb); 7,4-7,5 (m, 5H, ArH); 7,6-7,8 (m, 4H, ArH).

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 19,96 (2 CH₃); 28,18 (CH); 48,19 (CH₂); 100,18 (CHa); 112,23 (C); 118,76 (C); 127,81 (2 CHAr); 128,96 (2 CHAr); 129,31 (CH); 129,89 (CH); 130,43 (2 CHAr); 131,63 (C); 132,61 (2 CHAr); 140,56 (2 C); 152,27 (C); 170,58 (C).

**N-(4-{3-(p-cyanobenzylidène)-2-oxo-1,2-dihydro-3H-pyrol-5-yl}-phényl)acétamide 187h
(gfp67-00)**



C₂₄H₂₃N₃O₂
385,47 g.mol⁻¹
solide rouge
Rdt = 20 %
PF = 148-150°C

Après évaporation du solvant, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant AcOEt/hexane : 1/1) et le produit majoritaire est isolé et recristallisé dans le MeOH.

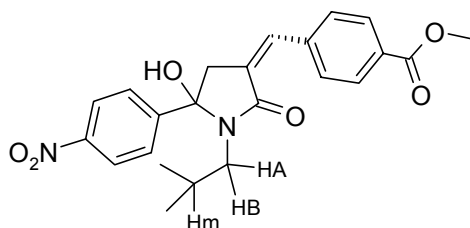
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 0,74 (d, J = 6,6, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,52 (m, 1 H, CH₂CH(CH₃)₂); 2,24 (s, 3H, COCH₃); 3,54 (d, J = 7,5, 2H, CH₂CH(CH₃)₂); 6,09 (s, 1H, Ha); 7,36 (s, 1H, Hb); 7,43 (d, J = 8,7, 2H, ArH de 4-NHAcPh); 7,65 (d, J = 8,5, 2H, ArH de 4-NHAcPh); 7,69 (m, 4H, ArH de 4-CNPh).

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 19,96 (2 CH₃); 24,90 (OCH₃); 28,20 (CH); 48,23 (CH₂); 100,01 (CHa); 112,17 (C); 118,78 (C); 119,74 (2 CHAr); 127,22 (C); 128,60 (2 CHAr); 129,10 (CH); 130,41 (2 CHAr); 132,61 (2 CHAr); 139,40 (C); 140,58 (2 C); 151,71 (C); 168,54 (C); 170,68 (C).

4-[(Z)-[5-hydroxy-1-isobutyl-5-(4-nitrophényl)-2-oxopyrrolidin-3-ylidene]méthyl]-benzoate de méthyle 185k



$C_{23}H_{24}N_2O_6$

424,46 g.mol⁻¹

coton blanc

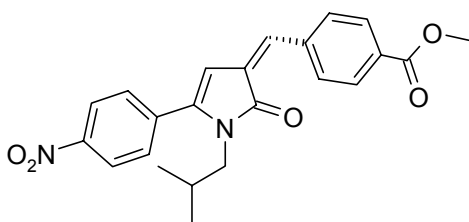
Rdt = 40 % (Méthode B)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 0,79 (d, J = 6,5, 3H, CH₂CH(CH₃)₂); 0,82 (d, J = 6,5, 3H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,71 (m, 1H, H_m); 2,74 (dd, J_{HAH_m} = 8,1 et J_{HAHB} = 13,7, 1H, CH_AH_BCH(CH₃)₂); 3,29 (dd, J_{H_BH_m} = 7,5 et J_{HAHB} = 13,7, 1H, CH_AH_BCH(CH₃)₂); 3,48 (d, J = 2,2, 2H, CH₂ pyrrole); 3,55 (s, 1 H, OH); 3,92 (s, 3H, CO₂CH₃); 7,43 (d, J = 8,4, 2H, Ar₂-H) ; 7,52 (m, 1H, H_{vin}) ; 7,43 (d, J = 9, 2H, Ar₁-H) ; 7,99 (d, J = 8,4, 2H, Ar₂-H) ; 8,25 (d, J = 9, 2H, Ar₁-H).

ESMS m/z : 447 (M+Na)

4-[[5-(4-nitrophenyl)-1-isobutyl-2-oxo-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-ylidène]méthyl]benzoate de méthyle 187k (gfp74-00)



$C_{23}H_{22}N_2O_5$

406,44 g.mol⁻¹

solide orange

Rdt déshydratation = 75 %

Rdt global = 28 % (Méthode B)

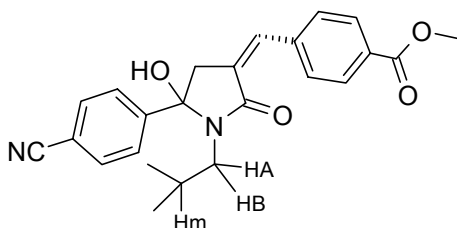
PF = 153-155°C

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 0,75 (d, J = 6,6, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,62 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,57 (d, J = 7,6, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,94 (s, 3H, CO₂CH₃); 6,31 (s, 1H, Ha) ; 7,56 (s, 1H, Hb) ; 7,6-7,8 (m, 4H, ArH) ; 8,09 (d, J = 8,4, 2H, ArH) ; 8,25 (m, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 67,08 H% 5,53 N% 6,80 (+0,3 H₂O)
trouvée C% 67,03 H% 5,55 N% 6,74

4-[(Z)-[5-hydroxy-1-isobutyl-5-(4-cyanophényl)-2-oxopyrrolidin-3-ylidène]méthyl]-benzoate de méthyle 185I



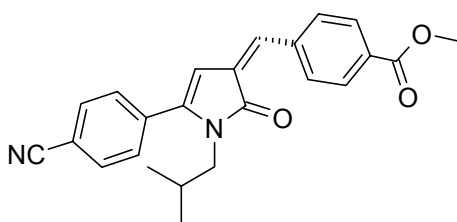
$C_{24}H_{24}N_2O_4$
 404,47 g.mol⁻¹
 coton blanc
 Rdt = 35 % (Méthode B)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 0,70 (d, J = 6,5, 3H, CH₂CH(CH₃)₂); 0,77 (d, J = 6,5, 3H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,53 (m, 1H, H_m); 2,79 (dd, J_{HAH_m} = 8,4 et J_{HAHB} = 13,7, 1H, CH_AH_BCH(CH₃)₂); 3,20 (dd, J_{H_BH_m} = 7,2 et J_{HAHB} = 13,7, 1H, CH_AH_BCH(CH₃)₂); 3,44 (d, J = 2,2, 2H, CH₂ pyrrole); 3,91 (s, 3H, CO₂CH₃); 4,39 (s, 1 H, OH); 7,37 (d, J = 8,4, 2H, Ar2-H) ; 7,43 (m, 1H, H_vin) ; 7,61 (d, J = 8,8, 2H, Ar1-H) ; 7,68 (d, J = 8,8, 2H, Ar1-H) ; 7,94 (d, J = 8,4, 2H, Ar2-H).

ESMS m/z : 427 (M+Na)

4-[[5-(4-cyanophényl)-1-isobutyl-2-oxo-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-ylidène]méthyl]benzoate de méthyle 187I (gfp73-00)

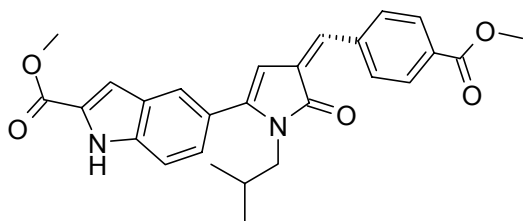


$C_{24}H_{22}N_2O_3$
 386,45 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt déshydratation= 72 %
 Rdt = 23 % (Méthode B)
 Rdt = 62 % (Méthode C)
 PF = 145-147°C

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 0,75 (d, J = 6,6, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,61 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,55 (d, J = 7,4, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,95 (s, 3H, CO₂CH₃); 6,26 (s, 1H, Ha) ; 7,53 (s, 1H, Hb) ; 7,5-7,9 (m, 6H, ArH) ; 8,09 (d, J = 8,3, 2H, ArH).

5-{[4-(méthoxycarbonyl)phényl]méthylidène}-5-oxopyrrolin-2-yl]-1H-indole-2-carboxylate de méthyle 187n (gfp75-00)

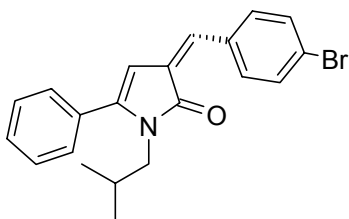


$C_{27}H_{26}N_2O_5$
 458,52 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 25 % (Méthode B)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 0,73 (d, J = 6,6, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,69 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,59 (d, J = 7,5, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,94 (s, 3H, CO₂CH₃); 3,99 (s, 3H, CO₂CH₃); 6,19 (s, 1H, Ha) ; 7,29 (s, 1H, H4 indole); 7,42 (d, J = 8,7, 1H, H6 indole); 7,43 (m, 1H, Hb) ; 7,52 (d, J = 8,7, 1H, H7 indole); 7,70 (d, J = 8,4, 2H, ArH); 7,83 (s, 1H, H3 indole); 8,07 (d, J = 8,4, 2H, ArH); 9,02 (s, 1H, NH éch.).

N1-isobutyl-3-(4-bromobenzylidène)-5-phenyl-1H-pyrrolin-2-one 187o



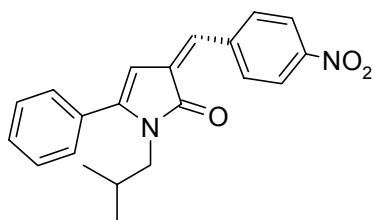
$C_{21}H_{20}BrNO$
 382,30 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt = 45 % (Méthode C)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 0,74 (d, J = 6,8, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,66 (m, 1 H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,55 (d, J = 7,5, 2H, CH₂CH(CH₃)₂); 6,09 (s, 1H, Ha); 7,31 (s, 1H, Hb); 7,4-7,5 (m, 5H, ArH); 7,6-7,8 (m, 4H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 65,98 H% 5,27 N% 3,66
 trouvée C% 65,79 H% 5,38 N% 3,59

N1-isobutyl-3-(4-nitrobenzylidène)-5-phenyl-1H-pyrrolin-2-one 187p (gfp90-03)



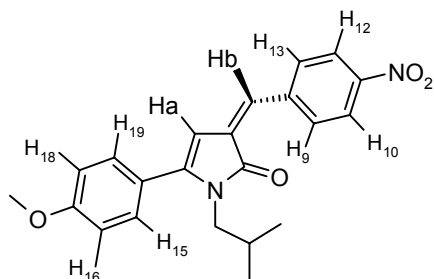
$C_{21}H_{20}N_2O_3$
 348,41 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt Méthode B= 30 %
 Rdt Méthode C= 67 %
 PF = 143-145°C

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) :

0,75 (d, J = 6,6, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,64 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,56 (d, J = 7,6, 1H, CH₂CH(CH₃)₂); 6,15 (s, 1H, Ha); 7,43 (s, 1H, Hb) ; 7,4-7,6 (m, 4H, ArH); 7,77 (d, J = 9, 2H, ArH); 8,27 (d, J = 9, 2H, ArH).

Microanalyse : calculée C% 72,40 H% 5,79 N% 8,04
 trouvée C% 72,52 H% 5,95 N% 8,13

N1-isobutyl-3-(4-nitrobenzylidène)-5-(4-méthoxyphényl)-1H-pyrrolin-2-one 187q (gfp93-03)



$C_{22}H_{22}N_2O_4$
 378,43 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 76 % (Méthode C)
 PF = 157-159°C

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

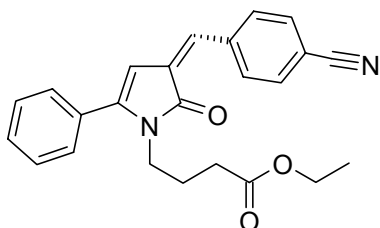
δ 0,76 (d, J = 6,6, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); 1,70 (m, 1 H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,55 (d, J = 7,5, 2H, CH₂CH(CH₃)₂); 3,89 (s, 3H, OCH₃); 6,09 (s, 1H, Ha); 7,01 (d, J = 8,8, 2H, H16 et H18); 7,38 (s, 1H, Hb); 7,42 (d, J = 8,8, 2H, H15 et H19); 7,76 (d, J = 8,6, 2H, H9 et H13); 8,27 (d, J = 8,6, 2H, H10 et H12).

NOESY :

Corrélation H9/13 avec Hb, H9/13 avec Ha, H15/19 avec Ha, H15/19 avec H16/18, H16/18 avec OCH₃, H15/19 avec CH₂ de i-Bu, H9/13 avec H10/12; pas de corrélation Ha avec Hb → forme trans

Microanalyse : calculée C% 69,49 H% 5,89 N% 7,37 (+0,1 H₂O)
trouvée C% 69,47 H% 5,92 N% 7,42

N1-éthoxybutanoate-3-(4-cyanobenzylidène)-5-phényl-1H-pyrrolin-2-one 188e



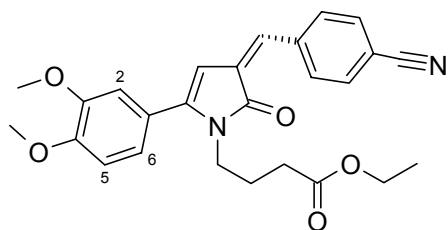
C₂₄H₂₂N₂O₃
386,45 g.mol⁻¹
solide rouge
Rdt = 52 % (Méthode C)

Réaction faite avec 1,2 éq. de TEA. Recristallisation dans l'EtOH.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 1,10 (t, J = 7,2, 3 H, COOCH₂CH₃); 1,59 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂COOEt); 2,15 (t, J = 7,2, 2 H, N(CH₂)₂CH₂COOEt); 3,68 (t, J = 7,2, 2 H, NCH₂(CH₂)₂COOEt); 3,93 (q, J = 7,2, 2 H, COOCH₂CH₃); 6,49 (s, 1H, Ha); 7,32 (s, 1H, Hb); 7,5-7,7 (m, 5H, ArH); 7,87 (d, J = 8,3, 2H, ArH); 7,97 (d, J = 8,3, 2H, ArH).

N1-éthoxybutanoate-3-(4-cyanobenzylidène)-5-(3,4-diméthoxy)phényl-1H-pyrrolin-2-one 188g



C₂₆H₂₆N₂O₅
446,51 g.mol⁻¹
solide orange
Rdt = 50 % (Méthode B)

Réaction faite avec 1,2 éq. de TEA. Recristallisation dans l'EtOH.

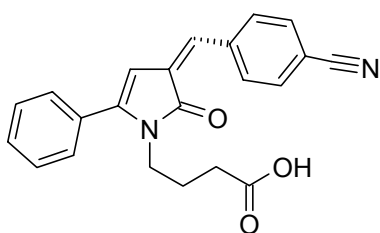
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 1,20 (t, $J = 7,2$, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 1,82 (m, 2 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$); 2,26 (t, $J = 7,4$, 2 H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{COOEt}$); 3,74 (t, $J = 7,2$, 2 H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COOEt}$); 3,95 (s, 6H, 2 OCH_3); 4,05 (q, $J = 7,2$, 2 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 6,08 (s, 1H, Ha); 6,96 (d, $J = 1,9$, 1H, H2); 6,97 (d, $J = 8,1$, 1H, H5); 7,07 (dd, $J_{\text{H6-H5}} = 8,1$ et $J_{\text{H6-H2}} = 1,9$, 1H, H6); 7,34 (s, 1H, Hb); 7,6-7,8 (m, 4H, ArH).

Hydrolyse de 37r et 37s :

Une suspension de 200 mg d'ester dans 3 mL d'un mélange HCl 1N/AcOH (1/1) est chauffée à 90°C pendant 3h. Le précipité formé est filtré puis lavé avec 2x5 mL d'eau puis séché sous vide.

Acide 4-[(3Z)-3-(4-cyanobenzylidene)-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-yl]-butanoïque **189e**

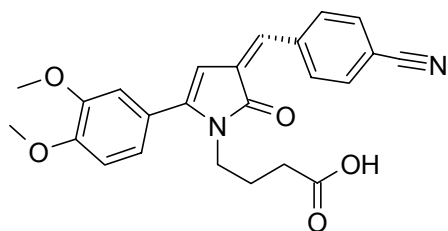


$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$
 358,40 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 70 %

^1H -RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,57 (m, 2 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); 2,07 (t, $J = 7,3$, 2 H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{COOH}$); 3,66 (t, $J = 7,4$, 2 H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$); 6,48 (s, 1H, Ha); 7,31 (s, 1H, Hb); 7,4-7,7 (m, 5H, ArH); 7,86 (d, $J = 8,1$, 2H, ArH); 7,97 (d, $J = 8,1$, 2H, ArH); 12,01 (s, 1H, COOH).

Acide 4-[(3Z)-3-(4-cyanobenzylidene)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-yl]butanoïque 189g



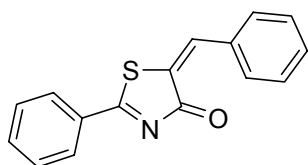
C₂₄H₂₂N₂O₅
 418,45 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt = 60 %

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 1,84 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂COOEt); 2,34 (t, J = 7,1, 2 H, N(CH₂)₂CH₂COOH); 3,78 (t, J = 7,1, 2 H, NCH₂(CH₂)₂COOH); 3,96 (s, 3H, OCH₃); 3,97 (s, 3H, OCH₃); 6,13 (s, 1H, Ha); 6,8-7,0 (m, 2H, H2 et H5); 7,10 (dd, J_{H6-H2} = 8,3 et J_{H6-H5} = 1,5, 1H, H6); 7,39 (s, 1H, Hb); 7,6-7,8 (m, 4H, ArH).

Préparation des thiazolones 191 :

5-benzylidène-2-phényl-1,3-thiazol-4(5H)-one 191a (gfp15-99)



C₁₆H₁₁NOS
 265,34 g.mol⁻¹
 solide jaune peu soluble
 Rdt = 5 %
 PF = 132-135°C

Une solution de 1,03 mL (10 mmoles, 1 éq.) de benzonitrile, 0,70 mL (10 mmoles, 1 éq.) d'acide thioglycolique, 1,01 mL (10 mmoles, 1 éq.) de benzaldéhyde et 1 mL de triéthylamine dans 30 mL d'éthanol est portée à reflux pendant une heure. Evaporer l'éthanol, reprendre l'huile brunâtre obtenue dans l'éther et faire un lavage avec une solution de bicarbonate de sodium. Evaporer la phase organique après l'avoir séchée sur Na₂SO₄.

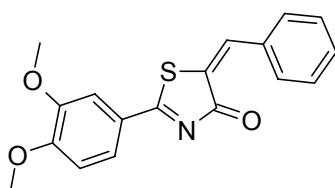
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) :

δ 7,15-7,55 (m, 5H, ArH); 7,6-7,7 (m, 3H, ArH); 7,99 (s, 1H, CHv-Ph); 8,14 (m, 3H, ArH).

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) :

δ 126,79 (C) ; 129,28 (CHAr) ; 129,70 (CHAr) ; 131,11 (CHAr) ; 131,52 (CHAr) ; 132,18 (C) ; 134,17 (C) ; 135,58 (CHAr) ; 139,03 (CHAr) ; 183,66 (C) ; 187,77 (C).

5-benzylidène-2-(3,4-diméthoxyphényl)-1,3-thiazol-4(5H)-one 191b (gfp18-99)



$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$

325,39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide jaune peu soluble

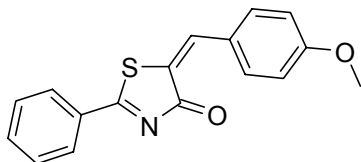
Rdt = 13 %

Une solution de 2,06 mL (20 mmoles, 1 éq.) de benzonitrile, 1,4 mL (20 mmoles, 1 éq.) d'acide thioglycolique, 2,44 mL (20 mmoles, 1 éq.) d'anisaldéhyde et 2 mL de triéthylamine dans 10 mL d'éthanol est portée à 90°C pendant 12 heures dans un tube scellé. Filtrer le précipité obtenu et le triturer dans l'éther.

^1H -RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,92 (s, 3H, OCH_3); 3,94 (s, 3H, OCH_3); 7,2-7,4 (m, 2H, ArH); 7,5-8,0 (m, 7H, ArH).

5-(4-méthoxybenzylidène)-2-phényl-1,3-thiazol-4(5H)-one 191c (gfp16-99)



$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$

295,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

solide orange peu soluble

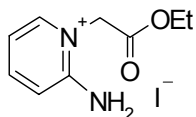
Rdt = 20 %

PF = 205-210°C

Même mode opératoire que **191b**.

^1H -RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 3,87 (s, 3H, OCH_3); 7,2-7,4 (m, 2H, ArH); 7,5-8,3 (m, 8H, ArH).

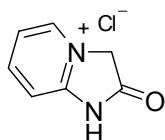
Synthèse des imidazopyridines :**2-amino-1-(2-éthoxy-2-oxoéthyl)pyridinium 193**

$C_9H_{13}N_2O_2I$
 308,12 g.mol⁻¹
 solide blanc
 Rdt = 78 %

Une solution de 2,5 mL de chloroacétate d'éthyle (0,024 mole, 2,4 éq) et 3,6g de NaI (0,024 mole, 2,4 éq) est portée à reflux dans 5 mL d'isopropanol pendant 1 heure. Après refroidissement 1,47g de benzamidine (15,6 mmoles, 1,6 éq.), 1 mL de benzaldéhyde (10 mmoles, 1 éq.), et 15 mL d'isopropanol sont ajoutés au mélange. Celui-ci est agité pendant 12 heures à T.A. Le précipité formé (3,5g de **193** + NaCl) est filtré et lavé 3 fois avec 10 mL d'éthanol. Le filtrat est évaporé à sec et le solide obtenu est recristallisé dans l'EtOH (300 mg de **193**).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) :

δ 1,34 (t, J = 7,2 , 3H, CH₃); 4,31 (q, J = 7,2 , 2H, OCH₂); 5,12 (s, 2H, CH₂); 6,94-6,98 (m, 1H, ArH); 7,12-7,16 (m, 1H, ArH) ; 7,9-8,0 (m, 2H, ArH)

2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[1,2-a]pyridin-4-ium 194 gfp41-99

$C_7H_8N_2OCl$
 171,60 g.mol⁻¹
 solide beige
 Rdt = 45 %
 PF > 230°C

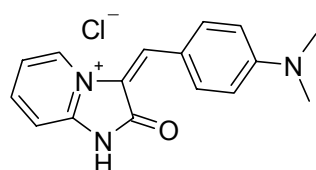
A une solution fortement agitée de 8g d'acide chloroacétique (85 mmoles, 1 éq.) dans 32 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte, 7g de K₂CO₃ (50 mmoles, 0,6 éq) dissous dans 10 mL d'eau pendant 1h. A la fin du dégagement gazeux, 8g de 2-aminopyridine (85 mmoles, 1 éq) sont ajoutés et le mélange est chauffé à 85-95°C pendant 3h. Après le refroidissement du milieu par 80 mL d'eau glacée, le précipité formé est filtré et lavé 3 fois avec 20 mL d'eau glacée puis repris dans 46 mL d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est distillé en chauffant par pallier (max.140°C) jusqu'à ce que le produit cristallise. Après refroidissement,

le solide est filtré puis lavé avec de l'acétone. Le filtrat est évaporé et le résidu obtenu est repris dans l'acétone, filtré puis séché à l'étuve (80-90°C).

^1H -RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 5,23 (s, 2H, CH_2) ; 7,4-7,7 (m, 2H, ArH) ; 8,37 (m, 1H, ArH) ; 8,75 (d, $J = 7$, 1H, ArH)

chlorure de 3-[4-(diméthylamino)benzylidène]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[1,2-a]pyridin-4-ium **195a**



$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OCl}$
301,78 g.mol $^{-1}$
solide violet

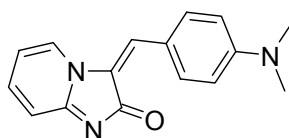
Un mélange de 1 g de dihydropyridazolone **194** (5,86 mmoles, 1 éq.) et 0,874 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde (5,86 mmoles, 1 éq.) dans 10 mL d'EtOH est chauffé à reflux pendant 10 min. Après refroidissement et filtration, le résidu collant obtenu est trituré dans l'isopropanol puis dans l'oxyde d'isopropyle pour donner 1,2 g d'une poudre violette impure.

^1H -RMN (200 MHz, D_2O) :

δ 2,73 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 6,06 (d, $J = 9$, 2H, ArH de 4- NMe_2Ph) ; 7,03 (d, $J = 7$, 1H, ArH) ; 7,07 (s, 1H, $\text{CH}^v\text{-Ph}$) ; 7,10-7,30 (m; 1H, ArH) ; 7,70 (d, $J = 9$, 2H, ArH de 4- NMe_2Ph) ; 7,75-7,90 (m; 1H, ArH) ; 8,21 (d, $J = 7$, 2H, ArH)

ESMS m/z : 266 (M^+).

3-[4-(diméthylamino)benzylidène]imidazo[1,2-a]pyridin-2(3H)-one **195b** (gfp37-99)



$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}$
265,32 g.mol $^{-1}$
solide orange
Rdt = 27 %
PF > 230°C

Le solide violet est repris dans 500 mL de CH_2Cl_2 , le mélange est lavé avec une solution de NaOH 10N. Après extraction et évaporation de la phase organique, 400 mg d'un solide orange sont obtenus.

^1H -RMN (200 MHz, DMSO + TFA) :

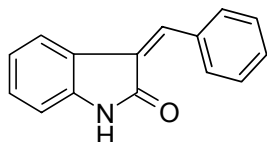
δ 3,16 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 6,89 (d, $J = 9$, 2H, ArH de 4-NMe₂Ph) ; 7,4-7,6 (m, 2H, ArH) ; 8,16 (m, 1H, ArH) ; 8,31 (s, 1H, CHv-Ph) ; 8,49 (d, $J = 9$, 2H, ArH de 4-NMe₂Ph) ; 9,23 (d, $J = 7$, 1H, ArH)

ESMS m/z : 266 (M+H).

Mode opératoire général pour la préparation des oxindoles 196 :

Un mélange d'oxindole (3,75 mmol, 1 éq.) et d'aldéhyde (4,13 mmol, 1,1 éq.) dans 10 mL d'EtOH est chauffé à 70-75°C pendant 5h avec 1 mL de pipéridine. Après refroidissement, le précipité formé est filtré puis rincé à l'EtOH.

3-benzylidène-1,3-dihydro-2H-indol-2-one 196a (gfp43-00)



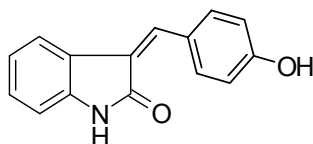
C₁₅H₁₁NO
221,26 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 45 %
Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,44

Recristallisé dans l'AcOEt

¹H-RMN (200 MHz, DMSO + TFA) :

δ 6,8-7,0 (m, 2H, ArH) ; 7,1-7,3 (m, 1H, ArH) ; 7,4-7,6 (m, 4H, ArH) ; 7,65 (s, 1H, CHv-Ph) ; 7,7-7,9 (m, 2H, ArH) ; 10,62 (s large, 1H, NH éch.).

3-(4-hydroxybenzylidène)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one 196b (gfp44-00)



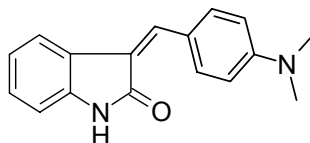
C₁₅H₁₁NO₂
237,26 g.mol⁻¹
solide jaune
Rdt : 68 %
Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,23

Recristallisé dans un mélange EtOH/iPrOH/MeOH (8/1/1)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 6,7-7,0 (m, 4H, ArH) ; 7,1-7,3 (m, 1H, ArH) ; 7,53 (s, 1H, CHv-Ph) ; 7,61 (d, J = 8,4, 2H, ArH) ; 7,69 (d, J = 7,5, 2H, ArH) ; 10,12 (s large, 1H, NH éch.) ; 10,12 (s large, 1H, OH éch.).

3-[4-(diméthylamino)benzylidène]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one 196c (gfp45-00)



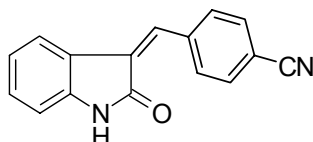
$C_{17}H_{16}N_2O$
 264,33 g.mol⁻¹
 solide rouge
 Rdt : 80 %
 Rf (AcOEt/hexane 1/1) : 0,33

Recristallisé dans un mélange EtOH/iPrOH/MeOH (8/1/1)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,02 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 6,7-6,8 (m, 3H, ArH) ; 6,9-7,0 (m, 1H, ArH) ; 7,0-7,2 (m, 1H, ArH) ; 7,62 (s, 1H, CHPh) ; 7,69 (d, J = 9, 2H, ArH) ; 10,43 (s large, 1H, NH éch.).

3-(4-cyanobenzylidène)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one 196d (gfp45-00)



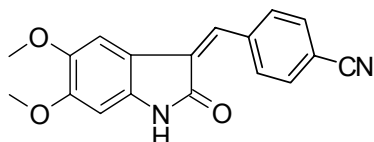
$C_{16}H_{10}N_2O$
 246,27 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 60 %
 PF : 234-236°C

Trituré dans Et₂O.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 6,85 (m, 2H, ind-5 et ind-6); 7,23 (d, J = 8, 1H, ind-4); 7,36 (d, J = 8, 1H, ind-7); 7,62 (s, 1H, CHv-Ph); 7,85 (d, J = 8, 2H, ArH); 7,96 (d, J = 8, 2H, ArH); 10,65 (s large, 1H, NH éch.).

3-(4-cyanobenzylidène)-5,6-diméthoxy-1,3-dihydro-2H-indol-2-one 196e (gfp45-00)



$C_{18}H_{14}N_2O_3$
 306,32 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 60 %

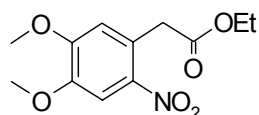
PF : 234-236°C

La pâte rouge obtenue est dissoute dans 15 mL de DMF puis de l'eau est ajoutée jusqu'à la précipitation. Le solide rouge est filtré puis séché sous vide.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO) :

δ 3,56 (s, 3H, OMe); 3,79 (s, 3H, OMe); 6,51 (s, 1H, ArH); 6,98 (s, 1H, ArH); 7,42 (s, 1H, CH_v-Ph); 7,87 (d, J = 8, 2H, ArH); 7,97 (d, J = 8, 2H, ArH); 10,41 (s large, 1H, NH éch.).

(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)acétate d'éthyle 198



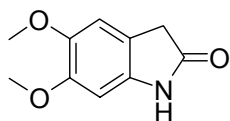
C₁₂H₁₅NO₆
269,26 g.mol⁻¹
solide beige
Rdt : 82%

Un mélange de 7g de 3,4-diméthoxyphénylacétate d'éthyle **197** (31 mmoles, 1 éq.) et de 40 mL d'AcOH est refroidit dans un bain de glace. Une solution de 8,2 mL d'acide nitrique à 68%, préalablement refroidie dans un bain de glace, est ensuite ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel froid. La solution est ensuite agitée à TA pendant 15 min puis versée sur un mélange glace/eau. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 2x10 mL d'eau puis séché sous vide.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO) :

δ 1,19 (t, J = 7, 3H, OCH₂CH₃); 3,89 (s, 3H, OCH₃); 3,90 (s, 3H, OCH₃); 4,04 (s, 2H, CH₂COOEt); 4,10 (q, J = 7, 2H, OCH₂CH₃); 7,19 (s, 1H, H6); 7,72 (s, 1H, H3).

5,6-diméthoxy-1,3-dihydro-2H-indol-2-one 200



C₁₀H₁₁NO₃
 193,20 g.mol⁻¹
 solide orange
 Rdt : 60 %
 PF : 208-213°C

Un mélange de 2,7 g de **198** (10 mmoles), 50 mL d'AcOH et 270 mg de Pd/C, sous atmosphère d'H₂ à 50 psi est agité pendant 5h. Après filtration du Pd/C et évaporation de l'AcOH, le produit est séché sous vide.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) :

δ 3,52 (s, 2H, CH₂ indole); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,55 (s, 1H, H4); 6,86 (s, 1H, H7); 8,52 (s large, 1H, NH éch.).