
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Motatu, I.-A. (2015). *Synthèse et évaluation des propriétés anticancéreuses de nouveaux dérivés de tétrahydro gbs carbolines* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté des Sciences – Chimie, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/209137/4/241c673a-0adb-494a-a0ea-c0a91213a821.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

D 04031



communication refusée

Faculté des Sciences
Service de Chimie et Physicochimie Organiques
Laboratoire de Chimie Organique

Synthèse et évaluation des propriétés anticancéreuses de nouveaux dérivés de tétrahydro- β -carbolines

Thèse de doctorat présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Sciences

Alexandra Motatu

Février 2015

Promoteur :
Pr. Ivan Jabin

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES,
UNIVERSITÉ D'EUROPE

ULB

Universite Libre de Bruxelles



003566058

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier le Professeur Ivan Jabin pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Chimie Organique pour effectuer cette thèse de doctorat. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a donnée en m'intégrant dans son équipe et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Je tiens à remercier également les Professeurs Robert Kiss et Véronique Mathieu du Laboratoire de Toxicologie et Cancérologie Expérimentale (ULB) pour leur aide dans l'évaluation des effets biologiques de mes composés, ainsi que pour leurs conseils, les encouragements, la confiance qu'ils m'ont accordé et les corrections apportées à ce manuscrit. Je remercie sincèrement MD Florence Lefranc pour sa disponibilité, son encadrement et ses conseils lors de l'expérience de microscopie de fluorescence.

J'adresse un chaleureux remerciement au Professeur Vincent Dalla pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire (Université du Havre) pour réaliser la synthèse asymétrique des dérivés de la tétrahydro- β -carboline. Je le remercie pour l'attention qu'il a porté à notre collaboration et pour ses conseils très constructifs. Je remercie tout aussi chaleureusement Dr. Catherine Tailler pour son encadrement, sa disponibilité, sa patience et ses conseils.

Mes remerciements s'adressent aussi aux autres Membres du jury, les Professeurs Michel Luhmer, Vincent Raussens et Johan Wouters pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je voudrais également remercier le FRIA pour le financement de ce projet.

Je remercie de tout cœur Michel Kaisin pour la bourse qui porte son nom et qui m'a permis d'aller au Havre pour développer la méthode de synthèse asymétrique. Michel, je te remercie également pour les nombreuses et précieuses corrections que tu as apportées à ce manuscrit.

Je tiens à remercier également le Professeur Gwilherm Evano qui s'est toujours montré disponible pour répondre à mes questions.

Un grand merci à Pierre Van Antwerpen pour son aide lors de l'utilisation de l'HPLC préparative.

Je souhaite remercier ensuite mes collègues de la « Calixteam ». Nous avons passé des très bons moments ensemble et je vous remercie pour votre gentillesse, votre soutien et pour la bonne ambiance que vous avez créé autour de moi et qui a fait du labo LCO un endroit très agréable pour travailler. Je ne peux pas vous promettre que je mangerai de la viande et que j'arrêterai les graines, mais je vais toujours me rappeler les drinks, les soirées et les repas de midi. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et vous allez me manquer énormément!

JF, mon papa du labo, tu as joué un rôle très important dans ma décision de faire une thèse en m'encadrant pendant mon stage Erasmus et en me faisant ainsi découvrir la beauté de la Chimie Organique.

Angel, chérie, j'ai toujours admiré ton attention portée aux détails. Merci pour ton exemple et pour ton soutien. Merci également pour les corrections que tu as apportées à ce manuscrit et pour les soirées sympa qu'on a passé ensemble.

Damien, merci pour ton encadrement tout au début de ma thèse. C'est grâce à toi et à Sébastien que ce projet a commencé. Je te remercie aussi pour les nombreuses discussions scientifiques, ou non, et pour m'avoir fait découvrir Kaamelot.

Alice, tu es quelqu'un qui est toujours prête à aider. Je te remercie pour tes conseils et ta disponibilité pendant ma thèse et surtout pour la patience pendant ma rédaction. Toi, et dans les derniers mois, ta petite fille, étaient les meilleurs compagnons de bureau.

Steven, c'était vraiment chouette d'encadrer des TP avec toi. Tes étudiants ont beaucoup de chance car ça se voit que l'enseignement te plaît ! Merci pour ton aide, ta gentillesse et pour la patience avec laquelle tu répondais à mes questions. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse !

Gaël, mon cher voisin de paillasse, merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble. Je te remercie également pour ton aide en tout ce qui concerne l'informatique. Bon courage pour ta thèse ! Je n'ai aucun doute que ça va très bien se passer, mais malheureusement, tu vas devoir trouver quelque d'autre à chatouiller...

Sara, tes calix n'ont pas du tout été gentils avec toi mais, malgré ça, ton courage dans ton travail est impressionnant et je suis sûre que plein de bonnes choses vont suivre. Je te le souhaite ! Même si personne ne le reconnaît pas, tu es la petite princesse-fée du labo et évidemment : merci pour m'avoir fait découvrir Disneyland !

Roy, ta façon d'assumer ton originalité me faisait toujours sourire. J'espère que tu resteras original le plus longtemps possible ! Un tout grand merci pour la patience avec laquelle tu répondais à mes questions informatiques, scientifiques et RMN.

Alex, merci pour avoir assuré une bonne ambiance au labo avec tes chansons et bon courage pour la fin de ta thèse !

Merci également à mes collègues du « labo 3 » : Cédric, Morgan, Antoine, Jian-Jun, Charles, Phideline, Emeline et Christopher pour leur bonne humeur communicative.

Un merci spécial à Céline, ma mémorante, pour la contribution qu'elle a apportée à ce travail. Ce fut un plaisir de t'encadrer !

Merci également aux différents post-docs, chercheurs et mémorants qui ont travaillé au labo ou qui ont croisé mon chemin pendant ma thèse et d'une façon ou une autre ont contribué à la super ambiance du labo : Axel, Benjamin C., Manu, Pierre-Edouard, Alexandre, Minh-Dung, Larla, Coryse, Gaëlle, Nicolas, Alix, Jonathan, Guillaume et Florian. Pikachu, un merci spécial pour avoir assuré la diversité des fonds d'écran sur mon ordi.

Merci aux PATGS du service : Marc, Georges, Mohamed et Jessica pour l'efficacité avec laquelle ils maintiennent le bon fonctionnement du laboratoire.

Et je n'oublie certainement pas mes collègues du laboratoire de Toxicologie dans mes remerciements.

Ma chère Delphine, si JF était mon « papa du labo », toi tu étais ma « marraine du labo ». Je n'oublierai jamais l'amitié avec laquelle tu m'as accueillie chez toi quand je suis arrivée en Belgique pour démarrer ma thèse. Avec ton calme, ta force, ta rigueur et, en même temps, ta gentillesse, tu as toujours été un modèle d'équilibre parfait pour moi. Merci pour tout !

Céline, je te remercie pour les bons moments qu'on a passés ensemble, pour les discussions scientifiques ou non et pour ton aide lors des tests AP-1 et cytokines. Je te souhaite plein de bonnes choses !

Merci à vous deux pour l'encadrement et les conseils précieux que vous m'avez donnés, pour vos encouragements et votre soutien !

Benjamin, merci pour ton aide lors des analyses HPLC.

Merci à Thierry pour sa patience et pour son aide au niveau du test MTT.

Merci également aux autres chercheurs de pharma avec lesquels j'ai travaillé tout au début de ma thèse : Natalie, Iyas, Jalal, Gilles et Cédric. Je vous remercie pour votre soutien et pour votre bonne humeur. Merci à François Dufasne et à Michel Gelbcke pour la bonne collaboration lors du projet DYRK1A et pour leur soutien.

J'adresse aussi mes remerciements aux trois autres chercheurs avec lesquels j'ai travaillé pendant ma thèse : Lio, merci pour m'avoir fait découvrir les joies de la fluorescence ! C'était un plaisir de travailler avec toi pendant les TP et pendant ces dernières expériences. Bon courage pour la suite ! Maud c'était un plaisir de faire des hydrogénations avec toi ! Ludo, bienvenu dans l'équipe « Calix » !

Je voudrais également remercier les membres de l'équipe URCOM : Marie-Jo, Nicolas, Vincent, Sébastien, Olivier, Mohamed, Catalin, Audrey et Ronan.

J'adresse également mes remerciements à Rita et à Lidija pour les innombrables échantillons qu'elles ont fait passer en RMN pendant ces 4 ans de thèse.

Merci à tous mes amis pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles et pour toutes les bonnes soirées que nous avons passées ensemble. Une pensée toute particulière pour Mădălina, Larisa, Matei et Alina, votre présence a toujours été précieuse.

Je vais terminer par remercier à ma famille sans qui je ne serais pas arrivée jusqu'ici. Merci à mes parents pour avoir cru en moi et pour m'avoir toujours poussé à aller plus loin. Je les remercie pour les valeurs qu'ils m'ont transmises, qui sont les bases de ce que je suis aujourd'hui. Bogdan, mon frère chéri, ton opinion sera toujours importante pour moi car ta façon de penser est très originale. Surtout ne change pas !

Cătălin, tu as toujours été là pour moi dans mes grands moments de joie et dans mes pires moments de découragement. Merci pour ton dévouement et pour ton soutien ! Je ne serai pas arrivée jusqu'ici sans toi.

Resumé

Le cancer reste une maladie grave car il représente une des causes principales de décès dans les pays développés. Plus d'un tiers de cancers solides réagi très faiblement à la chimiothérapie conventionnelle et/ou développe rapidement une résistance au traitement. Des thérapies ciblées, utilisées en association avec les traitements conventionnels, pourraient augmenter la survie des patients. C'est dans le cadre des thérapies ciblées que ce travail de thèse s'inscrit.

Nous nous sommes intéressés à synthétiser de nouvelles molécules qui pourraient être efficaces contre les cancers résistants à l'apoptose et donc aux traitements conventionnels. La principale cible de notre projet était la kinase DYRK1A, qui a été décrite comme étant impliquée dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. Dans ce but, une série de nouvelles molécules, principalement des dérivés de la tétrahydro- β -carboline, a été synthétisée et leurs propriétés antitumorales ont été caractérisées *in vitro*. En effet, ces structures ressemblent à celle de l'harmicine, un alcaloïde apparenté à l'harmine, l'inhibiteur de DYRK1A le plus sélectif et le plus puissant connu à ce jour.

Une méthodologie "one-pot" très efficace, développée au Laboratoire de Chimie Organique (ULB), a été utilisée pour obtenir les squelettes de type tétrahydro- β -carboline. Le deuxième chapitre de cette thèse détaille cette méthodologie et décrit la librairie de 47 dérivés qui ont été synthétisés.

Un second objectif de ce travail était de développer une version énantiosélective de cette méthodologie afin de la rendre encore plus intéressante. Cette partie, décrite dans le troisième chapitre, a été réalisée avec succès en collaboration avec l'Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire de l'Université du Havre (Le Havre, France). Les expériences que nous avons réalisées ont permis, non seulement d'obtenir le composé le plus actif avec un bon excès énantiomérique, mais également de mieux comprendre les aspects mécanistiques qui constituent la base de l'énantiosélectivité.

L'évaluation des propriétés anticancéreuses des composés synthétisés est ensuite détaillée dans le quatrième chapitre. Les analyses toxicologiques et pharmacologiques ont montré que trois molécules présentent une bonne activité antitumorale *in vitro* avec une sélectivité prometteuse entre les cellules cancéreuses et les cellules normales. D'une manière inattendue, les tests biologiques plus poussés, que nous avons réalisés, ont suggéré que ces molécules n'agissent pas comme des inhibiteurs de kinases. Elles interfèrent en fait sur la prolifération cellulaire, en ciblant des facteurs de transcription spécifiques, par des mécanismes qui doivent encore être élucidés. Ces expériences biologiques ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire de Toxicologie et Cancérologie Expérimentale (ULB).

Summary

Cancer is a devastating disease which remains one of the major causes of death in developed countries. More than one third of adult solid cancers respond very poorly to chemotherapy and/or rapidly develop resistance to treatment. Targeted therapies, used in combination with conventional treatments could be used to increase the survival of cancer patients.

In this work we were interested in developing new molecules related to the targeted therapy concept that could be effective against cancer types that are resistant to apoptosis and thereby to conventional treatments. The leading target of our project was the DYRK1A kinase, which was described as being involved in cell proliferation and resistance to apoptosis. For this purpose, a series of new molecules, mainly tetrahydro- β -carboline derivatives, has been synthesized and their antitumoral properties were characterized *in vitro*. Indeed these structures resemble harmicine, an alkaloid similar to harmine, the most selective and potent DYRK1A inhibitor known to date.

An efficient "one-pot" methodology, developed in the Laboratoire de Chimie Organique (ULB) was used to obtain the tetrahydro- β -carboline scaffolds. Chapter II of this work describes the use of this methodology for the synthesis of a library of 47 derivatives.

A second goal of this work was to further improve this methodology by developing an enantioselective version. This part, described in chapter III, was carried out successfully in collaboration with the Research Unit in Macromolecular and Organic Chemistry of Université du Havre (Le Havre, France). The experiments we have performed enabled us not only to obtain the most active compound with a good enantiomeric excess, but also to gain insight of the mechanism responsible for the enantioselectivity.

The fourth chapter details the evaluation of the anti-cancer properties of the synthesised compounds. The pharmacological and toxicological analyses showed that 3 molecules display actual anti-tumor activity *in vitro* with a promising selectivity between cancerous and normal cells. Surprisingly, further biological assays we have performed suggested that these molecules do not act as kinase inhibitors but influence cell proliferation through the targeting of specific transcription factors by mechanisms that remain to be deciphered. The biological experiments were performed in collaboration with the Cancerology and Experimental Toxicology Laboratory (ULB).

Abréviations et symboles

ADN	Acide Désoxyribonucléique
(Boc) ₂ O	Di-tert-butylidicarbonate
Akt/PKB	Protein Kinase B
AP-1	Activator protein 1
Apaf	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Bcl-2-Associated Death Promoter
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated protein
Bcl-2	B-cell CLL/ lymphoma 2
Bcl-W	Bcl-2-like protein 2
Bcl-X _L	Bcl-2 like protein
Bcl-X _S	B-Cell Lymphoma - Extra Large
Bcr-Abl	Breakpoint Cluster Region- Abelson murine Leukemia
Bfl-1	Bcl-2-Related Protein A1
Bid	Bcl-2 Interacting Domain Death Agonist
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death
BINOL	1,1'-bi-2-naphthol
Boc	Tert-butoxycarbonyle
Cbz	Carboxybenzyl
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD20	B-Lymphocyte Antigen CD20
Cdc42	Cell Division Cycle 42
CDKs	Cyclin Dependent Kinases
CDKs	Cyclin-Dependent Kinases
CLKs	CDK-like kinases
COSY	Correlation Spectroscopy
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylamine
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DYRK1A	Dual-specificity tyrosine-(Y)-Phosphorylation Regulated Kinase 1A
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
éq.	Equivalents
ESI	Electrospray Ionization

Abréviations et symboles

EtOH	Ethanol
FADD	Fas-Associated Death Domain
Fas	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLIP	FADD-Like IL-1 β -converting enzyme - Inhibitory Protein
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
GG	Global Growth
GGR	Global Growth Ratio
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase-3-beta
GSKs	Glycogen Synthase Kinases
GTP	Guanosine Triphosphate
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bonds Correlation spectroscopy
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
Hrk	Harakiri, Bcl-2 interacting protein
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HRP	Horseradish peroxidase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy
IFN	Interferon
I κ B	Nuclear factor of κ -light-polypeptide-gene enhancer in B-cells inhibitor
IL	Interleukine
JAK	Janus kinase
KLF	Krüppel-like factor
MAO-A	Monoamine oxidase A
MAO-B	Monoamine oxidase B
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
Mcl-1	Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein
MEC	Matrice extracellulaire
MeCN	Acétonitrile
Mek/MAP2K	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MeOH	Méthanol
MDR	Multidrug resistance
mp	Melting point
MS	Molecular Sieves
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer cells
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NRTK	Non-receptor tyrosine kinase
Ns	Nosyle

Abréviations et symboles

Omi/Htra2	Htra serine peptidase 2
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p21 (CIP1)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53 (TP53)	Tumor protein p53
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PET	Positron Emission Tomography
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
pRB	Retinoblastoma protein
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTSA	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique
quant.	Quantitatif
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog
Ras	Rat Sarcoma virus oncogene
rdt.	Rendement
Rf	Rapport frontal
Rheb	Ras Homolog Enriched in Brain
Rho	Ras Homology growth-related
RKT	Receptor Tyrosine Kinase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SEM	Erreur standard de la moyenne [= moyenne/racine carré (no d'essais)]
Smac/DIABLO	Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspases
SP-1	Specificity protein 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Ta	Température ambiante
TBA	Tétra-n-butylammonium
TBTU	O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate
<i>t</i> Bu	Tert-butyle
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TFIIA	Transcription factor II A
TFIIB	Transcription factor II B
THBC	Tétrahydro- β -carboline
THBCI	Tétrahydro- β -carboline-Imidazolidin-2-one
THBCP	Tétrahydro- β -carboline-tétrahydroPyrimidin-2-one
THBTP	Tétrahydrobenzothiényopyridine
THBTPI	Tétrahydrobenzothiényopyridine-Imidazolidin-2-one
THF	Tétrahydrofurane
THIQ	Tétrahydroisoquinoléine
THIQI	Tétrahydroisoquinoléine-Imidazolidin-2-one
THTP	Tétrahydrothiényopyridine

Abréviations et symboles

THTPI	Tétrahydrothiényridine-Imidazolidin-2-one
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRADD	TNF Receptor Associated Death-Domaine
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIP	2,4,6-triisopropylphenyl
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VMQ	Vidéo Microscopie Quantitative

dqfCOSY: Double-Quantum Filtered-CORrelated SpectroscopY.

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

δ : Déplacement chimique

ppm : partie par million

s : singulet, bs : singulet large, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : massif (si intervalle de δ)/ multiplet (si une seule valeur pour δ).

S : Solvant

W : Eau

G : Graisse

Table de matières

Chapitre I - Introduction.....	1
1.1 Le cancer.....	2
1.1.1 Caractéristiques générales.....	2
1.1.1.1 Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses.....	2
1.1.1.2 Le cycle cellulaire.....	11
1.1.1.3 La migration cellulaire.....	15
1.1.1.4 La complexité de la signalisation dans une cellule - Rôle des kinases dans le contrôle du cycle cellulaire et de la migration.....	18
1.1.2 Epidémiologie.....	19
1.1.3 Traitements.....	20
1.1.3.1 La chirurgie.....	20
1.1.3.2 La radiothérapie.....	21
1.1.3.3 La chimiothérapie cytotoxique.....	21
1.1.3.4 Les thérapies ciblées.....	23
1.1.4 La kinase Dyrk1A : une nouvelle cible thérapeutique ?	27
1.1.5 L'harmine.....	28
1.1.6 Autres cibles importantes dans le cadre de ce projet.....	30
1.1.6.1 Les facteurs de transcription.....	30
1.1.6.2 Les cytokines.....	33
1.2 Les dérivés de la tétrahydro-β-carboline	35
1.2.1 Généralités.....	35
1.2.2 Propriétés biologiques.....	37
1.2.3 Méthodes de synthèse des dérivés de tétrahydro- β -carbolines.....	43
1.2.3.1 La réaction de Pictet-Spengler.....	43
1.2.3.2 La réaction de Bischler-Napieralski.....	49
1.2.3.3 Généralités sur les ions N-acyliminium et N-carbamyliminium	51
1.2.3.4 Notre méthodologie de synthèse « one-pot »	52
1.2.3.5 Autres méthodes de synthèse des composés tétracycliques de type THBCI, THBCP, TH(B)TPI et THIQI.....	54
1.3 But du travail.....	60

Chapitre II - Synthèse d'une petite librairie de dérivés de tétrahydro- β -carbolines, tétrahydroisoquinoléine, tétrahydrothiénopyrimidine et tétrahydrobenzothiényopyrimidine..... 62

2.1	La méthode de synthèse « one pot »	63
2.2	Synthèse des dérivés de THBCI.....	66
2.3	Synthèse des dérivés de THIQI, THTPI et THBTPI.....	77
2.4	Synthèses des imidazolones	80
2.5	Alkylation et acylation des groupes NH.....	83
2.5.1	Alkylation et autres modifications effectuées sur les dérivés de THBCI et THBCP	83
2.5.2	Acylation du dérivé de THBCI 5a	87
2.5.3	Alkylation des dérivés de THIQI, THBTPI, THTPI.....	90
2.6	Autres réactions	91
2.6.1	Essais d'alkylation des dérivés de THBCI par des agents portant des chaînes aliphatiques	90
2.6.2	Essais d'obtention des dérivés portant un cycle imidazolidin-2-thione accolé	92
2.7	Conclusions.....	94

Chapitre III - Synthèse énantiosélective de dérivés de THBCI..... 96

3.1	Préambule.....	97
3.2	Introduction sur les réactions de type Pictet Spengler asymétriques	98
3.2.1	Synthèse de dérivés de THBC impliquant une induction asymétrique interne ..	98
3.2.1.1	Le centre stéréogénique est porté par l'amine – Synthèse à partir des dérivés de tryptophane	98
3.2.1.2	Le centre stéréogénique est porté par l'aldéhyde.....	100
3.2.1.3	Le centre stéréogénique est porté par l'atome d'azote.....	102
3.2.2	Synthèse de dérivés de THBC impliquant une induction asymétrique externe	103
3.2.2.1	Les acides phosphoriques dérivés du BINOL.....	103
3.2.2.2	Utilisation des acides de Lewis chiraux en catalyse de la réaction de Pictet-Spengler asymétrique	110
3.2.2.3	Les thiourées chirales comme catalyseurs de la réaction de Pictet-Spengler asymétrique	111

3.3 Résultats : Cyclisation asymétrique des substrats de type urée et imidazolone	115
3.3.1 Stratégie 1 – Utilisation des acides phosphoriques dérivés du BINOL	115
3.3.2 Stratégie 2 – Utilisation de la thiourée chirale de Jacobsen	121
3.4 Synthèse d'une imidazolone portant le noyau indole	123
3.5 Optimisation des conditions de cyclisation asymétrique de l'imidazolone 34	125
3.6 Alkylation de l'imidazolone 34	131
3.7 Cyclisation asymétrique des substrats alkylés	131
3.8 Synthèse énantiosélective du dérivé de la tétrahydro-β-carboline-imidazolidinone 25f	132
3.9 Conclusions	135
Chapitre IV - Analyses pharmacologiques	137
4.1 Analyse de l'activité anticancéreuse in vitro	138
4.1.1 Evaluation de la concentration inhibitrice de croissance IC_{50} via le test colorimétrique MTT	138
4.1.1.1 Généralités	138
4.1.1.2 Activité anticancéreuse des composés synthétisés - Analyse de type structure-activité (SAR)	139
4.1.1.3 Bio-sélectivité	147
4.1.2 Pureté et stabilité physicochimique des dérivés	148
4.1.3 Analyse par vidéomicroscopie quantitative	151
4.1.3.1 Effets sur la croissance globale d'une population de cellules	151
4.1.3.2 Effets du produit 25f sur le nombre et la durée des mitoses	156
4.2 Tentatives pour apprécier le mécanisme d'action de certains produits	159
4.2.1 Evaluation de l'inhibition des kinases	159
4.2.2 Modification de l'organisation du cytosquelette d'actine	160
4.2.3 Modification de l'activité de la famille des facteurs de transcription AP-1	163
4.2.4 Modification du taux d'expression de cytokines	165
4.2.5 Discussions	167
4.3 Conclusions	170
Chapitre V - Conclusions générales et perspectives	171
Chapitre VI - Experimental section	175

6.1	Organic synthesis	176
6.1.1	General Information.....	176
6.1.2	Synthesis of azides.....	177
6.1.3	Synthesis of isocyanates	179
6.1.4	Synthesis of tetracyclic tetrahydro- β -carboline derivatives (THBCI).....	180
6.1.5	Modifications of the THBCI scaffold	190
6.1.6	Synthesis of tetrahydroisoquinoline derivatives (THIQI).....	193
6.1.7	Synthesis of tetrahydrothienopyridine and tetrahydrobenzothienopyridine derivatives (THTPI, THBTPI)	196
6.1.8	Synthesis of imidazolones.....	201
6.1.9	Synthesis of alkylated THBCI	205
6.1.10	Other modifications of the alkylated THBCI scaffold.....	221
6.1.11	Acylation of compound 5a.....	224
6.1.12	Other synthesis assays described in Chapter II – section 2.6	225
6.1.13	Synthesis of alkylated THIQI	228
6.1.14	Synthesis of alkylated THTPI and THBTPI	231
6.1.15	Synthesis of substrates for enantioselective cyclisation	233
6.1.16	Asymmetric cyclisation assays	245
6.1.17	Alkylation of enantioenriched compound 46 to give compound 25f	250
6.2	Physicochemical properties evaluation by HPLC	251
6.2.1	Purity test	251
6.2.2	Stability test	253
6.3	Other HPLC analysis	253
6.3.1	Chiral HPLC resolution of compound 25f.....	253
6.3.2	Enantiomeric excess evaluation	254
6.4	Pharmacology	255
6.4.1	Cell lines and cell culture media	255
6.4.2	MTT assay	255
6.4.3	Computer-assisted quantitative phase-contrast microscopy	256
6.4.4	Kinase inhibition screening.....	257
6.4.5	Fluorescence microscopy.....	258
6.4.6	Analysis of the AP-1 family of transcription factors activity.....	259
6.4.7	Cytokine secretion analysis.....	261
Chapitre VII	- Bibliographie	262
Chapitre VIII	- Annexes	271

Chapitre I

Introduction

1.1 Le cancer

1.1.1 Caractéristiques générales

1.1.1.1 Les 10 caractéristiques des cellules cancéreuses

« Cancer » est un terme qui englobe toutes les maladies dans lesquelles des cellules anormales se divisent sans contrôle et sont en mesure d'envahir d'autres tissus. Les cellules cancéreuses peuvent se propager à d'autres parties du corps à l'aide des systèmes sanguins et lymphatiques.¹

Au cours de leur division, évolution et propagation, les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques qui leur permettent d'échapper aux systèmes de contrôle que les cellules normales utilisent pour garder l'homéostasie d'un tissu et, par conséquent, de l'organisme.¹

Ces caractéristiques, reprises dans la Figure 1.1, ont été décrites en détail dans les revues de Hanahan et Weinberg et seront discutées largement dans les paragraphes suivants.^{2,3}



Figure 1.1 – Les 10 caractéristiques principales des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg³)

¹ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; Taylor & Francis: New York, 2007.

² Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

³ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.

1. Signalisation proliférative autonome.

Les cellules normales nécessitent des signaux de croissance extérieurs pour passer de l'état latent à l'état prolifératif, tandis que les cellules cancéreuses possèdent la capacité de générer leurs propres facteurs de croissance (stimulation autocrine), réduisant ainsi leur dépendance à la stimulation du tissu normal environnant.

De plus, les systèmes intracellulaires, qui reçoivent et transforment les signaux de prolifération en action, peuvent aussi être altérés. C'est le cas de l'oncogène Ras qui agit comme un interrupteur moléculaire dans plusieurs voies de signalisation, dont la cascade Ras-Raf-MAP kinase, et qui est muté dans 25% des tumeurs. Les formes mutées sont capables d'activer les kinases présentes en aval, sans en avoir reçu l'ordre. Les mécanismes de « feedback » négatif sont également modifiés au sein des cellules tumorales. Par exemple, la protéine PTEN (phosphatase and tensin homolog), qui joue un rôle d'inhibiteur de la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) en dégradant le produit de cette kinase [PIP₃ (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)], peut perdre sa fonction suite à une mutation.⁴

2. Insensibilité aux signaux suppresseurs de croissance.

Pour pouvoir se développer, les cellules cancéreuses doivent, non seulement s'assurer d'obtenir des stimuli de croissance, mais aussi échapper aux systèmes de contrôle antiprolifératifs. Les mécanismes qui inhibent la croissance et la division fonctionnent, tout comme leur homologue de croissance, sur base de récepteurs transmembranaires qui activent des voies de signalisation intracellulaires. Les cellules normales disposent de divers mécanismes pour inhiber la prolifération.^{3,5} Par exemple, les protéines de la famille du gène RB répondent principalement à des signaux extracellulaires et contrôlent à la fois la croissance et la division cellulaires. Par contre, la protéine p53 détecte le stress intercellulaire (concentration de nucléotides, d'oxygène ou de glucose) ou les défauts de l'ADN. Elle peut, soit mettre en pause le cycle cellulaire et attendre de meilleures conditions pour la mitose, soit déclencher la mort cellulaire dans le cas de dommages trop importants dans le génome.

3. Résistance à la mort cellulaire.

L'apoptose, le type de mort cellulaire programmée le plus étudié par les biologistes cellulaires, est un processus présent en état latent dans toutes les cellules de l'organisme humain et qui peut être déclenché par une multitude de signaux physiologiques.³

Deux mécanismes sont principalement décrits dans la littérature pour expliquer l'activation de l'apoptose : la voie extrinsèque (ou voie du récepteur de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) (Figure 1.2).⁶

⁴ Jiang, B.-H.; Liu, L.-Z. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 150-158.

⁵ Sherr, C. J.; McCormick, F. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 103-112.

⁶ Wong, R. S. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87.

Les récepteurs de mort sont des protéines transmembranaires qui déclenchent la voie extrinsèque de l'apoptose. Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire qui lie le ligand et un domaine intracellulaire qui traduit la liaison du ligand dans une cascade de signalisation. Les récepteurs de mort les plus connus sont TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) et Fas (tumor necrosis factor receptor superfamily member 6), leurs ligands s'appellent TNF et FasL. Suite à la reconnaissance du ligand par son récepteur, le domaine intracellulaire du récepteur recrute des protéines adaptatrices TRADD (TNF receptor associated death-domain) ou FADD (Fas-associated death domain) pour former le complexe DISC (death inducing signaling complex).⁶ Ce complexe DISC va recruter les procaspases initiatrices 8 ou 10 (inactives) qui seront activées au sein du complexe par clivage et association. A leur tour, les caspases initiatrices activées vont cliver et activer les procaspases effectrices qui vont produire une réaction protéolytique en chaîne en clivant les protéines du cytosol et la lamina nucléaire.¹

La voie intrinsèque peut être déclenchée par des signaux intracellulaires comme le stress oxydatif, des dommages dans le génome, l'hypoxie et des concentrations élevées de calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol. Elle implique la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage dans le cytoplasme de certaines protéines [cytochrome c, Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases), Omi/Htra2] qui se trouvent normalement dans l'espace intramembranaire des mitochondries. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c s'associe avec un facteur activateur de procaspases appelé Apaf (apoptotic protease activating factor-1) et avec la procaspase initiatrice 9 pour former l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, la procaspase 9 est clivée et activée (tout comme la procaspase 8 est activée dans le complexe DISC). L'activation de cette caspase entraîne l'activation des caspases effectrices 3 et 7. Un rôle important dans le fonctionnement de la voie mitochondriale, et dans la communication entre les deux voies, est joué par une famille de protéines appartenant à la famille Bcl-2. Cette famille contient des protéines antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 et Mcl-1) mais également des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bcl-X_s, Bid, Bik, Bim et Hrk).^{1,6} Lorsqu'un signal apoptotique est reçu par la cellule, la protéine Bax s'insère dans la membrane extérieure de la mitochondrie et y forme des oligomères. La protéine Bak, déjà présente dans cette membrane sous forme de monomères, peut également s'auto-associer pour former des pores. C'est ainsi que la membrane de la mitochondrie est perméabilisée.⁷

Les protéines Smac/DIABLO et Omi/Htra2 aident à l'activation des caspases en empêchant la protéine IAP (inhibitor of apoptosis) d'inhiber les caspases 3 et 9 (voir Figure 1.2).

⁷ Simpson, C. D.; Anyiwe, K.; Schimmer, A. D. *Cancer Lett.* **2008**, 272, 177-185.

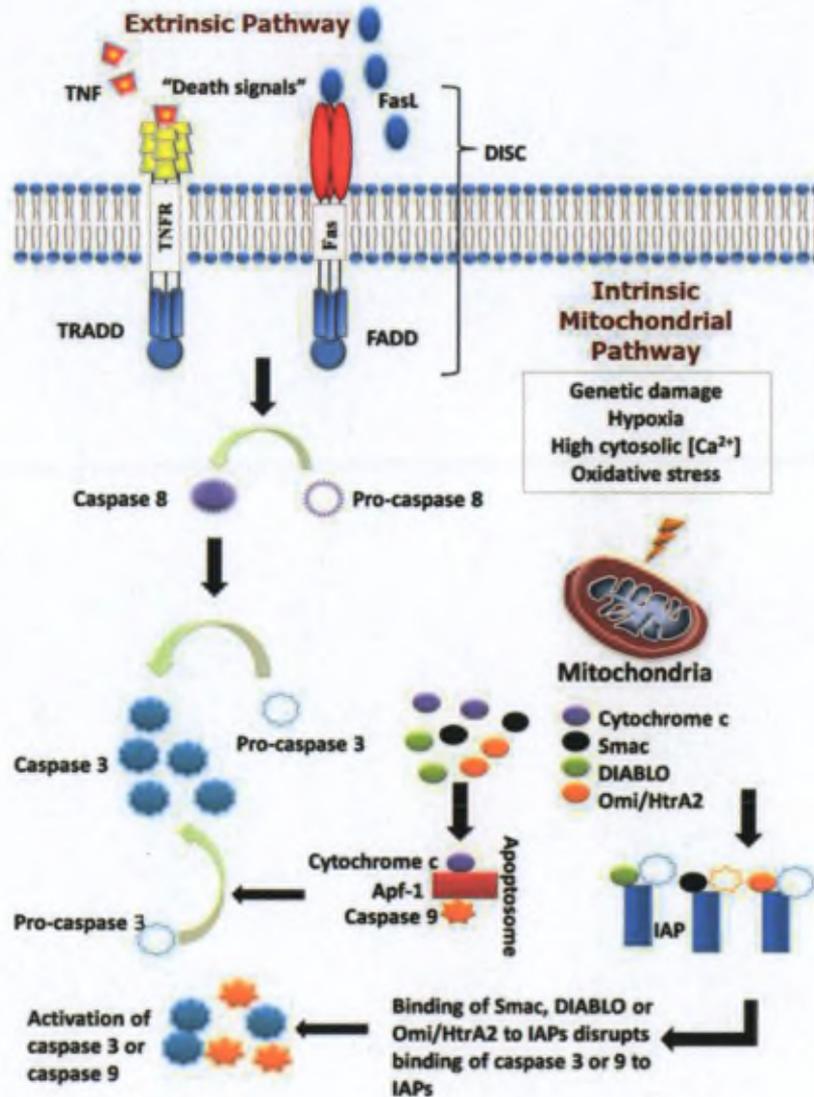


Figure 1.2 – Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (Wong⁶)

Les cellules cancéreuses disposent d'une panoplie de mécanismes pour échapper au processus d'apoptose, illustrée dans la Figure 1.3.

Par exemple, l'apoptose peut être bloquée par la perte de fonction de la protéine p53. La protéine p53 peut induire l'apoptose en réponse à la détection d'erreurs dans l'ADN, à l'hypoxie et à la surexpression des oncogènes. Des mutations dans le gène p53 mènent à la synthèse d'une protéine p53 inactive. Cette mutation est observée dans plus de 50% des cancers chez l'Homme.

La voie extrinsèque de l'apoptose peut également être supprimée par inhibition de la voie du récepteur de mort. Un récepteur de mort piège, qui ne possède pas de domaine intracellulaire et n'est donc pas capable de transmettre le signal de détection du ligand dans la cellule, peut être synthétisé.²

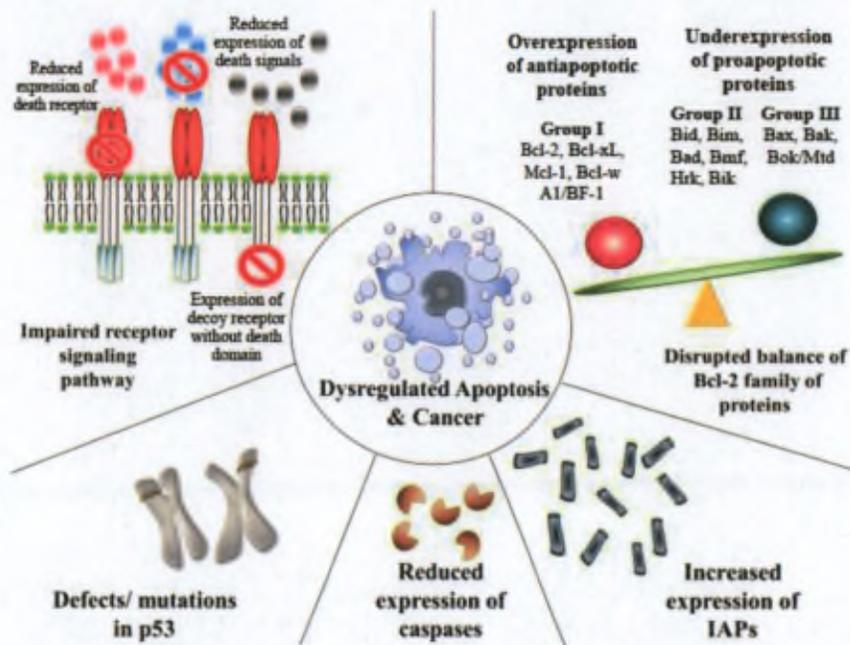


Figure 1.3 - Mécanismes qui contribuent à l'inhibition de l'apoptose chez les cellules tumorales (Wong⁶)

Une autre façon d'altérer la voie de signalisation du récepteur de mort est par la synthèse de la protéine FLIP (FADD-like IL-1 β -converting enzyme - inhibitory protein) qui agit comme un inhibiteur de la caspase 8. La protéine FLIP a une structure moléculaire très similaire à celle de la caspase 8, mais la cystéine présente dans le site actif de l'enzyme est remplacée par une tyrosine, ne conférant donc aucune activité enzymatique à la protéine FLIP. De plus, cette protéine a une affinité plus importante pour le complexe DISC que la caspase 8.⁷

Concernant la voie intrinsèque de l'apoptose, l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peut être fortement perturbé en défaveur de la mort cellulaire.⁶

La baisse de la concentration des caspases, ou des altérations de leur fonctionnement, induisent également la diminution de l'apoptose et le développement de tumeurs.⁶

4. Capacité de prolifération illimitée.

Les cellules normales peuvent effectuer seulement un nombre limité de divisions avant d'entrer dans un état appelé sénescence, dans lequel elles sont encore vivantes mais ne peuvent plus se diviser. Le nombre de divisions est contrôlé par la longueur des séquences répétitives d'ADN non-codant présentes au bout des chromosomes, appelées télomères. A chaque division, les télomères, qui jouent un rôle protecteur pour l'ADN, sont raccourcis. La détérioration progressive des télomères mène la cellule à la sénescence et, si elle arrive à dépasser cette barrière, les dégâts dans le génome, produits par la fusion des chromosomes non protégés, amènent finalement la cellule à la mort. La fusion de chromosomes peut, dans de rares cas, donner naissance à des mutations qui permettent à la cellule de se diviser indéfiniment. La cellule devient alors immortalisée. Ce processus est un des mécanismes que les cellules tumorales utilisent pour proliférer sans limite.

Un autre moyen pour éviter la sénescence est l'expression de l'enzyme télomérase qui maintient la longueur des télomères. La plupart des cellules normales n'expriment pas cette enzyme. Elle est en revanche présente dans 90% des lignées immortalisées (dont les cellules cancéreuses).

5. Induction de l'angiogénèse.

Pour pouvoir survivre et fonctionner, les cellules ont besoin de nutriments et d'oxygène et doivent éliminer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. La proximité des vaisseaux sanguins assure une réponse à ces besoins. Le processus d'angiogénèse (développement de nouveaux vaisseaux sanguins) est un processus latent chez l'adulte. Il est activé dans des cas particuliers comme par exemple le cycle menstruel ou la guérison de lésions. Lors de la progression d'une tumeur, l'angiogénèse est activée de manière permanente ce qui facilite son développement.

L'induction de l'angiogénèse⁸ fonctionne comme un interrupteur basé sur des facteurs pro- et anti-angiogéniques. La perturbation de l'équilibre normal entre ces facteurs est nécessaire pour que les tumeurs croissent. C'est ce qu'illustre la Figure 1.4.

6. Activation du comportement invasif et métastase.

Dans les états avancés de leur développement, les cancers acquièrent des propriétés invasives et métastatiques. La métastase est la diffusion des cellules cancéreuses à des sites distants dans le corps et la formation de tumeurs secondaires dans ces sites. Il est estimé que les cancers métastatiques sont responsables pour 90% de la mortalité par cancer.^{2,7}

Pour pouvoir quitter la tumeur primaire, il est nécessaire que les cellules modifient leur morphologie et leur interaction avec les cellules voisines ainsi qu'avec la matrice extracellulaire (MEC). Le processus commence par l'invasion du tissu environnant. Ensuite, les cellules tumorales peuvent pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour être transportées vers d'autres organes et tissus. Une fois sur place, les cellules vont s'échapper des vaisseaux pour créer de micrométastases qui vont se développer pour coloniser le nouveau tissu.⁹

⁸ Pour des revues sur l'angiogénèse voir : a) Bergers, G.; Benjamin, L. E. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 401-410 ; b) Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2011**, 473, 298-307.

⁹ Fidler, I. J. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 453-458.

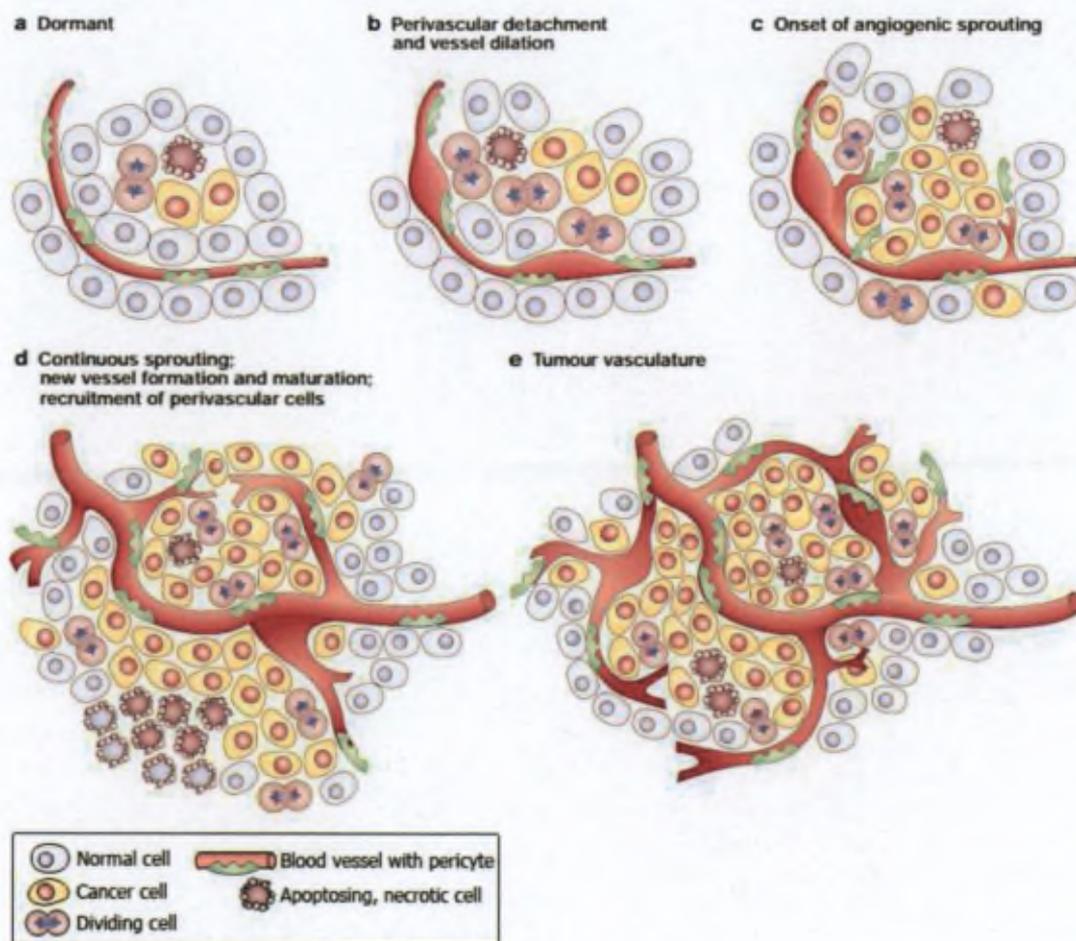


Figure 1.4 – L’angiogenèse (Bergers).^{8a} Un des principaux mécanismes d’activation de l’angiogenèse implique la sécrétion des ligands comme VEGF (vascular endothelial growth factor) par les cellules cancéreuses en réponse à l’hypoxie ou à l’activité des oncogènes. Ces ligands sont alors reconnus par des récepteurs spécifiques présents sur la surface des cellules endothéliales, ce qui va stimuler la production de nouveaux vaisseaux sanguins.^{2,3} Le processus commence avec le détachement des péricytes et la dilatation des vaisseaux (b), suivie par la germination angiogénique (c), la formation de nouveaux vaisseaux, leur maturation et le recrutement de péricytes (d). Cette formation des vaisseaux sanguins se poursuivra aussi longtemps que la tumeur se développe et les vaisseaux sanguins alimentent spécifiquement les zones nécrotiques et hypoxiques de la tumeur pour leur fournir des nutriments et de l’oxygène (e).^{8a}

7. Modification du métabolisme énergétique.

Le métabolisme d’une cellule cancéreuse est réorganisé pour mieux soutenir la croissance et la prolifération. Dans des conditions de normoxie, les cellules normales transforment le glucose en pyruvate dans le cytosol. Ce processus est appelé glycolyse. Ensuite, le pyruvate est transformé en dioxyde de carbone dans la mitochondrie.¹ Comme cette deuxième étape nécessite une quantité importante d’oxygène, dans les conditions d’hypoxie du tissu tumoral, la glycolyse est favorisée par rapport à l’oxydation du pyruvate. Les cellules tumorales utilisent la glycolyse comme principal processus pour produire de l’énergie.¹⁰ Pour

¹⁰ Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033.

soutenir cette voie métabolique, les récepteurs de glucose présents sur la surface de la cellule sont surexprimés. L'apport accru de glucose dans les tumeurs permet leur détection par la technique PET (positron emission tomography) en utilisant le ^{18}F -fluorodésoxyglucose comme traceur.³

8. Capacité d'échapper au système immunitaire.

Selon une hypothèse toujours actuelle, il existe une réponse du système immunitaire contre les tumeurs naissantes. Les cellules qui arrivent à proliférer sont celles qui ont réussi à éviter la détection par le système immunitaire ou celles qui ont bloqué la voie de la mort cellulaire en réponse à l'attaque immunitaire.³

Des études récentes¹¹ montrent que les cellules cancéreuses coopèrent avec des cellules du système immunitaire pour se développer. Dans les étapes initiales du développement du cancer, les macrophages (cellules du système immunitaire inné) présents dans le microenvironnement de la tumeur peuvent produire un milieu inflammatoire qui soutient la prolifération. De plus, ils libèrent des espèces réactives oxygénées qui favorisent l'apparition des mutations. Dans les états avancés du développement de la tumeur, les macrophages empêchent l'activité des lymphocytes T et libèrent des facteurs de croissance comme des protéases qui détruisent la MEC et le VEGF qui stimule l'angiogenèse.

Les cellules du système immunitaire adaptatif sont également impliquées dans la genèse des tumeurs. Certains leucocytes, tels que les lymphocytes T et les cellules NK (natural killer cells) limitent le développement de la tumeur et, par conséquent, une grande partie des tumeurs qui surviennent ne finissent pas par développer une maladie maligne. Cependant, il est maintenant clair que les leucocytes infiltrant les tumeurs soutiennent le développement du cancer et sa progression.¹²

On peut définir ces 8 premières caractéristiques des cellules cancéreuses comme des propriétés acquises qui leur permettent de survivre, proliférer et se disséminer. L'acquisition de ces propriétés est facilitée par deux autres caractéristiques qui rendent possible la transformation des cellules normales en cellules tumorales. Il s'agit de l'instabilité du génome et l'inflammation présente dans les lésions précancéreuses.

9. Mutations et instabilité du génome.

Les cellules saines disposent d'un système complexe qui détecte et répare les dégâts de l'ADN. Un taux de mutation plus élevé est observé pour les cellules cancéreuses car elles peuvent augmenter leur sensibilité aux agents mutagènes, bloquer le système de surveillance

¹¹ Qian, B.-Z.; Pollard, J. W. *Cell* **2010**, *141*, 39-51.

¹² Johansson, M.; DeNardo, D. G.; Coussens, L. M. *Immunol Rev.* **2008**, *222*, 145-154.

de l'intégrité du génome et inhiber le système de réparation de l'ADN.¹³ La protéine p53 y joue un rôle important et est appelé le « gardien du génome ».³

10. L'inflammation.

La présence de cellules du système immunitaire dans les lésions néoplasiques met en évidence sa tentative d'attaquer les tumeurs.³ La réponse inflammatoire produite par ces cellules a l'effet inattendu de favoriser le développement de la tumeur. L'inflammation contribue à l'acquisition des caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses car elle permet l'alimentation de la tumeur par des facteurs de croissance et de survie. Elle permet également la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques et la sécrétion des enzymes qui modifient la MEC, favorisant ainsi l'invasion et la migration des cellules cancéreuses.¹⁴

Le microenvironnement de la tumeur.

En plus des 10 caractéristiques des cellules tumorales décrites ci-dessus, le microenvironnement de la tumeur joue un rôle important dans le développement du cancer. C'est une notion importante à ne pas négliger pour avoir une vue d'ensemble de la complexité de cette maladie.

Les études de ces dernières années montrent que les tumeurs ne sont pas des tissus homogènes et qu'il est plus correct de les considérer comme des organes plus complexes qu'un tissu normal. Le microenvironnement d'une tumeur contient plusieurs types de cellules cancéreuses, des cellules du système immunitaire, des nouveaux vaisseaux sanguins, des cellules normales et des cellules souches (Figure 1.5).

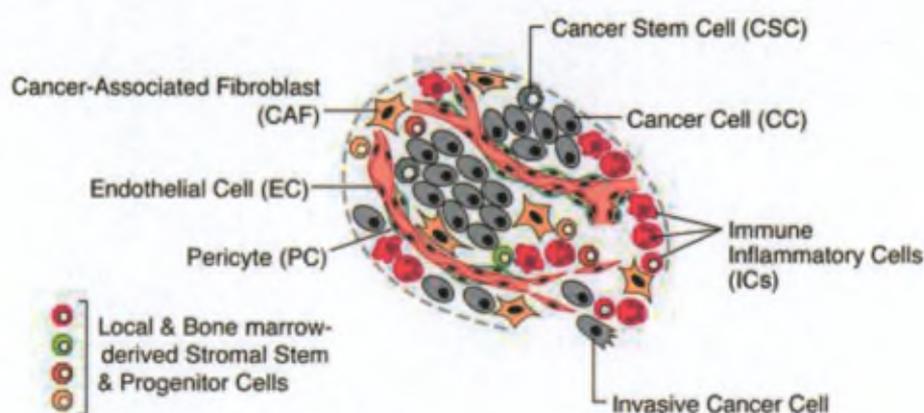


Figure 1.5 - Les différents types de cellules présentes dans le microenvironnement de la tumeur (Hanahan et Weinberg)³

¹³ Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2010**, *11*, 220-228.

¹⁴ Grivnickov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. *Cell* **2010**, *140*, 883-889.

1.1.1.2 Le cycle cellulaire

Une cellule se reproduit par une séquence d'événements hautement régulés dans lesquels elle double son contenu et se divise en deux cellules filles identiques. Ce cycle de duplication et de division est appelé le cycle cellulaire. Pour pouvoir produire deux cellules filles identiques, l'ADN de chaque chromosome doit être copié de manière exacte et doit être ensuite précisément distribué aux deux cellules filles. Les cellules eucaryotes disposent de mécanismes complexes de contrôle pour chaque étape du cycle cellulaire.¹⁵ Les systèmes de contrôle répondent à des stimuli intracellulaires (l'achèvement de la réplication de l'ADN, la présence de défauts dans l'ADN) et à des stimuli extracellulaires (quantité de nutriments, nombre de cellules nécessaires dans le tissu). Des anomalies dans les étapes de régulation du cycle cellulaire peuvent mener à la formation d'un cancer.¹

Le cycle cellulaire est divisé en quatre étapes illustrées Figure 1.6 :

- la phase G₁ (pour « Intervalle 1 », « gap » en anglais)
- la phase S (pour « Synthèse de l'ADN »)
- la phase G₂ (pour « Intervalle 2 »)
- la phase M – cette étape comprend la mitose (division du noyau) et la cytokinèse (séparation du cytoplasme)

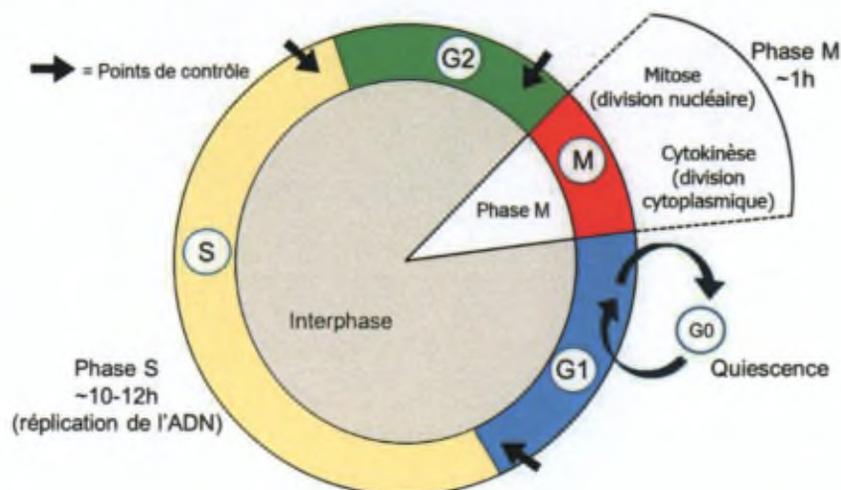


Figure 1.6 - Les étapes du cycle cellulaire chez les eucaryotes (figure d'après Alberts¹)

¹⁵ Meijer, L. *Oncologie* 2003, 5, 311-326.

L'interphase.

Les phases G_1 , S et G_2 constituent l'interphase. Pendant cette étape, la cellule a une activité métabolique intense, car elle se prépare pour la division en doublant sa quantité de protéines et d'organites, ainsi que son ADN. L'intervalle G_1 , outre d'offrir à la cellule le temps de croître, fournit également le temps d'analyser le milieu extracellulaire et l'état de la cellule avant de commencer l'étape de réplication. Par exemple, l'impossibilité de réparer les défauts de l'ADN peut déclencher l'apoptose via la voie de la protéine p53.¹⁶ Si le milieu extérieur n'est pas favorable, la cellule peut décider d'entrer dans un état latent G_0 pendant des jours voire même des années jusqu'à la réception de signaux de division et de croissance. Certaines cellules peuvent rester en phase G_0 jusqu'à la mort de l'organisme. La réplication de l'ADN a lieu dans la phase S. Cette phase est la plus lente du cycle cellulaire (10-12h).

Vers la fin de la phase G_2 , la cellule vérifie que tout le matériel génétique a été copié sans faute. Cette étape du cycle cellulaire peut également être prolongée pour que la cellule ait le temps de finir la réplication, de corriger les erreurs de l'ADN et de vérifier que le milieu extérieur est favorable à la division.

Un rôle majeur dans les systèmes de contrôle du cycle cellulaire est joué par une famille de protéine-kinases : les kinases cyclines-dépendantes (CDKs—cyclin dependent kinases). Ces protéines sont activées lors de la formation d'un complexe hétérodimérique avec des protéines régulatrices appelées cyclines.¹⁷ Tout comme dans l'étape G_1 , la vérification de l'intégrité et de la conformité du génome, ainsi que l'analyse du milieu extérieur sont effectuées à la fin de la phase G_2 .¹

La phase M.

La phase M commence par la mitose où les chromatides sœurs sont séparées et distribuées dans deux noyaux identiques. Cette étape est rapide (environ 1h) par rapport à la durée du cycle cellulaire complet (~24h). La phase M comporte 6 étapes illustrées Figure 1.7 (images b-g).^{1,15,18}

- Prophase – Les chromosomes répliqués se condensent. A l'extérieur du noyau, le fuseau mitotique commence à se former entre les deux centrosomes doublés.
- Prométaphase – La membrane nucléaire est déchirée et les chromosomes commencent à s'attacher aux microtubules du fuseau mitotique via des complexes protéiques appelés kinétochores.

¹⁶ Taylor, W. R.; Stark, G. R. *Oncogene* **2001**, *20*, 1803-1815.

¹⁷ Pour une revue sur les CDKs, voir : Malumbres, M.; Barbacid, M. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 153-166.

¹⁸ Scholey, J. M.; Brust-Mascher, I.; Mogilner, A. *Nature* **2003**, *422*, 746-752.

- Métaphase – Les chromosomes sont alignés à la moitié du fuseau mitotique. L'alignement correct de tous les chromosomes est vérifié avant l'étape suivante.
- Anaphase – Les chromatides sœurs sont séparées vers les pôles opposés du fuseau mitotique.
- Télophase – Les deux chromatides sœurs arrivent aux pôles et se décondensent ; l'enveloppe nucléaire est formée autour, achevant ainsi la formation des deux noyaux identiques.
- Cytokinèse - La séparation du cytoplasme commence par la contraction de l'anneau contractile.

A la fin de la mitose, la cellule est séparée en deux via la cytokinèse. Pendant cette étape, le cytoplasme est divisé en deux parties lors de la contraction de l'anneau contractile constitué d'actine et de myosine. Le cytoplasme commun aux deux cellules filles en train de se diviser se restreint de plus en plus jusqu'à la fission de la membrane qui crée les deux cellules filles, chacune ayant un noyau et devenant ainsi individualisée au niveau cytoplasmique.¹⁹

¹⁹ Fededa, J. P.; Gerlich, D. W. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 440-447.

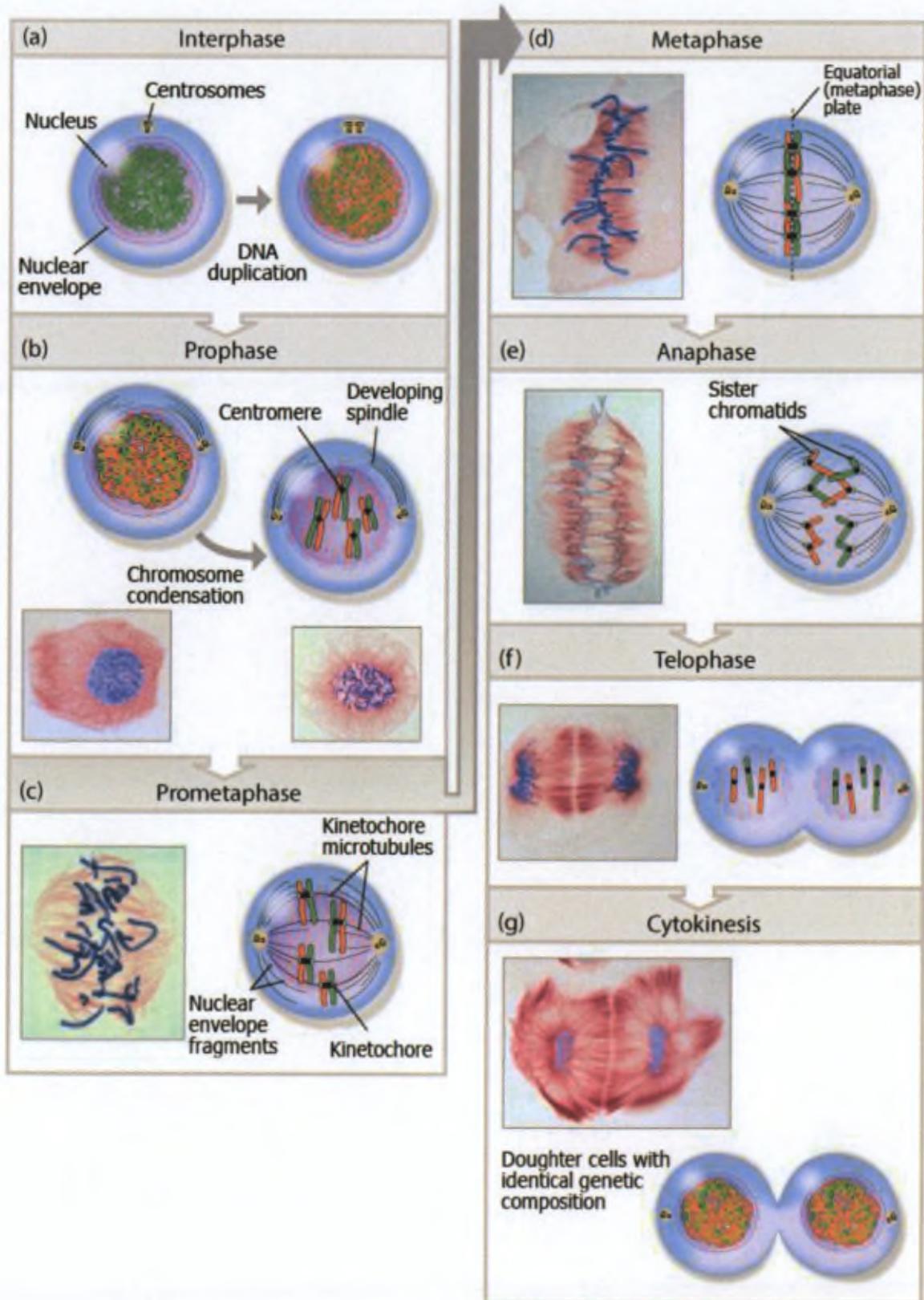


Figure 1.7 – La phase M : mitose (b-f) et cytokinèse (g). (Source: Nature Education 2013)²⁰

²⁰ <http://www.nature.com/scitable/topicpage/mitosis-and-cell-division-205#>

1.1.1.3 La migration cellulaire

La migration cellulaire est une caractéristique essentielle dans de nombreux processus comme la réponse immunitaire, la cicatrisation, l'angiogenèse et également dans le développement d'un comportement invasif et la formation de métastases. Ainsi, la compréhension et l'exploitation de ce phénomène peut conduire à des nouvelles thérapies antitumorales.²¹

Les constituants de la cellule jouant un rôle important dans le processus de migration sont le cytosquelette et les protéines d'adhésion.

Le cytosquelette.

Un réseau complexe de fibres et filaments constitue le cytosquelette de la cellule. Cette structure joue un rôle très important dans la morphologie de la cellule, sa motilité et l'organisation de son contenu pendant la division.

Le cytosquelette est composé de trois types de fibres¹ :

- Les fibres d'actine – L'actine globulaire (soluble) polymérise pour former de microfilaments hélicoïdaux à doubles brins. Les fibres d'actine sont réparties dans toute la cellule, avec une concentration plus importante en dessous de la membrane. Les microfilaments jouent un rôle important dans la cytokinèse (formation de l'anneau contractile d'actine) et dans la migration cellulaire (aspect détaillé par la suite).
- Les microtubules – Ils sont formés de dimères de α - et β -tubuline qui polymérisent pour former de tubes de 25 nm de diamètre. Ces structures sont plus rigides que les microfilaments d'actine. Les microtubules donnent sa forme à la cellule et ont un rôle important dans la division.
- Les filaments intermédiaires – Les protéines les constituant font partie de plusieurs familles dont les kératines et les lamines. Les filaments intermédiaires ont des rôles différents selon l'endroit où ils se trouvent dans la cellule et en fonction du type de celle-ci. Ils interviennent dans sa résistance mécanique, forment la lamina nucléaire ou connectent le cytoplasme de deux cellules épithéliales à travers les jonctions intercellulaires.

Les molécules d'adhésion.

En plus du cytosquelette, la motilité des cellules est contrôlée par une multitude de protéines d'adhésion qui lient les cellules les unes aux autres ou à la MEC. Ces protéines font partie de différentes familles : les cadhérines, les intégrines, les immunoglobulines, les

²¹ Yamazaki, D.; Kurisu, S.; Takenawa, T. *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 379-386.

sélectines et les protéoglycanes. Ces protéines transmembranaires forment des liaisons entre les cytosquelettes de deux cellules ou entre le cytosquelette d'une cellule et la MEC.^{1,22}

La migration cellulaire.

Les cellules commencent leur migration par le développement des protubérances fines (filopodes) ou larges (lamellipodes) (Figure 1.8). La cellule devient ainsi polarisée car son avant et son arrière sont différents. Les filopodes et lamellipodes sont formés par la polymérisation de l'actine. Ces protubérances sont ensuite stabilisées par leur adhésion aux protéines de la MEC à l'aide des intégrines. Par contraction des fibres d'actine et de myosine, une force de traction se crée, ce qui déplace le noyau et le corps de la cellule vers l'avant.^{21,23}

La direction du mouvement est donnée par divers stimuli comme par exemple un gradient de facteurs de croissance ou de chémokines, la topographie de la MEC ou un gradient électrochimique.²³ La traction amène le détachement de l'arrière de la cellule et sa rétractation.

Durant la migration, le cytosquelette d'actine est continuellement remodelé et la force nécessaire à la migration est produite par cette remodelisation. L'inhibition de ce processus diminue évidemment la motilité de la cellule. La compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent la réorganisation du cytosquelette d'actine est importante dans la thérapie du cancer car elle pourrait apporter de nouvelles cibles.^{21,22} Nous allons montrer par la suite que les produits développés dans ce projet agissent entre autre sur l'organisation du cytosquelette d'actine.

Les cellules cancéreuses ont différentes façons de migrer en fonction de leur état de différenciation (Figure 1.9). Dans les tumeurs épithéliales ou le mélanome, les cellules migrent ensemble, les jonctions intercellulaires assurées par les cadhérines restant non-altérées. Ce type de migration est également employé par les cellules endothéliales pendant l'angiogenèse. Au fur et à mesure de la dedifférenciation des cellules cancéreuses, la fonction des cadhérines est perdue et les cellules migrent de façon individuelle. Cette transition est appelée épithélio-mésenchymateuse (EMT) et constitue un indicateur de la progression de la tumeur. Dans une étape plus avancée de la maladie, la fonction des intégrines est également perdue et la cellule migre d'une façon amiboïde en insérant son contenu entre les espaces de la matrice. Dans la migration collective et mésenchymateuse, la cellule sécrète des enzymes qui clivent et modifient la MEC, tandis que dans la transition mésenchymateuse-amiboïde, ces enzymes sont inhibées.²¹

²² Lefranc, F.; Brotchi, J.; Kiss, R. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2411-2422.

²³ Parson, J. T.; Horwitz, A. R.; Schwartz, M. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2010**, *11*, 633-643.

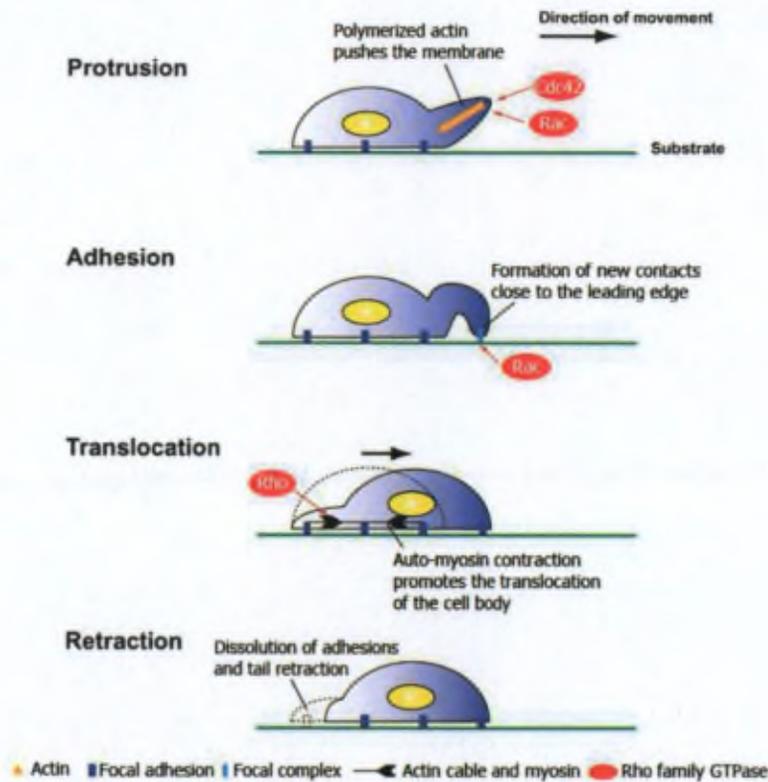


Figure 1.8 – La migration d’une cellule sur un substrat bidimensionnel (Yamazaki²¹). Les petites protéines de la famille des Rho-GTPases (Cdc42, Rac et Rho) sont des effecteurs clé qui agissent comme un interrupteur moléculaire contrôlant ainsi la formation des filopodes, des lamellipodes et des fibres de stress. La kinase PI3K joue également un rôle significatif dans l’induction de l’asymétrie de la cellule. Sa stimulation par des molécules extracellulaires mène à l’accumulation de son substrat phosphorylé PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) qui stimule les GTPases de la famille Rho pour former l’avant de la cellule.²¹

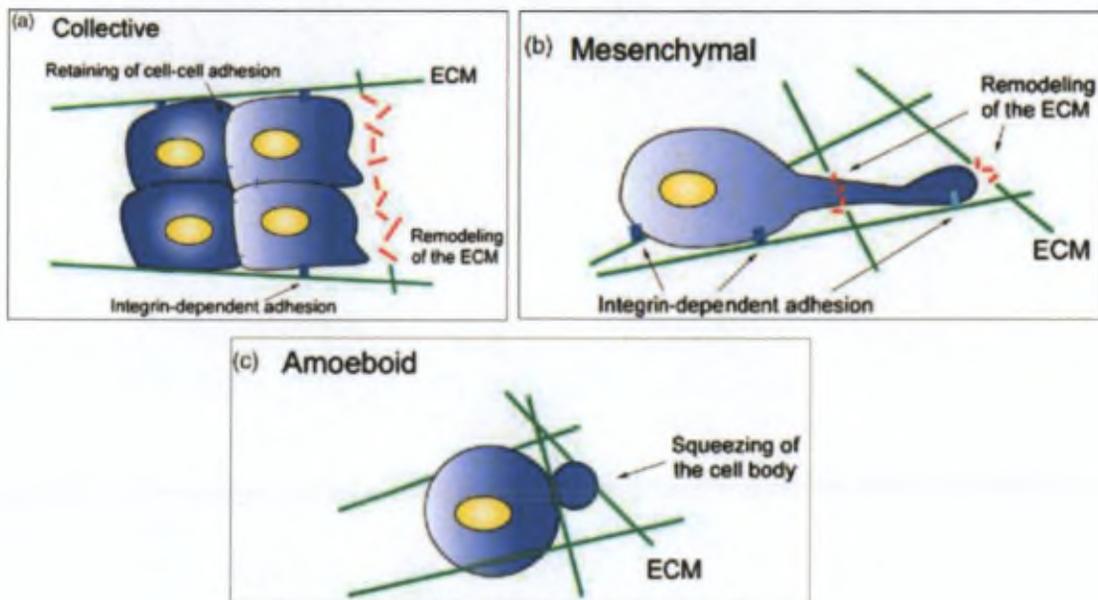


Figure 1.9 – Modes de migration des cellules tumorales (Image modifiée d’après Yamazaki²¹)

1.1.1.4 La complexité de la signalisation dans une cellule - Rôle des kinases dans le contrôle du cycle cellulaire et de la migration

Nous avons déjà mentionné les kinases cycline-dépendantes (CDKs) et leur rôle primordial dans le contrôle du cycle cellulaire. Lors du cycle cellulaire, celles-ci peuvent notamment déclencher le passage de la phase G1 à la phase S, via la voie de la protéine suppresseur de tumeur pRB.

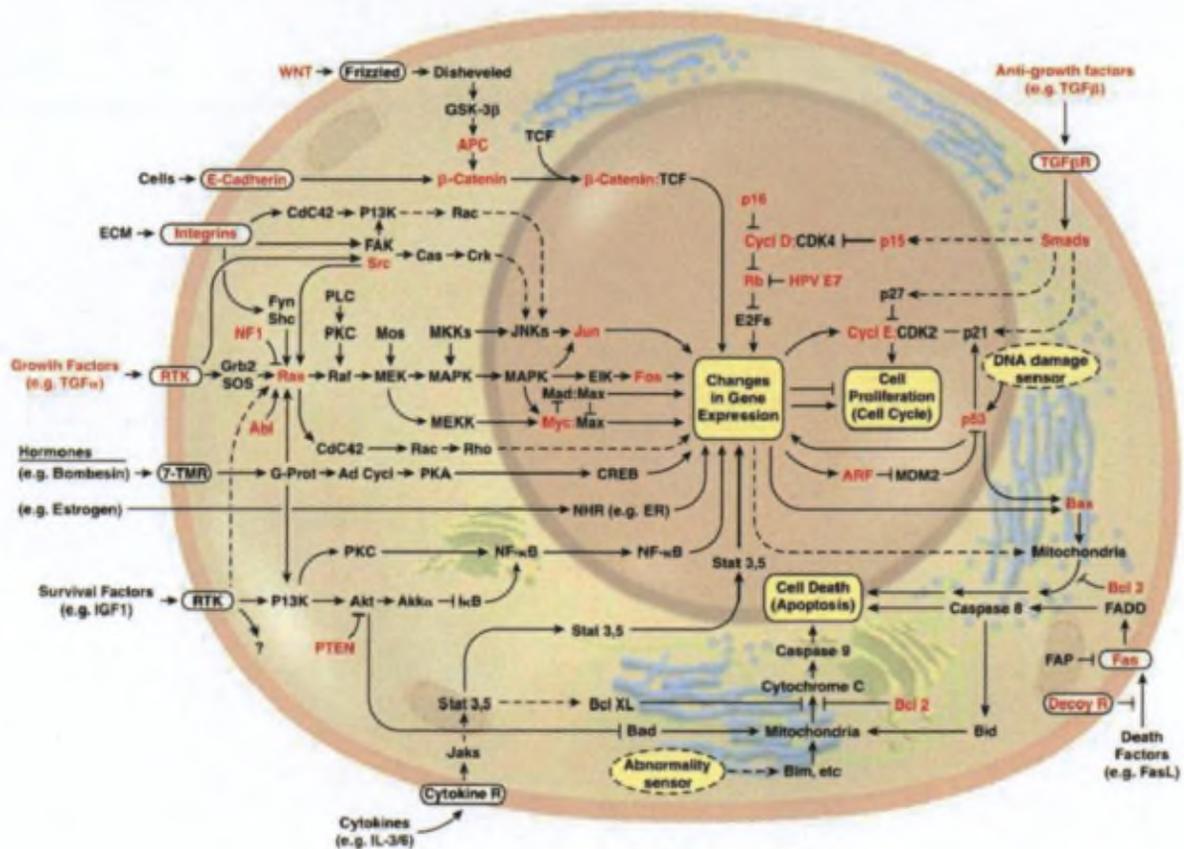


Figure 1.10 – La complexité de la signalisation cellulaire. En rouge : les protéines les plus souvent mutées dans le cancer. (Hanahan²⁴). Une fois activée par les récepteurs transmembranaires de type RKT (receptor tyrosine kinase), la protéine Ras recrute et active la kinase Raf. A son tour, la kinase Raf va phosphoryler et activer la cascade de kinases Mek/MAP2K (mitogen-activated protein kinase) et MAPK (mitogen-activated protein kinase). La kinase MAPK ainsi activée est ensuite délocalisée dans le noyau où elle active plusieurs facteurs de transcription (protéines qui contrôlent la transcription de gènes),²⁴ comme par exemple des facteurs de la famille Ap1.^{2,5,25} La protéine Ras peut également activer la voie de la protéine PI3K en phosphorylant le phosphatidylinositol (PI) et par cette phosphorylation recruter et activer la kinase Akt/PKB (protein kinase B). La kinase Akt activée peut agir via la voie de mTOR (mammalian target of rapamycin) qui stimule la croissance cellulaire (non illustré sur cette figure).^{24,26} La protéine Akt peut également bloquer l'apoptose en inhibant la protéine pro-apoptotique Bad par phosphorylation.²⁶ Outre le rôle qu'elle joue dans la voie de signalisation Akt, la kinase PI3K active aussi les kinases de la famille Rho impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine (non illustré sur cette figure).²¹

²⁴ Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355-366.

²⁵ Shaulian, E.; Karin, M. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E131-E136.

²⁶ Shaw, R. J.; Cantley, L. C. *Nature* **2006**, *441*, 424-430.

Les complexes CDK4/cycline D, CDK6/cycline D et CDK2/cycline E phosphorylent et inactivent la protéine pRB qui a des propriétés inhibitrices de croissance. La protéine pRB non-phosphorylée forme un complexe avec le facteur de transcription E2F en altérant ainsi sa fonction. Ce facteur contrôle la transcription des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN ainsi que la transcription des cyclines A et E pouvant donc arrêter le cycle cellulaire avant le début de la phase S.⁵

Outre les kinases cycline-dépendantes, une multitude d'autres kinases sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire comme illustré dans la Figure 1.10 et expliqué dans la légende de cette figure. Nous pouvons notamment citer les kinases intervenant dans deux voies majeures de signalisation : la voie Raf et la voie m-TOR.

Ces mécanismes de régulation sont interconnectés pour former un réseau très complexe de signalisation illustré Figure 1.10. Par exemple, en plus de leur rôle d'adhésion, les intégrines interviennent également dans la signalisation via la voie de Rho-GTPases.²²

Il est important de remarquer que chaque protéine de ces voies de signalisation, peut *a priori* représenter une cible intéressante dans le développement des traitements anticancéreux.

1.1.2 Epidémiologie

Le cancer représente la seconde cause de mortalité dans les contrées industrialisées. Dans un rapport effectué par l'IARC (International Agency for Research on Cancer), il est estimé que 8,2 millions de décès dus à cette maladie ont été enregistrés en 2012 dans le monde ; 65% d'entre eux sont survenus dans les régions développées. Notons que 14,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde en 2012, dont 57% dans les régions développées. De plus, au cours de la même année, 32,6 millions de patients étaient déjà atteints par cette maladie.²⁷ D'après le rapport de l'ACS (American Cancer Society) de 2011, ces chiffres vont atteindre 21,4 millions de nouveaux cas de cancer et 13,2 millions de décès en 2030.²⁸

Le même rapport montre que certains types de cancer sont plus fréquents que d'autres. C'est le cas notamment du cancer du poumon pour les hommes et le cancer du sein pour les femmes (Figure 1.11).²⁸

²⁷ World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, 2012

²⁸ American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*, Atlanta, 2011

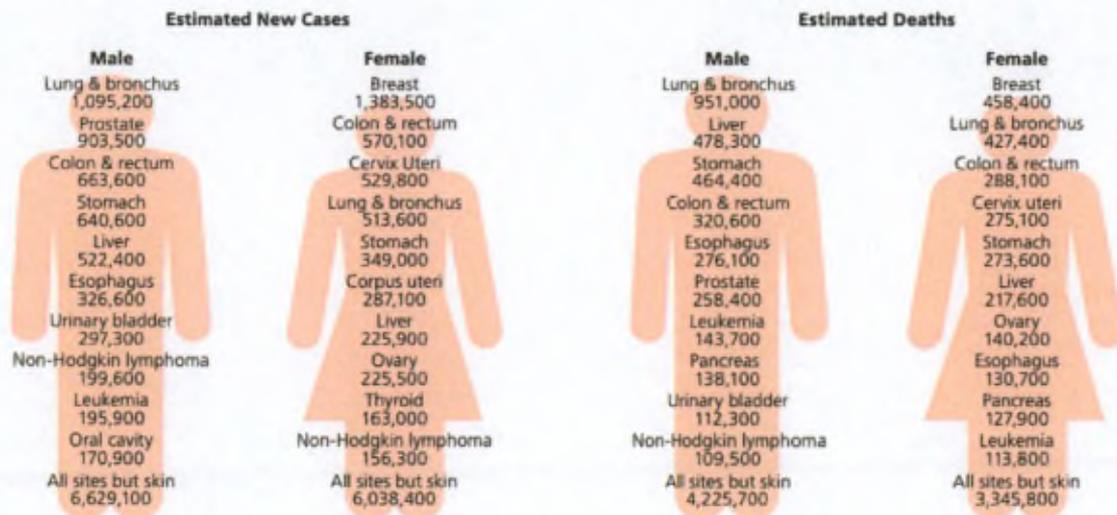


Figure 1.11 – Estimation des nouveaux cas de cancers et du nombre de décès en 2008 dans le monde. (American Cancer Society²⁸)

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un tiers des cancers peuvent être évités. Ainsi, parmi les facteurs de risque reconnus par l'OMS on peut mentionner : le tabac,²⁹ le style de vie,^{30,31,32} l'alcool,²⁹ les infections³³ et l'hérédité.³⁴

1.1.3 Traitements

1.1.3.1 La chirurgie

La chirurgie est un des traitements les plus importants pour les tumeurs solides. Elle implique la résection de la tumeur et d'une partie du tissu sain environnant. Malheureusement, la chirurgie est inopérante pour les cancers métastatiques, entraînant souvent une rechute de la maladie voir la mort du patient. En effet, il est illusoire de penser éliminer toutes les métastases par la chirurgie, y compris les micrométastases en formation. Des traitements complémentaires comme la radiothérapie et la chimiothérapie s'avèrent donc nécessaires.³⁵

²⁹ Secretan, B.; Straif, K.; Baan, R.; Grosse, Y.; El Ghissassi, F.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Freeman, C.; Galichet, L.; Coglianò, V.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 1033-1034.

³⁰ Mao, Y.; Pan, S.; Wen, S. W.; Johnson, K. C. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 831-837.

³¹ Terry, P.; Giovannucci, E.; Michels, K. B.; Bergkvist, L.; Hansen, H.; Holmberg, L.; Wolk, A. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 525-533.

³² Durko, L.; Malecka-Panas, E. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2014**, *10*, 45-54.

³³ De Flora, S.; Bonanni, P. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 787-795.

³⁴ Petrucelli, N.; Daly, M.B.; Feldman, G.L. *BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. In *GeneReviews* [Internet]. University of Washington, Seattle; 1998 [Updated 2013]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>

³⁵ Kornienko, A.; Mathieu, V.; Rastogi, S. K.; Lefranc, F.; Kiss, R. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4823-4939.

1.1.3.2 La radiothérapie

En général, la radiothérapie est la deuxième étape dans le schéma du traitement du cancer, après la chirurgie. Elle vise à détruire les cellules cancéreuses qui se sont diffusées dans le tissu entourant la tumeur et qui n'ont pas pu être éliminées par chirurgie.³⁵ La radiothérapie est également utilisée pour les types de cancers pour lesquels la chirurgie n'est pas envisageable comme les lymphomes. Les radiations ionisantes produisent des lésions de l'ADN, les cellules en division rapide étant donc plus affectées que les cellules normales.¹ Par contre, les cellules souches tumorales se divisent plus lentement et sont donc plus difficiles à éliminer de cette façon. Il suffit que quelques cellules souches cancéreuses subsistent pour qu'elles puissent régénérer la tumeur.¹

Il est important de mentionner que deux autres types de thérapies sont également utilisés dans le traitement du cancer. Il s'agit de l'immunothérapie^{36a} (qui vise l'induction ou l'augmentation de la réponse du système immunitaire contre le cancer) et de l'hormonothérapie^{36b} (qui implique des médicaments qui interfèrent avec la signalisation de la prolifération via les récepteurs d'hormones présents à la surface de certaines cellules cancéreuses). Ces thérapies sont assez éloignées de ce projet et ne seront pas détaillées par la suite.

1.1.3.3 La chimiothérapie cytotoxique

La chimiothérapie anticancéreuse cytotoxique est définie comme l'utilisation de substances chimiques afin de diminuer la prolifération ou de déclencher la mort des cellules cancéreuses. La plupart des agents chimiothérapeutiques ciblent le cycle cellulaire, attaquant ainsi les cellules qui ont une division rapide.^{36c,37} Les cellules normales qui se divisent rapidement comme les cellules des follicules pileux, la moelle osseuse, les cellules germinales et celles du système gastro-intestinal sont également affectées par ce type de traitement d'où les effets secondaires indésirables. Parmi les plus fréquents nous pouvons citer la leucopénie (diminution du nombre de leucocytes), la diarrhée et la nausée (conséquence de dommages causés à la muqueuse intestinale), l'infertilité et l'alopecie (perte des cheveux).^{36c} Les différentes classes de médicaments cytotoxiques sont représentées dans le Tableau 1.1.

³⁶ a) Lesterhuis, W. J.; Haanen, J. B. A. G.; Punt, C. J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 591-600 ; b) Jones, K. L.; Buzdar, A. U. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 391-406; c) Schulz, W.A. *Molecular Biology of Human Cancers – An advanced student's textbook*; Springer: Dordrecht, 2007.

³⁷ Lind, M. J. *Medicine* **2011**, *39*, 711-716.

Classe		Exemples de principes actifs	Mécanisme d'action et références
Agents alkylants de l'ADN	Moutarde à l'azote et dérivés	Cyclophosphamide, Ifosfamide, Melphalan	Les dérivés azotés de moutarde sont des précurseurs des ions aziridinium qui alkylent l'ADN, tandis que les agents méthylants produisent du diazométhane et transfèrent ainsi un groupe méthyle sur l'ADN. L'ion aziridinium peut également réagir avec des groupes nucléophiles (HO, SH, NH) présents sur les protéines. Les dérivés de cis-platine et les nitroso-urées produisent des réactions de réticulation entre deux bases. L'atome d'oxygène O ⁶ et d'azote N ⁷ de la guanine sont souvent les cibles de ces agents. ³⁸
	Agents méthylants de l'ADN	Dacarbazine, Témzololomide	
	Dérivés du N-nitroso-urée	Carmustine, Lomustine, Fotémustine	
	Dérivés de cis-platine	Cisplatine, Carboplatin, Oxaliplatine	
Inhibiteurs des topoisomérases	Inhibiteurs de la topoisomérase 1	Irinotécan, Topotécan	Les topoisomérases sont des enzymes responsables du maintien de la bonne structure de l'ADN pendant la réplication. Elles clivent l'ADN, ce qui permet aux deux brins de se dérouler, et les relie une fois que la chaîne est détendue. Les inhibiteurs de topoisomérases bloquent le fonctionnement de ces enzymes en permettant le clivage de l'ADN mais en bloquant l'étape de réparation.
	Inhibiteurs de la topoisomérase 2	Etoposide, Teniposide	
Inhibiteurs de l'organisation des microtubules	Dérivés de la pervenche	Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine	Les médicaments de cette classe perturbent l'assemblage ou la dépolymérisation des microtubules. Ceci affecte principalement la mitose, mais le transport vésiculaire et la migration des cellules sont également inhibés.
	Taxanes	Paclitaxel, Docetaxel	
Antibiotiques antitumoraux	Anthracyclines	Doxorubicine, Daunorubicine, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantrone	Les antracyclines possèdent une structure plane conférée par des cycles condensés ce qui leur permet de s'insérer entre les deux brins d'ADN. Lorsque la topoisomérase se lie à l'ADN elle y est attachée de manière covalente ce qui bloque son activité et bloque aussi la réplication. ³⁸
	Autres	Bléomycine, Mitomycin	
Anti-métabolites	Analogues des purines	Mercaptopurine, Thioguanine, phosphate de Fludarabine	Les analogues des bases azotées imitent les structures des nucléosides et interviennent dans la synthèse de l'ADN en produisant la rupture de la chaîne d'ADN après leur incorporation. Le méthotrexate agit en bloquant l'enzyme dihydrofolate réductase impliquée dans la synthèse des nucléotides.
	Analogues des pyrimidines	Fluorouracil (5-FU), Cytarabine, Gemcitabine, Capecitabine	
	Antagonistes de l'acide folique	Méthotrexate	

Tableau 1.1 – Classification des agents utilisés en chimiothérapie^{37,36,38}

³⁸ Lemke, T.L.; William, D.A.; Roche, V.F.; Zito, S.W. *Foye's Principals of Medicinal Chemistry*, 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2008.

Une stratégie visant à contourner les problèmes associés à la chimiothérapie conventionnelle est le développement de médicaments contre des cibles beaucoup plus spécifiques. Ce type de médicaments s'inscrit dans le concept général de thérapie ciblée.

1.1.3.4 Les thérapies ciblées

Les anticorps.

La thérapie à base d'anticorps cible le plus souvent les récepteurs des facteurs de croissance présents à la surface des cellules tumorales, comme par exemple les récepteurs HER (human epidermal growth factor receptor 2) et EGFR (epidermal growth factor receptor). Des anticorps visant le récepteur VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) représentent un moyen de court-circuiter le processus d'angiogenèse. D'autres anticorps visent les cellules du système immunitaire en ciblant les protéines spécifiques des lymphocytes comme la protéine CD20 (B-lymphocyte antigen CD20). Ces cibles sont souvent surexprimés dans le cancer.³⁹

Plusieurs mécanismes dans lesquels les anticorps induisent la mort des cellules cancéreuses sont possibles :⁴⁰

- action directe de l'anticorps sur son récepteur qui peut avoir un effet inhibiteur sur l'activité de ce dernier ;
- induction de l'apoptose des cellules cancéreuses ou vectorisation d'un médicament conjugué à l'anticorps de manière spécifique vers les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales ;
- activation du système immunitaire contre les cellules tumorales.

Parmi les médicaments de type anticorps présents sur le marché, nous pouvons citer le Rituximab (cible : CD20, lymphome non hodgkinien), le Trastuzumab (cible : HER2, cancer du sein), le Cetuximab (cible : EGFR, cancer colorectal), et le Bevacizumab (cible : VEGFR, cancer du poumon, cancer du sein et cancer colorectal).³⁹

Les inhibiteurs de kinases.

Les protéines kinases jouent le rôle de médiateur dans la plupart des traductions de signaux dans les cellules eucaryotes. Ce sont des protéines possédant un site actif, hautement conservé, qui transfèrent un groupe phosphate de l'ATP sur les groupes hydroxyle des sérines, des thréonines et des tyrosines présents sur les protéines. Par cette phosphorylation, la protéine substrat subit une modification allostérique de sa conformation ce qui inhibe, active ou augmente son activité.¹ Les kinases contrôlent de nombreux autres processus cellulaires, y

³⁹ Weiner, L. M.; Surana, R.; Wang, S. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317-327.

⁴⁰ Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 278-287.

compris le métabolisme, la transcription, la progression du cycle cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, le mouvement des cellules, l'apoptose et la différenciation.⁴¹

Les 518 kinases représentant le kinome humain sont classifiées sous forme d'un dendrogramme (Figure 1.12) qui respecte les similitudes entre les séquences des domaines catalytiques des différentes kinases. Certaines kinases sont des cibles très connues pour le cancer alors que d'autres n'ont jamais été exploitées pour cette maladie.⁴² Une recherche sur clinicaltrials.gov montre qu'il y a 2800 études cliniques achevées ou en cours pour les mots « kinase inhibitors ADN cancer » dans les phases I, II et III d'essais cliniques. Les kinases les plus ciblées dans ces études sont celles dont le rôle dans la signalisation est bien connu (ex : VEGFR, EGFR, HER2, Kit et Aurora).

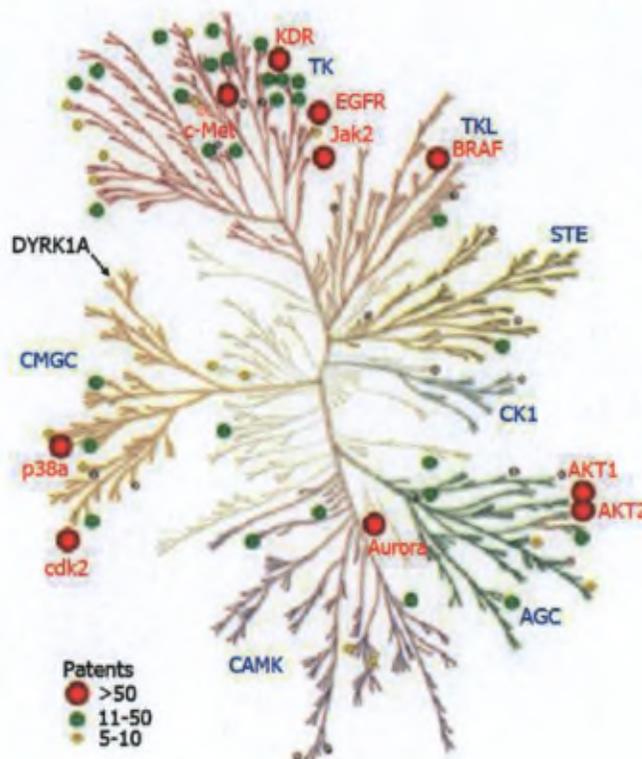


Figure 1.12 – Le kinome humain. Nombre de brevets déposés sur les inhibiteurs de kinases entre 2006-2009⁴²

Les inhibiteurs de kinases représentent actuellement la famille la plus importante des traitements ciblés avec plus de 10 000 brevets déposés aux États-Unis entre 2001-2010. Une partie des inhibiteurs de kinases approuvés par le FDA (Food and Drug Administration – USA) pour le traitement du cancer sont présentés dans le Tableau 1.2.⁴³

⁴¹ Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.

⁴² Fedorov, O.; Müller, S.; Knapp, S. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 166-169.

⁴³ Knight, Z. A.; Lin, H.; Shokat, K. M. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 130-137.

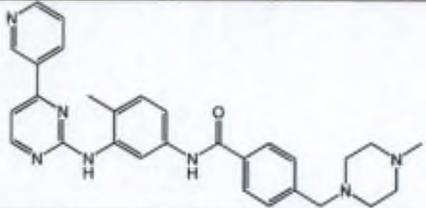
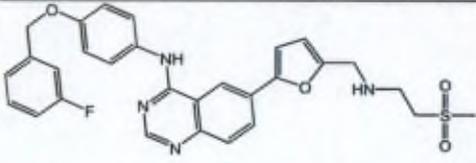
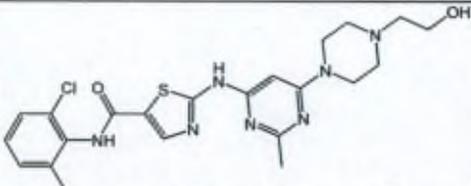
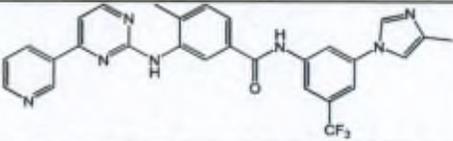
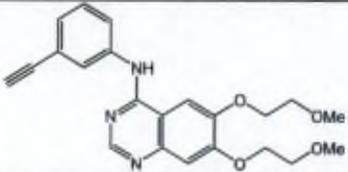
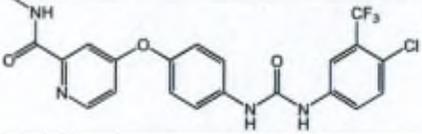
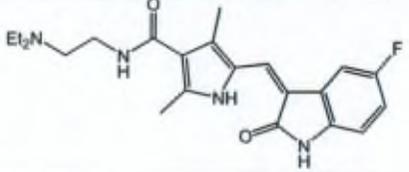
Inhibiteur	Structure	Kinases ciblées	Types de cancer
Imatinib		Bcr-Abl, KIT (mast/stem cell growth factor receptor) et PDGF (platelet-derived growth factor receptor)	leucémie myéloïde chronique et tumeur stromale gastro-intestinale
Lapatinib		EGFR et Her2	cancer du sein
Dasatinib		Bcr-Abl	leucémie myéloïde chronique
Nilotinib		Bcr-Abl	leucémie myéloïde chronique
Erlotinib		EGFR	cancer du poumon et cancer du pancréas
Sorafenib		VEGFR2 et PDGFR	cancer du poumon et cancer du foie
Sunitinib		VEGFR2, PDGFR et KIT (CD117)	cancer du rein et tumeur stromale gastro-intestinale

Tableau 1.2 – Exemples d'inhibiteurs de kinases présents sur le marché^{43,44}

L'imatinib a été un des premiers inhibiteurs de kinases à être développé. Il cible la tyrosine-kinase Bcr-Abl. Cette protéine naît d'une translocation chromosomique particulière, connue sous le nom du chromosome de Philadelphie. C'est la conséquence d'une rupture de deux chromosomes et de leur relation croisée au niveau des sites de deux gènes spécifiques, appelés Abl et Bcr. La fusion de ces gènes crée un gène hybride, codant pour la protéine Bcr-Abl. La protéine Abl est une kinase impliquée dans la signalisation cellulaire. La substitution

⁴⁴ Jänne, P. A.; Gray, N.; Settleman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 709-723.

du fragment Bcr au niveau de l'extrémité N-terminale normale du gène Abl le rend hyperactif, de sorte qu'il stimule la prolifération inappropriée de cellules hématopoïétiques. En conséquence, un nombre excessif de globules blancs s'accumulent dans la circulation sanguine ce qui provoque la leucémie myéloïde chronique.¹ L'avantage de la thérapie par l'imatinib est que seules les cellules tumorales possèdent cette kinase, ce qui diminue significativement l'effet du médicament sur les cellules normales.

Même si certains types de cancer répondent bien aux thérapies ciblées, ce type de traitement a eu peu de succès dans le cas du cancer du poumon, du sein, colorectal, de la prostate et du pancréas qui ont un taux de mortalité plus élevé. Le succès du traitement avec l'imatinib réside aussi dans le fait que la mutation Bcr-Abl est vitale pour le développement de la leucémie myéloïde chronique, tandis que la majorité des tumeurs solides ne dépendent pas d'une seule voie de signalisation.⁴⁵

La résistance des cancers aux traitements ciblés.

Un problème majeur à résoudre dans le cadre des thérapies ciblées reste le développement de la résistance au traitement (Figure 1.13). Souvent, les kinases ciblées par les anticorps ou par les inhibiteurs acquièrent des mutations qui bloquent la liaison du médicament. C'est le cas par exemple de la kinase Bcr-Abl qui, suite à une mutation, devient insensible à l'imatinib.⁴³ Un autre exemple est la mutation T790M de l'EGFR qui lui confère une résistance aux inhibiteurs de kinase ATP-compétitifs tel que l'erlotinib, en augmentant l'affinité de l'EGFR pour l'ATP de plus d'un ordre de grandeur.⁴⁶

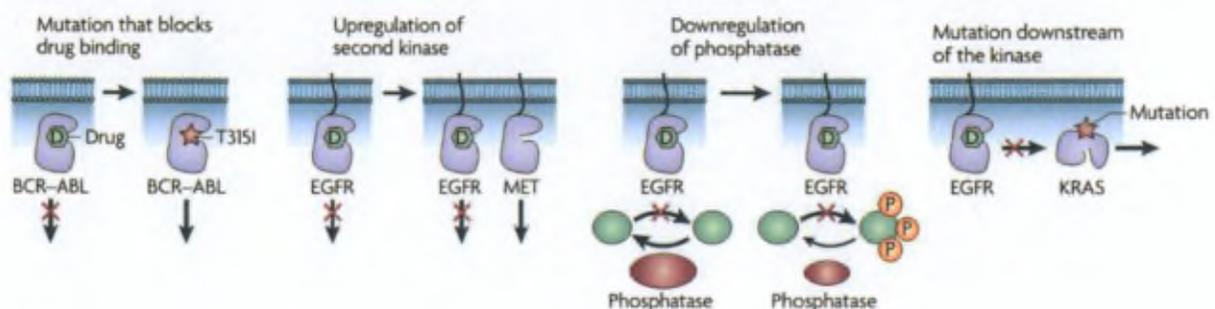


Figure 1.13 – Mécanismes de résistance des cellules tumorales aux inhibiteurs de kinases⁴³

Outre les mutations de la kinase ciblée, la signalisation redondante d'une cellule cancéreuse facilite l'utilisation de voies alternatives pour effectuer le processus bloqué par un inhibiteur. Ainsi, suite au traitement, la cellule peut surexprimer d'autres récepteurs de type,

⁴⁵ Morphy, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1413-1437.

⁴⁶ Yun, C.-H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K.-K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 2070-2075.

« receptor tyrosine kinase » (RTKs) qui activent la même voie de signalisation.^{43,44} La voie PI3K, par exemple, est activée par une multitude de RTKs.⁴⁷

Une caractéristique unique des inhibiteurs de kinases est qu'ils sont moins sélectifs que n'importe quel autre type de médicament. En effet, la superfamille des kinases est la plus grande famille de gènes ciblés par un médicament qui se lie à un substrat commun : l'ATP.^{48,49}

Des inhibiteurs multi-kinases comme le sorafenib ont déjà démontré leur efficacité clinique dans le traitement des tumeurs solides.^{44,50} Ainsi, plutôt que de tenter d'optimiser la spécificité d'une seule molécule anti-kinase pour une cible au sein des cellules cancéreuses, se concentrer sur l'optimisation de profils contre un groupe de kinases semble une meilleure stratégie.⁴³

1.1.4 La kinase Dyrk1A : une nouvelle cible thérapeutique ?

La kinase Dyrk1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) est une kinase impliquée dans la progression des maladies neurodégénératives comme le syndrome de Down ou la maladie d'Alzheimer.^{51,52}

La famille des kinases DYRKs se compose de 5 protéines identifiées à ce jour : Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3 et Dyrk4 et fait partie du groupe CMGC du kinome humain. Ce dernier comprend les familles des kinases CDKs (cyclin-dependent kinases), MAPKs (mitogen-activated protein kinases), GSKs (glycogen synthase kinases) et CLKs (CDK-like kinases). La kinase Dyrk1A est une kinase possédant une double spécificité : elle peut phosphoryler des substrats sur les résidus sérine ou thréonine, mais elle est également capable d'effectuer une autophosphorylation activatrice sur un résidu tyrosine : l'acide aminé Tyr321 situé dans la boucle d'activation. Contrairement aux kinases de type MAPK, l'activité de la kinase Dyrk1A n'est pas modulée par des kinases en amont. La façon dont son activité est régulée n'est pas encore bien connue, mais elle pourrait être faite par des échanges dans l'expression du gène, par des interactions avec d'autres protéines ou par des modifications dans la localisation cellulaire.⁵³

Le rôle de la kinase Dyrk1A dans le processus d'apoptose a été démontré dans le travail de Laguna et coll.⁵⁴ La kinase Dyrk1A phosphoryle la caspase 9 sur le résidu Thr125, ce qui

⁴⁷ Gossage, L.; Eisen, T. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1973-1978.

⁴⁸ Bain, J.; McLauchlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 199-204.

⁴⁹ Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevornic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2007**, *408*, 297-315.

⁵⁰ Strumberg, D.; Voliotis, D.; Moeller, J. G.; Hilger, R. A.; Richly, H.; Kredtke, S.; Beling, C.; Scheulen, M. E.; Seeber, S. *Int J Clin Pharmacol Ther* **2002**, *40*, 580-581.

⁵¹ Wegiel, J.; Gong, C.-X.; Hwang, Y.-W. *FEBS J.* **2011**, *278*, 236-245.

⁵² Frost, D.; Meechoovet, B.; Wang, T.; Gately, S.; Giorgetti, M.; Shcherbakova, I.; Dunckley, T. *PLoS One* **2011**, *6*, e19264.

⁵³ Becker, W.; Sippl, W. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 246-256.

⁵⁴ Laguna, A.; Aranda, S.; Barallobre, M. J.; Barhoum, R.; Fernández, E.; Fotaki, V.; Delabar, J. M.; de la Luna, S.; de la Villa, P.; Arbonés, M. L. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 841-853.

la rend inactive, protégeant les cellules de la rétine contre l'apoptose. L'étude de Seifert et coll.⁵⁵ confirme que la caspase 9 est un substrat de Dyrk1A.

La littérature récente montre que d'autres protéines impliquées dans le cancer représentent un substrat pour la kinase Dyrk1A. C'est le cas par exemple des facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells),^{56,57} Gli1⁵⁸ et STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)^{59,60} ou de l'oncogène Notch1⁶¹. De plus, la kinase Dyrk1A est surexprimée dans le glioblastome et son inhibition mène à la dégradation de l'EGFR.⁶²

Le rôle dans la signalisation d'environ 50% de kinases n'est pas encore bien caractérisé. La kinase Dyrk1A fait partie des kinases peu étudiées dans les maladies néoplasiques et peut donc être une cible intéressante.⁴²

Etant donné que le rôle de la kinase Dyrk1A dans l'apoptose en général et dans le cancer plus particulièrement, est de mieux en mieux connu, nous nous sommes intéressés au développement d'inhibiteurs potentiels de cette kinase qui pourraient dès lors agir sur les cancers résistants aux stimuli pro-apoptotiques.

1.1.5 L'harmine

Une large gamme d'inhibiteurs de la kinase Dyrk1A, naturels ou de synthèse, est déjà décrite dans la littérature, mais très peu d'entre eux ont été testés contre le cancer.⁶³ Parmi les molécules les plus connues, nous pouvons citer notamment l'harmine,⁶⁴ la roscovitine⁴⁸ et la molécule INDY⁶⁵ (inhibitor of DYRK) (Tableau 1.3).

⁵⁵ Seifert, A.; Allan, L. A.; Clarke, P. R. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268-6280.

⁵⁶ Gwack, Y.; Sharma, S.; Nardone, J.; Tanasa, B.; Iuga, A.; Srikanth, S.; Okamura, H.; Bolton, D.; Feske, S.; Hogan, P. G.; Rao, A. *Nature* **2006**, *441*, 646-650.

⁵⁷ Daniel, C.; Gerlach, K.; Váth, M.; Neurath, M. F.; Weigmann, B. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1767-1775.

⁵⁸ Mao, J.; Maye, P.; Kogerman, P.; Tejedor, F. J.; Toftgard, R.; Xie, W.; Wu, G.; Wu, D. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35156-35161.

⁵⁹ Wiechmann, S.; Czajkowska, H.; de Graaf, K.; Grötzing, J.; Joost, H.-G.; Becker, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 403-408.

⁶⁰ Masuda, M.; Wakasaki, T.; Suzui, M.; Toh, S.; Joe, A.; Weinstein, I. *Curr. Cancer Drug Targets* **2010**, *10*, 117-126.

⁶¹ Fernandez-Martinez, J.; Vela, E. M.; Tora-Ponsioen, M.; Ocaña, O. H.; Nieto, M. A.; Galceran, J. *J. Cell. Sci.* **2009**, *122*, 1574-1583.

⁶² Pozo, N.; Zahonero, C.; Fernandez, P.; Linares, J. M.; Ayuso, A.; Hagiwara, M.; Perez, A.; Ricoy, J. R.; Hernandez-Lain, A.; Sepulveda, J. M.; Sanchez-Gomez, P. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2475-2487.

⁶³ Ionescu, A.; Dufresne, F.; Gelbecke, M.; Jabin, I.; Kiss, R.; Lamoral-Theys, D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1315-1329.

⁶⁴ Göckler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F. J.; Becker, W. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6324-6337.

⁶⁵ Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; Hosoya, T.; Ito, N.; Hagiwara, M. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 86.

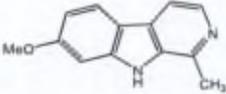
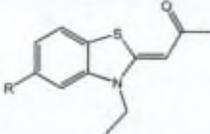
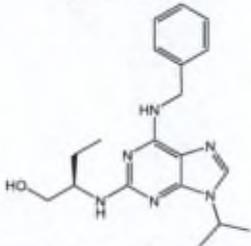
Nom et structure	IC ₅₀ d'inhibition de DYRK1A mature (μM)	IC ₅₀ d'inhibition de l'autophosphorylation de DYRK1A (μM)	Observations
Harmine 	0,08	Tyr321: 2 Ser520: 5	Produit naturel ; Sélectif par rapport à d'autres kinases, mais inhibe la MAO (monoamine oxydase) ce qui peut produire des effets neurologiques indésirables. ⁶⁶
INDY  INDY : R = OH TG003 : R = OMe	INDY : 0,2 TG003 : 0,9	-	Produits de synthèse ; INDY est un inhibiteur sélectif de DYRK1A. TG003 est moins sélectif par rapport aux kinases : Clk, DYRK1B, PIM et CSNK.
Roscovitine 	3,1	5	Produit de synthèse ; Inhibiteur plus puissant des CDKs par rapport à DYRK1A. Le produit est en phase clinique II pour le cancer du poumon et celui du sein.

Tableau 1.3 – Quelques exemples d'inhibiteurs de la kinase DYRK1A⁶³

L'harmine a été identifiée comme un inhibiteur puissant et sélectif de la kinase DYRK1A, avec une concentration d'inhibition à 50% de l'activité de cette kinase (indice IC₅₀) de l'ordre de 0,08 μM^{49,67} (0,03 μM dans une autre étude⁶⁴) (Tableau 1.3).

L'inhibition d'activité de la kinase DYRK1B, qui a un taux de similitude de structure du site actif de 85% avec la kinase DYRK1A, est caractérisé par un indice IC₅₀ de 0,2 μM. Les autres membres de la famille DYRK (DYRK2 et DYRK4) sont inhibés en terme d'indice IC₅₀ aux concentrations de 2 et 80 μM respectivement.⁶⁴ L'inhibition de l'activité de la kinase DYRK1A par l'harmine a lieu en compétition avec l'ATP. La co-cristallisation du composé avec la kinase montre que l'harmine se lie au niveau du site actif de l'enzyme.⁶³

L'harmine pourrait inhiber la résistance des cellules cancéreuses à des traitements pro-apoptiques par son activité anti-DYRK1A, qui est un inhibiteur de la caspase 9.^{54,64} Une

⁶⁶ Santillo, M. F.; Liu, Y.; Ferguson, M.; Vohra, S. N.; Wiesenfeld, P. L. *Toxicol. in Vitro* **2014**, *28*, 403-410.

⁶⁷ Adayev, T.; Wegiel, J.; Hwang, Y.-W. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 212-218.

étude a été réalisée sur des lignées cellulaires de cancer du sein surexprimant la protéine BCRP (breast cancer resistance protein), une protéine qui conduit à la résistance aux inhibiteurs de la topoisomérase I.⁶⁸ Cette étude a démontré que le co-traitement de ces cellules cancéreuses avec l'harmine (en doses non-toxiques) et la camptothécine (un inhibiteur de la topoisomérase I) supprime la résistance des cellules cancéreuses associée à la protéine BCRP.

Les travaux de plusieurs équipes de recherche^{69,70,71} révèlent une activité cytotoxique de l'harmine et de ses dérivés envers des lignées de cellules tumorales humaines en culture, ce qui prouve son potentiel d'utilisation dans la thérapie anticancéreuse. Ces exemples seront détaillés par la suite (§1.2.2).

L'harmine étant l'inhibiteur le plus puissant connu à ce jour de la kinase Dyrk1A, nous avons ciblé des structures apparentées de ce composé, à savoir des dérivés de la tétrahydro- β -carboline comme détaillé ci-après.

1.1.6 Autres cibles importantes dans le cadre de ce projet

Au cours de ce travail, d'autres cibles de molécules que nous avons synthétisées se sont avérées être intéressantes. Ces cibles sont différentes des kinases visées au début de notre projet, et elles seront discutées brièvement ci-après.

1.1.6.1 Les facteurs de transcription

Dans le cadre de ce projet, certaines cibles, autres que la kinase DYRK1A visée au début, se sont avérées importantes. C'est le cas des facteurs de transcription. Un bref résumé de la littérature sur les facteurs de transcription, qui jouent un rôle important dans le cancer, est donc présenté ci-dessous.

Généralités.

Les facteurs de transcription sont des biomolécules qui contrôlent l'activité d'un gène en déterminant si l'ADN du gène sera ou non transcrit en ARN. C'est l'enzyme ARN polymérase qui catalyse les réactions chimiques nécessaires pour la synthèse de l'ARN, en utilisant l'ADN comme matrice. Les facteurs de transcription contrôlent quand, où, et avec quelle efficacité, l'ARN polymérase fonctionne. Les facteurs de transcription peuvent activer ou inhiber la

⁶⁸ Ma, Y.; Wink, M. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 146-149.

⁶⁹ Frédérick, R.; Bruyère, C.; Vancraeynest, C.; Reniers, J.; Meinguet, C.; Pochet, L.; Backlund, A.; Masereel, B.; Kiss, R.; Wouters, J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6489-6501.

⁷⁰ Skouta, R.; Hayano, M.; Shimada, K.; Stockwell, B. R. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5707-5713.

⁷¹ a) Cao, R.; Chen, H.; Peng, W.; Ma, Y.; Hou, X.; Guan, H.; Liu, X.; Xu, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 991-1001; b) Cao, R.; Chen, Q.; Hou, X.; Chen, H.; Guan, H.; Ma, Y.; Peng, W.; Xu, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 4613-4623; c) Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Hou, X.; Guan, H.; Chen, Q.; Ma, Y.; Xu, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 249-257.

transcription d'un gène, ce qui détermine le fonctionnement ou non du gène à un moment donné.⁷²

Les facteurs généraux de transcription sont nécessaires pour l'initiation de la transcription chez les eucaryotes, notamment pour le recrutement de l'ARN polymérase au niveau du site d'initiation de la transcription. Ils comprennent un certain nombre de protéines, telles que TFIIA (Transcription factor II A) et TFIIB (Transcription factor II B), entre autres (Figure 1.14).⁷²

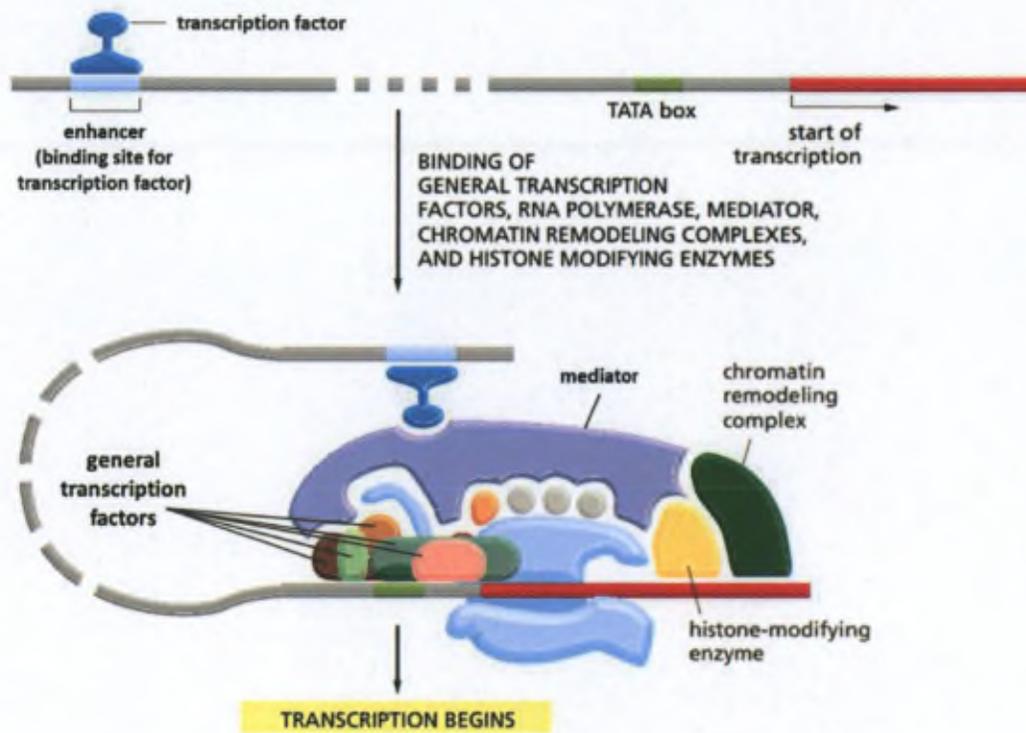


Figure 1.14 - Initiation de la transcription dans une cellule eucaryote (figure d'après Alberts¹)

Les facteurs de transcription représentent un des moyens que la cellule utilise pour répondre aux stimuli de l'environnement et aux signaux provenant d'autres cellules.¹ Ils peuvent jouer des rôles importants dans la biologie du cancer, notamment s'ils influencent l'activité des gènes impliqués dans le cycle cellulaire.⁷³ De plus, des facteurs de transcription peuvent être les produits d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs.¹

Les facteurs de transcription fonctionnent dans le noyau et leur transport nucléaire peut influencer leur activité.⁷⁴ Un autre mécanisme général important dans le contrôle de l'activité de facteurs de transcription est une modification post-traductionnelle, telle que la phosphorylation.⁷⁵ Enfin, en plus de contrôler la transcription de gènes y compris d'autres facteurs de transcription, ces complexes protéiques peuvent également contrôler les gènes

⁷² Encyclopædia Britannica <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1255831/transcription-factor>.

⁷³ Libermann, T.; Zerbini, L. *Curr. Gene Ther.* **2006**, *6*, 17-33.

⁷⁴ Komeili, A.; O'Shea, E. K. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 355-360.

⁷⁵ Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1172-1183.

responsables de leur propre transcription, conduisant à des mécanismes de feedback complexes.^{1,72}

Les facteurs de transcription de la famille AP-1.

Nous décrivons ci-après les rôles physiologiques des facteurs de transcription de la famille AP-1 car certains d'entre eux pourraient être des cibles de molécules que nous avons synthétisées durant ce travail de thèse.

Le facteur de transcription AP-1 (activator protein 1) est un complexe dimérique qui comprend des membres des plusieurs familles de protéines, dont les plus connus sont les familles JUN (JunB, c-Jun, JunD) et FOS (FosB, c-Fos, Fra1, Fra2).⁷⁶ Les protéines AP-1 sont des facteurs de transcription de type bZIP (basic leucine-zipper) car ils dimérisent à l'aide des leucines et possèdent un domaine contenant des acides aminés basiques, qui sont protonés au pH physiologique et peuvent interagir avec le squelette de l'ADN.²⁵ Le complexe AP-1 peut être formé par de nombreuses combinaisons d'hétérodimères ou d'homodimères. Les différentes combinaisons de dimères reconnaissent des séquences différentes dans les promoteurs des gènes régulés par AP-1.⁷⁷

La régulation de la prolifération cellulaire par AP-1 peut avoir une importance cruciale pour le développement des tumeurs. Cependant, le complexe AP-1 ne favorise pas toujours la prolifération cellulaire : il peut également présenter des activités antiprolifératives en fonction du contexte cellulaire. C-Jun est essentiellement un régulateur positif de la prolifération cellulaire, tandis que JunB et JunD sont souvent considérés comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire.⁷⁷

Concernant l'effet des facteurs de la famille AP-1 sur l'apoptose, des études *in vitro* indiquent que l'augmentation de l'activité d'AP-1 peut conduire à l'apoptose dans des types cellulaires spécifiques, y compris des cellules tumorales humaines.²⁵ Cependant, l'oncogène AP-1 peut aussi diminuer l'apoptose dans les tumeurs du foie.⁷⁸ La double activité d'AP-1 dans l'apoptose est bien illustrée par le double rôle de c-Jun dans les cellules neuronales⁷⁹ et les hépatocytes.⁷⁸

AP-1 peut donc avoir un double rôle dans le cancer. Cette protéine peut être antioncogène en induisant l'apoptose, mais elle peut également favoriser l'apparition des tumeurs par son action sur la signalisation de survie cellulaire. Le résultat final de l'activité d'AP-1 dans le cancer semble dépendre de la composition de dimères ainsi que du contexte cellulaire et génétique (le type de tumeur, le stade de la tumeur et le contexte génétique des tumeurs). Les fonctions antioncogènes récemment découvertes pour certaines protéines de la famille AP-1 pourraient fournir une nouvelle opportunité pour les traitements anticancéreux qui sont basés

⁷⁶ Shaulian, E.; Karin, M. *Oncogene* **2001**, *20*, 2390-2400.

⁷⁷ Eferl, R.; Wagner, E. F. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 859-868.

⁷⁸ Eferl, R.; Ricci, R.; Kenner, L.; Zenz, R.; David, J.-P.; Rath, M.; Wagner, E. F. *Cell* **2003**, *112*, 181-192.

⁷⁹ Whitfield, J.; Neame, S. J.; Paquet, L.; Bernard, O.; Ham, J. *Neuron* **2001**, *29*, 629-643.

sur la modulation des complexes AP-1 dans divers types de tumeurs spécifiques.⁷⁷ Cette approche pourrait, non seulement inhiber l'activité oncogénique d'AP-1, mais également interférer activement à différents stades de développement de la tumeur.

1.1.6.2 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines ou des glycoprotéines régulatrices, de petite masse moléculaire, sécrétées par des globules blancs ou par d'autres types de cellules, en réponse à des stimuli. Elles se lient à des récepteurs spécifiques sur la membrane des cellules cibles, ce qui déclenche les voies de transduction de signaux qui modifient finalement l'expression des gènes dans les cellules cibles.⁸⁰ Les altérations cellulaires qui donnent lieu à un cancer provoquent des changements dans l'expression locale des cytokines. Ces perturbations entraînent les cellules immunitaires à s'infiltrer dans la tumeur, et à leur tour, à libérer des cytokines supplémentaires qui agissent de manière paracrine ou autocrine sur divers types cellulaires, dont les cellules cancéreuses.⁸¹ La compréhension de la fonction des cytokines, au cours du développement et de la progression tumorale n'est pas aisée en raison de la redondance et la pléiotropie apparente de leur action et de la manière dont l'ensemble de l'environnement de cytokines modifie les effets des cytokines individuelles.⁸²

Les cytokines incluent différents types de protéines. Parmi celles-ci on peut mentionner : les chémokines, les interférons, les interleukines, les lymphokines et le TNF (tumor necrosis factor). Elles peuvent être pro- ou anti-inflammatoires.⁸⁰ Les chémokines constituent un groupe de cytokines chimotactiques, de faible masse moléculaire, ayant une incidence sur la migration des leucocytes et d'autres types cellulaires dont les cellules cancéreuses. Elles sont exprimées en réponse à des cytokines inflammatoires.⁸³

Les cytokines les plus connues dans le cancer sont présentées dans le Tableau 1.4.

Cytokine	Role dans le cancer
TNF- α	Le TNF- α , produit par les cellules tumorales ou par les cellules inflammatoires dans le micro-environnement de la tumeur, peut favoriser la survie des cellules tumorales par l'induction de gènes codant pour des molécules antiapoptotiques via la voie NF-kB. Il favorise également l'angiogenèse et la métastase, ainsi que l'altération du contrôle du système immunitaire.
IL-6	IL-6 est une cytokine pléiotropique inflammatoire puissante. Elle est un facteur important qui favorise la croissance cellulaire et diminue l'apoptose.

⁸⁰ Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A.; Kuby, J. *Kuby Immunology*, 4th ed.; W.H. Freeman: New York, 2007.

⁸¹ Dranoff, G. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 11-22.

⁸² Paul, W. E. *Cell* **1989**, *57*, 521-524.

⁸³ Balkwill, F. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 540-550.

IL-8	IL-8 entraîne une réponse angiogénique dans les cellules endothéliales et augmente la prolifération et la survie des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses. Cette chémokine augmente la migration des cellules cancéreuses, des cellules endothéliales et des neutrophiles infiltrant le site de la tumeur. En conséquence, l'expression d'IL-8 est corrélée à l'angiogenèse, à la genèse et à la métastase des tumeurs dans de nombreux modèles de xénotreffes ou orthotopiques, <i>in vivo</i> . La signalisation d'IL-8, induite par un médicament ou par le stress, peut conférer une résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. ⁸⁴
IL-10	IL-10 inhibe l'activation de NF- κ B, par des mécanismes qui ne sont pas encore bien définis, et par conséquent inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, y compris le TNF- α , IL-6 et IL-12. IL-10 agit donc comme un inhibiteur du développement et de la progression tumorale.
IL-12	IL-12 est importante pour la résistance de l'organisme hôte à des tumeurs. L'activité antitumorale de l'IL-12 a été largement décrite dans des modèles murins, où il a été montré qu'elle inhibe la tumorigénèse et induit une régression des tumeurs déjà présentes.
IL-17	IL-17 induit le recrutement de cellules immunitaires dans les tissus périphériques. Cette réponse nécessite l'activation de NF- κ B après l'engagement du récepteur de l'IL-17. IL-17 conduit également à l'induction de nombreux facteurs pro-inflammatoires, y compris le TNF- α , IL-6 et IL-1 β .
IFN- γ	IFN- γ , produit par les cellules Th naïves, contribue également à l'activité antitumorale de l'IL-12. IFN- γ a, à la fois, un effet toxique direct sur les cellules cancéreuses et une activité antiangiogénique.
TRAIL	TRAIL peut se lier à cinq récepteurs différents, dont deux (DR4 et DR5) sont des récepteurs de mort qui fournissent des signaux apoptotiques, caspase-dépendants, à la cellule sur laquelle ils sont exprimés.

Tableau 1.4 – Les principales cytokines impliquées dans le cancer⁸⁵

La plupart des cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules immunitaires, ou par les cellules tumorales elles-mêmes, favorisent le développement de la tumeur. Les cytokines pro-apoptotique (TRAIL)⁸⁶ et anti-inflammatoire (IL-10)⁸⁵ interfèrent également avec le développement de la tumeur en agissant cette fois négativement sur ce développement.

⁸⁴ Waugh, D. J. J.; Wilson, C. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735-6741.

⁸⁵ Lin, W.-W.; Karin, M. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1175-118.

⁸⁶ Almasan, A.; Ashkenazi, A. *Cytokine Growth F. Rev.* **2003**, *14*, 337-348.

L'inhibition sélective de l'action de cytokines pro-inflammatoires, qui favorisent les tumeurs tout en améliorant l'activité des cytokines pro-apoptotiques et anti-inflammatoires, pourrait être la base d'une thérapie anticancéreuse.⁸⁵

1.2 Les dérivés de la tétrahydro- β -carboline

1.2.1 Généralités

Les β -carbolines sont des alcaloïdes indoliques, naturels ou de synthèse, qui possèdent une structure tricyclique de type pyrido[3,4-b]indole. Ces molécules sont classées selon leur structure en fonction du niveau de saturation du troisième cycle, les dérivés insaturés étant appelés β -carbolines tandis que les dérivés partiellement ou totalement saturés sont connus sous le nom de dihydro- et tétrahydro- β -carbolines (DHBC ou THBC). Les dérivés de β -carboline et de THBC les plus connus, ainsi que ceux dont les propriétés pharmacologiques seront détaillées dans cette section, sont représentés dans la Figure 1.15.

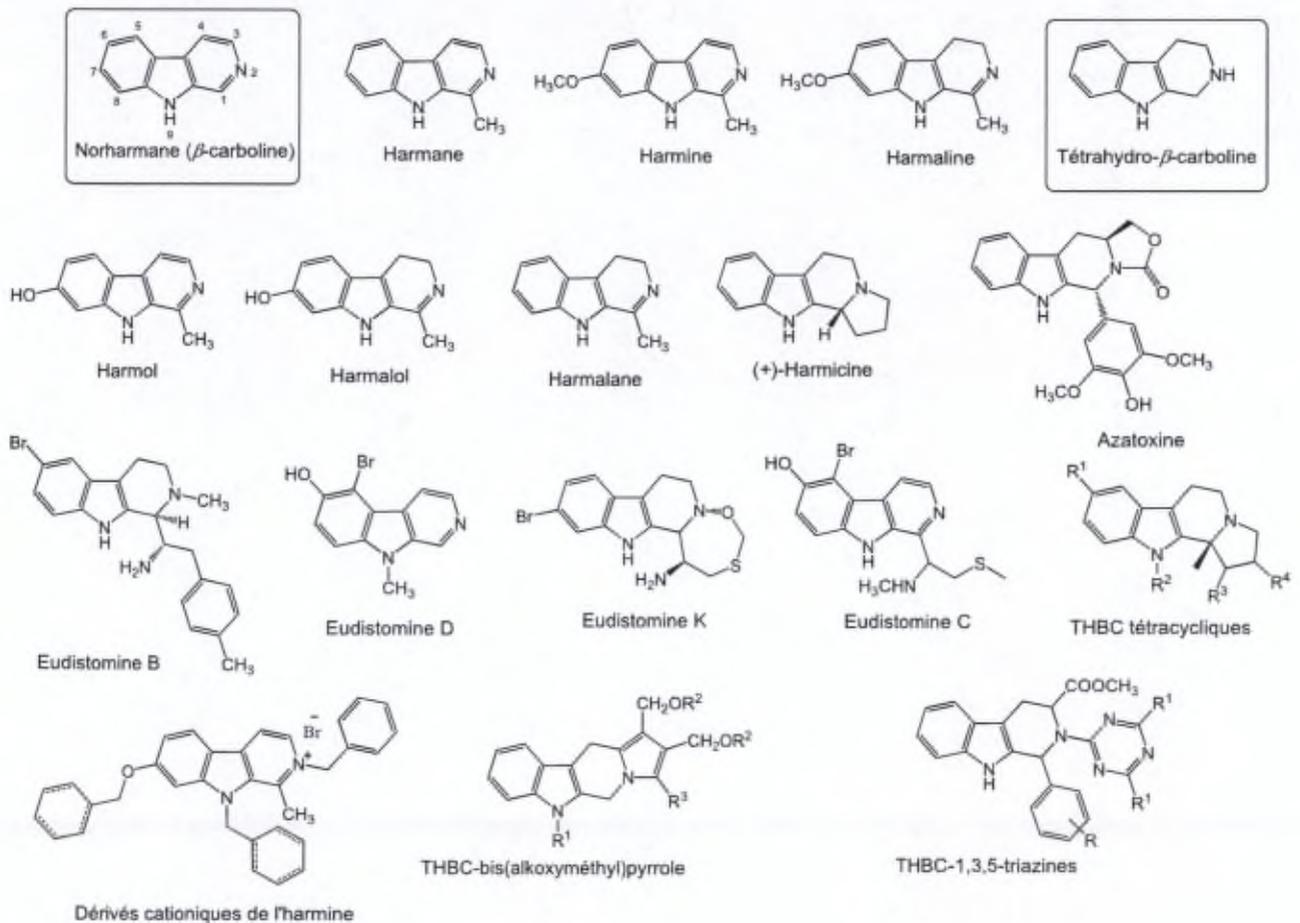


Figure 1.15 – Les principaux dérivés de β -carboline et de THBC⁸⁷

Ces composés sont très largement retrouvés dans la nature notamment dans certaines plantes, dans des aliments, chez certains invertébrés marins et dans les tissus de l'organisme humain. Les dérivés de la β -carboline possèdent une large gamme de propriétés biologiques notamment des propriétés antitumorales, antivirales, sédatives et hypnotiques.⁸⁷

Sources naturelles.

Des dérivés de la β -carboline ont été isolés, pour la première fois, de la plante *Peganum harmala* (également appelée rue de Syrie, Figure 1.16). C'est une plante pérenne qui pousse dans les prairies semi-arides. Elle est utilisée traditionnellement comme emménagogue au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. Elle est également connue et utilisée en Iran et en Asie centrale. Les principales β -carboline présentes dans un extrait de rue de Syrie sont l'harmine, l'harmaline, l'harmane et l'harmalol.⁸⁸ D'autres plantes contenant des β -carboline sont utilisées par des tribus amazoniennes pour leurs propriétés hallucinogènes : il s'agit notamment de différentes espèces des genres *Banisteriopsis*, *Tetrapteris* (Malpighiaceae), *Virola*, (Myristicaceae) et *Anadenanthera* (Leguminosae). Vraisemblablement, l'harmine et l'harmaline sont responsables des effets hallucinogènes de "l'ayahuasca", une boisson utilisée à des fins religieuses au Brésil.⁸⁹ En Chine, la rue de Syrie est utilisée en pharmacopée traditionnelle pour traiter les cancers du système digestif et le paludisme.⁸⁷

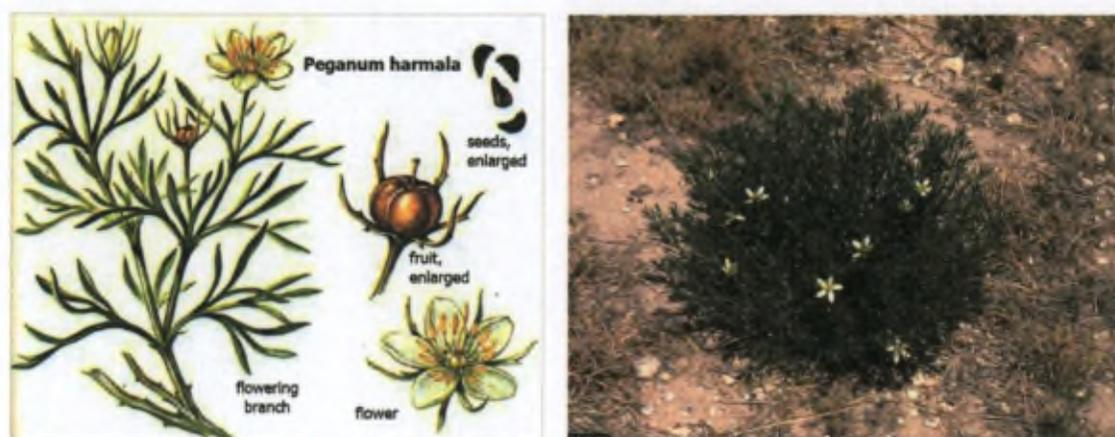


Figure 1.16 – *Peganum harmala*⁹⁰

De nombreux dérivés de β -carboline simples ou complexes ont été isolés et caractérisés à partir de divers invertébrés marins, tels que les hydrozoas (*Aglaophenia*), les bryozoaires (*Cribricellina*, *Catenicella*), les coraux mous (*Lignopsis*), les tuniciers (*Eudistoma*, *Didemnum*,

⁸⁷ Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 479-500.

⁸⁸ Moloudizargari, M.; Mikaili, P.; Aghajanshakeri, S.; Asghari, M. H.; Shayegh, J. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *7*, 199-212.

⁸⁹ Pfau, W.; Skog, K. *J. Chromatogr. B* **2004**, *802*, 115-126.

⁹⁰ a) http://www.drugs-forum.com/forum/showwiki.php?title=Syrian_Rue; b) USDA, NRCS. The PLANTS Database National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. **2014**, (<http://plants.usda.gov>).

Lissoclinum, Ritterella, Pseudodistoma) et diverses éponges. Les ascidies marines, appartenant au genre Eudistoma (famille Polycitoridae), sont une autre source de nombreux alcaloïdes β -carboliniques biologiquement actifs comme par exemple les eudistomines A-V, les eudistalbines A et B et l'isoeudistomine U.⁸⁷

Au cours des deux dernières décennies, il a été démontré que divers dérivés de β -carbolines et de tétrahydro- β -carbolines sont largement présents dans les aliments comme le cacao et le chocolat,⁹¹ différents types de sauces (soja, Worcestershire),⁹² le vin,⁹³ les fruits⁹⁴ et les jus de fruits,⁹⁵ en concentrations variables mais appréciables.

Il est probable que l'ingestion de ces composés pourrait être en partie responsable de leur présence dans les fluides physiologiques, les tissus et les organes de divers mammifères, mais leur synthèse endogène, via des voies de biosynthèse, est également envisageable.⁸⁷

1.2.2 Propriétés biologiques

Les dérivés de β -carbolines et de tétrahydro- β -carbolines ont des propriétés antivirales, antitumorales et antiparasitaires, mais ils agissent aussi sur le système nerveux central car ils présentent une certaine affinité pour les récepteurs des neurotransmetteurs.⁸⁷

Une partie des effets cytotoxiques de ces composés peut être attribuée à leur capacité à s'insérer entre les bases de l'ADN, inhibant ainsi la réplication, la transcription et le processus de réparation de l'ADN. La présence de groupes alkyle courts sur la position 9 de l'harmine augmente sa capacité d'intercalation de façon significative, tandis qu'un substituant benzyle sur cette position est défavorable à l'interaction avec l'ADN (Figure 1.17).⁹⁶ Cette interaction est plus forte pour les dérivés aromatiques, les dérivés de dihydro- β -carboline comme l'harmaline étant moins aptes à s'insérer entre les bases aromatiques de l'ADN.⁸⁷

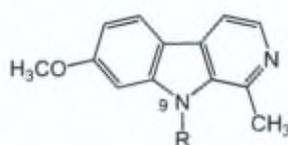


Figure 1.17 – Dérivés de l'harmine qui agissent comme des agents intercalants de l'ADN ou comme inhibiteurs de la topoisomérase de type I⁹⁶

⁹¹ Herraiz, T. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4900-4904.

⁹² Gutsche, B.; Herderich, M. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1998**, *360*, 836-839.

⁹³ Herraiz, T.; Huang, Z.; Ough, C. S. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 455-459.

⁹⁴ Herrainz, T. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4883-4887.

⁹⁵ Herrainz, T.; Galisteo, J. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7156-7161.

⁹⁶ Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Ma, Y.; Liu, X.; Hou, X.; Guan, H.; Xu, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 1557-1563.

L'harmine et ses dérivés substitués en position 9 inhibent fortement l'activité de la topoisomérase I, mais n'ont aucun effet sur la topoisomérase II. Ces enzymes permettent d'éliminer les tensions générées par la torsion de l'ADN pendant la réplication et sont la cible de nombreux produits anticancéreux. La puissance d'inhibition de la topoisomérase I peut être améliorée par l'introduction d'un substituant approprié en position 9, les groupes donneurs d'électrons étant favorables.⁹⁶

Les β -carbolines sont également des inhibiteurs connus des monoamines oxydases A et B (MAO-A et MAO-B). L'harmine et ses dérivés (harmane, harmaline et dérivés méthylés sur les atomes d'azote) sont des inhibiteurs compétitifs, réversibles et puissants pour la MAO-A (Figure 1.15). Ces produits inhibent également la MAO-B, mais avec des concentrations inhibitrices (IC₅₀) plus importantes.⁹⁷ Les MAOs catalysent la dégradation (déamination oxydante) de toute une gamme de neurotransmetteurs, y compris la 5-hydroxytryptamine (5-HT appelée également la sérotonine), l'histamine et les catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline). Les enzymes MAO-A et MAO-B présentes dans le système nerveux (central et périphérique) protègent les neurones des amines exogènes, arrêtent l'action des neurotransmetteurs et régulent la concentration des amines intracellulaires.⁹⁸ Outre leur affinité pour la MAO, les effets neurologiques des β -carbolines sont également dus aux interactions avec les récepteurs de la 5-HT et de la benzodiazépine.⁸⁷ L'étude de Cao et al.⁷¹ montre que les effets neurologiques de l'harmine peuvent être modulés par le choix judicieux des substituants.

Comme montré dans le paragraphe 1.1.5, l'harmine est un inhibiteur sélectif et puissant de la kinase DYRK1A qui, à des concentrations plus élevées, peut inhiber d'autres kinases comme par exemple les CDKs. L'harmol et d'autres dérivés de la β -carboline substitués en positions 2, 3, 4, 5 et 8 inhibent également les CDKs. Les dérivés de la 3,4-dihydro- β -carboline et les 1,2,3,4-tétrahydro- β -carbolines sont moins actifs contre ces kinases.⁹⁹

Propriétés antitumorales des dérivés de β -carboline et de THBC.

L'équipe de J. Wouters⁶⁹ a montré que des analogues de l'harmine présentent des activités inhibitrices de croissance importantes contre plusieurs lignées de cellules tumorales humaines dont deux lignées (gliome U373 et cancer de l'œsophage OE21) résistantes à la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle. Les produits les plus intéressants de cette étude sont des produits cationiques. Ils portent des substituants méthylcyclohexyle ou benzyle sur l'atome d'oxygène en position 7 et sur l'atome d'azote en position 9 et un substituant benzyle sur l'atome d'azote en position 2 (Figure 1.18).

⁹⁷ Kim, H.; Sablin, S. O.; Ramsay, R. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 137-142.

⁹⁸ Youdim, M. B. H.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295-309.

⁹⁹ Song, Y.; Wang, J.; Teng, S. F.; Kesuma, D.; Deng, Y.; Duan, J.; Wang, J. H.; Qi, R. Z.; Sim, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1129-1132.



Figure 1.18 - Dérivés cationiques de l'harmine synthétisés par l'équipe de Wouters⁶⁹

Ces composés sont actifs sur 5 lignées cellulaires tumorales (U373, T98G, Hs683, OE21 et OE23) à des concentrations IC_{50} inférieures au μM . Les auteurs montrent que la présence de substituants sur ces positions est nécessaire pour que l'activité antitumorale soit supérieure à celle de l'harmine.

Les dérivés des 1,2,3,4-tétrahydro- et 3,4-dihydro- β -carbolines, substitués en position 1, présentent également une cytotoxicité importante contre diverses lignées tumorales humaines et murines. Parmi eux, la 1-(9'-éthyl-3'-carbazole)-3,4-dihydro- β -carboline présente les activités cytotoxiques les plus efficaces contre les lignées cellulaires tumorales testées avec des concentrations IC_{50} inférieures à $0.001 \mu g/mL$ (3 nM) (Figure 1.19).¹⁰⁰

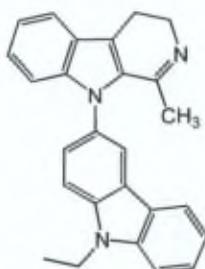


Figure 1.19 – Structure de la 1-(9'-éthyl-3'-carbazole)-3,4-dihydro- β -carboline¹⁰⁰

Une série de dérivés de la tétrahydro- β -carboline substitués en positions 1, 2 et/ou 9 a été synthétisée par Skouta et al (Figure 1.20). L'activité antitumorale de ces produits réside dans l'induction d'une mort cellulaire non-apoptotique. De plus, ces composés présentent une activité plus importante sur une lignée cellulaire exprimant une protéine Ras mutée.⁷⁰

¹⁰⁰ Shen, Y.-C.; Chen, C.-Y.; Hsieh, P.-W.; Duh, C.-Y.; Lin, Y.-M.; Ko, C.-L. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 32-36.

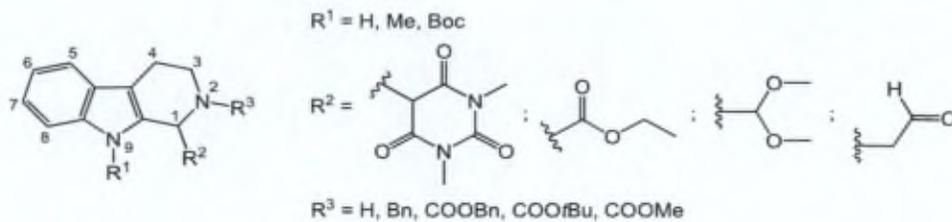


Figure 1.20 - Dérivés de la tétrahydro- β -carboline synthétisés par Skouta et al.⁷⁰

En revanche, des dérivés de la tétrahydro- β -carboline couplés à des 1,3,5-triazines induisent l'apoptose dans des cellules de cancer du sein MCF7 et MDA-MB-231 et produisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Figure 1.21).¹⁰¹

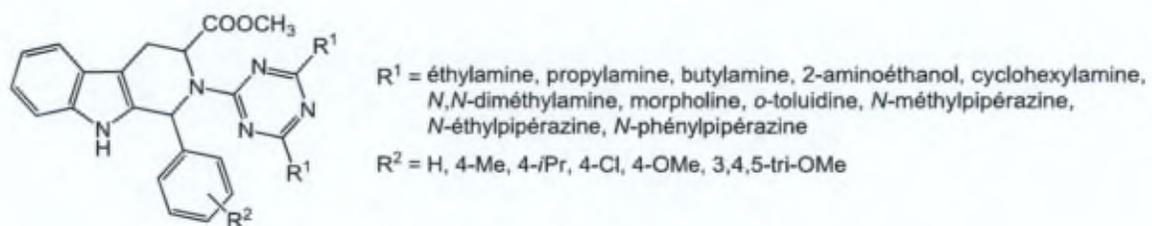


Figure 1.21 – Dérivés de la tétrahydro- β -carboline couplés à des 1,3,5-triazines¹⁰¹

Les travaux de Liu et al.¹⁰² montrent que des dérivés de THBC portant des substituants en positions 1,2,3 et sur le noyau indolique sont actifs contre plusieurs lignées de cancer et agissent comme des inhibiteurs de la KSP (kinesin spindle protein), une protéine impliquée dans la formation du fuseau de microtubules pendant la mitose (Figure 1.22).

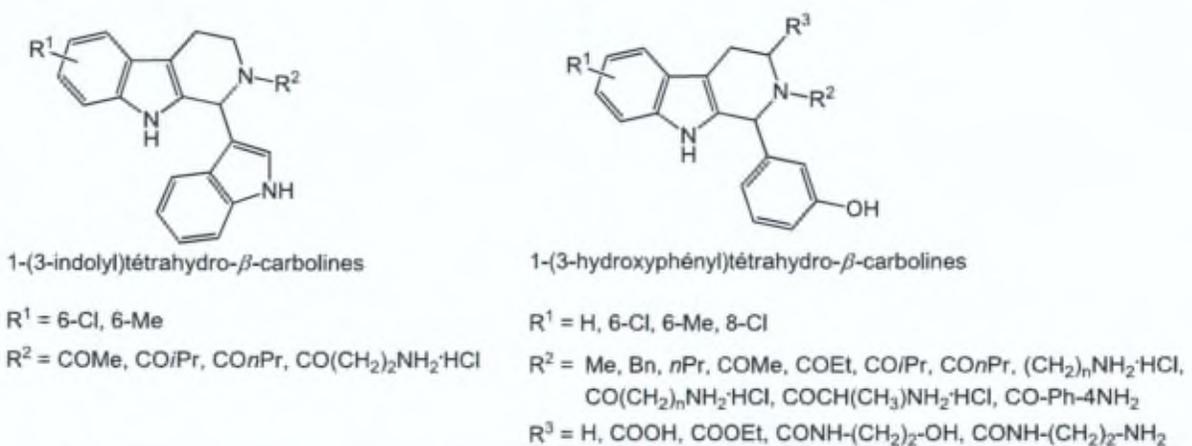


Figure 1.22 - Dérivés de THBC synthétisés par Liu et al.¹⁰²

¹⁰¹ Kumar, R.; Gupta, L.; Pal, P.; Khan, S.; Singh, N.; Katiyar, S. B.; Meena, S.; Sarkar, J.; Sinha, S.; Kanaujiya, J. K.; Lochab, S.; Trivedi, A. K.; Chauhan, P. M. S. *Eur. J. M. Chem.* **2010**, *45*, 2265-2276.

¹⁰² Liu, F.; Yu, L.-Q.; Jiang, C.; Yang, L.; Wu, W.-T.; You, Q.-D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4167-4177.

Des analyses de type structure-activité effectuées sur une série de dérivés de β -carboline développée par Cao et al.^{71a} montrent que des substituants appropriés en position 1 et 9 ont un impact important sur l'augmentation de leur activité antitumorale et la diminution de leur neurotoxicité (Figure 1.23). Ainsi, l'introduction d'un groupe benzyle en position 9 rend les dérivés plus actifs que l'harmine. De plus, les effets neurologiques ne sont plus observés chez la souris dans le cas de dérivés substitués.^{71b,c}

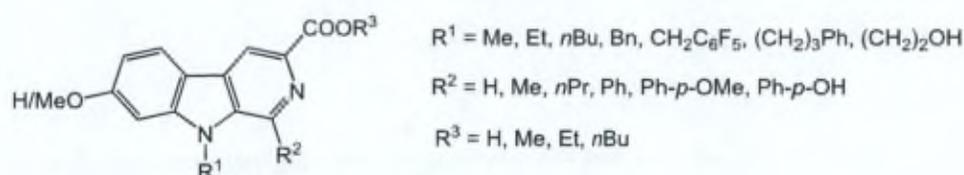


Figure 1.23 - Dérivés de la β -carboline développés par Cao et al.⁷¹

THBC tétracycliques.

Des analogues tétracycliques de la THBC peuvent également inhiber la prolifération des cellules tumorales. A titre d'exemple, l'azatoxine (Figure 1.24), qui porte un quatrième cycle fusionné en position 2,3 du squelette de la THBC, est un inhibiteur de la topoisomérase II.¹⁰³

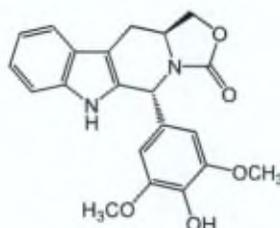


Figure 1.24 – Structure de l'azatoxine

Bertrand et ses collaborateurs¹⁰⁴ ont développé des composés tétracycliques de THBC qui portent un cycle à cinq fusionné en position 1,2 du squelette de la THBC (Figure 1.25). Les produits les plus actifs de l'étude sont ceux qui portent des groupes hydrophobes sur la partie indole de la molécule et des groupes méthylamine sur le cycle à cinq.

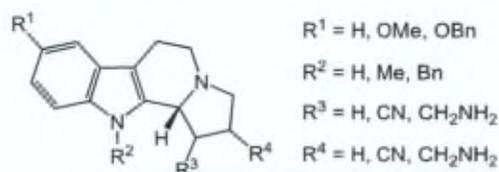


Figure 1.25 - Dérivés de THBC tétracycliques développés par Bertrand et al.¹⁰⁴

¹⁰³ Letreute, F.; Madalengoitia, J.; Orr, A.; Cuzi, T. J.; Lehnert, E.; Macdonald, T.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4478-4483.

¹⁰⁴ Bertrand, M.; Poissonnet, G.; Théret-Bettioli, M.-H.; Gaspard, C.; Werner, G. H.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Léonce, S.; Dodd, R. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2155-2164.

Une publication récente montre que des dérivés de la THBC fusionnés a un cycle bis(alkoxyméthyl)pyrrole (Figure 1.26) sont des agents antitumoraux puissants *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs suggèrent que ces produits tétracycliques possèdent plusieurs modes d'action. Ainsi la partie THBC est responsable de l'inhibition de la topoisomérase tandis que la partie bis(alkoxyméthyl)pyrrole interagit avec l'ADN. Certains produits développés dans cette étude sont plus actifs que l'inhibiteur de la topoisomérase I, l'irinotecan, sur des modèles de xénogreffes de cancer colorectal HT-29 humain greffé chez la souris immunodéficente.¹⁰⁵

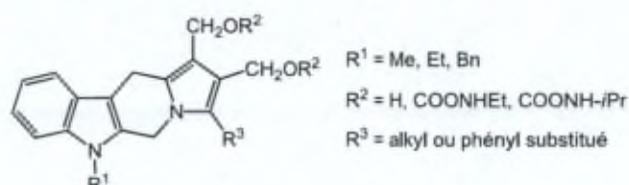


Figure 1.26 – Dérivés de THBC fusionnés a un cycle bis(alkoxyméthyl)pyrrole¹⁰⁵

Les invertébrés marins sont une source connue de molécules anticancéreuses comme par exemple les THBC et les β -carboline de la famille des eudistomines.⁸⁷ L'eudistomine K est un autre exemple de THBC tétracycliques présentant une activité cytotoxique (Figure 1.27). *In vitro*, elle diminue la prolifération de la lignée de leucémie murine P-338 à une concentration inhibitrice de croissance IC_{50} de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (0,3 μM). L'activité antitumorale *in vivo* et antivirale de l'eudistomine K contre les virus de l'herpès et le poliovirus a été également décrite.¹⁰⁶ D'autres eudistomines comme par exemple les eudistomines B, C et D ont une cytotoxicité élevée sur la lignée de leucémie murine L1210 (IC_{50} 3,4, 0,36 et 2,4 $\mu\text{g/ml}$) et sur la lignée de lymphome murin L5178Y (IC_{50} 3,1, 0,42 et 1,8 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 1.27).¹⁰⁷

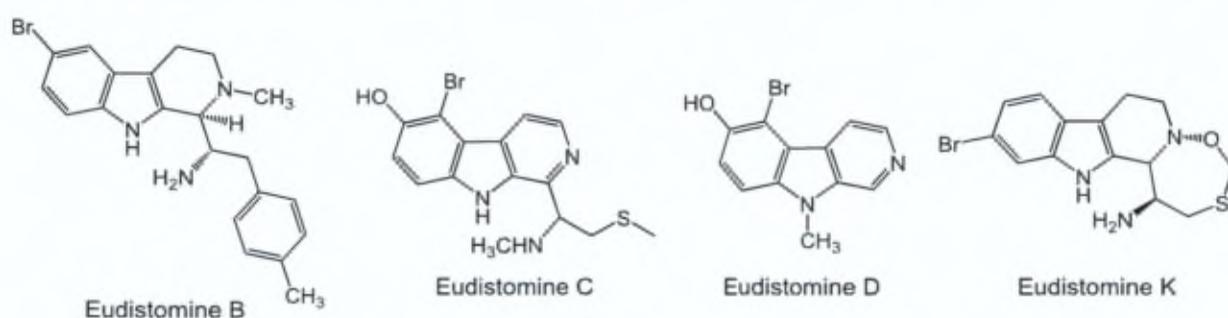


Figure 1.27 – Quelques exemples d'eudistomines

¹⁰⁵ Chaniyara, R.; Tala, S.; Chen, C.-W.; Zang, X.; Kakadiya, R.; Lin, L.-F.; Chen, C.-H.; Chien, S.-I.; Chou, T.-C.; Tsai, T.-H.; Lee, T.-C.; Shah, A.; Su, T.-L. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1544-1563.

¹⁰⁶ Lake, R.; Blunt, J.; Munro, M. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 1201-1206.

¹⁰⁷ Kobayashi, J.; Cheng, J. F.; Ohta, T.; Nozoe, S.; Ohizumi, Y.; Sasaki, T. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3666-3670.

Aux vues des nombreuses études qui montrent leur activité contre des lignées tumorales, leur activité antikinase et leur capacité d'interagir avec l'ADN, les dérivés de β -carboline et de THBC ont un potentiel considérable pour être utilisés comme des « leads » dans le développement des médicaments anticancéreux. En outre, les dérivés tétracycliques semblent vraisemblablement être des agents anticancéreux prometteurs.

Activité fongicide et antivirale.

L'harmine, l'harmane, l'harmalane, le tétrahydroharmane et la tétrahydroharmine possèdent une bonne activité contre le virus TMV (tobacco mosaic virus) *in vitro* (Figure 1.15). Les activités des composés di- ou tétra-hydrogénés sont plus élevées que celles des composés contenant un noyau pyridine.¹⁰⁸

Ces composés présentent également de bonnes activités fongicides contre 14 sortes de champignons des plantes. Dans ce cas-ci, la relation structure-activité s'inverse, les dérivés aromatiques étant plus actifs que les DHBC ou les THBC. Tout comme dans le cas du cancer, le type de substituants ainsi que leurs positions respectives sur le squelette β -carboline influencent de manière significative l'activité.¹⁰⁸

1.2.3 Méthodes de synthèse des dérivés de tétrahydro- β -carbolines

1.2.3.1 La réaction de Pictet-Spengler

La méthode la plus connue pour synthétiser des dérivés de β -carboline est la réaction de Pictet-Spengler.¹⁰⁹ Cette réaction a été découverte en 1911 par Amè Pictet et Theodor Spengler¹¹⁰ quand ils ont observé qu'en chauffant la β -phényléthylamine avec le diméthoxyméthane en présence d'HCl, la 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine (THIQ) se forme suite à une réaction de cycloaddition (Schéma 1.1).

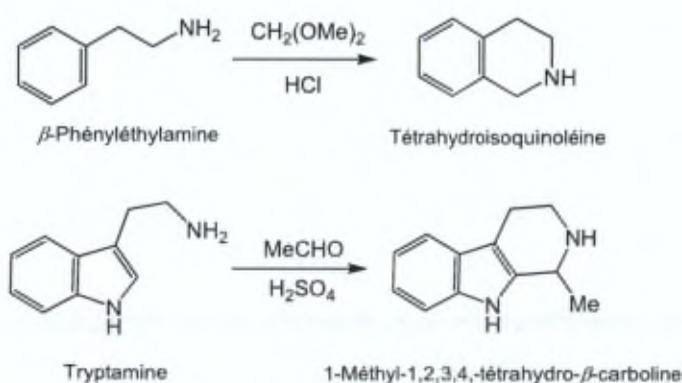


Schéma 1.1 - Les premières réactions de Pictet-Spengler¹⁰⁹

¹⁰⁸ Song, H.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Wang, Q. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1010-1018.

¹⁰⁹ Stöckigt, J.; Antonchick, A. P.; Wu, F.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538-8564.

¹¹⁰ Pictet, A.; Spengler, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 2030-2036.

20 ans après, Tatsui a remplacé la β -phényléthylamine par la tryptamine, et réussit ainsi la première synthèse du noyau 1,2,3,4-tétrahydro- β -carboline.¹¹¹

A partir de la tryptamine, la condensation de Pictet-Spengler est initialisée par la formation d'un ion iminium suivie de l'attaque nucléophile de l'indole et enfin d'une cyclisation (Schéma 1.2). L'attaque sur l'ion iminium peut se produire soit directement en position 2, soit en position 3 de l'indole pour former une spiroindolénine. La preuve du passage par l'intermédiaire spirocyclique a été obtenue par marquage isotopique.¹¹² Cependant, il est encore difficile de savoir si, d'une manière générale, l'ion carbonium est formé par un réarrangement de la spiroindolénine ou par l'attaque directe de la position 2 de l'indole.

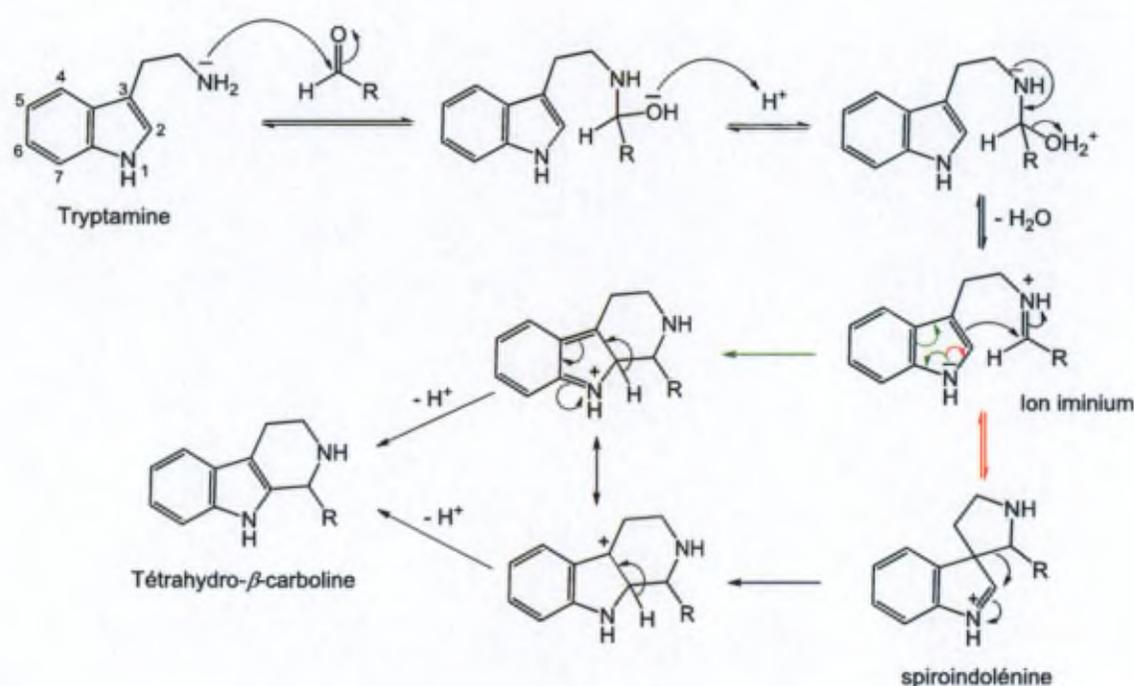


Schéma 1.2 – Mécanisme de la réaction de Pictet-Spengler

L'intérêt pour la synthèse énantiosélective de dérivés de THBC et de THIQ a augmenté pendant ces deux dernières décennies et des progrès remarquables ont été enregistrés dans le développement de méthodes efficaces et hautement énantiosélectives.

Ce travail a été en partie consacré à la synthèse asymétrique de dérivés de THBC et l'état de l'art dans ce domaine sera détaillé dans le chapitre III.

Certaines plantes disposent d'enzymes qui effectuent la synthèse asymétrique de dérivés de THBC. Ces enzymes font partie de la famille des Pictet-Spenglerases. La première enzyme de ce type identifiée est la strictosidine synthétase (STR). La STR catalyse la condensation

¹¹¹ Tatsui, G. *J. J. Pharm. Soc. Jpn.* **1928**, 48, 92 [*Chem. Abs.* **1928**, 22, 3415]

¹¹² Bailey, P. D. *J. Chem. Res. Syn.* **1987**, 6, 202-203.

diastéréosélective de la tryptamine avec la sécologanine pour donner la (*S*)-strictosidine (Schéma 1.3).¹⁰⁹

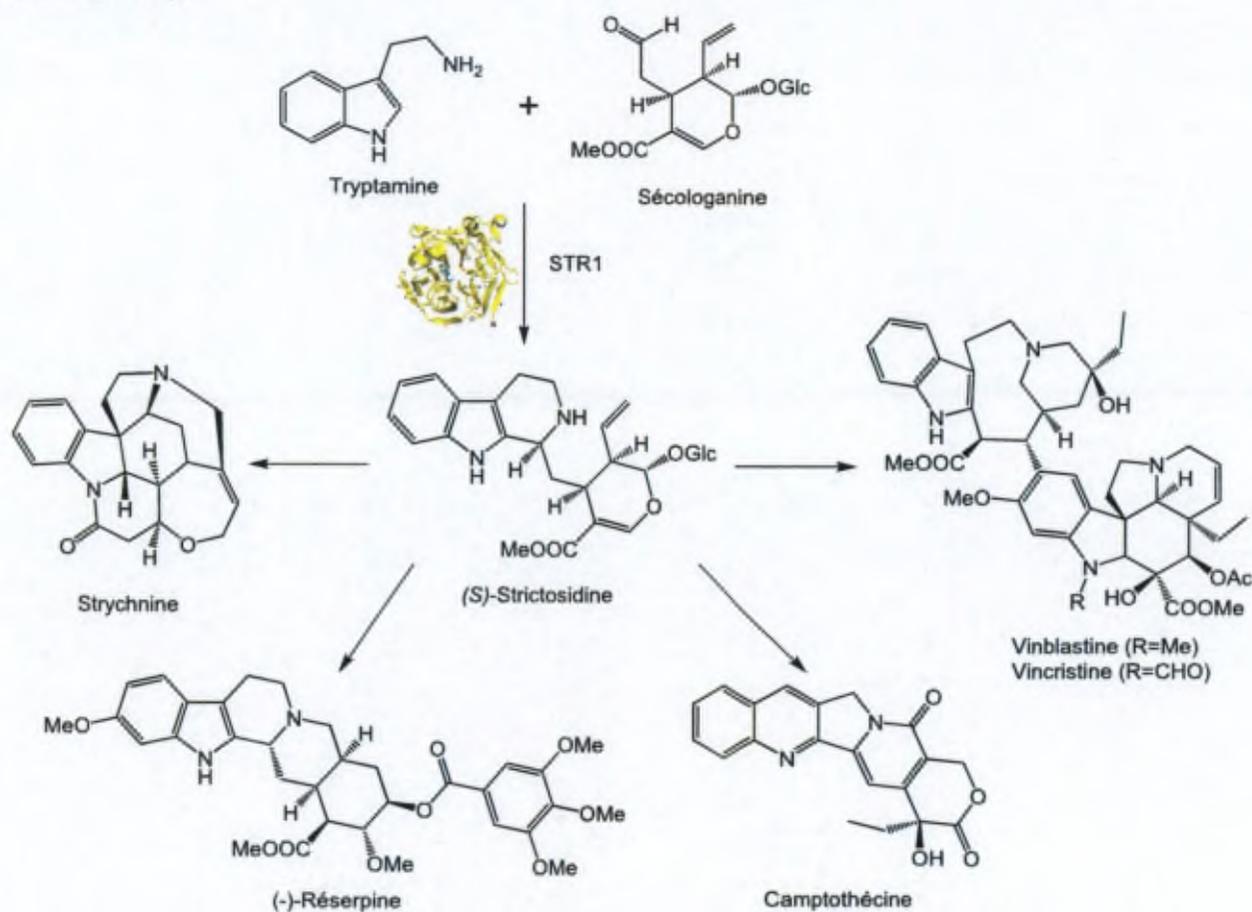


Schéma 1.3 – Biosynthèse des dérivés de la THBC et de la THIQ catalysée par la strictosidine synthétase¹⁰⁹

La strictosidine est un précurseur important pour de nombreux alcaloïdes présentant une activité antitumorale comme la camptothécine et les alcaloïdes dérivés de la pervenche (vincristine, vinblastine) mais également pour d'autres molécules qui présentent un intérêt pharmacologique comme la strychnine et la réserpine.¹⁰⁹

Quelques exemples d'applications de la réaction de Pictet-Spengler.

Parmi les nombreux exemples de la réaction de Pictet-Spengler trouvés dans la littérature, nous pouvons citer des synthèses de dérivés de l'harmine ou de la tétrahydro-β-carboline ayant une activité antitumorale.^{70,71a,99,100,101,102,103,105,107} Ces composés sont obtenus en général par la condensation de la tryptamine, du tryptophane ou d'esters de tryptophane avec divers aldéhydes pour donner des dérivés de la THBC. Pour obtenir le squelette de type harmine, la THBC peut être oxydée à l'aide du $K_2Cr_2O_7$, $S/Xylène$ ou SeO_2 . Ensuite, les atomes d'azote peuvent être alkylés avec divers substituants pour créer des bibliothèques de composés.

Singh a utilisé la réaction de Pictet-Spengler suivie d'une réaction de Baylis-Hillman pour obtenir des squelettes de type canthine, possédant des propriétés antitumorales et

antipaludiques. La première étape de la synthèse consiste en la condensation de la tryptamine ou du tryptophane méthylester avec le diméthoxyglyoxal pour donner le squelette tétrahydro- β -carboline (Schéma 1.4). Ensuite, l'oxydation par KMnO_4 mène à un dérivé aromatique de type β -carboline. L'aldéhyde est déprotégé en milieu acide et est ensuite mis en réaction avec divers acrylates pour donner accès à des squelettes de type canthine via la réaction de Baylis-Hillman. En fonction du temps de réaction et de la nature du groupe électroattracteur, le rapport entre l'adduit Baylis-Hillman et la canthine peut varier.¹¹³

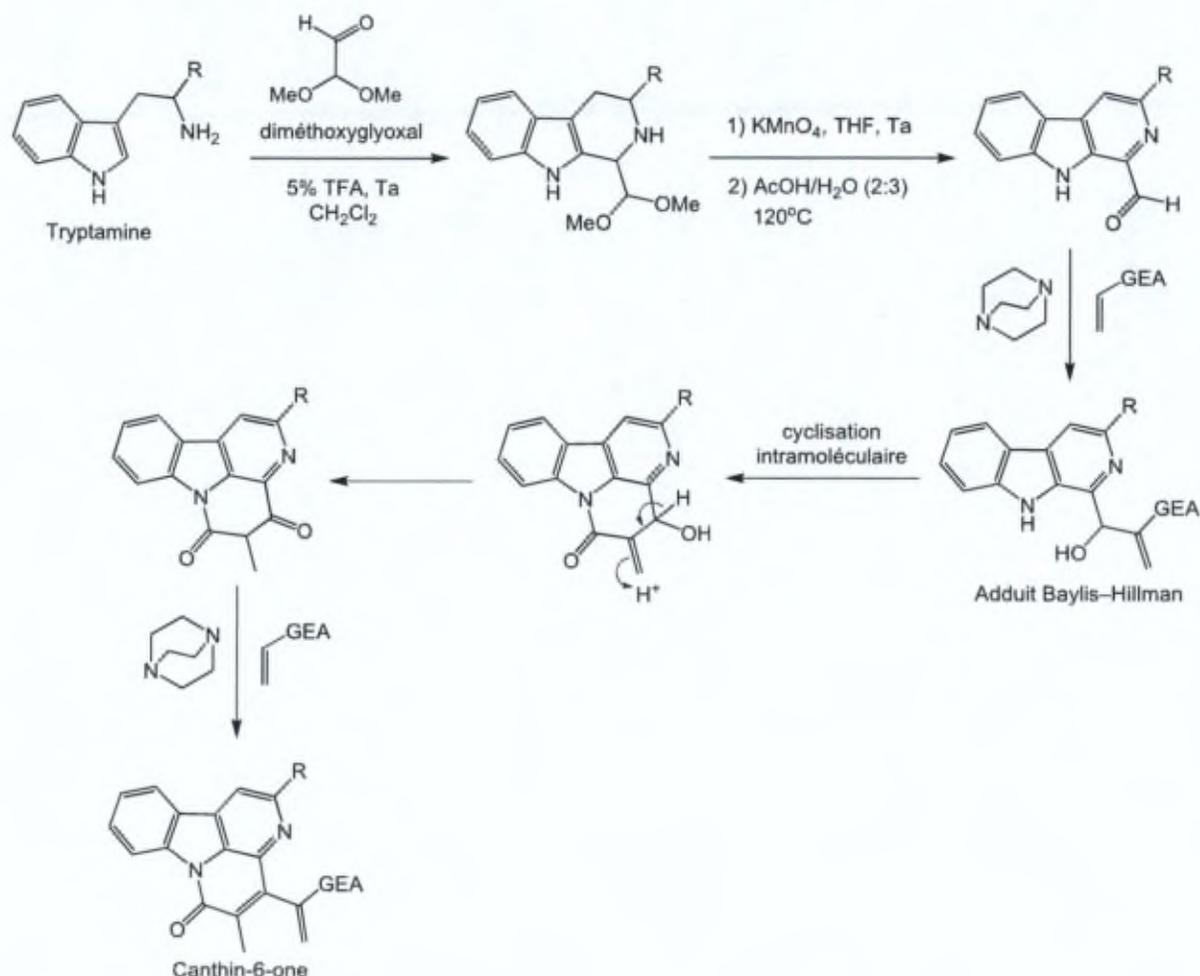


Schéma 1.4 – Synthèse de squelettes de type canthine en utilisant la réaction de Pictet-Spengler. GEA = groupe électroattracteur¹¹³

L'équipe de Takayama a utilisé la réaction de type Pictet-Spengler pour la synthèse totale de l'eudistomine B afin de confirmer sa structure. L'intermédiaire obtenu à partir de la 5-bromotryptamine et d'un diol chiral protégé, subit une réaction de Pictet-Spengler pour donner un composé tétracyclique (Schéma 1.5). L'eudistomine B est obtenue suite à une série de réactions qui modifient le groupe carbamate en groupe amine, en passant par une inversion de la stéréochimie. L'étape de cyclisation a lieu avec une bonne diastéréosélectivité (rapport

¹¹³ Singh, V.; Hutait, S.; Batra, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 6211-6216.

des diastéréoisomères ($rd = 4 : 1$), due à l'intermédiaire *N*-acyliminium, dans lequel le noyau indole attaque du côté le moins encombré (anti par rapport au groupe benzyle).¹¹⁴

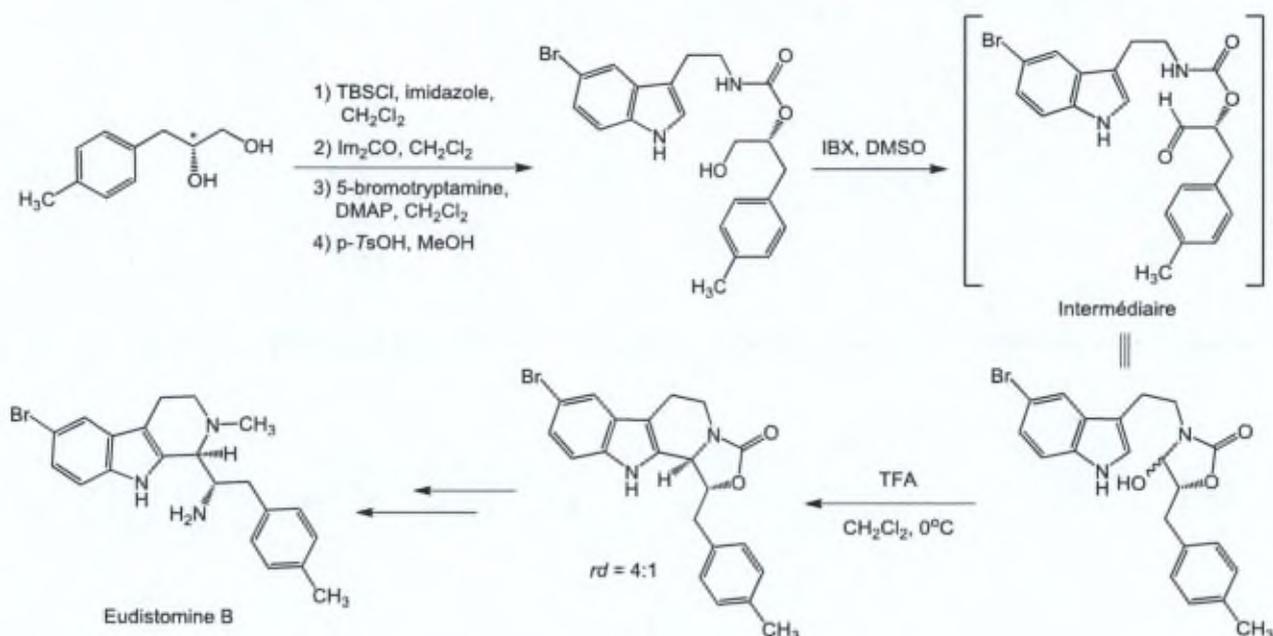


Schéma 1.5 – La synthèse de l'eudistomine B¹¹⁴

La réaction de Pictet-Spengler est aussi l'étape clé pour synthétiser des molécules dérivées du THBC-bis(hydroxyméthyl)pyrrole développées par Su et son équipe (Schéma 1.6).¹⁰⁵ Ces molécules possèdent une activité anticancéreuse très intéressante *in vitro* et *in vivo*. Le tryptophane ou le tryptophane méthylester est condensé avec le formaldéhyde pour aboutir au squelette de la THBC. Ensuite, le cycle bis(hydroxyméthyl)pyrrole est introduit via une réaction d'addition 1,3-dipolaire avec le diméthylacétylènedicarboxylate et l'anhydride acétique.

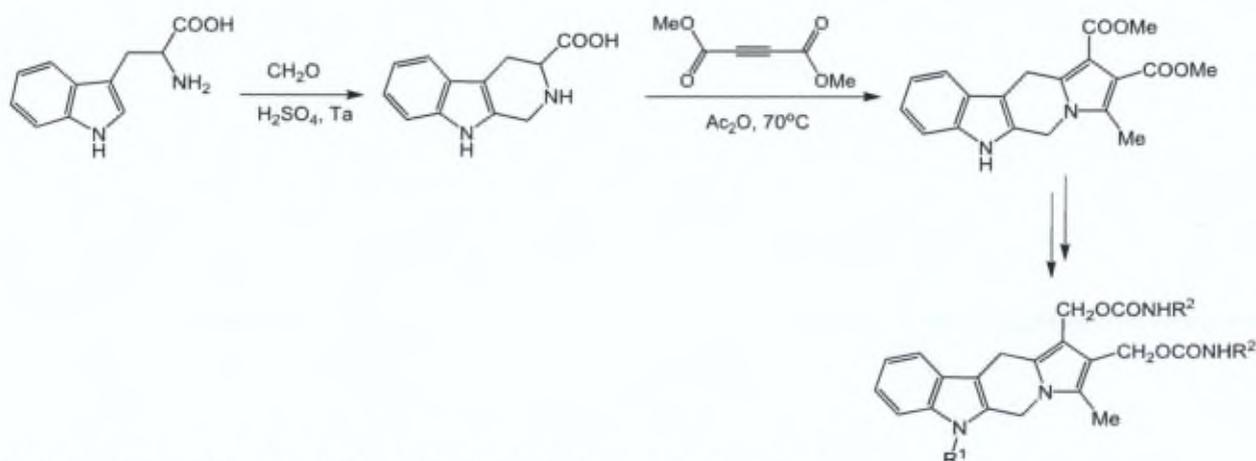


Schéma 1.6 – Synthèse des dérivés du THBC-bis(hydroxyméthyl)pyrrole¹⁰⁵

¹¹⁴ Ito, T.; Kitajima, M.; Takayama, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4506-4508.

Mis à part les substrats de type tryptophane ou dopamine et leurs dérivés, la réaction de Pictet-Spengler s'applique également sur des dérivés de l'histamine pour donner accès à des dérivés de type tétrahydroimidazopyridine. Dans ce cas-ci, la réaction est effectuée via une catalyse basique (Schéma 1.7).^{115,116}

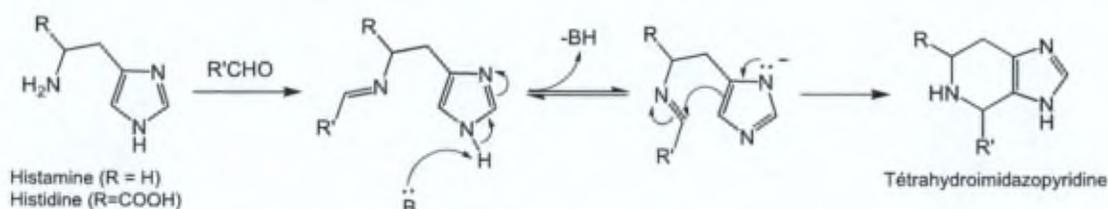


Schéma 1.7 – Mécanisme de la réaction de Pictet-Spengler en catalyse basique

Kundu et al. ont montré que les amines aromatiques liées à des imidazoles peuvent également être utilisées comme substrats pour la réaction de Pictet-Spengler pour donner des composés tétracycliques de type triazabenzénoazulène (Schéma 1.8).¹¹⁵

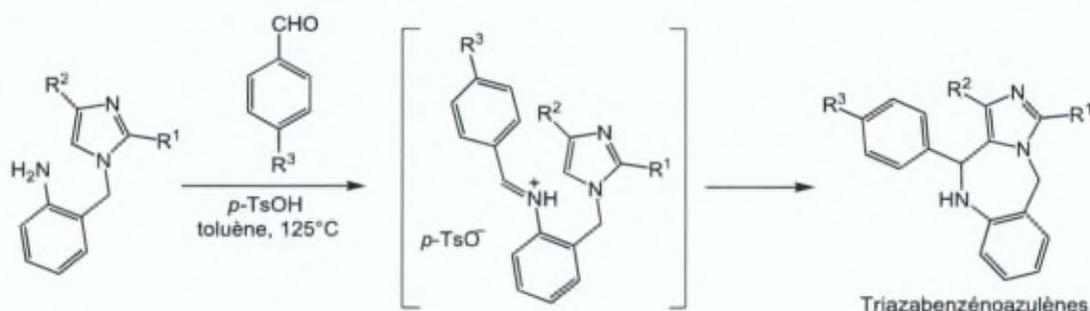
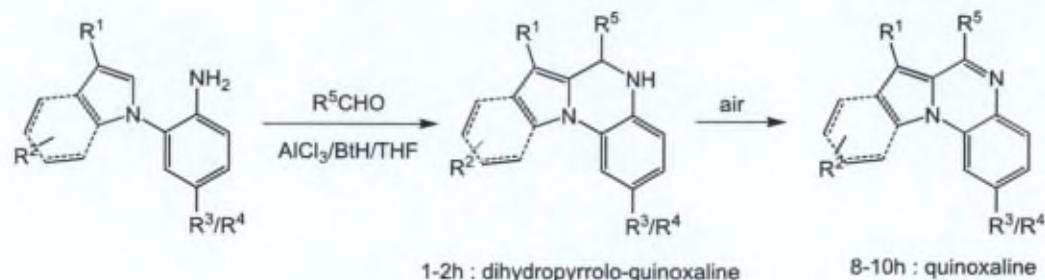


Schéma 1.8 – Synthèse des triazabenzénoazulènes via la réaction de Pictet-Spengler¹¹⁵

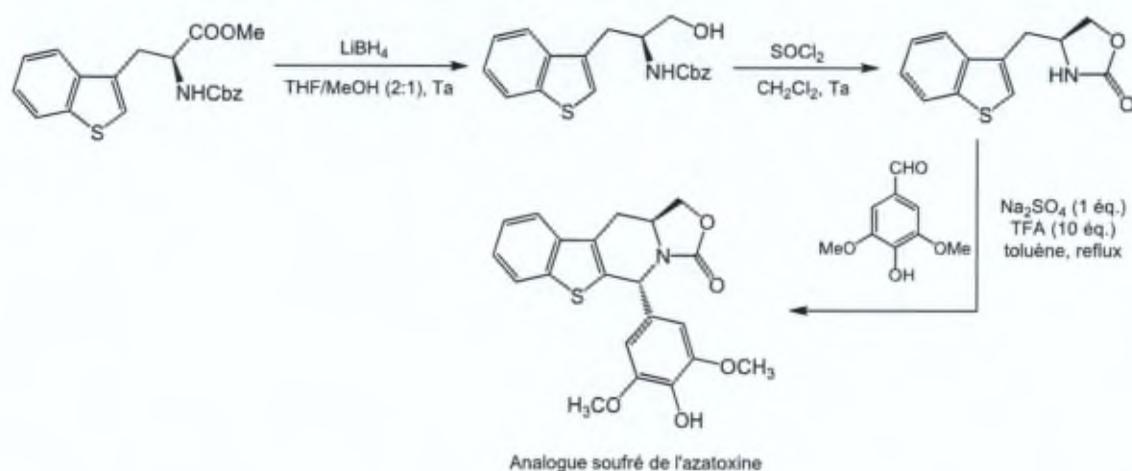
Les acides de Lewis peuvent également être utilisés pour catalyser la réaction de Pictet-Spengler. Une étude récente de l'équipe de Chandra utilise des arylamines et des aldéhydes aromatiques pour arriver à des structures de type quinoxaline (Schéma 1.9).¹¹⁶

¹¹⁵ Kundu, B.; Sawant, D.; Partani, P.; Kesarwani, A. P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4889-4892.

¹¹⁶ Verma, A. K.; Jha, R. R.; Sankar, V. K.; Aggarwal, T.; Singh, R. P.; Chandra, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6998-7010.

Schéma 1.9 – La réaction de Pictet-Spengler catalysée par des acides de Lewis¹¹⁶

Les benzothiéo[2,3-c]pyridines sont des analogues des β -carboline ayant parfois des activités biologiques plus intéressantes. Ces composés sont plus lipophiles que les β -carboline mais interagissent moins avec les constituants de la cellule car ils possèdent un donneur de lien H en moins.¹¹⁷ Récemment, la réaction de Pictet-Spengler a été utilisée pour synthétiser un analogue soufré de l'azatoxine (Schéma 1.10).¹¹⁸ A notre connaissance, aucune étude biologique de ce produit n'a encore été effectuée.

Schéma 1.10 – Synthèse d'un dérivé soufré de l'azatoxine via la réaction de Pictet-Spengler¹¹⁸

1.2.3.2 La réaction de Bischler-Napieralski

Une autre réaction utilisée pour la synthèse de dérivés de la THBC est la réaction de Bischler-Napieralski.¹¹⁹ Cette réaction s'effectue à partir d'un β -aryléthylamide en présence

¹¹⁷ Tolkunov, V. S.; Eresko, A. B.; Mazepa, A. V.; Tolkunov, S. V. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2011**, *47*, 1170-1175.

¹¹⁸ Gracia, S.; Marion, C.; Rey, J.; Popowycz, F.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3165-3168.

¹¹⁹ Bischler, A.; Napieralski, B. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 1903-1908.

d'un agent déshydratant et permet la synthèse de motifs 3,4-dihydro- β -carboline et 3,4-dihydroisoquinoléine (Schéma 1.11).¹²⁰

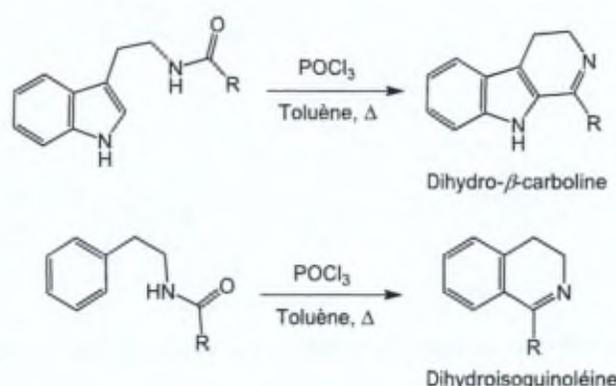


Schéma 1.11 - La réaction de Bischler-Napieralski

Le mécanisme de la réaction est basé sur la formation de l'ion iminium lors de la première étape, suivie par une cyclisation via une substitution électrophile aromatique (Schéma 1.12).

121

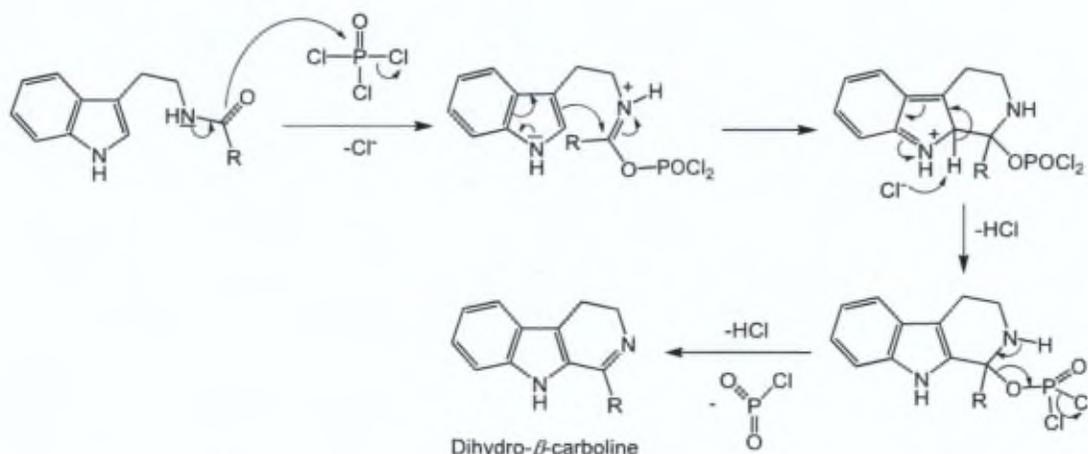


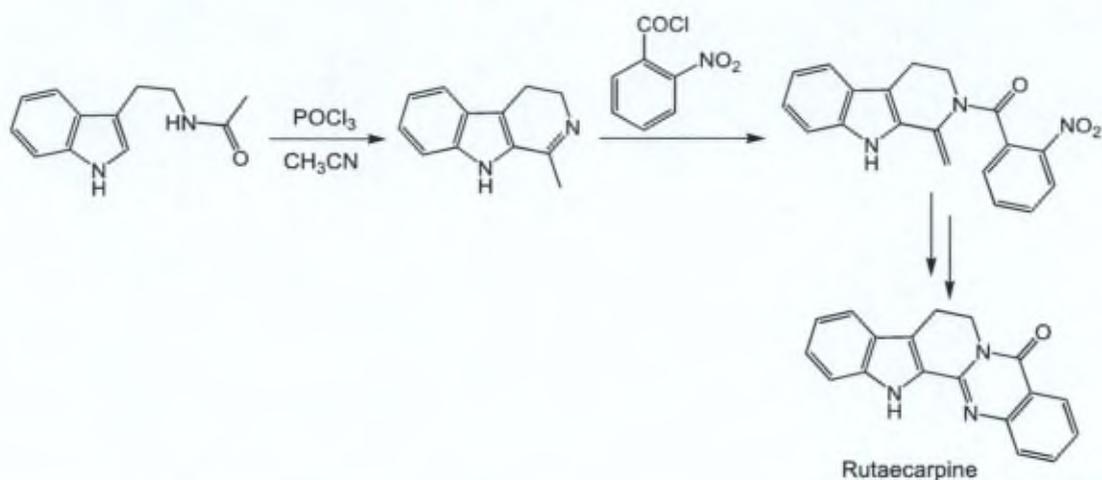
Schéma 1.12 – Mécanisme de la réaction de Bischler-Napieralski

A titre d'exemple, la réaction de Bischler-Napieralski a été utilisée comme étape clé pour la synthèse de la rutaecarpine (Schéma 1.13),¹²² un alcaloïde présentant des propriétés antiémétiques, antinociceptives, anti-inflammatoires, analgésiques et anti-hypertensives.

¹²⁰ Whaley, W. M.; Govindachari, T. R. *The Preparation of 3,4-Dihydroisoquinolines and Related Compounds by the Bischler-Napieralski Reaction*. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc., 2004, 74-150.

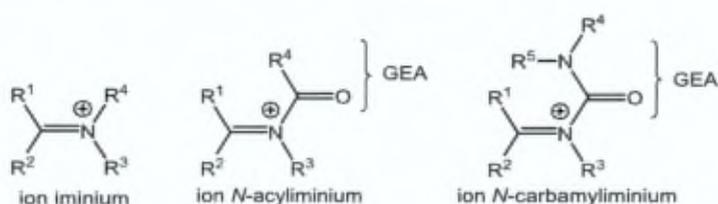
¹²¹ Fodor, G.; Nagubandi, S. *Tetrahedron* 1980, 36, 1279-1300.

¹²² Lee, C.-S.; Liu, C.-K.; Chiang, Y.-L.; Cheng, Y.-Y. *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 481-484.

Schéma 1.13 – Synthèse de la rutaecarpine via la réaction de Bischler-Napieralsky¹²²

1.2.3.3 Généralités sur les ions *N*-acyliminium et *N*-carbamylium

Les ions alkylium (ou simplement iminium) sont des précurseurs cationiques très utilisés pour la formation de liaisons carbone-carbone. Les ions *N*-acylium sont également des intermédiaires très utilisés en synthèse organique. Plusieurs revues¹²³ exhaustives ont été publiées sur ce sujet et les propriétés de ces intermédiaires ne seront que brièvement discutées dans ce paragraphe. Grâce au caractère électroattracteur du groupe carbonyle présent sur l'atome d'azote, les ions *N*-acylium sont beaucoup plus réactifs en tant qu'électrophiles que les ions iminium (Figure 1.28). Le groupe électroattracteur (GEA) peut-être un acyle, un ester, un amide ou un sulfonyle.

Figure 1.28 – Structure des ions iminium, *N*-acylium et *N*-carbamylium

Les ions *N*-acylium portant des groupes acyle esters ont une réactivité proche mais, dans certains cas, des différences notables de la stéréochimie de la réaction sont observées. Dans le cas où le groupe électroattracteur est un amide, on parle d'ions *N*-carbamylium qui sont beaucoup moins courants. Dans le cadre de notre projet, une méthode de synthèse

¹²³ a) Speckamp, W. N.; Moolenaar, M. J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3817-3856 ; b) Maryanoff, B. E.; Zhang, H.-C.; Cohen, J. H.; Turchi, I. J.; Maryanoff, C. A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1431-1628 ; c) Yazici, A.; Pyne, S. *Synthesis* **2009**, *2009*, 339-368 ; d) Yazici, A.; Pyne, S. *Synthesis* **2009**, *2009*, 513-541.

impliquant un ion *N*-carbamylium a été développée. En fonction des groupes R^{1-3} , les ions *N*-acylium et *N*-carbamylium peuvent être cycliques ou linéaires.

En général, du fait de leur haute réactivité, les ions *N*-acylium sont générés *in situ* à partir des *N*-acylamine stables par traitement avec un acide de Lewis ou un acide protique (Schéma 1.14).^{123c}

L'attaque d'un nucléophile sur un ion *N*-acylium est l'étape clé de la réaction d' α -amidoalkylation (Schéma 1.14) qui est une version de la réaction de Mannich. Cette attaque peut se faire de manière inter- et intra-moléculaire.^{123c} Les ions *N*-acylium sont des précurseurs importants dans la synthèse d'alcaloïdes.^{123a}

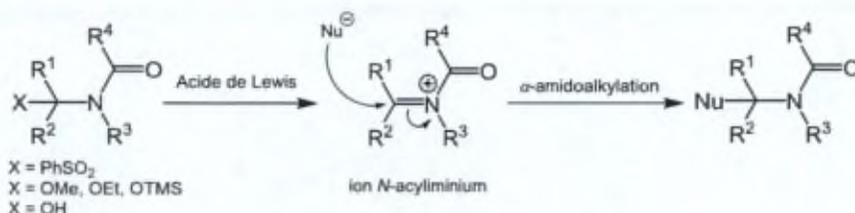


Schéma 1.14 – Génération d'ion *N*-acylium et réaction d' α -amidoalkylation

1.2.3.4 Notre méthodologie de synthèse « one-pot »

Les exemples de synthèses décrites précédemment permettent la préparation d'une large gamme de composés de type tétrahydro- β -carboline (THBC), tétrahydroisoquinoléine (THIQ) et tétrahydrobenzothiényridine (THBTP).

Une méthode « one-pot » très efficace, donnant accès aux squelettes de type THBC et THIQ contenant un cycle imidazolidin-2-one fusionné, a été développée au sein du Laboratoire de Chimie Organique (ULB) (Schéma 1.15).¹²⁴ Cependant seuls quelques exemples de THBC et THIQ avaient été décrits. Cette méthodologie se base sur une réaction « domino » de type Staudinger aza-Wittig à partir d'un azoture portant en position α un groupement aldéhyde protégé sous forme d'acétal. L'isocyanate ainsi généré n'est pas isolé, il est mis directement en réaction avec différents dérivés de la tryptamine ou d'éthylamines aromatiques pour donner des intermédiaires urée. Finalement, la déprotection de l'aldéhyde en milieu acide est suivie par la formation d'un intermédiaire *N*-carbamylium, qui se cyclise spontanément et forme un cycle tétrahydropyridine via une réaction de type Pictet-Spengler.

Au cours de ce projet de thèse, nous avons principalement visé la synthèse de dérivés de type THBCI, car ces composés sont beaucoup moins exploités que leur analogues THBC ou β -carbolines dans le cadre des traitements contre le cancer. Néanmoins, les composés auxquels nous nous sommes intéressés sont apparentés aux dérivés de la THBC et pourraient conserver les propriétés antitumorales de ces derniers. De plus, des dérivés de la THBC portant des cycles

¹²⁴ Mémoire réalisé par Sébastien Soriano ; Laboratoire de Chimie Organique, 2010

supplémentaires accolés ont prouvé leur efficacité contre le cancer *in vitro* et *in vivo*, comme mentionné précédemment.^{103,104,105,106,107}

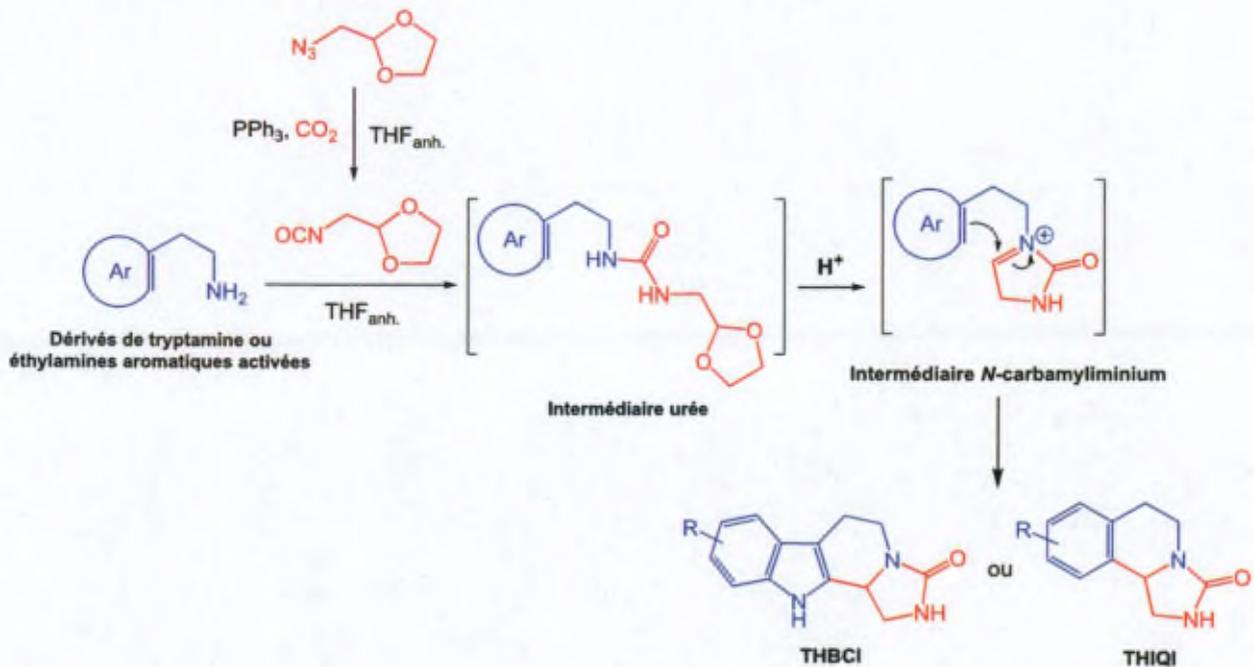


Schéma 1.15 - Schéma général de la méthodologie « one-pot »

Dans le cadre de ce travail, il a été montré que la méthodologie peut être étendue à la synthèse des dérivés possédant le squelette tétrahydro-β-carboline fusionné à un cycle tétrahydropyrimidin-2-one (THBCP), des dérivés de la tétrahydrothiénylopyridine (THBTPI) et des dérivés de la tétrahydrobenzothiénylopyridine (THBTPI). Ces squelettes sont illustrés sur la Figure 1.29. Les lettres I et P supplémentaires dans la dénomination indiquent le cycle Imidazolidin-2-one ou tétrahydroPyrimidin-2-one fusionné.

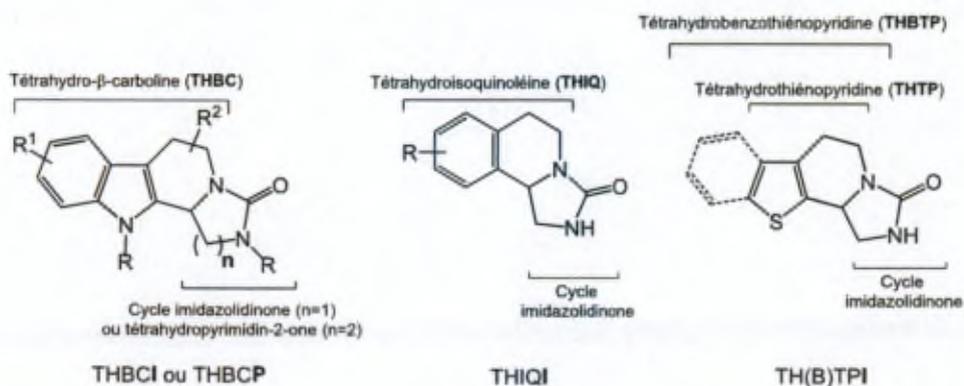


Figure 1.29 – Les types de composés synthétisés au cours de ce travail

Il faut souligner que dans la réaction de type Pictet-Spengler, l'intermédiaire de type *N*-carbamylium est relativement original. Par ailleurs, seuls quelques exemples de dérivés de THBC portant un cycle imidazolidin-2-one ou tétrahydropyrimidin-2-one supplémentaire ont été décrits dans la littérature, et seront détaillés par la suite, mais leurs propriétés biologiques n'ont toujours pas été décrites.

1.2.3.5 Autres méthodes de synthèse des composés tétracycliques de type THBCI, THBCP, TH(B)TPI et THIQI

L'exemple le plus proche de notre méthodologie pour accéder à des dérivés de THBCI ou THBCP tétracycliques, est la voie de synthèse développée par Meldal et ses collaborateurs.¹²⁵ Il s'agit d'un procédé en phase solide dont le substrat de départ est un dipeptide Trp-Gly ou Trp-Ala greffé sur résine (Schéma 1.16). Des α -aminoaldéhydes, protégés par un groupe 3-Boc-(1,3)-oxazinane (Box) sur le groupe aldéhyde et activés par un pentafluorophénylcarbamate sur l'amine, réagissent avec les dipeptides supportés pour donner des précurseurs urée. Un traitement en milieu acide conduit à la déprotection de l'aldéhyde et à une cyclisation intramoléculaire de type Pictet-Spengler qui mène à la THBCI. Des dérivés de la THBC contenant un cycle tétrahydropyrimidin-2-one (THBCP) fusionné peuvent également être obtenus par cette méthodologie en utilisant des β -aminoaldéhydes protégés. Les auteurs décrivent également la synthèse des dérivés portant de noyaux tétrahydrobenzothiényridine (THBTPI) ou tétrahydrothiényridine (THTPI). Les composés décrits dans cette étude¹²⁵ ont été obtenus avec des bons rendements, compris entre 63 et 94%.

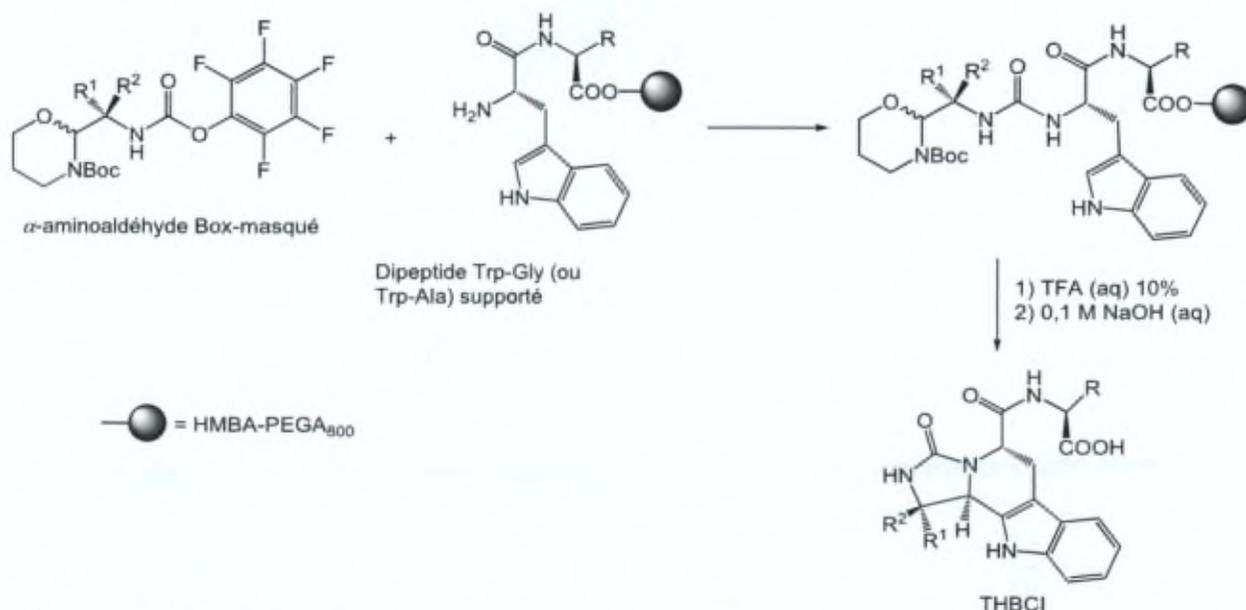


Schéma 1.16 – Synthèse en phase solide de composés de type THBCI¹²⁵

¹²⁵ Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8056-8066.

Une autre étude du même groupe montre que la réaction de cyclisation n'a pas lieu lorsque le noyau indolique est remplacé par un noyau aromatique non activé.¹²⁶ Dans ce cas, une imidazolone est générée par arrachement d'un proton en α de l'ion iminium (Schéma 1.17). Cet aspect sera discuté plus en détail par la suite (Chapitre II).

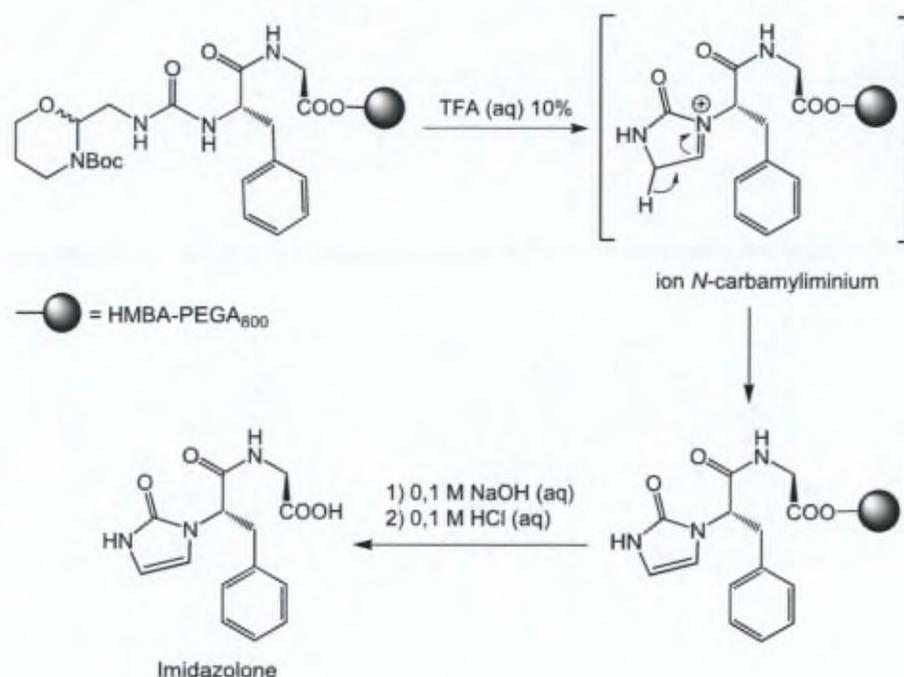


Schéma 1.17 – Formation d'une imidazolone¹²⁶

Etant donné que la dernière étape implique le clivage de la résine, il faut noter que cette méthode est limitée à la formation de composés possédant un résidu acide aminé sur le squelette principal. Un deuxième inconvénient de cette méthode est la synthèse multi-étape de précurseurs d'urée (Schéma 1.18). Ces composés peuvent être obtenus via la réduction partielle de l'amide de Weinreb synthétisé à partir d'acides aminés protégés par des groupes Cbz ou Fmoc. Une autre possibilité de synthèse de ces précurseurs est l'oxydation d'amino-alcools (également synthétisés à partir d'acides aminés protégés) par le périodinane de Dess-Martin.¹²⁷

¹²⁶ Diness, F.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7044-7047.

¹²⁷ Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 130-144.

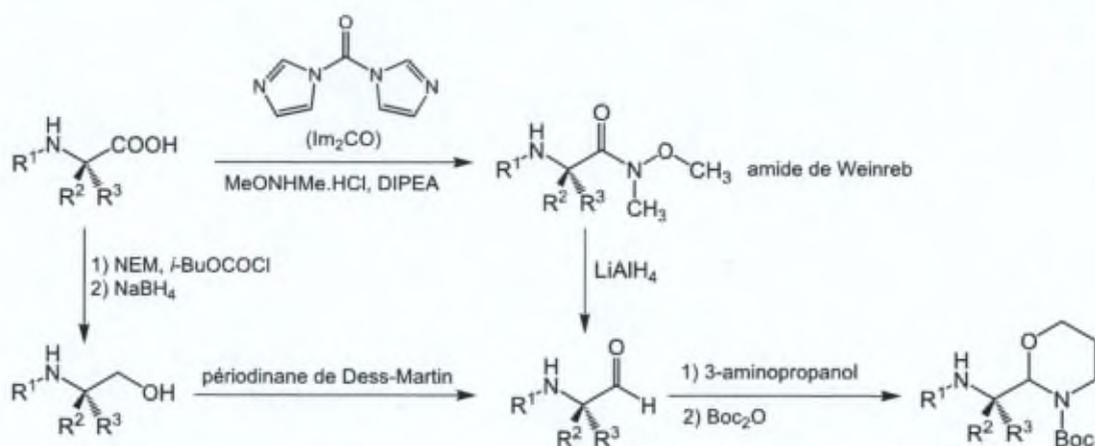


Schéma 1.18 - Séquence réactionnelle menant à la formation des α -aminoaldéhydes protégés par un groupe 3-Boc-(1,3)-oxazinane (Box)¹²⁷

Une autre voie de synthèse de composés de type THBCI consiste à ajouter un cycle imidazolone supplémentaire à des composés possédant déjà le squelette THBC. Ainsi, l'équipe de Tourwé^{128a} a effectué la synthèse de dérivés de THBCI via la réaction de Pictet-Spengler à partir du L-tryptophane et d'un α -aminoaldéhyde protégé par un groupe Cbz (Schéma 1.19). Après la déprotection du groupe Cbz par hydrogénolyse, le substrat est mis en réaction avec du carbonyldiimidazole (Im₂CO) pour donner les composés tétracycliques correspondants.

Cependant, seuls des composés obtenus à partir du L-tryptophane ont été décrits dans ces travaux, le but étant d'obtenir des composés tétracycliques qui pourraient être utilisés comme des peptidomimétiques (ces derniers étant plus rigides que les composés tricycliques de départ).

Un désavantage de cette méthode consiste dans le fait que l'obtention des précurseurs THBC tricycliques implique plusieurs étapes.^{128b} De plus, les deux dernières étapes de cette méthode, dont celle de la formation du cycle imidazolidinone, se déroulent avec des rendements faibles à bons (19-75%).

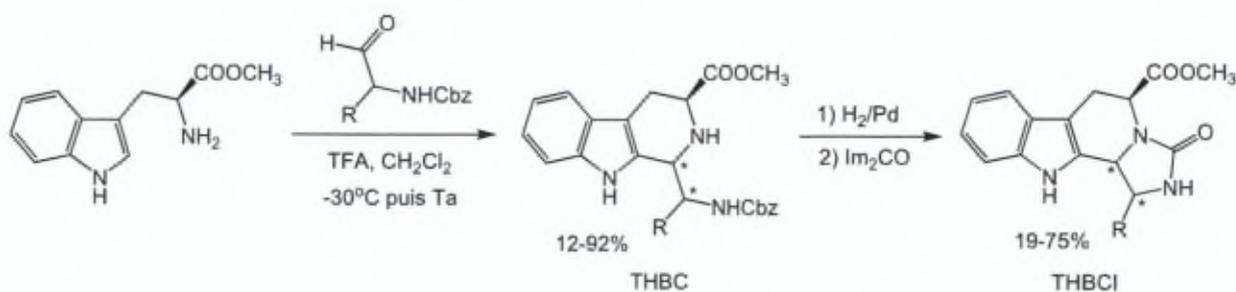


Schéma 1.19 – Synthèse des dérivés tétracycliques de la tétrahydro- β -carboline¹²⁸

¹²⁸ a) Pulka, K.; Feytens, D.; Misicka, A.; Tourwé, D. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 97-108; b) Pulka, K.; Kulis, P.; Tymecka, D.; Frankiewicz, L.; Wilczek, M.; Kozminski, W.; Misicka, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1506-1514.

Des dérivés tétracycliques de type THBCP et THIQP, contenant un cycle tétrahydropyrimidine-2-one, peuvent être obtenus en chauffant des mélanges de composés carbonyles α,β -insaturés et d'urées en milieu acide, comme décrit par Fisyuk et al. (Schéma 1.20).¹²⁹ La réaction s'effectue avec des bons rendements. Cependant, cette méthode ne permet pas l'accès aux dérivés de type THBCI ou THIQL.

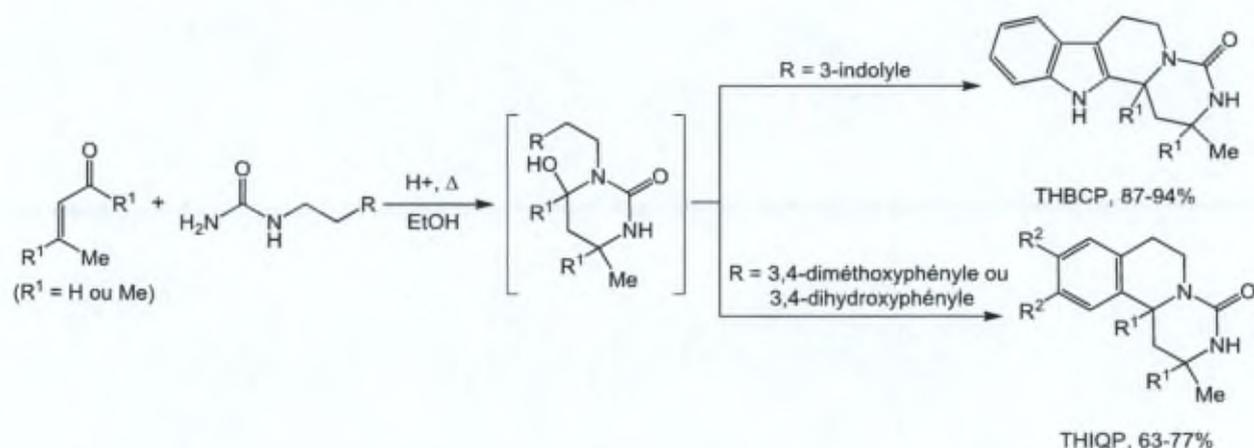


Schéma 1.20 – Synthèse des dérivés tétracycliques de type THBCP et THIQP à partir de composés carbonyles α,β -insaturés¹²⁹

Les mêmes auteurs ont décrit la synthèse de THBCPt ou de THIQPt dont le cycle accolé est de type tétrahydroPyrimidine-2-thione, par chauffage en milieu acide des dérivés d'isothiocyanatocarbonyle avec des aryléthylamines activées par de groupes donneurs d'électrons (Schéma 1.21).¹³⁰ Cette méthode utilise des conditions difficiles (reflux dans AcOH). Les rendements (21% et 93%) dépendent fortement du substrat utilisé. Dans une autre version de la méthode, développée par le même groupe, les isothiocyanatocarbonyle peuvent être obtenus par traitement des composés carbonyliques α,β -insaturées par du KSCN, en milieu acide (mélange d'acide acétique glacial et d'acide sulfurique). Les aryléthylamines peuvent être ensuite ajoutées directement dans le milieu réactionnel après la filtration des sels de potassium. Cependant, des rendements plus faibles sont obtenus par cette voie.

Un avantage de ces deux méthodes est la purification facile, par recristallisation, du produit final.

¹²⁹ Fisyuc, A. S.; Mukanov, A. Y.; Novikova, E. Y. *Mendeleev Commun.* **2003**, *13*, 278–279.

¹³⁰ a) Fisyuc, A. S.; Mukanov, A.Y. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2003**, *39*, 277–279 ; b) Fisyuc, A. S.; Mukanov, A. Y.; Poendaev, N. V. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 455–462.

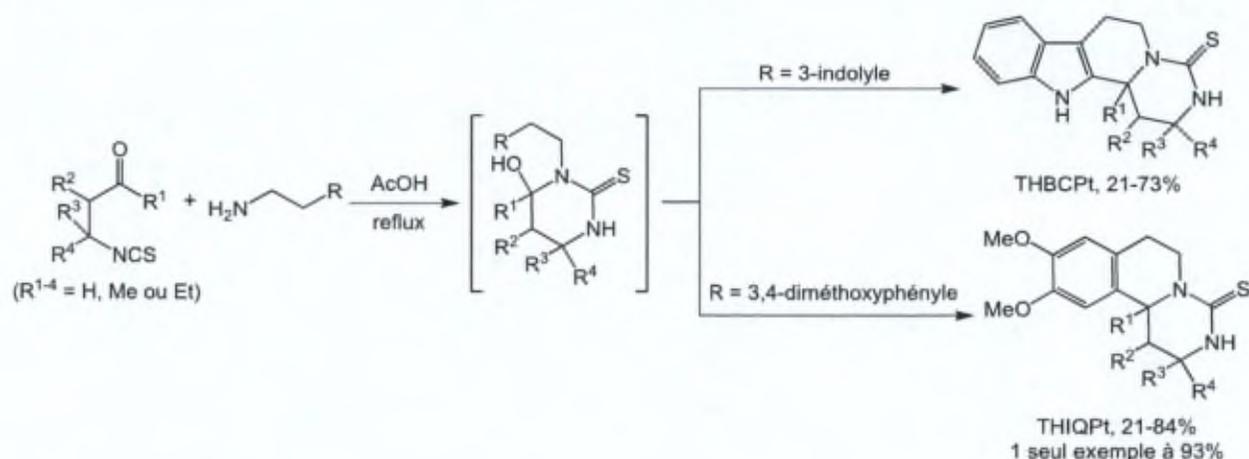


Schéma 1.21 – Synthèse des dérivés tétracycliques de la THBCPt à partir de composés carbonyliques α,β -insaturés¹³⁰

Il faut noter que ces deux dernières voies de synthèse ne permettent que l'accès à des squelettes THBC dont le quatrième cycle est un cycle à 6 chaînons (de type tétrahydropyrimidin-2-one ou tétrahydropyrimidin-2-thione). Les dérivés de type THBCI auxquels nous nous sommes intéressés ne sont pas accessibles par cette méthode.

Un dernier exemple d'une méthode multi-étapes donnant accès à des dérivés de type THBCI et THBCP, a été décrit par l'équipe de Nefzi.¹³¹ Cette méthode est basée sur une réaction de Pictet-Spengler effectuée en phase solide (Schéma 1.22). Le L-tryptophane greffé sur une résine méthylbenzhydramine (MBHA) a été mis en réaction avec différents aldéhydes en milieu acide (2% TFA) pour donner des THBC supportées. Après la réduction de l'urée, le carbonyldiimidazole (Im_2CO) ou le thiocarbonyldiimidazole (Im_2CS) ont été utilisés pour former le quatrième cycle. Des dérivés de la THBC fusionnés à un cycle imidazolidin-2-one en position 1,6 du cycle pyrimidine sont obtenus après le clivage de la résine en milieu acide (HF). Il faut noter que les composés décrits dans ce projet de thèse portent le cycle imidazolidinone en positions 1,2 du cycle pyrimidine.

La méthode permet également l'accès aux dérivés portant des cycles tétrahydropyrimidin-2-one ou tétrahydropyrimidin-2-thione (THBCP ou THBCPt) (Schéma 1.22).

Les dernières étapes de cette méthodologie se déroulent avec des rendements excellents. Néanmoins, le clivage de la résine qui nécessite l'utilisation de l'acide fluorhydrique (HF), composé très toxique, représente un inconvénient majeur de cette méthode.

¹³¹ Klein, G.; Ostresh, J. M.; Nefzi, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2211-2215.

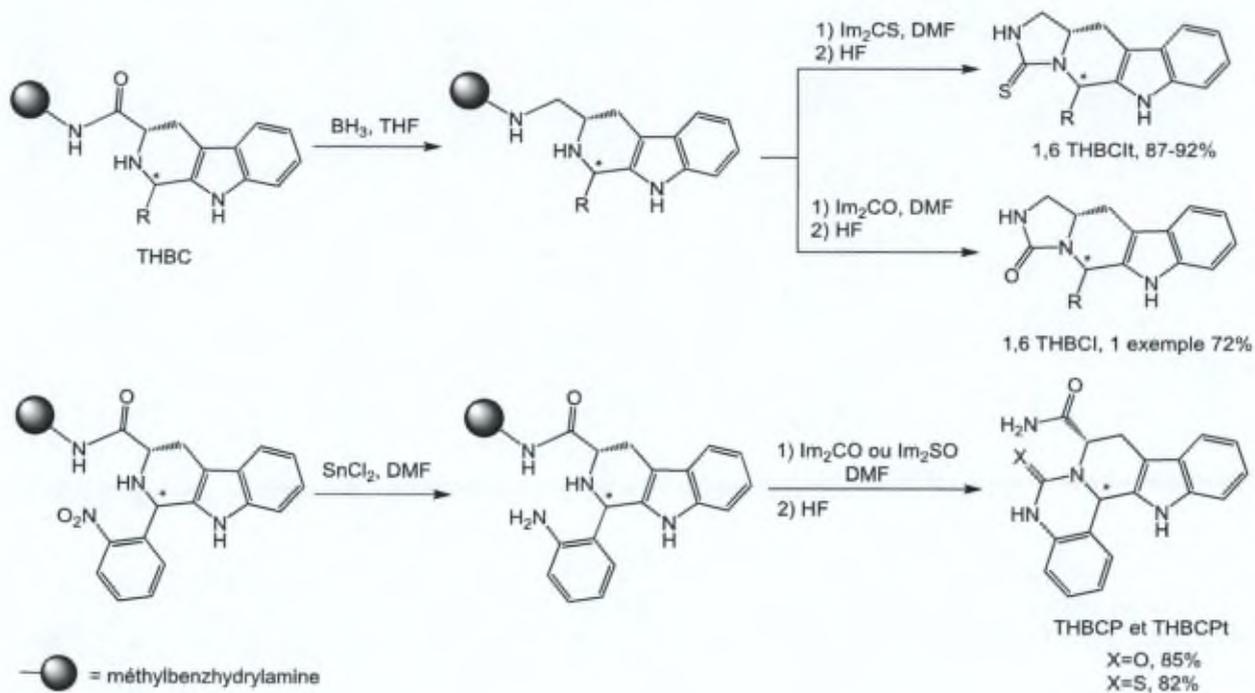


Schéma 1.22 – Synthèse en phase solide des dérivés tétracycliques de 1,6 THBCI(t) et THBCP(t)¹³¹

1.3 But du travail

A l'heure actuelle, le cancer représente toujours un grave problème de santé publique. En effet cette maladie est responsable de plus de 8 millions de décès par an. Environ 40% des cancers solides répondent bien aux traitements. En revanche, plus d'un tiers d'entre eux ne réagissent que très faiblement à la chimiothérapie conventionnelle (de nature cytotoxique) puisqu'ils présentent une résistance naturelle aux stimuli pro-apoptotiques et/ou développent rapidement un phénotype de « multidrug resistance » (MDR). Ces types de cancer, comme par exemple le glioblastome ou le mélanome, sont extrêmement agressifs. Ils évoluent vite, menant à des pronostics sombres et entraînent la mort de plus de trois-quarts des patients qui en sont atteints au cours de l'année du diagnostic. Pour l'instant, le traitement de cette maladie consiste à combiner la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Des thérapies ciblées, utilisées en association avec les traitements conventionnels, pourraient augmenter la survie de ces patients.

C'est dans le concept de « thérapies ciblées » que ce projet s'inscrit. La thérapie ciblée vise plus spécifiquement les cellules tumorales, diminuant ainsi les effets systémiques indésirables.

Considérer la signalisation biochimique dans une cellule tumorale comme une cascade unidirectionnelle est une représentation simplifiée. Il faut garder à l'esprit le fait que ces cellules disposent d'un réseau de signalisation excessivement complexe, dynamique et coopératif. Certaines protéines mutées ne sont pas vitales pour le cancer, mais elles agissent souvent comme des modulateurs des voies de signalisation. C'est pour cette raison que cibler simultanément plusieurs voies, en utilisant le concept de polypharmacologie, semble une bonne stratégie pour développer des traitements efficaces.

Des dérivés de la β -carboline ou de la tétrahydro- β -carboline ont montré une activité anticancéreuse *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, l'harmine (une des β -carbolines les plus connues) est un inhibiteur sélectif et puissant de la kinase Dyrk1A, une kinase impliquée dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. Cette kinase est encore peu exploitée dans le cadre de la thérapie du cancer. L'harmine est également un inhibiteur de la monoamine oxydase, ce qui limite son utilisation à cause des effets neurotoxiques.

Une méthode « one-pot » très efficace a été développée au sein du Laboratoire de Chimie Organique donnant facilement accès à des dérivés tétracycliques de la tétrahydro- β -carboline. Il est important de mentionner que seulement quelques exemples de dérivés de THBCI ou THIQUI ont été synthétisés précédemment au laboratoire. Le premier objectif de ce travail était donc d'exemplifier davantage la méthodologie en synthétisant d'autres dérivés de THBCI et THIQUI, comme par exemple des dérivés obtenus à partir d'esters du tryptophane. Nous envisageons également d'étendre la méthodologie à la synthèse des dérivés de tétrahydropyrimidin-2-one (THBCP), tétrahydrothiénopyridine (THTPI) et tétrahydrobenzothiényopyridine (THBTPI).

Etant donné le fait que notre méthodologie de synthèse donne accès à des mélanges racémiques, un second objectif était de développer une version asymétrique de cette méthodologie, afin d'obtenir les produits les plus actifs de manière énantiosélective.

Le but suivant et principal de ce travail était de développer une librairie de dérivés tétracycliques de tétrahydro- β -carbolines et d'en évaluer leurs propriétés anticancéreuses. La nouvelle série de composés tétracycliques présente un élément de nouveauté structurale par rapport aux dérivés connus. Ceci pourrait donc mener à des activités biologiques meilleures ainsi qu'à une neurotoxicité réduite. Ce type de composés n'a pas encore été exploité dans le traitement du cancer.

Enfin, le dernier objectif de ce travail était d'élucider le mécanisme d'action dans le cas où les composés synthétisés posséderaient une activité biologique importante, une première cible à tester étant la kinase Dyrk1A.

Chapitre II

*Synthèse d'une petite librairie de dérivés de
tétrahydro- β -carbolines, tétrahydroisoquinoléine,
tétrahydrothiénopyrimidine et
tétrahydrobenzothiényopyrimidine*

2.1 La méthode de synthèse « one pot »

Comme mentionné dans le Chapitre I (paragraphe 1.2.3.4), une méthodologie « one pot », très efficace, donnant accès à des dérivés de THBCI et THIQI a été développée au sein du Laboratoire de Chimie Organique (ULB),¹²⁴ mais seulement quelques exemples avaient déjà été synthétisés.

Dans le cadre de ce projet cette méthodologie a été étendue à d'autres exemples de THBCI et THIQI ainsi qu'aux dérivés possédant le squelette tétrahydro- β -carboline fusionné à un cycle tétrahydropyrimidin-2-one (THBCP), aux dérivés de la tétrahydrothiénopyridine (THTPI) et aux dérivés de la tétrahydrobenzothiényopyridine (THBTPI).

Pour rappel, la première étape de cette méthodologie est une réaction « domino » de type Staudinger aza-Wittig effectuée sur un azoture portant un groupe aldéhyde protégé sous forme d'acétal (Schéma 2.1). Ainsi, un isocyanate est généré et il est directement mis en réaction avec différents dérivés de la tryptamine ou d'éthylamines aromatiques pour donner des intermédiaires urée. La dernière étape est la déprotection de l'aldéhyde en milieu acide, suivie par la formation d'un intermédiaire *N*-carbamylium. Cet intermédiaire cyclise de manière spontanée dans le milieu réactionnel, pour conduire à la formation du cycle tétrahydropyridine, via une réaction de type Pictet-Spengler.

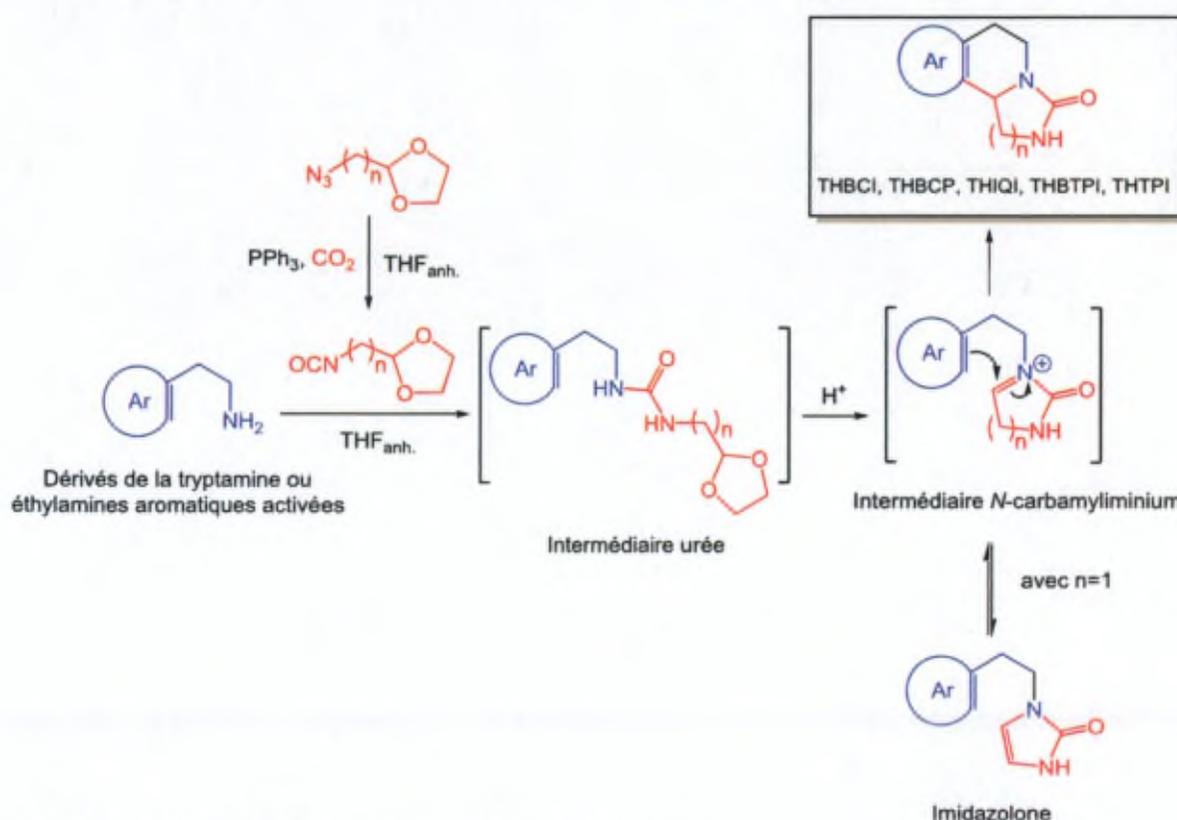


Schéma 2.1 – Schéma général de la méthodologie de synthèse « one-pot »

Tout comme dans la synthèse en phase solide développée par l'équipe de Meldal,^{125,126} en absence d'un noyau aromatique activé, l'étape de cyclisation n'a pas lieu. En revanche, un proton en position α de l'ion *N*-carbamiyliminium est éliminé pour donner accès à des imidazolones (Schéma 2.1).

La première étape du schéma de synthèse est la formation de l'isocyanate via la réaction de Staudinger aza-Wittig (Schéma 2.2). La réaction de Staudinger est basée sur la réaction entre un azoture et la triphénylphosphine pour produire un iminophosphorane. Cet iminophosphorane intermédiaire (aza-ylure très nucléophile) s'hydrolyse spontanément en présence d'eau pour donner une amine primaire et de l'oxyde de triphénylphosphine (OPPh₃) (Schéma 2.2).

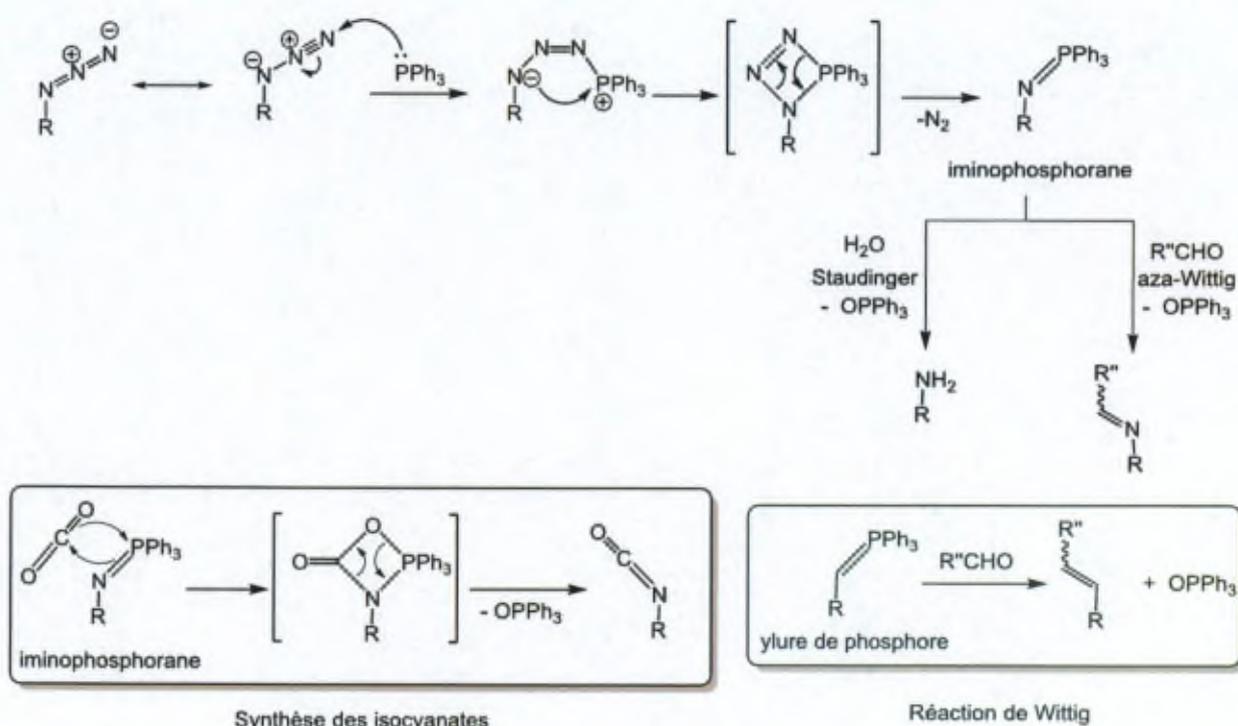


Schéma 2.2 – La réaction de Staudinger aza-Wittig. Mécanisme et synthèse des isocyanates

La modification la plus importante de la réaction de Staudinger est probablement son extension à la formation de liaisons peptidiques, en utilisant la grande nucléophilie de l'atome d'azote de l'aza-ylure, en présence d'un groupe ester. Ainsi, de nombreuses applications biologiques concernant le marquage de l'ADN ou des protéines ont été développées.¹³² De plus, l'iminophosphorane réagit facilement avec une variété de composés électrophiles pour donner des intermédiaires de synthèse importants. Par exemple, la réaction d'aza-Wittig est une réaction qui utilise des iminophosphoranes pour produire des imines. Dans cette réaction, qui présente une grande similitude avec la réaction de Wittig, l'iminophosphorane est traité avec

¹³² van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806-8827.

un aldéhyde, une cétone ou une thiocétone pour former des imines (Schéma 2.2).¹³³ Lorsque du CO₂ est utilisé, la réaction donne accès à des isocyanates. Cette réaction est connue depuis longtemps et en 1985, l'équipe de Messmer l'a appliquée sur des sucres portant des groupes azoture pour obtenir des carbamates cycliques.¹³⁴

Dans une deuxième étape de notre méthodologie, différents dérivés de la tryptamine ou d'autres aryléthylamines peuvent réagir sur l'isocyanate formé *in situ* pour obtenir des dérivés de type urée (Schéma 2.3). Lorsque cet intermédiaire urée est placé en milieu acide, l'aldéhyde masqué est activé par protonation. Ceci entraîne une première cyclisation intramoléculaire par l'attaque nucléophile du groupe NH distale. Après l'élimination de l'éthylène glycol, l'ion *N*-carbamyliiminium, hautement réactif, est généré. Dans le cas où les amines de départ portent un groupe nucléophile (noyau aromatique activé), une deuxième cyclisation intramoléculaire de type Pictet-Spengler peut avoir lieu et, après la réaromatisation du système, des composés de type THBCI, THBCP, THIQI ou TH(B)TPI sont obtenus. Pendant cette cyclisation de type Pictet-Spengler, un centre asymétrique est créé et le mélange racémique est obtenu.

Une réaction d'élimination du proton en position α par rapport à l'ion *N*-carbamyliiminium est observée dans le cas des noyaux aromatiques qui ne sont pas assez nucléophiles, ce qui conduit à la formation d'une imidazolone (Schéma 2.3). L'ion *N*-carbamyliiminium est donc un intermédiaire commun à la voie menant à l'imidazolone et à celle menant aux composés cyclisés. Le processus de formation de l'imidazolone étant réversible, il est possible d'obtenir le composé cyclisé à partir de celle-ci, en contrôlant les conditions d'acidité du milieu. Ceci a été clairement démontré par l'équipe de Meldal^{125,126} et a également été exploité au cours de ce travail.

¹³³ Cossío, F. P.; Alonso, C.; Lecea, B.; Ayerbe, M.; Rubiales, G.; Palacios, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2839-2847.

¹³⁴ Kovács, J.; Pintér, I.; Messmer, A.; Tóth, G. *Carbohydr. Res.* **1985**, *141*, 57-65.

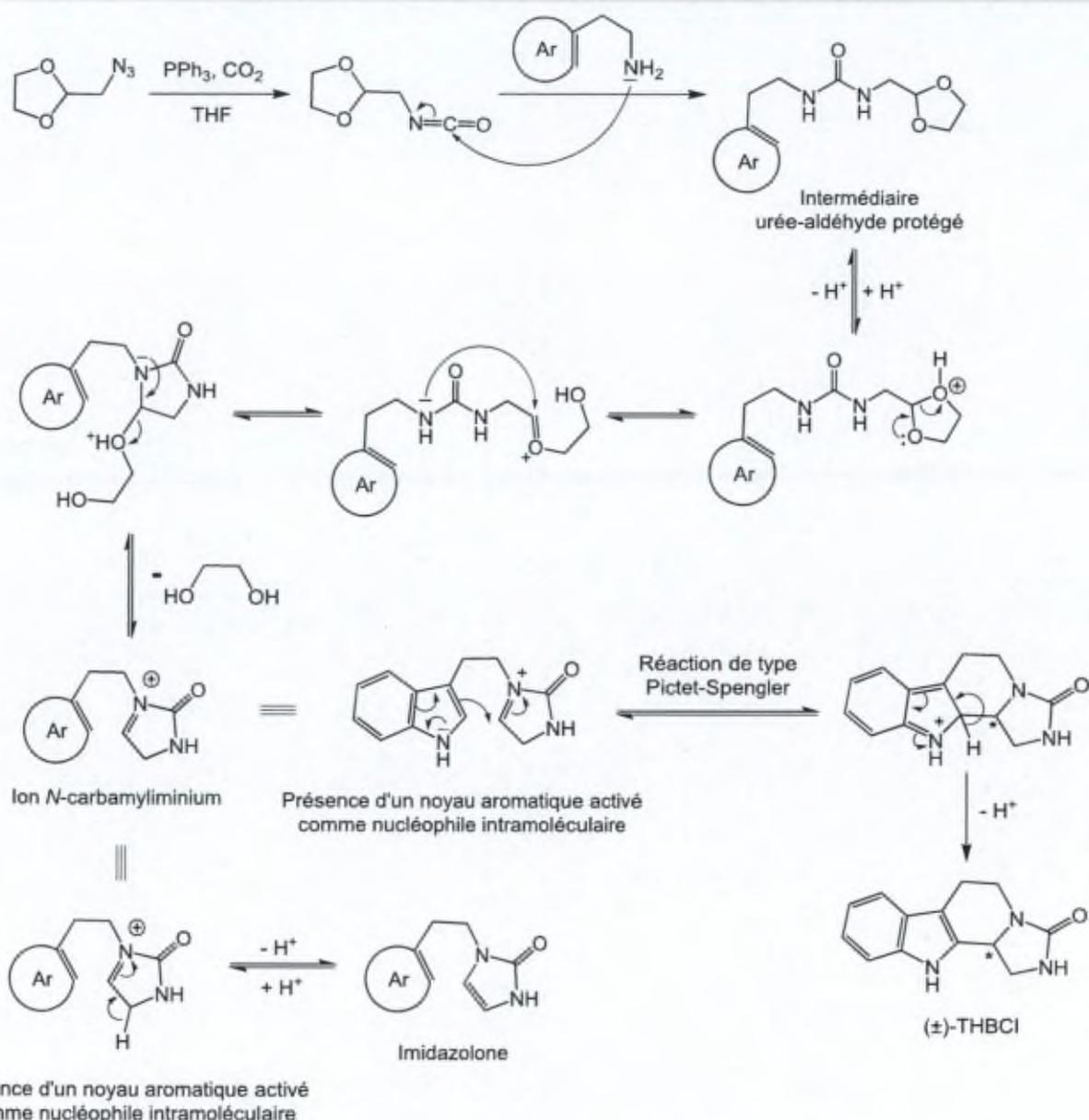


Schéma 2.3 – Mécanisme de la méthodologie « one pot » avec pour exemple la synthèse d'un dérivé de THBCI

2.2 Synthèse des dérivés de THBCI

Les premiers composés auxquels nous nous sommes intéressés sont ceux provenant de la tryptamine (**4a**) et de ses dérivés. Tout d'abord, les azotures **2a** et **2b** ont été facilement obtenus à partir des dérivés bromés commerciaux (le 2-bromométhyl-1,3-dioxolane **1a** et le 2-(2-bromoéthyl)-1,3-dioxolane **1b**) par réaction avec NaN_3 .¹³⁵ Ensuite, les amines **4a-d** ont été mises en réaction avec les isocyanates **3a** et **3b**, générés *in situ* via la réaction de Staudinger aza-Wittig à partir des azotures **2a** et **2b**, dans du THF anhydre et à température ambiante. Les intermédiaires urée formés n'ont pas été isolés (Schéma 2.4). Le THF a alors été évaporé et le

¹³⁵ Alvarez, S. G.; Alvarez, M. T. *Synthesis* **1997**, 4, 413-414.

résidu solide obtenu a été repris dans du méthanol. Après l'ajout d'HCl aq. (2,8 M) le milieu réactionnel a été chauffé à 55°C. En général, 4h sont suffisantes pour l'achèvement de la réaction. Les dérivés de THBCI **5a-e** ainsi obtenus ont ensuite été purifiés par chromatographie flash (FC).

Le remplacement du THF par le méthanol comme solvant n'est pas une opération indispensable. Le produit **5a** a été synthétisé sans effectuer ce changement de solvant et il a été obtenu avec un rendement de 69% après purification. Cependant, des produits de dégradation du THF en milieu acide rendent la purification des composés plus difficile, donc l'étape de cyclisation a été réalisée dans du méthanol pour la suite de ce projet.

L'intermédiaire urée est stable et peut donc être isolé par FC et soumis à l'étape de cyclisation en conditions acides dans une étape séparée. Cet avantage a été utilisé pour développer une version énantiosélective de notre méthodologie, aspect discuté dans le Chapitre III.

La synthèse de dérivés de THBCI **5a-c**,¹²⁴ obtenus précédemment au laboratoire, a été optimisée dans le cadre de ce travail. Ainsi, les rendements globaux de la réaction pour l'obtention de ces dérivés sont élevés (82-89 %). Les spectres RMN des bruts réactionnels ne montrent pas la présence d'autres dérivés de la tryptamine que les produits attendus, cependant les rendements obtenus ne sont pas quantitatifs à cause de la séparation parfois délicate de l'oxyde de triphénylphosphine (OPPh₃).

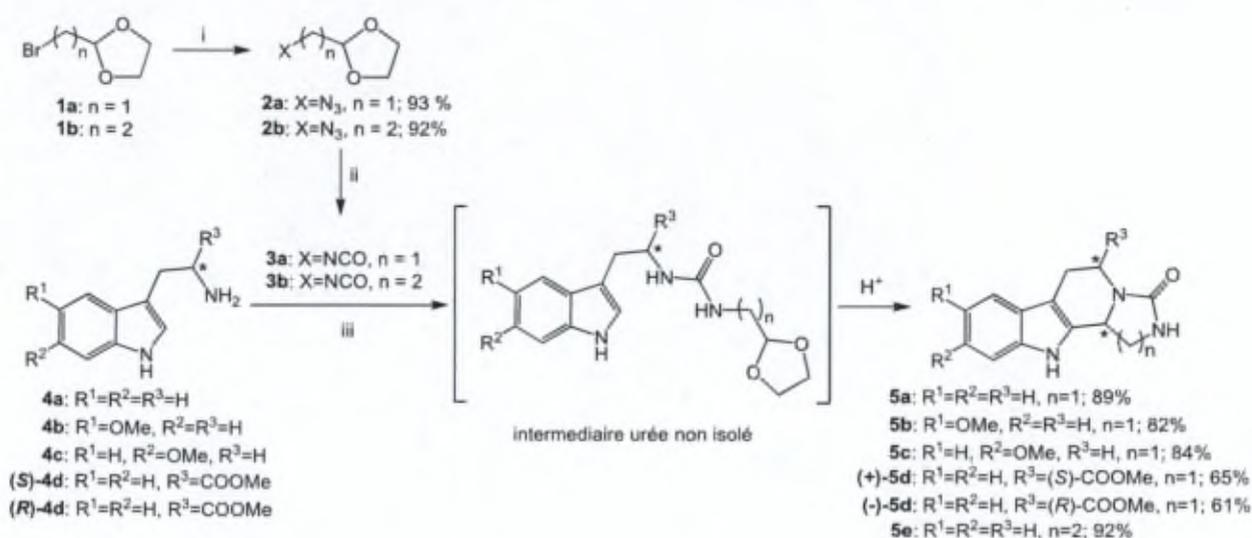


Schéma 2.4 – Synthèse des dérivés de THBCI. Réactifs : i) NaN₃, DMSO, 70°C ; ii) PPh₃, CO₂, THF, Ta ; iii) THF, Ta

La méthodologie a été ensuite exploitée pour l'obtention d'un dérivé original de THBCP **5e** portant un cycle tétrahydropyrimidin-2-one accolé au squelette THBC. Ce produit a été synthétisé de manière efficace (rendement de 92% après la purification) à partir de la tryptamine **4a**, en utilisant l'azoture **2b** qui porte l'aldéhyde protégé en position β .

Cette méthodologie de synthèse a été également étendue à l'utilisation d'autres amines que des dérivés de la tryptamine. Lorsque les esters de méthyle du tryptophane énantio-purs (*S*-

4d et (**R**)-**4d** ont été utilisés, la réaction a eu lieu avec une haute diastéréosélectivité (d'environ 9:1, déterminée par HPLC-MS et confirmée par analyse RMN ^1H du brut réactionnel) et le diastéréoisomère majoritaire a été obtenu pur après FC.

Comme les amines (**S**)-**4d** et (**R**)-**4d** sont commercialisées sous forme de chlorhydrate, elles ont tout d'abord été déprotonées par traitement avec une solution saturée de NaHCO_3 . L'amine a ensuite été extraite par de l'acétate d'éthyle, concentrée et mise en réaction avec l'isocyanate **3a**. En fin de réaction de cyclisation (HCl aq. 2,8 M/MeOH), nous avons observé par RMN ^1H que le milieu réactionnel contenait le produit attendu et un produit secondaire **6** dans un rapport d'environ 1:1 (Schéma 2.5). Au cours de cet essai, le produit final a été obtenu avec un rendement de 22% après plusieurs étapes de purification par FC.

Afin d'améliorer le rendement, l'étape de cyclisation a été tentée dans un mélange TFA/MeOH 1:3 et le milieu réactionnel a ensuite été concentré et purifié par FC. Cette méthode a donné un meilleur rendement de 65%. Le produit secondaire **6** a été observé à nouveau dans les fractions récupérées après chromatographie, mais en quantité beaucoup plus faible.

Même si ce composé secondaire **6** n'a pas pu être séparé de l' OPPh_3 , les signaux des deux espèces sont très peu superposés et l'attribution de la structure de **6** a pu être réalisée par l'analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C , dqfCOSY, HSQC ^1H - ^{13}C et HMBC ^1H - ^{13}C . La structure proposée pour **6**, ainsi que le mécanisme de sa formation sont représentés dans le Schéma 2.5.

L'analyse par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI-MS) indique une masse moléculaire de 315 u.m.a, ce qui correspond bien à la structure **6**.

Même si les taches de corrélation en RMN 2D confirment la structure de composé **6**, il reste difficile d'expliquer comment l'acétal reste stable en milieu acide.

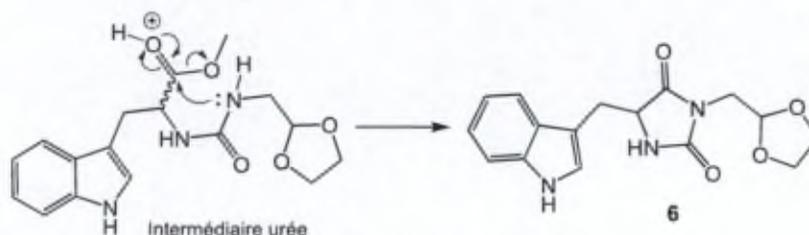


Schéma 2.5 - Mécanisme de formation du produit secondaire **6**

La configuration absolue de dérivés de THBCI provenant du tryptophane a été déterminée par l'équipe de Meldal¹²⁵ via des études NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) (Figure 2.1). Ces études ont été effectuées sur des molécules obtenues à partir du L- et D- tryptophane, portant un atome de carbone asymétrique de configuration connue (1-(*S*)), en position α du nouveau centre chiral **2** qui se forme lors de la réaction de Pictet-Spengler. La configuration du centre chiral situé en position **3** détermine la configuration du nouveau centre qui se crée en position **2**. Lorsque la synthèse est effectuée à partir du D-tryptophane, on observe un NOE entre les atomes d'hydrogène H_a et H_b ce qui signifie qu'ils sont en configuration *cis*, c'est-à-dire positionnés du même côté du cycle imidazolindione. Par contre, l'utilisation du L-tryptophane

mène à un produit pour lequel la configuration relative de H_a et H_b est *trans*. Ces études NOE montrent que la réaction de Pictet-Spengler conduit majoritairement au diastéréoisomère pour lequel H_b et H_c ont une configuration relative *trans*. Par analogie avec ces travaux¹²⁵ nous avons supposé que cette diastéréosélectivité est également valable dans le cas du composé (+)-**5d**, synthétisé dans le cadre de ce travail.

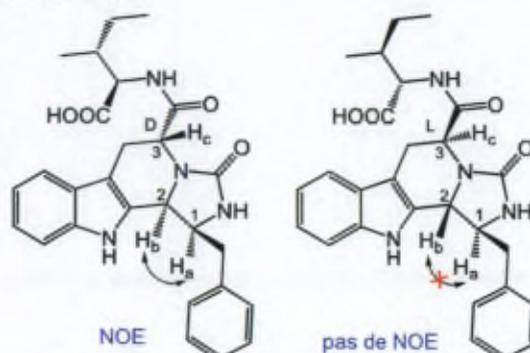


Figure 2.1 – Détermination de la stéréochimie par NOE¹²⁵

Cette hypothèse a été confirmée par spectroscopie de RMN 1H . En effet, les signaux RMN 1H du composé (+)-**5d** ont été comparés avec ceux d'un produit similaire décrit dans l'étude de Meldal (Tableau 2.1).¹²⁵ Les protons du cycle imidazolidinone du diastéréoisomère majoritaire du composé (+)-**5d** présentent des déplacements chimiques et des constantes de couplage similaires avec les protons correspondants du produit Pictet-Spengler apparenté, synthétisé par Meldal.¹²⁵ Les données RMN reprises dans le Tableau 2.1 suggèrent donc bien que les deux composés ont la même configuration relative, c'est-à-dire que les protons des deux centres asymétriques sont en position *trans* l'un par rapport à l'autre.

La configuration absolue a donc pu être attribuée comme étant 2-(*R*)-3-(*S*) pour le composé (+)-**5d** et, par analogie, 2-(*S*)-3-(*R*) pour (-)-**5d**.

Proton	Déplacement chimique (ppm) pour :	
	Composé (+)- 5d	Produit Pictet-Spengler synthétisé par Meldal ¹²⁵
H_a	3,78 (dd, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz)	3,77 (t, $J = 8,9$ Hz)
H_b	3,38 (dd, $J_1 = 9$ Hz et $J_2 = 4,2$ Hz)	3,41 (dd, $J_1 = 8,8$ Hz et $J_2 = 3,4$ Hz)
H_c	5,12	5,16

Tableau 2.1 – Déplacements chimiques et constantes de couplage du produit (+)-**5d** (DMSO- d_6 , 300 MHz, Ta) et du composé apparenté décrit par Meldal (DMSO- d_6 , 250MHz, Ta)

Il a déjà été mentionné dans le chapitre précédent que des dérivés cationiques de l'harmine présentent de bonnes activités biologiques.⁶⁹ Encouragés par ces résultats, nous avons ciblé la synthèse d'un nouveau dérivé : le composé cationique **11** (Figure 2.2).

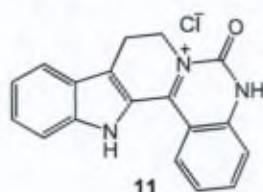


Figure 2.2 – Structure du produit **11**

Des produits similaires ont déjà été synthétisés par Meldal et ses collaborateurs¹²⁵ en utilisant des amines aromatiques portant un aldéhyde protégé sous forme d'acétal en position 2 (Schéma 2.6). Après l'obtention du dérivé de THBC pentacyclique, le système est aromatisé par oxydation à l'air en présence de TFA 95%. Les auteurs proposent comme mécanisme de cette réaction l'attaque des électrons π en position 3 de l'indole sur l'oxygène. Il s'en suit la formation et l'ouverture d'un intermédiaire époxyde et l'aromatisation par élimination du proton du centre asymétrique formé par la réaction de Pictet-Spengler.

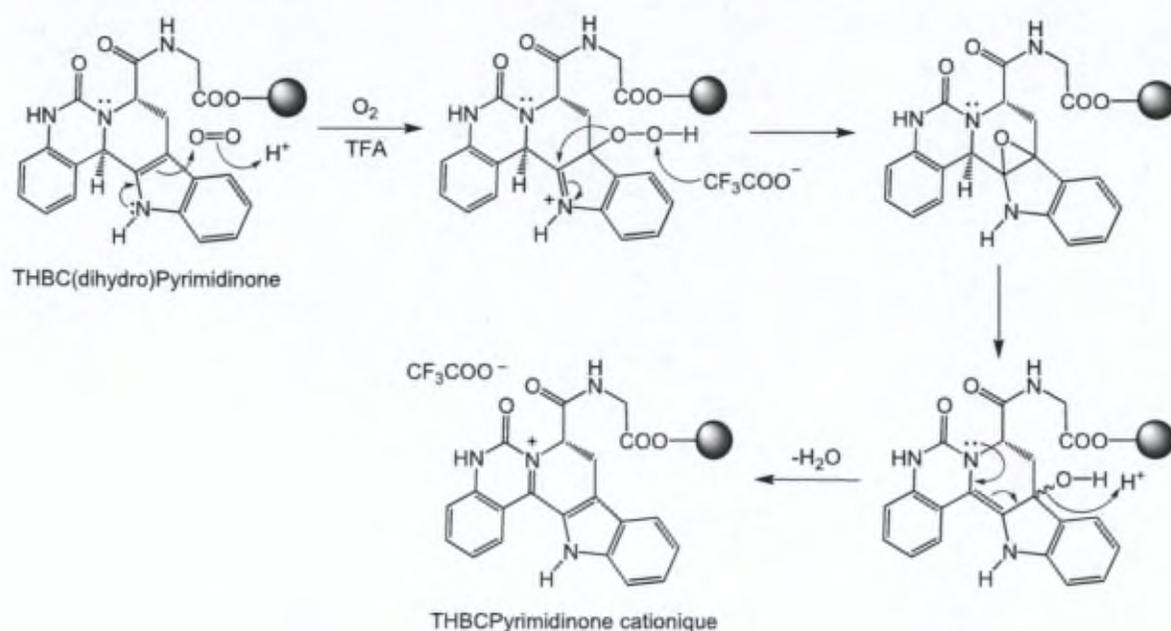


Schéma 2.6 – Mécanisme de la réaction d'oxydation des dérivés de THBCPyrimidin-2-one cationiques

Afin de synthétiser le produit **11**, la méthodologie de synthèse « one pot » a été modifiée au niveau de l'étape de formation de l'isocyanate. D'abord, la 2-(1,3-dioxolan-2-yl)benzénamine **9** a été synthétisée à partir du 2-nitrobenzaldéhyde **7** disponible

commerciallement, en suivant le procédé décrit par Clayden *et al.*¹³⁶ Après la protection du groupe aldéhyde, le groupe nitro a été réduit sous atmosphère d'hydrogène en présence du Pd/C pour obtenir l'amine **9** (Schéma 2.7).

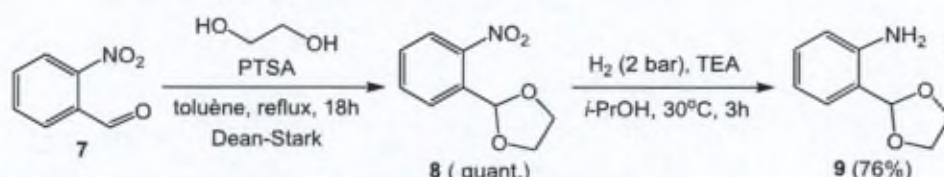


Schéma 2.7 – Synthèse de la 2-(1,3-dioxolan-2-yl)benzénamine **9**

Ensuite, l'amine **9** a été traitée avec le triphosgène pour donner l'isocyanate correspondant qui n'a pas été purifié et a été utilisé tel quel dans l'étape suivante (Schéma 2.8). La réaction de l'isocyanate **10** avec la tryptamine a donné un intermédiaire urée qui, sans être isolé, a été cyclisé en milieu acide pour donner l'intermédiaire **11'**. Son oxydation spontanée dans le milieu réactionnel a mené à la formation du produit cationique **11** qui a été isolé avec un rendement de 16%, calculé à partir de la tryptamine.

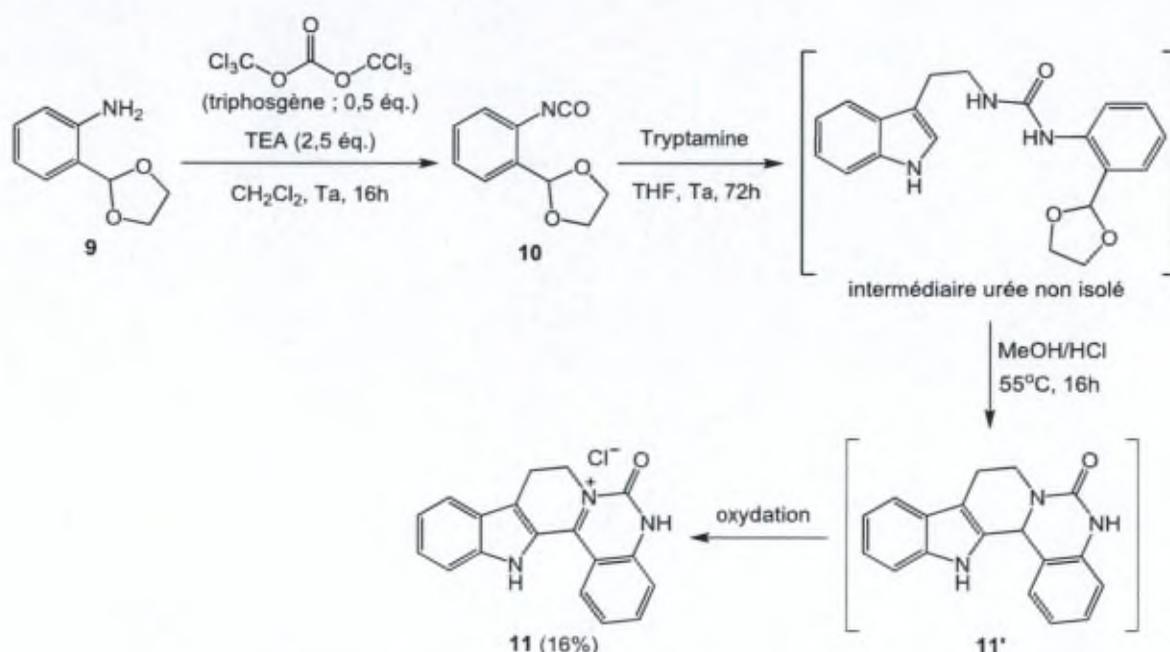


Schéma 2.8 – Synthèse du dérivé de THBCP cationique **11**

Ce faible rendement peut être expliqué en tenant compte de plusieurs observations.

Même si la purification de l'amine **9** par FC a été décrite,¹³⁶ nous avons pu constater que la stabilité de ce produit est assez faible. Ainsi, si l'amine est gardée à température ambiante

¹³⁶ Clayden, J.; Pickworth, M.; Jones, L. H. *Chem. Commun.* **2009**, 547-549.

pendant une nuit, des produits de dégradation sont observés par CCM et RMN. De même, le composé change de couleur (de jaune à brun) assez rapidement lorsqu'il est mis sous vide, ou légèrement chauffé. Etant donné sa très faible stabilité, l'amine **9** a donc été engagée rapidement dans l'étape suivante, sans être complètement séparée du chlorhydrate de triéthylamine issu de la réaction et sans éliminer complètement le solvant (*i*PrOH). Cependant, la présence de l'isopropanol dans le milieu réactionnel peut, malheureusement, entraîner une dégradation du triphosgène ou de l'isocyanate. Ainsi, plusieurs produits ont été observés en CCM lors de l'étape de formation de l'isocyanate.

Le produit cationique **11** est assez polaire, étant soluble dans le méthanol. Une certaine perte du produit ne peut pas être évitée lors de la purification par colonne, ce qui contribue à l'isolement de ce produit en faible quantité.

Puisque l'objectif était tout d'abord d'obtenir le produit cationique pour tester son activité antitumorale, l'optimisation de la méthode de synthèse n'a pas été réalisée au-delà de ce qui est décrit ci-dessus.

Pour augmenter la diversité des molécules synthétisées, des modifications ont été apportées au niveau du groupe méthoxy présent sur le noyau indolique de **5b** ainsi qu'au niveau du groupe ester de (+)-**5d** (Schéma 2.9). Ainsi, le composé (+)-**5f** portant un groupe carboxyle a été obtenu par hydrolyse en milieu basique de l'ester (+)-**5d**. Ensuite, le produit (+)-**5g** portant un substituant benzyle lié par un groupe amide a été synthétisé via un couplage de type peptidique à partir de l'acide (+)-**5f**. D'autre part, le composé phénolique **5h** a, quant à lui, été synthétisé par déméthylation du composé **5b** en présence de BBr₃.

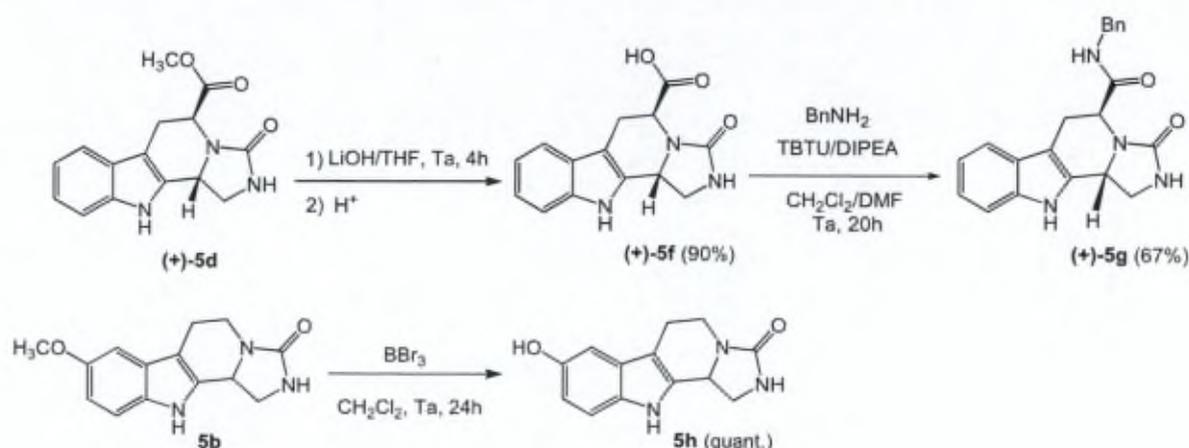


Schéma 2.9 – Modifications supplémentaires apportées au squelette THBCI

Caractérisation des dérivés de THBCI par spectroscopie de RMN.

La structure de chaque produit synthétisé dans le cadre de ce projet a été déterminée par spectroscopie de RMN (¹H, ¹³C, dqfCOSY, HSQC ¹H-¹³C et, si nécessaire HMBC ¹H-¹³C). La structure des produits a également été vérifiée par spectrométrie de masse à haute résolution ou ESI-MS.

A titre d'exemple, la démarche utilisée pour l'attribution de la structure du composé **5a** sera discutée ci-dessous. La Figure 2.3 présente le spectre RMN ^1H de ce composé et de son précurseur, l'intermédiaire urée **33**. Les caractéristiques du spectre RMN ^1H du composé **5a** sont détaillées dans le Tableau 2.2.

Tout d'abord, quelques différences sont faciles à observer entre les spectres RMN ^1H de l'urée et du produit cyclisé (Figure 2.3). Premièrement, une disparition du proton en position 2 confirme que la réaction de cyclisation a bien eu lieu. On observe également la disparition du signal correspondant au proton de l'aldéhyde protégé (un triplet à 4,84 ppm), et l'apparition du signal correspondant au proton en position 13 (un multiplet à 5,06 ppm). Ce dernier signal est caractéristique des produits cyclisés décrits dans ce travail. Ces protons situés dans une zone spectrale où peu de pics sont observés facilitent le suivi des réactions de cyclisation par spectroscopie de RMN ^1H . De plus, les spectres RMN ^1H des urées présentent deux triplets à 2,96 et 3,50 ppm dans du CDCl_3 , correspondant aux protons situés en positions 10 et 11. Dans le cas des produits cycliques, ces protons deviennent diastéréotopiques et apparaissent donc sous forme de signaux différenciés.

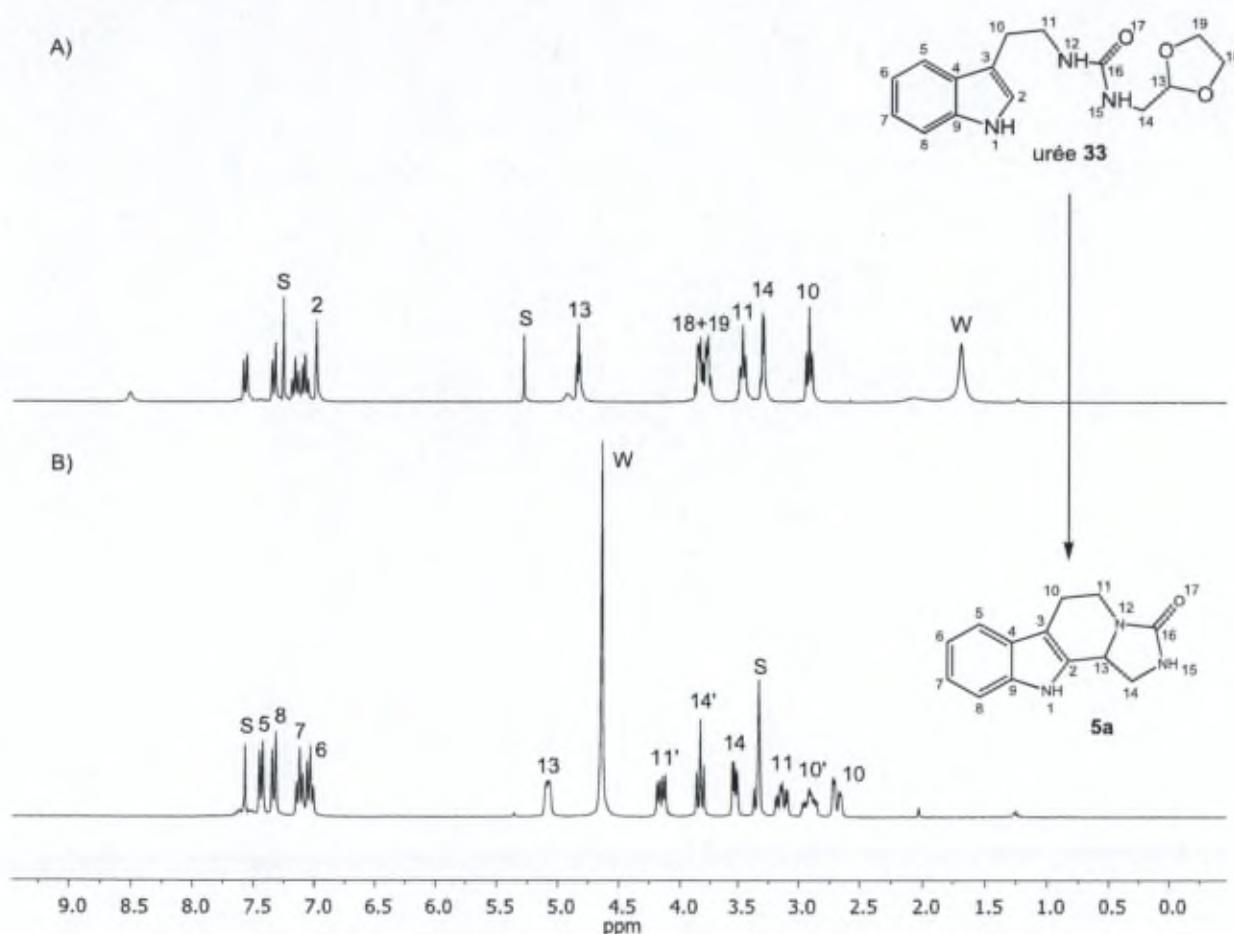


Figure 2.3 - Spectre RMN ^1H de l'intermédiaire urée (A) (300 MHz, CDCl_3 , 298 K) et du composé **5a** (B) (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1, 298 K); S = solvants, W = eau.

δ (ppm)	Nombre de protons	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
2,67	1	m	-	10
2,89	1	m	-	10'
3,12	1	ddd	$J_1 = 13,2, J_2 = 11,7, J_3 = 4,5$ Hz	11
3,51	1	dd	$J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 8,7$ Hz	14
3,81	1	t	$J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz	14'
4,13	1	dd	$J_1 = 5,7$ Hz, $J_2 = 13,5$ Hz	11
5,06	1	m	-	13
7,01	1	m*	-	6
7,10	1	m*	-	7
7,31	1	d	8,1	8
7,42	1	d	7,8	5

Tableau 2.2 - Données relatives au spectre RMN ^1H du composé **5a**.*) certaines multiplicités ne sont claires qu'avec de forts agrandissements

L'analyse du spectre RMN ^1H de **5a** nous permet déjà d'attribuer le signal correspondant au proton 13 sur base de son déplacement chimique. Ensuite, l'analyse du spectre dqfCOSY a permis d'identifier trois systèmes de spins :

un système de spin composé des protons 10, 10', 11, 11' - attribué à $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$

un système de spin composé des protons 14, 14', 13 - attribué à $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}$

un système de spin composé des protons 5, 6, 7, 8 - attribué aux protons aromatiques (Ar-H)

A ce stade, nous pouvons déjà attribuer les signaux correspondant aux protons 13 et 14.

Ensuite, les spectres ^{13}C et HSQC nous permettent de confirmer l'attribution des signaux correspondant aux protons diastéréotopiques 10 et 10' sur base du déplacement chimique de l'atome de carbone C10. En tenant compte du fait qu'ils font partie du même système de spin, l'attribution des protons 11 et 11' a également été possible. Les deux taches de corrélation attribuées aux protons 14 et 14' confirment bien qu'ils sont liés au même atome de carbone. Le signal présent à 163,9 ppm sur le spectre ^{13}C peut être attribué à l'atome de carbone C16, sur base de son déplacement chimique. Ainsi, les signaux correspondant aux atomes de carbone et proton en positions 10, 11, 13, 14 et 16 ont pu être attribués.

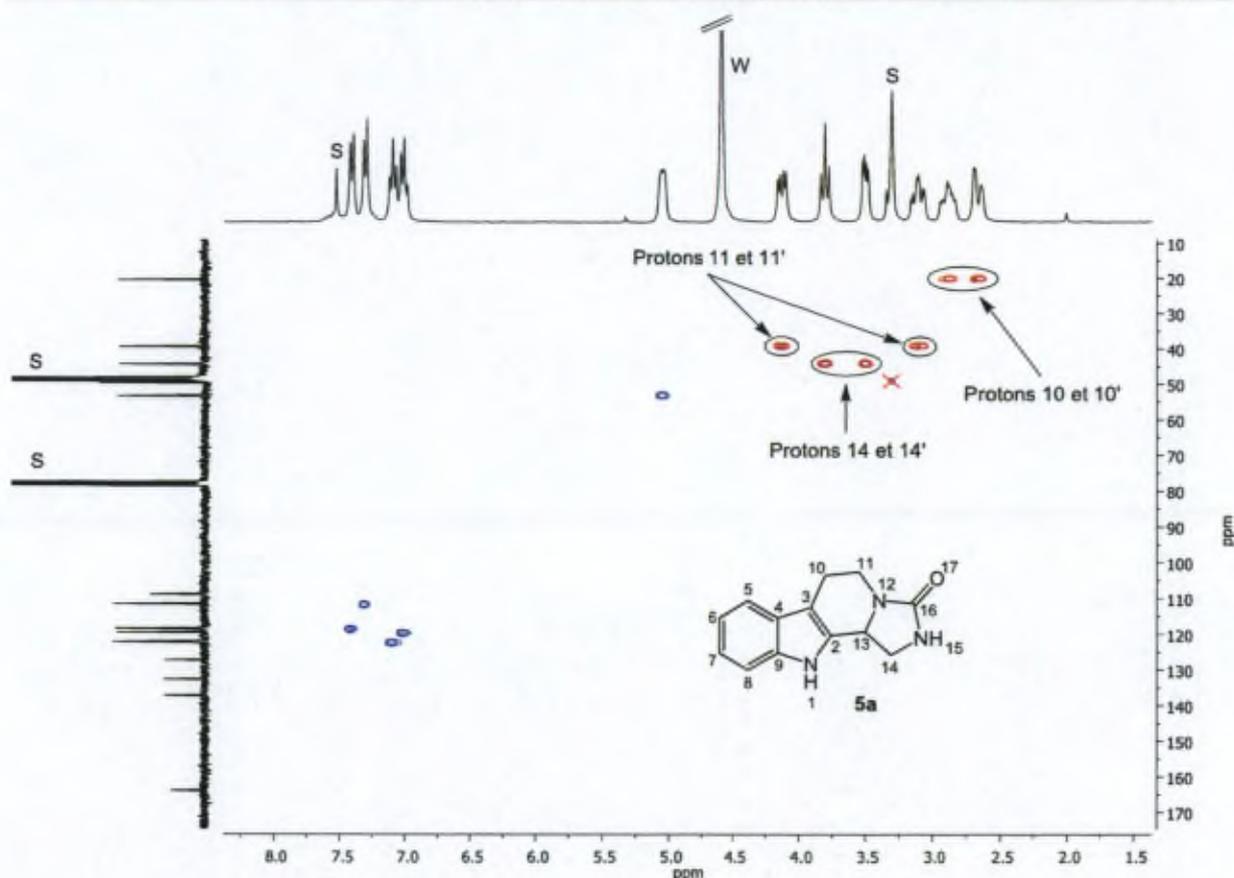


Figure 2.4 – Spectre HSQC édité (^1H - ^{13}C , 7T, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1, 298 K) du composé **5a**, S = solvants, W = eau. Les taches de corrélations de couleur rouge sont en phase inverse

L'attribution des protons et des atomes de carbone aromatiques a été effectuée à l'aide du spectre ^1H - ^{13}C HMBC. Les taches de corrélation qui permettent cette attribution sont : les taches de corrélation en 3J de l'atome de carbone C2 avec les protons H14 et H10, en 2J : C2-H13, ainsi que les taches de corrélation de l'atome de carbone C3 avec les protons H10, H11 et H5 (Figure 2.5). L'attribution du signal correspondant au proton H5 permet celle des autres protons aromatiques, à l'aide des taches de corrélation observées sur le spectre dqfCOSY, et, par conséquent, des atomes de carbone correspondants en utilisant le spectre ^1H - ^{13}C HSQC. Le signal correspondant à l'atome de carbone C4 a pu être attribué sur base des taches de corrélation en 3J : C4-H6 et C4-H8. De même, le pic correspondant à l'atome de carbone C9 a pu être attribué sur base des taches de corrélation en 3J : C9-H5 et C9-H7.

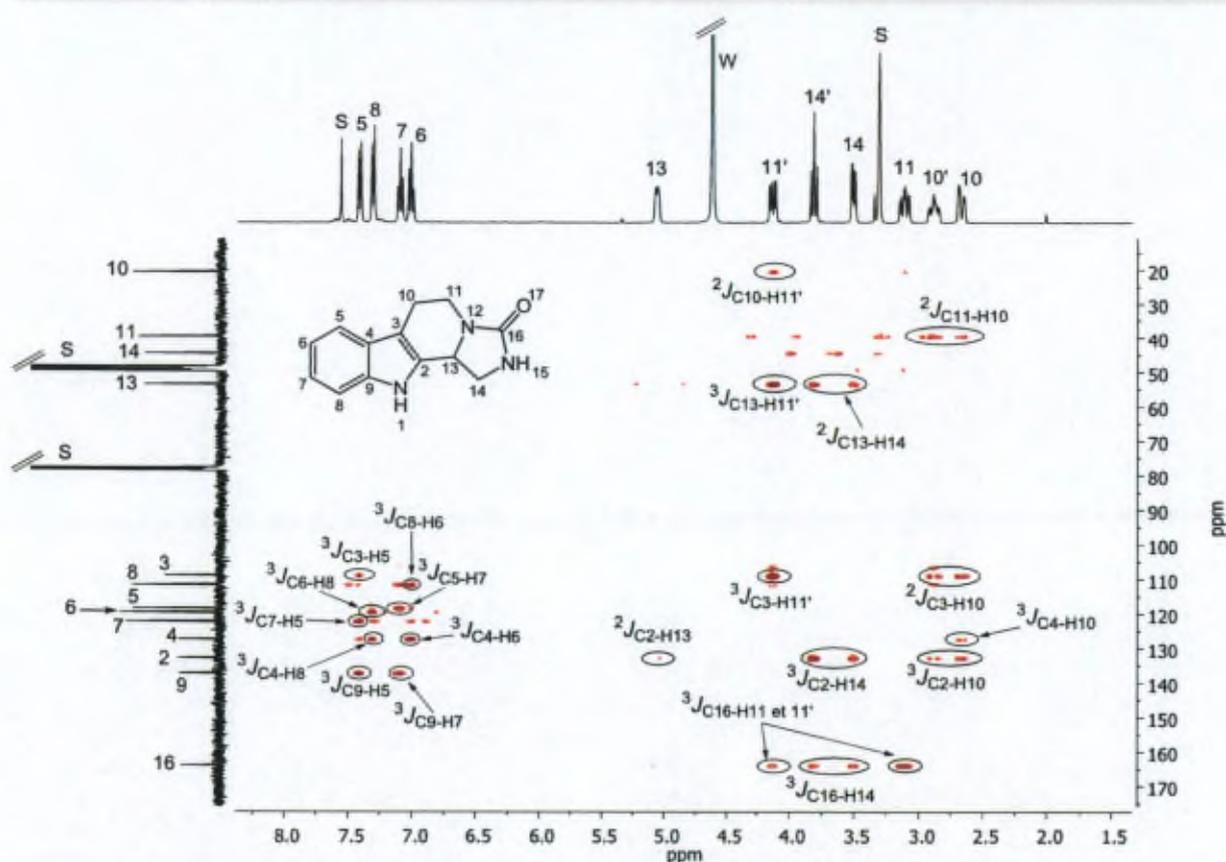


Figure 2.5 – Spectre HMBC (^1H - ^{13}C ; 9,4T; $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1, 298 K) du composé **5a**, S = Solvants, W = eau

Le spectre HMBC ^1H - ^{13}C permet également de confirmer ces attributions via les taches de corrélation supplémentaires observées (comme par exemple : $^3J_{\text{C}13-\text{H}11}$, $^3J_{\text{C}10-\text{H}11}$, $^3J_{\text{C}11-\text{H}10}$, $^3J_{\text{C}13-\text{H}14}$, $^3J_{\text{C}6-\text{H}8}$, $^3J_{\text{C}8-\text{H}6}$, $^3J_{\text{C}7-\text{H}5}$, $^3J_{\text{C}5-\text{H}7}$) qui sont compatibles avec la structure du dérivé de THBCI **5a**.

Après avoir caractérisé et validé la structure de tous ces composés (**5a-5h**), un "screening" de leur activité biologique a été effectué. Les résultats, présentés dans le chapitre IV (§4.1.1.2), montreront que les modifications apportées au niveau du noyau indolique de **5b** ainsi que celles effectuées au niveau du groupe ester de (+)-**5d** n'apportent pas d'avantages au niveau de l'activité biologique. C'est pour cette raison que les synthèses ont été réorientées vers d'autres types de modification du squelette THBCI, plus spécifiquement vers la substitution des atomes d'hydrogène porté par les atomes d'azote. Ces synthèses seront discutés dans le paragraphe 2.5.

Il est à remarquer que les produits décrits dans ce paragraphe 2.2, (**5a-5h**, **11**) sont des molécules dont la synthèse est originale.

2.3 Synthèse des dérivés de THIQI, THTPI et THBTPI

La méthodologie de synthèse développée au sein du laboratoire présente une grande polyvalence, pouvant donner accès à différents squelettes, en fonction de la structure de l'amine de départ.

Cette capacité a été exploitée afin d'étendre la méthodologie « one-pot » à l'utilisation d'autres noyaux aromatiques que le noyau indolique, pour accéder à des composés de type tétrahydroisoquinoléine (THIQI),¹³⁷ tétrahydrothiénopyridine (THTPI)¹³⁷ ou tétrahydrobenzothiényopyridine (THBTPI) avec un cycle Imidazolidinone accolé.

L'obtention de ce type de composés est importante car des dérivés de la tétrahydroisoquinoléine ont également été décrits comme étant des substances anticancéreuses. Les exemples les plus connus dans la littérature sont les antibiotiques antitumoraux de la famille des saframycines,¹³⁸ l'ectéinascidine¹³⁹ ou l'azapodophyllotoxine¹⁴⁰ (Figure 2.6).

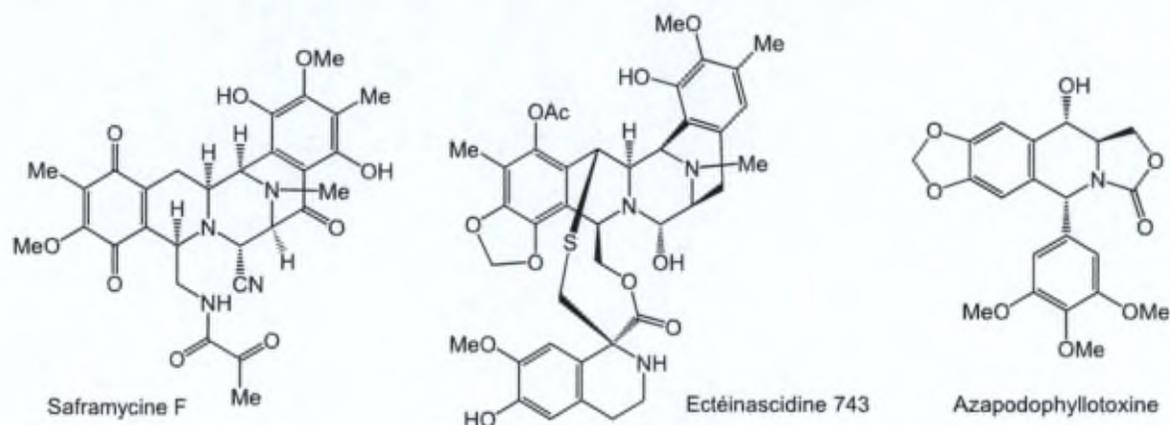


Figure 2.6 – Quelques dérivés de la THIQ présentant une activité antitumorale

La méthodologie « one pot » a été étendue avec succès à l'utilisation des différentes amines présentant un noyau benzénique substitué par un ou plusieurs groupements électrodonneurs (activées) **12a-c**, conduisant à la formation des dérivés de THIQI **13a-c**, avec des rendements globaux moyens (59-67%) (Schéma 2.10). Sauf indication contraire, les rendements présentés dans ce Schéma correspondent aux produits isolés après purification.

¹³⁷ Mémoire réalisé par Céline Guissart, sous mon encadrement; Laboratoire de Chimie Organique, ULB, 2012.

¹³⁸ a) Scott, J. D.; Williams, R. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669-1730 ; b) Dong, W.; Liu, W.; Yan, Z.; Liao, X.; Guan, B.; Wang, N.; Liu, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 239-244.

¹³⁹ D'Incalci, M.; Badri, N.; Galmarini, C. M.; Allavena, P. *Br J Cancer* **2014**, 646-650.

¹⁴⁰ Semenova, M. N.; Kiselyov, A. S.; Tsyganov, D. V.; Konyushkin, L. D.; Firgang, S. I.; Semenov, R. V.; Malyshev, O. R.; Raihstat, M. M.; Fuchs, F.; Stielow, A.; Lantow, M.; Philchenkov, A. A.; Zavelevich, M. P.; Zefirov, N. S.; Kuznetsov, S. A.; Semenov, V. V. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7138-7149.

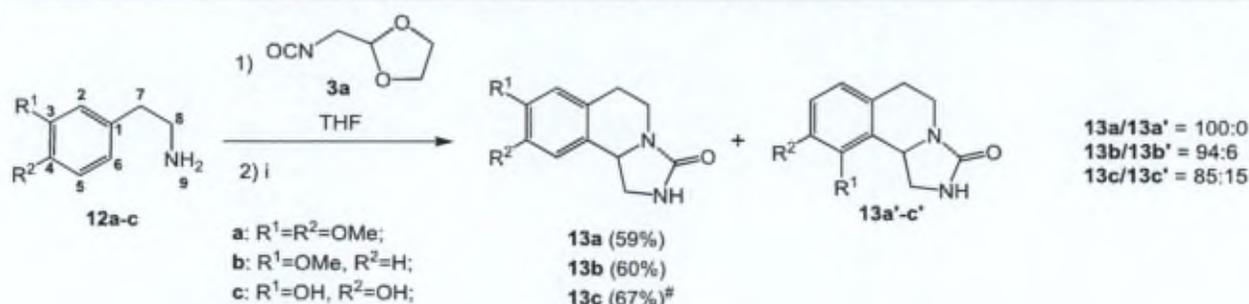


Schéma 2.10 - Synthèse des dérivés de THIQI. Réactifs : (i) évaporation du THF et ajout du HCl (2,8 M)/MeOH pour **12a** ou TFA pour **12b** et **12c**; 55°C pour **12a-b**, 50°C pour **12c**. #) Rendement calculé sur base de spectres RMN ¹H des différentes fractions.

Il faut signaler que seul le composé **13a** avait déjà été décrit dans la littérature, mais il avait été obtenu via une méthode différente qui implique la réduction d'une hydantoïne avec un rendement de 30%.¹⁴¹

Régiosélectivité de la réaction de formation des THIQ.

Dans le cas des amines **12a-c**, l'obtention de deux régioisomères **13a-c** et **13a'-c'** est possible car la cyclisation de type Pictet-Spengler peut avoir lieu en position 2 ou 6 du cycle aromatique (Schéma 2.10). Ces positions sont activées pour la substitution électrophile par les substituants donneurs d'électrons présents sur le noyau, selon les règles d'orientation classiques. Dans le cas de l'amine **12a**, seul l'isomère **13a** formé par cyclisation en position 6 a été obtenu. L'analyse du spectre RMN ¹H du brut réactionnel du composé **13b** permet d'estimer un rapport de 94:6 entre les deux régioisomères **13b** et **13b'**. Pour le dérivé **13c** un rapport de 85:15 entre les deux régioisomères a été calculé sur base du spectre RMN ¹H du brut réactionnel.

L'obtention des régioisomères **13a-b** comme produits majoritaires peut être expliquée par un encombrement stérique moindre au niveau de la position 6 des amines **12a-b** par rapport à la position 2. Une quantité plus importante de l'isomère formé par substitution en position 2 a été obtenue pour le produit **13c**, peut-être en raison du moindre encombrement stérique du groupe hydroxyle en position 3 par rapport au groupe méthoxy.

Dans le cas des amines **12a-b** qui sont moins nucléophiles que le noyau indolique, le suivi par RMN ¹H de la réaction de cyclisation en milieu acide a montré clairement la formation d'une imidazolone comme produit principal. La synthèse et l'isolement des imidazolones seront discutés par la suite (§ 2.4).

Il est important de rappeler que, comme décrit précédemment, l'ion *N*-carbamylium intermédiaire peut conduire à la formation d'une imidazolone via une déprotonation en position α . Ce processus est réversible dans des conditions acides et l'irréversibilité de la cyclisation de type Pictet-Spengler déplace cet équilibre vers la formation des produits cyclisés. Ainsi, la

¹⁴¹ Liao, Z. K.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4745-4752.

conversion de ces produits intermédiaires en produits de cyclisation **13a-b** a été réalisée en augmentant l'acidité du milieu réactionnel ou en prolongeant le temps de réaction. Le produit **13a** a pu être obtenu en utilisant un mélange HCl aq. (2,8 M)/MeOH (1:5) pour l'étape de cyclisation. La cyclisation du produit **13b** a été tentée dans un mélange MeOH/TFA (2:1) mais après 4 jours à température ambiante et 75h à 55°C seul l'imidazolone a pu être observée par RMN ¹H. Le milieu réactionnel a alors été concentré et solubilisé dans du TFA pur ce qui a mené à l'achèvement de la réaction en 4h à 55°C. Le composé **13c** a été synthétisé à partir du chlorhydrate de la dopamine en ajoutant de la triéthylamine dans le milieu réactionnel lors de l'étape de formation de l'isocyanate. Après la purification par FC, la THIQI **13c** a été obtenue en mélange avec le chlorhydrate de triéthylamine (TEA·HCl). Le rendement calculé sur base de cette fraction correspond à une valeur de 67%. Un lavage à l'acétonitrile a permis d'isoler le produit avec une pureté satisfaisante en vue des tests biologiques.

La méthodologie « one pot » a ensuite été étendue à l'utilisation de la thiophénéthylamine **15** et de la benzothiophénéthylamine **19** pour obtenir des dérivés originaux de THTPI (**17**) et THBTPI (**22**) avec des rendements globaux moyens (46 et 56%, respectivement) (Schéma 2.11). Sauf indication contraire, les rendements présentés correspondent aux produits isolés après purification.

En premier lieu, les amines **15** et **19** ont été synthétisées par la réduction des nitriles correspondants en présence du chlorure d'indium (InCl₃) et de NaBH₄, comme décrit par Saavedra *et al.*¹⁴²

La purification des produits **17** et **22** est délicate car ils co-éluent avec l'OPPh₃. Pour le produit **17**, une fraction contenant l'urée **16** et de l'OPPh₃ a été isolée par FC avant l'étape de cyclisation. Après la cyclisation en milieu acide, le composé **17** pur a été isolé avec un rendement de 46%.

La méthodologie « one pot » permet la synthèse du dérivé **22** avec un rendement de 56%, calculé à partir de l'amine **19**, sur base des spectres RMN ¹H. Pour obtenir ce composé **22** avec une pureté satisfaisante pour les tests biologiques, l'imidazolone **21** a été synthétisée en utilisant un mélange TFA/MeOH 1:9 pour l'étape de cyclisation. Cette imidazolone est plus facile à séparer de l'OPPh₃ et a pu être isolée avec un rendement de 67%. La cyclisation du composé **21** par réaction de Pictet-Spengler a été effectuée en utilisant un mélange HCl/MeOH/CH₂Cl₂ 1:5:15. La conversion dans cette étape est totale, le THBTPI **22** a été obtenu avec un rendement quantitatif après la purification par FC.

¹⁴² Saavedra, J. Z.; Resendez, A.; Rovira, A.; Eagon, S.; Haddenham, D.; Singaram, B. *J. Org. Chem.* **2011**, *77*, 221-228.

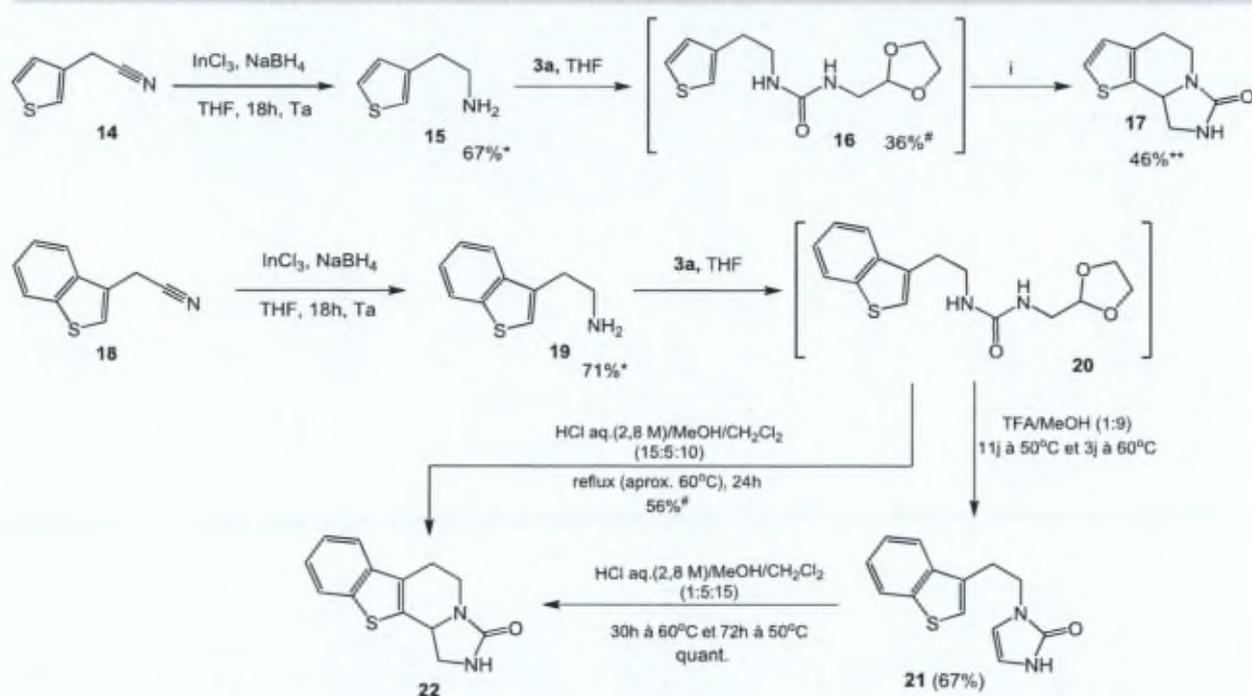


Schéma 2.11 - Synthèse des dérivés de THTPI et THBTPI. Réactifs : (i) évaporation du THF et ajout du TFA; 50°C ;
 *) l'expérience a été répétée trois fois et les rendements sont cohérents ; **) rendement calculé à partir de
 l'intermédiaire urée 16 ; #) rendement calculé sur base de spectres RMN ^1H des différentes fractions

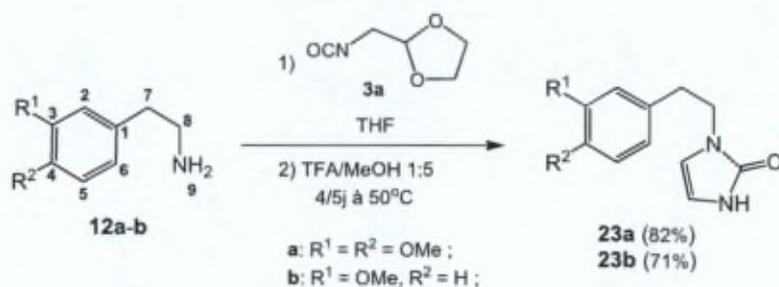
Les composés **13a** et **13b** sont solubles dans du CDCl_3 . Pour les autres dérivés (**13c**, **17** et **22**) des mélanges de $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ont été utilisés pour leur caractérisation par RMN ^1H .

2.4 Synthèses des imidazolones

Dans le cadre de ce travail, nous avons pu montrer que, pour les amines portant des noyaux aromatiques moins nucléophiles, en choisissant des conditions appropriées, il est possible d'arrêter la réaction à l'imidazolone et d'isoler celle-ci. Ceci est particulièrement intéressant car les imidazolones peuvent être traitées par des acides chiraux afin d'effectuer une réaction de Pictet-Spengler énantiosélective. Cette possibilité sera détaillée dans le Chapitre III.

Des nouvelles molécules de type imidazolone, dont la synthèse est originale, ont ainsi été obtenues.

Pour isoler les imidazolones via la méthodologie « one pot », des conditions acides plus douces par rapport à celles utilisées pour les produits cyclisés ont été employées. Ainsi, les imidazolones **23a-b** ont été synthétisées à partir des amines **12a-b** en utilisant un mélange TFA/MeOH 1:5 pour l'étape de condensation de l'aldéhyde avec le groupe NH de l'urée (Schéma 2.12). Ces composés ont été isolés avec de bons rendements après la purification par FC.

Schéma 2.12 – Synthèse des imidazolones **23a** et **23b**

Les réactions d'obtention des imidazolones ne sont pas faciles à suivre par CCM à cause de la superposition des taches correspondants aux urées, imidazolones et produits cyclisés de type THIQI, THBTPI ou THTPI.

La formation des imidazolones est, en revanche, facile à observer par RMN ¹H. Une des caractéristiques spectrales des imidazolones est la présence de signaux correspondant aux protons de la double liaison qui se présentent sous forme de triplets à 6,2-6,3 et 6,0 ppm (Figure 2.7 B). La multiplicité de ces signaux peut être expliquée par des couplages respectivement en ³J et ⁴J avec le proton du groupe NH. En effet, les taches de corrélation correspondant à ces couplages ont été observées dans le spectre dqfCOSY du produit.¹⁴³

Etant donné le fait que les urées intermédiaires, les imidazolones et les dérivés de THIQI ont des R_f proches en CCM, l'utilisation de la spectroscopie de RMN ¹H est un outil plus approprié pour le suivi de la réaction soit dans le cas où l'isolement de l'imidazolone est souhaité, soit pour s'assurer que la transformation de l'imidazolone en produit cyclisé est complète (Figure 2.7 A vs. B).

¹⁴³ Etudes effectuées dans le cadre du mémoire réalisé par Sébastien Soriano sur la synthèse des imidazolones. Laboratoire de Chimie Organique, 2010.

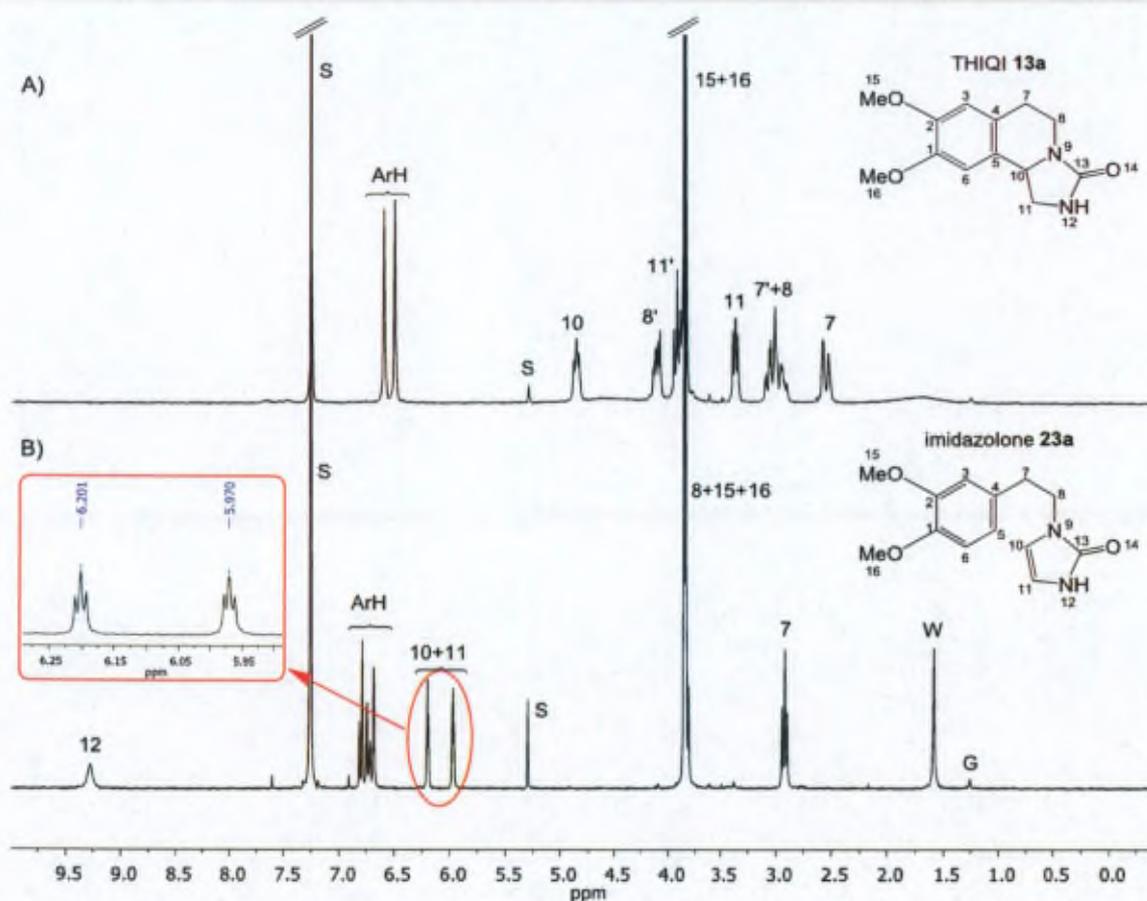


Figure 2.7 – Spectres RMN ¹H (CDCl₃, 298 K, 300 MHz) de la THIQUI 13a (A) et de l'imidazolone correspondante 23a (B); G = graisse, S = Solvants

La synthèse de l'imidazolone **24** s'est révélée un peu plus délicate (Schéma 2.13). La réaction a tout d'abord été testée dans les conditions classiques pour la synthèse des imidazolones (TFA/MeOH 1:9)¹²⁶, mais une faible conversion, d'environ 18%, a été observée par RMN ¹H. L'augmentation de l'acidité du milieu réactionnel jusqu'à un rapport TFA/MeOH de 1:4, a mené à l'obtention d'une quantité importante de produit cyclisé **17**. Les deux produits ont été isolés avec des rendements de 35% pour le produit cyclisé **17** et 15% pour l'imidazolone **24**.

Un deuxième essai a été effectué en utilisant toujours un mélange TFA/MeOH en rapport 1:9 pour l'étape de cyclisation, mais cette fois-ci en chauffant à 60°C (Schéma 2.13). Après 24h, une analyse RMN ¹H a montré la présence de 3 espèces : l'imidazolone **24**, l'urée et le produit cyclisé **17** dans un rapport 1:0,74:0,45. Ceci montre que le composé **17** commence à se former avant la conversion totale de l'urée. La réaction a été arrêtée lorsque la conversion de l'urée était pratiquement totale, les deux produits ont ensuite été purifiés par FC. Sur base des spectres RMN ¹H des différentes fractions chromatographiques, les rendements suivants ont été calculés : 35% pour l'imidazolone et 25% pour le produit cyclisé. Cependant, environ 10% de l'urée de départ a pu être isolée également après purification.

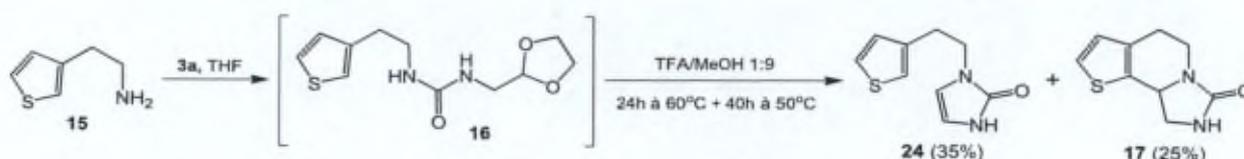


Schéma 2.13 – Synthèse de l'imidazolone 24

L'isolement conjoint de **24** et **17** n'est pas surprenant, car Meldal¹²⁶ et ses collaborateurs décrivent un comportement semblable pour un dérivé similaire portant des cycles thiophénéthylamine. Dans leurs travaux, un mélange imidazolone/produit de cyclisation a été décrit dans un rapport de 66:34, mais le rendement après purification de ces composés n'a pas été mentionné.

2.5 Alkylation et acylation des groupes NH

2.5.1 Alkylation et autres modifications effectuées sur les dérivés de THBCI et THBCP

Dans le chapitre introductif, il a été mentionné^{69, 71a, 96, 104} que la substitution des atomes d'hydrogène portés par les atomes d'azote des dérivés de la THBC augmente leur activité anticancéreuse. De même, en fonction de la nature des substituants, la neurotoxicité de ces dérivés peut varier.

Ainsi toute une nouvelle gamme de composés, originaux, possédant des structures très intéressantes du point de vue biologique, a été développée et leur synthèse est décrite dans ce paragraphe.

Tout d'abord nous sommes intéressés à déterminer si une alkylation sélective, sur un seul atome d'azote, pourrait être réalisée en utilisant un seul équivalent d'agent alkylant. Ainsi, lorsque l'alkylation du produit **5a** a été effectuée avec un équivalent d'iodure de méthyle et un équivalent de base, un mélange de produits **25a** et **25b** est obtenu. Ces deux composés ont été synthétisés, dans un deuxième essai, en utilisant 1,5 équivalents d'iodure de méthyle et deux équivalents de NaH et ensuite purifiés par FC (Schéma 2.14). En tenant également compte des fractions contenant un mélange des deux produits, les rendements calculés par RMN ¹H ont été de 41% pour **25a** et 49% pour **25b**.

L'alkylation ultérieure du composé **25a** par un équivalent de bromure de benzyle a mené à la formation du composé **25c**, dialkylé de manière non-symétrique, avec un rendement de 85%.

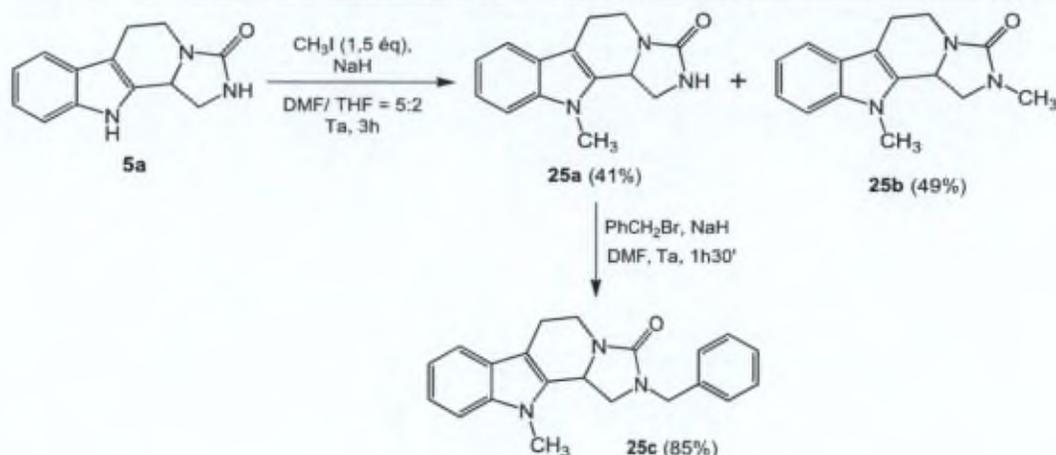


Schéma 2.14 – Obtention des composés 25a-c par alkylation

La méthode générale utilisée dans la suite de ce travail, pour alkyler les dérivés de THBCI, THBCP, THIQI, THTPI, THBTPI, précédemment décrits, est basée sur la déprotonation des atomes d'azote indolique et/ou celui du noyau de l'imidazolidinone (par du NaH dans un mélange DMF/THF), suivie par la réaction avec au moins 2 équivalents d'agent alkylant.

Le choix des agents alkylants a été orienté par les résultats des tests biologiques. Ceux-ci montrent une augmentation de l'activité antitumorale pour les dérivés di-benzylés (voir Chapitre IV, § 4.1.1.2). Nous nous sommes donc orientés vers la synthèse des dérivés de THBCI et THBCP portant des groupes benzyle sur les deux atomes d'azote.

Les composés **25d-l** ont donc été aisément obtenus à partir des dérivés de THBCI **5a-d** et THBCP **5e** en utilisant différents agents alkylants de type $\text{R-CH}_2\text{Br}$ ou $\text{R-CH}_2\text{Cl}$, avec des rendements compris entre 45% et 86% (Schéma 2.15).

L'obtention des produits **25e** et **25k** avec des rendements moyens (53% et 51% respectivement) peut être expliquée par la formation, dans le milieu réactionnel, de produits secondaires, qui ont été observés en CCM. Leur structure n'a cependant pas été déterminée.

Notons que, le produit **25l** (synthétisé à partir du dérivé de THBCP **5e**), est moins stable que les autres dérivés alkylés de THBCI. Une dégradation partielle de ce produit a été constatée après une conservation à -20°C pendant un an.

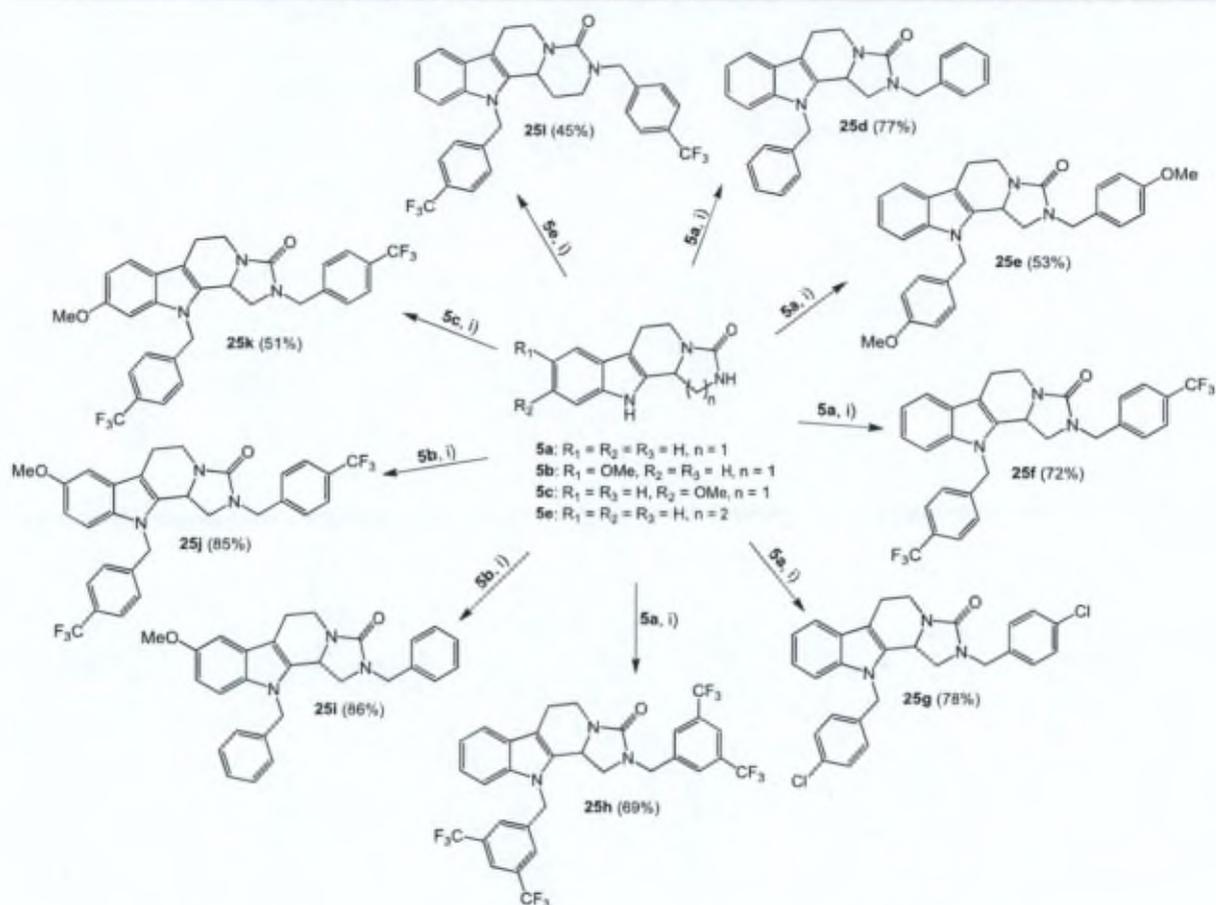


Schéma 2.15 – Benzoylation des produits 5a-c et 5e. i) NaH, THF/DMF, agent alkylant, Ta

Le dérivé de THBCI (+)-5d a également été alkylé par le bromure de benzyle. Lorsque le bromure de benzyle réagit sur cet ester, un mélange de l'ester de benzyle (+)-25m et l'ester de méthyle (+)-25n a été obtenu (Schéma 2.16). Le composé (+)-25m a été séparé de ce mélange avec une pureté satisfaisante pour les tests biologiques (Rdt = 47%), ce qui n'a pas été possible pour le composé (+)-25n. Le produit (+)-25m a alors été *trans*-estérifié, en présence d'acide *p*-toluène sulfonique (PTSA) dans du méthanol, pour donner (+)-25n (Rdt = 66%).

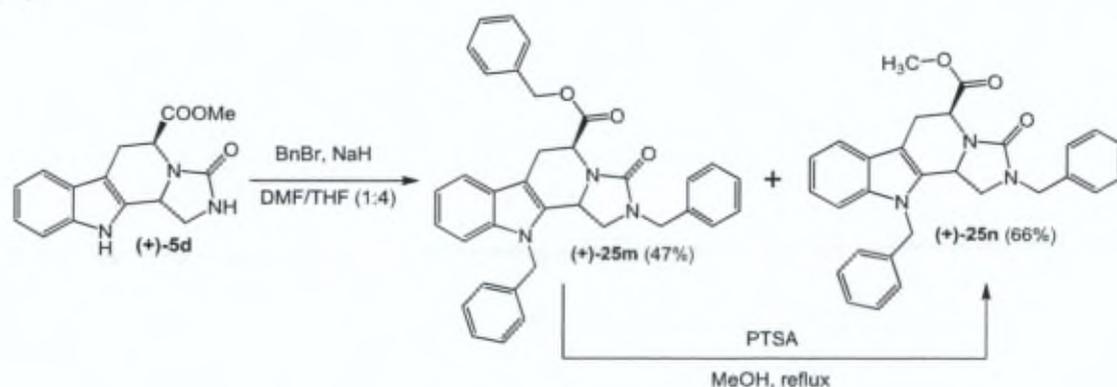


Schéma 2.16 – Benzoylation du composé (+)-5d

L'obtention de composés portant des substituants plus polaires a ensuite été envisagée. Le composé **25o** a ainsi été obtenu à partir du dérivé **5a** par alkylation avec le chlorure de 2-(méthyl)-1-méthylimidazole, disponible au laboratoire (Schéma 2.17).

Pour évaluer l'effet de la présence de substituants encore plus polaires sur l'activité biologique, le diacide **25q** a été synthétisé à partir du composé **25p** par déprotection des esters de *tert*-butyle en présence de TFA (Schéma 2.17).

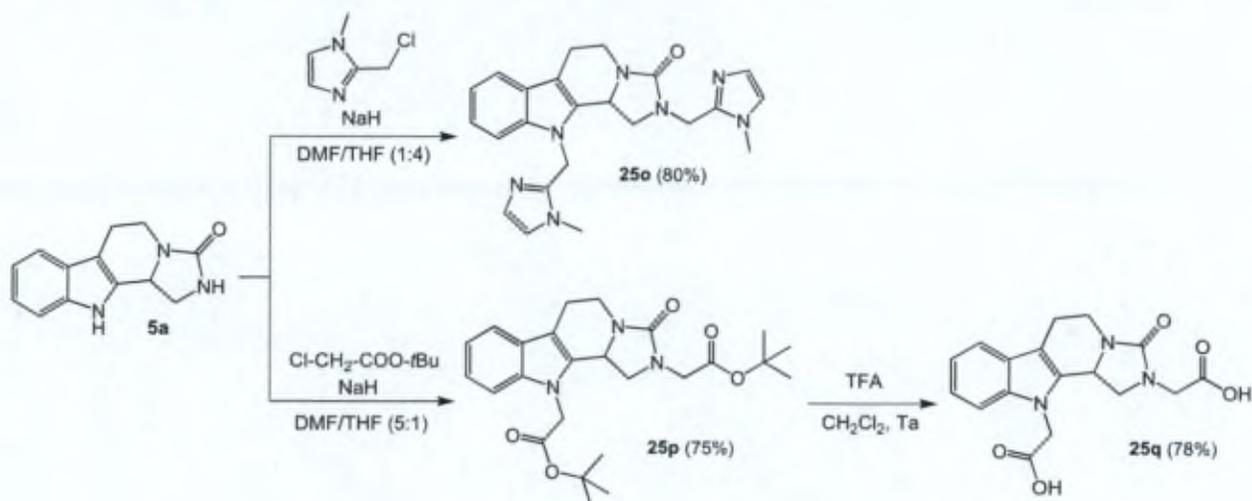


Schéma 2.17 – Obtention des composés portant des substituants polaires

Caractérisation par spectroscopie RMN ¹H des dérivés alkylés de THBCI.

La structure des produits alkylés **25a-q** a été déterminée à l'aide de la spectroscopie RMN (¹H, ¹³C, HSQC, HMBC) comme montré précédemment pour le composé **5a** (§2.2).

Par rapport au spectre RMN ¹H du composé de départ **5a**, les produits **25a-c** présentent des signaux supplémentaires correspondant aux groupes méthyle. Ces signaux se présentent sous forme de singulets : à 3,6 ppm pour le groupe méthyle lié à l'atome d'azote indolique et à 2.8 ppm pour le groupe méthyle lié à l'imidazolone (Figure 2.8).

Dans les cas des dérivés **25d-k**, les signaux des protons diastéréotopiques correspondants aux groupes CH₂ benzyliques sont des doublets constituant un système de type AB. Pour ces produits, les protons en position 18 sont plus déblindés que les protons en position 19 et possèdent une constante de couplage légèrement plus grande, d'environ 17-18 Hz par rapport à celle de 15 Hz pour les protons 19.

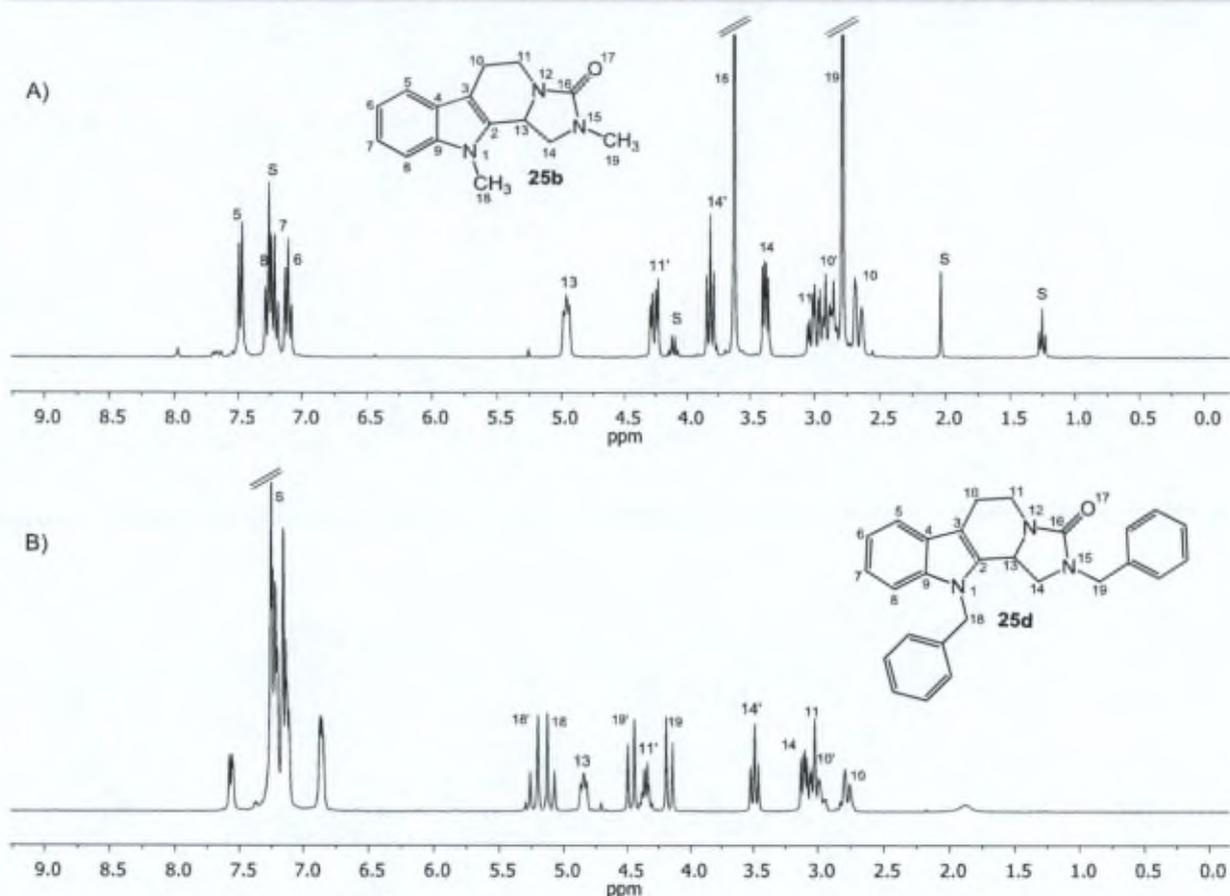


Figure 2.8 – Spectres RMN ^1H (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz) représentatifs pour les dérivés méthylés (A) et benzylés (B) de THBCI; S = solvant

Pour les composés (+)-**25m** et (+)-**25n**, les protons diastéréotopiques correspondants aux groupes CH_2 liés aux atomes d'azote imidazolone peuvent également être observés sur le spectre RMN ^1H . Par contre, les signaux des protons en position 18 se présentent comme un singulet ayant un déplacement chimique de 5,12 ppm pour (+)-**25m** ou se superposent avec les signaux des protons 11 et 13 pour le composé (+)-**25n**.

La diastéréotopie des groupes CH_2 est également observable dans les spectres RMN ^1H des produits **25o-q**, mais, dans ces cas-ci, les valeurs des constantes de couplage sont légèrement différentes.

2.5.2 Acylation du dérivé de THBCI **5a**

L'acylation de la THBCI **5a** a été effectuée dans du THF anhydre en présence d'un excès de chlorure d'acétyle (4,5 éq.), de TEA (1,2 éq.) et de quantités catalytiques de *N,N'*-diméthyl-4-aminopyridine (4-DMAP) dans le but d'obtenir un produit portant deux groupes acétyle sur les atomes d'azote. Dans ces conditions, seul l'atome d'azote de l'imidazolidinone est acylé pour donner le produit **25r** (Schéma 2.18). Le rendement moyen de la réaction peut être expliqué par la présence de produits secondaires, observés par CCM, dans les fractions

recupérées après la purification par FC. Leur structure n'a pas été déterminée. Néanmoins, il est important de préciser que le produit di-acylé n'a pas été observé parmi ces produits secondaires.

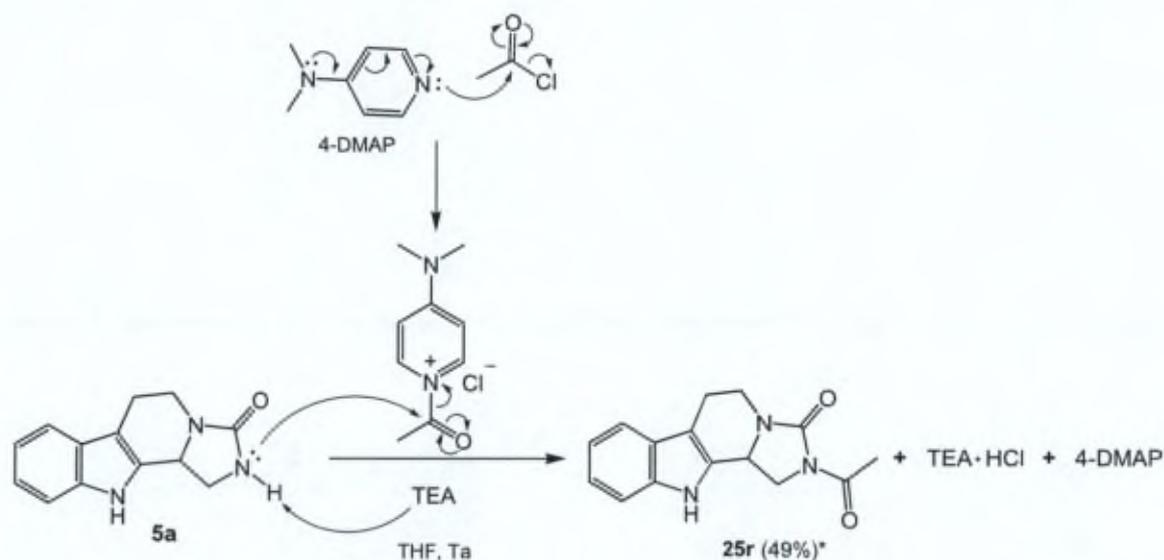


Schéma 2.18 – Acylation du dérivé de THBCI 5a. *) la synthèse a été réalisée deux fois et les rendements sont cohérents.

La sélectivité de la réaction d'acylation est liée à la différence de nucléophilie des deux atomes d'azote. En effet, l'azote imidazolindinonique, est plus nucléophile que l'azote indolique, le doublet non liant de ce dernier étant impliqué dans l'aromaticité. Comme illustré dans le Schéma 2.18, le chlorure d'acétyle est tout d'abord activé par la 4-DMAP. Cet intermédiaire est plus réactif vis-à-vis des nucléophiles, puisque le 4-DMAP est un meilleur groupe partant que le chlorure. Ainsi activé, le groupe carbonyle peut être attaqué par l'atome d'azote imidazolindinonique pour mener au composé acylé **25r**.

La tache de corrélation, qui permet d'attribuer sans équivoque la structure du composé **25r**, a été observée dans le spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (Figure 2.9). Même si cette tache est faible en intensité, la structure du dérivé **25r** a également été validée par spectroscopie de RMN ^1H via le déplacement chimique des protons CH_3 du groupe acyle qui possèdent une valeur caractéristique pour une substitution sur l'azote de l'imidazolindinone (environ 2,50 ppm dans CDCl_3 à 298 K et 300 MHz). L'attribution des structures pour les composés obtenus par la fonctionnalisation ultérieure du composé **25r** constitue une autre preuve de la structure de celui-ci (*vide infra*).

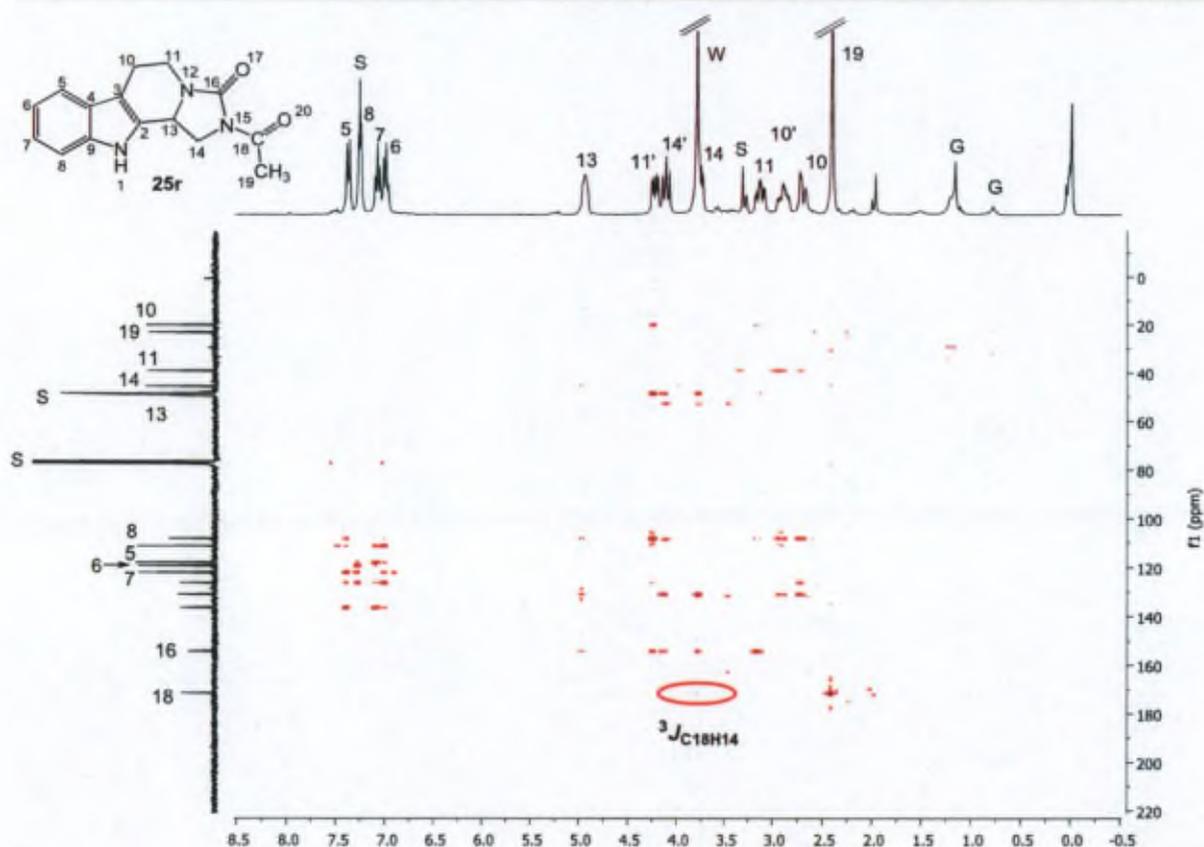


Figure 2.9 - Spectre HMBC du composé **25r** (^1H - ^{13}C , $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 5:1, 298 K; 9,4 T)

Un seul atome d'azote ayant été acylé, le produit **25r** a ensuite été alkylé sur l'atome d'azote indolique (Schéma 2.19). Cette réaction a été réalisée dans un mélange THF/DMF anhydre en présence de NaH (1,4 éq.) et de bromure de benzyle (1,2 éq.). Après une heure de réaction, l'intermédiaire benzylé **25s** a été observé par RMN ^1H et ESI-MS comme produit principal de la réaction. Le mélange réactionnel contenait également le composé **25t**. Lors d'un deuxième essai, après 17 heures de réaction, le groupe acyle a été éliminé pour donner le produit **25t** comme produit majoritaire. Néanmoins, le composé **5a**, obtenu par déprotection du substrat de départ **25r**, est également observé en CCM et une quantité importante de produit dibenzylé **25d** est également obtenue. Pour optimiser le rendement de cette réaction, une solution serait d'isoler le composé **25s**, en contrôlant le temps de réaction, et d'effectuer la déprotection du groupe acyle dans un deuxième temps.

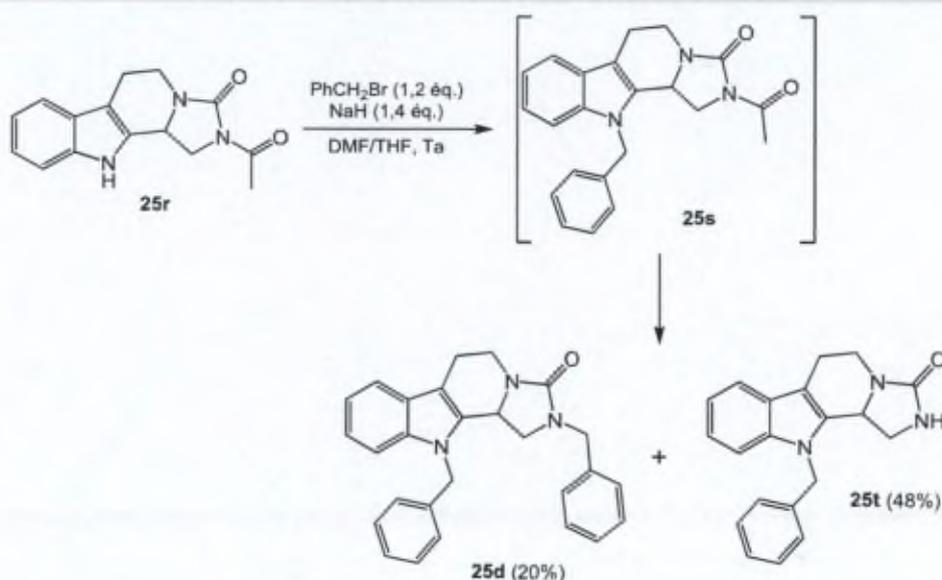


Schéma 2.19 – Alkylation du produit 25r

Le composé **25t** offre la possibilité d'une réaction avec un agent alkylant différent, sur l'atome d'azote de l'imidazolone. L'acylation sélective (**5a**→**25r**), suivie par la monoalkylation et la déprotection du groupe acyle, représente donc un outil qui permet la synthèse des produits portant des substituants différents sur les deux atomes d'azote. Ainsi, des nouvelles voies de synthèse peuvent être développées afin de varier les propriétés pharmacologiques des dérivés de THBCI. Cette stratégie n'a cependant pas été exploitée dans le présent travail, faute de temps.

2.5.3 Alkylation des dérivés de THIQI, THBTPI, THTPI

Tout comme les dérivés de THBCI, les dérivés de THIQI **13a-c**, THBTPI **22** et THTPI **17** ont été alkylés sur l'atome d'azote afin d'augmenter leur activité antitumorale. L'agent alkylant (bromure de 4-trifluorométhylbenzyle) a été choisi après avoir analysé les résultats des tests biologiques des dérivés de THBCI. Ceux-ci montrent que les composés portant ce substituant sur les atomes d'azote ont une bonne activité contre plusieurs lignées cellulaires tumorales (résultats détaillés dans le Chapitre IV). Les alkylations ont été réalisées en présence de NaH, dans du DMF/THF à température ambiante et l'avancement des réactions a été suivi par CCM. Les composés finaux, **26a-c**,¹³³ **27** et **28**, ont été purifiés par chromatographie sur colonne et isolés avec des rendements moyens à très bons (51-86%) (Schéma 2.20). Il faut noter que ces composés n'ont jamais été décrits dans la littérature.

Dans le cas du dérivé **26c**, obtenu à partir de la dopamine, les groupes hydroxyle présents sur le noyau aromatique sont également alkylés selon cette procédure.

Le rendement obtenu pour le composé **26b** est moyen (54%) à cause d'une erreur de manipulation (arrêt précoce de la réaction). Pour les produits **26c** (51%) et **27** (60%), certaines

fractions provenant de la colonne FC contenaient des impuretés. Comme c'est avant tout la pureté des produits qui a été privilégiée, nous ne nous sommes pas attachés à optimiser les rendements.

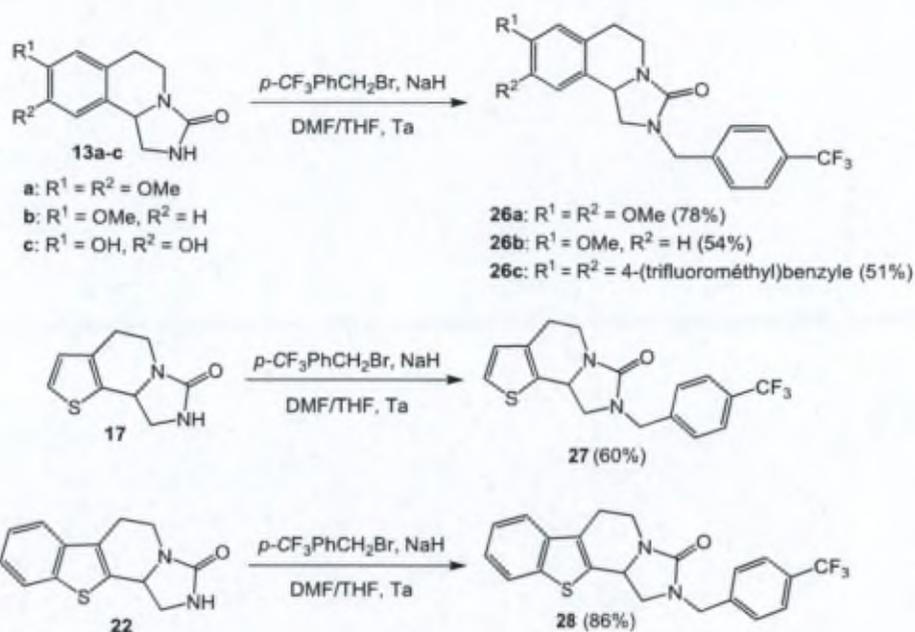


Schéma 2.20 – Alkylation des dérivés de THIQI, THTPI et THBTPI

2.6 Autres réactions

2.6.1 Essais d'alkylation des dérivés de THBCI par des agents portant des chaînes aliphatiques

Pour étendre la librairie des dérivés de THBCI, l'alkylation des atomes d'azote par des longues chaînes aliphatiques a également été entreprise.

La synthèse du dérivé **29** portant des chaînes hexyle a été réalisée dans du DMF à chaud, en présence de NaH (Schéma 2.21). La conversion complète du substrat de départ **5a** a été constatée par CCM et RMN et le produit **29** semble être le seul produit obtenu. Cependant, lors du séchage à la rampe à vide pour enlever les traces de DMF, une dégradation du produit a été constatée, une tache supplémentaire a été observée en CCM. Une purification par FC a été alors effectuée sur le produit **29**, mais une réapparition du produit secondaire a été constatée dans les fractions provenant de la colonne.

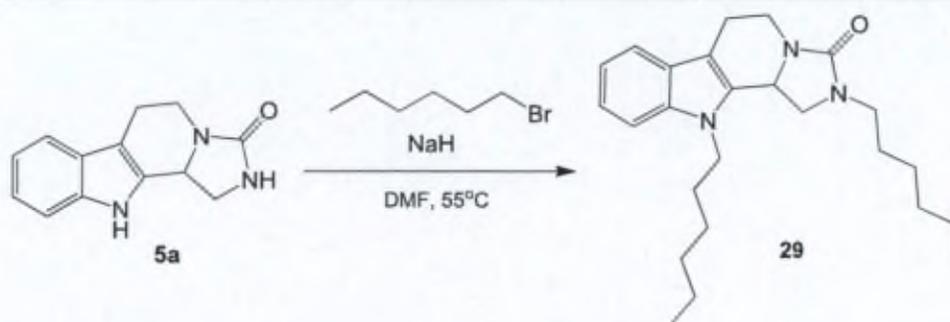


Schéma 2.21 – Essai de synthèse des dérivés de THBCI substitués par des chaînes alkyles

Pour optimiser cette synthèse, le THF pourrait être utilisé comme solvant, étant plus volatile. Néanmoins, la dégradation du composé **29** dans des conditions où les dérivés substitués par des groupes benzyle restent stables suggère une instabilité intrinsèque de ce composé qui n'est pas compatible avec les tests pharmacologiques.

2.6.2 Essais d'obtention des dérivés portant un cycle imidazolidin-2-thione accolé

D'un point de vue biologique, il serait intéressant d'évaluer des dérivés contenant un groupe thionyle à la place du groupe carbonyle, pour tenter de comprendre le rôle que cette partie de la molécule joue dans l'activité biologique. Dans ce but, la synthèse du composé **31** a donc été entreprise (Schéma 2.22).

Tout d'abord, la synthèse de ce produit a été tentée via une version modifiée de la méthodologie « one-pot ». En effet, en remplaçant le CO_2 par du CS_2 , l'isothiocyanate **3c** a été obtenu via la réaction de Staudinger aza-Wittig. Cet isothiocyanate est mis en réaction avec la tryptamine pour obtenir l'intermédiaire thiourée **30** qui a été purifié par FC et isolé avec un rendement de 84%. Lorsque ce composé est mis en milieu acide, un dérivé inattendu s'est formé par l'attaque du soufre sur l'acétal comme illustré dans le Schéma 2.22. Ceci est une conséquence de la nucléophilie plus élevée de l'atome du soufre du groupe thiourée, par rapport à l'atome d'oxygène dans le cas des intermédiaires urée. La structure du composé **32** a été confirmée par analyses RMN (1D et 2D) et ESI-MS. Ce composé est assez polaire et son rendement moyen peut être expliqué en partie par sa forte rétention sur gel de silice lors de la purification. Le composé **31** a été détectée par RMN ^1H , en faible quantité, dans certaines fractions de chromatographie, mais il n'a pas pu être séparé des sous-produits de la réaction (SPPH_3 , produits secondaires).

La deuxième méthode pour obtenir le composé **31** implique la transformation des groupes urée en thio-urée en utilisant le réactif de Lawesson¹⁴⁴ (Schéma 2.22). Cet essai n'a pas donné le résultat souhaité. Dans les conditions testées, le substrat de départ est resté inchangé dans le milieu réactionnel.

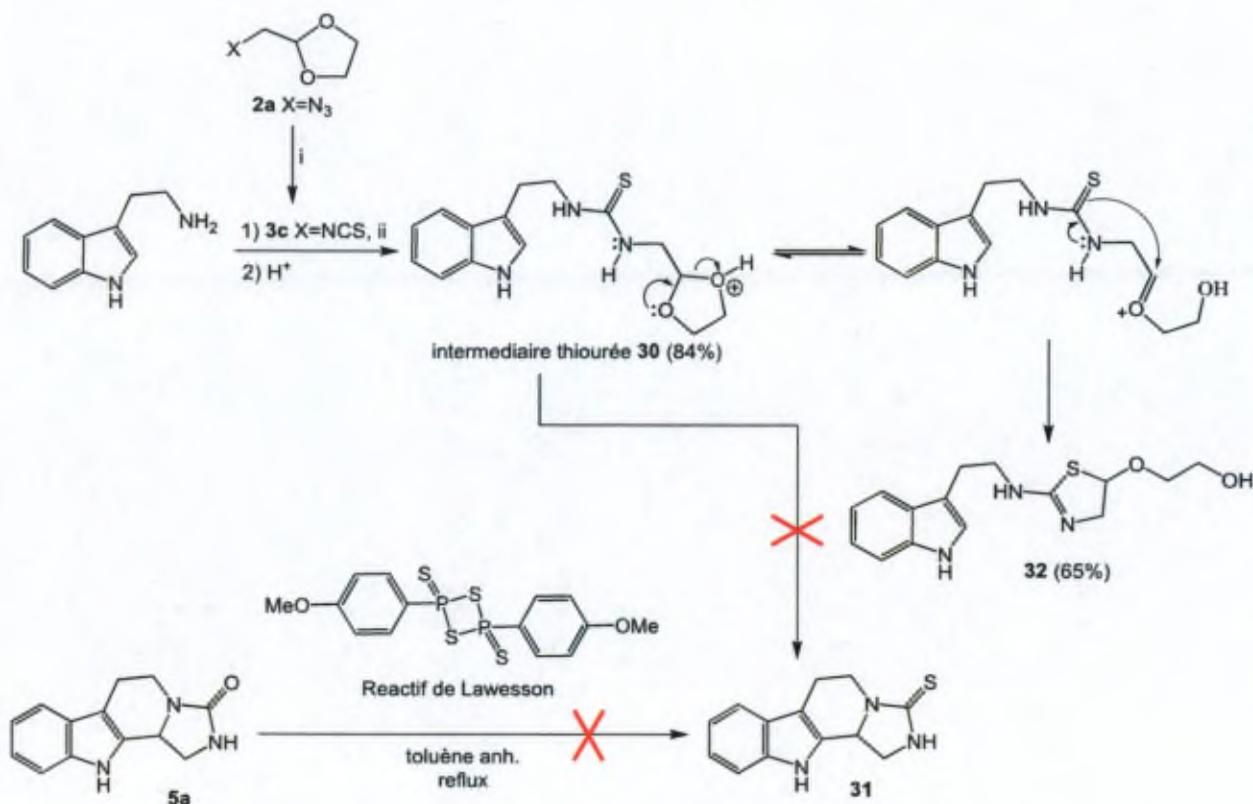


Schéma 2.22 – Essai d'obtention d'un dérivé sulfuré de la THBC. Réactifs : i) PPh₃, CS₂, THF, Ta; ii) THF, Ta

¹⁴⁴ a) Thanigaimalai, P.; Lee, K.-C.; Bang, S.-C.; Lee, J.-H.; Yun, C.-Y.; Roh, E.; Hwang, B.-Y.; Kim, Y.; Jung, S.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1555-1562 ; b) Ryoda, A.; Yajima, N.; Haga, T.; Kumamoto, T.; Nakanishi, W.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Ishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 133-141.

2.7 Conclusions

La méthodologie « one-pot » développée précédemment au laboratoire a été utilisée avec succès pour la synthèse d'une petite librairie de dérivés de tétrahydro- β -carbolines. De plus, cette procédure a été étendue à l'utilisation d'autres types d'amines pour obtenir des dérivés de tétrahydroisoquinoléines, tétrahydrothiénopyridines et tétrahydrobenzothiényridines. La synthèse d'un dérivé cationique a également été effectuée avec succès. Ces composés ont été obtenus avec des bons rendements et sont de pureté élevée, nécessaire pour évaluer leurs propriétés biologiques. Ces structures sont reprises dans le Schéma 2.23 qui montre l'ensemble de dérivés de THBCI, THBCP, THIQI, THTPI et THBTPI qui ont été synthétisés au cours de ce travail.

La deuxième série de composés synthétisés est composée de dérivés substitués sur les atomes d'azote, en général par des groupes benzyle, car ceux-ci sont connus pour améliorer l'activité biologique.^{69, 71b} Des dérivés alkylés de THBCI, THBCP, THIQI, THTPI, THBTPI ont également été obtenus avec de bons rendements et des puretés satisfaisantes pour les analyses pharmacologiques.

La méthodologie « one-pot » permet également l'accès à des imidazolones et à des urées dont l'importance sera discutée dans le chapitre suivant (Chapitre III).

Parmi les 44 composés synthétisés et décrits dans ce chapitre, il faut remarquer que 43 d'entre eux sont des produits originaux.

Enfin, l'obtention de dérivés comprenant un groupe thionyle ou portant des chaînes alkyles sur les atomes d'azote n'a pu être réalisée avec succès dans le cadre de ce travail.

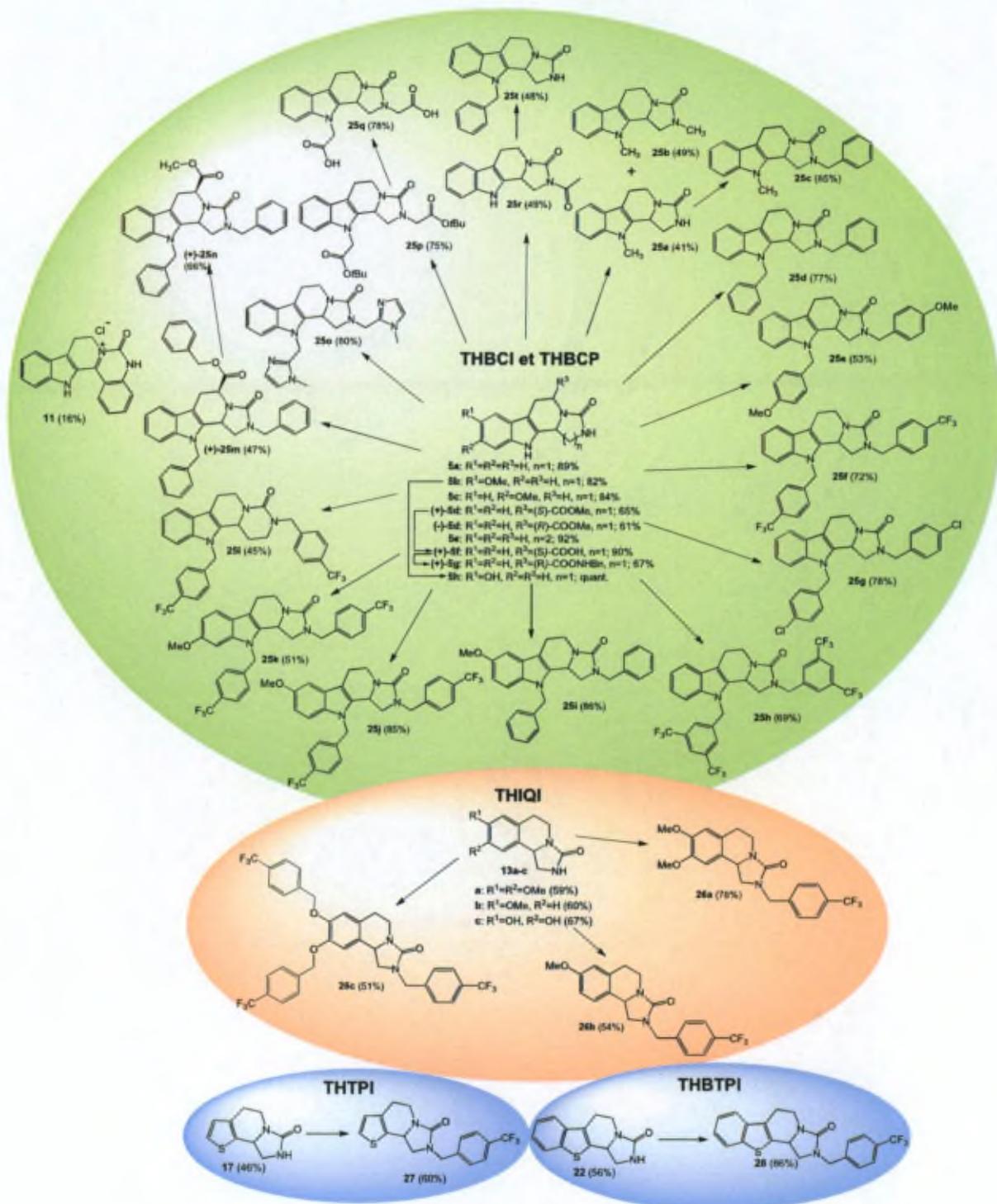


Schéma 2.23 – Structures des dérivés de THBCI, THBCP, THIQI, THTPI et THBTPI synthétisés dans le cadre de ce projet en vue des tests biologiques

Chapitre III

Synthèse énantiosélective de dérivés de THBCI

3.1 Préambule

Le thalidomide, la kétamine, le limonène et l'asparagine ne sont que quelques exemples de molécules chirales dont les deux énantiomères ont des propriétés pharmacologiques différentes dues à la reconnaissance moléculaire contrôlée par la chiralité.

Il n'est donc pas étonnant que la FDA (Food and Drug Administration, USA) impose aujourd'hui des normes¹⁴⁵ spéciales pour tout développement des principes actifs chiraux. Entre autres, ces normes imposent une évaluation individuelle des deux énantiomères séparés sur les plans pharmacologique et clinique. Le développement d'un seul d'entre eux comme médicament est exigé si les deux énantiomères présentent des différences considérables en efficacité, spécificité ou lorsqu'un isomère est inerte. De plus, il faut tenir compte du fait que la toxicité ou des propriétés pharmacologiques inattendues peuvent avoir leur origine non pas dans l'isomère lui-même, mais dans un métabolite spécifique à un des isomères. C'est pour cette raison que l'interconversion potentielle des énantiomères doit être examinée par analyse pharmacocinétique dans la phase clinique I. En ce qui concerne les normes européennes, des recommandations similaires sont reprises dans la Directive 81/852/EEC consacrée à l'investigation des substances chirales.

C'est pour toutes ces raisons que nous nous sommes intéressés au développement d'une version énantiosélective de notre méthodologie « one-pot » (Chapitre II, § 2.1) pour obtenir des dérivés de tétrahydro- β -carboline qui présentent une activité biologique intéressante (analyses détaillées dans le chapitre IV, § 4.1.1.2)

Outre les consignes légales concernant le développement d'un médicament basé sur un principe actif chiral, le développement d'une version hautement énantiosélective rendrait notre méthodologie « one-pot » encore plus utile et intéressante et augmenterait l'éventail des réactions catalytiques énantiosélectives en chimie des ions *N*-acyliminium.

¹⁴⁵ Development of New Stereoisomeric Drugs.

<http://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm122883.htm>

3.2 Introduction sur les réactions de type Pictet Spengler asymétriques

La version énantiosélective de la réaction de Pictet-Spengler existe naturellement dans les différentes plantes contenant des alcaloïdes dérivés de THBC ou THIQ grâce à l'enzyme strictosidine synthétase (STR).¹⁰⁹

En synthèse organique, deux possibilités sont décrites dans la littérature pour obtenir des produits de cyclisation de type de Pictet-Spengler énantio purs.

La première possibilité est l'utilisation de réactions diastéréosélectives dans lesquelles la présence d'un centre stéréogénique sur l'ion iminium contrôle la formation du deuxième centre. L'ion iminium chiral peut-être généré à partir des dérivés de tryptophane, en utilisant des composés carbonylés chiraux ou des copules chirales sur l'atome d'azote.

La deuxième option consiste à introduire l'asymétrie dans la molécule en utilisant un adjuvant externe en quantité stœchiométrique ou catalytique.

Ces deux possibilités seront détaillées dans les paragraphes suivants.

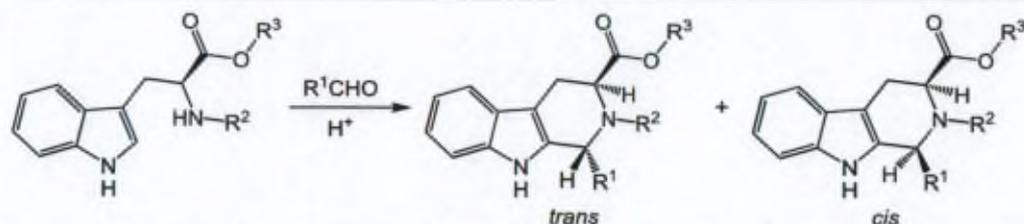
3.2.1 Synthèse de dérivés de THBC impliquant une induction asymétrique interne

3.2.1.1 Le centre stéréogénique est porté par l'amine – Synthèse à partir des dérivés de tryptophane

Une nomenclature particulière est utilisée dans la littérature pour désigner les diastéréoisomères qui peuvent être obtenus à partir d'ions iminium chiraux, dans le contexte spécifique de la réaction de Pictet-Spengler effectuée à partir des dérivés du tryptophane. L'appellation *cis* est utilisée dans le cas où les atomes d'hydrogène portés par les deux centres stéréogéniques se trouvent sur la même face du cycle tétrahydropyridine (Tableau 3.1).

La méthode la plus simple pour générer des ions *N*-acyliminium chiraux est d'utiliser des dérivés du tryptophane comme source azotée. Cook et ses collaborateurs¹⁴⁶ montrent que la nature des substituants des aldéhydes et de l'atome d'azote joue un rôle majeur dans le contrôle de la diastéréosélectivité. Par contre, le groupe ester influence de manière négligeable la sélectivité (Tableau 3.1). Dans le cas où l'atome d'azote n'est pas substitué ($R^2 = H$), l'isomère *cis* est formé de manière préférentielle. Inversement, lorsque l'azote porte un substituant R^2 , les diastéréoisomères *trans* sont majoritaires et la proportion de l'isomère *trans* augmente avec la taille de R^2 .

¹⁴⁶ Cox, E. D.; Hamaker, L. K.; Li, J.; Yu, P.; Czerwinski, K. M.; Deng, L.; Bennett, D. W.; Cook, J. M.; Watson, W. H.; Krawiec, M. J. *Org. Chem.* **1997**, *62*, 44-61.



R ¹	R ²	R ³	Conditions non-acides, aprotiques (<i>trans/cis</i>)	Conditions acides (<i>trans/cis</i>)
Me	Bn	Me	74 : 26	88 : 12
Me	CH(Ph) ₂	Me	90 : 10	100 : 0
<i>n</i> Pr	Bn	Me	77 : 23	89 : 11
Me	H	Me	-	25 : 75
Me	Bn	<i>i</i> Pr	77 : 23	87 : 13
C ₆ H ₁₁	Bn	Me	100 : 0	100 : 0

Tableau 3.1 – Diastéréosélectivité de la synthèse des dérivés de THBC 1,2,3-trisubstitués¹⁴⁶

Les diastéréoisomères peuvent généralement être séparés par chromatographie flash. Les auteurs montrent que l'isomère *trans*, thermodynamiquement plus stable, pourrait être obtenu exclusivement à partir de l'isomère *cis* (ou du mélange *cis / trans*), par épimérisation, en modifiant les conditions expérimentales (temps de réaction, acidité). Le procédé d'épimérisation est amorcé par la protonation de l'atome d'azote suivie par le clivage de la liaison C-N pour générer un carbocation, qui peut recycler pour donner le diastéréoisomère *trans* (Schéma 3.1).

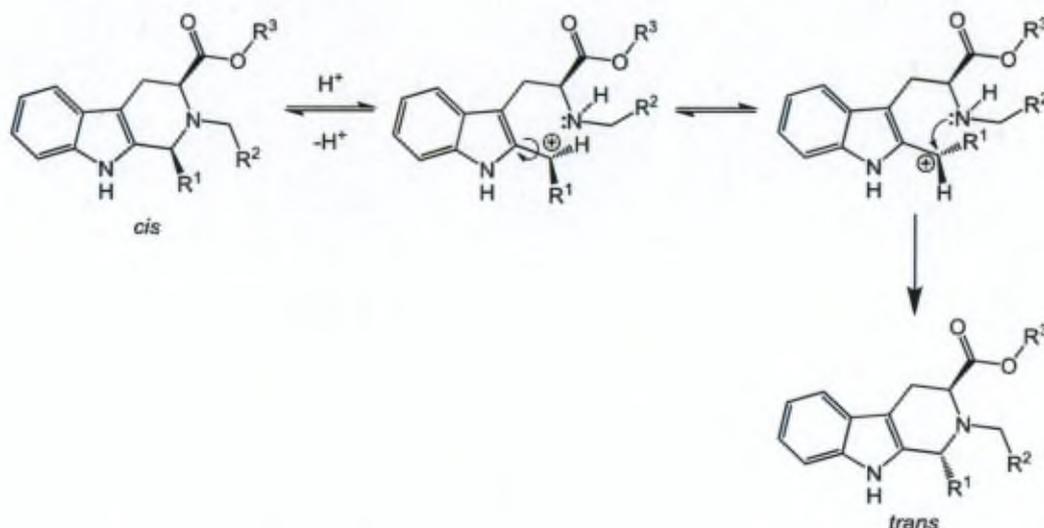


Schéma 3.1 – Epimérisation du centre stéréogénique en position C1 par clivage de la liaison C-N¹⁴⁶

Les travaux de Meldal portent sur des dérivés de THBC apparentés aux molécules auxquelles nous nous sommes intéressées. Ces produits sont obtenus via des cyclisations

diastéréosélectives des ions *N*-acyliminium¹⁴⁷, ou *N*-carbamylium¹²⁵ (illustrées dans le chapitre I, §1.2.3.5). Pour rappel ces auteurs utilisent des aldéhydes protégés sous forme de *N*-Boc-1,3-oxazinanés qui sont connectés, soit par couplage peptidique, soit par un lien de type urée, à diverses amines aromatiques (dont le tryptophane) greffées sur des résines. Traités en milieu acide, ces composés libèrent la fonction aldéhyde qui peut subir l'attaque nucléophile intramoléculaire de l'azote, ce qui conduit à la formation d'un ion *N*-acyliminium ou *N*-carbamylium cyclique, hautement réactif. Par la suite, une réaction de type Pictet-Spengler quantitative et *trans* stéréosélective se produit par l'attaque de l'indole sur l'ion iminium, ajoutant ainsi deux cycles fusionnés au groupe indole. L'explication de la stéréosélectivité *trans* observée se base sur le développement d'une interaction non-favorable des groupes carbonyle dans le cas de l'attaque du noyau indolique du côté du bras latéral peptidique (Schéma 3.2).

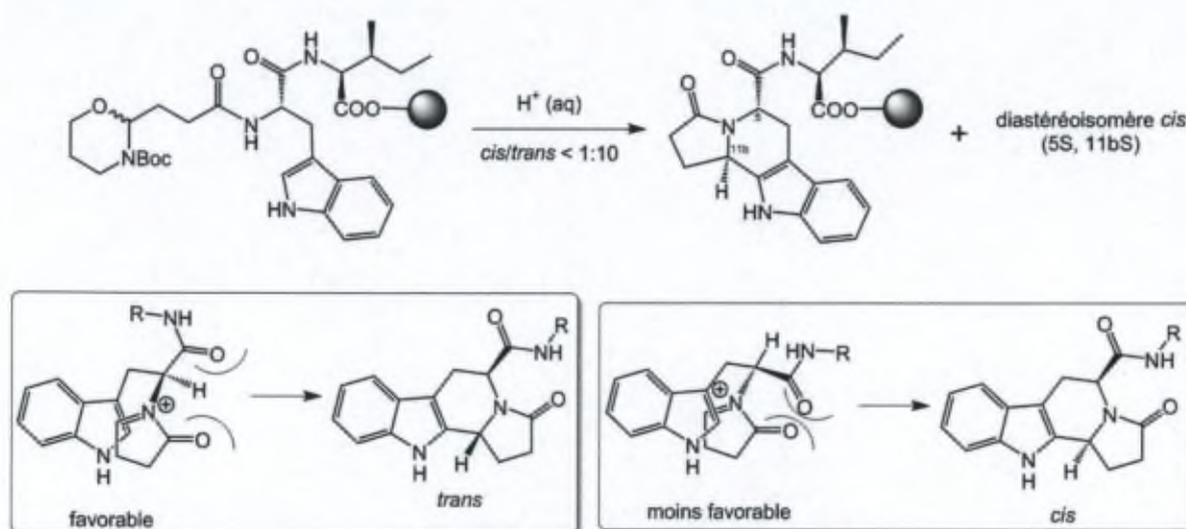


Schéma 3.2 - Origine de la sélectivité pour la synthèse de dérivés de THBCI portant un cycle pyrrolidin-2-one accolé¹⁴⁷

Notre méthodologie « one pot » permet également la synthèse des dérivés énantio-purs à partir des esters de tryptophane. Comme montré dans le Chapitre II, la réaction a lieu avec un excès diastéréoisomérique (*de*) de 80%.

3.2.1.2 Le centre stéréogénique est porté par l'aldéhyde

Lorsque la tryptamine est condensée avec différents aldéhydes portant en position α une fonction amine protégée de configuration absolue connue (*S*), l'isomère 1(*R*), 10(*S*) est obtenu préférentiellement (Schéma 3.3).¹⁴⁸ C'est la nature du groupe protecteur qui détermine la

¹⁴⁷ Nielsen, T. E.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3765-3773.

¹⁴⁸ Ducrot, P.; Rabhi, C.; Thal, C. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 2683-2692.

stéréosélectivité de la réaction. La meilleure sélectivité pour l'isomère 1(*R*),10(*S*) est obtenue lorsque l'amine est protégée par un groupe benzyloxycarbamate (Cbz). L'utilisation des groupes pyrrole ou la phthalimide (Pht) mène à l'inversion du rapport entre les deux isomères (Tableau 3.2). Une augmentation de la température conduit à une diminution de la diastéréosélectivité mais l'augmentation de l'acidité, (en utilisant 10 éq. de TFA au lieu de 2 éq.) ne semble pas avoir d'effet sur la sélectivité. La stéréosélectivité obtenue peut-être expliquée en utilisant le modèle de Felkin-Anh (Schéma 3.3). Les auteurs considèrent le groupe NHCbz comme étant le groupe le plus encombrant. L'attaque la plus favorable s'effectuerait donc sur la face la moins encombrée du plan de la double liaison C=N, la face opposée par rapport à ce groupe.

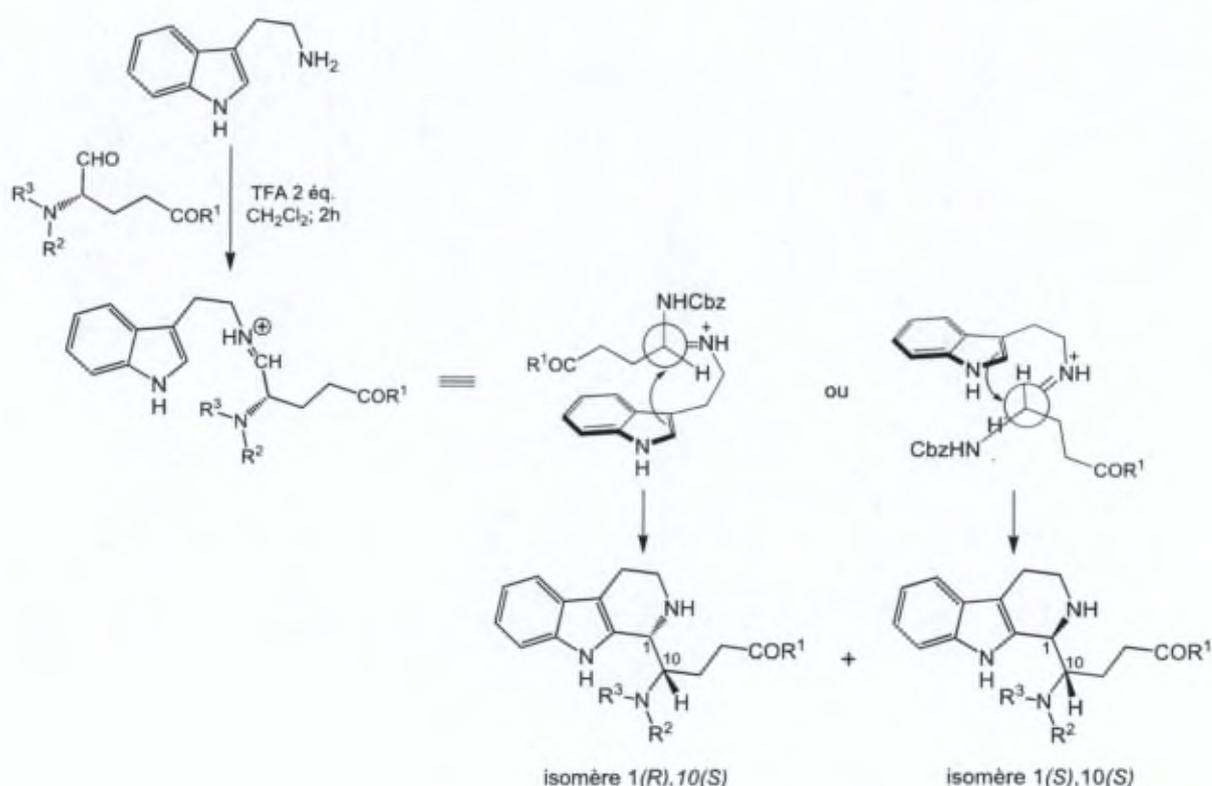


Schéma 3.3 – Exemple de réaction de Pictet Spengler diastéréosélective en utilisant un aldéhyde chiral¹⁴⁸

R ¹	R ²	R ³	T [°C]	Rdt [%]	1(<i>R</i>),10(<i>S</i>)	1(<i>S</i>),10(<i>S</i>)
<i>t</i> BuO	Cbz	H	-40	81	100	0
<i>t</i> BuO	Cbz	H	-40	77	100	0
<i>t</i> BuO	Cbz	H	Ta	61	75	25
<i>t</i> BuO	Boc	H	-40	71	90	10
<i>t</i> BuO	COOMe	H	-40	73	91	9
<i>t</i> BuO	Pyrrole	-	-50	62	0	100
Et ₂ N	Pht	-	Ta	68	7	93

Tableau 3.2 – Diastéréosélectivité de la réaction de Pictet Spengler à partir des aldéhydes chiraux¹⁴⁸

3.2.1.3 Le centre stéréogénique est porté par l'atome d'azote

L'équipe de Koomen¹⁴⁹ a développé une approche permettant l'accès à des dérivés énantipurs de la THBC en utilisant la réaction de Pictet-Spengler sur la tryptamine portant sur l'amine un groupe sulfoxyde comme copule chirale (Schéma 3.4). Plusieurs types de sulfoxydes ont été testés et les meilleurs résultats ont été obtenus avec la *p*-tolylsulfinamine. Dans ce cas l'isomère majoritaire est isolé par recristallisation. Le substituant 2-éthoxynaphtyle sur le soufre exerce un effet similaire sur le diastéréocontrôle, mais il rend la séparation des diastéréoisomères plus difficile. La liaison N-S étant sensible à l'action des acides, il a fallu identifier des catalyseurs protiques et métalliques (acides de Brønsted et de Lewis) capables de promouvoir la réaction sans enlever l'auxiliaire chiral.

Après l'examen de plusieurs acides protiques ou de Lewis, les meilleurs résultats pour la séquence condensation/cyclisation sont obtenus avec l'acide camphorsulfonique (CSA). Cet acide chiral n'influence pas la diastéréosélectivité car des résultats identiques sont obtenus avec chacun de ses deux énantiomères. La sélectivité de cette réaction est donc complètement contrôlée par la chiralité de l'auxiliaire. Une fois la réaction de Pictet-Spengler diastéréosélective effectuée, l'auxiliaire chiral est facilement enlevé par un traitement acide spécifique (HCl/EtOH) pour donner les dérivés de THBC avec des excès énantiomériques (*ee*) élevés.

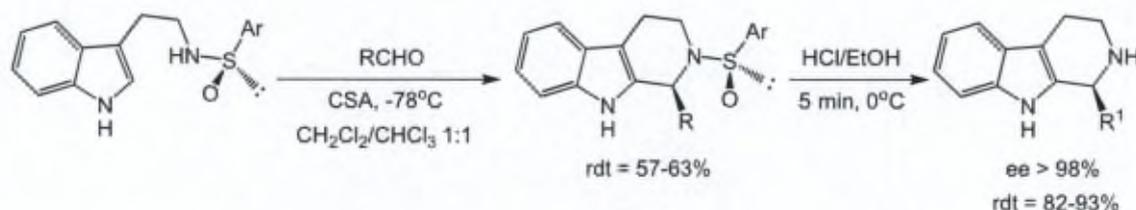


Schéma 3.4 – Emploi d'un auxiliaire chiral de type sulfoxyde pour réaliser des réactions de Pictet Spengler diastéréosélectives¹⁴⁹

Ces résultats de Koomen et coll améliorent ceux d'une contribution antérieure du groupe de Nakagawa,¹⁵⁰ où des groupes α -méthylbenzyle avaient été utilisés comme copule chirale avec un succès modeste ; des excès diastéréoisomériques de 34 à 72% étant obtenus dans le cas des aldéhydes aromatiques et de 18 à 38% seulement pour la série des aldéhydes aliphatiques.

¹⁴⁹ Gremmen, C.; Willemse, B.; Wanner, M. J.; Koomen, G.-J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1955-1958.

¹⁵⁰ Soe, T.; Kawate, T.; Fukui, N.; Nakagawa, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1857-1860

3.2.2 Synthèse de dérivés de THBC impliquant une induction asymétrique externe

Dans la littérature récente, plusieurs acides de Brønsted ou de Lewis chiraux sont utilisés, en quantités stœchiométriques ou catalytiques, pour effectuer la réaction de Pictet-Spengler de manière énantiosélective. Une brève présentation des acides chiraux dérivés du 1,1'-bi-2-naphthol (BINOL) s'impose car ce sont les catalyseurs vers lesquels nous nous sommes orientés pour rendre énantiosélective notre méthodologie de synthèse.

L'utilisation de ces acides s'inscrit dans le concept ACDC (*Asymmetric Counteranion Directed Catalysis*)¹⁵¹ défini par l'induction de l'asymétrie lors d'une addition nucléophile sur un intermédiaire cationique prochiral formant une paire fortement associée avec un anion chiral optiquement pur, provenant du catalyseur. Dans le cas des catalyseurs de type acide de Brønsted, les forces électrostatiques sont complétées par des interactions supplémentaires de type lien-H, mais le caractère ionique de l'intermédiaire n'est pas négligeable. Dans un sens plus large, le concept ACDC implique un caractère anionique prédominant de l'espèce responsable de l'induction asymétrique.

Le concept ACDC s'inscrit dans celui, plus général, de la catalyse asymétrique effectuée via des paires d'ions. L'approche ACDC est beaucoup plus récente que la variante catalytique inverse où l'énantiosélectivité est contrôlée par le cation.¹⁵²

3.2.2.1 Les acides phosphoriques dérivés du BINOL

Les acides phosphoriques chiraux dérivés du BINOL s'inscrivent dans la catégorie des organocatalyseurs. Ces catalyseurs sont de plus en plus utilisés en synthèse organique car ils représentent une alternative davantage compatible avec la notion de « chimie verte » que les catalyseurs historiques que sont les catalyseurs métalliques ou les acides minéraux. Les groupes d'Akiyama et Terada¹⁵³ ont introduit, en 2004, l'utilisation de phosphates de BINOL chiraux comme d'efficaces catalyseurs, de type acide de Brønsted, dans des réactions de Mannich asymétriques. Depuis, de nombreuses transformations asymétriques catalytiques ont été réalisées en utilisant cette classe de catalyseurs, incluant notamment des réactions de Friedel-Crafts, Pictet-Spengler, Mannich, des réactions de cycloaddition et d'amination réductrice.¹⁵⁴

¹⁵¹ Pour une revue sur le concept ACDC, voir : Mahlau, M.; List, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 518-533.

¹⁵² Pour une revue sur la catalyse effectuée par des paires d'ions, voir : Brak, K.; Jacobsen, E. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 534-561.

¹⁵³ a) Akiyama, T.; Itoh, J.; Yokota, K.; Fuchibe, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1566-1568 ; b) Uruguchi, D.; Terada, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5356-5357.

¹⁵⁴ Pour des revues sur les acides phosphoriques dérivés du BINOL, voir : a) Kampen, D.; Reisinger, C. M.; List, B. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *291*, 395-456 ; b) Akiyama, T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5744-5758 ; c) Connon, S. *J. Angew. Chem. Intern. Ed.* **2006**, *45*, 3909-3912 ; d) Terada, M. *Chem. Commun.* **2008**, 4097-4112 ;

La chiralité des BINOL et des acides phosphoriques correspondants réside dans l'impossibilité de rotation autour de la liaison σ reliant les deux noyaux binaphthyle. Dans les cas des BINOL ceci est dû à l'encombrement stérique des substituants en positions 2,2' et 8,8' (Figure 3.1). Ce type de chiralité est une chiralité axiale appelée atropoisomérisation.

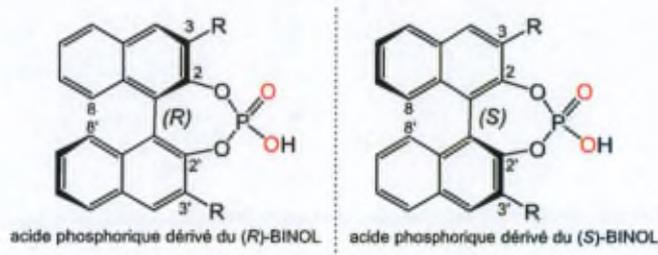


Figure 3.1 – Structure des acides phosphoriques dérivés du BINOL

L'un des premiers à utiliser ce type de catalyseurs pour effectuer des réactions de Pictet-Spengler énantiosélectives fut le groupe de List.¹⁵⁵ Tout d'abord, les auteurs remarquent le manque de réactivité des imines, dérivées de la tryptamine, pour former des ions iminium et décrivent la formation des produits secondaires obtenus par l'imination du produit d'homo aldol dans le cas où des aldéhydes aliphatiques sont utilisés (Schéma 3.5).

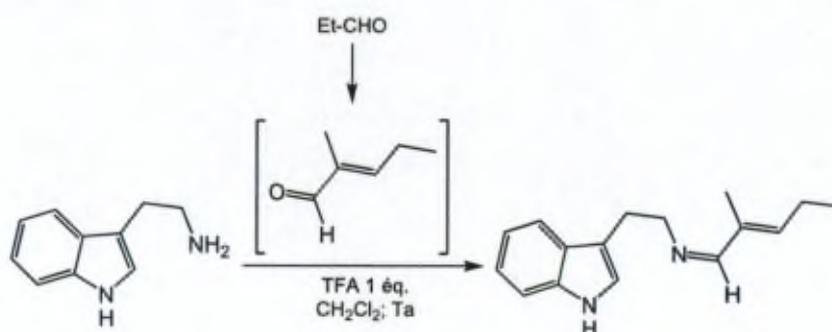


Schéma 3.5 – Condensation de type homoaldol et formation de l'imine correspondante¹⁵⁵

Les auteurs observent, en revanche, que la cyclisation s'effectue facilement lorsque les tryptamines sont disubstituées par deux groupes électro-attracteurs en position α de l'amine. Plusieurs acides phosphoriques, solvants et conditions de réaction ont été testés et les meilleurs résultats furent obtenus en utilisant l'acide phosphorique portant en positions 3,3' des groupes encombrants tri-isopropylphényl (TRIP), dans du toluène, à basse température (-30°C)

e) Zamfir, A.; Schenker, S.; Freund, M.; Tsogoeva, S. B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5262-5276 ; f) Terada, M. *Synthesis* **2010**, 2010, 1929-1982.

¹⁵⁵ Seayad, J.; Seayad, A. M.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1086-1087.

(Tableau 3.3). La réaction fonctionne aussi bien avec des aldéhydes aliphatiques qu'avec des aldéhydes aromatiques. Les rendements sont compris entre 40-98% et les excès énantiomériques (*ee*) sont élevés (62-96%). Néanmoins, cette méthodologie est limitée à l'utilisation d'amines portant des di-esters géminaux en α .

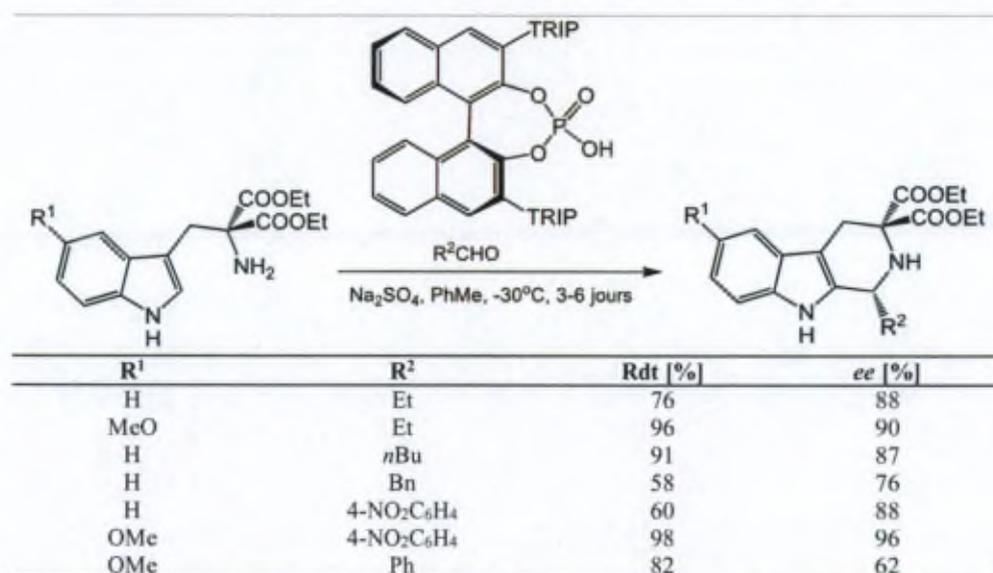


Tableau 3.3 – Réaction de Pictet-Spengler catalysée par des acides de Brønsted chiraux¹⁵⁵

Indiscutablement, les travaux les plus proches des nôtres sont ceux du groupe de Dixon. En effet, cette équipe a développé une méthode de synthèse asymétrique pour accéder à des dérivés de THBC tétracycliques portant un cycle de type pyrrolidin-2-one fusionné.¹⁵⁶ Dans la continuité de ces travaux initiaux, ces auteurs ont plus récemment décrit l'accès à des dérivés optiquement enrichis portant des cycles tétrahydropyrimidin-2-one¹⁵⁷ proches des dérivés de THBC auxquels nous nous sommes intéressés.

La première publication de ce groupe sur ce sujet porte sur une cascade de cyclisation au départ de tryptamines et d'énol-lactones qui, suite à une condensation déshydratante, mènent à des intermédiaires de type énamide (Schéma 3.6). En présence des acides chiraux dérivés du BINOL, ces intermédiaires énamide cyclisent via la formation transitoire d'ions *N*-acyliminiums pour donner des dérivés de THBC portant un cycle supplémentaire.^{156a} L'optimisation des conditions de réaction montre que les meilleurs résultats en termes de rendement et de sélectivité ont été obtenus en utilisant une charge en catalyseur de 10% molaire, dans du toluène au reflux, dans des conditions de haute dilution (concentration du

¹⁵⁶ a) Muratore, M. E.; Holloway, C. A.; Pilling, A. W.; Storer, R. I.; Trevitt, G.; Dixon, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10796-10797 ; b) Holloway, C. A.; Muratore, M. E.; Storer, R. I.; Dixon, D. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4720-4723.

¹⁵⁷ Aillaud, I.; Barber, D. M.; Thompson, A. L.; Dixon, D. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2946-2949.

substrat de 7mM). L'acide phosphorique, ayant conduit aux meilleurs excès énantiomériques, est le catalyseur synthétisé par MacMillan,¹⁵⁸ portant en positions 3,3' des substituants SiPh₃.

La sélectivité est assurée par la formation d'une paire d'ions chirale entre le contre-ion chiral du catalyseur (anion phosphate) et l'ion *N*-acyliminium, probablement stabilisée par une liaison hydrogène entre le P=O du catalyseur et le NH de l'indole. Dans le cas des énoil-lactones disubstituées ($R^2 \neq H$), un seul diastéréoisomère est observé et cette sélectivité peut être expliquée de la façon suivante : l'intermédiaire clé énamide serait en équilibre avec deux formes énantiomères d'ions *N*-acyliminium **A** et **B**. La formation réversible de ces deux isomères est suivie de l'étape de cyclisation intramoléculaire irréversible, à partir de laquelle l'obtention du composé (+) est plus rapide et donc majoritaire (produit cinétique), sans doute en raison d'une meilleure coopérativité de l'ion *N*-acyliminium parent **A** avec l'ion phosphate. Ce processus de cyclisation asymétrique relèverait donc d'une résolution cinétique dynamique (Schéma 3.6).

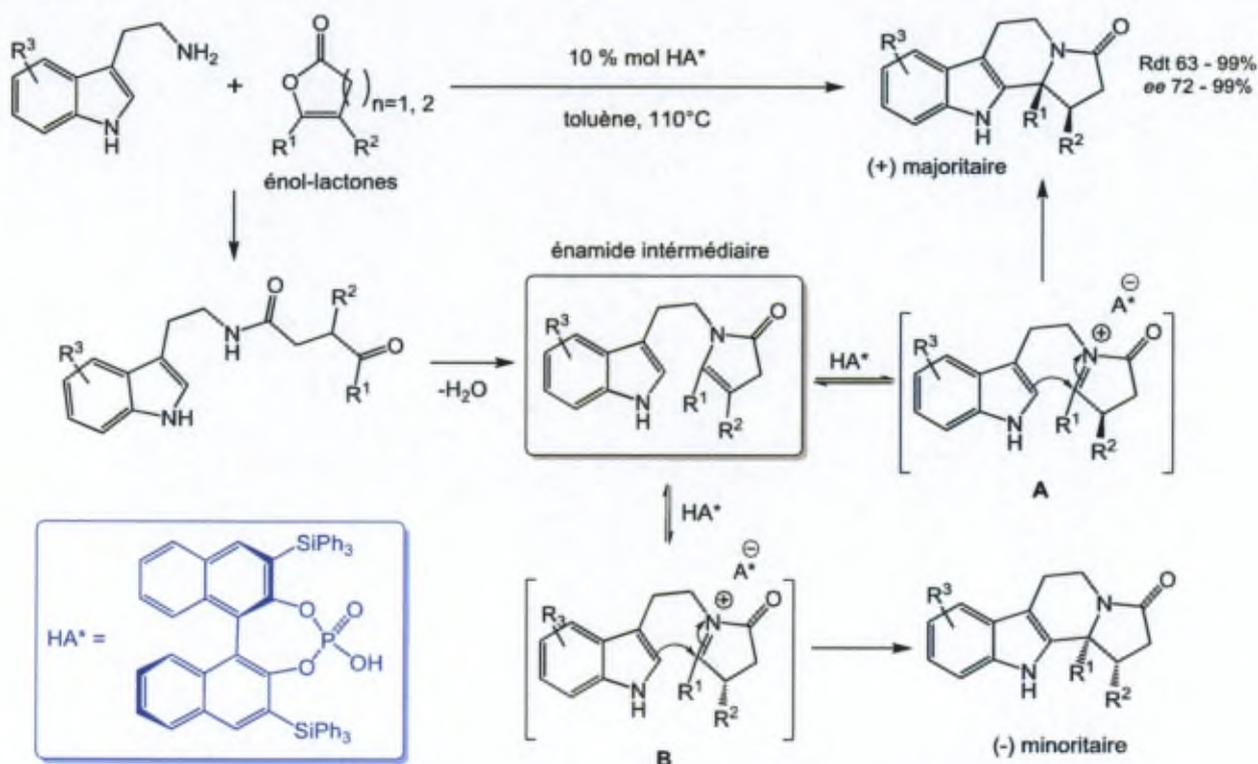


Schéma 3.6 - Cyclisations énantiosélectives en cascade catalysées par un acide phosphorique chiral dérivé du (*R*)-BINOL^{156a}

Malgré son succès, ce schéma réactionnel présente le désavantage de nécessiter la synthèse parfois laborieuse des énoil-lactones de départ, obtenus à partir d' α -alcyno-acides activés par des complexes d'or. La méthode de synthèse a alors été améliorée par l'utilisation des δ - et γ -cétoacides ou cétoesters soit commerciaux soit plus faciles à préparer (Schéma

¹⁵⁸ Storer, R. I.; Carrera, D. E.; Ni, Y.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 84-86.

3.7).^{156b} Tout comme dans le travail précédent de cette équipe, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant des acides phosphoriques dérivés du BINOL, portant en positions 3,3' le substituant SiPh_3 , ayant ou non les cycles naphyles partiellement réduits. La haute diastéréosélectivité de la réaction s'explique de la même façon que précédemment (Schéma 3.6).

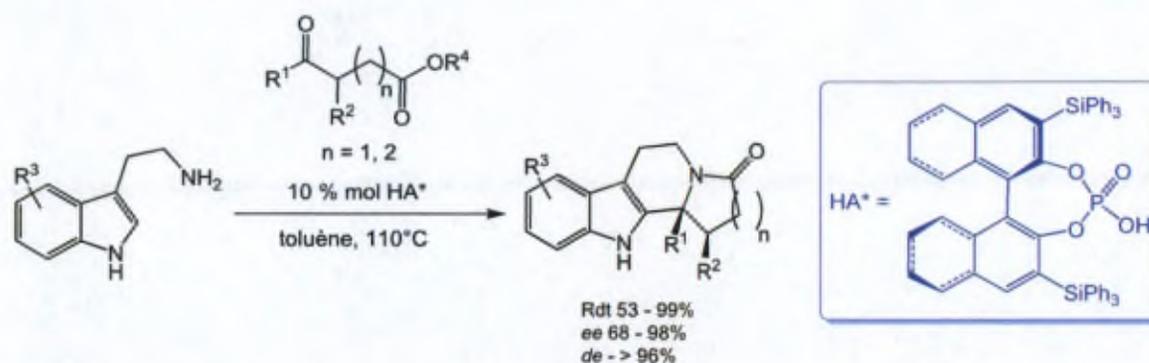
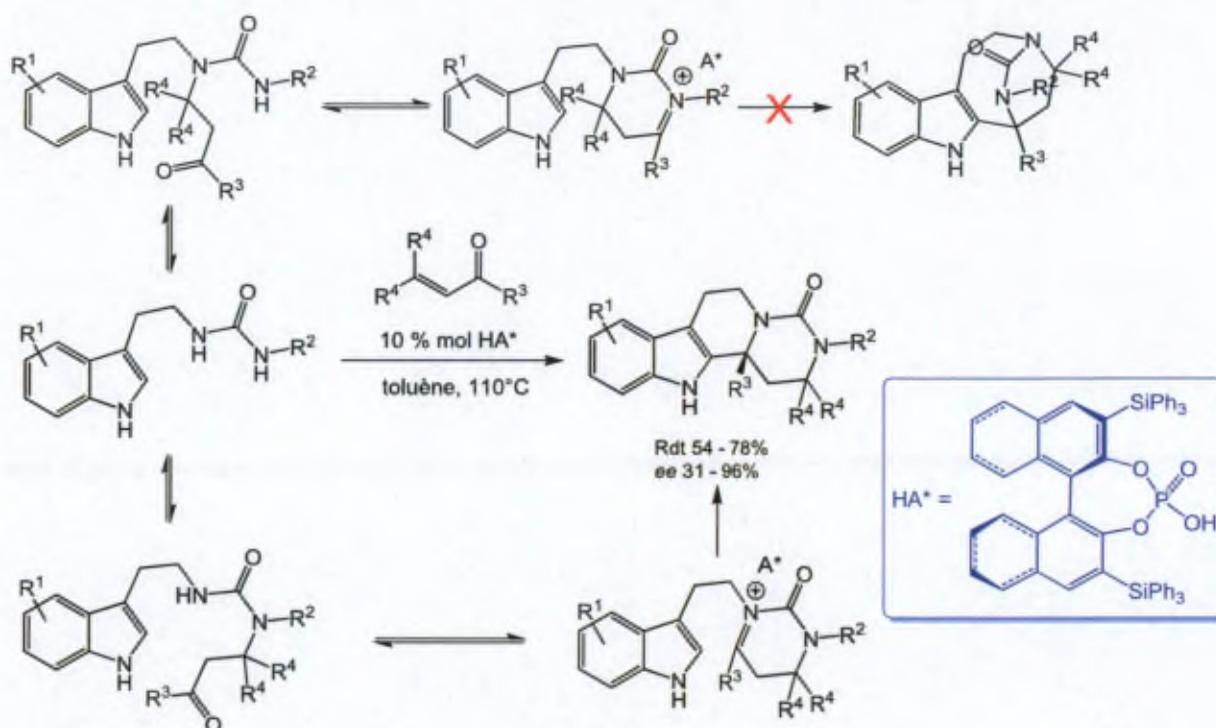


Schéma 3.7 - Cyclisations énantiosélectives de type Pictet-Spengler catalysées par un acide phosphorique chiral^{156b}

Plus récemment, le même groupe a diversifié la méthode en étendant la cyclisation aux ions de type *N*-carbamylium formés par l'addition de Michael d'une urée, dérivée de la tryptamine, sur une cétone α,β -insaturée (Schéma 3.8).¹⁵⁷ Les conditions optimales de réaction restent les mêmes que dans les cas précédents et à nouveau, les auteurs soulignent l'importance de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel pour obtenir des bons excès énantiomériques. Si la concentration optimale de 5 mM est doublée ($R^1 = R^2 = R^4 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$), l'excès énantiomérique chute de 73 à 58%.

La réaction en cascade peut être effectuée au départ de diverses urées dérivées des tryptamines portant des groupes électroattracteurs ou donneurs d'électrons sur le noyau indolique. Il en est de même pour des substrats urée portant des substituants alkyle ou aryle sur l'azote distal. Une augmentation significative des valeurs d'excès énantiomériques a été constatée dans le cas des urées contenant des substituants méthyle ou éthyle en position 7 du cycle indolique. Par contre, l'emploi de l'oxyde de mésityle en tant qu'énone diminue l'énantiosélectivité (*ee* de 43% pour $R^1 = 7\text{-Me}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = R^4 = \text{Me}$). De même, un faible excès énantiomérique de 31% est obtenu lorsque une thiourée dérivée de la tryptamine est utilisée à la place de l'urée ($R^1 = R^2 = R^4 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$, $\text{C}=\text{O} \rightarrow \text{C}=\text{S}$).

Malgré la présence de deux atomes d'azote potentiellement nucléophiles, la réaction est sélective et les rendements sont en général élevés. Les auteurs proposent comme explication la réversibilité de l'addition de Michael. Dans le cas de la formation d'un ion *N*-carbamylium par l'addition du Michael de l'azote proximale, la condensation de la cétone sur l'azote distal de l'urée crée un ion iminium qui devrait subir une cyclisation défavorable à 8 chaînons comme illustré sur le Schéma 3.8.

Schéma 3.8 – Réaction en cascade : addition de Michael/cyclisation de l'ion *N*-carbamyliminium et mécanisme proposé¹⁵⁷

Par rapport aux catalyseurs chiraux de type acide de Lewis métalliques, l'utilisation catalytique d'acides de Brønsted chiraux de type acide phosphorique reste limitée à l'activation de substrats réactifs. Cet inconvénient a été surmonté par certains chercheurs qui ont développés des catalyseurs de type acide de Brønsted présentant une acidité accrue.

L'équipe de Yamamoto¹⁵⁹ a décrit la synthèse d'un catalyseur de type phosphoramidate chiral dérivé du BINOL (PON*). Celui-ci a été utilisé avec succès pour activer par protonation des cétones α, β -insaturées dans une réaction de Diels-Alder asymétrique (Schéma 3.9 – A). Si des acides phosphoriques sont utilisés, la réaction ne s'effectue pas. Le *N*-triflylphosphoramidate chiral portant des substituants 2,4,6-triisopropylphényle (TRIP) est synthétisé facilement à partir du dérivé de BINOL optiquement actif, par phosphorylation avec du POCl₃ et échange du chlorure de phosphoryle résultant par le TfNH₂.

Plus récemment un catalyseur de type sulfonimide dérivé du BINOL a été synthétisé par le groupe de List.¹⁶⁰ Ce catalyseur peut être utilisé pour activer la réaction d'aldéhydes avec des éthers d'énol silylés dans une réaction d'aldolisation de type Mukaiyama (Schéma 3.9 - B). Les auteurs proposent, comme première étape du mécanisme, la silylation du catalyseur *in situ* par l'énosilane (protodésilylation), suivie par l'activation de l'aldéhyde, par le biais d'une silylation de l'oxygène induite par le sulfonimide silylé. Ainsi, le réel catalyseur de la réaction serait l'espèce silylée qui agit comme acide de Lewis, hypothèse qui reste en accord avec le

¹⁵⁹ Nakashima, D.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9626-9627.

¹⁶⁰ García-García, P.; Lay, F.; García-García, P.; Rabalakos, C.; List, B. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4427-4430.

concept d'ACDC. En plus, l'analyse des structures tridimensionnelles des modèles a montré que le groupe fonctionnel du substrat en interaction avec le proton est situé plus profondément dans la poche chirale du disulfonimide comparé à l'acide phosphorique. Une telle situation pourrait conduire à une communication stéréochimique accrue entre le catalyseur et le substrat. Notons que ni les acides phosphoriques ni les phosphoramides trifliques ne sont des (pré-) catalyseurs actifs pour cette réaction d'aldolisation, ce qui met en relief le potentiel unique de cette classe de sulfonimides chiraux pour promouvoir des catalyses silylantes. Soulignons également la polyvalence du sulfonimide de List puisqu'il existe également des articles illustrant son utilisation en tant que catalyseur protique, notamment pour des réactions de type Friedel et Crafts.¹⁶¹

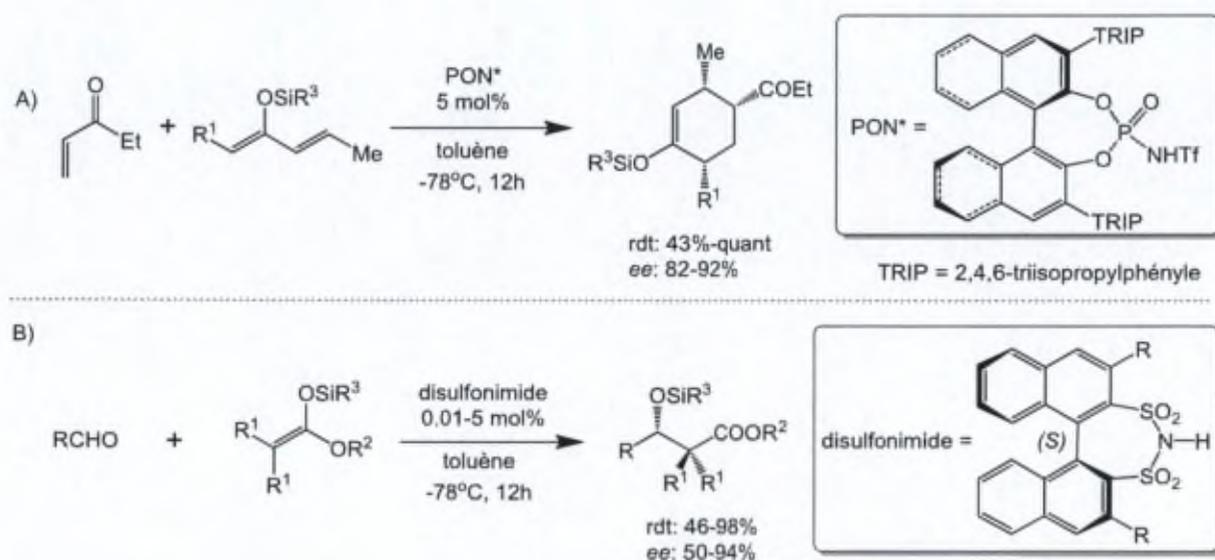


Schéma 3.9 - Utilisation des phosphoramides et disulfonimides dérivés du BINOL en catalyse asymétrique. A) Travail de Yamamoto, B) Travail de List

Dans le travail récent effectué par le groupe de Donoghue,¹⁶² les valeurs de pK_a des différents acides phosphoriques, phosphoramides et disulfonimides ont été déterminées et il a été confirmé que l'acidité augmente dans le sens décrit sur la Figure 3.2. Néanmoins, cette étude montre que l'acidité du *N*-triflylphosphoramide PON* est proche de celle des acides phosphoriques apparentés, ce qui conduit les auteurs à suggérer que pour les nombreuses applications catalytiques de ces deux familles d'acides, leurs valeurs relatives de pK_a peuvent ne pas être les seuls facteurs déterminant la performance catalytique.

¹⁶¹ Chen, L.-Y.; He, H.; Chan, W.-H.; Lee, A. W. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7141-7147.

¹⁶² Christ, P.; Lindsay, A. G.; Vormittag, S. S.; Neudörfl, J.-M.; Berkessel, A.; O'Donoghue, A. C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8524-8528.

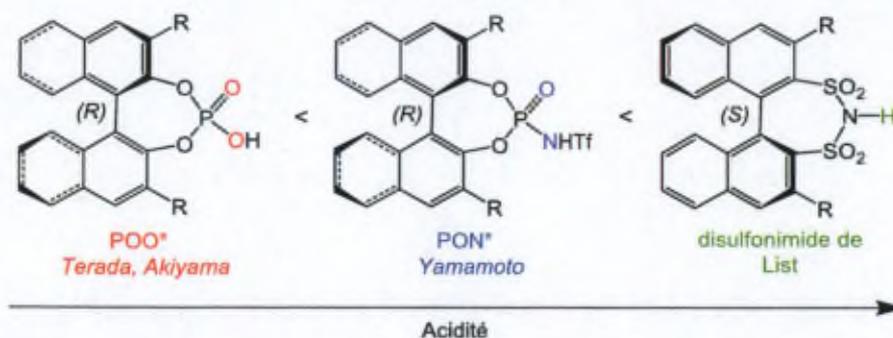


Figure 3.2 – Acidité des acides de Brønsted dérivés du BINOL

3.2.2.2 Utilisation des acides de Lewis chiraux en catalyse de la réaction de Pictet-Spengler asymétrique

Le groupe de Leighton a utilisé un chlorosilane dérivé de la pseudoéphédrine, comme catalyseur de type acide de Lewis chiral, pour effectuer une réaction de Pictet-Spengler énantiosélective.

Cet acide de Lewis est utilisé pour réaliser une cyclisation de type Pictet-Spengler asymétrique sur des α -iminoamides afin d'obtenir des dérivés d' α -aminoamides.¹⁶³ Les α -iminoamides sont préparés à partir des α -cétoamides correspondants par condensation avec des dérivés de la tryptamine. Mis en présence de 1,5 éq. de chlorosilane chiral, les α -iminoamides cyclisent avec de bons rendements et des excès énantiomériques élevés (Schéma 3.10).

La réaction est effective aussi bien pour les α -iminoamides aromatiques ($R^2 = \text{Ar}$) que pour les α -iminoamides aliphatiques ($R^2 = \text{Alkyle}$). Les auteurs ont réussi à mettre au point une méthode « one-pot » dans laquelle la condensation des cétoamides avec la tryptamine est réalisée dans du toluène à reflux. Ensuite, la température est abaissée et le promoteur chiral est ajouté pour réaliser la cyclisation asymétrique. Lorsque la réaction a été réalisée à l'échelle de 5 mmol, le produit désiré est obtenu avec un rendement de 79% et un excès énantiomérique de 99% ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Ph}$). De plus, la pseudoéphédrine est facilement récupérable du brut réactionnel, ce qui compense le désavantage de devoir utiliser 1,5 éq. du médiateur.

Le modèle chimique et stéréochimique qui peut expliquer la réactivité et la sélectivité de cette transformation est illustré dans le Schéma 3.10. Ce modèle s'appuie sur la formation d'un complexe pseudo-cyclique pentavalent du silicium par coordination bidentate du silicium par les atomes d'azote de la fonction imine et d'oxygène de la fonction *N*-arylamide. La formation de ce complexe conduit à la libération d'une molécule de HCl qui est neutralisée par l'azote du motif éphédrine et contribue ainsi à augmenter l'acidité de Lewis du silicium. L'indole attaque

¹⁶³ Bou-Hamdan, F.R.; Leighton, J. L. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2439-2442.

alors l'imine activée sur la face la plus dégagée, du côté opposé au groupe phényle lié au silicium. Ce modèle s'appuie sur les travaux précédents du même groupe¹⁶⁴ et est également soutenu par la formation, et la détection par RMN, d'un complexe similaire issu de la réaction du chlorosilane chiral avec un α -iminoamide provenant de la méthylamine et le cétoamide dont $R^2 = \text{Ph}$, dans du C_6D_6 .

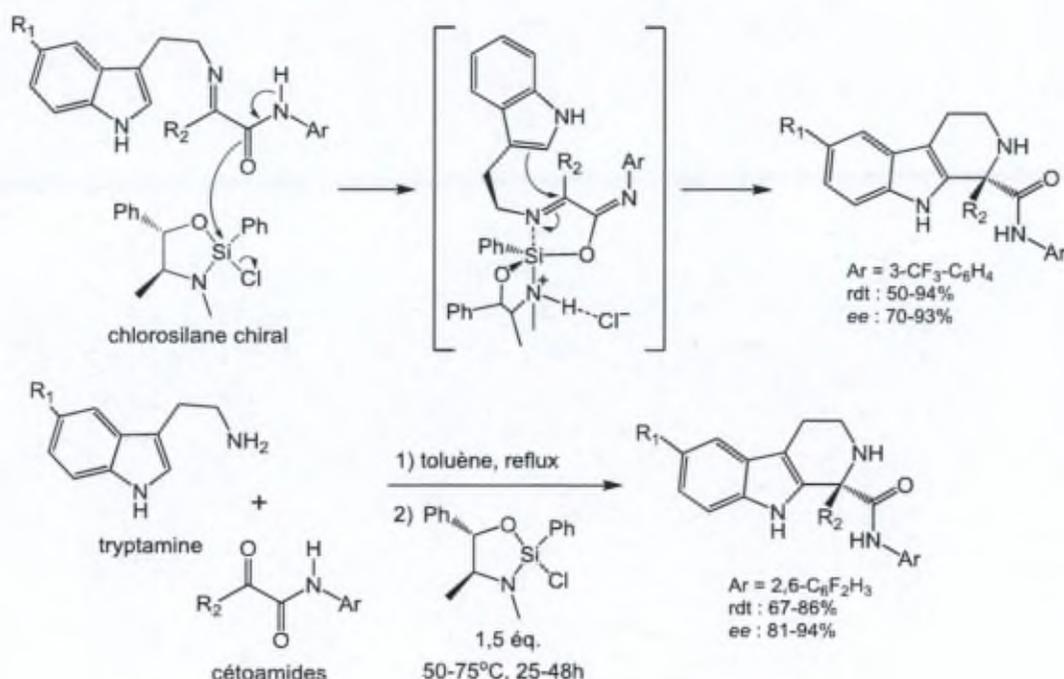


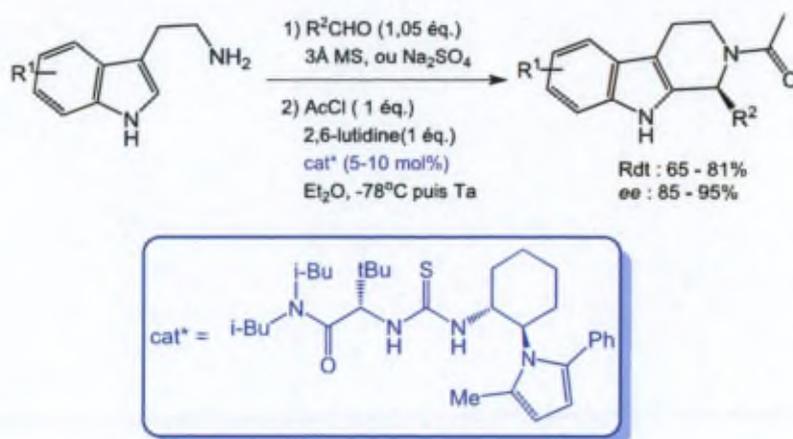
Schéma 3.10 – Réaction de Pictet-Spengler asymétrique effectuée sur des α -iminoamides. En dessous, version « one-pot » de cette réaction¹⁶³

3.2.2.3 Les thiourées chirales comme catalyseurs de la réaction de Pictet-Spengler asymétrique

C'est Taylor et Jacobsen,¹⁶⁵ en 2004, qui furent les premiers à développer une réaction de Pictet-Spengler asymétrique organocatalysée en utilisant un catalyseur de type thiourée chirale. Le manque de réactivité des ions iminium a été surmonté en générant des ions *N*-acyliminium par réaction entre des imines, obtenues à partir de la tryptamine, et le chlorure d'acétyle (Schéma 3.11). Un screening de plusieurs thiourées a montré que les meilleurs résultats, en termes de rendement et d'énantiosélectivité, étaient obtenus avec le catalyseur représenté dans le Schéma 3.11. Lors de l'utilisation d'aldéhydes aromatiques ou du triméthylacétaldéhyde, des températures plus élevées sont nécessaires et le catalyseur subit une décomposition (par acétylation du groupe thiourée) engendrant une diminution de l'énantiosélectivité.

¹⁶⁴ Kubota, K.; Leighton, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 946-948.

¹⁶⁵ Taylor, M. S.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10558-10559.

Schéma 3.11 – Réaction de Pictet-Spengler catalysée par une thiourée chirale¹⁶⁵

Une deuxième publication de ce groupe décrit l'utilisation du catalyseur chiral de type thiourée étendue à l'obtention des dérivés tétracycliques de la THBC par la cyclisation de type Pictet-Spengler d'hydroxylactames.¹⁶⁶ Ceux-ci sont obtenus à partir de l'imide correspondant par réduction en présence de NaBH₄ ou par alkylation avec des réactifs organométalliques. Ils sont ensuite cyclisés avec de bons rendements et une bonne sélectivité sous l'action d'une thiourée chirale, moyennant un traitement par le TMSCl qui permet la formation *in situ* des chlorolactames beaucoup plus réactifs que les hydroxylactames parents. Notons que la réaction peut également être initiée en remplaçant le chlorotriméthylsilane par de l'HCl en présence de tamis moléculaires de 3Å, car la présence d'eau a un effet néfaste sur la sélectivité.

Un vaste screening des catalyseurs a montré que le meilleur d'entre eux est la thiourée représentée dans le Schéma 3.12. Le *tert*-butylméthyléther (TBME) est le solvant optimal pour cette réaction qui par ailleurs offre les inductions asymétriques optimales entre -55°C et -78°C, alors que l'utilisation d'autres solvants tels que l'Et₂O, le CH₂Cl₂ ou le toluène conduit à des excès énantiomériques modestes.

Les auteurs suggèrent que la cyclisation a lieu via une substitution de type S_N1, avec formation *in situ* de l'ion *N*-acyliminium électrophile. L'hypothèse est soutenue par le fait que les hydroxylactames tertiaires alkylées sont plus réactifs que leurs analogues secondaires (R⁴ = H) (Schéma 3.12). Il est postulé que l'énantiosélectivité de la réaction est assurée par une forte interaction entre le catalyseur et l'ion chlorure rendant chiral ce complexe thiourée-chlorure de *N*-acyliminium. La modélisation computationnelle et l'influence de la taille de l'anion halogénure sur la sélectivité appuient le fait que la thiourée n'interagit pas avec le site base de Lewis de l'ion *N*-acyliminium, typiquement le carbonyle, comme postulé initialement. L'interaction ion iminium-catalyseur chiral s'effectue donc par le biais de l'ion chlorure. La

¹⁶⁶ Raheem, I. T.; Thiara, P. S.; Peterson, E. A.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13404-13405.

formation de l' α -chlorolactame est confirmée par des études de spectroscopie RMN (à températures variables) et par la formation quantitative de l' α -chlorolactame de la 1-benzyl-5-hydroxypyrrolidin-2-one dans des conditions similaires.

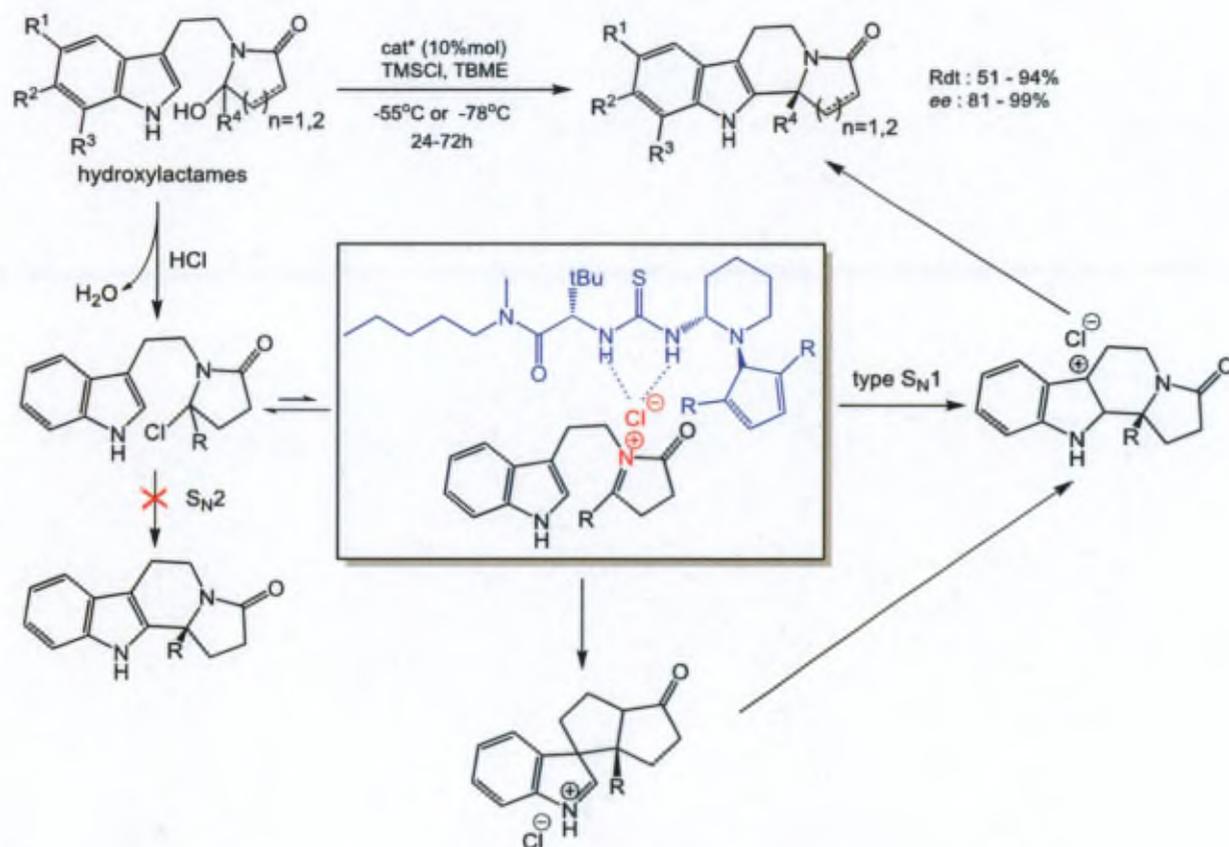


Schéma 3.12 – Mécanisme de la cyclisation asymétrique d'hydroxylactames catalysée par une thiourée chirale¹⁶⁶

Cette méthodologie a été appliquée avec succès pour la synthèse de l'harmicine (Figure 1.15) avec un rendement de 97% après la réduction du groupe carbonyle par LiAlH_4 .

L'emploi d'un acide de Brønsted faible (l'acide benzoïque) comme co-catalyseur étend la méthodologie de Jacobsen à l'activation des imines dans des conditions non acylantes pour obtenir des dérivés de THBC non-protégés (Schéma 3.13).¹⁶⁷ En utilisant les conditions de réaction optimisées (représentées dans le Schéma 3.13) des THBC ont été obtenues avec des bons rendements et des excès énantiomériques intéressants. Pour les substrats provenant des aldéhydes aliphatiques, la réaction peut conduire à de bons excès énantiomériques même en absence de l'acide benzoïque, des temps de réaction plus longs sont néanmoins nécessaires. Dans la série de la 6-méthoxytryptamine, les aldéhydes aromatiques ne peuvent pas cycliser dans des conditions neutres.

¹⁶⁷ Klausen, R. S.; Jacobsen, E. N. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 887-890.

Dans le cas de la réaction co-catalysée par l'acide benzoïque, il est postulé que ce dernier protone l'imine pour former un ion *N*-protioiminium dont le contre-ion benzoate est fortement associé au catalyseur chiral via des liaisons hydrogène. Le modèle de cette réaction est donc, d'une certaine manière, assez semblable à celui de la précédente, qui exploitait un complexe thiourée chiral/ion chlorure (Schéma 3.13). Certains catalyseurs urée qui ont fait partie du screening des catalyseurs sont commercialement disponibles, mais le catalyseur thiourée optimal peut être préparé avec un rendement de 69% en trois étapes à partir de *N*-méthylbenzylamine et de valine, une seule étape de purification par chromatographie étant nécessaire.

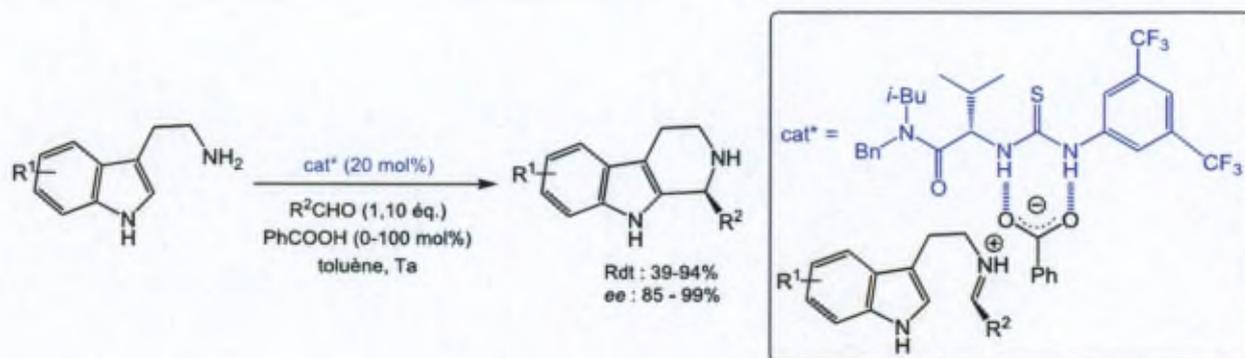


Schéma 3.13 – Réaction de Pictet-Spengler énantiosélective catalysée par une thiourée chiral et un acide de Brønsted¹⁶⁷

De nombreux exemples de la réaction de Pictet-Spengler asymétrique ont donc été décrits dans la littérature. Nous avons déjà exploité l'induction asymétrique interne via l'utilisation des dérivés de tryptophane, dont la présence d'un centre chiral sur l'ion *N*-carbamiiminium contrôle la sélectivité de la cyclisation (résultats décrits dans le Chapitre II, §2.2). Afin de rendre notre méthodologie de synthèse « one-pot » énantiosélective, d'une manière indépendante du substrat, nous nous sommes intéressés, par la suite, à utiliser des catalyseurs chiraux, notamment les acides chiraux dérivés du BINOL et les thiourées chiraux.

3.3 Résultats : Cyclisation asymétrique des substrats de type urée et imidazolone

Afin de développer une version énantiosélective de notre méthodologie de synthèse, il est nécessaire d'isoler les intermédiaires urée et/ou imidazolone et d'étudier leur cyclisation en présence d'un catalyseur chiral, en utilisant des solvants apolaires. Ainsi, en premier lieu, les intermédiaires urée ont été synthétisés en utilisant notre méthodologie « one-pot » (Schéma 3.14). La synthèse des imidazolones a été discutée en détail dans le chapitre précédent (§2.4).

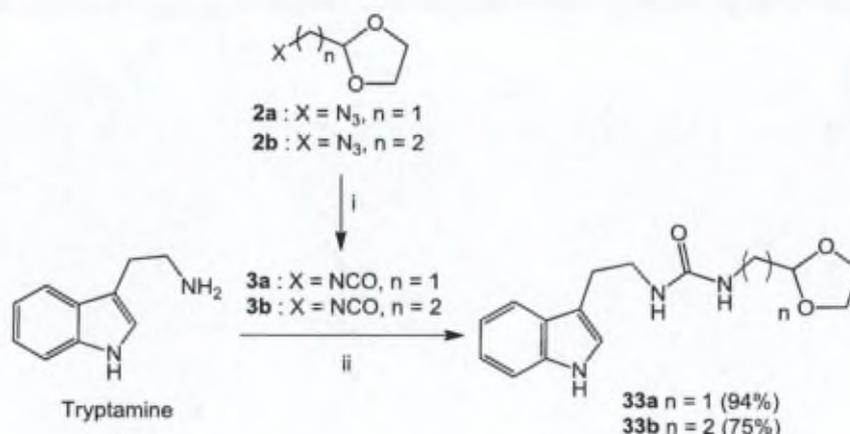


Schéma 3.14 – Synthèse des urées. Réactifs : i) PPh_3 , CO_2 , THF, Ta ; ii) THF, Ta

3.3.1 Stratégie 1 – Utilisation des acides phosphoriques dérivés du BINOL

Encouragés par les résultats de Dixon, la première stratégie que nous avons envisagée a été d'effectuer la cyclisation des intermédiaires urée et imidazolone isolés en utilisant les catalyseurs de type acide de Brønsted dérivés du BINOL comme illustré dans le Schéma 3.15.

Il est important de préciser quelques aspects liés à la différence de réactivité entre ces substrats. Dans le cas des urées, l'acide chiral doit être capable de catalyser l'activation de l'aldéhyde et la formation de l'ion *N*-carbamylium. En même temps, elles ont l'avantage de porter un nucléophile plus puissant (le noyau indole) par rapport aux imidazolones. La présence des nucléophiles intramoléculaires plus faible dans le cas des substrats **23a-b**, **21** et **24**, (par rapport aux urées **33a-b**) permet l'isolement de l'imidazolone. Dans ce cas-ci, l'intermédiaire *N*-carbamylium devrait être plus facile à générer par la protonation directe du substrat.

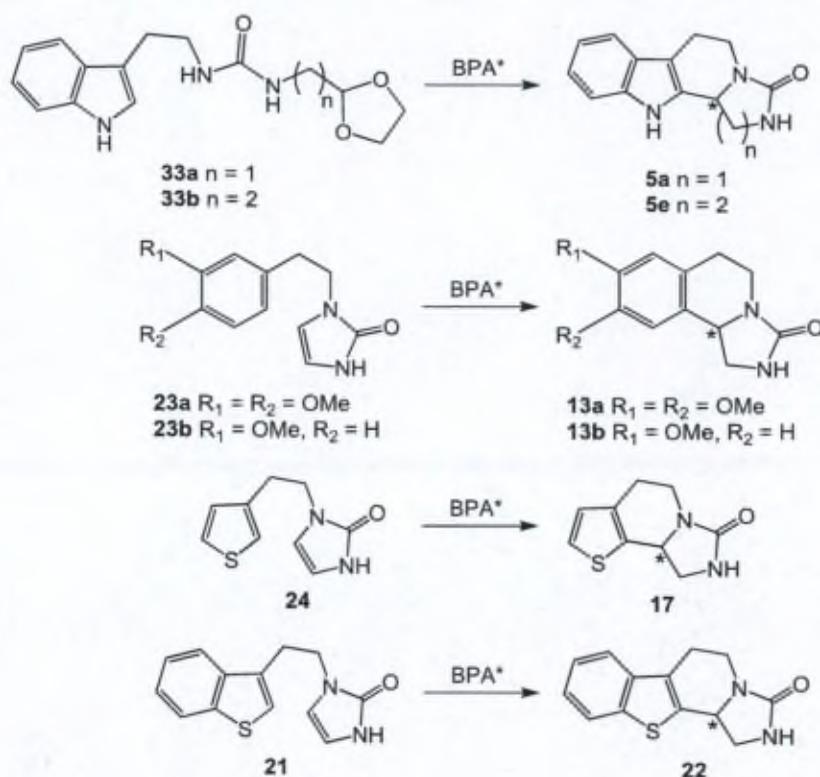


Schéma 3.15 – Stratégie générale de synthèse asymétrique des dérivés de THBCI et THIQI catalysée par un acide de Bronsted chiral

Dans un premier temps la réactivité des substrats urée et imidazolone a été testée en présence de différents catalyseurs, dans différentes conditions de température et de solvants. Ces essais sont représentés dans le Tableau 3.4.

Tout d'abord, la capacité du bis(trifluorométhane)sulfonimide (Tf_2NH) à effectuer la réaction de cyclisation a été testée dans du toluène ou du dioxane. Le superacide Tf_2NH a été choisi pour démarrer les tests car il est plus acide que n'importe lequel des acides chiraux susceptibles d'être utilisés dans cette étude. Son utilisation permettra d'estimer la capacité des différents substrats à cycliser et d'anticiper la nature des acides qui pourront être ensuite utilisés.

Dans le cas de l'urée **33a**, une conversion totale est observée dans du dioxane par CCM (entrées 2-4) et même à température ambiante (entrée 3). Lorsque le toluène est employé comme solvant, seul le substrat de départ est observé par CCM après 30 minutes de réaction, à cause de sa faible solubilité dans ce solvant (entrée 1). L'acide phosphorique racémique non substitué dérivé du BINOL, beaucoup moins acide que le Tf_2NH ¹⁶² n'est, en toute logique, pas capable de catalyser cette réaction et seules des traces de produit cyclisé **5a** ont été observées (par CCM) après chauffage pendant 6 jours au reflux (entrée 5). En revanche, l'analogue *N*-triflyl phosphoramidate dérivé du BINOL, d'acidité intermédiaire entre le Tf_2NH et les acides phosphoriques, semble être un bon catalyseur pour cette réaction, même si, après 40 h à 50°C,

la réaction n'était toujours pas complète. L'augmentation de la température a été nécessaire pour obtenir une conversion totale (entrée 6).

Dans le cas d'imidazolones non-soufrées, le produit de cyclisation souhaité n'a pas été obtenu (entrées 7-10). Dans ces expériences (entrées 7-10), plusieurs taches ont été observées par CCM après environ 1 h de réaction, dont une est plus intense et correspond au composé dénommé « produit secondaire » dans le Tableau 3.4. Le prolongement du temps de réaction a mené, dans la plupart des cas, à une dégradation du substrat. Le produit secondaire n'a pas pu être complètement séparé du mélange réactionnel. Mais l'analyse par RMN ^1H de la fraction contenant ce produit indique une disparition des protons CH caractéristiques de l'imidazolone.

Entrée	Substrat (S)	Catalyseur (10% mol)	Solvant	Température, Temps de réaction	Observations CCM
S = urée					
1	33a	Tf ₂ NH	toluène	reflux, 30 min	S pas soluble
2	33a	Tf ₂ NH	dioxane	reflux, 1h	produit cyclisé
3	33a	Tf ₂ NH	dioxane	Ta, 24h	produit cyclisé
4	33a	Tf ₂ NH (5% mol)	dioxane	44h à 50°C + 120 h à 75°C	produit cyclisé
5	33a	(R)-POOH* (R = H)	dioxane	reflux, 6 jours	S
6	33a	PON (rac) (R = H)	dioxane	48h à 50°C + 6h à 75°C	produit cyclisé propre
S = imidazolones					
7	23a et 23b	Tf ₂ NH	toluène	reflux, 30 min	dégradation
8	23a et 23b	Tf ₂ NH	toluène	70°C, 5h	produit secondaire
9	23a et 23b	Tf ₂ NH	dioxane	Reflux, 15h	dégradation
10	23a	PON (rac) (R = H)	dioxane	40h à 50°C + 6h à 75°C	S + produit secondaire
11	24	Tf ₂ NH	dioxane	48h à 50°C	produit cyclisé + produit secondaire
12	24	PON (rac) (R = H)	dioxane	30h à 50°C + 16h à 65°C	peu de produit cyclisé + produits de dégradation
13	24	(R)-POOH* (R = H)	dioxane	48h à 50°C + 72h à 100°C	S
14	21	Tf ₂ NH	dioxane	48h à 50°C	S + produit secondaire

Catalyseurs

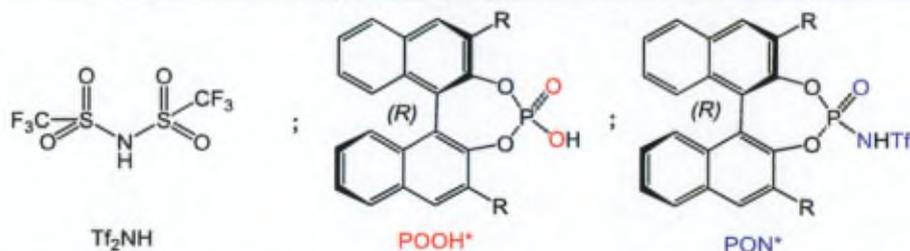


Tableau 3.4 – Premiers tests de réactivité effectués sur les substrats de type urée et imidazolone. Ces essais ont été effectués à l'échelle de 10 mg avec une concentration du substrat de départ de 80 mM. Le toluène utilisé a été fraîchement séché sur CaH₂ et ensuite distillé. Le dioxane anhydre était soit acheté, soit fraîchement distillé sur Na/benzophénone.

Concernant les imidazolones portant un noyau thiophène ou benzothiophène, le produit cyclisé a été observé en CCM uniquement dans le cas de l'imidazolone **24** en présence du Tf₂NH ou d'une phosphoramidate (entrées 11 et 12). Lors de l'utilisation du Tf₂NH, un produit

secondaire, plus polaire que le substrat de départ et que le produit cyclisé, se forme d'abord dans le milieu réactionnel, puis s'est dégradé lors du prolongement du temps de réaction (entrées 11 et 12). Les structures des produits secondaires issus de la réaction des imidazolones soufrés n'ont pas été déterminées.

Les essais en vue d'obtenir des dérivés de THIQI (**23a-b**), THTPI (**17**) et THBTPI (**22**) optiquement purs ont été arrêtés à ce stade, car la priorité de ce travail restait la synthèse de dérivés de THBCI, qui présentent une activité antitumorale plus intéressante (Chapitre IV, §4.1.1.2).

C'est pourquoi, en nous appuyant sur les résultats de notre pré-screening du tableau 4, un second screening d'une gamme de catalyseurs de type phosphoramidate dérivés du BINOL optiquement purs, portant différents substituants en positions 3,3', a alors été réalisé pour la cyclisation énantiosélective de l'urée **33a**.

Afin d'évaluer les excès énantiomériques, une méthode HPLC chirale a été développée à partir du produit racémique **5a**. Les meilleures conditions pour la séparation des énantiomères ont été obtenues en utilisant une colonne CHIRALPAK® IA (5µm, 250×4,6 mm) dont la phase stationnaire est de type amylose-tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate). La phase mobile était constituée d'un mélange *n*-heptane/2-propanol 70:30 (Figure 3.3).

Avant l'évaluation de l'excès énantiomérique par HPLC chirale, une étape de purification du brut réactionnel par chromatographie (flash ou sur plaque préparative) s'est avérée nécessaire. En effet, les phosphoramidates sont des acides forts et leur présence dans le brut réactionnel peut endommager les colonnes chirales. Les phosphoramidates ont été faciles à séparer par élution avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (1:1), conditions dans lesquelles le produit de cyclisation **5a** reste adsorbé sur la colonne. Ce dernier a ensuite pu être récupéré par élution avec un mélange dichlorométhane/méthanol.

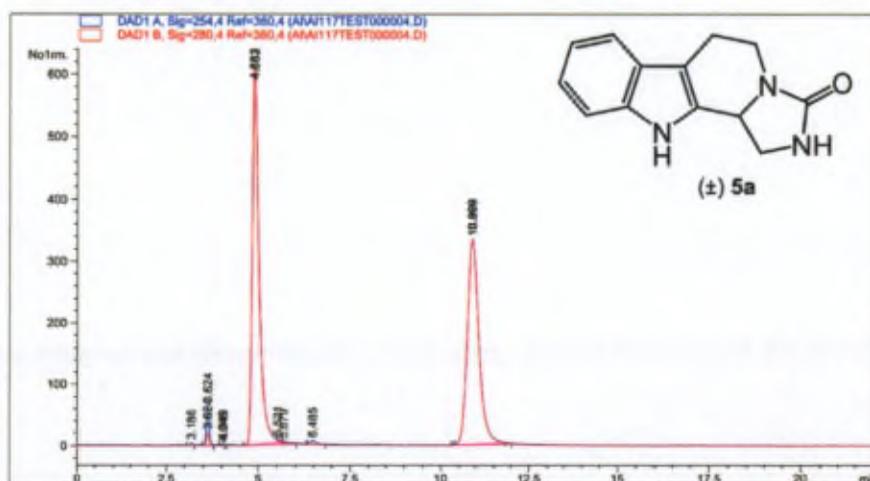


Figure 3.3 – Séparation des deux énantiomères de (\pm) **5a** par HPLC chirale. Colonne CHIRALPAK® IA 5µm 250×4,6 ; phase mobile: *n*-heptane/2-propanol 70:30, volume d'injection : 20 µL, débit : 1mL/min. Dans ces conditions l'urée **33a** présente un temps de rétention de 8,133 min. L'attribution de l'énantiomère correspondant au chaque pic n'a pas été réalisé.

Dans le cas des réactions incomplètes, l'urée de départ **33a** n'a pas pu être séparée du produit cyclisé, mais ceci n'a pas gêné l'évaluation de l'excès énantiomérique car les deux énantiomères et l'urée présentent des temps de rétention très différents en utilisant la méthode de séparation décrite plus haut (4,88 min et 10,89 min pour les deux énantiomères et 8,13 min pour l'urée).

Toutes les fractions provenant de la colonne contenant du produit cyclisé, pur ou mélangé avec l'urée de départ **33a**, ont été analysées par HPLC chirale et le même *ee* a été obtenu pour chaque fraction ce qui exclut la possibilité de la modification du rapport des énantiomères durant la purification sur colonne.

La cyclisation de l'urée **33a** a donc été tentée dans différentes conditions et les résultats obtenus sont repris dans le Tableau 3.5

Entrée	Catalyseur (10% mol)	Solvant	Température et Temps de réaction	<i>ee</i> ^a	Observations CCM (conversion)
1	(<i>R</i>)-Vapol-PONHTf	dioxane	3j 20h à 50°C + 48h à 75°C	2 %	++++ (100%)
2	(<i>R</i>)-Vapol-PONHTf	dioxane	48h à 75°C	1 %	++++ (100%)
3	(<i>R</i>)-[H8]-3,5-diCF ₃ Ph-PONHTf	dioxane	19h à 50°C + 40h à 75°C	8 %	+++
4	(<i>R</i>)-[H8]-Ph-PONHTf	dioxane	20h à 50°C + 40h à 75°C	4 %	+++
5	(<i>R</i>)-SiPh ₃ -PONHTf	dioxane	96h à 75°C	8 %	+
6	(<i>R</i>)-[H8]-Phen-PONHTf	dioxane	72h à 75°C	8 %	+
7	(<i>R</i>)-Trip-PONHTf	dioxane	72h à 75°C	20 %	++
8	(<i>R</i>)-[H8]-3,5-diCF ₃ Ph-PONHTf	dichloroéthane	88h à 75°C	14 %	+

Catalyseurs					
(<i>R</i>)-Vapol-PONHTf	(<i>R</i>)-[H8]-3,5-diCF ₃ Ph-PONHTf	(<i>R</i>)-[H8]-Ph-PONHTf	(<i>R</i>)-SiPh ₃ -PONHTf	(<i>R</i>)-[H8]-Phen-PONHTf	(<i>R</i>)-TRIP-PONHTf

Tableau 3.5 – Screening des catalyseurs de type phosphoramidite pour la cyclisation asymétrique de l'urée **33a**. Ces essais ont été effectués à l'échelle de 20-25 mg avec une concentration de 70-80 mM.

Plusieurs essais ont d'abord été effectués en chauffant à 50°C (entrées 1, 3 et 4) mais, après un certain temps, la réaction n'a plus évolué et l'augmentation de la température a été nécessaire pour obtenir une bonne conversion. Une faible sélectivité a été observée lors de l'utilisation des catalyseurs portant des groupes encombrants en positions 3,3' (entrées 3, 5-8), mais ces catalyseurs ont malheureusement donné des conversions plus faibles que celui de type « vapol » (entrées 1-2). Les rendements de réaction n'ont pas été déterminés car ce screening

portait principalement sur les excès énantiomériques. Il est néanmoins important de mentionner qu'outre le produit cyclisé **5a**, aucun autre composé n'a été observé en CCM.

La diminution de la polarité du solvant n'a apporté qu'un faible bénéfice en terme de sélectivité et une diminution de la conversion (entrées 3 vs. 8). Le meilleur catalyseur de la série semble être celui portant le groupe triisopropylphényle (TRIP) en position 3,3' (entrée 7).

Les conditions que Dixon et ses collaborateurs ont utilisées pour obtenir des dérivés de THBC contenant un cycle tétrahydropyrimidinone accolé, ont été également testées, avec l'intention d'augmenter la solubilité des substrats à haute dilution et à chaud, et donc de faciliter la cyclisation. Les imidazolones **21**, **24** et l'urée **33a** ont été mises donc dans du toluène en présence du catalyseur de MacMillan¹⁵⁸ (l'acide phosphorique dérivé du BINOL portant en position 3,3' des substituants SiPh₃) (Tableau 3.6). Une concentration de 5 mM a été employée pour le substrat (comme décrit dans les travaux de Dixon) et le milieu réactionnel a été chauffé à reflux, sous atmosphère inerte. Même si à chaud les substrats sont solubles, après 65 h de réaction, seule l'urée de départ **33a** a été observée par CCM. L'acide chiral n'est donc pas capable d'activer l'aldéhyde dans ces conditions de réaction.

De même, aucune conversion n'a été observée avec les imidazolones **21** et **24** après 96 h de temps de réaction (Tableau 3.6), alors qu'une dégradation partielle était observée dans les mêmes réactions catalysées par les PON (Cf. Tableau 3.4). En effet la formation de l'ion *N*-carbamyliminium est plus facile dans le cas des imidazolones, mais elles portent un nucléophile plus faible que le noyau indole, donc la réaction de cyclisation est défavorable par rapport à l'urée **33**.

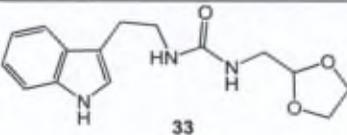
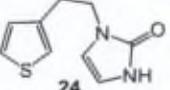
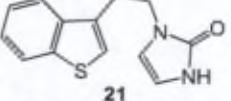
Entrée	Substrat (S)	Catalyseur (10% mol)	Solvant	Température, Temps de réaction	Observations CCM
1		MacMillan	toluène	96h à reflux	S
2		MacMillan	toluène	96h à reflux	S
3		MacMillan	toluène	96h à reflux	S

Tableau 3.6 - Tests de réactivité effectués sur les substrats **33**, **24** et **21** dans les conditions décrits par Dixon. Ces essais ont été effectués à l'échelle de 10 mg avec une concentration du substrat de départ de 5 mM.

Le manque de réactivité observé dans le cadre de ces essais pourrait s'expliquer par une acidité insuffisante de ces catalyseurs pour activer l'aldéhyde protégé ou les imidazolones. L'utilisation des substrats plus réactifs s'avère nécessaire afin de pouvoir obtenir une meilleure

conversion lors de l'utilisation des phosphoramides portant des substituants encombrants et de pouvoir également exploiter l'utilisation des acides phosphoriques dérivés du BINOL.

Une deuxième hypothèse qui pourrait expliquer le manque de réactivité est basée sur les interactions de type liaisons hydrogène qui peuvent exister entre le catalyseur et le substrat **33a**, ainsi qu'entre le catalyseur et le produit final ou le diol qui est libéré pendant la réaction (Schéma 3.16). Le catalyseur pourrait ainsi former des complexes fortement associés avec ces trois espèces présentes dans le milieu réactionnel, ce qui mènerait à une faible réactivité.

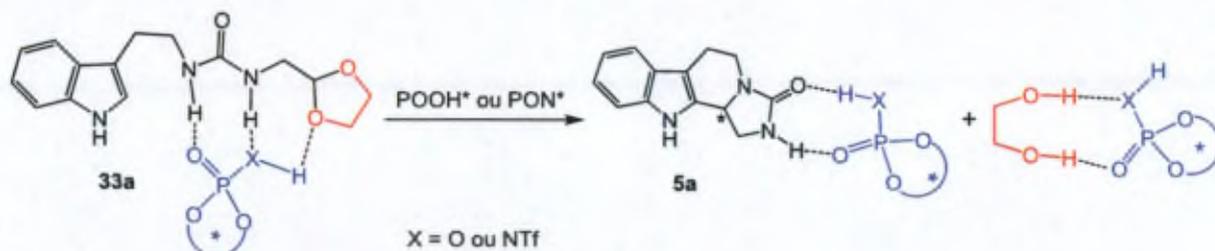


Schéma 3.16 – Interactions possibles entre le catalyseur et les espèces présentes dans le milieu réactionnel

3.3.2 Stratégie 2 – Utilisation de la thiourée chirale de Jacobsen

L'utilisation de la stratégie de Jacobsen (§ 3.2.2.3)^{165,166} a également été envisagée. Selon celle-ci, l'énantiosélectivité serait assurée par une thiourée chirale qui complexe le contre-ion chlorure de l'ion *N*-carbamylium. Notre stratégie consiste donc à adapter les conditions de Jacobsen à notre système en utilisant comme catalyseur 10% mol d'HCl anhydre (qui est commercial en solution dans du dioxane) et 10% molaire d'une thiourée chirale (Schéma 3.17).

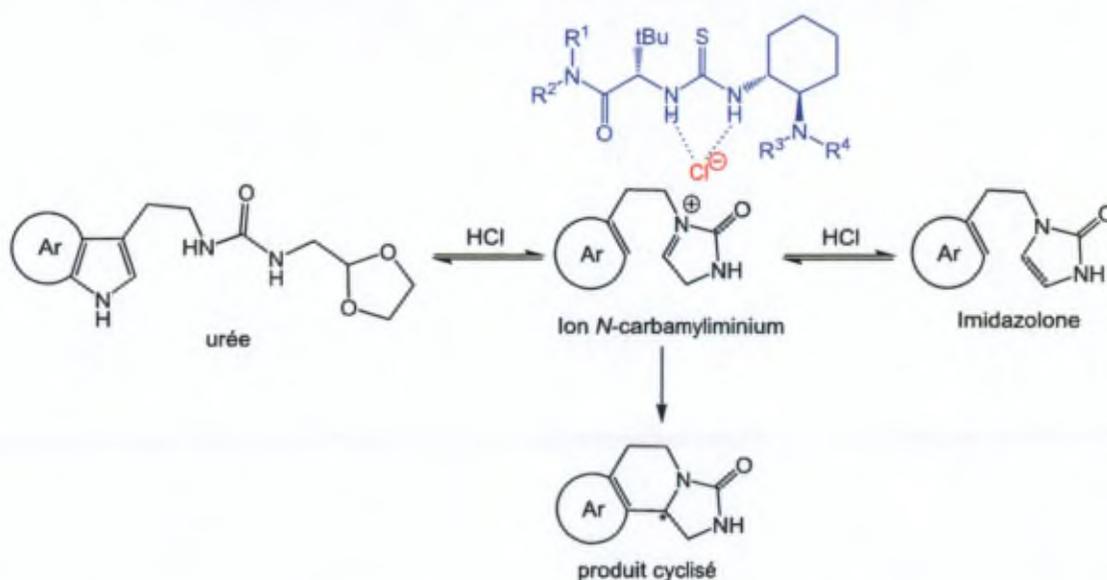
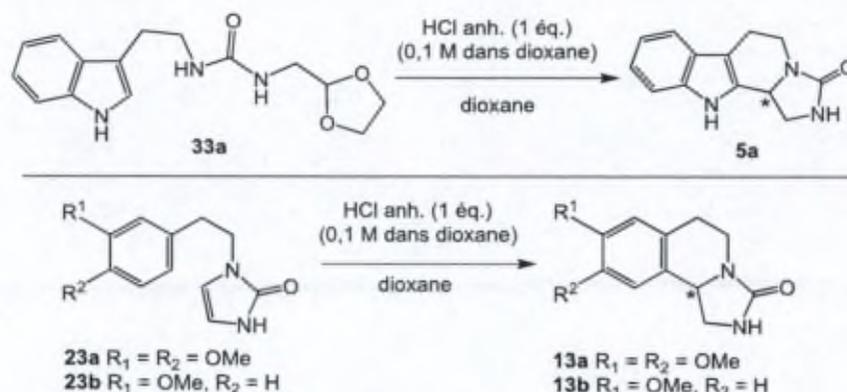


Schéma 3.17 – Approche utilisant une thiourée chirale pour la cyclisation asymétrique des imidazolones et urées

Tout d'abord, la réactivité des substrats en présence d'HCl anhydre a été vérifiée et ces résultats sont repris dans le Tableau 3.7.



Entrée	Substrat (S)	Catalyseur (HCl anhydre)	Température et Temps de réaction	Observations
1	Imidazolones 23a et 23b	1 éq.	46h à 50°C	S
2	Urée 33a	1 éq.	6 jours à 75°C	faible conversion
3	Urée 33a	1 éq. + (10 % mol) thiourée de Schreiner	48h à 50°C + 40h à 75°C	faible conversion

Tableau 3.7 – Utilisation de l'HCl pour effectuer la réaction de cyclisation

Ainsi, les imidazolones **23a** et **23b** ont été mises en réaction avec 1 éq. d'HCl dans du dioxane anhydre, mais aucune évolution n'est observée en CCM après 46h à 50°C (entrée 1). Dans le cas de l'urée **33a** une faible quantité de produit est observée en CCM, mais la conversion reste faible même après des longs temps de réaction (entrée 2). L'ajout d'une thiourée dans le milieu réactionnel pour complexer l'anion chlorure, et activer ainsi l'acide et/ou les formes protonées intermédiaires, n'a conduit à aucune accélération perceptible de la réaction (entrée 3).

Nous avons donc abandonné cette stratégie car il est évident que les substrats ne sont pas assez réactifs pour être activés par les acides phosphoriques dérivés du BINOL ou par 1 équivalent d'HCl.

Par ailleurs, dans le cas du substrat **33a**, l'éthylène glycol, formé pendant la réaction, pourrait être responsable des faibles excès énantiomériques obtenus lors des réactions catalysées par les phosphoramides (Cf. Tableau 3.5).

La synthèse d'une imidazolone portant un noyau indole pourrait être une solution à ce problème. D'une part, il n'y aurait plus de libération d'éthylène glycol, et d'autre part, l'indole serait suffisamment nucléophile pour attaquer le motif imidazolone protoné. Dans le cas de ce système attendu pour être plus réactif, des agents moins acides comme les acides

phosphoriques dérivés du BINOL pourraient également être envisagés. Cette démarche est discutée dans le paragraphe suivant.

3.4 Synthèse d'une imidazolone portant le noyau indole

Tout d'abord, la synthèse de ce type d'imidazolone a été tentée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'obtention des imidazolones de type méthoxyaryle et thio aromatiques **21**, **23a-b** et **24**. Comme attendu, lorsque l'urée **33a** est traitée par un mélange TFA/MeOH, seul le produit cyclisé **5a** est obtenu (Schéma 3.18). La formation de l'imidazolone correspondante **34** n'a pas été mise en évidence pendant le suivi de la réaction par l'analyse RMN ^1H et CCM du brut réactionnel.

Nous avons alors élaboré une stratégie synthétique qui implique la désactivation de l'atome d'azote indolique de la tryptamine par protection avec un groupe électroattracteur. Ainsi la réaction en milieu acide devrait s'arrêter à l'imidazolone. Ensuite, ce groupe est censé pouvoir être enlevé par un traitement qui n'induit pas la cyclisation de type Pictet-Spengler, donc de préférence en milieu basique. Cette logique nous a fait opter pour l'emploi du groupe *o*-nitrophénylsulfonyle qui peut être facilement enlevé, dans des conditions douces, par traitement avec un nucléophile, comme un thiophénolate, en milieu basique. (Schéma 3.18).

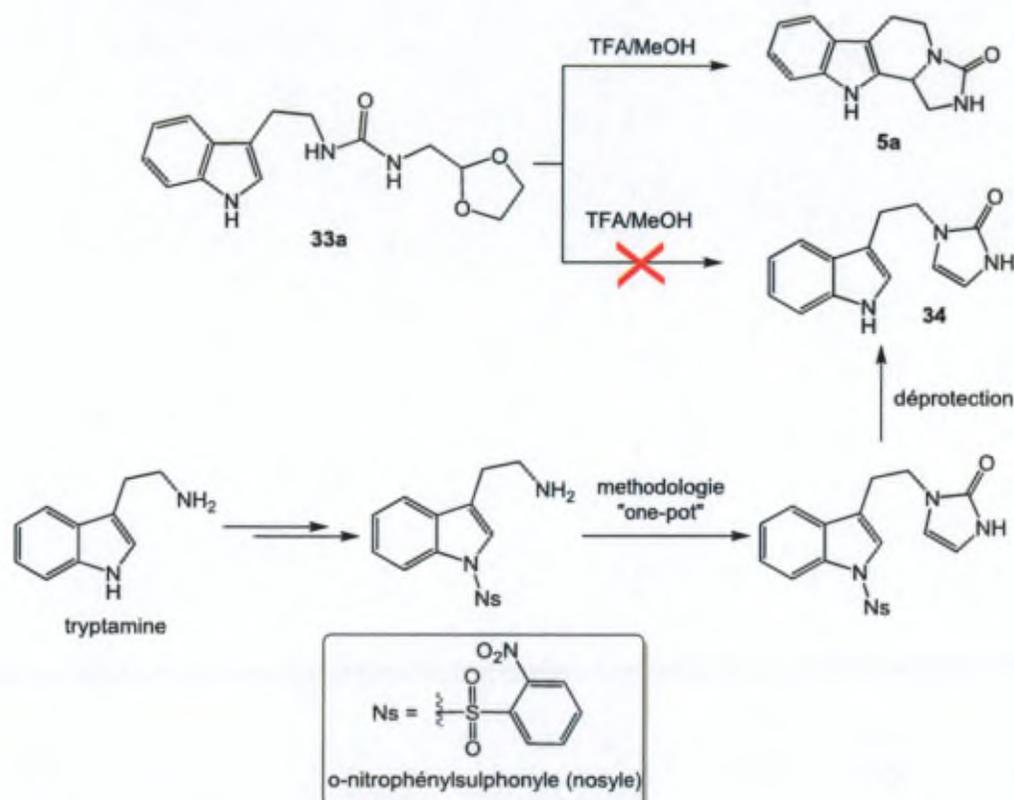


Schéma 3.18 – Stratégie de synthèse d'un substrat imidazolone portant un noyau indolique

La première étape de cette synthèse consiste en la protection du groupe amine primaire de la tryptamine par le groupe Boc. Cette réaction a été facilement réalisée par traitement de la tryptamine avec le di-*tert*-butyl-dicarbonat, en milieu basique, dans du THF anhydre (Schéma 3.19).

La protection désactivante de l'atome d'azote indolique a été effectuée par la réaction avec le chlorure de 2-nitrobènesulfonyle, dans du dichlorométhane en milieu basique, selon une procédure¹⁶⁸ adaptée de la protection de l'indole par un groupe tosyle. Comme base, une solution aqueuse de KOH 6M en présence de 0,2 éq. d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium (TBAHSO₄) a été tout d'abord testée. Dans ces conditions, le produit désiré a été obtenu avec un rendement de 47 %. Le TBAHSO₄ agit en transférant l'ion hydroxyde de la phase aqueuse vers la phase organique via une réaction d'échange avec le KOH. Une fois en phase organique, le TBAOH peut déprotoner l'indole et initier la réaction. Le mode opératoire a été ensuite optimisé en utilisant un excès de KOH sous forme de poudre broyée et 0,05 éq. de TBAHSO₄ comme illustré dans le Schéma 3.19. Cette optimisation a permis d'effectuer cette nosylation avec des rendements de l'ordre de 80%.

Le groupe Boc a été facilement enlevé par traitement avec du TFA pour déprotéger l'amine primaire libre en vue de la réaction avec l'isocyanate. En appliquant notre méthodologie de synthèse « one-pot » sur cette amine nosylée sur l'indole, l'imidazolone **38** a été obtenue avec un rendement moyen de 60% sur deux essais. Plusieurs produits secondaires ont été observés en CCM. Après la purification par chromatographie flash, l'une des taches a été identifiée comme étant le produit **5a** obtenu par la perte du groupe nosyle suivie par la cyclisation de l'imidazolone. La quantité de ce produit ne correspond qu'à 2 % par rapport à l'urée de départ. Les autres produits secondaires n'ont pas été identifiés. Si la réaction est réalisée dans un mélange de TFA/MeOH (1:5), 6 jours à 55°C s'avèrent nécessaires pour compléter la réaction. La quantité de TFA peut être augmentée : TFA/MeOH (1:2) ce qui a considérablement fait chuter la durée réactionnelle à 30 h, et provoqué une légère baisse du rendement de 60% à 55%.

¹⁶⁸ Kuwano, R.; Kashiwabara, M.; Sato, K.; Ito, T.; Kaneda, K.; Ito, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 521-535.

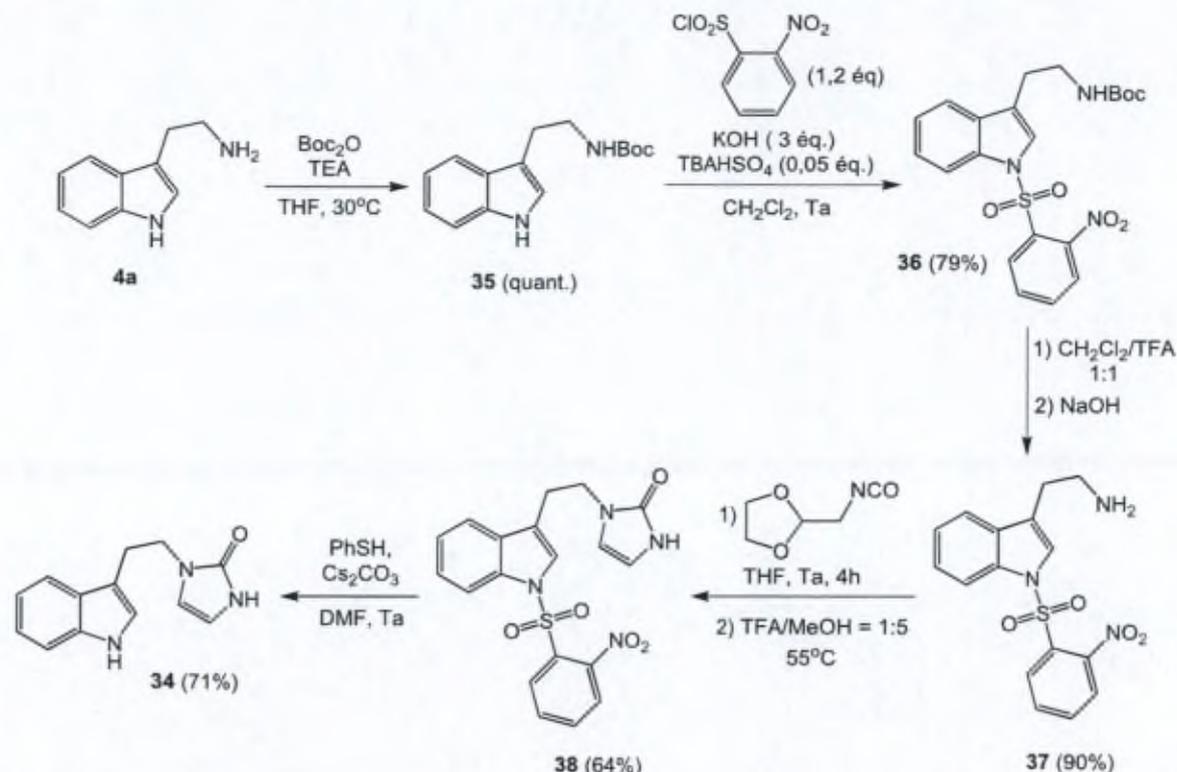


Schéma 3.19 – Synthèse de l'imidazolone **34**. Les rendements présents sur cette Schéma sont exprimés en quantité de produit isolé après purification. Ces réactions ont été réalisées trois fois et les rendements des trois expériences sont cohérents.

Le groupe nosyle a été ensuite enlevé par traitement avec du thiophénol dans du DMF en milieu basique. Cette déprotection est décrite¹⁶⁹ pour des substrats assez complexes, dans de l'acétonitrile. Dans notre cas, l'acétonitrile a été remplacé par le diméthylformamide, car l'imidazolone **38** n'est pas soluble dans l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane. Lors de la purification sur colonne, le DMF qui n'a pas été enlevé par évaporation, est éliminé par élution avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 1:1. L'imidazolone **34** a ainsi été obtenue avec un rendement global de 32% pour 5 étapes.

La caractérisation de ce produit, par RMN ¹H, nécessite impérativement d'utiliser du CDCl₃ passé sur l'alumine basique. Les traces d'HCl, présentes dans le CDCl₃ sont suffisantes pour induire la réaction de cyclisation de l'imidazolone **34** dans le tube RMN.

3.5 Optimisation des conditions de cyclisation asymétrique de l'imidazolone **34**

Une fois l'imidazolone (portant un groupe indole) synthétisée, une nouvelle série de tests de cyclisation asymétrique a été entreprise. Tout d'abord, nous avons repris les conditions et

¹⁶⁹ Mizoguchi, H.; Oguri, H.; Tsuge, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3016-3019.

les catalyseurs qui ont donné les meilleurs résultats dans le cas de l'urée. Les réactions ont donc été effectuées dans du dioxane à l'échelle de 10 ou 15 mg, avec une concentration du substrat de départ de 90 ou 130 mM. Comme attendu, la réactivité a été améliorée d'une manière importante, les réactions catalysées par des phosphoramides ont notamment pu être ainsi effectuées à température ambiante. Le suivi des expériences n'a pas été réalisé par CCM, car l'imidazolone **34** et le produit cyclisé **5a** présentent le même R_f . L'avancement des réactions a donc été contrôlé par l'analyse RMN ^1H des bruts réactionnels. Au cours du temps, l'intensité des signaux correspondants aux protons CH de l'imidazolone diminue et celle du signal correspondant au proton du centre chiral du produit cyclisé **5a** augmente (Figure 3.4).

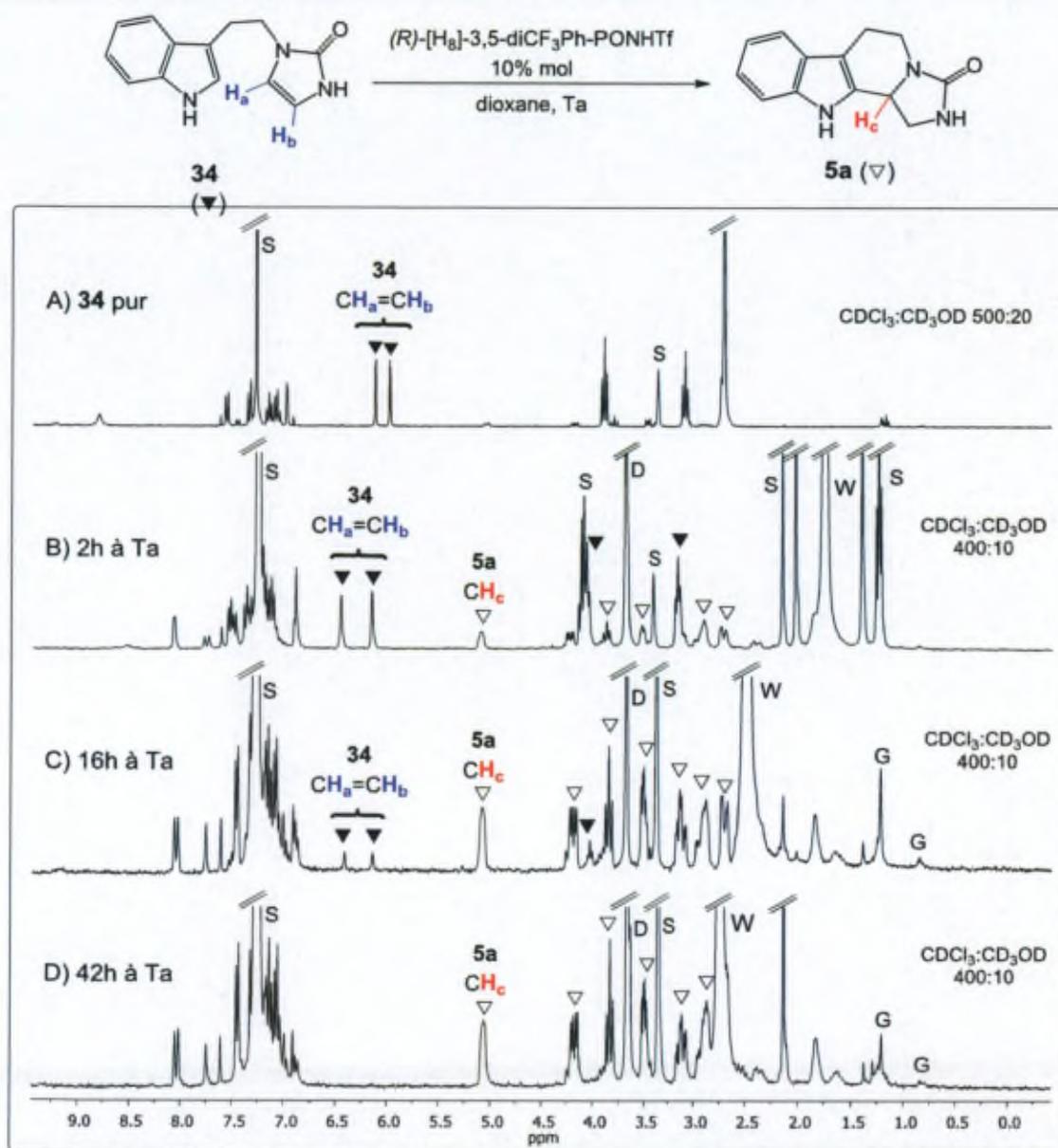
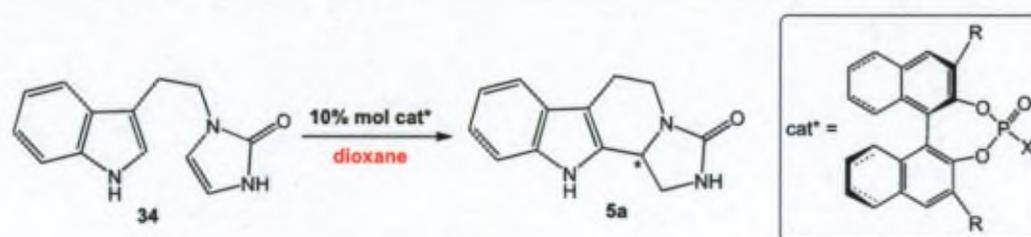


Figure 3.4 – Evolution du spectre RMN ^1H du brut réactionnel de la cyclisation de l'imidazolone **34** en présence d'une phosphoramide chirale. A) Spectre ^1H du produit **34**. B) Spectre ^1H du milieu réactionnel (produit **34** + catalyseur chirale (R) -[H8]-3,5-dicF₃Ph-PONHTf dans dioxane) après 2 h à température ambiante. Le produit **5a** commence à se former ; C) Spectre RMN ^1H du milieu réactionnel après 16h à température ambiante; D) Spectre ^1H du milieu réactionnel après 42h à température ambiante. 300MHz, 298 K, D = dioxane, G = graisse, S = autres solvants, W = eau

Le substrat **34** n'est pas soluble dans le dioxane à cette concentration, ce qui explique les longs temps de réaction nécessaires. Néanmoins, un solvant plus polaire dans lequel la solubilité de l'imidazolone serait meilleure ne peut pas être choisi pour cette réaction car ce type de solvant diminuerait la sélectivité. Les résultats de ces essais sont représentés dans le Tableau 3.8. Dans tous ces essais, la conversion est totale et aucun produit secondaire n'a été observé en CCM. Les rendements illustrés dans le Tableau 3.8 sont exprimés en quantité de produit isolé après purification par FC ou plaque préparative. Une quantité plus importante de produit est perdue lorsque la purification est effectuée sur plaque préparative (entrées 2 et 5), mais cette méthode permet l'élution simultanée de plusieurs plaques, rendant donc le screening plus rapide. Dans le cas de l'acide phosphorique dérivé du BINOL, la conversion est totale et la réaction est propre en CCM. Deux étapes de purification par plaque préparative et FC ont néanmoins été nécessaires pour séparer le produit cyclisé du catalyseur chiral, ce qui explique le faible rendement de seulement 21% (entrée 5).



Entrée	Catalyseur (10% mol)	Température	Temps	Rendement	ee%
1	X = NHTf, R = H	Ta	18h	85%	0
2	X = NHTf, R = TRIP	Ta	48h	61%	5%
3	X = NHTf, R = phénantryl	Ta	64h	76%	7%
4	X = NHTf, R = 3,5-di-CF ₃ Ph	Ta	42h	77%	11%
5	X = OH, R = 3,5-di-CF ₃ Ph	24h à Ta + 68h à 50°C		21%	10%

Tableau 3.8 – Essais de cyclisation asymétrique de l'imidazolone **34** dans du dioxane

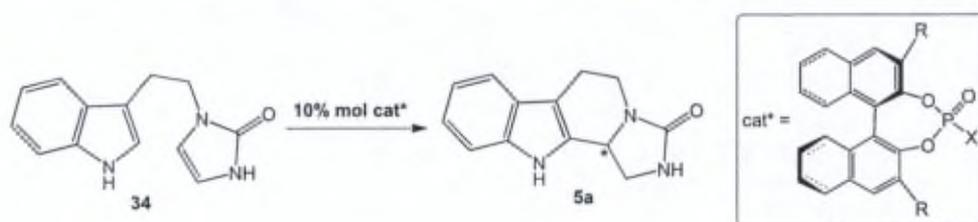
Même si le problème de la réactivité a été résolu par l'utilisation de l'imidazolone, la diastéréosélectivité de la réaction n'a pas été augmentée. Dans ces conditions de réaction il n'existe pas de différence de sélectivité entre la phosphoramidite et l'acide phosphorique (entrées 4 vs. 5). Néanmoins, le fait que l'imidazolone peut être activée par un acide phosphorique et que la réaction a lieu même dans un milieu réactionnel hétérogène, nous a encouragé à tester à nouveau les conditions de réaction mises au point par l'équipe de Dixon.¹⁵⁷

Ainsi, l'imidazolone a été mise en réaction dans du toluène anhydre à une concentration de 5 mM en présence du catalyseur de MacMillan¹⁵⁸ (Tableau 3.9, entrée 1). La réaction a été effectuée à reflux et la conversion fut totale après 40h de réaction. Le produit **5a** a été isolé avec un rendement de 92% après purification par FC et un excès énantiomérique encourageant de 40%, encore jamais obtenu à ce stade.

Un nouveau screening des catalyseurs, de type phosphoramide ou acide phosphorique dérivés du BINOL, a été effectué dans ces nouvelles conditions en utilisant l'imidazolone **34** comme substrat. Les résultats de ce screening sont repris dans le Tableau 3.9.

Lorsque le catalyseur de MacMillan est remplacé par son équivalent phosphoramide la valeur de l'excès énantiomérique chute de 40% à 14% (entrées 1 et 2). La diminution de la température n'a pas entraîné d'augmentation de la sélectivité (entrée 3) conformément à l'observation également faite par Dixon.¹⁵⁷

On observe une certaine influence de la concentration de l'imidazolone sur la sélectivité de la réaction, mais elle n'est pas aussi importante que celle décrite par Dixon.¹⁵⁷ L'excès énantiomérique diminue de 10 % lorsque la concentration est augmentée d'un facteur 10 (entrées 1 et 4).



Entrée	Catalyseur (10% mol)	Solvant	Température	Temps	Rendement	ee%	Conc. du S
1	X = OH, R = SiPh ₃	toluène	110°C	40h	92%	40%	5 mM
2	X = NHTf, R = SiPh ₃	toluène	110°C	2h	96%	14%	5 mM
3	X = NHTf, R = SiPh ₃	toluène	50°C	35h	quant.	15%	5 mM
4	X = OH, R = SiPh ₃	toluène	110°C	24h	88%	30%	50 mM
5	X = OH, R = SiPh ₃	1,4-dioxane	reflux (110°C)	70h	S	-	5 mM
6	X = OH, R = SiPh ₃	dichloréthane	reflux (84°C)	42h	96%	36%	5 mM
7	X = OH, R = 3,5-di-CF ₃ Ph	toluène	110°C	24h	77%	40%	5 mM
8	X = OH, R = antryl	toluène	110°C	24h	quant.	2%	5 mM
9	X = OH, Vapal*	toluène	110°C	4h30'	96%	2%	5 mM
10	X = OH, R = Phenantryl	toluène	110°C	24h	67%**	2%	5 mM
11	X = OH, R = 4- <i>t</i> BuPh	toluène	110°C	22h	87%	2%	5 mM
12	X = OH, R = TRIP	toluène	110°C	22h	quant.	30%	5 mM

Tableau 3.9 – Essais de cyclisation asymétrique de l'imidazolone **34** dans des solvants apolaires non-coordinants. Ces expériences ont été effectuées à l'échelle de 10 mg et le rendement est exprimé en quantité de produit isolé après purification par FC.

*) Pour la structure revoir Tableau 3.5

**) Le catalyseur a un R_f proche du produit et les fractions contenant un mélange des deux n'ont pas été prises en compte pour le calcul du rendement.

Ensuite, l'influence du solvant sur la réactivité et la sélectivité a été évaluée (entrées 1, 5 et 6). La réaction de cyclisation n'a pas été catalysée par l'acide phosphorique dérivé du BINOL dans du dioxane (entrée 5). Après 70 h de réaction, le substrat de départ est l'espèce majoritaire détectée par l'analyse RMN du brut réactionnel. Plusieurs produits secondaires, ou produits de dégradation, sont également observés sur le spectre RMN, leur structure n'a pas été déterminée.

Lorsque le dichloroéthane remplace le toluène comme solvant, la réaction s'opère avec un très bon rendement, mais avec une sélectivité légèrement plus faible (entrée 6 *versus* 1).

Les conditions optimales pour la réaction sont donc celles présentées en entrée 1. Avec ces conditions, plusieurs catalyseurs dérivés de l'acide phosphorique, portant différents substituants en position 3,3', ont été testés sans succès notable (entrées 7-12).

Le catalyseur portant le groupe 3,5-trifluorométhylphényle s'est avéré aussi efficace que le catalyseur de MacMillan en terme d'énantiocontrôle (entrées 1 et 7), alors que celui équipé du substituant TRIP donne un excès énantiomérique appréciable de 30%. Les autres acides phosphoriques conduisent au produit **5a** quasi racémique. Le catalyseur portant des substituants phénantryle a un R_f proche de celui du produit, ce qui explique la quantité plus faible de produit isolé obtenue (entrée 10).

Pour pouvoir expliquer des différences de sélectivité aussi marquées obtenues avec les différents catalyseurs testés, plusieurs hypothèses sur les interactions substrat-catalyseur peuvent être avancées.

Les acides phosphoriques sont des catalyseurs bi-fonctionnels car l'atome d'oxygène de la double liaison phosphoryle agit comme une base de Brønsted tandis que le groupe OH agit comme un acide de Brønsted.

Dans le mécanisme proposé par Terada^{153b, 154f} pour expliquer l'énantiosélectivité de la réaction de Mannich entre des β -dicétones et des imines *N*-Boc, les deux sites sont impliqués dans des interactions par des liaisons hydrogène (Figure 3.5). La partie « base de Brønsted » du catalyseur interagit avec le groupe OH de la forme énolique de l'acétylacétone, stabilisant ainsi cette forme énolique nucléophile, et simultanément le proton acide du catalyseur active l'imine en générant un intermédiaire protio-iminium davantage électrophile. Les substituants volumineux présents en positions 3,3' restreignent la mobilité des partenaires de réaction ainsi connectés l'un à l'autre, assurant un environnement chiral pour les transformations énantiosélectives.

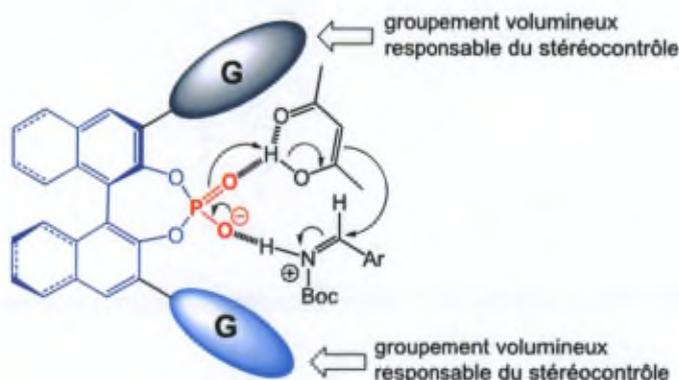


Figure 3.5 - Mécanisme hypothétique de la réaction de Mannich énantiosélective catalysée par l'acide phosphorique chiral

Certains substituants présents en positions 3,3' de l'anion chiral semblent incompatibles avec la formation d'un microenvironnement chiral suffisamment compact autour du substrat pour obtenir une bonne sélectivité.¹⁷⁰ Dans le cas des groupes moins volumineux comme le vapol (entrée 9) et le *p-t*-Bu-C₆H₄ (entrée 11) les liaisons hydrogène entre le groupe phosphate et le substrat peuvent certes se former, mais il y aurait trop peu de contraintes stériques, ce qui implique une faible induction asymétrique. Par contre, certains groupes à forte demande stérique comme l'anthryle ou le phénanthryle (entrées 8 et 10) tiendraient le substrat éloigné de l'anion chiral ce qui expliquerait la faible induction asymétrique. Il est envisageable que dans ce cas-ci, seules des interactions ioniques soient possibles entre le phosphate et l'ion *N*-carbamylinium, sans formation de liaisons hydrogène.

Le catalyseur de type MacMillan (entrée 1), et celui portant des substituants 3,5-di-CF₃Ph (entrée 7) ou TRIP (entrée 12) semblent avoir la taille appropriée pour pouvoir accueillir le substrat à proximité du groupe phosphate et ainsi stabiliser cette interaction par des liaisons hydrogène supplémentaires, ce qui conduit à des excès énantiomériques plus élevés. Etant donné l'importante différence structurale qui existe entre ces trois substituants, il est possible que leurs effets électroniques ne jouent pas un rôle très important sur la sélectivité.

A toutes ces considérations s'ajoute la possibilité que des interactions par liaisons hydrogène se créent dans un site où l'ion *N*-carbamylinium est éloigné du nouveau centre chiral, comme l'illustre la partie gauche de la Figure 3.6. La conséquence attendue de telles interactions indésirables est une induction asymétrique faible, voire nulle qui viendrait annihiler l'éventuelle bonne induction découlant de l'état de transition favorable tel que, par exemple, celui illustré à droite de la Figure 3.6.

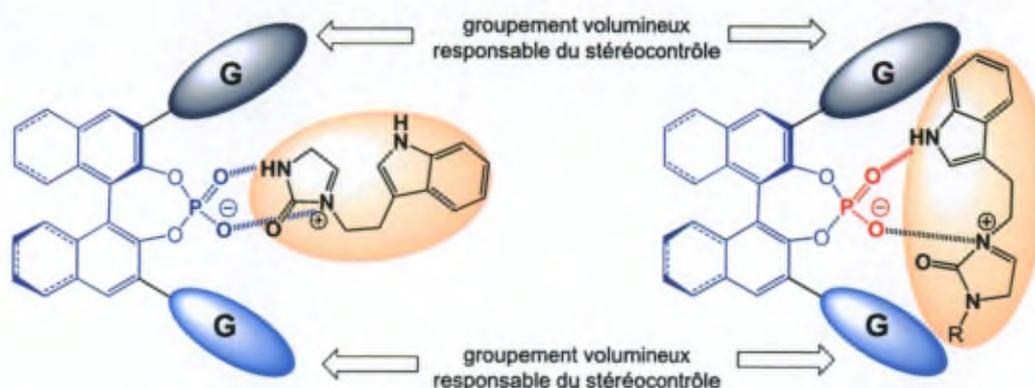


Figure 3.6 – Interactions possibles entre le catalyseur et l'ion *N*-carbamylinium

Afin de confirmer ces hypothèses, des substrats de type imidazolone modifiés au niveau des substituants des atomes d'azote ont été synthétisés puis évalués dans notre cyclisation énantiosélective, comme décrit dans les deux paragraphes suivants.

¹⁷⁰Thèse d'Ilija Čorić, 2012 - promoteur Prof. Dr. Benjamin List, Max-Planck Institut für Kohlenforschung.

3.6 Alkylation de l'imidazolone 34

En premier lieu il était nécessaire d'empêcher le groupe NH de l'imidazolone d'effectuer des liaisons hydrogène avec le catalyseur (partie gauche de la Figure 3.6). Par conséquent, nous avons décidé de substituer l'atome d'hydrogène de l'imidazolone par un groupe méthyle. Dans ce but, le composé **40** a été synthétisé par une séquence de deux étapes impliquant d'abord la méthylation de l'imidazolone du substrat **38** dont l'atome d'azote indolique est protégé par un groupe nosyle, suivie de la déprotection de ce dernier (Schéma 3.20). Les rendements présentés sont exprimés en produit pur isolé après purification par FC. Lors de l'alkylation du dérivé **38**, une fraction a été dénosylée et un mélange des composés **39** et **40** est obtenu. En ce qui concerne le produit **40**, le rendement a été calculé à partir du composé **38**. D'autre part, l'imidazolone diméthylée **41** a été obtenue par l'alkylation directe de l'imidazolone **34** (Schéma 3.20). Ce dérivé diméthylé nous permettra également d'évaluer l'influence du proton NH indolique sur le stéréocontrôle de la cyclisation.

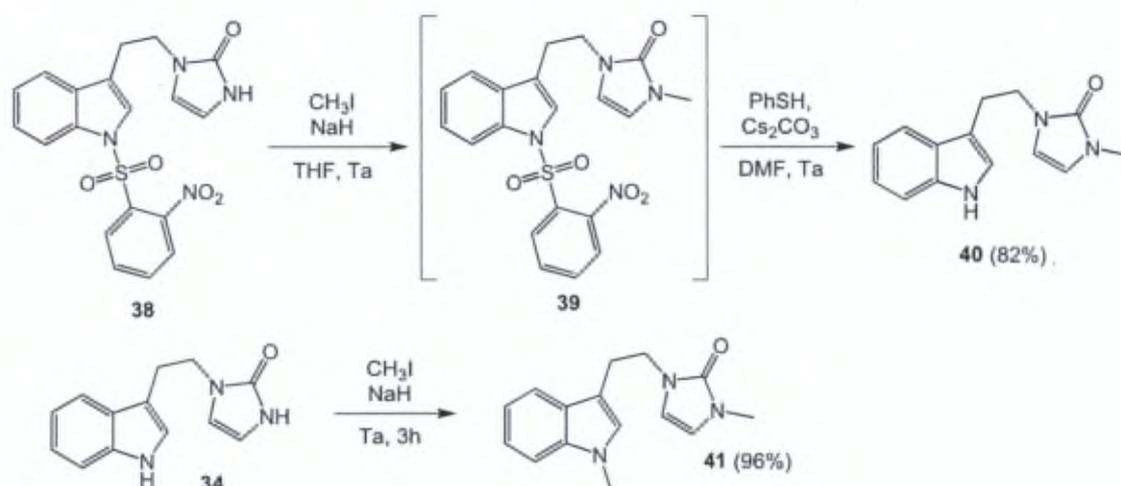


Schéma 3.20 – Synthèse des imidazolones portant des groupes méthyle sur les atomes d'azote

3.7 Cyclisation asymétrique des substrats alkylés

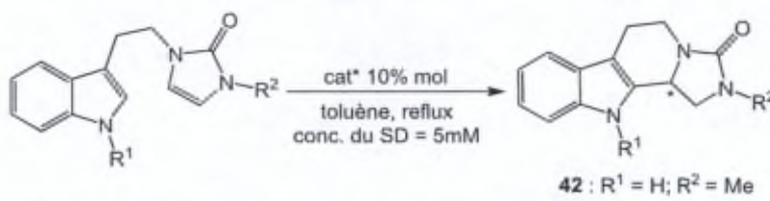
Ces deux substrats, **40** et **41** ont été testés pour la cyclisation asymétrique dans les conditions de Dixon. Les résultats sont illustrés dans le Tableau 3.10. La cyclisation de l'imidazolone **40** a été réalisée avec succès pour donner le produit cyclisé **42** avec un bon rendement et un excès énantiomérique très satisfaisant de 87% (entrée 2).

De façon cohérente avec les résultats précédents obtenus à partir du substrat bis-NH (Cf tableau 10, entrée 7), une bonne sélectivité (*ee* de 83%, entrée 3) a été également obtenue en utilisant le catalyseur portant des substituants 3,5-di-CF₃Ph. Par contre, lorsque l'atome d'azote

indolique est également alkylé (substrat **41**), la réaction est inhibée et après 114 h d'agitation au reflux, seul le substrat **41** a été observé dans le spectre RMN ^1H du brut réactionnel (entrée 4).

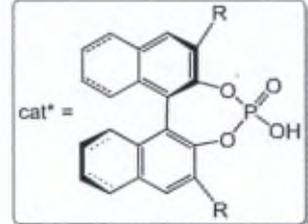
Ces résultats semblent confirmer notre hypothèse, selon laquelle l'atome d'hydrogène du NH de l'imidazolone interagit de façon préjudiciable avec le catalyseur chiral.

Cette interaction tient le catalyseur éloigné du site de la cyclisation. L'absence de réactivité du substrat *N,N*-diméthylé **41** suggère également qu'une interaction entre l'anion chiral et l'atome d'hydrogène porté par l'azote indolique est indispensable pour activer ce nucléophile. Ainsi, le catalyseur n'agit pas uniquement en activant le caractère électrophile de l'imidazolone par le transfert de proton, mais plutôt en adoptant un mode d'activation bifonctionnel en accord avec le postulat de Terada illustré Figure 3.5 et Figure 3.6.



42 : R¹ = H; R² = Me

cat* =



Entrée	Substrat (S)	R ¹	R ²	Catalyseur	Temps	Rendement	Observations	ee%
1	34	H	H	R = SiPh ₃ (MacMillan)	40h	92%	-	40%
2	40	H	Me	R = SiPh ₃ (MacMillan)	5h	91%	-	87%*
3	40	H	Me	R = 3,5-di-CF ₃ Ph	22h	97%	-	83%
4	41	Me	Me	R = SiPh ₃ (MacMillan)	114h	-	S	-

Tableau 3.10 – Cyclisation asymétrique des imidazolones portant des substituants méthyle sur les atomes d'azote.

*) L'ee est calculé comme moyenne de deux expériences.

3.8 Synthèse énantiosélective du dérivé de la tétrahydro- β -carboline-imidazolidinone **25f**

Une fois la méthode de cyclisation énantiosélective mise à point, nous nous sommes intéressés à la synthèse du produit doté de l'activité biologique la plus prometteuse: la 2,11-bis(4-(trifluorométhyl)benzyl)-1,2,5,6,11,11b-hexahydro-3H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3-one (**25f**).

En premier lieu, la synthèse de l'imidazolone **45**, monosubstituée sur l'atome d'azote de l'imidazolone par un groupe 4-(trifluorométhyl)benzyle était nécessaire. L'alkylation de l'imidazolone protégée **38** a conduit à un mélange des imidazolones mono- **43** et dialkylée **44**. L'analyse RMN ^1H du brut réactionnel montre un rapport de **43/44** de 1:0,2. Le composé **43** a été isolé de ce mélange, par chromatographie flash et un rendement de 52% a été calculé à l'aide des spectres RMN de différentes fractions. Si le temps de réaction est augmenté de 2 h à

16 h, la proportion de produit di-alkylé **44** augmente (**43** : **44** = 1 : 0,75). Dans ce cas, le produit **44** a été isolé avec un rendement de 38%. D'autres essais pour optimiser les résultats de cette réaction n'ont pu être effectués par manque de temps.

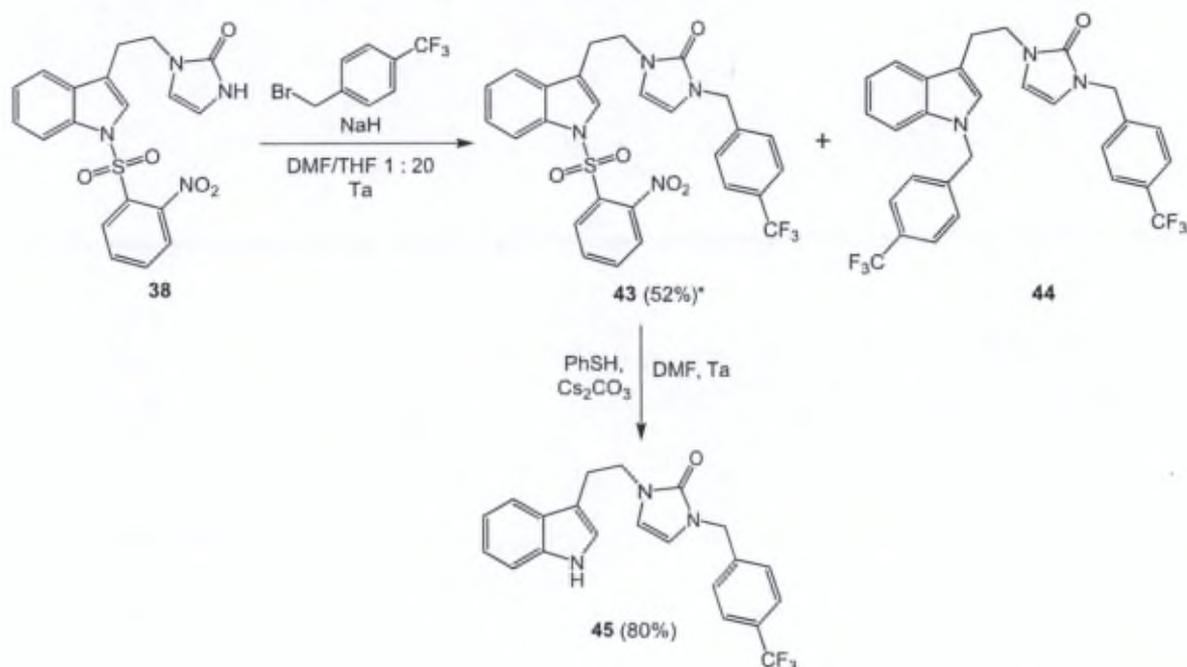
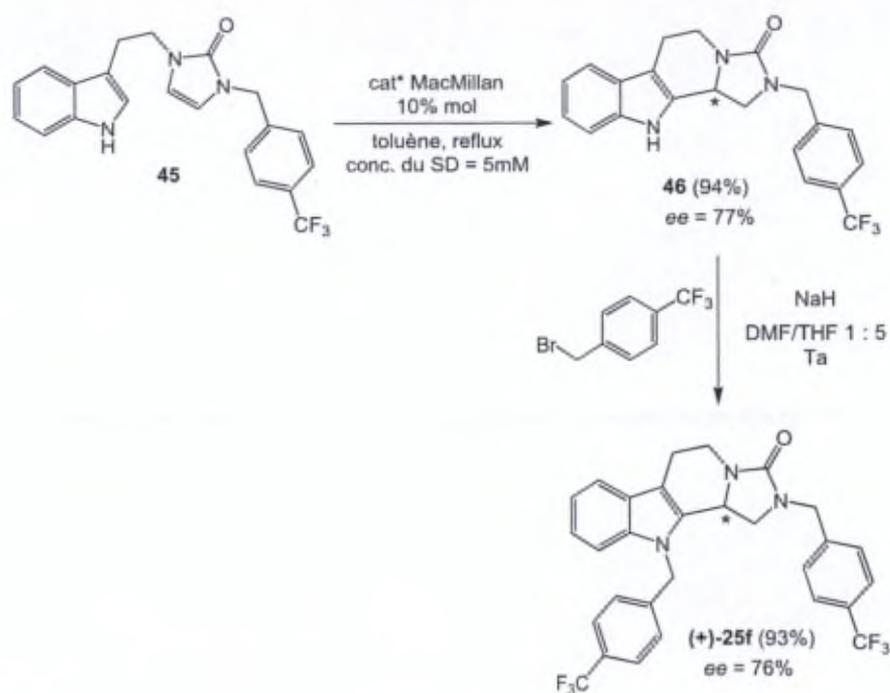


Schéma 3.21 – Synthèse des imidazolones portant des substituants 4-(trifluorométhyle)benzyle sur les atomes d'azote.
Rendement calculé sur base des spectres RMN ¹H des différentes fractions obtenues après la purification par FC.

La cyclisation énantiosélective de l'imidazolone **45** a été effectuée en utilisant la méthode décrite précédemment pour aboutir au dérivé de THBCI portant un groupe 4-(trifluorométhyl)benzyle sur l'azote de l'imidazolone **46** (Schéma 3.22). Ce composé a été obtenu avec un rendement de 94% et un *ee* satisfaisant de 77%, mais toutefois moins bon que celui obtenu à partir de l'analogue méthylé **40** (87% *ee*, Tableau 3.10). Ensuite, l'atome d'azote indolique a été alkylé pour donner, après 16 h de réaction, le composé **25f** avec un rendement de 93%.

Ce produit a été analysé par HPLC chirale, et la mesure de l'excès énantiomérique (76%) nous a permis de nous assurer qu'il ne racémise pas durant l'étape d'alkylation. Cette mesure a été effectuée sur la même colonne HPLC, en utilisant un mélange *n*-heptane/2-propanol 80:20 comme phase mobile. Pour confirmer nos résultats le composé **25f** racémique a été également injecté dans le système HPLC.

Schéma 3.22 – Synthèse asymétrique du produit (+)-25f (*ee* = 76%)

L'obtention du produit **25f** a été également tentée par la cyclisation directe de l'imidazolone **44**, mais comme attendu d'après les résultats précédents (Cf tentative infructueuse de cyclisation de **41**), après 24 h à reflux dans du toluène, l'analyse du spectre RMN du brut réactionnel n'a montré aucune conversion.

A ce stade de notre étude, il faut signaler que la configuration absolue des produits énantiomériques n'a pas été déterminée.

3.9 Conclusions

La synthèse asymétrique du produit 2,11-bis(4-(trifluorométhyl)benzyl)-1,2,5,6,11,11b-hexahydro-3H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3-one, (+)-**25f**, qui possède les propriétés biologiques les plus intéressantes a été réalisée avec succès (rendement de 17 % sur 8 étapes, *ee* de 76%). Schéma 3.23.

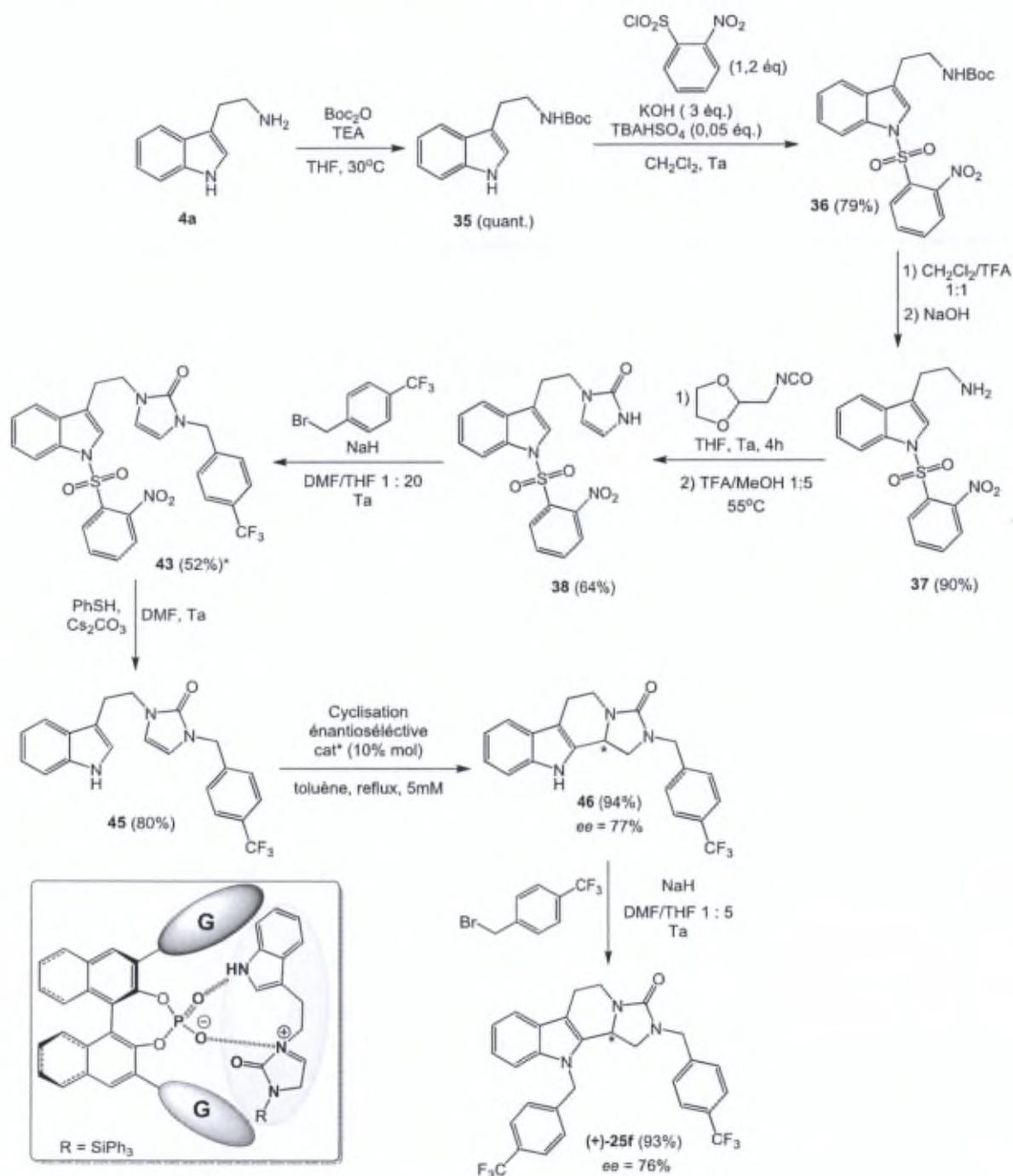
La voie directe comprenant la méthodologie « one pot » de synthèse des dérivés de THBCI, suivie de la cyclisation asymétrique, a dû être abandonnée. En effet, les catalyseurs de type acide phosphorique dérivé du BINOL ne sont pas suffisamment acides pour activer directement l'aldéhyde protégé des substrats urée ou les imidazolones portant des nucléophiles plus faibles que le noyau indole.

Pour résoudre ce problème de réactivité, l'imidazolone **34** portant le noyau indole a été synthétisée avec succès selon un schéma comportant 5 étapes, avec un rendement global de 32%. Sa cyclisation énantiosélective, catalysée par un acide phosphorique dérivé du BINOL a mené au premier résultat encourageant : l'obtention du dérivé souhaité de THBCI **5a**, avec un rendement de 92% et un excès énantiomérique de 40% (Schéma 3.19, Tableau 3.9).

Le screening général des catalyseurs et des substrats utilisés au cours de cette étude, a permis une meilleure compréhension du fonctionnement de ces types de catalyseurs et d'en tirer quelques conclusions sur le mécanisme de la réaction de Pictet Spengler énantiosélective:

- L'atome d'hydrogène du NH de l'imidazolone semble interagir de façon défavorable avec le catalyseur chiral. Cette interaction tient le catalyseur éloigné du site de la cyclisation ce qui se traduit dans une sélectivité moyenne.
- L'absence de réactivité de l'imidazolone *N,N*-diméthylée **41** suggère qu'une interaction entre l'anion chiral et l'atome d'hydrogène porté par l'azote indolique est indispensable pour activer ce nucléophile.
- Le catalyseur n'agit pas uniquement en activant le caractère électrophile de l'imidazolone par un transfert de proton, mais plutôt en adoptant un mode d'activation bifonctionnel : l'atome d'oxygène de la double liaison phosphoryle agit comme une base de Brønsted tandis que le groupe OH agit comme un acide de Brønsted.
- L'acide phosphorique dérivé du BINOL, portant en positions 3,3' des substituants SiPh₃ et celui portant des substituants 3,5-di-CF₃Ph semblent avoir la taille appropriée pour pouvoir accueillir le substrat à proximité du groupe phosphate. Ainsi l'interaction catalyseur-substrat est stabilisée par des liaisons hydrogène supplémentaires, ce qui conduit à des excès énantiomériques plus élevés.
- Il est à remarquer que les acides phosphoriques donnent de meilleurs *ee* par rapport aux phosphoramides analogues.

Il est important de noter que, dans le schéma de synthèse suivi, les dérivés intermédiaires (36, 37, 38, 43, 45 et 46) ainsi que le produit final 25f, sont tous des produits originaux.



Sch\u00e9ma 3.23 – Synth\u00e8se \u00e9nantios\u00e9lective du compos\u00e9 (+)-25f (ee = 76%)

Chapitre IV

Analyses pharmacologiques

4.1 Analyse de l'activité anticancéreuse *in vitro*

4.1.1 Evaluation de la concentration inhibitrice de croissance IC_{50} via le test colorimétrique MTT

4.1.1.1 Généralités

Un premier criblage qui permet d'identifier les composés présentant une activité anticancéreuse *in vitro* a été effectué à l'aide du test colorimétrique MTT. Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes, et métaboliquement actives, de réduire le sel de tétrazolium MTT (3-[4,5- diméthylthiazol-2yl-diphényltétrazolium bromide) en formazan (Schéma 4.1). Cette réduction, schématisée ci-dessous, est effectuée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan (insolubles dans le milieu de culture) sont dissouts à la fin du test dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour donner une solution violette. L'absorbance de cette solution est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes, et métaboliquement actives, qui restent dans le récipient de culture après trois jours de traitement avec le produit d'intérêt.

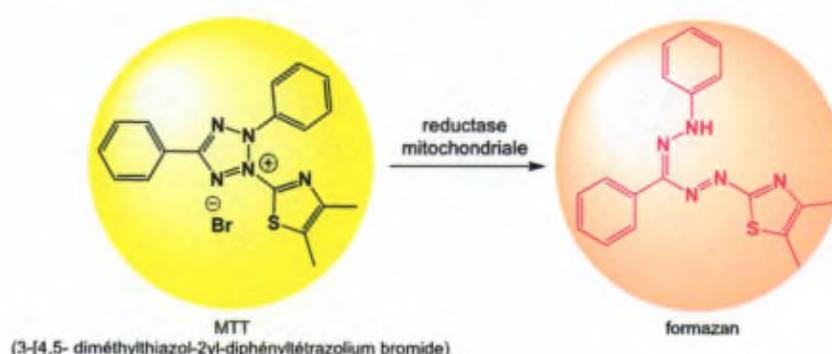


Schéma 4.1 – Réduction du MTT par les cellules métaboliquement actives

Les 47 composés (5a-h, 13a-c, 11, 17, 25a-t, 26a-c, 21, 22, 27, 28, 34, 38, 42, 43, 44, et 46), synthétisés dans le cadre de ce projet, ont été évalués au niveau de leur activité anticancéreuse *in vitro* en utilisant le test colorimétrique MTT. Celui-ci permet de calculer la concentration inhibitrice de croissance de 50% (IC_{50}) définie comme la concentration qui inhibe à 50% la croissance globale d'une population de cellules après trois jours de mise en présence des cellules avec le produit d'intérêt.

Chaque composé a été testé sur 6 lignées cellulaires cancéreuses humaines. Les composés les plus intéressants ont été également évalués sur une lignée cancéreuse murine. Une moitié des lignées cellulaires humaines employées est sensible aux stimuli pro-apoptotiques :

Hs683¹⁷¹ (oligodendrogliome), MCF7¹⁷² (cancer du sein) et PC-3¹⁷² (cancer de la prostate). Les autres 3 lignées cellulaires présentent divers niveaux de résistance aux stimuli pro-apoptiques liés à la chimiothérapie cytotoxique : U373¹⁷¹ (glioblastome), SKMEL-28¹⁷³ (mélanome) et A549¹⁷⁴ (cancer du poumon-non-à-petites cellules).

Afin de pouvoir mieux expliquer les relations de type structure-activité, les résultats sont présentés en 4 tableaux en fonction du squelette moléculaire des produits analysés (Tableaux 4.1-4.4.). Pour cette première étape de criblage nous avons considéré comme inactifs les composés qui ont une valeur de concentration inhibitrice de croissance IC₅₀ supérieure à 100 µM (notés « > 100 » dans les tableaux). Chaque valeur de concentration IC₅₀ représente la valeur moyenne calculée sur six mesures. Pour les composés qui sont actifs sur l'ensemble des six lignées cellulaires testées, la moyenne et l'erreur standard de la moyenne ont été calculées.

$$SEM = \frac{\text{deviation standard}}{\text{racine carrée (no. d'essais)}}$$

Les résultats obtenus pour les dérivés de tétrahydro-β-carbolines sont également représentés sous forme d'un histogramme (Figure 4.1).

La pureté de chaque composé qui a été soumis au test colorimétrique MTT a été préalablement évaluée en combinant plusieurs techniques : la spectrométrie RMN ¹H, la CCM et l'HPLC. Cet aspect sera discuté plus en détail par la suite (§ 4.1.2). Les valeurs de pureté déterminées par HPLC sont décrites dans la dernière colonne des Tableaux 4.1-4.1.

4.1.1.2 Activité anticancéreuse des composés synthétisés - Analyse de type structure-activité (SAR)

Dérivés de THBC et THBCP

Les résultats présentés dans le Tableau 4.1 montrent que les dérivés tétracycliques de tétrahydro-β-carbolines, non-substitués sur les atomes d'azote, ne sont pas actifs (**5a-h**, concentrations IC₅₀ >100 µM, entrées 1-9).

La substitution des atomes d'azote par des groupes méthyle (entrées 10-12) ne rend pas les produits actifs. En revanche, les dérivés de type THBCI deviennent actifs lorsqu'au moins un des atomes d'azote est benzylé (entrées 13, 14 et 33). A remarquer que le composé **46** (IC₅₀

¹⁷¹ Branle, F.; Lefranc, F.; Camby, I.; Jeuken, J.; Geurts-Moespot, A.; Sprenger, S.; Sweep, F.; Kiss, R.; Salmon, I. *Cancer* **2002**, *95*, 641-655.

¹⁷² Dumont, P.; Ingrassia, L.; Rouzeau, S.; Ribaucour, F.; Thomas, S.; Roland, I.; Darro, F.; Lefranc, F.; Kiss, R. *Neoplasia* **2007**, *9*, 766-776.

¹⁷³ Van Goietsenoven, G.; Hutton, J.; Becker, J.P.; Lallemand, B.; Robert, F.; Lefranc, F.; Pirker, C.; Vandebussche, G.; Van Antwerpen, P.; Evidente, A.; Berger, W.; Prévost, M.; Pelletier, J.; Kiss, R.; Kinzy, T.G.; Kornienko, A.; Mathieu, V. *FASEB J.* **2010**, *24*, 4575-4584.

¹⁷⁴ Mathieu, A.; Rummelink, M.; D'Haene, N.; Penant, S.; Gaussin, J.F.; Van Ginckel, R.; Darro, F.; Kiss, R.; Salmon, I. *Cancer* **2004**, *101*, 1908-1918;

= 39 μM) qui porte un groupe électroattracteur (trifluorométhyle) sur le groupe benzyle est plus actif que le composé **25c** (IC_{50} = 74 μM) qui porte des substituants méthyle et benzyle.

Neuf dérivés de la série THBCI (**25c**, **25d**, **25f**, **25i**, **25g**, **25t**, **46**; entrées 13, 14, 15, 17-21, 30, 33) sont actifs vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires tumorales testées. Pour ces composés, aucune différence d'activité n'a été observée entre les lignées sensibles ou plus ou moins résistantes aux stimuli pro-apoptotiques. Pour certains d'entre eux, les tests biologiques ont été réalisés en duplicats ou en triplicats, dans le but de confirmer les résultats. Quatre des produits analysés présentent parmi les activités anticancéreuses les plus intéressantes avec des concentrations IC_{50} moyennes qui se situent en dessous de 50 μM . Il s'agit notamment des produits **25d** (concentration IC_{50} moyenne = 31 μM), **25f** (IC_{50} moyenne = 21 μM), **25i** (IC_{50} moyenne = 34 μM) et **46** (IC_{50} moyenne = 39 μM).

Le composé **25f** est le plus actif en termes d'activité anticancéreuse *in vitro*. Il a été obtenu par alkylation des atomes d'azote avec des groupements benzyle eux-mêmes porteurs de groupes électroattracteurs en position 4 (entrée 17). L'activité de ce produit a été testée d'abord avec le mélange racémique. Afin de déterminer si l'un des deux énantiomères était plus actif que l'autre, ils ont été séparés par HPLC chirale sur colonne semi-préparative et testés séparément via le test colorimétrique MTT (entrées 18 et 19). Curieusement, les deux énantiomères présentent une activité similaire au niveau de l'inhibition globale de la prolifération cellulaire et les concentrations inhibitrices de croissance IC_{50} sont légèrement plus faibles que celle du mélange racémique. Le composé (+)-**25f** (ee = 76%), obtenu via la méthode asymétrique, a été également évalué via le test MTT et son activité se situe dans les mêmes valeurs de concentrations IC_{50} que celles du mélange racémique (entrée 20).

Les dérivés **25e** (portant des groupes donneurs d'électrons sur les substituants benzyle, entrée 16), **25j** et **25k** (portant des groupes OMe en positions 5 ou 6 du noyau indole, entrées 24, 25), **25l** (dont le quatrième cycle est un cycle à 6 chaînons, entrée 26) sont actifs sur quatre lignées cellulaires humaines, mais ne présentent pas d'activité sur les lignées résistantes à la chimiothérapie pro-apoptotique telles les lignées SKMEL-28 (mélanome) et U373 (glioblastome).

La présence de deux groupes trifluorométhyle en positions 3 et 5 du noyau benzyle diminue également l'activité d'inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* (produits **25f** vs. **25h**, entrées 17 et 22).

L'acylation de l'atome d'azote de l'imidazolidinone ne rend pas le squelette de type tétrahydro- β -carboline actif (produit **9r**, IC_{50} > 98 μM , entrée 32).

Des composés moins actifs ont été obtenus lorsque les atomes d'azote ont été substitués par un groupe hydrophobe différent comme l'ester de *tert*-butyle (produit **25p**, IC_{50} moyenne = 63 μM , entrée 30). L'élimination du groupement *tert*-butyle conduit à la perte complète de l'activité inhibitrice de la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* (produit **25q**, IC_{50} moyenne > 100 μM ; entrée 31).

Parmi les composés moins actifs, on peut également mentionner les produits : **25t** (IC_{50} moyenne $> 76 \mu M$, entrée 33) qui est alkylé uniquement sur l'atome d'azote indolique, **25c** (IC_{50} moyenne = $74 \mu M$ entrée 13) et **25b** portant des substituants méthyle (IC_{50} moyenne $> 97 \mu M$, entrée 12).

L'alkylation des atomes d'azote avec des substituants polaires comme des imidazoles induit une perte de l'activité anticancéreuse (produit **25o**, IC_{50} moyenne $> 100 \mu M$, entrée 29).

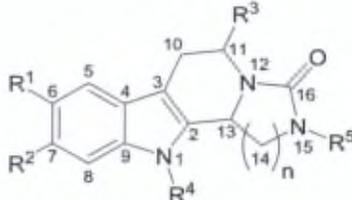
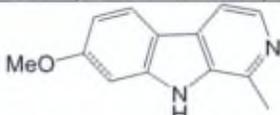
Les composés provenant des esters de tryptophane et portant des substituants sur l'atome de carbone en position 11, comme les produits (+)-**25m** (entrée 27) et (+)-**25n** (entrée 28), ne sont pas actifs, malgré le fait qu'ils possèdent des substituants benzyles sur les atomes d'azote.

Le dérivé cationique de THBCP, **11** (IC_{50} moyenne = $39 \mu M$, entrée 34), présente une activité intéressante malgré le fait que c'est un produit assez polaire pour lequel on ne supposait pas une bonne pénétration cellulaire. L'alkylation de ce produit est une voie qui reste à exploiter dans l'espoir d'augmenter encore l'activité de ce type de composé.

Activité anticancéreuse des imidazolones.

L'imidazolone **34** non-substituée n'est pas active (Tableau 4.1, entrée 35). Le composé **38**, portant un groupe nosyle sur l'atome d'azote indolique est actif, mais présente une activité moindre sur la lignée de glioblastome U373 résistante à la chimiothérapie pro-apoptotique ($IC_{50} = 100 \mu M$, entrée 36). Lorsque l'atome d'azote de l'imidazolone est alkylé, le composé perd l'activité sur la lignée de mélanome SKMEL-28 (**43**, entrée 35). Le produit **44** (l'imidazolone correspondante du composé **25f**) présente une activité similaire avec celui-ci.

Après ce premier criblage pharmacologique via le test colorimétrique MTT, la stabilité des produits les plus actifs a été évaluée dans le milieu de culture avant de poursuivre les analyses pharmacologiques. Les résultats concernant la stabilité physicochimique des dérivés, ainsi que leur pureté sont détaillés dans le paragraphe 4.1.2.

Entrée	Composé	Structure						IC ₅₀ [μM] Lignées cellulaires								Pureté HPLC (%)
								Humaines						Murine		
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	n	HS683	MCF7	PC3	SKMEL-28	U373	A549	Moyenne ± SEM	B16F10	
	Harmine							32	26	32	27	26	29	29 ± 1		
1	5a	H	H	H	H	H	1	>100	-	-	-	>100	-	>100	-	92
2	5b	OMe	H	H	H	H	1	>100	-	-	-	>100	-	>100	-	99
3	5c	H	OMe	H	H	H	1	>100	-	-	-	>100	-	>100	-	97
4	(+)-5d	H	H	(S)- COOMe	H	H	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	94
5	(-)-5d	H	H	(R)- COOMe	H	H	2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	94
6	5e	H	H	H	H	H	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	100
7	(+)-5f	H	H	(S)-COOH	H	H	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	100
8	(+)-5g	H	H	(S)- CONHCH ₂ - Ph	H	H	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	99
9	5h	OH	H	H	H	H	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	91
10	25a	H	H	H	CH ₃	H	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	93
11	42	H	H	H	H	Me	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	91
12	25b	H	H	H	CH ₃	CH ₃	1	>100	86	>100	>100	96	>100	>97	-	89
13	25c	H	H	H	CH ₃	CH ₂ Ph	1	75	81	69	82	100	81	81 ± 4	81	87
								65	51	68	66	83	65	66 ± 4	-	
14	46	H	H	H	H	4-(trifluoromethyl)- benzyle	1	27	28	23	36	93	25	39 ± 11	-	99

15	25d	H	H	H	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	1	24	23	16	41	36	27	28 ± 4	28	98
								31	30	37	46	30	27	34 ± 3	51	
16	25e	H	H	H	4-methoxybenzyle	4-methoxybenzyle	1	52	30	44	>100	>100	41	>61	-	94
17	(±)-25f	H	H	H	4-(trifluoromethyl)-benzyle	4-(trifluoromethyl)-benzyle	1	9	26	2	46	36	15	22 ± 7	13	92
								17	14	22	45	32	15	24 ± 5	46	92
								20	7	8	47	8	14	17 ± 6	8	100
18	(-)-25f	H	H	H	4-(trifluoromethyl)-benzyle	4-(trifluoromethyl)-benzyle	1	23	26	22	78	40	26	36 ± 9	21	99
19	(+)-25f							19	20	14	41	38	30	27 ± 5	25	93
20	(+)-25f (ee : 76%)							24	25	25	41	64	19	33 ± 7	-	94
21	25g	H	H	H	4-chlorobenzyle	4-chlorobenzyle	1	57	28	40	95	42	40	50 ± 10	-	99
22	25h	H	H	H	3,5-di-(trifluoromethyl)-benzyle	3,5-di-(trifluoromethyl)-benzyle	1	>100	>100	45	>100	>100	80	>88	-	99
23	25i	OMe	H	H	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	1	31	29	35	54	41	33	37 ± 4	34	98
								29	25	33	39	33	28	31 ± 2	49	
24	25j	OMe	H	H	4-(trifluoromethyl)-benzyle	4-(trifluoromethyl)-benzyle	1	19	32	35	>100	>100	21	>51	-	92
25	25k	H	OMe	H	4-(trifluoromethyl)-benzyle	4-(trifluoromethyl)-benzyle	1	56	29	29	>100	>100	40	>59	-	99
26	25l	H	H	H	4-(trifluoromethyl)-benzyle	4-(trifluoromethyl)-benzyle	2	75	35	39	92	>100	78	>70	-	94
27	(+)-25m	H	H	(S)-COOCH ₂ Ph	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	97
28	(+)-25n	H	H	(S)-COOMe	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	1	>100	-	-	>100	>100	55	>89	68	87
29	25o	H	H	H	2-(methyl)-1-methyl-1H-imidazole	2-(methyl)-1-methyl-1H-imidazole	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	95
30	25p	H	H	H	CH ₂ COO <i>t</i> Bu	CH ₂ COO <i>t</i> Bu	1	48	64	60	80	80	47	63 ± 6	62	98
								58	42	70	72	77	56	63 ± 5	-	
31	25q	H	H	H	CH ₂ COOH	CH ₂ COOH	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	92
32	25r	H	H	H	H	COCH ₃	1	>100	90	>100	>100	>100	>100	>98	-	91
33	25t	H	H	H	CH ₂ Ph	H	1	72	80	60	>100	82	55	>75	89	97
								76	56	79	94	89	65	77 ± 6	-	

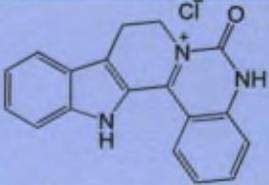
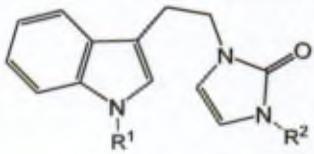
34	11		38	43	31	57	36	31	39 ± 4	-	-	
			Lignée cellulaire								Pureté HPLC (%)	
		R ¹	R ²	HS683	MCF7	PC3	SKMEL -28	U373	A549	Moyenne ± SEM		B16F10
35	34	H	H	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	98
36	38	Ns	H	37	50	51	43	100	42	54 ± 9	-	97
37	43	Ns	4-(trifluorométhyl)benzyle	53	30	32	>100	>100	38	>59	-	95
38	44	4-(trifluorométhyl)benzyle	4-(trifluorométhyl)benzyle	21	21	20	35	62	19	30 ± 7	-	80

Tableau 4.1 - Valeurs des concentrations inhibitrices de croissance IC₅₀ (µM) obtenues sur 6 lignées cellulaires cancéreuses humaines et la lignée cellulaire cancéreuse murine (B16F10) à l'aide du test colorimétrique MTT pour les dérivés de tétrahydro-β-carbolines (THBC) et imidazolones
- : Non déterminé

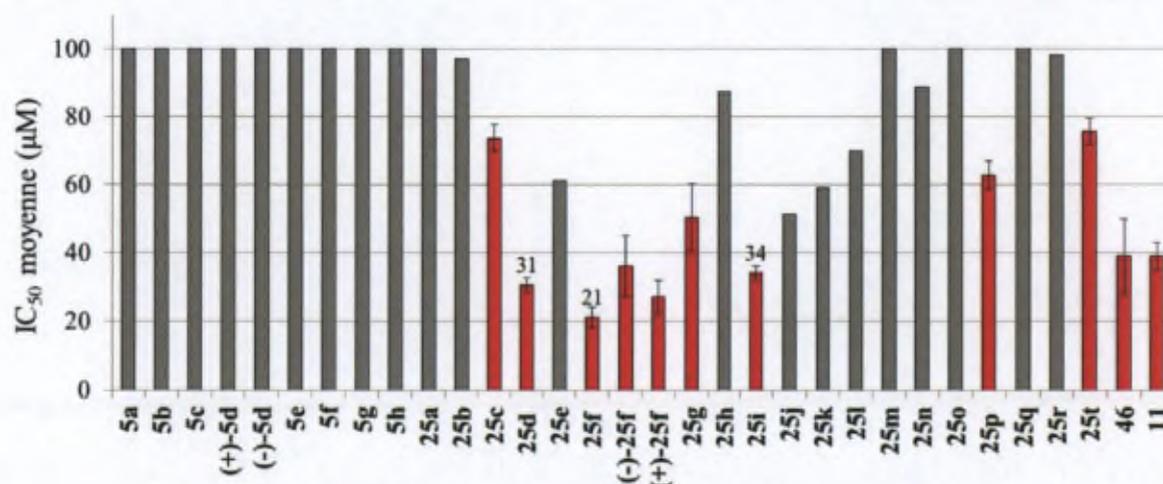


Figure 4.1 – Histogramme illustrant l'activité anti-tumorale des dérivés de tétrahydro-β-carbolines. La moyenne des indices IC₅₀, obtenue via le test colorimétrique MTT sur les 6 lignées cellulaires cancéreuses est représentée sur l'abscisse. Les composés qui sont actifs contre toutes les 6 lignées cancéreuses sont marqués en rouge.

Activité anticancéreuse des tétrahydroisoquinoléines.

Les résultats du test colorimétrique MTT effectué sur les dérivés de THIQUI sont représentés dans le Tableau 4.2. Les composés **13a-c**, dont l'atome d'azote n'est pas substitué, ne sont pas actifs (entrées 1-3). Par contre, l'ajout d'un groupement benzyle porteur d'un groupe électroattracteur rend la molécule active (**26a-b**, entrées 4, 5). La présence des groupes benzyle en positions 1 et 2 entraîne la diminution de l'activité sur les lignées SKMEL-28 (mélanome) et U373 (glioblastome) ainsi que sur la lignée de cancer du sein MCF-7 (**26c**, entrée 6).

Le composé **26b** est le plus intéressant de la série, avec une inhibition de croissance moyenne (indice IC₅₀) inférieure à 50 μM.

Activité anticancéreuse des thiéno et benzothiéno-pyridines.

Comme c'est le cas pour les dérivés de tétrahydro-β-carbolines et tétrahydroisoquinoléines, les dérivés de tétrahydro-(benzo)thiéno-pyridines, dont l'atome d'azote n'est pas substitué, ne sont pas actifs en termes d'inhibition *in vitro* de la croissance de divers modèles de cancers humains et murin (Tableau 4.3 et Tableau 4.4). Les composés portant des groupes 4-(trifluorométhyl)-benzyle sur l'atome d'azote (Tableau 4.3, entrée 2 et Tableau 4.4 entrée 3), présentent une certaine activité qui reste néanmoins inférieure à celle des dérivés de THBCI et THIQUI.

Entrée	Composé	Structure			IC ₅₀ [μM] Lignée cellulaire								Pureté HPLC (%)	
		R ¹	R ²	R ³	Humaines							Murine		
					HS683	MCF7	PC3	SKMEL-28	U373	A549	Moyenne ± SEM	B16F10		
1	13a	OMe	OMe	H	>100	-	-	>100	>100	>100	>100	>100	-	100
2	13b	OMe	H	H	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	99
3	13c	OH	OH	H	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	100
4	26a	OMe	OMe	4-(trifluorométhyl)-benzyle	44	65	65	83	87	78	70 ± 6	-	100	
5	26b	OMe	H	4-(trifluorométhyl)-benzyle	44	33	39	60	59	40	46 ± 5	-	100	
6	26c	(4-(trifluorométhyl)-benzyl)oxy	(4-(trifluorométhyl)-benzyl)oxy	4-(trifluorométhyl)-benzyle	52	>100	44	>100	>100	36	>72	24	91	

Tableau 4.2 - Valeurs des concentrations inhibitrices de croissance (indices IC₅₀ ; μM) obtenues sur 6 lignées cellulaires cancéreuses humaines et la lignée cellulaire cancéreuse murine (B16F10) à l'aide du test colorimétrique MTT pour les dérivés de la tétrahydroisoquinoléine (THIQ)

Entrée	Composé	Structure	IC ₅₀ [μM] Lignée cellulaire								Pureté HPLC (%)
		R	Humaines							Murine	
			HS683	MCF7	PC3	SKMEL	U373	A549	Moyenne ± SEM	B16F10	
1	17	H	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	-	100
2	27	4-(trifluorométhyl)benzyle	79	66	59	75	66	74	70 ± 3	54	91

Tableau 4.3 - Valeurs des concentrations inhibitrices de croissance (indices IC₅₀ ; μM) obtenues sur 6 lignées cellulaires cancéreuses humaines et la lignée cellulaire cancéreuse murine (B16F10) à l'aide du test colorimétrique MTT pour les dérivés de la tétrahydrothiényridine (THTP)

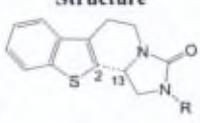
Entrée	Composé	Structure 	IC ₅₀ [μM]							Pureté HPLC (%)
			Lignée cellulaire						Moyenne ± SEM	
			HS683	MCF7	PC3	SKMEL	U373	A549		
1	21	R = H, imidazolone	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	95
2	22	R = H, produit cyclisé	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	99
3	28	R = 4-(trifluorométhyl)- -benzyle	14	14	66	>100	12	17	>38	96

Tableau 4.4 - Valeurs des concentrations inhibitrices de croissance (indices IC₅₀ ; μM) obtenues sur 6 lignées cellulaires cancéreuses humaines et la lignée cellulaire cancéreuse murine (B16F10) à l'aide du test colorimétrique MTT pour les dérivés de la tétrahydrobenzothiényridine (THBTP)

En conclusion, parmi ces 47 composés, certains présentent des activités anticancéreuses intéressantes, ayant des valeurs moyennes d'IC₅₀ inférieures à 50 μM. Il s'agit notamment des composés : **25d** (concentration IC₅₀ moyenne = 31 μM), **25f** (IC₅₀ moyenne = 21 μM), **25i** (IC₅₀ moyenne = 34 μM), **46** (IC₅₀ moyenne = 39 μM), le dérivé cationique **11** (IC₅₀ moyenne = 39 μM), l'imidazolone **44** (IC₅₀ moyenne = 30 μM) et le dérivé de THIQI **26b** (IC₅₀ moyenne = 46 μM).

Nous avons considéré les produits **25d**, **25f** et **25i** comme des produits « hit » avec le composé **25f** étant le plus actif. Des analyses plus poussées ont donc été effectuées sur ces molécules afin de déterminer le mécanisme d'action des dérivés alkylés de THBCI.

4.1.1.3 Bio-sélectivité

Les composés **25d**, **25f** et **25i**, qui possèdent une activité anticancéreuse *in vitro* intéressante ont été également évalués sur les lignées cellulaires normales humaines HaCaT (kératinocytes) et NHDF (fibroblastes dermiques) afin de calculer l'indice de bio-sélectivité cellules normales / cellules cancéreuses. Cet indice de bio-sélectivité *in vitro* est défini comme le rapport obtenu entre la valeur moyenne des indices IC₅₀ obtenus sur des lignées normales humaines et la valeur moyenne des indices IC₅₀ obtenus sur les lignées cancéreuses humaines. Il est important de mentionner que les fibroblastes et les kératinocytes sont des lignées cellulaires qui ont une prolifération rapide et présentent donc des caractéristiques de cinétique cellulaire proche de celles des cellules cancéreuses.

Les résultats obtenus sont repris dans le Tableau 4.5. On peut déduire que les produits présentent une certaine bio-sélectivité, mais sont néanmoins actifs sur les cellules normales. Le

produit **25f** semble être le plus prometteur, étant trois fois moins actif sur les cellules normales que sur les cellules cancéreuses.

Composé	IC ₅₀ [µM]				Indice de bio-sélectivité ^b
	Lignée cellulaire normale			Lignée cellulaire tumorale	
	HaCaT	NHDF	mean ± SDev	mean ± SDev ^a	
25d	38	45	41 ± 5	31 ± 4	1,3
25f	36	> 100	> 68	21 ± 4	>3,2
25i	90	> 100	> 95	34 ± 4	>2,8

Tableau 4.5 - Evaluation de l'indice de biosélectivité *in vitro* pour les dérivés **25d**, **25f** et **25i**.

a) moyenne des deux / trois valeurs calculées dans le Tableau 4.1. b) La valeur d'IC₅₀ moyenne obtenue pour les lignées de cellules normales a été divisée par la valeur d'IC₅₀ moyenne obtenue pour les lignées cellulaires cancéreuses

4.1.2 Pureté et stabilité physicochimique des dérivés

Avant toute analyse biologique, la pureté des composés a été contrôlée par RMN ¹H, CCM et HPLC. Même si l'analyse de la pureté par HPLC est une pratique très courante dans les laboratoires de chimie médicinale et toxicologie, il est important de garder à l'esprit les limites de cette technique : les aires de pics qu'on mesure dépendent du coefficient d'absorption molaire des produits. *A priori*, un produit et les éventuelles impuretés issues de la synthèse doivent présenter des valeurs proches pour ces coefficients. Néanmoins, une combinaison des trois techniques a été utilisée pour estimer la pureté.

Dans le cas où des impuretés ont été observées dans le spectre RMN ¹H ou sur le chromatogramme, des étapes supplémentaires de purification par chromatographie flash ou par lavage ont été réalisées pour obtenir une pureté satisfaisante en vue des tests biologiques.

Les valeurs de pureté déterminées par HPLC, des produits qui ont été soumis au test MTT, sont élevées (Tableaux 4.1 - 4.4). Elles sont supérieures à 90%, à l'exception des produits **25b** (89%), **25c** (87%), (+)-**25n** (87%) et **44** (80%). Dans le cas du produit **44**, l'impureté principale est le composé **43**, son intermédiaire de synthèse, dont la séparation n'a pas été totale (Figure 4.2). Malgré son inhomogénéité, le composé **44** a été soumis au test MTT. En effet, le produit **43** n'a pas une activité antitumorale supérieure au produit **44**, l'effet biologique observé est donc principalement dû au composé **44**.

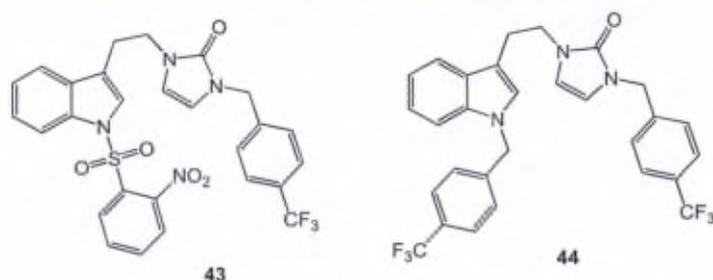


Figure 4.2 – Structure des composés 43 et 44

De même, plusieurs échantillons du produit le plus actif (**25f**), ayant des valeurs de pureté différentes, ont été testés et des résultats très similaires de l'activité antiproliférative *in vitro* ont été obtenus (Tableau 4.1, entrée 17). On peut donc supposer que les éventuelles impuretés qui pourraient provenir de la synthèse sont inactives, à tout le moins aux concentrations retrouvées dans nos produits.

Pour le composé **11** la pureté a été évaluée uniquement par RMN ^1H et CCM et a été considérée comme satisfaisante.

Afin de s'assurer que l'effet biologique observé est dû au produit lui-même et non pas aux éventuels produits de dégradation dans les milieux de culture, la stabilité des composés les plus intéressants (**25d**, **25f**, **25i**, **44** et **46**, Figure 4.3) a été évaluée par HPLC dans un solvant organique (le méthanol) et dans le milieu de culture. Le composé **11**, également intéressant, n'a pas pu être testé dans les mêmes conditions HPLC que les produits mentionnés plus haut à cause de sa polarité élevée. Une méthode HPLC appropriée n'a pas été développée pour ce produit, par manque de temps.

D'une manière générale, le produit à tester a été incubé à 37 °C pendant 7 jours dans du MeOH ou dans le milieu de culture (EMEM, RPMI ou MEM). A chaque moment de l'analyse ($t = 1j, 2j, 3j, 7j$) un échantillon est pris, dilué, et injecté en HPLC. Pour calculer la stabilité, l'aire du pic obtenue pour chaque moment est comparée à l'aire du pic obtenue pour une solution fraîchement préparée ($t=0$), selon la formule :

$$\text{Stabilité après } x \text{ jours} = \frac{\text{Aire moyenne du pic après } x \text{ jours}}{\text{Aire moyenne du pic à } t = 0} \times 100$$

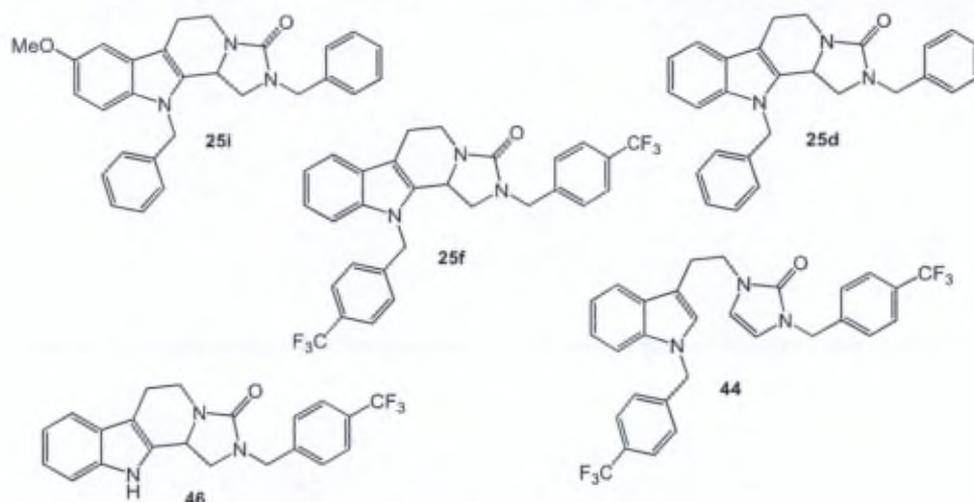


Figure 4.3 – Structure des composés 25d, 25f, 25i, 44 et 46

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4.6. Le produit **25i** est stable dans le milieu de culture et dans le méthanol. Les produits **25d** et **25f** sont également stables dans le méthanol, mais ils présentent une moindre stabilité dans le milieu de culture après 7 jours d'analyse (de 76 % et 85% respectivement). Néanmoins, il faut noter que leur stabilité après 3 jours (la durée de l'expérience pour le test colorimétrique MTT) est de 94% et 90% respectivement.

Les composés **44** et **46** sont également stables pendant 7 jours dans le milieu de culture. L'activité intéressante du produit **44** ne provient donc pas de sa cyclisation de type Pictet-Spengler, dans le milieu de culture, pour donner le produit **25f**.

Dans certains cas une évaporation du milieu de culture peut se produire au cours de l'incubation à 37°C, ce qui mène à l'obtention des valeurs de la stabilité supérieures à 100%. Néanmoins, ce test permet d'en tirer l'information qui nous intéresse, c'est-à-dire de déterminer si les composés sont stables, car l'analyse des chromatogrammes montre qu'aucun autre pic supplémentaire, qui pourrait être dû à la dégradation des produits, n'apparaît dans le milieu de culture, pendant les 7 jours d'incubation. Ces 5 composés présentent donc une bonne stabilité dans le milieu de culture et y restent l'espèce majoritaire, même après 7 jours à 37°C. On peut donc affirmer que l'activité antitumorale observée pour ces composés est due aux produits eux-mêmes et non à des produits de dégradation apparus au cours du processus de culture cellulaire, même si l'on ne peut exclure une métabolisation de certains des produits par les cellules cancéreuses elles-mêmes.

Composé	Stabilité (%) évaluée à 37 °C dans du :		
	MeOH après 3 jours	MEM ou EMEM* après 3 jours	MEM ou EMEM* après 7j
25d	91	94	76
25f	104 [#]	90	85
25i	96	115 [#]	110 [#]
	MeOH après 3 jours	RPMI après 3 jours	RPMI après 7j
44	-	87	112 [#]
46	-	97	93

Tableau 4.6 – Evaluation de la stabilité, en milieu de culture et dans le méthanol, des produits présentant une activité antitumorale intéressante (voir Tableau 4.1)

*) Le composé **25d** a été évalué dans du milieu de type EMEM

#) Les valeurs supérieures à 100% peuvent être dues à l'évaporation d'une partie du milieu de culture ou du solvant lors de l'incubation à 37°C

4.1.3 Analyse par vidéomicroscopie quantitative

4.1.3.1 Effets sur la croissance globale d'une population de cellules

Le test colorimétrique MTT est une méthode indirecte qui permet d'apprécier l'effet global d'un produit sur la croissance d'une population de cellules. Pour rappel, le taux de croissance d'une population de cellules à un temps t est le bilan à ce moment t entre le nombre de cellules produites (prolifération cellulaire) et le nombre de cellules perdues (mort cellulaire) au sein de cette population de cellules. Les résultats fournis par le test colorimétrique MTT ne donne aucune information sur le fait qu'un produit actif agit sur le taux de prolifération cellulaire, sur le taux de mort cellulaire, ou sur ces deux variables biologiques en même temps. Un produit pourrait également réduire le produit MTT en formazan par une réaction chimique indépendante de l'enzyme succinate déshydrogénase. Ce composé pourrait alors donner des résultats de type « faux positifs » comme c'est le cas par exemple pour certains polyphénols.¹⁷⁵

Nous avons ainsi complété les résultats des analyses liées au test colorimétrique MTT par des analyses liées à une technique dénommée microscopie à contraste de phase assistée par ordinateur ou vidéomicroscopie quantitative (VMQ). En effet, cette technique, développée au sein du Service des Systèmes Logiques et Numériques (Faculté des Sciences Appliquées ; ULB) et du Laboratoire de Cancérologie et de Toxicologie Expérimentale (Faculté de Pharmacie ; ULB) permet de filmer le comportement d'une culture cellulaire, traitée ou non avec un produit à analyser, pendant plusieurs jours. L'installation requise est composée d'un microscope qui se trouve dans une enceinte thermostatée et qui est relié à une caméra et à un ordinateur. La caméra prend des photos d'un champ de la culture cellulaire toutes les 4 minutes pendant la durée de

¹⁷⁵ Bruggisser, R.; von Daeniken, K.; Jundt, G.; Schaffner, W.; Tullberg-Reinert, H. *Planta Med.* **2002**, *68*, 445-448.

l'expérience, qui dure en général 3 jours. Par des logiciels appropriés, l'analyse de ces 1080 images permet d'obtenir plusieurs types d'informations, qui seront détaillées ci-dessous.

Pour confirmer la valeur de l'indice IC_{50} obtenue à l'aide du test colorimétrique MTT et pour vérifier qu'à cette concentration le produit ne précipite pas dans le milieu de culture, les six composés présentant les indices IC_{50} les plus intéressants, à savoir les produits **11**, **25d**, **25f**, **25i**, **44** et **46**, ont été testés à leur concentration IC_{50} (test colorimétrique MTT) par vidéomicroscopie quantitative sur quatre lignées cellulaires : Hs683 (oligodendrogliome), U373 (glioblastome), A549 (cancer du poumon-non-à-petites cellules) et SKMEL-28 (mélanome). Les images obtenues pour les composés **25d**, **25f** et **25i** sur la lignée U373 sont présentées à la Figure 4.4.

Tout d'abord cette technique permet de déterminer si les composés testés agissent soit en tuant les cellules (effets cytotoxiques), soit en diminuant la prolifération (effets cytostatiques). Les cellules des lignées cellulaires utilisées dans ce travail sont adhérentes et se cultivent en monocouche. Lorsqu'elles meurent, elles se détachent peu à peu de la surface de culture (le fond de la boîte de culture) et deviennent ainsi réfringentes.

La Figure 4.4 montre que pour la condition contrôle (CT ; les cellules ne sont pas traitées par le produit d'intérêt) on observe une prolifération importante des cellules après 72h d'incubation. Par contre, dans le cas des cellules qui ont été traitées avec les produits **25d**, **25f** et **25i** la prolifération est inhibée de manière importante. De plus, les cellules restent vivantes, tout au moins d'un point de vue morphologique : l'effet « anti-croissance » des produits analysés serait donc cytostatique (« anti-prolifératif ») et non cytotoxique (« inducteur de mort cellulaire »). A titre d'exemple, l'effet d'une molécule cytotoxique, **DLT-13a**¹⁷⁶ (développée en collaborations avec divers laboratoires de la Faculté de Pharmacie - ULB) est illustré à la Figure 4.4.

¹⁷⁶ Lamoral-Theys, D.; Pottier, L.; Kerff, F.; Dufrasne, F.; Proutière, F.; Wauthoz, N.; Neven, P.; Ingrassia, L.; Antwerpen, P. V.; Lefranc, F.; Gelbcke, M.; Pirotte, B.; Kraus, J.-L.; Nève, J.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Dubois, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3823-3833.

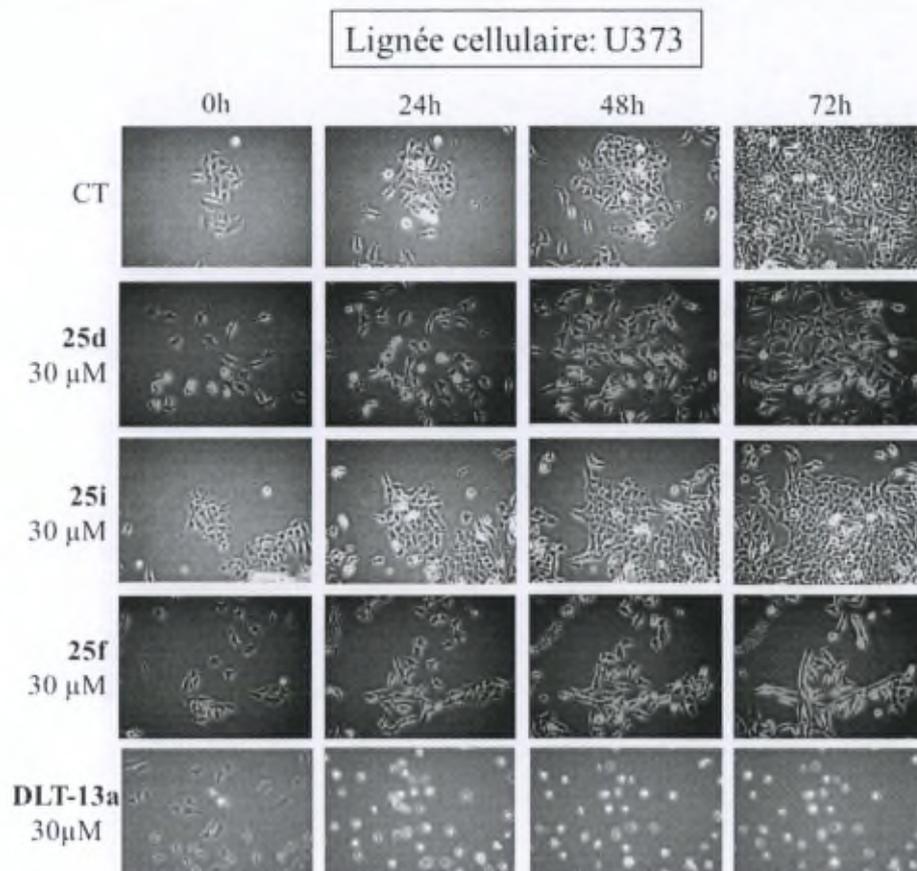


Figure 4.4 - Images obtenues par vidéomicroscopie quantitative pour les produits **25d**, **25f** et **25i** sur la lignée de glioblastome U373

Le nombre de cellules vivantes apparaissant dans chaque image numérisée grâce à la technique VMQ peut être dénombré à l'aide d'un logiciel développé à cet égard. Ce comptage permet le calcul de deux indices : la croissance globale (indice GG - *Global Growth*) et le ratio de croissance globale (indice GGR - *Global Growth Ratio*). La croissance globale est calculée en divisant le nombre des cellules vivantes, enregistrées aux temps 24h, 48h et 72h, par le nombre de cellules vivantes enregistrées au temps 0. L'indice GG a été calculé pour chaque contrôle et chaque condition traitée. L'indice GGR de chaque composé a été obtenu en divisant l'indice GG calculé pour chaque condition traitée par celui du contrôle, et ce après 24h, 48h ou 72h. A titre d'exemple, les indices calculés pour le produit **25f** sont représentés à la Figure 4.5. Comme les composés ont été testés à leur concentration inhibitrice de croissance IC_{50} , déterminée par le test colorimétrique MTT, l'indice GGR devrait avoir une valeur proche de 0,5.

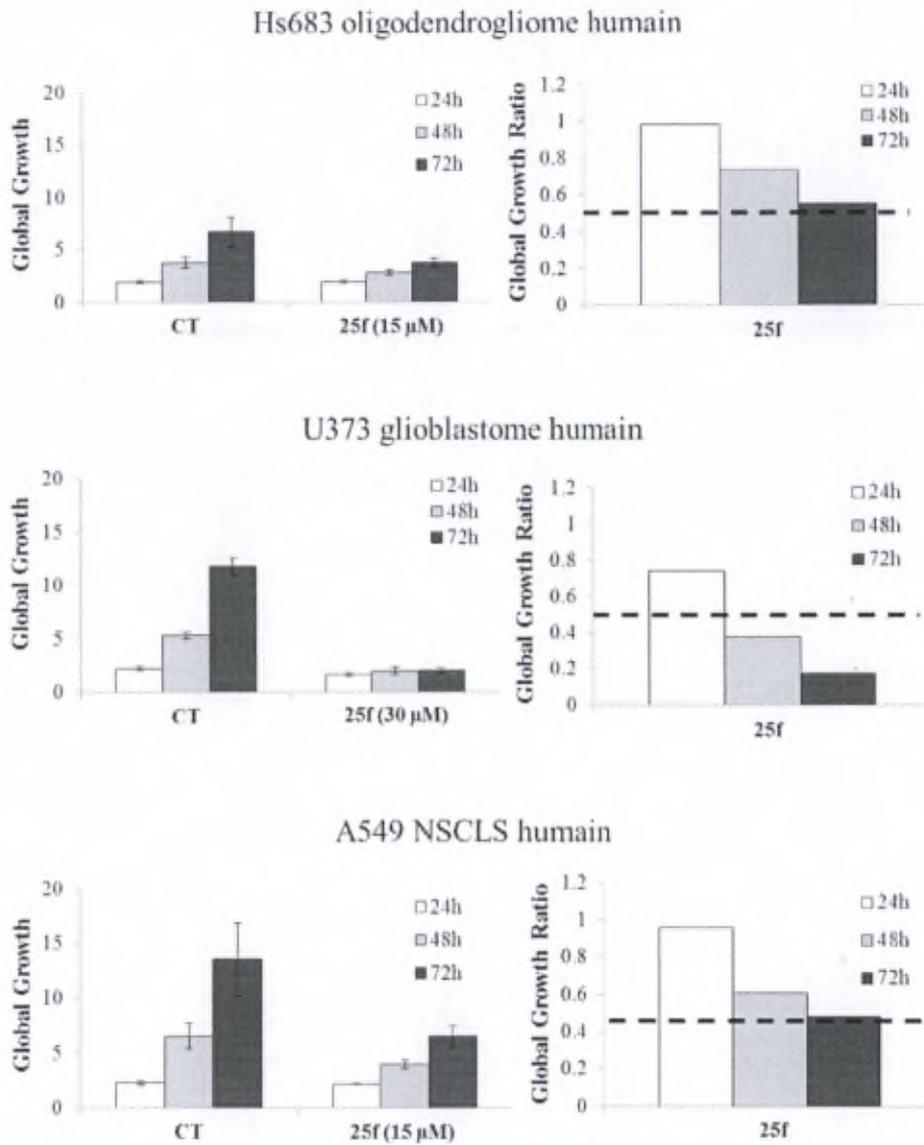


Figure 4.5 - Représentation graphique des indices GG et GGR calculés pour le composé 25f testé sur les lignées de gliomes humains Hs683 et U373 et pour la lignée NSCLC A549

Les valeurs des indices GGR calculées pour les différentes expériences de vidéomicroscopie effectuées dans le cadre de ce travail se trouvent dans le Tableau 4.7.

Composés	Lignées cellulaires			
	U373	Hs683	SKMEL-28	A549
11	0,17	-	0,36	-
25d	0,38	0,21	0,59	0,20
25f	0,17	0,6	0,29	0,48
(+)25f*	0,48	-	0,32	-
25i	0,80	-	0,42	0,12
44	0,41	-	0,22	-
46	0,33	-	0,38	-

Tableau 4.7 – Valeurs des indices GGR calculées à 72h de traitement pour les composés présentant l'activité la plus intéressante après un criblage à l'aide du test colorimétrique MTT (voir Tableau 4.1)

*) issu de la méthode de synthèse asymétrique, *ee* = 76%

- : non déterminé

Le Tableau 4.7 montre que les résultats obtenus par la technique VMQ confirment l'activité antitumorale observée pour ces 6 composés à l'aide du test colorimétrique MTT. Ainsi, aucun résultat de type « faux positif » n'a pu être mis en évidence par la technique VMQ par rapport au test MTT, les valeurs des indices GGR étant proches ou inférieures à 0,5.

La vidéomicroscopie permet également de déterminer si les composés testés précipitent dans le milieu de culture à leur concentration inhibitrice de croissance IC_{50} telle que déterminée par le test colorimétrique MTT. A titre d'exemple, la Figure 4.6 présente une image typique de deux produits qui ne sont pas solubles dans le milieu de culture à leur concentration inhibitrice de croissance IC_{50} et qui précipitent dans le milieu de culture.

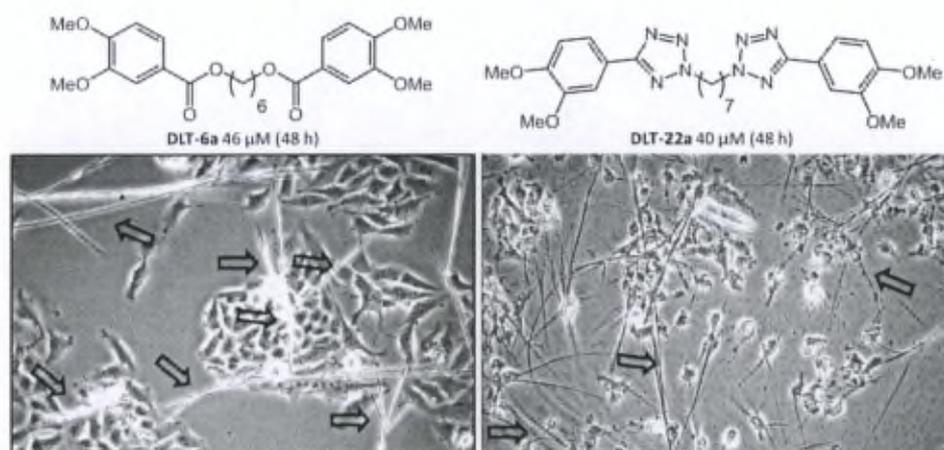


Figure 4.6 – Image¹⁷⁷ obtenue à l'aide d'un microscope à contraste de phase pour la lignée cellulaire de glioblastome humain U373 traitée pendant 48h avec les composés **DLT-6a**¹⁷⁶ et **DLT-22a**¹⁷⁶ à leur concentration IC_{50} . Ces produits ne sont pas solubles dans le milieu de culture à leur concentration IC_{50} : les flèches noires montrent les cristaux formés par ces composés dans le milieu de culture.

¹⁷⁷ These de Delphine Lamoral-Theys, ULB 2013

Une formation de cristaux pourrait ainsi entraîner la mort des cellules et également diminuer la concentration active du produit analysé. L'analyse visuelle des images montre que les composés testés dans le cadre de notre travail sont entièrement solubles dans le milieu de culture, à leur concentration IC_{50} .

Tous les produits testés par vidéomicroscopie ont donc montré un comportement purement cytotatique, avec un taux de mort cellulaire de moins de 10% après les trois jours d'expérience.

Le composé **25f** présente l'activité anticancéreuse la plus intéressante. De même, ce composé est le plus sélectif entre les cellules normales et les cellules cancéreuses de la série des dérivés de THBCI. Ces résultats nous ont encouragés à effectuer des tests complémentaires pour déterminer le mécanisme d'action de cette molécule. Cette démarche sera discutée par la suite (§ 4.2).

4.1.3.2 Effets du produit 25f sur le nombre et la durée des mitoses

Les 1080 images numérisées toutes les 4 minutes pendant la durée de 72 heures de l'expérience de VMQ peuvent être compressées pour réaliser un film dont la durée avoisine une minute. Grâce à ce film, une visualisation de la morphologie et de la migration cellulaire peut être effectuée dans les conditions contrôles et dans les conditions de traitement. Un logiciel a également été développé par Olivier Debeir (Service des Systèmes Logiques et Numériques ; Faculté des Sciences Appliquées ; ULB)¹⁷⁸ pour quantifier le taux de mitoses et la durée des mitoses au sein d'une population cellulaire donnée. Ainsi, dans le cas où un effet cytotatique est suspecté pour un produit d'intérêt donné, il est possible de déterminer si cet effet cytotatique est lié à une diminution du taux de mitoses, à une augmentation de la durée des mitoses ou à la combinaison de ces deux processus

Lors de la division cellulaire la cellule se détache partiellement de la surface de la boîte de culture pour pouvoir notamment partager son cytoplasme entre les deux cellules fille lors de la cytokinèse (Figure 4.7). Par conséquent, la cellule apparaît comme une zone lumineuse sur le film ce qui permet au logiciel de détecter les mitoses. Chaque événement mitotique détecté à l'aide du logiciel est ensuite validé et corrigé manuellement comme décrit précédemment.¹⁷⁸

¹⁷⁸ Debeir, O.; Mégalizzi, V.; Warzée, N.; Kiss, R.; Decaestecker, C. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 2985-2998.

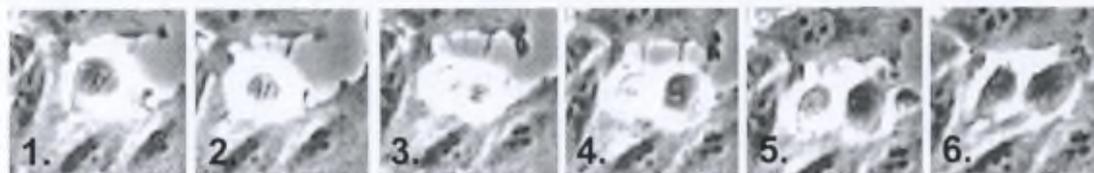


Figure 4.7 - Images illustrant la mitose d'une cellule Hs683 (oligodendrogliome) observée en vidéomicroscopie. Lorsque une cellule entre en mitose, elle se détache légèrement du support cellulaire et devient réfringente (1.). La cellule donne ensuite naissance à deux cellules filles (6.). La différence de réfringence entre les cellules en mitoses et les autres cellules permet au logiciel de détecter les mitoses.

Pendant les 3 jours de l'expérience, le nombre total de mitoses, qui se produisent dans le champ microscopique analysé, a ainsi été déterminé. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicat ou en quadruplicat. Les nombres de mitoses ainsi obtenus ont été normalisés par rapport au nombre de cellules présentes dans la première image numérisée.¹⁷⁸ Les résultats obtenus pour la molécule **25f** sont présentés dans la Figure 4.8. On observe ainsi que par rapport au contrôle le traitement avec le composé **25f**, à sa concentration inhibitrice de croissance IC_{50} , diminue le nombre de mitoses dans la population cellulaire analysée. L'effet antimittotique est plus marquant au niveau de la lignée de glioblastome U373 que pour les autres lignées analysées, mais cet effet apparaît également pour les lignées SKMEL-28 (mélanome), Hs683 (oligodendrogliome) et A549 (cancer du poumon non-à-petites cellules).

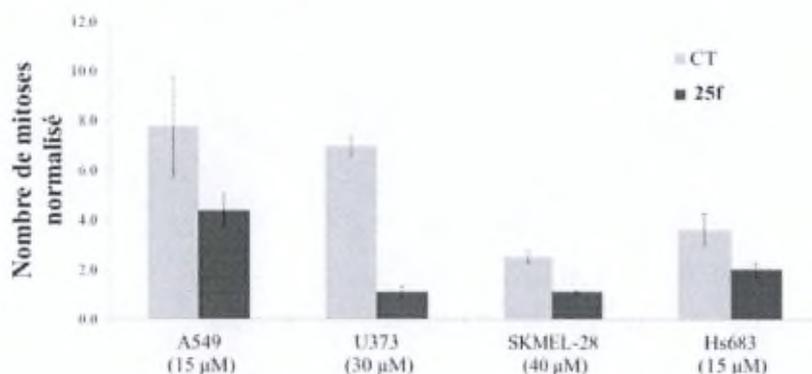


Figure 4.8 - Diminution du nombre de mitoses lors du traitement avec le composé **25f**. Les cellules ont été traitées ou non (CT) avec le produit **25f** à son IC_{50} . Le nombre de mitoses a été déterminé à l'aide d'un logiciel¹⁷⁸ et ce nombre a été normalisé par le nombre des cellules présentes au début de l'expérience (T_0) dans le champ microscopique observé.

Le même logiciel permet de déterminer sur combien d'images numérisées s'étend une mitose, donc de déterminer la durée de la mitose. La durée moyenne de la mitose pour les conditions traitées et contrôles est présentée dans la Figure 4.9.

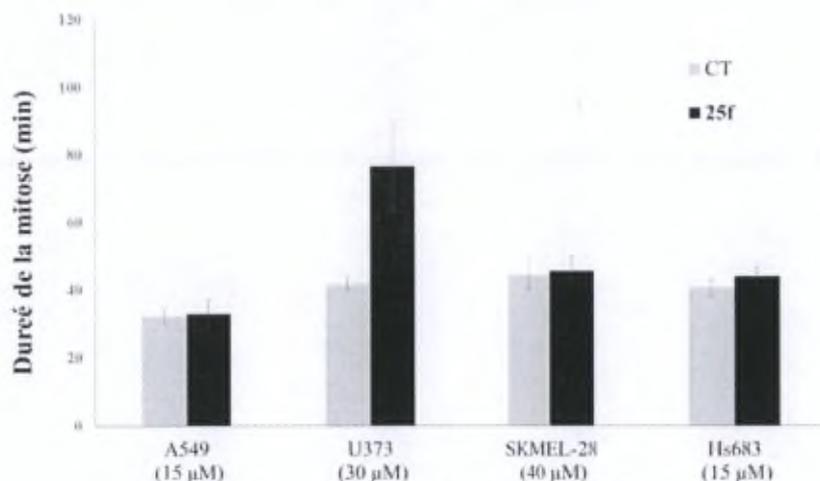


Figure 4.9 - Effet du produit **25f** sur la durée de mitose sur différentes lignées cellulaires. Les cellules ont été traitées ou non (CT) avec le produit **25f** à sa concentration IC₅₀. Le logiciel^{17b} permet de déterminer sur combien d'images s'étend une mitose. La durée de la mitose peut être ainsi estimée en tenant compte du fait que 4 minutes s'écoulent entre l'enregistrement de deux images successives.

Pour les lignées A549, SKMEL-28 et Hs683 la durée de la mitose n'est pas influencée par le traitement avec le produit **25f**. Une augmentation de 54% de cette durée a été constatée dans le cas de la lignée U373.

L'ensemble des analyses que nous avons réalisées suggèrent donc fortement que les effets cytostatiques du produit **25f** se traduisent par une diminution de l'activité mitotique des populations cellulaires traitées par ce produit. Ce composé tend plutôt à diminuer le nombre de mitoses (Figure 4.8) que d'augmenter la durée de celles-ci (Figure 4.9) au sein des populations cellulaires analysées.

4.2 Tentatives pour apprécier le mécanisme d'action de certains produits

4.2.1 Evaluation de l'inhibition des kinases

Après avoir confirmé l'activité antitumorale *in vitro* de certains dérivés de la THBCI, nous avons cherché à savoir si les effets antiprolifératifs (antimitotiques) pourraient être liés à l'inhibition d'une ou plusieurs kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire.

Le composé **25f** a donc été testé pour son activité anti-kinase grâce à une collaboration avec l'équipe du Prof. Laurent Meijer (ManRos Therapeutics, Roscoff, France). L'effet de ce composé sur l'activité de certaines kinases a été évalué en mesurant la quantité de phosphates inorganiques radioactifs incorporée au substrat de la kinase, en présence du produit, par rapport à un contrôle.

Principe de la méthode.

Le produit **25f** est ajouté, à différentes concentrations, à un milieu réactionnel tamponné qui contient une kinase recombinante et un mélange d'ATP non radioactif et radioactif (15 μ M [γ - 33 P] ATP à une concentration finale d'ATP de 15 mM). La réaction de transfert du [γ - 33 P] de l'ATP sur les substrats est démarrée par l'ajout d'un substrat oligopeptidique, spécifique à chaque kinase. Les réactions sont effectuées dans de plaques multi-puits qui sont incubées 30 minutes à 30°C. Elles sont ensuite arrêtées par l'ajout d'une solution d'acide phosphorique 1%. Le contenu des plaques est transféré sur du papier de phosphocellulose P81 suivi par le lavage avec une solution d'acide phosphorique 1 %. Ce papier est une matrice échangeuse d'ions avec une charge nette négative à la plupart des valeurs de pH. À un pH faible, le peptide phosphorylé se lie au papier au contraire de l'excès de [γ - 33 P] ATP, élué par lavage. La radioactivité de chaque condition est déterminée à l'aide d'un Microplate Scintillation Counter. La radioactivité due aux liaisons non spécifiques de l'ATP sur le substrat, en absence de la protéine kinase, est également mesurée et constitue le contrôle négatif [CT(-)]. Le contrôle positif [CT(+)] représente l'activité totale, mesurée en l'absence de l'inhibiteur. L'activité résiduelle de la kinase pour chaque concentration du produit **25f** est obtenue à l'aide de la formule :

$$\text{Activité résiduelle (\%)} = \frac{\text{Activité}_{\text{composé}} - \text{Activité}_{\text{CT(-)}}}{\text{Activité}_{\text{CT(+)}} - \text{Activité}_{\text{CT(-)}}} \times 100$$

Résultats.

A part la kinase DYRK1A, qui était la première cible pour ce projet, le composé **25f** a été testé sur diverses kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, notamment celles de la famille CDKs (CDK5, CDK1, CDK2 et CDK9) ou la kinase GSK3, ainsi que sur d'autres kinases comme les kinases CK1 et CLK1. La Figure 4.10, montre que le produit **25f** présente une valeur d'IC₅₀ d'inhibition des kinases testées supérieure à 10 μ M. A cette concentration le produit inhibe tout de même l'activité des kinases CK1 et CDK1 de 31% et de 27% respectivement (Figure 4.10). Pour rappel, la concentration inhibitrice de croissance à 50% (indice IC₅₀) du produit **25f** tel que révélé par le test colorimétrique MTT est de 21 μ M (Tableau 4.1, entrée 17). Le composé **25f** apparaît donc comme un inhibiteur potentiel de certaines kinases comme les kinases CK1 et CDK1. Cet aspect sera discuté plus en détail dans le paragraphe §4.2.5.

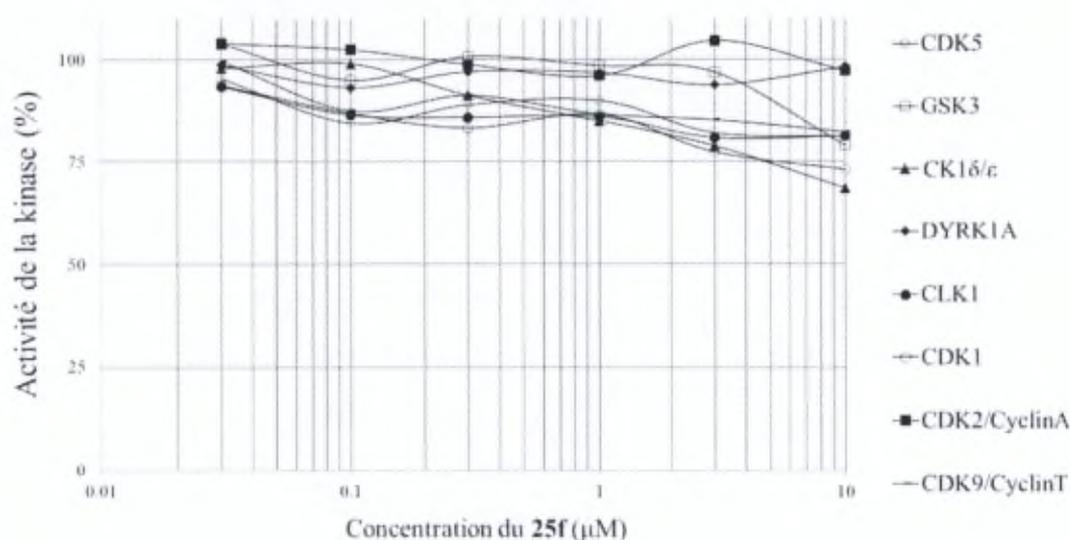


Figure 4.10 - Courbes dose-réponse d'inhibition des kinases par le produit **25f**. Lorsqu'il est utilisé à 10 μ M, ce composé inhibe la kinase CK1 de 31% et la kinase CDK1 de 27%.

4.2.2 Modification de l'organisation du cytosquelette d'actine

La technique VMQ permet d'observer visuellement que le produit **25f** modifie la morphologie des cellules (Figure 4.4). Les cellules semblent former moins de lamellipodes. Les effets antimittotiques du composé **25f** décrits ci-avant (Figure 4.8) pourraient être liés dès lors à

son influence possible sur le cytosquelette de la cellule. Afin de vérifier cette hypothèse, l'effet du composé **25f** sur l'organisation du cytosquelette d'actine a été étudié à l'aide de la microscopie à fluorescence.

Principe.

Ce test est basé sur l'utilisation de molécules fluorescentes couplées à des biomolécules qui interagissent de manière spécifique avec certains constituants de la cellule. Par exemple, pour visualiser le cytosquelette d'actine, une toxine appelée phalloïdine, couplée à une molécule fluorescente (Alexa 488 ®, Molecular probes) a été utilisée. En effet, la phalloïdine présente la propriété de se lier spécifiquement à l'actine fibrillaire. Les cellules traitées (ou non : contrôle) par le produit **25f** sont fixées avec du formaldéhyde et incubées avec une solution de fluorophores contenant : de la phalloïdine conjuguée au fluorophore Alexa Fluor 488 et de la DNase conjuguée au fluorophore Alexa Fluor 594 (®, Molecular probes). La DNase est un enzyme qui clive l'ADN et présente donc une forte affinité pour celui-ci. Ainsi le noyau de la cellule peut être également rendu visible. Après le marquage, les cellules peuvent être visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Chaque fluorophore est excité à sa longueur d'onde caractéristique, ce qui entraîne une fluorescence qui est détectée par la caméra. Alexa 488 est excité à une longueur d'onde $\lambda_{\text{excitation}}$ de 495 nm et donne une fluorescence verte à $\lambda_{\text{émission}} = 518$ nm, tandis que Alexa 594 ($\lambda_{\text{excitation}} = 594$ nm) donne une fluorescence rouge à $\lambda_{\text{émission}} = 617$ nm.

Le composé **25f** a été testé sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines: la lignée d'oligodendrogliome Hs683 et la lignée de glioblastome U373 à sa concentration IC_{50} (15 μM et 30 μM respectivement) ; pendant 3h, 6h ou 24h. Chaque condition a été testée en triplicat. Pour chaque condition, une dizaine d'images a été enregistrée et les plus représentatives d'entre elles ont été choisies. Chaque image est constituée de 3 photos : une pour chaque fluorophore et une en lumière blanche, sans excitation des fluorophores. Les images obtenues en fluorescence rouge et verte peuvent être ensuite superposées pour observer les noyaux et le cytosquelette d'actine sur la même image.

Résultats.

La Figure 4.11 présente un marquage du cytosquelette d'actine de cellules d'oligodendrogliome Hs683 cultivées sur lamelle pendant 24 heures sans traitement (CT) et traitées par 25 μM de composé **25f** (cellules traitées). Les cellules Hs683 de la condition contrôle, présentent les fibres de stress d'actine distribuées de façon parallèle et homogène au niveau des lamellipodes (Figure 4.11, simple flèche). Les fibres de stress d'actine des cellules traitées au composés **25f** ont une distribution aléatoires (Figure 4.11, doubles flèches) ou ont disparu (Figure 4.11, triples flèches).

Ces résultats montrent que le produit **25f** modifie l'organisation du cytosquelette d'actine, principalement au niveau des fibres de stress.

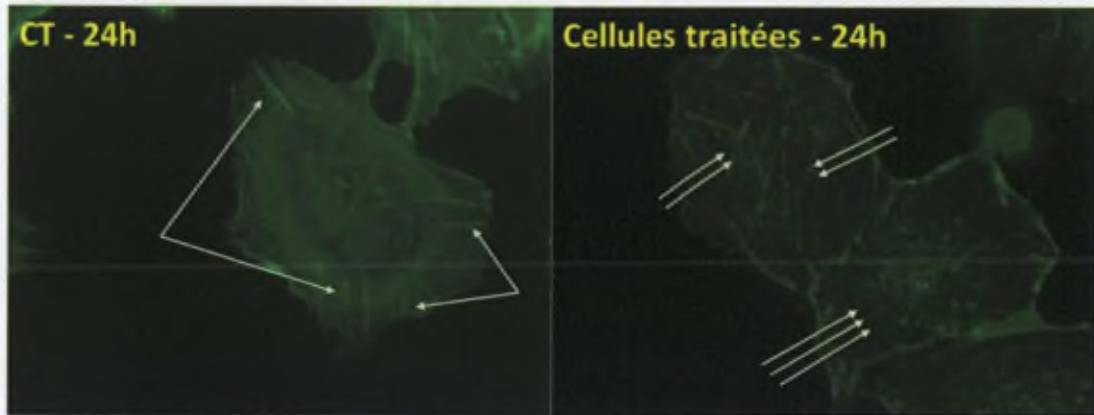


Figure 4.11 - Effet du composé **25f** sur l'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules d'oligodendroglome Hs683 observé par microscopie à fluorescence. Seules les images enregistrées en fluorescence verte sont illustrées. A gauche : condition contrôle (cellules Hs683 non traitées); à droite : cellules Hs683 traitées pendant 24 heures avec 20 µM de **25f**. Les flèches simples dans le contrôle montrent les fibres de stress d'actine, qui deviennent désorganisées (flèches doubles) ou même disparaissent (flèches triples) après le traitement.

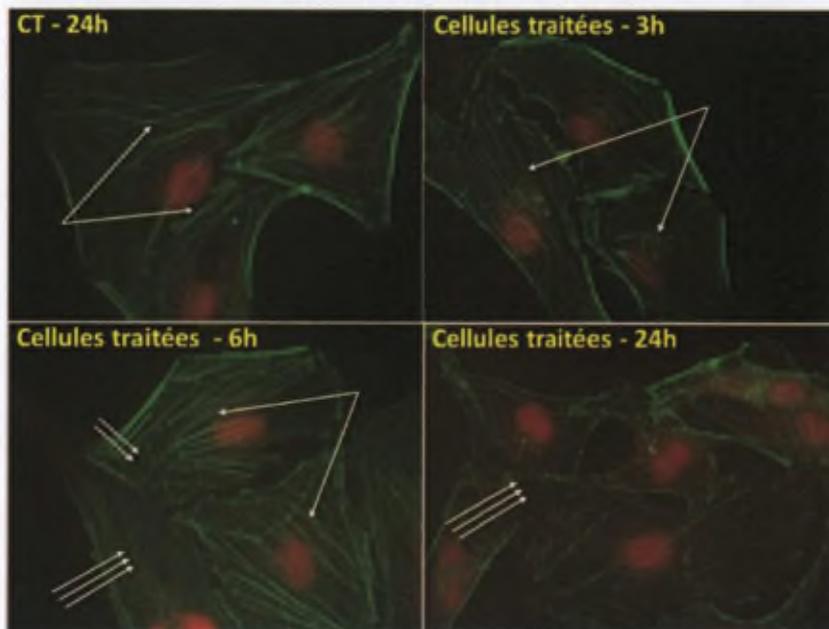


Figure 4.12 - Effet du composé **25f** sur l'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules de gliome U373 observés en utilisant la microscopie de fluorescence. Les images ont été obtenues par la superposition des photographies prises en fluorescence verte et rouge. Les noyaux sont visibles sur les images comme des zones rouges. Les flèches simples montrent les fibres de stress d'actine, qui deviennent désorganisées (flèches doubles) ou même disparaissent (flèches triples) après le traitement.

Les mêmes effets sont observés sur la lignée U373 (Figure 4.12). Tout comme pour la lignée Hs683, après 3h de traitement la désorganisation du cytosquelette n'a pas été observée. Après 6h l'effet du composé commence à être légèrement visible, tandis qu'après 24h le cytosquelette est désorganisé de manière importante.

Les effets du composé **25f** sur la désorganisation du cytosquelette d'actine pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution du taux de mitose (Figure 4.8) et l'effet cytostatique (Figure 4.4) dans les populations des cellules traitées comme nous le décrivions auparavant. En effet, la modification du cytosquelette d'actine peut empêcher la mitose, notamment pendant l'étape de cytokinèse comme nous le détaillerons dans le paragraphe Discussions (§4.2.5).

4.2.3 Modification de l'activité de la famille des facteurs de transcription AP-1

L'effet antiprolifératif du composé **25f** ne semble pas être expliqué seulement par une activité anti-kinase. Une approche qui permet l'analyse simultanée d'une multitude de facteurs de transcription a été alors envisagée pour étudier l'activité transcriptomique des cellules traitées par ce composé. Afin de déterminer si le produit **25f** agit en modifiant l'expression de gènes via certains facteurs de transcription nous avons utilisé un kit (Protein/DNA Array Kit, Panomix)¹⁷⁹ qui permet de déterminer l'activation ou l'inhibition de plusieurs facteurs de transcription simultanément (résultats non-montrés).

L'analyse par microdamiers des facteurs de transcription dont l'activité aurait pu être modifiée par le produit **25f** suggère ainsi que la famille des facteurs de transcription AP-1 pourrait être une cible des THBCI alkylés. Nous avons donc caractérisé les effets induits par les composés **25d**, **25f** et **25i** sur le taux d'activité des différents membres de cette famille et ce au sein des cellules d'oligodendrogliome Hs683.

Principe.

Ce test est effectué à l'aide d'un kit de type Elisa (TransAM Ap-1 Family) de chez Active Motif.¹⁷⁹ Dans chaque puits d'une plaque à 96 puits, des oligonucléotides qui contiennent une séquence reconnue par les facteurs de transcription de la famille AP-1 ont été immobilisés. Les cellules traitées pour 3h (ou non : contrôle) par le produit **25f**, ont été récoltées et les protéines nucléaires ont été extraites. Lorsque les extraits nucléaires qui contiennent les dimères de la famille AP-1 sont mis dans les puits, ceux-ci se lient de manière spécifique aux oligonucléotides. Après le

¹⁷⁹ Ce test a été effectué au sein du Laboratoire de Toxicologie par le Dr. Céline Bruyère (ULB).

retrait des protéines non liées par lavages, des anticorps spécifiques pour chaque membre de la famille AP-1 (c-Fos, FosB, Fra-1, c-Jun, JunB et JunD) sont ajoutés dans les puits prédéterminés. La détection est effectuée à l'aide d'un deuxième anticorps conjugué à l'enzyme HRP et d'une solution d'un substrat qui devient jaune sous l'action de l'enzyme. L'absorbance dans chaque puits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Résultats.

Les résultats obtenus montrent que les tendances des effets observés pour les trois composés **25d**, **25f** et **25i** sont similaires (Figure 4.13). En effet, ces trois composés ne modifient pas sensiblement l'activité des facteurs de transcription Fra-1, Fos-b et Jun-D (données non-illustrées). Fos-c n'a pas été détectée dans les cellules Hs683 (données non-illustrées). En revanche, ces composés ont augmenté de 55% à 83% l'expression nucléaire de Jun-B et phospho-c-Jun dans les cellules de gliome Hs683.

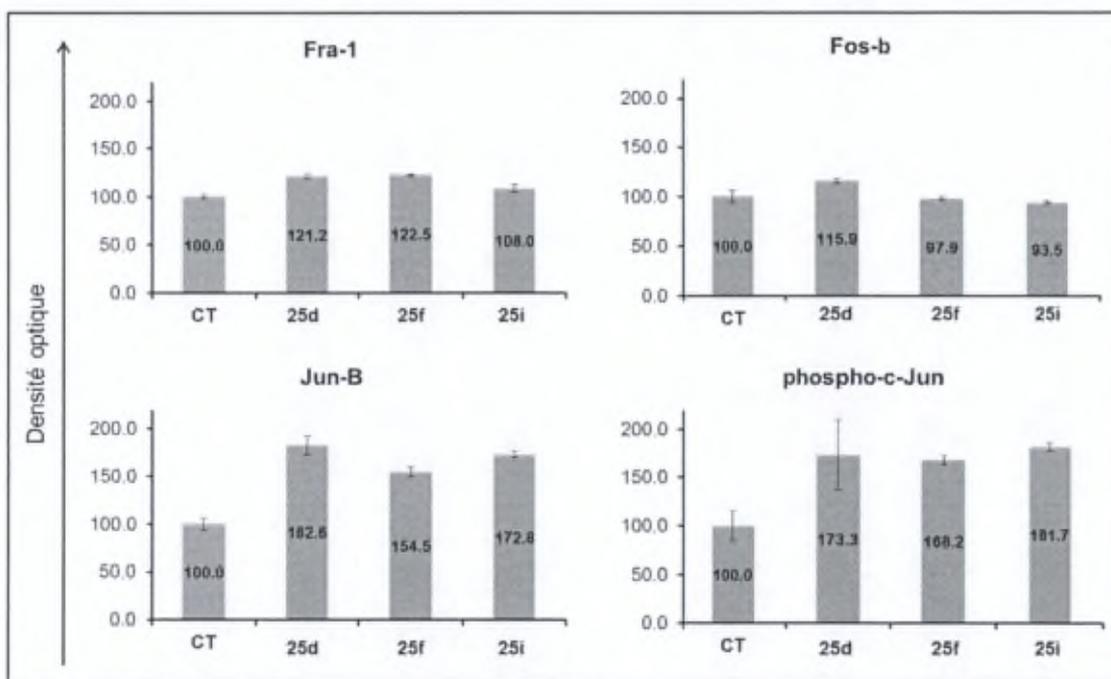


Figure 4.13 - Effet des produits **25d**, **25f** et **25i** sur l'expression nucléaire des facteurs de transcription de la famille AP-1 au sein des cellules gliales tumorales Hs683. La valeur d'absorbance obtenue pour le contrôle a été attribuée à 100%, les autres valeurs étant calculées en fonction de celle-ci.

Ces effets sur les facteurs de transcription de la famille AP-1 peuvent partiellement expliquer la désorganisation du cytosquelette d'actine, comme détaillé dans le paragraphe Discussions (§ 4.2.5)

4.2.4 Modification du taux d'expression de cytokines

Nous nous sommes attachés ensuite à déterminer si le composé **25f** pouvait modifier le profil de sécrétion des cytokines. Pour rappel, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules cancéreuses peut favoriser leur prolifération et l'angiogenèse ou pourrait être un marqueur de l'apparition de la résistance au traitement. Les cytokines pro-apoptotiques et anti-inflammatoires, quant à elles, agissent pour stimuler les attaques du système immunitaire et diminuer la prolifération des cellules cancéreuses.^{85,86}

De plus, dans le fonctionnement des cellules du système immunitaire, le contrôle de la sécrétion des cytokines est effectué via les facteurs de transcription de la famille AP-1.¹⁸⁰

Principe.

Pour quantifier la sécrétion de cytokines induite par le traitement avec du produit **25f** au sein de cellules cancéreuses, le kit Mosaic Human Cytokine Panel 1 Immunoassay de chez R&D Systems a été utilisé.¹⁷⁹ Ce kit se base sur la technique ELISA et peut détecter simultanément 8 cytokines dans le surnageant provenant d'une culture cellulaire. Dans chaque puits d'une plaque à 96 puits, 8 anticorps de capture qui reconnaissent spécifiquement les cytokines ciblées ont été immobilisés dans 8 spots différents (Figure 4.14). Lorsque les échantillons sont ajoutés, les cytokines présentes dans les échantillons sont liées par ces anticorps de capture. Après élimination par lavage de la matière non liée, des anticorps de détection biotinylés sont utilisés pour détecter les cytokines spécifiques. Les anticorps de détection non liés sont ensuite éliminés par lavage et la streptavidine-HRP est ajoutée. Suite à un lavage supplémentaire, des réactifs de substrat chimioluminescents sont ajoutés dans les puits, et un signal est produit. Il est proportionnel à la quantité de chaque cytokine liée dans l'étape initiale. Les plaques sont lues à l'aide d'un système d'imagerie connecté à une caméra, et l'intensité lumineuse de chaque spot est mesurée en utilisant un logiciel d'analyse. Des solutions étalon de cytokines sont utilisées pour générer une courbe de calibration et ainsi déterminer la concentration de cytokines dans les échantillons.

Les effets du produit **25f** sur la sécrétion de 8 cytokines a été évalué au sein des lignées cellulaires gliales tumorales Hs683 et U373. Chaque condition (contrôle et traitée) a été analysée en 4 répliquats. Chaque étalon a été analysé 3 fois.

¹⁸⁰ Foletta, V. C.; Segal, D. H.; Cohen, D. R. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *63*, 139-152.

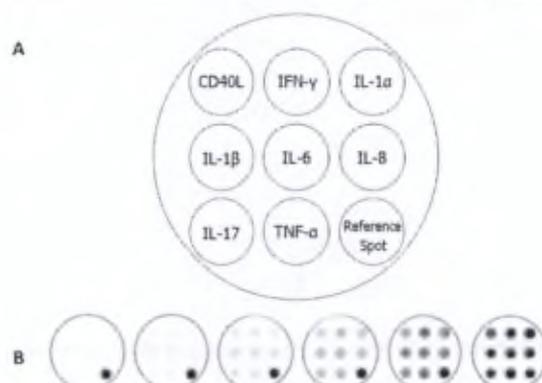


Figure 4.14 - A) Image du fond des puits du kit ELISA. Chacun des anticorps de capture, spécifique aux différentes cytokines notées sur l'image, a été immobilisé dans un endroit séparé. B) Image typique obtenue pour une courbe de calibration

Résultats.

Les résultats sont représentés dans le Tableau 4.8. On observe que la concentration de l'interleukine IL-8 est augmentée de manière importante pour les deux lignées analysées, à savoir les modèles de gliome humain Hs683 et U373. Une augmentation de l'expression d'IL-6 est également observée dans la lignée U373. Certaines cytokines ne sont pas exprimées de manière constitutive dans ces lignées. Le produit **25f** peut induire une production de ces cytokines. C'est le cas, par exemple, de l'interleukine IL-6 dans la lignée Hs683 et de l'IL-1 β et du TNF- α dans la lignée U373. Aucune de ces deux lignées n'exprime l'interleukine IL-17 même après traitement par le produit **25f**. La lignée U373 exprime plusieurs types de cytokines absentes dans la lignée Hs683. Ainsi, une diminution de la production des cytokines IFN- γ et IL- α , et une augmentation de la concentration du ligand de CD40 sont observés au sein de cette lignée.

Lignée	Traitement	Concentration des cytokines (pg/mL)							
		CD40L	IFN- γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-17	TNF- α
Hs683	CT	0	0	7 \pm 1	0	0.0	542 \pm 14	0	0
	25f (20 μ M)	0	0	28 \pm 3	0	7 \pm 3	1620 \pm 108	0	0
U373	CT	42 \pm 42	138 \pm 22	47 \pm 6	0	2211 \pm 64	1746 \pm 125	0	0
	25f (20 μ M)	190 \pm 55	35 \pm 15	20 \pm 2	21 \pm 15	3729 \pm 56	4247 \pm 250	0	35 \pm 10

Tableau 4.8 – Stimulation de la sécrétion des cytokines par le composé **25f** au sein des lignées gliales tumorales Hs683 et U373 après 72h de traitement

4.2.5 Discussions

Tout d'abord, la capacité des dérivés alkylés de THBCI à inhiber certaines kinases a été testée. Le produit **25f** montre une certaine activité inhibitrice des kinases CDK1 et CK1 à la concentration de 10 μM , de 27 et 31% respectivement. Le traitement des cellules cancéreuses avec ce produit, à sa concentration IC_{50} (21 μM) peut donc entraîner une inhibition importante de l'activité de ces kinases au sein des cellules analysées.

La kinase cycline-dépendante CDK1, en complexe avec les cyclines activatrices A ou B, est l'un des régulateurs de base de la mitose. Elle contrôle le cycle du centrosome, ainsi que l'apparition de la mitose. Les complexes CDK1-cycline phosphorylent plus de 70 substrats pendant la phase G2 et le début de la phase M pour déclencher la séparation du centrosome, les modifications de l'appareil de Golgi, la détérioration de l'enveloppe nucléaire et la condensation des chromosomes.¹⁸¹ Les données génétiques indiquent que la kinase CDK1 est suffisante pour entraîner la prolifération de tous les types de cellules jusqu'à la mi-gestation, ainsi que pendant la régénération du foie adulte, lors du « knockout » des autres kinases de la famille CDK.¹⁷

L'inhibition du complexe CDK1/cycline B peut donc expliquer, au moins en partie, les effets antimitotiques du composé **25f**.

Concernant la caséine kinase I (CK1), ses isoformes sont également connues pour réguler les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale. Elles peuvent phosphoryler des protéines régulatrices clés impliquées dans le cycle cellulaire, la transcription, la traduction et la structure du cytosquelette.¹⁸² Par exemple deux isoformes de la kinase CK1 : CK1 δ et CK1 ϵ sont capables de phosphoryler la protéine p53 pour l'activer et cette activation induit l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose.¹⁸³ D'autres substrats des isoformes CK1 α et δ , telles que PI3K, AKT, le récepteur de mort TRAIL et la protéine pro-apoptotique Bid sont impliqués dans les voies de signalisation importantes dans le cancer.¹⁸²

Cependant, pour les isoformes CK1 δ et ϵ , la fonction pro- ou anti-tumorigène est fortement dépendante du contexte cellulaire et elles semblent avoir des rôles parfois opposés dans différents types de tumeurs. Il est donc difficile de préciser si les isoformes CK1 δ et ϵ représentent des promoteurs de la tumorigenèse ou si leur dérégulation et leur expression altérée est plutôt la conséquence d'autres événements oncogéniques cellulaires.¹⁸¹

Sur cette base, il est donc difficile de préciser si les effets observés sur les kinases CK1 sont liés aux effets antitumoraux du produit **25f**.

¹⁸¹ Malumbres, M.; Barbacid, M. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 630-641.

¹⁸² Schitteck, B.; Sinnberg, T. *Mol. Cancer* **2014**, *13*.

¹⁸³ Knippschild, U.; Milne, D. M.; Campbell, L. E.; DeMaggio, A. J.; Christenson, E.; Hoekstra, M. F.; Meek, D. W. *Oncogene* **1997**, *15*, 1727-1736.

Nous avons ensuite pu montrer, via des expériences de vidéomicroscopie quantitative et de microscopie de fluorescence, que le composé **25f** présente des propriétés antimitotiques et qu'il est impliqué dans la désorganisation du cytosquelette d'actine. Ces deux effets peuvent être corrélés l'un à l'autre.

Le cytosquelette d'actine est modifié de manière importante au cours de la division cellulaire. Les cellules en interphase contiennent généralement un vaste réseau d'actine mais ce réseau est rapidement dépolymérisé et réarrangé lorsque les cellules entrent en mitose, ce qui donne aux cellules leur forme ronde caractéristique à la mitose. A la fin de la mitose, l'actine réorganise les sillons de clivage et constitue l'anneau contractile, qui est au cœur du processus de cytokinèse. Un autre événement mitotique dans lequel le réseau d'actine joue un rôle important est la séparation des centrosomes.¹⁸⁴

De même, une étude a montré que la dépolymérisation des filaments d'actine par des toxines telles que la latrunculine induisait un retard de la progression mitotique. Suite au traitement, la séparation des centrosomes est bloquée et le fuseau mitotique ne peut pas être assemblé correctement ce qui suggère que l'intégrité du cytosquelette d'actine peut être nécessaire pour le déclenchement efficace de la mitose.¹⁸⁵

Le produit **25f** peut donc empêcher la mitose, notamment pendant l'étape de cytokinèse, en agissant sur l'organisation du cytosquelette d'actine.

Ensuite, une expérience de type ELISA a montré que l'activité de Jun-B et phospho-c-Jun (facteurs de transcription de la famille AP-1) est augmentée lors du traitement avec les produits **25d**, **25f** et **25i** au sein des cellules gliales tumorales Hs683.

Polak et ses collaborateurs¹⁸⁶ ont démontré que les agents qui perturbent l'organisation des microtubules ou du cytosquelette d'actine conduisent à une accumulation de c-Jun dans les cellules traitées. La dépolymérisation de l'actine ou du réseau de microtubules induit une augmentation de la concentration de c-Jun sans entraîner une augmentation de la quantité d'ARNm de c-Jun ou de la durée de demi-vie de la protéine c-Jun. L'accumulation de c-Jun peut donc être due à une augmentation de la traduction de son ARNm. Cependant, le mécanisme qui lie le contrôle du cytosquelette et la traduction de c-Jun n'a pas encore été élucidé. Les effets du composé **25f** sur

¹⁸⁴ Heng, Y.-W.; Koh, C.-G. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2010**, *42*, 1622-1633.

¹⁸⁵ Uzbekov, R.; Kireyev, I.; Prigent, C. *Biol. Cell* **2002**, *94*, 275-288.

¹⁸⁶ Polak, P.; Oren, A.; Ben-Dror, I.; Steinberg, D.; Sapoznik, S.; Arditi-Duvdevany, A.; Vardimon, L. *Oncogene* **2006**, *25*, 665-676.

l'organisation du cytosquelette d'actine pourrait donc être une cause de l'accumulation de phospho-c-Jun qu'il induit.

Nous avons pu ensuite voir que le profil de la sécrétion des cytokines est modifié lors du traitement avec le produit **25f**, et ce au sein des cellules gliales tumorales Hs683 et U373.

Il reste difficile d'interpréter individuellement la variation de la concentration de chaque cytokine, car les effets des deux types de cytokines (pro- ou anti-inflammatoires) au sein des cancers et des gliomes¹⁸⁷ en particulier sont multiples.

Il a été démontré que, dans le cas du système immunitaire, les stimuli qui activent les lymphocytes T et B induisent une modification de la sécrétion des cytokines, via l'action des facteurs de transcription de la famille AP-1. Les protéines Fos et Jun interagissent avec les promoteurs de gènes des cytokines soit seuls, soit en combinaison avec d'autres facteurs de transcription comme par exemple le facteur NF- κ B.¹⁸⁰

L'équipe de Molitoris a montré qu'en traitant des cellules endothéliales microvasculaires du pancréas avec des cocktails de cytokines (mélange de IL-1 α , IL-6 et TNF- α) une augmentation de la polymérisation de l'actine a été observée. Cette modification de l'organisation du cytosquelette d'actine s'effectue via la voie de RhoA.¹⁸⁸

Les effets observés sur les cytokines pourraient donc être le lien entre les facteurs de transcription de la famille AP-1 et la désorganisation du cytosquelette d'actine que nous observons ici pour le produit **25f** au sein des cellules gliales tumorales Hs683.

Néanmoins, l'augmentation de la sécrétion de l'IL-8⁸⁴ dans les deux lignées de gliome testées (U373 et Hs683) pourrait être liée à une résistance que les cellules cancéreuses développeraient après les 72 heures de traitement.

¹⁸⁷ Albulescu, R.; Codrici, E.; Popescu, I. D.; Mihai, S.; Necula, L. G.; Petrescu, D.; Teodoru, M.; Tanase, C. P. *Mediat. Inflamm.* **2013**, *2013*, e979748.

¹⁸⁸ Campos, S. B.; Ashworth, S. L.; Wean, S.; Hosford, M.; Sandoval, R. M.; Hallett, M. A.; Atkinson, S. J.; Molitoris, B. A. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2009**, *296*, F487-F495.

4.3 Conclusions

47 composés (dont 46 originaux) ont été évalués au niveau de leur activité anticancéreuse *in vitro* via le test colorimétrique MTT. Parmi eux, neuf dérivés de la THBCI sont actifs contre l'ensemble des six lignées cellulaires tumorales utilisées. Pour ces composés, aucune différence d'activité n'a été observée entre les lignées sensibles ou résistantes à la chimiothérapie de type pro-apoptotique. Six d'entre eux présentent des activités anticancéreuses encore plus intéressantes, car les valeurs moyennes d'inhibition de croissance *in vitro* IC₅₀ sont inférieures à 50 µM. Il s'agit notamment des composés **11**, **25d**, **25f**, **25i**, **44** et **46**. De plus, les produits **25d**, **25f**, et **25i**, dérivés de THBCI portant des groupes benzyle sur les atomes d'azote, présentent une certaine bio-sélectivité. Le produit **25f** semble le plus prometteur, étant trois fois plus actif sur les cellules cancéreuses que sur les cellules normales.

Les tests de stabilité, effectués dans le milieu de culture, montrent que l'activité antitumorale observée pour ces composés est due aux produits eux-mêmes et non à des produits de dégradation apparus au cours de l'analyse par MTT.

L'analyse par la technique de vidéomicroscopie quantitative confirme l'activité antitumorale observée par le test colorimétrique MTT pour ces six composés. De plus, ces produits ont montré un comportement purement cytotatique : ils agissent en diminuant la prolifération des cellules cancéreuses sans les tuer. Pour le produit **25f**, une diminution du nombre des mitoses est observée dans la population cellulaire.

Les effets du composé **25f** sur la désorganisation du cytosquelette d'actine pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution du taux de mitose et l'effet cytotatique dans les populations des cellules traitées. En effet, la modification du cytosquelette d'actine peut empêcher la mitose, notamment pendant l'étape de cytokinèse.¹⁸⁵

Les composés **25d**, **25f** et **25i** augmentent l'expression des protéines Jun-B et phospho-c-Jun, membres de la famille des facteurs de transcription AP-1. Les effets du composé **25f** sur l'organisation du cytosquelette d'actine pourrait donc être une cause de l'augmentation de l'activité de phospho-c-Jun qu'il induit.¹⁸⁶

Cet effet observé sur le cytosquelette pourrait être la réponse de régulation autocrine aux changements observés dans le profil de la sécrétion des cytokines, induits notamment via la voie de certains facteurs de transcription de la famille AP-1.^{180,188}

Chapitre V

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales

La méthodologie « one-pot » développée au sein de notre laboratoire a été utilisée avec succès pour la synthèse d'une petite librairie de dérivés de tétrahydro- β -carbolines. De plus, cette procédure a été étendue à l'obtention des dérivés de tétrahydroisoquinoléines, de tétrahydrothiénopyridines et de tétrahydrobenzothiényridines.

C'est ainsi que 47 composés, dont 46 présentent une structure originale, ont été obtenus très purs avec des bons rendements.

Ces composés ont été évalués au niveau de leur activité anticancéreuse *in vitro*, via le test colorimétrique MTT. Ce premier screening montre que les produits qui ne sont pas alkylés sur les atomes d'azote ne sont pas actifs. Parmi les composés actifs, six produits présentent des activités anticancéreuses très intéressantes, en effet leurs valeurs moyennes d'IC₅₀ sont inférieures à 50 μ M. De plus, trois produits (**25d**, **25f**, et **25i**), dérivés de THBCI portant des groupes benzyle sur les atomes d'azote, présentent une bio-sélectivité encourageante entre les cellules normales et les cellules cancéreuses.

Ensuite, une analyse par vidéomicroscopie quantitative a montré que ces trois composés ont une activité cytotatique, et non pas cytotoxique, agissant sur la prolifération des cellules cancéreuses, en diminuant le nombre de mitoses qui a lieu dans une population cellulaire (Figure 5.1).

Des analyses pharmacologiques plus poussées, effectuées sur le produit « hit » **25f**, ont montré que ces composés ne sont pas des inhibiteurs des kinases comme on le pensait tout au début de ce projet. Les dérivés alkylés de THBCI modifient l'organisation du cytosquelette d'actine, en interférant avec l'activité des facteurs de transcription de la famille AP-1.

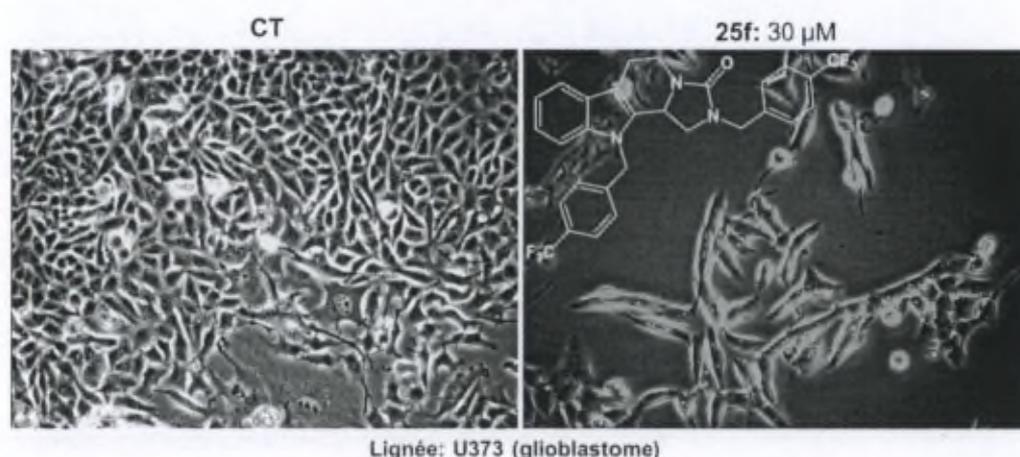


Figure 5.1 - Le composé **25f** présente l'activité anticancéreuse la plus intéressante

Nous avons également développé avec succès une méthode de synthèse énantiosélective du produit **25f**, le plus intéressant du point de vue de ses propriétés antitumorales (Figure 5.1). Même si cette méthode n'a pu être généralisée pour l'obtention des dérivés de THBCI non alkylés, le screening général des catalyseurs et des substrats, réalisé au cours de cette étude, a permis une meilleure compréhension du fonctionnement des catalyseurs de type acide phosphorique dérivés du BINOL.

Perspectives

Tout d'abord, les résultats observés sur la cible AP-1 devraient être confirmés par des tests de biologie moléculaire qui permettraient d'évaluer l'expression des différentes sous-unités des complexes AP-1 d'une part et leur activité transcriptionnelle d'autre part. En effet, le test ELISA que nous avons réalisé nous a fourni une image globale sur l'expression et l'activité des facteurs de transcription de la famille AP-1. Une expérience de Western Blot d'une part et des *electrophoresis mobility shift assay* ou des essais luciférase d'autre part pourraient montrer si les effets qu'on observe sont dus à une augmentation de leur expression d'une part et/ ou à une augmentation de leur activité transcriptionnelle d'autre part.

De point de vue des propriétés pharmacologiques des dérivés de THBCI, il serait également intéressant de vérifier si les composés de ce type interviennent dans la synthèse des protéines. Cette analyse devrait être effectuée sur le produit **25f**, qui est le produit « hit », mais également sur le composé **11** (Figure 5.2), étant donné le fait que des dérivés alkylés de l'harmine présentent cet effet.⁶⁹

Comme le produit cationique **11** (Figure 5.2) s'est avéré être le seul produit non-alkylé sur les atomes d'azote qui présente une bonne activité antitumorale, il serait intéressant d'optimiser sa synthèse.

La modification ultérieure de cette structure, notamment par alkylation des atomes d'azote pourra mener à des produits potentiellement plus actifs que le produit **25f**. La synthèse de nouveaux dérivés du composé **11** reste donc une voie à suivre pour développer des nouveaux médicaments anticancéreux.

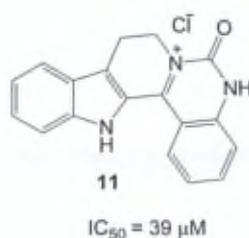


Figure 5.2 – Le composé **11**

Bien évidemment, un screening plus poussé des structures de type THBCI pourrait être effectué.

La nature des substituants du noyau indolique pourrait, par exemple, être modifiée. En effet, seulement des molécules portant des groupes électrodonneurs (OH ou OMe) sur le noyau indolique ont été synthétisées dans le cadre de ce travail. Il serait donc intéressant d'évaluer les effets de groupes électroattracteurs (Cl, F) sur le noyau indole (Figure 5.3).

Une autre voie de diversification des dérivés de THBCI serait d'introduire des longues chaînes aliphatiques sur les atomes d'azote. Cela permettra de vérifier si l'activité biologique qu'on observe pour les dérivés alkylés est due à une augmentation de l'hydrophobicité, par rapport aux dérivés non-alkylés, ou si les groupes benzyle jouent un rôle dans la reconnaissance de ces produits à l'intérieur de la cellule.

L'acylation sélective et la méthode de synthèse énantiosélective sont deux façons d'introduire des substituants différents sur les deux atomes d'azote ($R^2 \neq R^3$) (Figure 5.3). Ces deux méthodes pourraient être utilisées pour obtenir d'autres dérivés originaux pour notre librairie de composés et permettraient de moduler les propriétés biologiques des dérivés de THBCI avec une plus grande liberté.

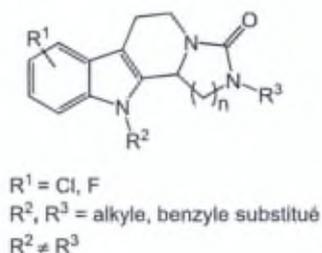


Figure 5.3 – Nouvelles cibles qui pourraient être envisagées

Chapitre VI

Experimental section

6.1 Organic synthesis

6.1.1 General Information.

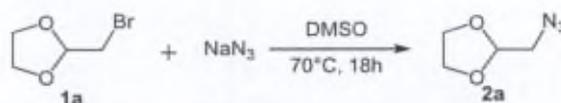
All reactions were performed under argon, unless otherwise stated. Solvents were distilled prior to use. Anhydrous tetrahydrofuran was obtained by distillation under argon in the presence of sodium/benzophenone. Chromatographic purification of the products was carried out using Merck silica gel 60 (0.040 - 0.063 mm). Thin-layer chromatography was carried out using Macherey-Nagel 60 aluminium plates that were visualized under UV light (254 nm), or by staining with ninhydrin and 4-anisaldehyde. ^1H NMR spectra were recorded on Bruker 400 or 300 spectrometers, at 400 or 300 MHz, at 298K, with residual solvent as the internal standard. ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker 400 or 300 spectrometers, at 100 or 75 MHz, at 298K, with the central peak of the deuterated solvent as the internal standard. When a mixture of CDCl_3 and CD_3OD was used to dissolve the NMR sample, the spectrum was referenced using CD_3OD (3.31 ppm for ^1H and 49.00 for ^{13}C) if a mixture of 1:1 was used, and CDCl_3 (7.26 ppm for ^1H and 77.16 ppm for ^{13}C) if deuterated chloroform was the predominant solvent in the mixture.

Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm), and coupling constants (J) are given in Hertz (Hz). Signal assignments were made by COSY, HMQC and HMBC spectra if necessary. Multiplicity was indicated as follows: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublet of doublets), t (triplet), m (multiplet if shift is centered, massive if shift is an interval), and bs (broad singlet). In some cases, the multiplicity of the signals was established due to the COSY spectrum, and the coupling constants were estimated and noted as: $J_1 \approx J_2 \approx x$ Hz. IR spectra were recorded on a Shimadzu IR-470 spectrophotometer or on a Bruker IFS 25 FTIR spectrometer as potassium bromide pellets, and the peak data are given in cm^{-1} . High resolution mass-spectra were recorded on an Agilent QTOF6520 or a Waters Xevo QTOF mass spectrometer. In addition to the ^1H and ^{13}C NMR spectra analysis, the purity of the compounds was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis that was performed on a Hewlett Packard 1100 MSD instrument using a Waters Symmetry Shield RP_8 column; 4.6×150 mm; $3.5 \mu\text{m}$. The mobile phase consisted of methanol and water with acid (TFA) or basic (TEA) additives (see Supplementary Information for details). Melting points were recorded on a Kofler apparatus and are uncorrected. Optical rotations were recorded using an Atago AP-100 polarimeter; specific rotation (SR) ($[\alpha]_D^{20}$) is reported in $(\text{deg} \cdot \text{mL})/(\text{g} \cdot \text{dm})$; concentrations (c) are given in $\text{g}/100 \text{ mL}$; D refers to the D-line of sodium (589 nm); and temperatures (T) are given in degrees Celsius ($^\circ\text{C}$). Yields that are presented in brackets are estimated by the ^1H NMR spectroscopy analysis of different FC fractions.

Safety measurements regarding organic azides. Although organic azides are known to be potentially explosive, we did not encounter any problems during the present work. However, precautions must be taken when working with these compounds or with sodium azide.

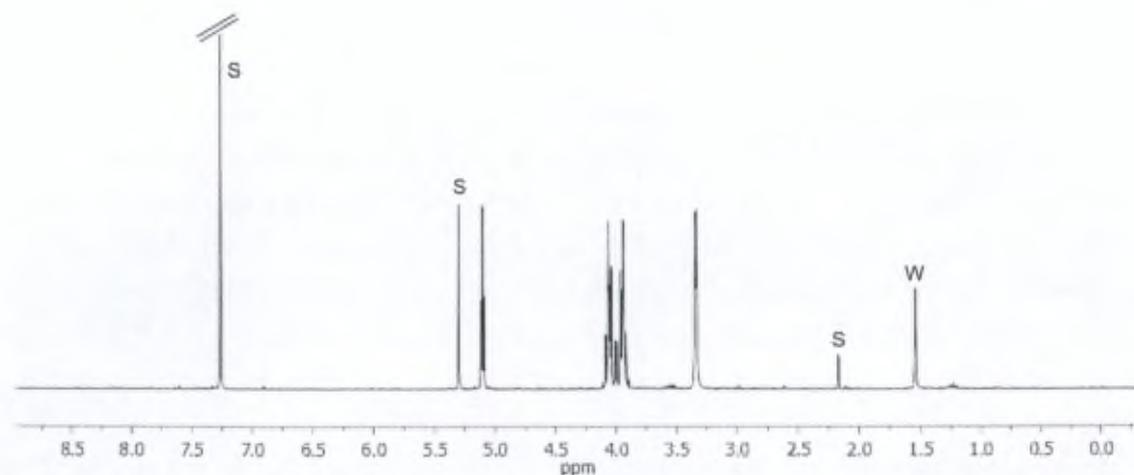
6.1.2 Synthesis of azides

Synthesis of 2-(Azidomethyl)-[1,3]-dioxolane

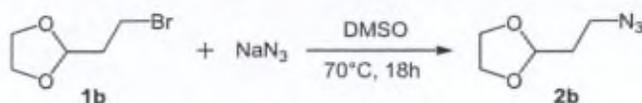


Azide **2a** was synthesized according to an adapted method¹³⁵ described in the literature. Sodium azide (2.638 g, 40.585 mmol) was suspended in DMSO and 2-bromomethyl-1,3-dioxolane **1a** (1.300 mL, 12.600 mmol) was added dropwise. When heated at 70 °C the azide dissolved and the clear solution was stirred overnight at this temperature, under normal atmosphere. After cooling, the reaction mixture was poured in 300 mL of an ice/water mixture. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 x 100 mL). The organic phase was concentrated to a volume of 50 mL and then washed with deionised water (3 x 50 mL), dried on a WA filter and concentrated to give azide **2a**. Colourless oil; 1.515 g, yield: 93%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.10 (t, 1H, *J* = 3.5 Hz; CH), 4.15-3.85 (m, 4H; CH₂CH₂), 3.33 ppm (d, 2H, *J* = 3.5 Hz; CH₂N). The ¹H NMR spectrum is in accordance with the one described in the literature.¹³⁵

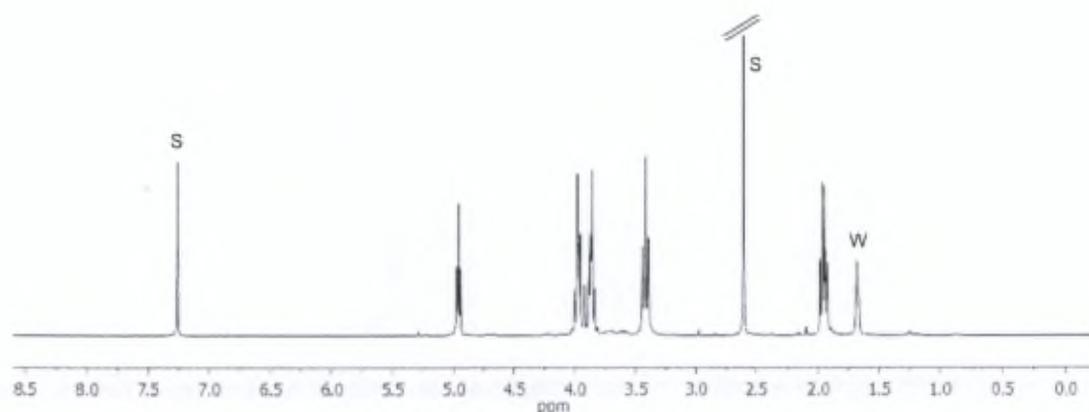


S = solvent, W = water

Synthesis of 2-(2-Azidoethyl)-[1,3]-dioxolane (**1b**)

The azide **2b** was synthesized according according to an adapted method¹³⁵ described in the literature. Sodium azide (1.305 g, 20.074 mmol) was suspended in DMSO (50 mL) and stirred for 25 min at 35 °C to obtain a clear solution then 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane **1b** (1.95 mL, 16.61 mmol) was added dropwise. The solution was stirred overnight at 25 °C under argon atmosphere. After cooling, the reaction mixture was poured in 200 mL of an ice/water mixture. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 × 120 mL). The organic phase was then washed with deionised water (3 × 50 mL), dried on a WA filter and concentrated to give azide **2b**. Yellowish oil; 2.541 g that contained 14% DMSO, yield: 92%.

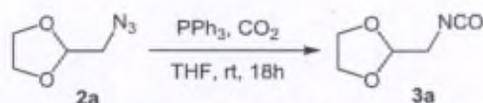
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.96 (t, 1H, *J* = 4.2 Hz; CH), 4.05-3.80 (m, 4H; CH₂CH₂), 3.43 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz; CH₂N₃), 1.96 ppm (m, 2H; CH₂CH₂N₃). The ¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) is in accordance with the one described in the literature.¹³⁵



S = solvent, W = water

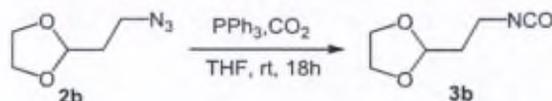
6.1.3 Synthesis of isocyanates

Synthesys of 2-(isocyanatomethyl)-1,3-dioxolane



To a solution of PPh₃ (1.980 g, 7.549 mmol) in anhydrous THF (50 mL) under argon, azide **2a** (0.730 mL, 7.350 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 15 min then saturated with CO₂ (g) for 10 min. The reaction was stirred for 18 h at room temperature under CO₂ atmosphere. Argon was then bubbled into the reaction mixture in order to remove the excess CO₂ and the crude isocyanate **3a** was immediately reacted with an amine.

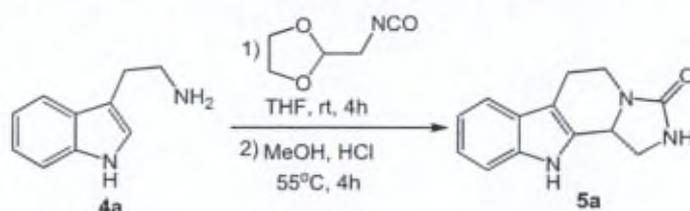
Synthesys of 2-(2-Isocyanatoethyl)-[1,3]-dioxolane



To a solution of PPh₃ (0.288 g, 1.098 mmol) in anhydrous THF (9 mL) under argon, azide **2b** (0.100 mL, 1.12 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 15 min then saturated with CO₂ (g) for 10 min. The reaction was stirred for 18 h at room temperature under CO₂ atmosphere. Argon was then bubbled into the reaction mixture in order to remove the excess CO₂ and the crude isocyanate **3b** was immediately reacted with an amine.

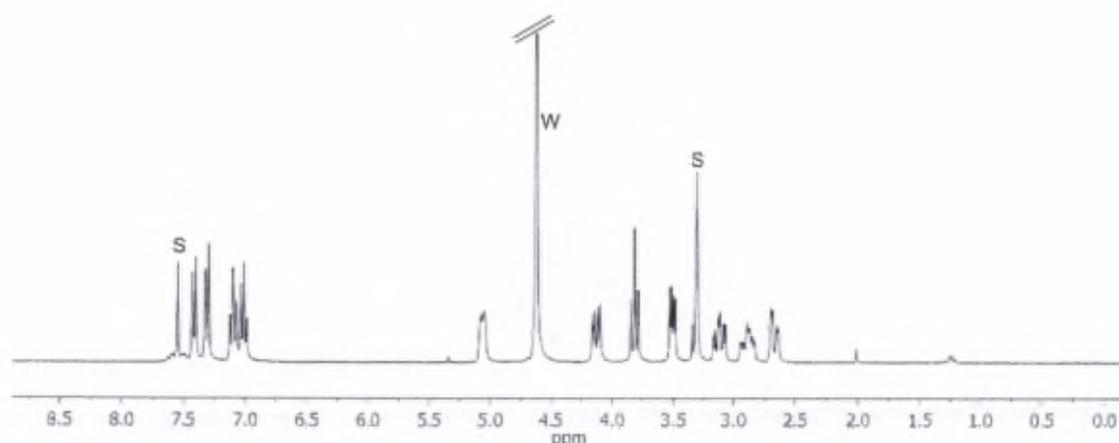
6.1.4 Synthesis of tetracyclic tetrahydro- β -carboline derivatives (THBCI)

Synthesis of 5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



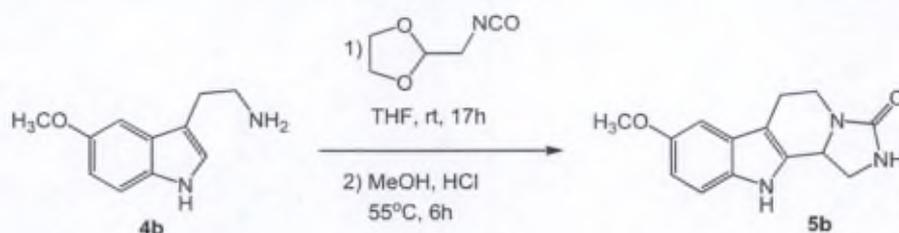
A solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 0.730 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was added to a solution of tryptamine **4a** (1.000 g, 6.242 mmol) in anhydrous THF (8 mL) under argon. After stirring at room temperature for 4 h, the solvent was removed and the residue was dissolved in MeOH (70 mL). HCl (2.8M, 30 mL) was added and the mixture was stirred at 55 °C for 4 h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (5 mL). The mixture was sonicated (5 min \times 3600 rpm) and the supernatant was removed by pipetting. A flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) was performed on the resulting solid and on the supernatant separately to afford the desired product **5a**. Beige foam; 1.267 g, yield: 89%; mp 250-255°C; HPLC Purity: 92%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 7.42 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NHCCCH), 7.31 (d, 1H, J = 8.1 Hz; NHCCHCH), 7.10 (m, 1H; NHCCHCH), 7.01 (m, 1H; NHCCCHCH), 5.06 (m, 1H, NCH), 4.13 (dd, 1H, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 13.5 Hz; NCHH), 3.81 (t, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NHCHH), 3.51 (dd, 1H, J = 3.9 Hz, J = 8.7 Hz, NHCHH), 3.12 (ddd, 1H, J_1 = 13.2, J_2 = 11.7, J_3 = 4.5 Hz; NCHH), 2.89 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.67 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 163.9 (CO), 137.2, 132.7, 127.4, 122.2, 119.6, 118.5, 111.7, 109.0, 53.5 (NCH), 44.4 (NHCH₂), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.6 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3269, 2922, 1680 (C=O), 1270 cm⁻¹; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₃H₁₄N₃O: 228.1137 [M+H⁺]; found: 228.1137 (error: 0 ppm).



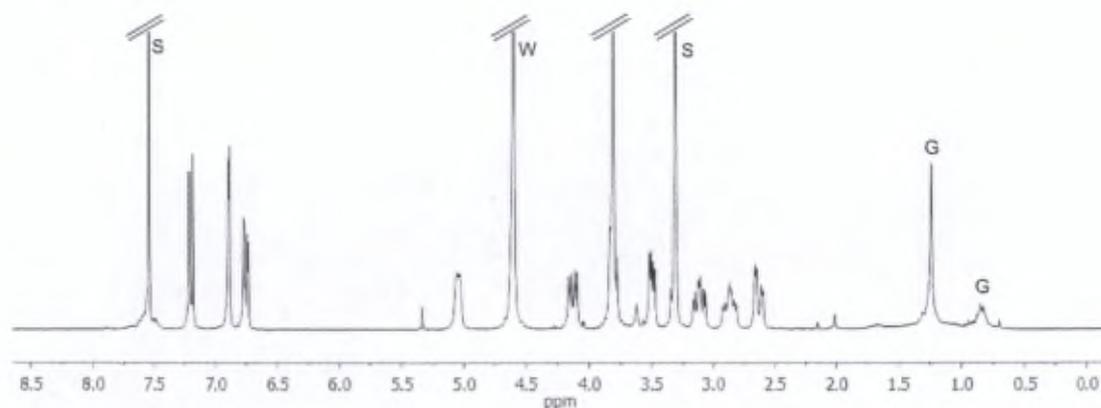
S = solvent, W = water

Synthesis of 8-methoxy-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one

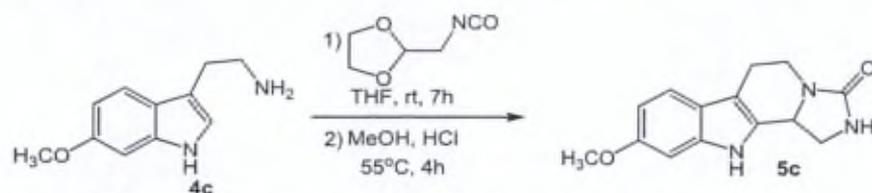


Isocyanate **3a** (theor. 3.121 mmol) in anhydrous THF (45 mL) synthesized using the general procedure was added without any purification to 5-methoxytryptamine **4b** (0.478 g, 2.511 mmol). After stirring the reaction for 17 h the solvent was removed in vacuum. The solid residue is dissolved in MeOH (30 mL) and HCl (2.8 M, 10 mL) was added. After the reaction for 6 h at 55 °C, the product **5b** was concentrated to dryness and purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 97/3 to 90/10). White foam; 0.530 g, yield: 82%; mp 218-221 °C; HPLC Purity: 99%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 7.20 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz; OCCHCH), 6.90 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz; OCCHC), 6.76 (dd, 1H, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz; OCCHCH), 5.05 (m, 2H, NCH), 4.13 (dd, 1H, *J*₁ = 5.7 Hz, *J*₂ = 13.5 Hz, NCHH), 3.95-3.70 (m, 4H; OCH₃, NHCHH), 3.50 (dd, 1H, *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz; NHCHH), 3.11 (m, 1H, NCHH), 2.87 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.63 ppm (dd, 1H, *J*₁ = 3.6 Hz, *J*₂ = 15.0 Hz; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 154.4 (2C; CH₃OC, CO), 137.4, 133.7, 127.7, 112.4 (OCCHCH), 112.2 (OCCHCH), 108.9, 100.8 (OCCHC), 56.3 (OCH₃), 53.6 (NCH), 44.5 (NHCH₂), 39.6 (NCH₂CH₂), 20.6 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3263, 2929, 1682 cm⁻¹ (C=O); HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₄H₁₆N₃O₂: 258.1243 [M+H⁺]; found: 258.1240 (error: -1.2 ppm).

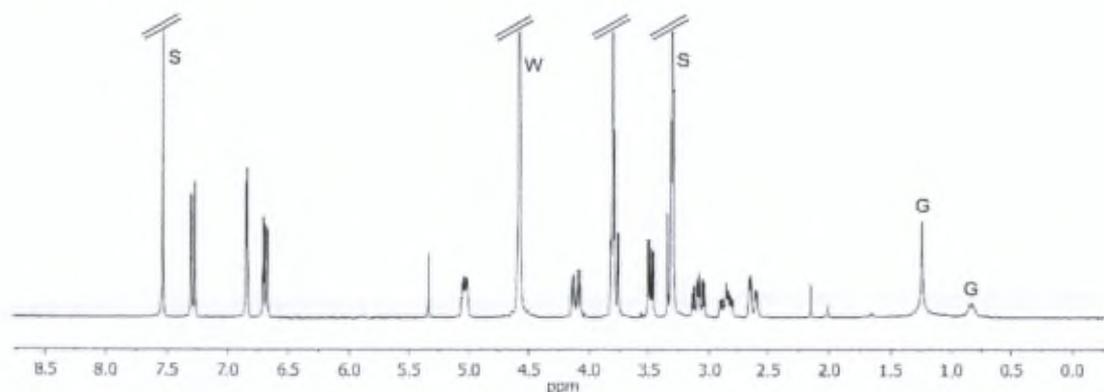


S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 9-methoxy-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one


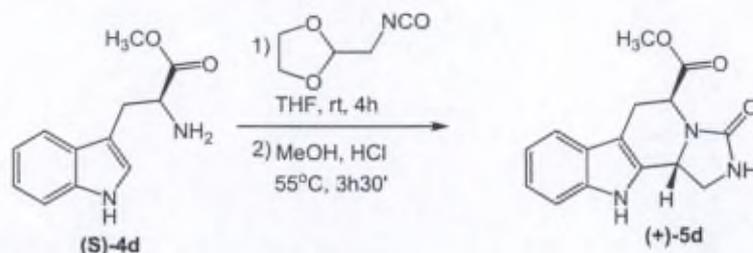
A solution of isocyanate **3a** (theor. 0.141 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added to a suspension containing 6-methoxytryptamine **4c** (0.023 g, 0.120 mmol) in anhydrous THF (3 mL). After reaction for 7h the solvent was evaporated in vacuum and the product was solubilised in MeOH (7 mL). HCl (2.8 M, 1 mL) was added and the reaction was stirred at 55 °C for 4 h. The reaction mixture was concentrated in vacuum and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford compound **5c**. Pale brown foam; 0.026 g, yield: 84%; mp 220-225 °C; HPLC Purity: 97%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 7.29 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz; OCCHCH), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz; OCCHC), 6.69 (dd, 1H, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz; OCCHCH), 5.03 (m, 1H, NCH), 4.11 (dd, 1H, *J*₁ = 5.4 Hz, *J*₂ = 13.5 Hz; NCHH), 3.85-3.70 (m, 4H; OCH₃, NHCHH), 3.49 (dd, 1H, *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz; NHCHH), 3.10 (ddd, 1H, *J*₁ = 13.2 Hz, *J*₂ = 11.7 Hz, *J*₃ = 4.8 Hz; NCHH), 2.86 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.62 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 163.9 (C=O), 156.8 (CH₃OC), 138.0 (NHCCCH), 131.5 (NHCCHN), 122.0 (NHCCCH), 119.0 (OCCHCH), 109.0 (OCCHCH), 108.9 (NHCCCH₂), 95.6 (OCCHC), 56.0 (OCH₃), 53.5 (NCH), 44.5 (NHCH₂), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.6 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3262, 2926, 1680 cm⁻¹ (C=O); HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₄H₁₆N₃O₂: 258.1243 [M+H⁺]; found: 258.1242 (error: -0.4 ppm).



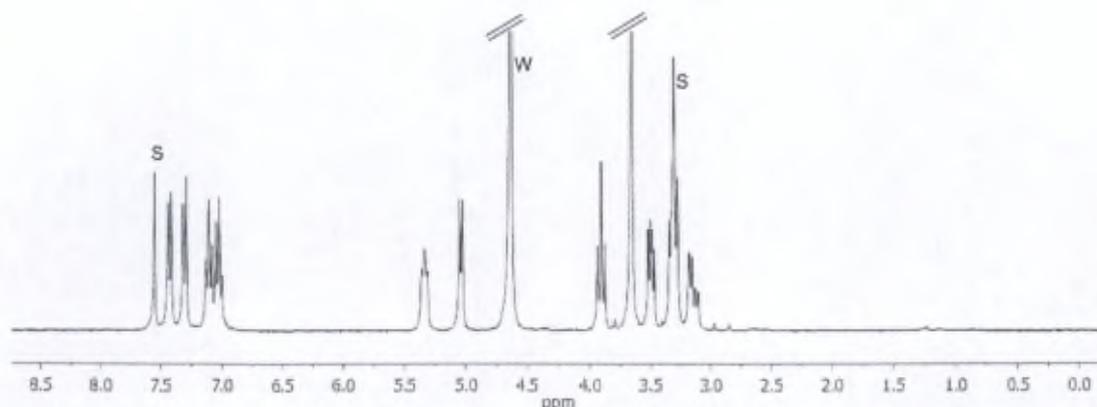
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of (5*S*)-methyl 3-oxo-2,3,5,6,11,11b-hexahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indole-5-carboxylate



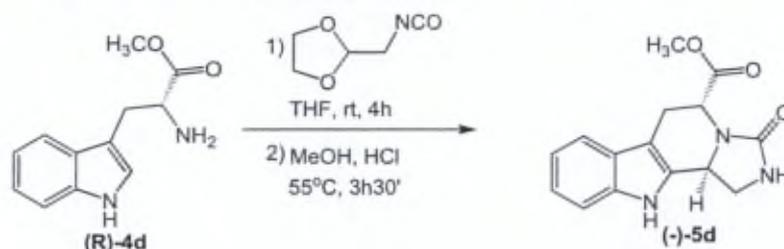
L-Tryptophan methyl ester hydrochloride (0.195 g, 0.766 mmol) was deprotonated using a saturated solution of NaHCO_3 (10 mL). The deprotonated amine was recovered by extraction with ethyl acetate (3×10 mL) dried on WA filter, concentrated in vacuum and immediately used. A solution containing isocyanate **3a** (theor. 0.822 mmol) in anhydrous THF (15 mL) under argon was added dropwise to the dry amine (**S**)-**4d** (0.151 g, 0.692 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 h. THF was afterwards concentrated under reduced pressure. The product was redissolved in MeOH (9 mL), TFA (1 mL) was added and the resulting solution is stirred for 3 h and 30 min at 55 °C. After this delay, more TFA (2 mL) was added and the mixture stirred for 48 h at 55 °C. After cooling the solution was concentrated to dryness. The product (+)-**5d** was purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient from 97/3 to 90/10). White foam; 0.128 g, yield: 65%; mp 120-122 °C; HPLC Purity: 94%;

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 1:1): δ = 7.43 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NHCCCH), 7.31 (d, 1H, J = 8.1 Hz; NHCCHCH), 7.11 (m, 1H; CCHCH), 7.02 (m, 1H; CCHCH), 5.34 (m, 1H, NHCH_2CH), 5.04 (d, 1H, J = 6.9 Hz; NCHCO), 3.91 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NHCHH), 3.66 (s, 3H; OCH_3), 3.49 (dd, 1H, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 8.7 Hz, NHCHH), 3.39-3.23 (m, 1H; COCHCHH), 3.15 ppm (ddd, 1H, J_1 = 15.9 Hz, J_2 = 7.2 Hz, J_3 = 1.8 Hz; COCHCHH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 5:1): δ = 172.0 (OCO), 161.9 (NCO), 136.4, 131.1, 126.4, 121.9, 119.2, 118.0, 111.1, 105.7, 52.3 (OCH_3), 50.8 (CHCO), 50.1 (NHCH_2CH), 44.2 (NHCH_2), 22.8 ppm (COCHCH_2); IR (KBr): ν = 2923, 2848, 1681 (C=O), 1434, 1262, 741 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$: 286.1192 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 286.1194 (error: 0.7 ppm); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +124.8 (c = 0.25 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 1:1).



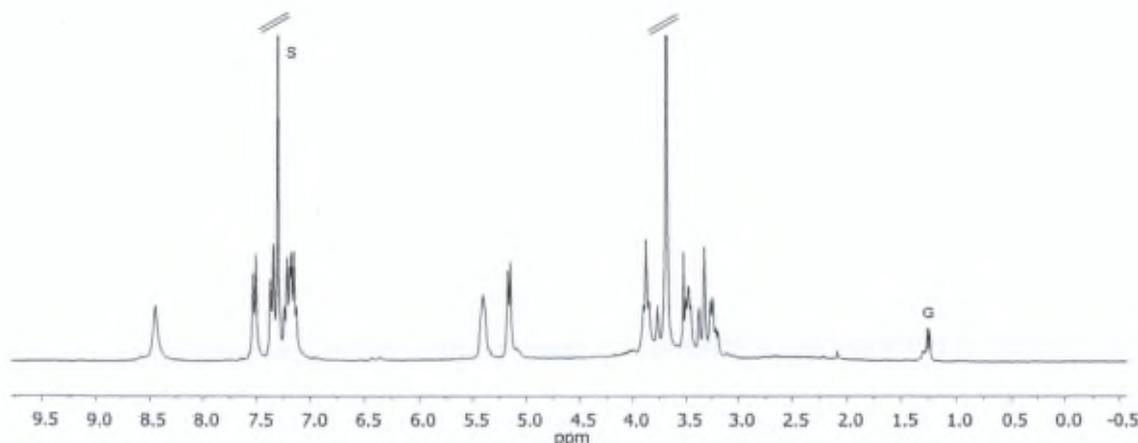
S = solvent, W = water

Synthesis of (5R)-methyl 3-oxo-2,3,5,6,11,11b-hexahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole-5-carboxylate

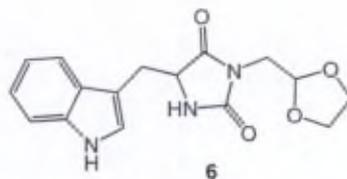


This compound was synthesised according to the same procedure used for (+)-5d by replacing L-Tryptophan methyl ester hydrochloride with D-Tryptophan methyl ester hydrochloride. (-)-5d White foam; 0.115 g, yield: 61%; mp 90 °C (dec.); HPLC Purity: 94%;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.41 (bs, 1H; ArNH), 7.48 (d, 1H, J = 7.2 Hz; NHCCCH), 7.32 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NHCCHCH), 7.22-7.04 (m, 2H; NHCCHCH , NHCCCHCH), 5.37 (m, 1H, NHCH_2CH), 5.12 (d, 1H, J = 6.6 Hz; NCHCO), 3.83 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 7.5$ Hz; NHCHH), 3.65 (s, 3H; OCH_3), 3.44 (m, 1H; NHCHH), 3.31 (d, 1H, J = 15.9 Hz; COCHCHH), 3.18 ppm (m, 1H; COCHCHH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 172.0 (OCO), 161.5 (NCO), 136.5, 131.0, 126.8, 122.6, 120.0, 118.6, 111.3, 107.0, 52.6 (OCH_3), 50.9 (NCHCO), 50.2 (NHCH_2CH), 44.5 (NHCH_2), 23.1 ppm (COCHCH_2); IR (KBr): ν = 3394, 3284, 2952, 1735, 1684 (C=O), 1438, 1292, 1214, 747 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$: 286.1192 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 286.1192 (error: 0 ppm); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -161.4 (c = 0.88 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 1:1).

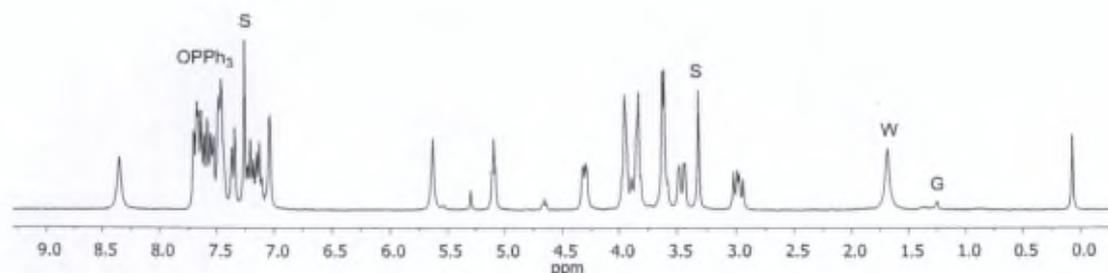


S = solvent, G = grease

¹H NMR spectrum of secondary compound 6 (3-((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)-5-((1H-indol-3-yl)methyl)imidazolidine-2,4-dione)

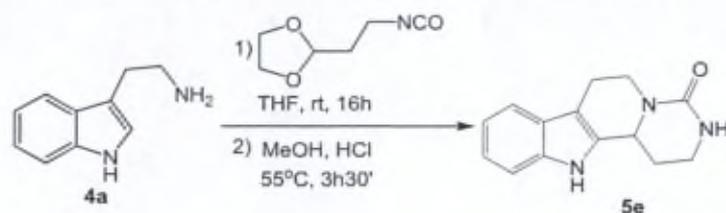
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.35 (bs, 1H, NH_{in}), 7.60* (m, 1H; ArH), 7.36 (d, 1H, J = 7.8 Hz; ArH), 7.20 (m, 1H; ArH), 7.13 (m, 1H; ArH), 7.04 (m, 1H; ArH), 5.63 (bs, 1H, CONH), 5.10 (t, 1H, J = 4.5 Hz; OCHCH₂), 4.31 (m, 1H; NHCH), 4.03-3.76 (m, 4H; OCH₂CH₂O), 3.62 (d, 2H, J = 4.5 Hz; NCH₂), 3.46 (m, 1H; InCH₂), 2.98 (dd, 1H, J_1 = 9.3 Hz, J_2 = 14.7 Hz; InCH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 173.5 (NCO), 156.9 (NHCO), 136.4, 126.9, 123.4, 122.6, 120.1, 118.7, 111.5, 109.8, 100.4 (OCHCH₂), 65.1 (OCH₂CH₂O), 58.0 (NHCH), 40.8 (NCH₂), 28.3 ppm (InCH₂);

*) chemical shift determined using the COSY spectrum



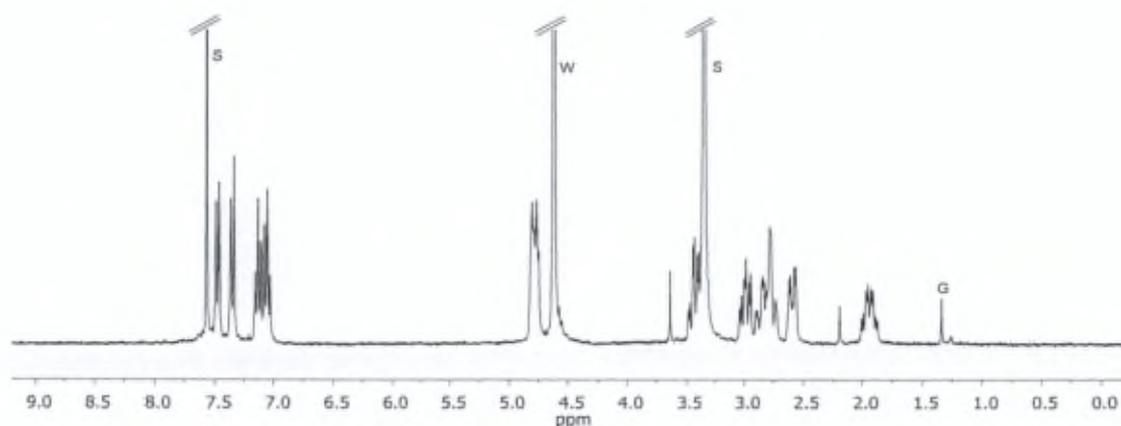
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 1,2,3,6,7,12b-hexahydropyrimido[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-4(12H)-one



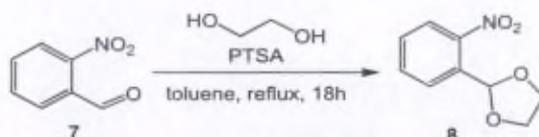
Isocyanate **3b** (theoretic mass: 0.138 g, 1.069 mmol) freshly prepared was added to a suspension of tryptamine (0.134 g, 0.84 mmol) in anhydrous THF (6 mL). The reaction mixture was then stirred at room temperature for 16 h then the solvent was removed in vacuum. The residue was dissolved in MeOH (10 mL), HCl (2.8M, 3 mL) was added and the reaction was stirred at 55 °C for 4 h. A flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then dichloromethane/methanol (gradient from 95/5 to 90/10) was performed on the crude product to afford the desired compound **5e**. Beige powder; 0.184 g, yield: 92%; mp 240-242 °C; HPLC Purity: 100%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 7.44 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; NHCCCH), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz; NHCCHCH), 7.10 (m, 1H; NHCCHCH), 7.02 (m, 1H; NHCCCHCH), 4.83-4.67 (m, 2H, NCH, NCHH), 3.46-3.20 (m, 2H; NHCH₂), 2.95 (m, 1H; NCHH), 2.88-2.63 (m, 2H; NCH₂CHH, NCH₂CHH), 2.55 (m, 1H; NHCH₂CHH), 1.90 ppm (m, 1H; NHCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 157.5 (CO), 137.2, 133.5, 127.2, 122.0, 119.5, 118.4, 111.6, 109.0, 52.6 (NCH), 41.2 (NCH₂), 38.6 (NHCH₂), 28.7 (NCHCH₂), 21.7 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3168, 2889, 2362, 1608 (C=O), 1498, 1306, 731 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₄H₁₆N₃O: 242.1293 [M+H⁺]; found: 242.1290 (error: -1.2 ppm).



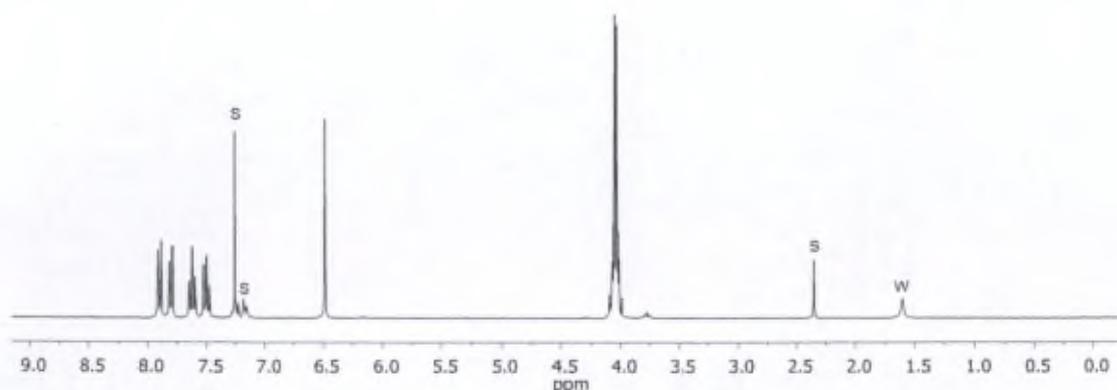
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 2-(2-nitrophenyl)-1,3-dioxolane



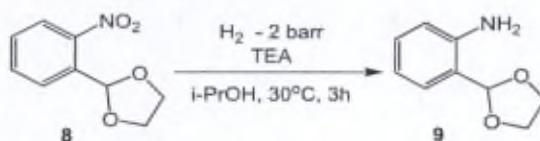
This compound was prepared using a modified existing procedure.¹³⁶ 2-Nitrobenzaldehyde **7** (8.0 g, 52.93 mmol) was dissolved in dry toluene (105 mL) under argon at room temperature, ethylene glycol (15 mL, 268.2 mmol) and PTSA (0.120 g, 0.63 mmol) were added, the mixture heated at reflux temperature for 18 h using a Dean-Stark apparatus. After cooling to room temperature, CH_2Cl_2 (100 mL) and saturated NaHCO_3 (50 mL) were added and the organic layer separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 50 mL), the combined organic fractions were dried (MgSO_4), filtered and concentrated under reduced pressure to give 2-(2-nitrophenyl)-1,3-dioxolane **8**. Yellow oil; 10.34 g, yield: quantitative;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.90 (dd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 8.1$ Hz; ArH), 7.80 (dd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz; ArH), 7.62 (td, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz; ArH), 7.50 (td, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz; ArH), 6.49 (s, 1H; OCH), 4.04 (m, 4H; CH_2CH_2). The $^1\text{H NMR}$ spectrum is according to the one described in the literature.¹³⁶



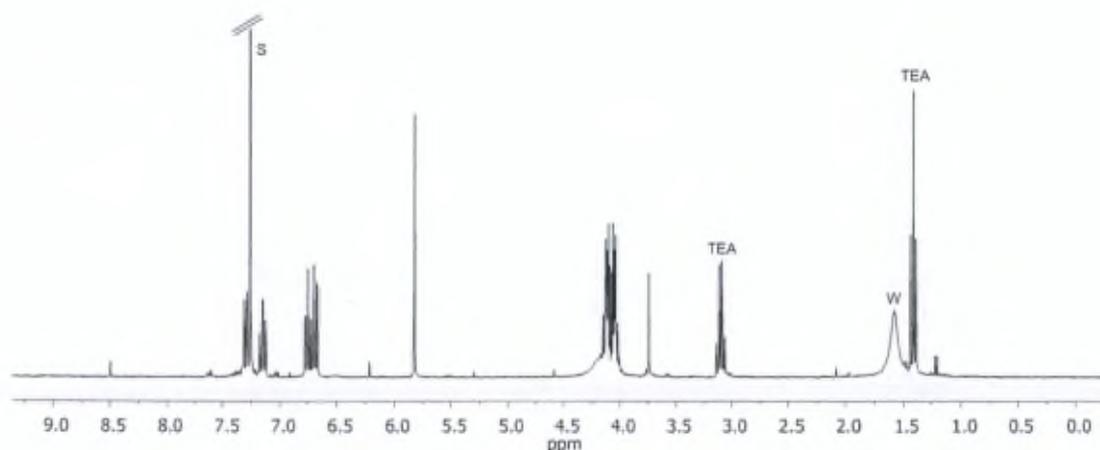
S = solvent, W = water,

Synthesis of 2-(1,3-dioxolan-2-yl)benzenamine



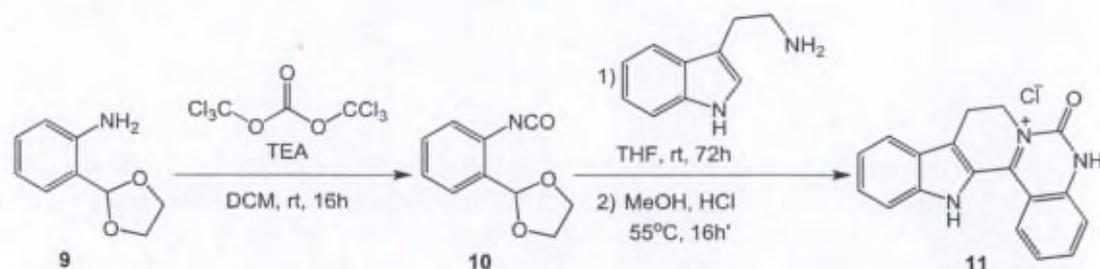
The 2-(2-nitrophenyl)-1,3-dioxolane **8** (0.610 g, 3.129 mmol) was dissolved in 2-propanol (45 mL), then triethylamine (1.7 mL, 12.096 mmol), 10 % palladium on carbon (0.029 g, 5% m/m) were added and the suspension stirred under a hydrogen atmosphere (2 barr) for 3h. The suspension was filtered through celite and the filtrate was concentrated to give 2-(1,3-dioxolan-2-yl)benzenamine **9**. Yellow oil; 0.392 g (estimated by NMR because the product contains some triethylamine), yield: 76%. The compound is rather unstable and cannot be purified by flash chromatography on silicagel. Degradation may also occur if the compound is heated during evaporation or stored at rt.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.30 (dd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz; ArH), 7.15 (td, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz; ArH), 6.75 (td, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.1$ Hz; ArH), 6.68 (dd, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz; ArH), 5.83 (s, 1H; OCH), 4.35-3.95 (m, 6H; CH_2CH_2 , NH_2). The ^1H NMR spectrum is according to the one described in the literature.¹³⁶



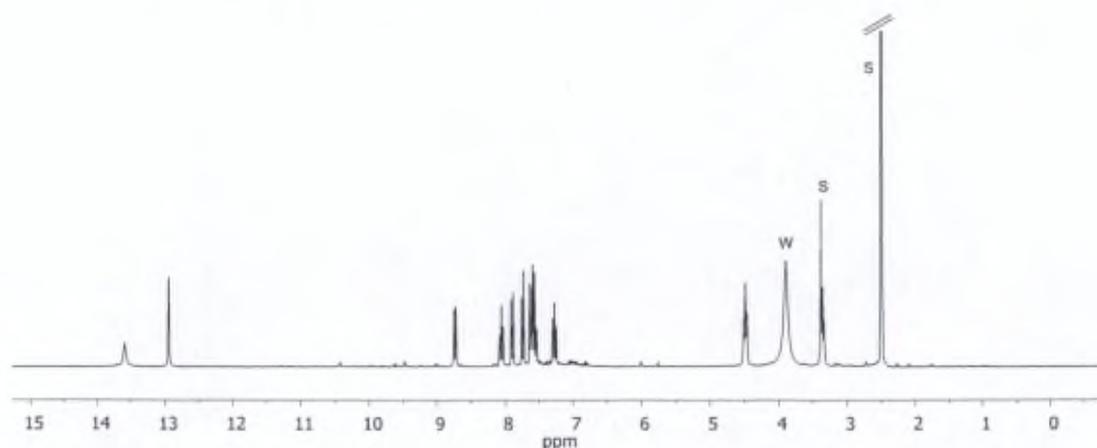
S = solvent, W = water, TEA = triéthylamine

Synthesis of 6-oxo-6,8,9,14-tetrahydro-5H-indolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-c]quinazolin-7-ium chloride



To a solution of triphosgene (0.634 g, 2.166 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) cooled to 0°C , a solution containing 2-(1,3-Dioxolan-2-yl)benzenamine **9** (0.728 g, 4.407 mmol) and triethylamine (1.580 mL g, 11.242 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added dropwise. The solution turns orange. After stirring at room temperature for 16h, tryptamine **4a** (0.704 g, 4.390 mmol) was added and the mixture stirred for 72h at rt. The mixture was then filtered to remove the triethylamine hydrochloride and the filtrate was washed with water (10 mL). After separation of the two phases, the organic phase was concentrated and the residue was dissolved in MeOH (5 mL). HCl (2.8M, 1.5 mL) was added and the mixture was stirred at 55°C for 16h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (5 mL) then filtered. A flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5) was performed on the resulting solid to afford the desired product **11**. Further purification was performed by trituration in CH_2Cl_2 . Red powder; 0.174 g, yield: 16%; mp 250°C (dec.);

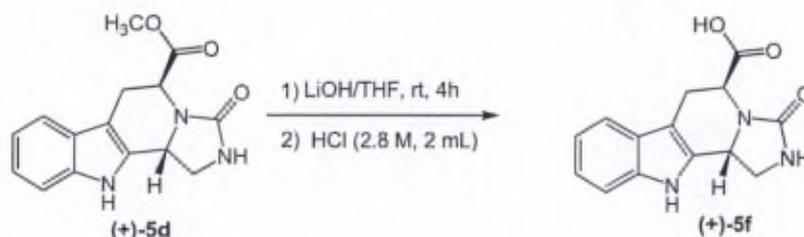
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 13.59 (s, 1H; NH), 12.95 (s, 1H; NH), 8.73 (d, 1H, J = 8.4 Hz; CONHCCH), 8.05 (m, 1H; CONHCCCH), 7.90 (d, 1H, J = 8.1 Hz; CH_2CCCH), 7.74 (d, 1H, J = 8.4 Hz; CNHCCH), 7.65-7.52 (m, 3H; ArH), 7.27 ppm (m, 1H; CH_2CCCHCH), 4.49 (t, 1H, J = 7.2 Hz; N^+CH_2), 3.36 (t, 1H, J = 7.5 Hz; $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ = 164.8 (CO), 156.1, 153.7, 152.4, 148.8, 141.3, 140.9, 139.8, 135.2, 134.5, 133.3, 131.9, 131.7, 125.9, 123.6, 120.5, 52.2 (NCH_2CH_2), 28.1 ppm (NCH_2CH_2); IR: ν = 3060, 1729 (C=O), 1519, 1256, 756 cm^{-1} ; ESI-MS: m/z found 228.27 [$\text{M}-\text{Cl}$] $^+$.



S = solvent, W = water

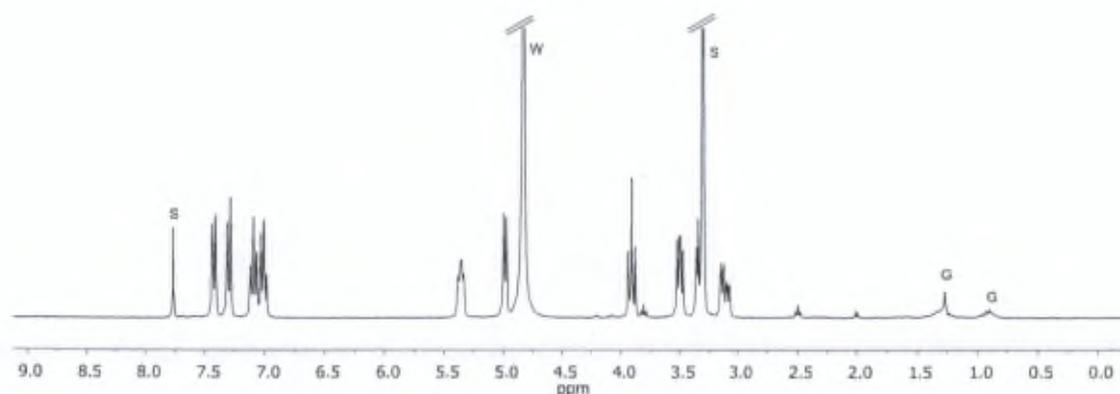
6.1.5 Modifications of the THBCI scaffold

Synthesis of (5S)-3-oxo-2,3,5,6,11,11b-hexahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole-5-carboxylic acid



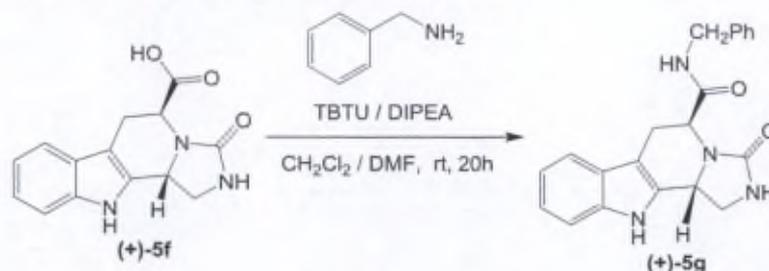
LiOH (1M, 0.400 mL) was added to a solution of (+)-5d (0.125 g, 0.438 mmol) in THF (6 mL) and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. Subsequently the mixture was evaporated to dryness, water was added (25 mL) and an extraction by CH_2Cl_2 (2×15 mL) was performed. The aqueous phase was then acidified with HCl (2.8 M, 2 mL) and the product was extracted with AcOEt (4×25 mL). The combined organic layers were washed with water, dried on a WA filter and then concentrated to afford the desired acid (+)-5f. White powder; 0.108 g, yield: 90%; mp 273 °C (dec); HPLC Purity: 100%;

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 1:4): δ = 7.42 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NHCCCH), 7.30 (d, 1H, J = 8.1 Hz; NHCCH), 7.10 (m, 1H; NHCCH), 7.01 (m, 1H; NHCCCH), 5.36 (m, 1H, NHCH_2CH), 4.99 (d, 1H, J = 7.2 Hz; NCHCO), 3.91 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NHCHH), 3.50 (dd, 1H, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, NHCHH), 3.34 (m, 1H; COCHCHH), 3.11 ppm (ddd, 1H, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, $J_3 = 1.8$ Hz; COCHCHH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 1:4): δ = 174.5 (OCO), 163.6 (NCO), 137.9, 132.5, 127.8, 122.7, 120.0, 118.7, 112.0, 106.7, 52.0 (NCHCO), 51.5 (NHCH_2CH), 45.3 (NHCH_2), 23.7 ppm (COCHCH_2); IR (KBr): ν = 3373, 1679, 1651, 1443, 1243, 749 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$: 272.1035 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 272.1031 (error: -1.5 ppm); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +187.5$ ($c = 0.19$ in MeOH).



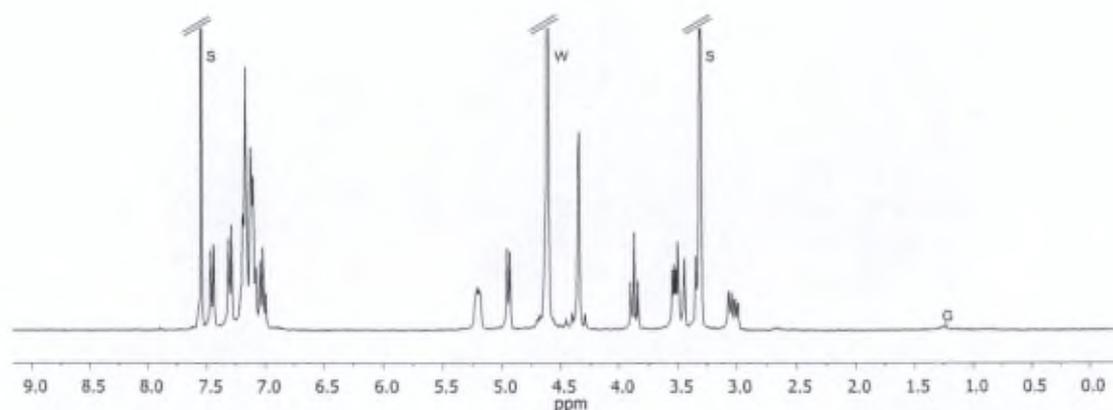
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of (5*S*)-*N*-benzyl-3-oxo-2,3,5,6,11,11*b*-hexahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indole-5-carboxamide



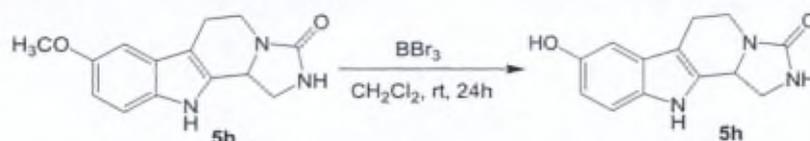
N,N-Diisopropylethylamine (0.032 mL, 0.184 mmol) is slowly added to a solution of (+)-**5f** (0.021 g, 0.077 mmol) and *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) (0.033 g, 0.102 mmol) in a mixture of anhydrous CH_2Cl_2 (1 mL) and anhydrous DMF (1 mL) under argon. The solution is stirred at room temperature for 1 h, then benzyl amine (0.012 mL, 0.110 mmol) is added drop wise. After reaction at room temperature for another 20 h, the solvents are evaporated in vacuum. The residue is redissolved in CH_2Cl_2 (15 mL) and washed with NH_4OH (2.5% aq., 3×5 mL). The organic layer is concentrated to dryness. The product (+)-**5g** is purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ as eluents (gradient from 97/3 to 90/10). Pale green powder; 0.018 g, yield: 67%; mp 138 °C; HPLC Purity: 99%;

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 1:1): δ = 7.45 (d, 1H, J = 7.8 Hz; ArH), 7.30 (d, 1H, J = 7.8 Hz; ArH), 7.23-7.06 (m, 6H; ArH), 7.02 (m, 1H; ArH), 5.21 (m, 1H, NHCH_2CH), 4.95 (d, 1H, J = 6.9 Hz; NCHCO), 4.42 - 4.26 (m, 2H; CH_2NHCO), 3.87 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NHCHHCH), 3.57-3.40 (m, 2H; NHCHHCH , COCHCHH), 3.03 ppm (ddd, 1H, $J_1 = 15.9$ Hz, $J_2 = 9.3$ Hz, $J_3 = 2.1$ Hz; COCHCHH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 4:1): δ = 171.0 (OCO), 162.4 (NCO), 137.9, 136.2, 130.5, 127.6 (2C), 126.3 (2C), 126.20, 126.16, 121.0, 118.2, 117.2, 110.3, 105.4, 51.5 (NCHCO), 49.9 (NHCH_2CH), 43.5 (NHCH_2), 42.3 (PhCH_2NH), 20.5 ppm (COCHCH_2); IR (KBr): ν = 3254, 1699, 1651, 1520, 1432, 734, 696 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$: 361.1665 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 361.1661 (error: -1.1 ppm); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +83.7$ ($c = 0.14$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 1:1).



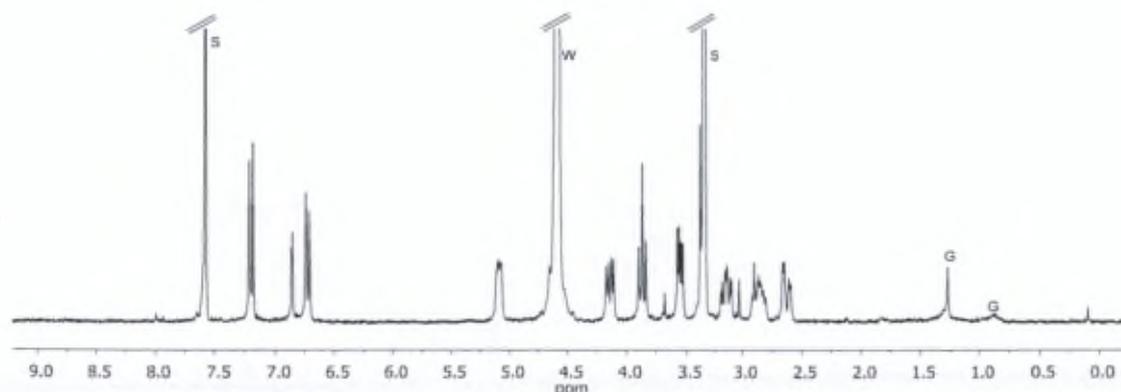
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 8-hydroxy-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one (**4h**)



To a solution containing **5b** (0.143 g, 0.555 mmol) in anhydrous dichloromethane (8 mL) at 0 °C, boron tribromide was added dropwise (0.150 mL, 1.584 mmol). The reaction was stirred for 30 min at 0 °C then 24 h at room temperature. A saturated NaHCO₃ (5 mL) solution was added afterwards, the mixture was stirred for 5 min, then the pH was adjusted at 6 using HCl_{aq}. The mixture was concentrated to dryness, then redissolved in MeOH, filtrated and concentrated in vacuo. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 97/3 to 85/15) to obtain the desired product **5h** in quantitative yield. Brown powder; 0.135 g, yield: quantitative; mp 152 °C (dec); HPLC Purity: 91%;

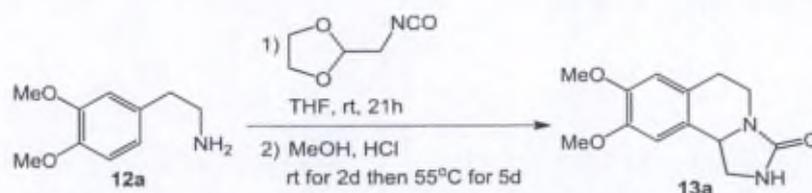
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 7.16 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz; OCCHCH), 6.82 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz; OCCHC), 6.69 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz; OCCHCH), 5.05 (m, 1H; NCH), 4.10 (dd, 1H, *J*₁ = 5.7 Hz, *J*₂ = 13.5 Hz; NCHH), 3.83 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.52 (dd, 1H, *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz; NCHCHH), 3.11 (m, 1H; NCHH), 2.82 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.59 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.9, 150.3, 133.9, 130.4, 127.2, 111.4, 111.1, 106.9, 101.9, 52.1 (NCH), 43.1 (NCHCH₂), 38.5 (NCH₂), 19.3 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3403-3237, 2160, 2030, 1976, 1636, 1616, 1268, 1186, 790 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₃H₁₄N₃O₂: 244.1086 [M+H⁺]; found: 244.1080 (error: -2.5 ppm).



S = solvent, W = water, G = grease

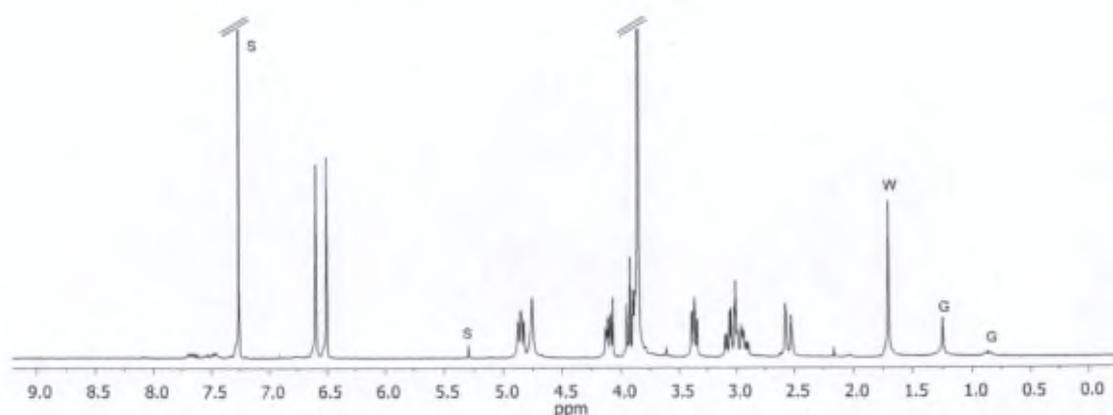
6.1.6 Synthesis of tetrahydroisoquinoline derivatives (THIQI)

Synthesis of 8,9-dimethoxy-1,5,6,10b-tetrahydroimidazo[5,1-a]isoquinolin-3(2H)-one



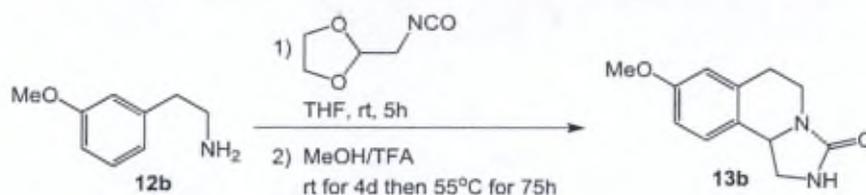
2-(3,4-dimethoxyphenyl) ethylamine (**12a**) (0.270 mL, 1.600 mmol) was added dropwise to a solution of isocyanate **2a** (theor. 1.960 mmol) in anhydrous THF (30 mL) prepared according to the general procedure. After reaction for 21 h the solvent was evaporated in vacuum and the product was solubilised in MeOH (25 mL). HCl (2.8 M, 5 mL) was added and the reaction was stirred at ambient temperature for 2 days then at 55 °C for 5 days. The reaction mixture was concentrated in vacuum. The dry residue is dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL) and was washed with a saturated NaHCO₃ solution (40 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) then the combined organic layers were washed with water (150 mL) dried on a WA filter and concentrated to dryness. The solid was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1:1) then CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 98/2 to 90/10) to afford compound **13a**. Grey powder; 0.233 g, yield: 59%; mp 167-170°C; HPLC Purity: 96%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.60 (s, 1H; ArH), 6.50 (s, 1H; ArH), 4.86 (m, 1H; NCH), 4.76 (bs, 1H; NH), 4.10 (m, 1H; NCHH), 3.70-4.00 (m, 7H; NHCHH, OCH₃, OCH₃), 3.37 (m, 1H; NHCHH), 3.16-2.85 (m, 2H; NCHH, NCH₂CHH), 2.55 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 161.7 (CO), 148.29, 148.27, 128.1, 126.9, 112.0, 107.9, 56.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 54.8 (NCH), 46.6 (NHCH₂), 38.2 (NCH₂CH₂), 27.3 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3368, 2930, 1690 (C=O), 1257 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₃H₁₇N₂O₃: 249.1239 [M+H⁺]; found: 249.1234 (error: -2.0 ppm). The ¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) is in accordance with the one described in the literature.¹⁴¹



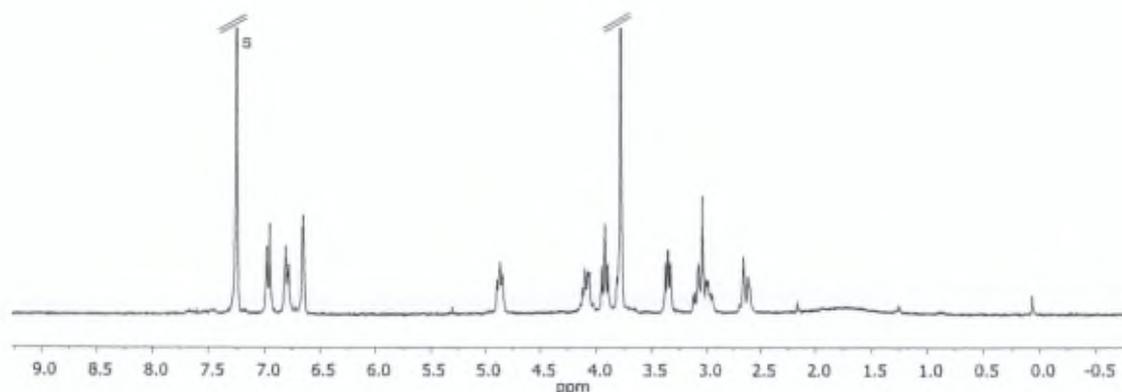
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 8-methoxy-1,5,6,10b-tetrahydroimidazo[5,1-a]isoquinolin-3(2H)-one



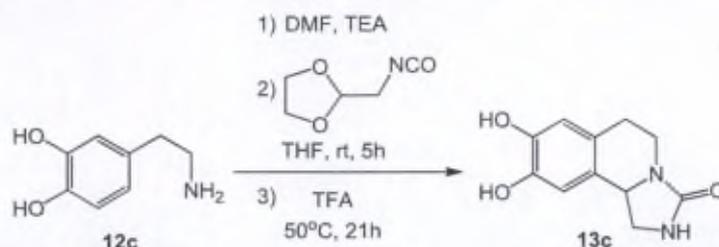
2-(3-methoxyphenyl)ethylamine **12b** (0.340 mL, 2.334 mmol) was added dropwise to a solution of isocyanate **2a** (theor. 2.718 mmol) in anhydrous THF (30 mL), prepared according to the general method. After reaction for 5 h the solvent was evaporated in vacuum and the product was solubilised in MeOH/TFA (2/1, 22.5 mL). The reaction was stirred at room temperature for 4 days and at 55 °C for 75 h, but only the imidazolone was obtained. Methanol was evaporated and TFA (1 mL) was added. The mixture was stirred at 55 °C for 4 h, controlled by NMR then concentrated in the presence of diethyl ether. The solid residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (50 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) then the combined organic layers were washed with water (150 mL) dried on a WA filter and concentrated to dryness. The solid was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/acetone (gradient from 80:20 to 60:40) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford compound **13b**. Grey powder; 0.304 g, yield: 60%; mp 154-156°C; HPLC Purity: 99%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.97 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz; OCCHCH), 6.80 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz; OCCHCH), 6.66 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz; OCCHC), 4.87 (m, 1H; NCH), 4.09 (m, 1H; NCHH), 3.93 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 8 Hz, NHCHH), 3.79 (s, 3H; CH₃), 3.36 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz; NHCHH), 3.16-2.90 (m, 2H; NCHH, NCH₂CHH), 2.63 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25⁰): δ = 161.8 (C=O), 158.6 (CH₃OC), 136.0 (OCCHC), 128.6 (OCCHCC), 126.2 (OCCHCH), 114.0 (OCCHC), 113.4 (OCCHCH), 55.4 (OCH₃), 54.7 (NCH), 46.7 (NHCH₂), 38.0 (NCH₂CH₂), 28.1 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3202, 2872, 1675 (C=O), 1263 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₂H₁₅N₂O₂: 219.1134 [M+H⁺]; found: 219.1129 (error: -2.3 ppm).



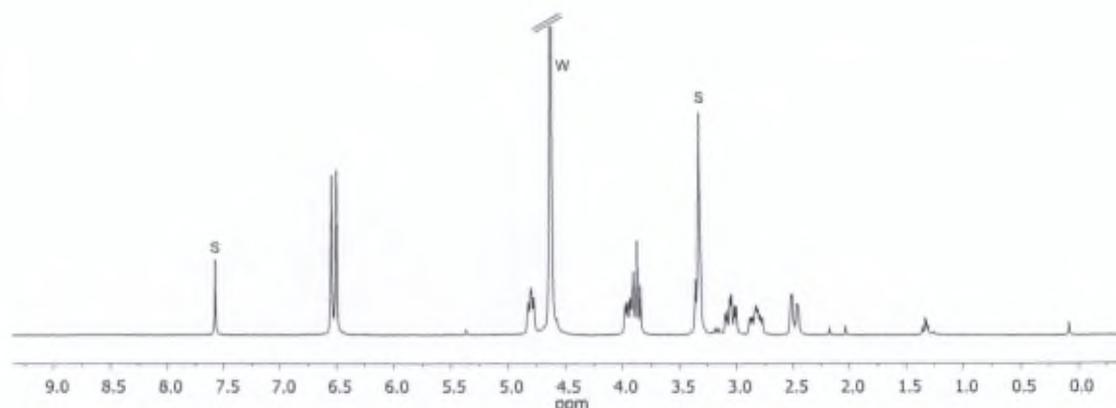
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 8,9-dihydroxy-1,5,6,10b-tetrahydroimidazo[5,1-a]isoquinolin-3(2H)-one



2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethan-1-amine hydrochloride **12c** (0.100 g, 0.527 mmol) was solubilized in 2 ml anhydrous DMF under argon and TEA (0.080 mL, 0.577 mmol) were added. The solution was stirred for 2 h and then was added, under argon, to the isocyanate **2a** (theor. 0.580 mmol) in anhydrous THF (10 mL), prepared according to the general method. After 5 h, the solvent was evaporated under vacuum and 2 mL of TFA were added to the residue. The reaction was stirred at 50 °C for 21 h. To concentrate the product, diethyl ether was added and several diethyl ether addition/evaporation cycles were made. The solid was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 95:5 to 90:10) to give a fraction of compound **13c** mixed with TEA·HCl (calculated yield = 67%). The compound was further purified by trituration in acetonitrile. Grey powder; 0.043 g, mp 185 °C (dec); HPLC Purity: 100%;

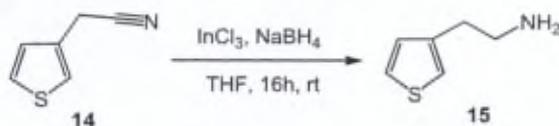
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD/CDCl₃; 1:1): δ = 6.53 (s, 1H; ArH), 6.48 (s, 1H; ArH), 4.78 (m, 1H; NCH), 3.78-3.98 (m, 2H; NHCHH, NCHH), 3.24-3.36 (m, 1H; NHCCH), 3.03 (m, 1H; NCHH), 2.80 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.47 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 163.4, 144.7, 127.9, 127.3, 126.0, 116.0, 112.0, 110.3, 55.4, 46.9, 38.8 ppm; IR: ν = 3100, 1669 (C=O), 1269 cm⁻¹; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₁H₁₃N₂O₃: 221.0926 [M+H⁺]; found: 221.0925 (error: -0.5 ppm).



S = solvent, W = water

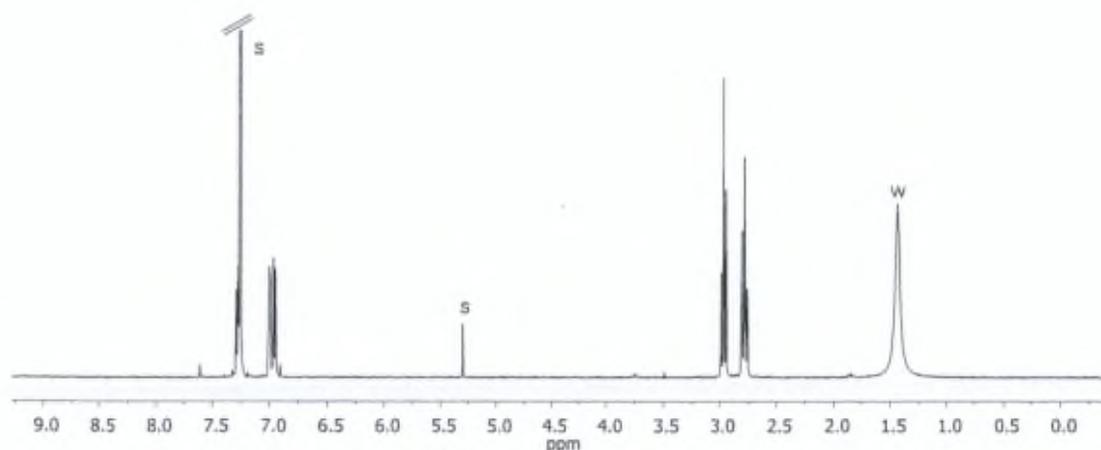
6.1.7 Synthesis of tetrahydrothienopyridine and tetrahydrobenzothienopyridine derivatives (THTPI, THBTPI)

Syntheses of 2-(3-Thienyl)ethanamine



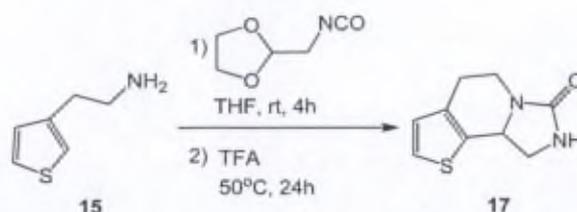
This compound was synthesized according to a procedure described in literature.¹⁴² An oven-dried round-bottom flask (25 mL) cooled under argon was fitted with a rubber septum and charged with a stir bar, anhydrous InCl_3 (0.681 g, 3.079 mmol), anhydrous THF (10 mL), and NaBH_4 (0.341 g, 9.014 mmol). The reaction was stirred at 25 °C for 1h, followed by the dropwise addition of 3-thiopheneacetonitrile (0.340 mL, 2.981 mmol), and the mixture was stirred at 25 °C for 16 h. The solution was quenched with 10 mL of 2.8 M hydrochloric acid, and the solution was refluxed for 2 h to dissolve remaining metal salts. The reaction mixture was cooled to 25°C, 5 mL of methanol were added, and the mixture was again refluxed for 2 h. The reaction mixture was then cooled to 25°C and filtered, and the methyl borate/methanol was removed from the filtrate by evaporation. The remaining acidic solution was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 10 mL), and the organic layers were discarded. The acidic aqueous layer was then basified with NaOH pellets to pH ≈ 11 and again extracted with CH_2Cl_2 (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried on a WA filter filtered, and evaporated under vacuum to afford 2-(3-thienyl)ethanamine **15**. Yellowish oil; 0.250 g, yield: 67%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.20-7.30 (m, 1H; ArH), 7.00 (m, 1H; ArH), 6.95 (m, 1H; ArH), 2.96 (t, 2H; J = 6.6 Hz, CH_2), 2.78 (t, 2H; J = 6.6 Hz, CH_2), 1.45 ppm (bs, 2H; NH_2). The $^1\text{H NMR}$ spectrum was according to literature.¹⁴²



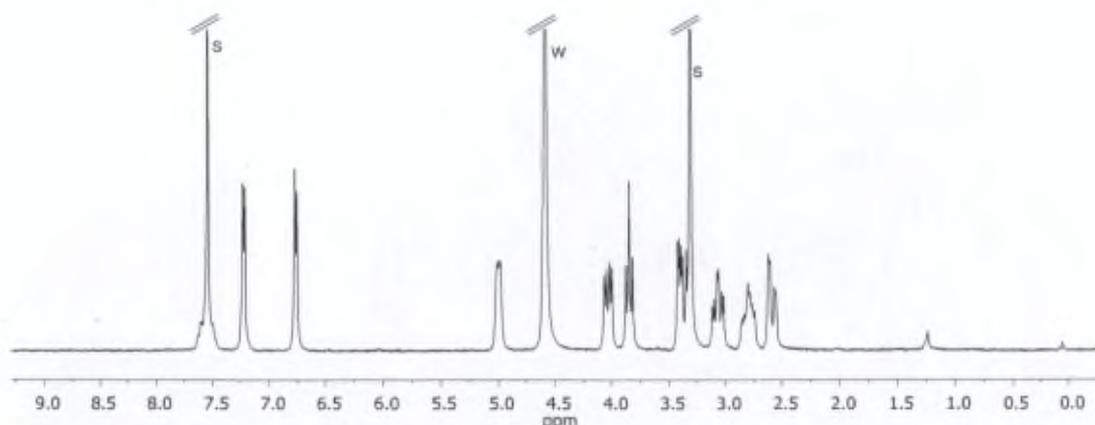
S = solvent, W = water

Synthesis of 4,5,9,9a-tetrahydroimidazo[1,5-a]thieno[2,3-c]pyridin-7(8H)-one



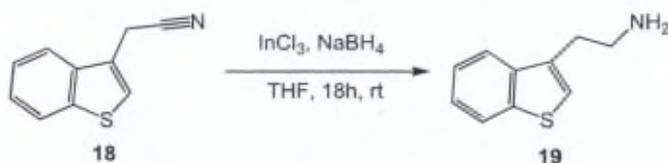
2-(3-thienyl)ethanamine **15** (0.249 g, 1.957 mmol) was added under argon to the isocyanate **2a** (theor. 2.401 mmol) in anhydrous THF (40 mL), prepared according to the general method. After reaction for 4 h, the solvent was evaporated under vacuum and the urea was partially purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 97:3 to 90:10). This step proceeded with a yield of 36% for the urea derivative (estimated using the NMR spectra of fractions of different purities). A fraction containing the urea (quantity estimated by NMR: 0.138 g, 0.537 mmol) and OPh₃ was collected and 5 mL of TFA were added to it. The reaction was stirred at 50 °C for 24 h then concentrated under vacuum by repetitive adding of Et₂O followed by evaporation. The solid was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (50/50) then CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (9/9/1) to afford the desired compound **17**. White powder; 0.048 g, yield: 46% (calculated for the cyclisation step); mp 176 °C; HPLC Purity: 100%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 1:1): δ = 7.22 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz; ArH), 6.76 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz; ArH), 5.00 (m, 1H; NCH), 4.04 (dd, 1H, *J*₁ = 6.0 Hz, *J*₂ = 13.4 Hz; NCHH), 3.85 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz; NHCHH), 3.40 (dd, 1H, *J*₁ = 3.6 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz; NHCHH), 3.07 (m, 1H; NCHH), 2.79 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.58 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.0, 135.4, 135.0, 127.7, 123.9, 54.3, 46.9, 38.4, 24.6 ppm; IR (KBr): ν = 3210, 2946, 2901, 2392, 1687 (C=O), 1275, 720 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₉H₁₁N₂OS: 195.0592 [M+H⁺]; found: 195.0591 (error: -0.5 ppm).



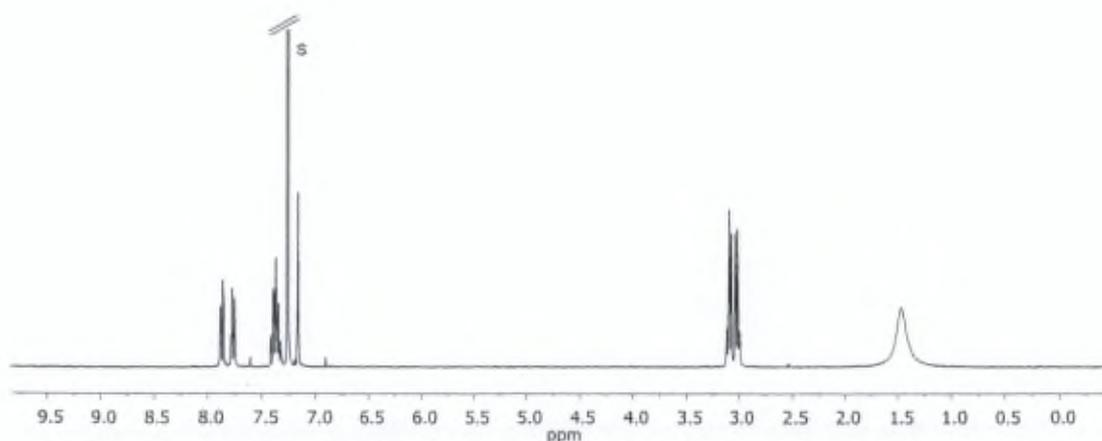
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 2-(benzo[b]thiophen-3-yl)ethan-1-amine



This compound was synthesized according to a procedure described in literature.¹⁴² An oven-dried round-bottom flask (25 mL) cooled under argon was fitted with a rubber septum and charged with a stir bar, anhydrous InCl_3 (0.676 g, 3.056 mmol), anhydrous THF (10 mL), and NaBH_4 (0.315 g, 8.304 mmol). The reaction was stirred at 25 °C for 1h, followed by the dropwise addition of 2-(benzo[b]thiophen-3-yl)acetonitrile **18** (0.441 mg, 2.545 mmol), and the mixture was stirred at 25 °C for 18 h. The solution was quenched with 10 mL of 2.8 M hydrochloric acid, and the solution was refluxed for 2 h to dissolve remaining metal salts. The reaction mixture was cooled to 25°C, 5 mL of methanol were added, and the mixture was again refluxed for 2 h. The reaction mixture was then cooled to 25°C and filtered, and the methyl borate/methanol was removed from the filtrate by evaporation. The remaining acidic solution was extracted with CH_2Cl_2 (3×10 mL), and the organic layers were discarded. The acidic aqueous layer was then basified with NaOH pellets to $\text{pH} \approx 11$ and again extracted with AcOEt (3×30 mL). The combined organic layers were dried on a WA filter filtered, and evaporated under vacuum to afford 2-(benzo[b]thiophen-3-yl)ethan-1-amine **19**. Yellowish oil; 0.320 g, yield: 71%.

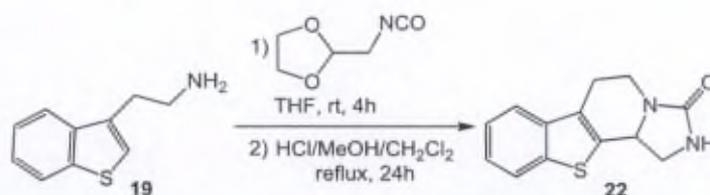
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.87$ (m, 1H; ArH), 7.76 (m, 1H; ArH), 7.43-7.31 (m, 2H; ArH), 7.16 (s, 1H; S-CH), 3.05 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.47 ppm (bs, 2H; NH_2). The ^1H NMR spectrum was according to literature.¹⁹⁰



S = solvent

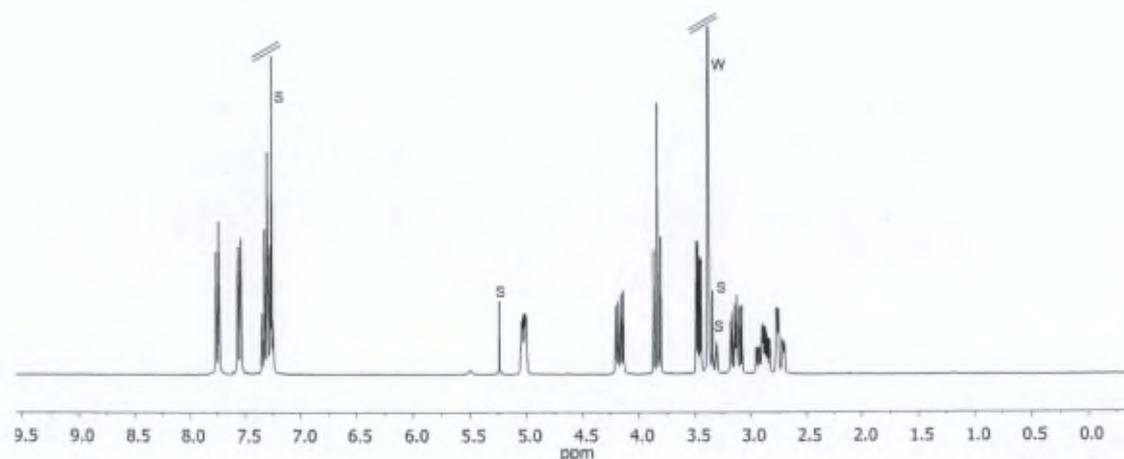
¹⁹⁰ Enfange, S. M. N.; Mash, D. C.; Khare, A. B.; Ouyang, Q. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4486-4491.

Synthesis of 1,5,6,11b-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-c]imidazo[1,5-a]pyridin-3(2H)-one

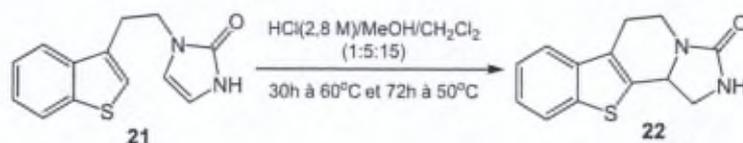


2-(benzothiophen-3-yl)ethan-1-amine **19** (0.320 g, 1.805 mmol) was added under argon to the isocyanate **2a** (theor. 2.013 mmol) in anhydrous THF (20 mL), prepared according to the general method. After reaction for 4 h, the solvent was evaporated under vacuum and the residue was dissolved in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1, 15 mL). HCl (2.8M, 15 mL) was then added to the mixture. The reaction was stirred at reflux for 24 h then concentrated under vacuum. The solid was purified several times by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (50/50) then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$ (10/10/1) but the desired compound **22** could not be entirely separated from the triphenylphosphineoxide. The synthesis could be improved by stopping the reaction at the imidazolone intermediate (TFA/MeOH = 3:27, see synthesis of imidazolone **21**) which is easier to separate from the triphenylphosphineoxide, followed by cyclisation using MeOH/HCl. White powder; 0.129 g, yield: (56%) - calculated based on the NMR spectrum of different fractions; mp 236 °C;

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 10:1): δ = 7.45 (dd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz; SCCHCH), 7.55 (dd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz; SCCCH), 7.36-7.22 (m, 2H; SCCHCH, SCCCHCH), 5.03 ppm (m, 1H, SCH), 4.17 (dd, 1H, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 13.5$ Hz; NCHH), 3.83 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NHCHH), 3.47 (dd, 1H, $J = 3.9$ Hz, $J = 8.7$ Hz; NHCHH), 3.13 (ddd, 1H, $J_1 = 13.8$, $J_2 = 11.4$, $J_3 = 4.8$ Hz; NCHH), 2.88 (m, 1H; NCH_2CHH), 2.73 ppm (m, 1H; NCH_2CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 10:1): δ = 162.3 (CO), 138.7, 138.6, 135.8, 129.8, 124.8, 124.5, 122.7, 121.1, 54.4 (NCH), 45.9 (NHCH_2), 37.9 (NCH_2CH_2), 22.8 ppm (NCH_2CH_2); IR: ν = 3201, 2946, 1686 (C=O), 1251, 757 cm^{-1} ; ESI-MS: m/z found 511 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 755 [$3\text{M}+\text{Na}$] $^+$.



S = solvent, W = water

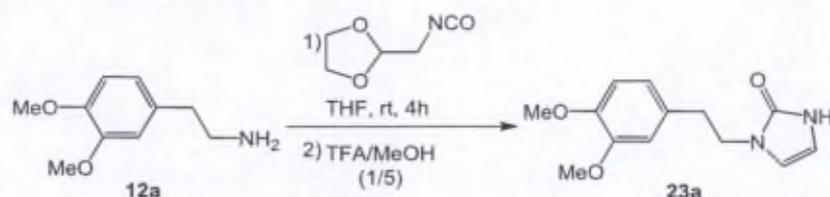
Synthesis of 1,5,6,11b-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-c]imidazo[1,5-a]pyridin-3(2H)-one by cyclisation of the imidazolone 21

Imidazolone **21** (0.050 g, 0.121 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH/CH₂Cl₂ = 3:1 (20 mL). HCl (1 mL, 2.8M) was added and the mixture was stirred for 30h at 60°C, then for 72h at 50°C.

After the reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 97:3 to 90:10) to afford the desired compound **22**. White powder; 0.053 g, yield: quant. The compound was further purified by trituration in acetonitrile. HPLC Purity: 99%;

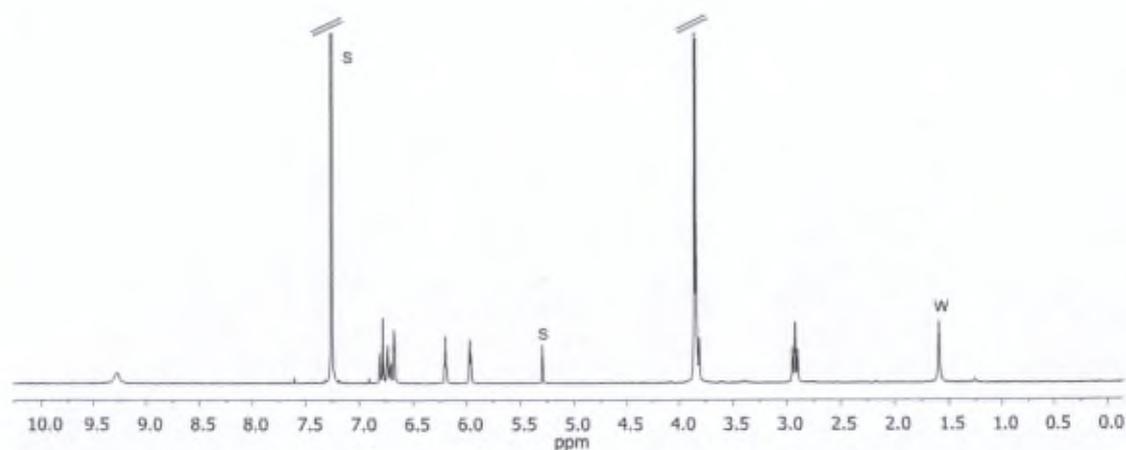
6.1.8 Synthesis of imidazolones

Synthesis of 1-(3,4-dimethoxyphenethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



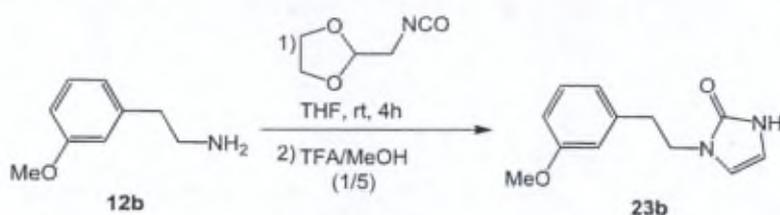
2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine **12a** (0.425 mL, 2.518 mmol) was added dropwise to a solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 2.718 mmol) in anhydrous THF (30 mL) under argon. After stirring at room temperature for 4 h, the solvent was removed and the residue was dissolved in MeOH (30 mL). TFA (6 mL) was added and the mixture was stirred at 50 °C for 96 h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (30 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 × 10 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford the desired product **23a**. White powder; 0.513 g, yield: 82%; mp 110 °C;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.27 (bs, 1H; NH), 6.83-6.65 (m, 3H; ArH), 6.20 (t, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 2.6 Hz; CHCH), 5.97 (t, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 2.6 Hz; CHCH), 3.90-3.78 (m, 8H; NCH₂, OMe), 2.92 ppm (t, 2H, *J* = 78.2 Hz; NCH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 154.6, 149.0, 147.8, 130.8, 120.9, 112.2, 112.0, 111.4, 107.8, 56.0, 45.0, 35.5 ppm; IR: ν = 3131, 2941, 1674 (C=O), 1516, 1027, 675 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 519 [2M+Na]⁺.



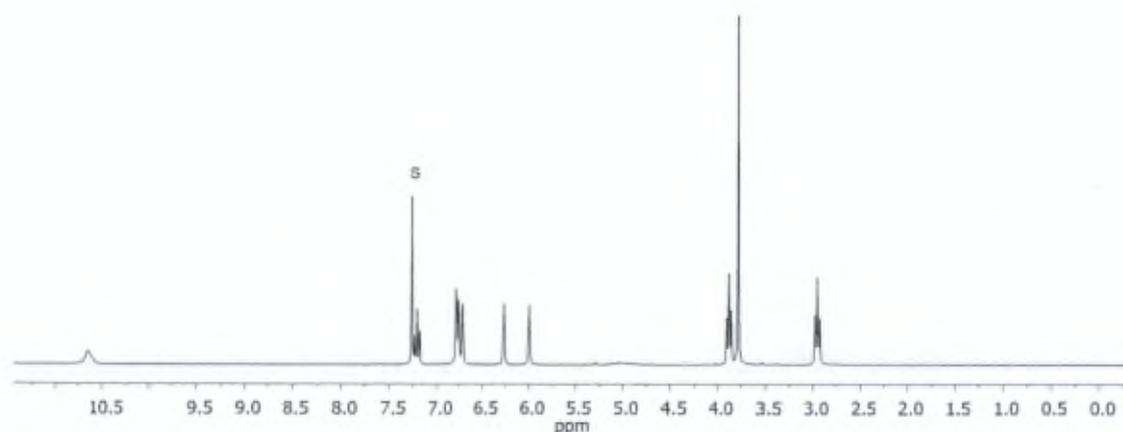
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(3-methoxyphenethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



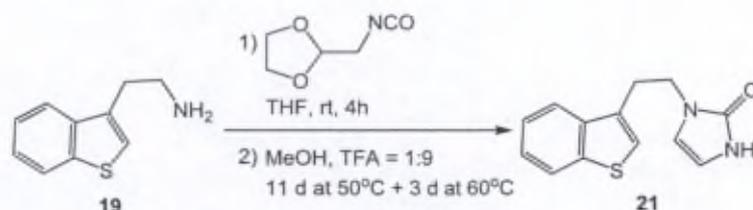
2-(3-methoxyphenyl)ethylamine **12b** (0.416 mL, 2.832 mmol) was added dropwise to a solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 3.020 mmol) in anhydrous THF (30 mL) under argon. After stirring at room temperature for 4 h, the solvent was removed and the residue was dissolved in MeOH (30 mL). TFA (6 mL) was added and the mixture was stirred at 50 °C for 120 h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (30 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 × 10 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford the desired product **23b**. White powder; 0.440 g, yield: 71%; mp 108 °C;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 10.66 (bs, 1H; NH), 7.21 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz; ArH), 6.83-6.67 (m, 2H; ArH), 6.26 (m, 1H; CHCH), 5.99 (m, 1H; CHCH), 3.87 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; ArH), 3.77 (m, 3H; OMe), 2.95 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 159.9, 154.7, 139.9, 129.7, 121.3, 114.5, 112.3, 111.8, 108.0, 55.3, 44.8, 36.1 ppm; IR: ν = 3171, 1662 (C=O), 1633, 1519, 1268, 788, 688 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 459 [2M+Na]⁺ 475 [2M+K]⁺, 677 [3M+Na]⁺.



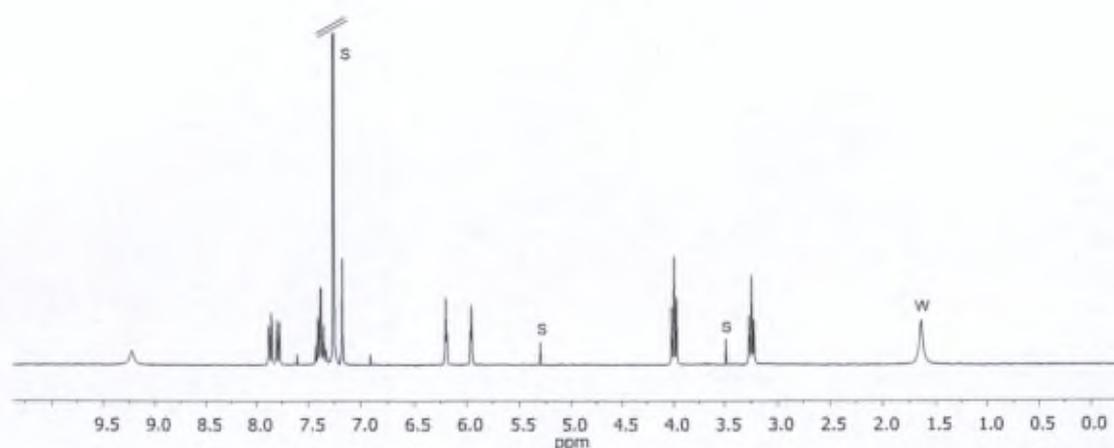
S = solvent

Synthesis of 1-(2-(benzo[b]thiophen-3-yl)ethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



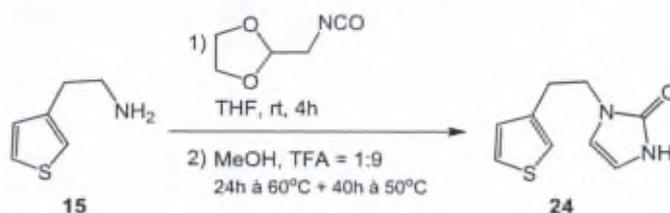
2-(benzo[b]thiophen-3-yl)ethylamine **19** (0.218 g, 1.230 mmol) was added dropwise to a solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 1.510 mmol) in anhydrous THF (20 mL) under argon. After stirring at room temperature for 5h, the solvent was removed and the residue was dissolved in MeOH (27 mL). TFA (3 mL) was added and the mixture was stirred at 50 °C for 11 d and at 60 °C for 3 d. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (50 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 × 20 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford the desired product **21**. White powder; 0.201 g, yield: 67%; mp 156 °C;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.22 (bs, 1H; NH), 7.86 (m, 1H; ArH) 7.79 (m, 1H; ArH), 7.45-7.31 (m, 2H; ArH), 7.17 (m, 1H; ArH), 6.19 (t, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 2.6$ Hz; CHCH), 5.95 (t, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 2.6$ Hz; CHCH), 3.99 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz; ArH), 3.24 ppm (t, 2H, $J = 6.9$ Hz; NCH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 154.7, 140.6, 138.7, 132.7, 124.5, 124.3, 123.2, 123.1, 121.5, 111.8, 108.1, 43.1, 28.8 ppm; IR: ν = 3113, 2824, 1666 (C=O), 1278, 723 cm⁻¹; ESI-MS: m/z found 511 [2M+Na]⁺.



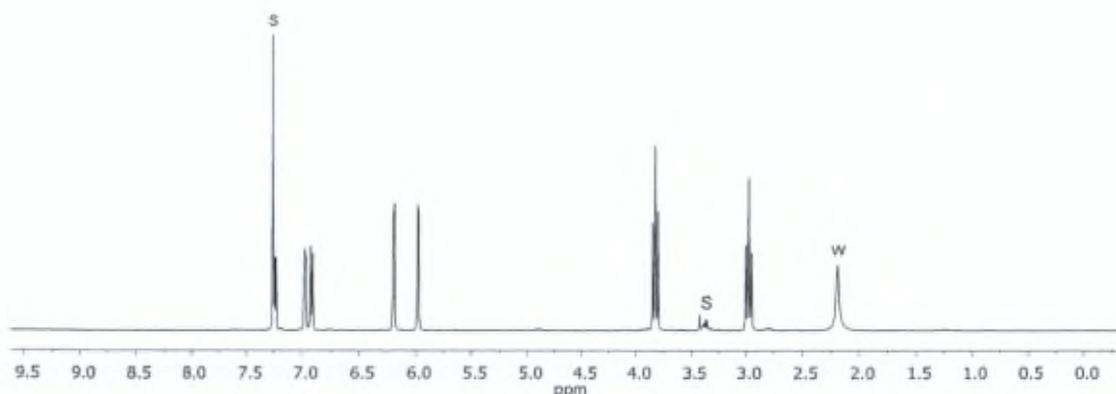
S = solvent

Synthesis of 1-(2-(thiophen-3-yl)ethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



2-(thiophen-3-yl)ethylamine **15** (0.526 mL, 4.135 mmol) was added dropwise to a solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 5.230 mmol) in anhydrous THF (30 mL) under argon. After stirring at room temperature for 4 h, the solvent was removed and the residue was dissolved in MeOH (54 mL). TFA (6 mL) was added and the mixture was stirred at 60 °C for 24 h. The temperature was then lowered at 50 °C because the cyclisation product **17** was beginning to form. The reaction was stopped when the urea substrate was converted (40 h). The solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (70 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 × 20 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford the desired product **24**. White powder; 0.278 g, yield: (35%) - calculated based on the NMR spectrum of different fractions; mp 154 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃: CD₃OD = 50:3): 7.24 (m, 1H; ArH), 6.97 (m, 1H; ArH), 6.91 (dd, 1H, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz; ArH), 6.19 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CHCH), 5.98 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz; CHCH), 3.83 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; ArH), 2.98 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 154.7, 138.5, 128.2, 126.0, 121.9, 111.7, 108.1, 44.1, 30.4 ppm; IR: ν = 3125, 1660 (C=O), 1285, 684 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 411 [2M+Na]⁺.



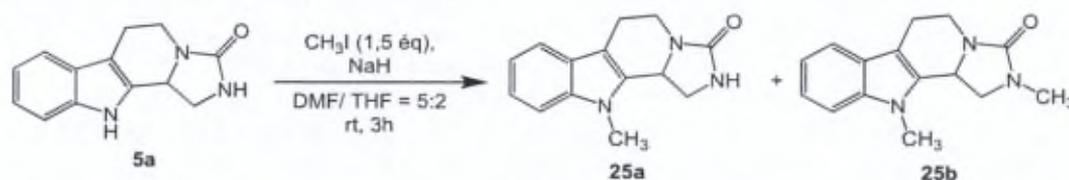
S = solvent, W = water

6.1.9 Synthesis of alkylated THBCI

General procedure for the alkylation of THBCIs with benzyl derivated alkylating agents.

THBCI (1 equiv.) was dissolved in a mixture of anhydrous THF/DMF and the solution was cooled to 0 °C. Then, NaH (1.5 - 5 equiv.; 60 % in mineral oil) was added and the mixture was stirred for 10 - 30 min at 0 °C to room temperature. An alkylating agent (1 - 5 equiv.) was added dropwise to the reaction mixture which was then stirred at room temperature for 1 h 30 min - 38 h. Excess NaH was then destroyed by the dropwise addition of water at 0 °C.

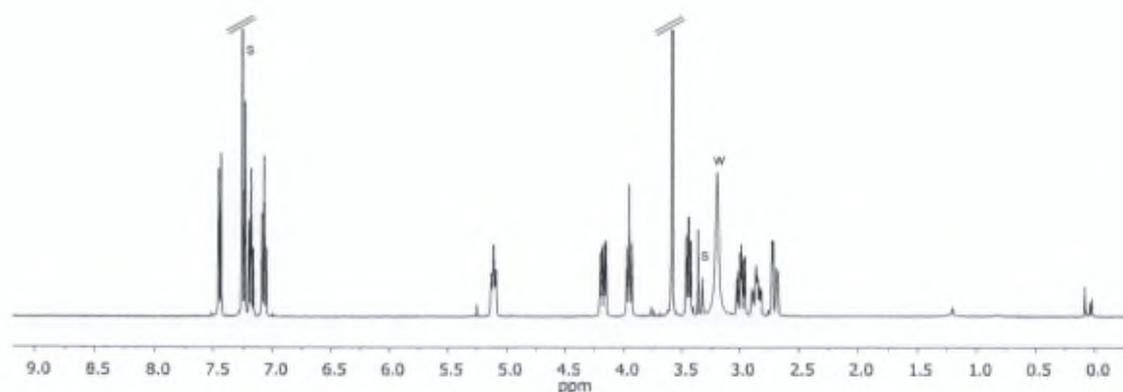
Synthesis of 11-methyl-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one and 2,11-dimethyl-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



To a solution of **5a** (0.350 g, 1.542 mmol) in a mixture of anhydrous DMF and THF (5 mL/2 mL), cooled to 0 °C, NaH 60% in mineral oil (0.135 g, 3.375 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and CH_3I (0.145 mL, 2.329 mmol) was added dropwise. The reaction was controlled by TLC. After 3h sodium acetate (0.188 g, 2.292 mmol) was added and the mixture stirred for 30 min. The reaction medium was then poured in an ice/water mixture (25 mL). The mixture was evaporated to dryness and the precipitate was washed with water (2 mL). The crude product was purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt} = 60/40$ then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, gradient from 96/4 to 92/8 to afford 3 fractions:

I. (25a): Pale yellow powder; 0.115 g; mp 240-242 °C; HPLC Purity: 93%;

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 11:1): $\delta = 7.45$ (d, 1H, $J = 6$ Hz; NCCCH), 7.28-7.22 (m, 1H; NCCHCH), 7.18 (m, 1H; NCCHCH), 7.07 (m, 1H; NCCCHCH), 5.11 (m, 1H; NCH), 4.18 (dd, 1H, $J_1 = 3.9$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz; NCHH), 3.96 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 7$ Hz; NCHCHH), 3.61 (s, 3H; CH_3), 3.45 (dd, 1H, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz; NCHCHH), 2.99 (m, 1H; NCHH), 2.85 (m, 1H; NCH_2CHH), 2.70 (m, 1H; NCH_2CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 11:1): $\delta = 162.2$ (CO), 137.3, 132.8, 126.5, 122.1, 119.5, 118.5, 108.9, 108.8, 52.0 (NCH), 44.6 (NCHCH_2), 38.6 (NCH_2), 30.3 (CH_3), 20.7 ppm (NCH_2CH_2); IR: $\nu = 3235, 2933, 1691$ (C=O), 1425, 1268, 734 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$: 242.1293 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 242.1296 (error: 1.2 ppm).



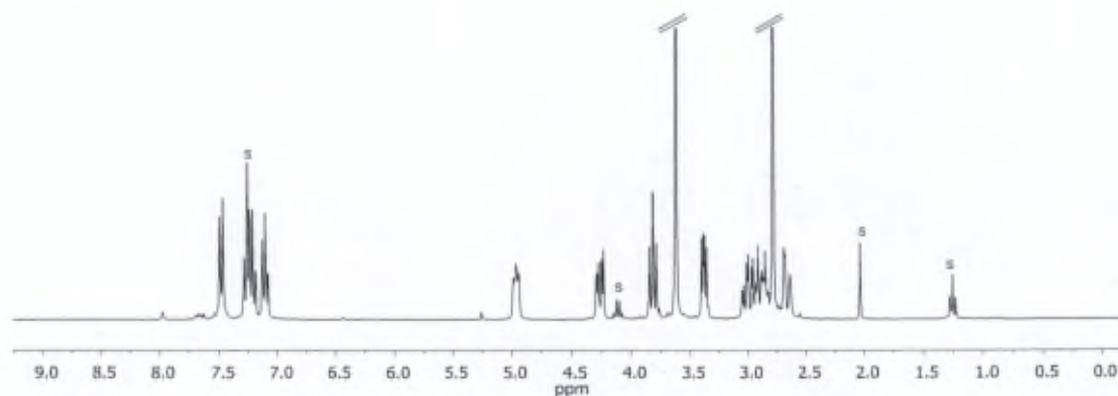
S = solvent, W = water

II. (25b): Beige powder; 0.071 g; mp 62 °C (dec.); HPLC Purity: 89%;

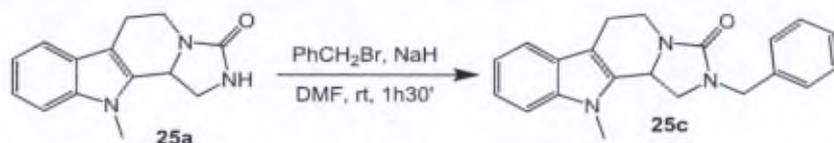
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.48 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NCCCH), 7.32-7.16 (m, 2H; NCCHCH, NCCHCH), 7.10 (m, 1H; NCCCHCH), 4.97 (m, 1H; NCH), 4.26 (m, 1H; NCHH), 3.82 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NCHCHH), 3.62 (s, 3H; ArNCH₃), 3.38 (dd, 1H, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 8.4 Hz; NCHCHH), 3.09-2.82 (m, 2H; NCHH, NCH₂CHH), 2.79 (s, 3H; CONCH₃), 2.66 (m, 1H; NCH₂CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 160.7 (CO), 137.4, 133.3, 126.7, 122.1, 119.6, 118.7, 109.4, 109.0, 51.3 (NCHCH₂), 49.4 (NCH), 39.6 (NCH₂), 31.1 (ArNCH₃), 30.4 (CONCH₃), 20.6 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2920, 2847, 1676 (C=O), 1433, 1262, 740 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}$: 256.1450 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 256.1445 (error: -2.0 ppm).

III. A fraction containing a mixture of the two products (**25a/25b** = 4 : 6) was also obtained (0.092 g).

The yields calculated using all 3 fractions were 41% for **25a** and 49% for **25b**.

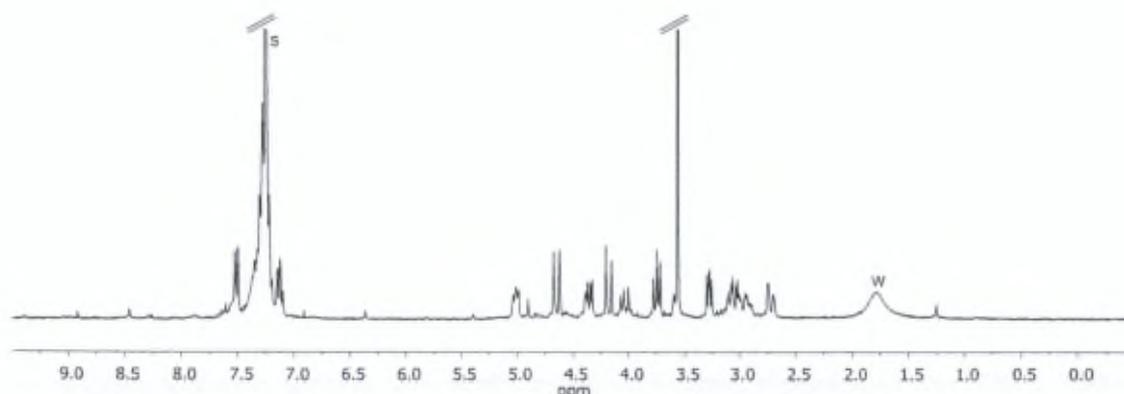


S = solvent

Synthesis of 2-benzyl-11-methyl-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one


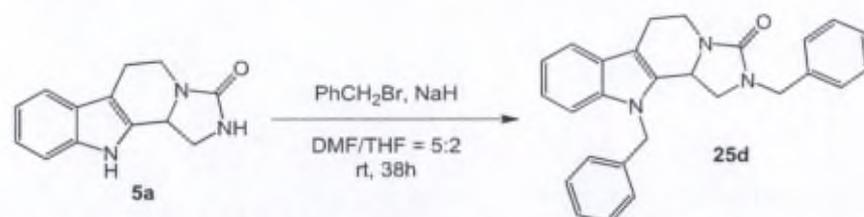
To a solution of **25a** (0.050 g, 0.207 mmol) in anhydrous DMF (2 mL), cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.019 g, 0.475 mmol) was added. The mixture was stirred for 10 min at room temperature and benzyl bromide (0.050 mL, 0.409 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 90 min, controlled by TLC, quenched with water (2 mL) and concentrated to dryness. The solid residue was then dissolved in dichloromethane (10 mL), filtered and evaporated in vacuo. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 97/3 to 95/5 to obtain the desired product **25c**. Yellow foam; 0.058 g, yield: 85%; mp 120-122 °C; HPLC Purity: 87%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.51 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.38-7.17 (m, 7H; ArH), 7.12 (m, 1H; ArH), 5.01 (m, 1H; CONCH), 4.64 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz; CHHPh), 4.35 (m, 1H; NCHHCH₂), 4.18 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CHHPh), 3.75 (m, 1H; NCHCHH), 3.57 (s, 3H; CH₃), 3.28 (dd, 1H, *J*₁ = 5.7, *J*₂ = 8.4 Hz; NCHCHH), 3.14-2.86 (m, 2H; NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.73 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.2 (CO), 137.4, 137.0, 133.2, 128.8 (2C), 128.1 (2C), 127.6, 126.7, 122.1, 119.6, 118.7, 109.3, 109.0, 49.5 (CONCH), 48.5 (NCHCH₂), 48.1 (CH₂Ph), 39.5 (NCH₂CH₂), 30.4 (CH₃), 20.7 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3349, 2918, 1692 (C=O), 1444, 1422, 1264, 1230, 751 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₁H₂₂N₃O: 332.1763 [M+H⁺]; found: 332.1764 (error: 0.3 ppm).



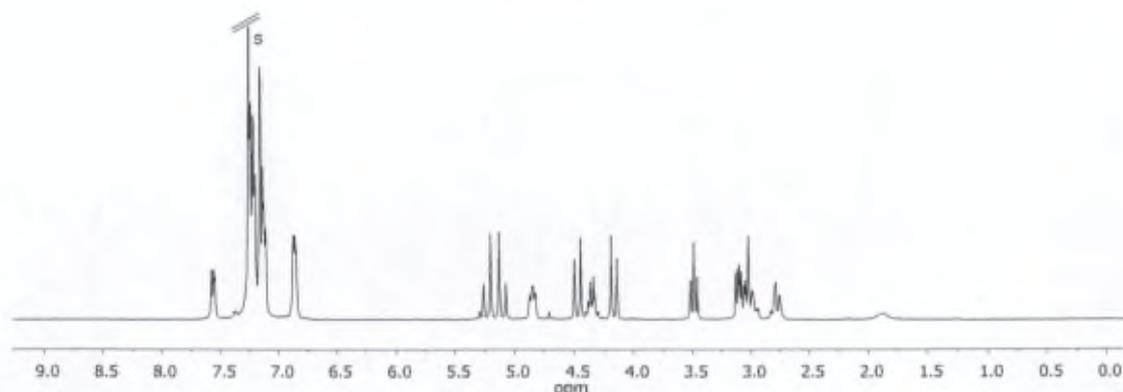
S = solvent, W = water

Synthesis of 2,11-dibenzyl-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



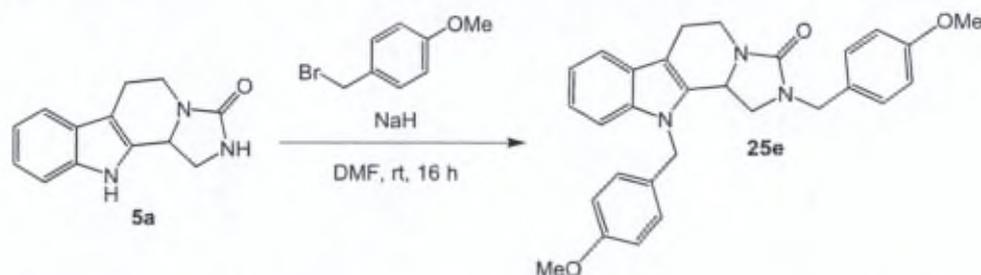
To a solution of **5a** (0.352 g, 1.552 mmol) in a mixture of anhydrous DMF and THF (5 mL / 2 mL), cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.136 g, 3.400 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and benzyl bromide (0.280 mL, 2.354 mmol) was added dropwise. The reaction was controlled by TLC. After 19 h more benzyl bromide (to a total of: 0.466 mL, 3.917 mmol) and NaH (to a total of: 0.203 g, 5.075 mmol) were added. After another 19 h the reaction mixture was poured in an ice/water mixture (10mL), concentrated to dryness and the precipitate was washed with water (2 mL). The crude product was purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ gradient from 95/5 to 50/50 to afford the desired product **25d**. White foam; 0.487 g, yield: 77%; mp 152-154 °C; HPLC Purity: 98%;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.56 (m, 1H; ArH), 7.35-7.00 (m, 11H; ArH), 6.86 (m, 2H; ArH), 5.23 (d, 1H, J = 17.4 Hz; CNCHHPh), 5.10 (d, 1H, J = 17.1 Hz; CNCHHPh), 4.85 (m, 1H; CONCH), 4.47 (d, 1H, J = 15.0 Hz; CONCHHPh), 4.36 (m, 1H, NCHHCH₂), 4.17 (d, 1H, J = 15.0 Hz; CONCHHPh), 3.49 (dd, 1H, J = 8.7 Hz; NCHCHH), 3.18-2.90 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.79 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 160.2 (CO), 137.4, 137.0, 136.9, 133.1, 129.1 (2C), 128.7 (2C), 128.1 (2C), 127.8, 127.5, 126.9, 125.9 (2C), 122.4, 119.9, 118.8, 110.3, 109.7, 49.6 (NCH), 48.4 (NCHCH₂), 48.0 (CONCH₂Ph), 47.4 (CNCH₂Ph), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3027, 2923, 1673 (C=O), 1433, 1253, 703 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$: 408.2076 [M+H⁺]; found: 408.2076 (error: 0 ppm).



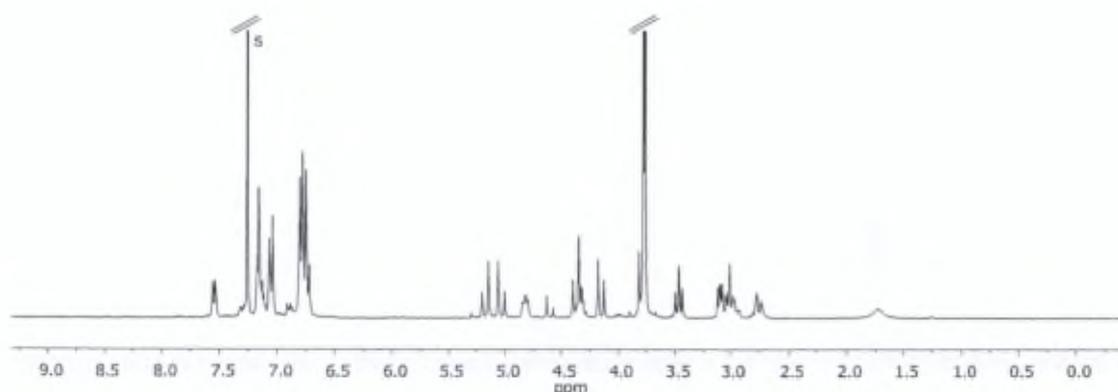
S = solvent

Synthesis of 2,11-bis(4-methoxybenzyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



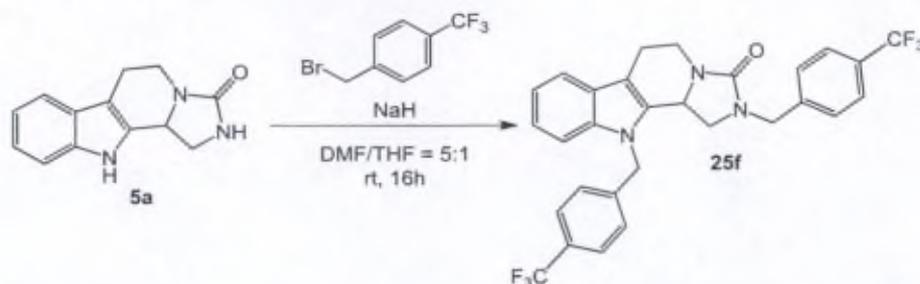
To a solution of **5a** (0.100 g, 0.440 mmol) in anhydrous DMF (3 mL), cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.058 g, 1.450 mmol) was added. The mixture was stirred for 10 min at room temperature and 4-methoxybenzyl bromide (0.220 mL, 1.509 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 16 h, quenched with HCl (2.8 M, 2 mL) at 0 °C and concentrated to dryness. The solid residue was then dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL), filtered and evaporated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 100/0 to 85/25 to obtain the desired product **25e**. White foam; 0.109 g, yield: 53%; mp 162-164 °C; HPLC Purity: 94%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.54 (m, 1H; ArH), 7.21-6.98 (m, 5H; ArH), 6.85-6.64 (m, 6H; ArH), 5.18 (d, 1H, *J* = 16.8 Hz; CNCHHPh), 5.03 (d, 1H, *J* = 16.8 Hz; CNCHHPh), 4.82 (m, 1H; CONCH), 4.43-4.26 (m, 2H; CONCHHPh, NCHHCH₂), 4.15 (d, 1H, *J* = 14.7 Hz; CONCHHPh), 3.80-3.73 (m, 6H; OCH₃), 3.47 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.15-2.88 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.75 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.2, 159.2, 159.1, 137.3, 133.2, 129.5 (2C), 129.0, 128.9, 127.2 (2C), 126.9, 122.3, 119.8, 118.7, 114.4 (2C), 114.1 (2C), 110.2, 109.7, 55.4 (2C, OCH₃), 49.6 (CONCH), 48.2 (NCHCH₂), 47.4 (CONCH₂Ph), 47.0 (CNCH₂Ph), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2939, 1684 (C=O), 1517, 1252, 1173, 1031 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₉H₃₀N₃O₃: 468.2287 [M+H⁺]; found: 468.2291 (error: 0.9 ppm).



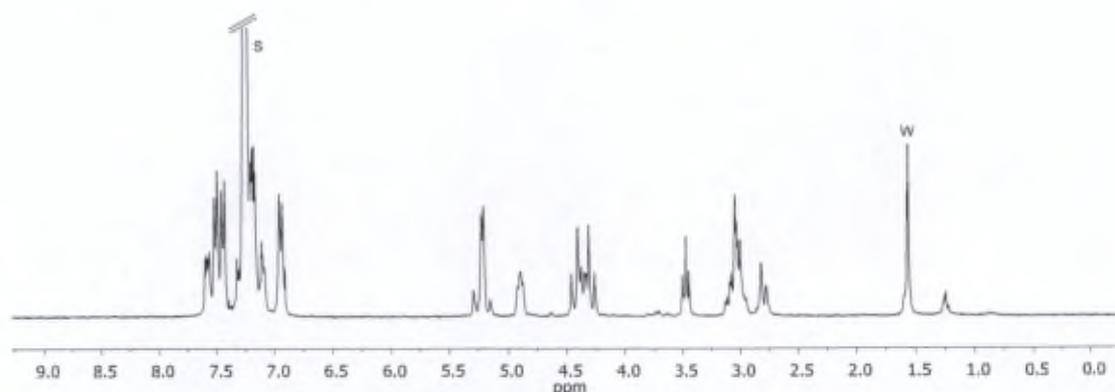
S = solvent

Synthesis of 2,11-bis(4-(trifluoromethyl)benzyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



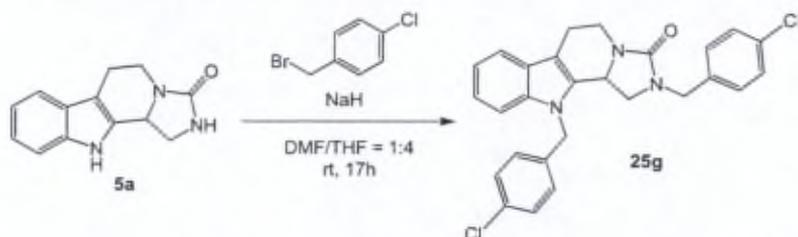
5a (0.200 g, 0.881 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (15 mL/3 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.105 g, 2.625 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.543 g, 2.272 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 16 h then concentrated in vacuum. The residue was redissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 97/3 to 95/5. Compound **25f** was further purified by trituration in an EtOH/H₂O mixture (0.5 mL/0.3 mL, × 2). White foam; 0.344 g, yield: 72%; mp 70 °C (dec.); HPLC Purity: 100%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.64-7.40 (m, 5H; ArH), 7.36-7.05 (m, 5H; ArH), 7.00-6.86 (m, 2H; ArH), 5.27 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz; CNCHHPh), 5.18 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz; CNCHHPh), 4.89 (m, 1H; CONCH), 4.50-4.22 (m, 3H; CONCH₂Ph, NCHHCH₂), 3.48 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.15-2.92 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.80 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.0 (CO), 141.1 (NCH₂C), 141.0 (NCH₂C), 137.3, 132.6, 130.3* (*J* = 32.5 Hz, CF₃C), 130.0* (*J* = 32.3 Hz, CF₃C), 128.3 (2C), 127.0, 126.12 (2C), 126.07 (q, 2C, *J* = 4.2 Hz, CF₃CCH), 125.8 (q, 2C, *J* = 3.8 Hz, CF₃CCH), 124.2* (*J* = 270 Hz, CF₃C), 123.9* (*J* = 270 Hz, CF₃C), 122.9, 120.3, 119.0, 110.9, 109.5, 49.5 (CONCH), 48.5 (NCHCH₂), 47.7 (CONCH₂Ph), 47.1 (CNCH₂Ph), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2920, 1693 (C=O), 1321, 1161, 1106, 1065, 1017, 744 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₉H₂₄N₃O₆: 544.1824 [M+H⁺]; found: 544.1826 (error: 0.4 ppm); *This chemical shift was determined using the ¹⁹F decoupled ¹³C NMR spectrum (100 MHz, CDCl₃) and the coupling constants were determined using the ¹³C NMR spectrum (100 MHz, CDCl₃).



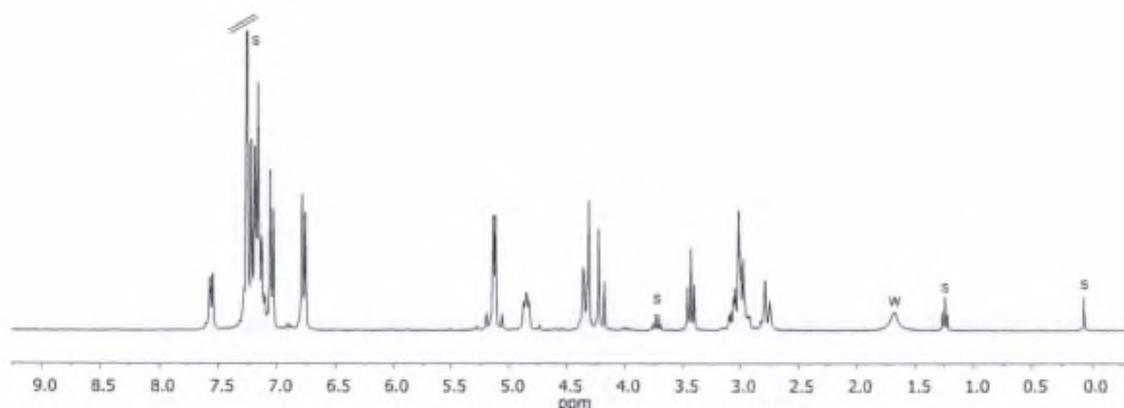
S = solvent, W = water

Synthesis of 2,11-bis(4-chlorobenzyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



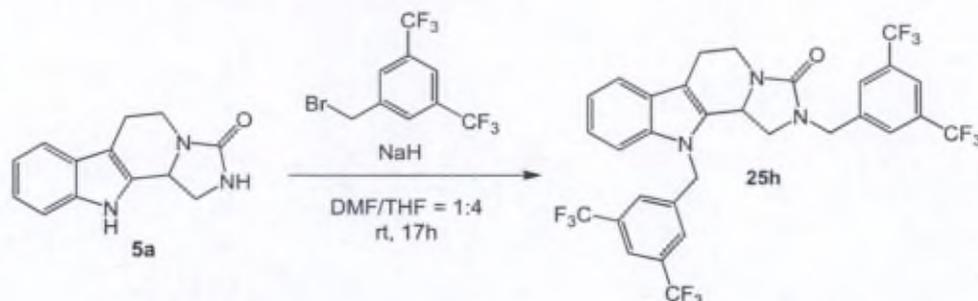
5a (0.049 g, 0.217 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (1 mL/ 4 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.024 g, 0.733 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 4-chlorobenzyl bromide (0.136 g, 0.660 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 17 h then concentrated in vacuum. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 98/2 to 90/10. The compound **25g** was further purified by trituration in EtOH (3 × 0.2 mL). White powder; 0.080 g, yield: 78 %; mp 79 °C (dec.); HPLC Purity: 99%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.56 (m, 1H; ArH), 7.38-7.08 (m, 7H; ArH), 7.04 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz; ArH), 6.77 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz; ArH), 5.18 (d, 1H, *J* = 17.1 Hz; CNCHHPh), 5.09 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz; CNCHHPh), 4.86 (m, 1H; CONCH), 4.41-4.27 (m, 2H; CONCHHPh, NCHHCH₂), 4.20 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHHPh) 3.44 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.11-2.89 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.77 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.0, 137.2, 135.5, 135.3, 133.7, 133.5, 132.7, 129.5 (2C), 129.2 (2C), 128.9 (2C), 127.2 (2C), 127.0, 122.7, 120.1, 118.9, 110.6, 109.5, 49.5 (CONCH), 48.3 (NCHCH₂), 47.4 (CONCH₂Ph), 46.8 (CNCH₂Ph), 39.4 (NCH₂CH₂), 20.7 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2914, 2852, 1688 (C=O), 1438, 1258, 1091, 800, 743 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₇H₂₄N₃OCl₂: 476.1296 [M+H⁺]; found: 476.1295 (error: -0.2 ppm).



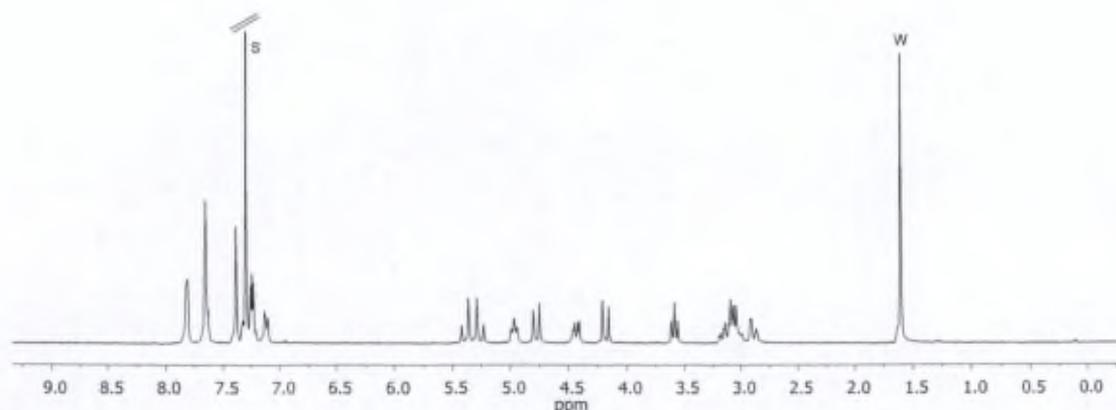
S = solvent, W = water

Synthesis of 2,11-bis(3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



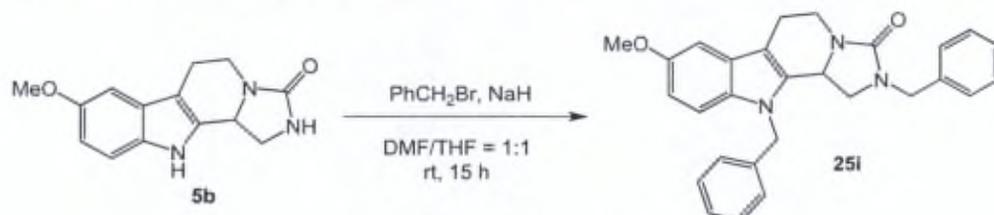
5a (0.049 g, 0.216 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (1 mL/4 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.028 g, 0.708 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.121 mL, 0.660 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 17 h then concentrated in vacuum. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/cyclohexane 90/10 followed by CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 100/0 to 90/10. The compound **25h** was further purified by trituration in EtOH (3 × 0.2 mL). White powder; 0.102 g, yield: 69%; mp 209 °C; HPLC Purity: 99%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (m, 2H; ArH), 7.67-7.55 (m, 3H; ArH), 7.34 (m, 2H; ArH) 7.23-7.15 (m, 2H; ArH), 7.13-7.03 (m, 1H; ArH), 5.35 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz; CNCHHPh), 5.22 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz; CNCHHPh), 4.93 (m, 1H; CONCH), 4.73 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz; CONCHHAr), 4.39 (m, 1H; NCHHCH₂), 4.14 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz; CONCHHAr), 3.54 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 8 Hz; NCHCHH), 3.17-2.93 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.84 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 159.7 (CO), 140.0, 139.8, 137.2, 132.7 (q, 2C, *J* = 34.5 Hz; CF₃C), 132.2 (q, 3C, *J* = 33.5 Hz; CF₃C, Cq), 128.0 (m, 2C, CF₃CCHCCH₂), 127.2, 126.0 (m, 2C, CF₃CCHCCH₂), 123.3, 123.1 (q, 2C, *J* = 271.3 Hz; CF₃), 123.0 (q, 2C, *J* = 271.1 Hz; CF₃), 122.1 (m, CF₃CCHCCF₃), 121.9 (m, CF₃CCHCCF₃), 120.8, 119.4, 111.6, 109.2, 49.4 (NCH), 49.3 (NCHCH₂), 47.7 (CONCH₂C), 46.9 (CHCNCH₂), 39.3 (NCH₂CH₂), 21.0 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2939, 1695(C=O), 1283, 1168, 1111, 734, 681 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₁H₂₂N₃O₁₂: 680.1571 [M+H⁺]; found: 680.1571 (error: 0 ppm).



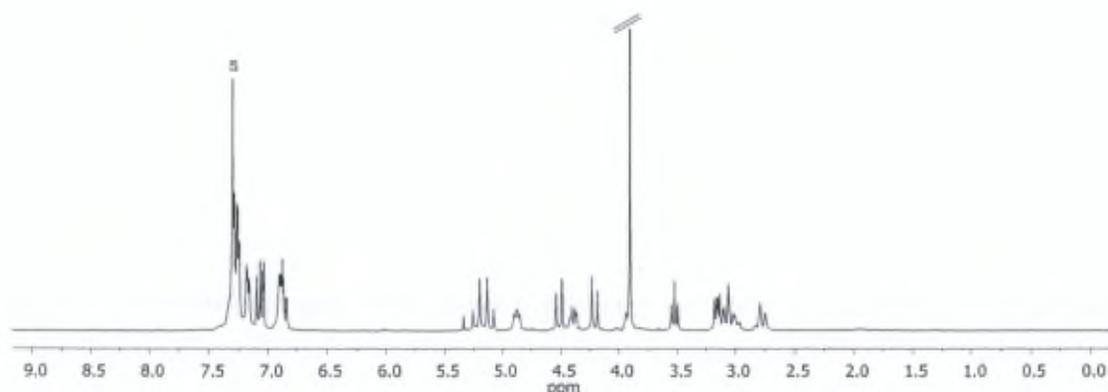
S = solvent, W = water

Synthesis of 2,11-dibenzyl-8-methoxy-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



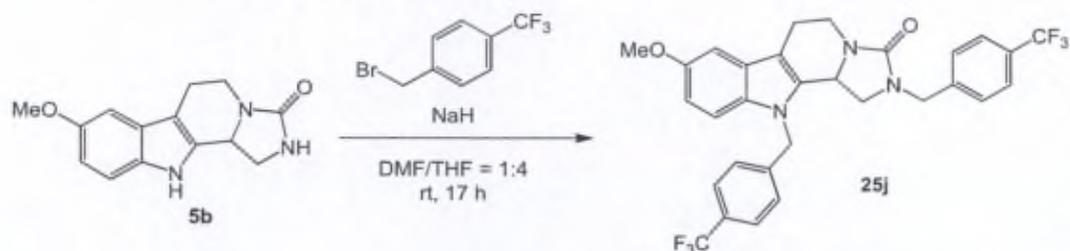
To a solution of **5b** (0.150 g, 0.583 mmol) in a mixture of anhydrous DMF and THF (5 mL/5 mL), cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.076 g, 1.900 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and benzyl bromide (0.215 mL, 1.759 mmol) was added dropwise. The reaction was controlled by TLC. After 15 h the reaction mixture was quenched with water (5 mL) and concentrated to dryness. The solid residue was then dissolved in dichloromethane (10 mL), filtered and washed with water (2 mL). The aqueous phase was extracted with dichloromethane (2 × 2 mL) and the combined organic layers were dried on anhydrous MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 95/5 to 90/10 to afford the desired product **25i**. White foam; 0.220 g, yield: 86%; mp 174-176 °C; HPLC Purity: 98%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.36-7.18 (m, 6H; ArH), 7.17-7.08 (m, 2H, ArH), 7.08-6.95 (m, 2H; ArH), 6.92-6.75 (m, 3H; ArH), 5.19 (d, 1H, *J* = 17.1 Hz; CNCHHPh), 5.06 (d, 1H, *J* = 17.1 Hz; CNCHHPh), 4.83 (m, 1H; CONCH), 4.47 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHHPh), 4.35 (m, 1H; CONCHHCH₂), 4.17 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHHPh), 3.86 (s, 3H; CH₃), 3.49 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.18-2.87 (m, 3H; NCHCHH, CONCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.73 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.2 (CO), 154.4, 137.2, 136.9, 133.8, 132.5, 129.0 (2C), 128.7 (2C), 128.1 (2C), 127.7, 127.5, 127.2, 125.9 (2C), 112.4, 110.5, 109.8, 100.7, 56.0 (CH₃), 49.6 (CONCH), 48.3 (NCHCH₂), 48.0 (CONCH₂Ph), 47.6 (NCH₂Ph), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2923, 1673 (C=O), 1480, 1430, 1214, 1159, 703 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₈H₂₈N₃O: 438.2182 [M+H⁺]; found: 438.2187 (error: 1.1 ppm).



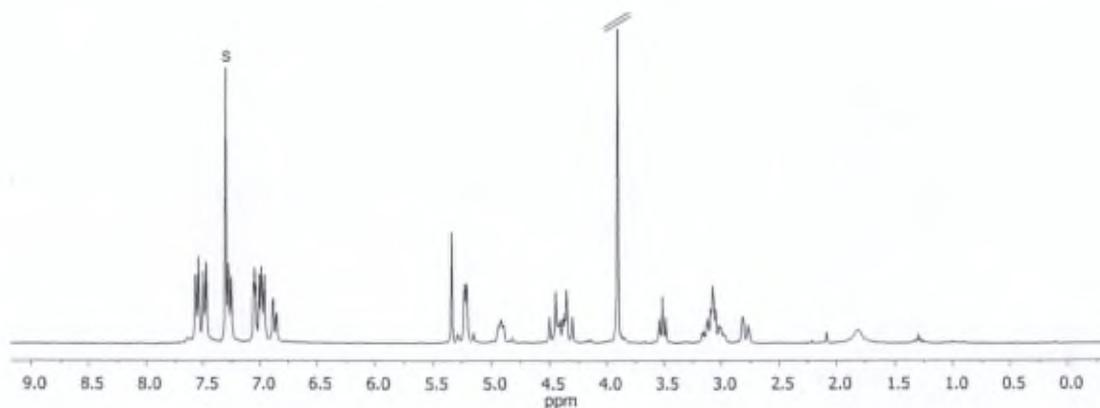
S = solvent

Synthesis of 8-methoxy-2,11-bis(4-(trifluoromethyl)benzyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



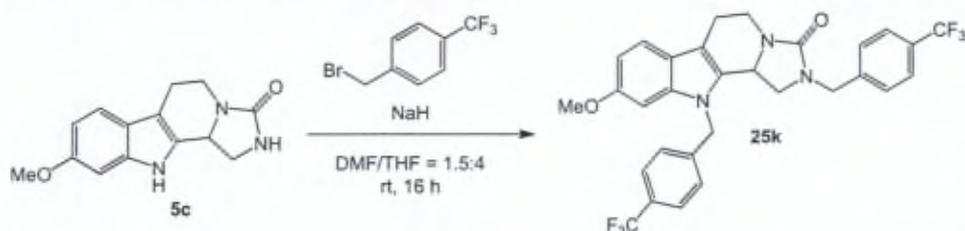
5b (0.036 g, 0.139 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (1 mL/4 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.016 g, 0.400 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 30 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.109 g, 0.456 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 17 h then concentrated in vacuum. The residue was redissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 98/2 to 90/10 to afford compound **25j**. Bright yellow powder; 0.068 g, yield: 85%; mp 67 °C (dec.); HPLC Purity: 92%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.51 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz; ArH), 7.44 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz; ArH), 7.22 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.04-6.89 (m, 4H; ArH), 6.82 (dd, 1H, *J*₁ = 9 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz; ArH), 5.22 (d, 1H, *J* = 18.0 Hz; CNCHHPh), 5.13 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz; CNCHHPh), 4.89 (m, 1H; CONCH), 4.50-4.23 (m, 3H; NCHHCH₂, CONCH₂Ph), 3.87 (s, 3H; CH₃), 3.47 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.15-2.90 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.75 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.0, 154.7, 141.2, 141.0, 133.3, 132.2, 130.2 (q, *J* = 32.6 Hz, CF₃C), 129.9 (q, *J* = 32.1 Hz, CF₃C), 128.2 (2C), 127.4, 126.2-125.9 (4C), 125.7 (q, 2C, *J* = 3.5 Hz, CF₃CCH), 124.2*(CF₃C), 123.9*(CF₃C), 112.8, 110.32, 110.29, 100.8, 56.0 (CH₃), 49.5 (CONCH), 48.4 (NCHCH₂), 47.6 (CONCH₂Ph), 47.1 (CNCH₂Ph), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2933, 1692 (C=O), 1321, 1106, 1065, 1017 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₂₇N₃O₂F₆: 574.1929 [M+H⁺]; found: 574.1931 (error: 0.3 ppm); *This chemical shift was determined using the ¹⁹F decoupled ¹³C NMR spectrum (100MHz, CDCl₃).



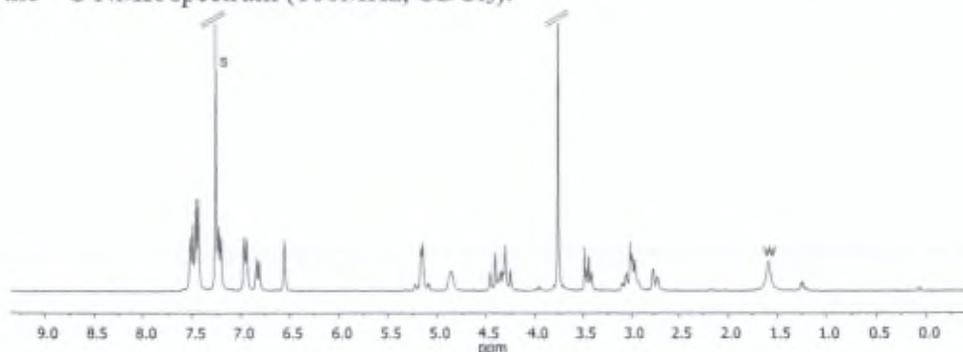
S = solvent

Synthesis of 9-methoxy-2,11-bis(4-(trifluoromethyl)benzyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



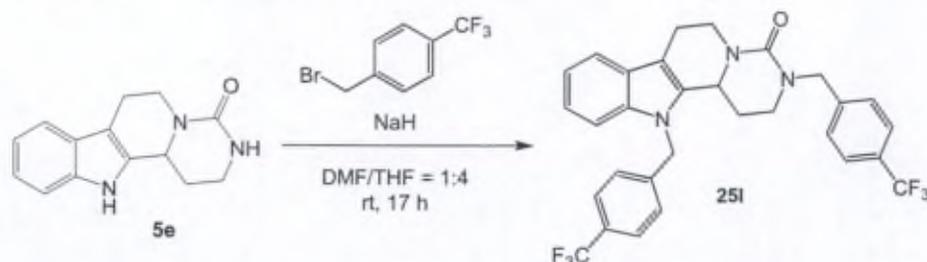
5c (0.049 g, 0.190 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (1.5 mL/4 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.026 g, 0.638 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.146 g, 0.608 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 16 h then concentrated in vacuum. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) washed with water until pH is neutral (1 × 10 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 10 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried with MgSO₄ and the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/cyclohexane 90/10 followed by CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 100/0 to 90/10 to give 0.056 g of the desired compound **25k**. The compound was further purified by trituration in ethanol (0.2 mL, × 2). Beige powder; 0.0397 g, yield: 51%; mp 178 °C; HPLC Purity: 99%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.60-7.35 (m, 5H; ArH), 7.30-7.15 (m, 2H; ArH), 6.95 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 6.83 (dd, 1H, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.7 Hz, CH₃OCCHCH), 6.56 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz; CH₃OCCHC), 5.20 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz; CNCHHPH), 5.12 (d, 1H, *J* = 18.0 Hz; CNCHHPH), 4.86 (m, 1H; CONCH), 4.43 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz; CONCHHPH), 4.34 (m, 1H; NCHHCH₂), 4.28 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz; CONCHHPH), 3.77 (s, 3H; CH₃), 3.44 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.14-2.87 (m, 3H; NCHCHH, NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.74 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.1 (NCO), 157.1 (CH₃OC), 141.1 (NCH₂C_q), 141.0 (NCH₂C_q), 138.1, 131.4, 130.3 (q, *J* = 32.3 Hz, CF₃C), 130.0 (q, *J* = 32.4 Hz, CF₃C), 128.3 (2C, CF₃CCHCH), 126.14 (2C, CF₃CCHCH), 126.1 (q, 2C, *J* = 3.8 Hz, CF₃CCH), 125.7 (q, 2C, *J* = 3.8 Hz, CF₃CCH), 124.2* (*J* = 279 Hz, CF₃C), 123.9* (*J* = 271 Hz, CF₃C), 121.4, 119.6, 110.8, 109.4, 93.8, 55.9 (CH₃), 49.6 (CONCH), 48.6 (NCHCH₂), 47.7 (CONCH₂C), 47.0 (CHCNCH₂), 39.5 (NCH₂CH₂), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2944, 1679 (C=O), 1320, 1161, 1106, 1065, 1018, 818 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₂₆N₃O₂F₆: 574.1929 [M+H⁺]; found: 574.1932 (error: 0.2 ppm); *This chemical shift was determined using the ¹⁹F decoupled ¹³C NMR spectrum (100MHz, CDCl₃) and the coupling constants were determined using the ¹³C NMR spectrum (100MHz, CDCl₃).



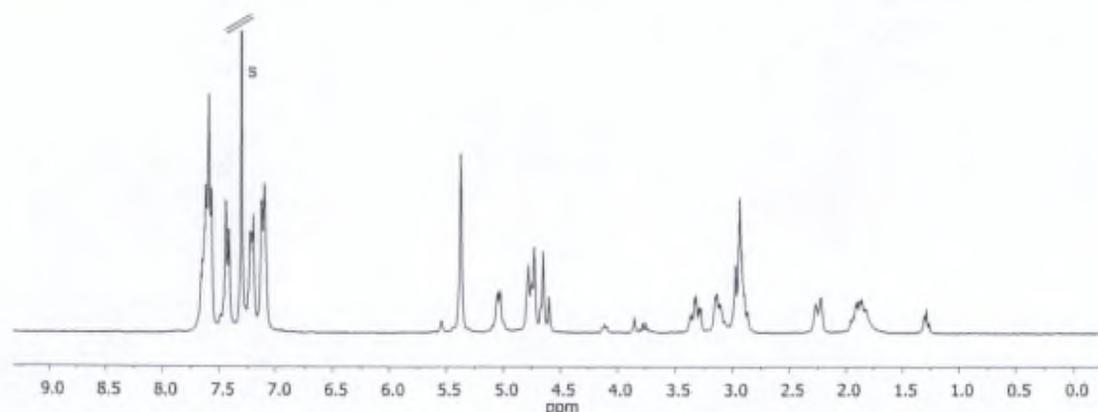
S = solvent, W = water

Synthesis of 3,12-bis(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,6,7,12b-hexahydropyrimido[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indol-4(12H)-one



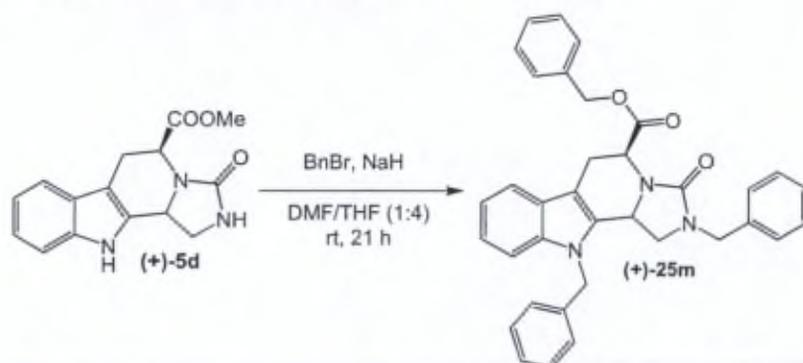
5e (0.069 g, 0.286 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (1 mL/4 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.060 g, 1.500 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.338 g, 1.414 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 17 h and then concentrated in vacuum. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) washed with water until pH is neutral (1 × 5mL). The organic phase is dried on a WA filter and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 100/0 to 95/5 to afford the desired compound **25l**. Pale yellow foam; 0.072 g, yield: 45%; mp 79 °C (dec.); HPLC Purity: 94%;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.65-7.50 (m, 5H; ArH), 7.38 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz; OCNCH₂CCH), 7.20-7.14 (m, 2H; ArH), 7.10-7.02 (m, 3H; ArH), 5.33 (s, 2H; CCNCH₂Ph), 5.00 (m, 1H; NCHHCH₂C), 4.76-4.65 (m, 2H; NCH, CONCHHPh), 4.58 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz; CONCHHPh), 3.28 (ddd, 1H, *J*₁=4.0, *J*₂ ≈ *J*₃ ≈ 12 Hz; NCHCH₂CHHN), 3.08 (ddd, 1H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, *J*₃ = 11.6 Hz; NCHCH₂CHHN), 2.99-2.78 (m, 3H; NCHHCH₂C, NCH₂CHHC, NCH₂CHHC), 2.20 (m, 1H; NCH₂CHHCH), 1.84 ppm (m, 1H; NCH₂CHHCH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 156.14 (CO), 142.7, 141.6, 138.1, 134.1, 130.4*, 129.9*, 128.5 (2C; NCH₂CCH), 127.1, 126.6 – 126.2 (m, 3C; NCH₂CCH, CF₃CCH), 125.9 (q, *J* = 3.6 Hz, CF₃CCH), 122.9, 120.6, 119.2, 112.2, 109.9, 52.2 (CONCH), 51.8 (CONCH₂Ph), 47.5 (CNCH₂Ph), 44.1 (NCH₂CH₂CH), 41.4 (NCH₂CH₂C), 30.5 (NCHCH₂CH₂), 22.2 ppm (NCH₂CH₂C); IR: ν = 1618 (C=O), 1418, 1323, 1108, 1065, 740 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₂₆N₃O₆: 558.1980 [M+H⁺]; found: 558.1982 (error: 0.4 ppm); *chemical shift estimated using the HMBC spectrum. The chemical shifts of CF₃ carbon atoms are not reported.



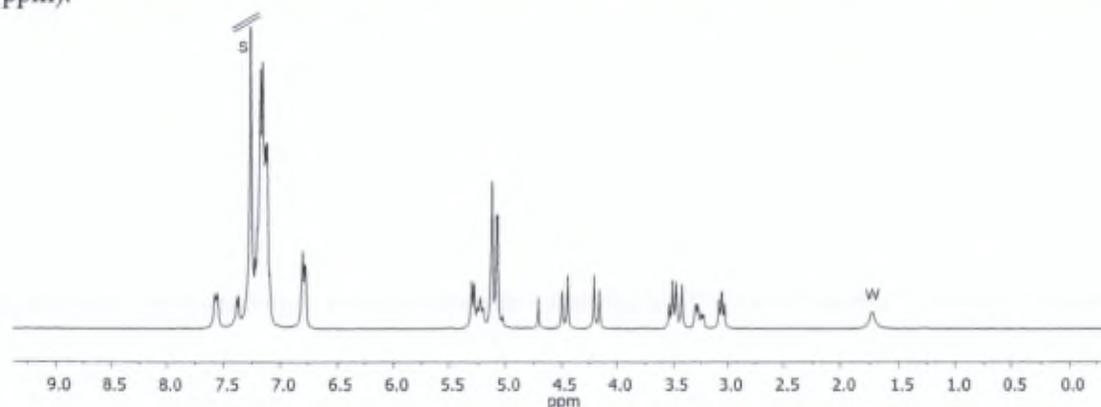
S = solvent

Synthesis of (5*S*)-2,11-dibenzyl-5-(2-phenylacetyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1*H*-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-*b*]indol-3(2*H*)-one



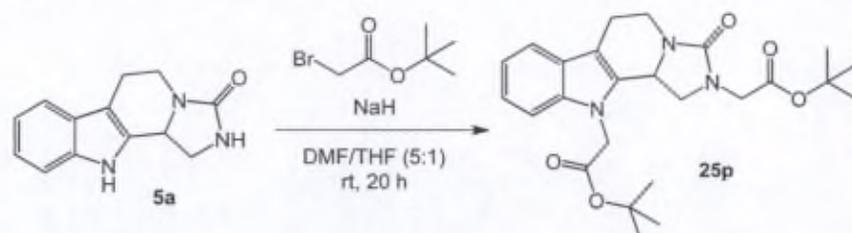
To a solution of (+)-**5d** (0.073 g, 0.271 mmol) in a mixture of anhydrous DMF/THF (1 mL/4 mL), under Ar, cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.042 g, 1.050 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and benzyl bromide (0.128 mL, 1.076 mmol) was added dropwise. After 21 h the reaction mixture was quenched and concentrated. The solid residue was then dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and water was added (1 mL). The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with water until a pH of 6 (2 × 2 mL), then dried on anhydrous MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 97/3 to 90/10 to afford the desired product (+)-**25m**. Pale green foam; 0.055 g, yield: 47%; mp 128-130 °C; HPLC Purity: 97%; [α]_D²⁰ = +84.9 (*c* = 0.35 in CH₂Cl₂);

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.56 (m, 1H; ArH), 7.45-7.01 (m, 16H; ArH), 6.79 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz; ArH), 5.29 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz; NCHCO), 5.23 (m, 1H; CONCH), 5.12 (s, 2H; CNCH₂Ph), 5.08 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz; OCH₂), 4.47 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHHPh), 4.18 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHHPh), 3.60-3.36 (m, 2H; NCHCHHN, OCOCHCHH), 3.26 (m, 1H; OCOCHCHH), 3.06 ppm (m, 1H; NCHCHHN); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.3, 159.4, 137.4, 136.8, 136.6, 135.6, 132.6, 129.0 (2C), 128.8 (2C), 128.6 (2C), 128.23, 128.18 (2C), 127.74, 127.67 (3C), 126.9, 125.8 (2C), 122.6, 120.0, 118.8, 109.7, 107.2, 66.9 (OCH₂), 51.8 (NCHCO), 48.7 (CONCH₂CH), 48.0 (CNCH₂Ph), 47.7 (CONCH₂CH), 47.4 (CONCH₂Ph), 23.9 ppm (COCHCH₂); IR: ν = 2912, 1736 (OC=O), 1694 (NC=O), 1176, 737, 696 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₅H₃₂N₃O₃: 542.2444 [M+H⁺]; found: 542.2440 (error: -0.7 ppm).



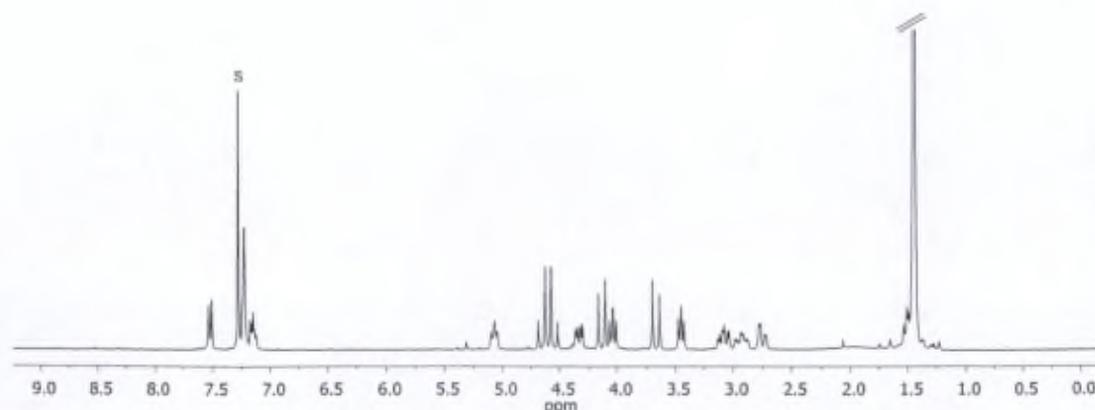
S = solvent, W = water

Synthesis of Di-tert-butyl 2,2'-(3-oxo-5,6-dihydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole-2,11(3H,11bH)-diyl)diacetate



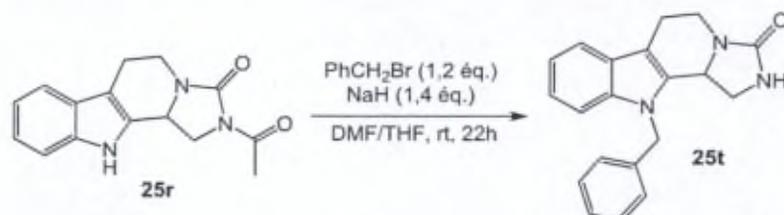
5a (0.101 g, 0.444 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (10 mL/2 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.057 g, 1.425 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min, then *tert*-butyl bromoacetate (0.195 mL, 1.320 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 20 h then THF was evaporated. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL) and water was added (10 mL). The two phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with water, dried on a WA filter and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 95/5 to 50/50 to afford compound **25p**. White foam; 0.132 g, yield: 75%; mp 40–45 °C; HPLC Purity: 98%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.5 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.24–7.17 (m, 2H; ArH), 7.13 (m, 1H; ArH), 5.06 (m, 1H; CONCH), 4.64 (d, 1H, *J* = 17.4 Hz; CNCHHCO), 4.53 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz; CNCHHCO), 4.32 (dd, 1H, *J*₁ = 12.9 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz; NCHHCH₂), 4.12 (d, 1H, *J* = 18 Hz; CONCHHCO), 4.02 (dd, 1H, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz; NCHCHH), 3.65 (d, 1H, *J* = 18 Hz; OCNCHHCO), 3.43 (dd, 1H, *J*₁ = 6.9 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz; NCHCHH), 3.06 (m, 1H; NCHHCH₂), 2.90 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.73 (m, 1H; NCH₂CHH), 1.47–1.37 ppm (m, 18H; *t*Bu); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 168.7, 167.4, 159.7, 137.5, 132.9, 127.2, 122.6, 120.1, 118.9, 110.3, 108.9, 83.1 (CCH₃), 82.1 (CCH₃), 49.33 (CONCH or NCHCH₂), 49.28 (CONCH or NCHCH₂), 46.6 (CNCH₂CO), 46.1 (CONCH₂CO), 39.1 (NCH₂CH₂), 28.18 (3C, CH₃), 28.10 (3C, CH₃), 20.9 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2976, 2929, 1737 (OC=O), 1696 (NC=O), 1437, 1368, 1228, 1149, 743 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₅H₃₄N₃O₅: 456.2498 [M+H⁺]; found: 456.2499 (error: 0.2 ppm).



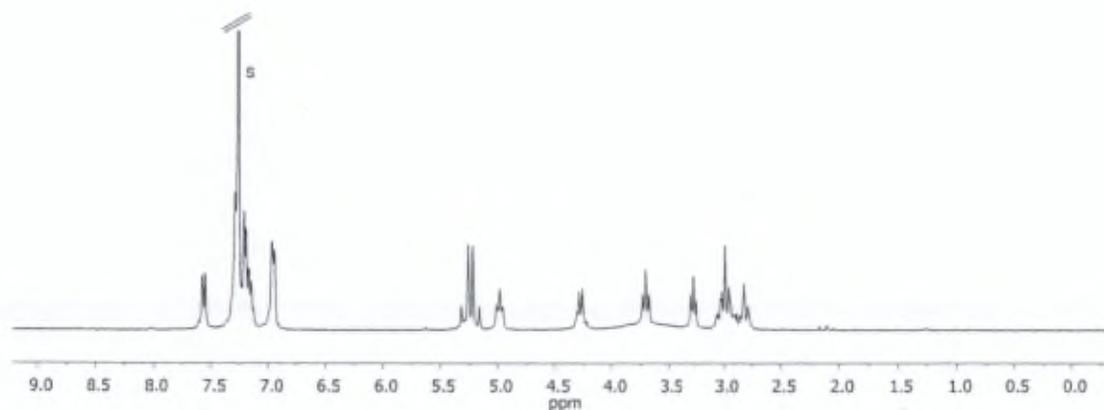
S = solvent

Synthesis of 11-benzyl-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



A solution of **25r** (0.048 g, 0.178 mmol) in a mixture of anhydrous THF and anhydrous DMF (4 mL/1 mL) under argon was cooled to 0 °C and NaH (60% in mineral oil, 0.010 g, 0.250 mmol) was added. The mixture was stirred for 10 min at room temperature and benzyl bromide (0.025 mL, 0.204 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 18 h when compound **5a** was observed on TLC. More NaH (60% in mineral oil, 0.010 g, 0.250 mmol) was added and the mixture stirred at room temperature for another 4h. The reaction was then stopped by adding water (1 mL), the solvents were evaporated, the residue was redissolved in CH_2Cl_2 (10 mL), filtered and evaporated in vacuo. The crude product was purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ gradient from 100/0 to 90/10 to obtain the desired product **25t**. Yellow powder; 0.027 g, yield: 48%; A fraction of dialkylated compound was also obtained (0.015 g, 0.037 mmol). mp 123-128 °C; HPLC Purity: 97%;

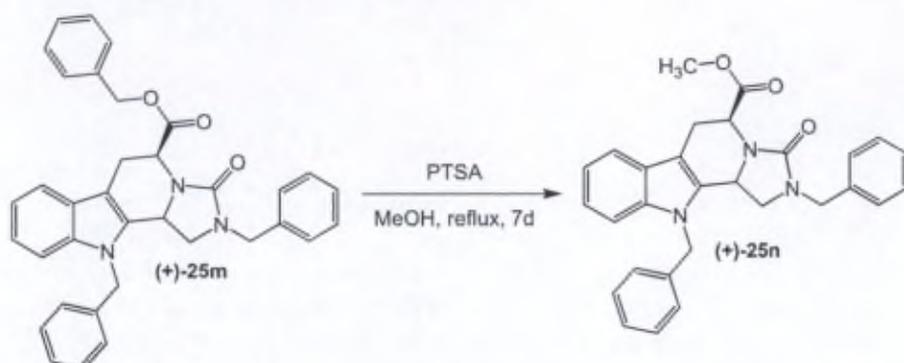
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.56 (m, 1H; ArH), 7.40-7.08 (m, 6H; ArH), 7.02-6.90 (m, 2H; ArH), 5.29 (d, 1H, J = 17.1 Hz; NCHHPH), 5.19 (d, 1H, J = 17.4 Hz; NCHHPH), 4.98 (m, 1H; CONCH), 4.28 (m, 1H; NCHHCH₂), 3.71 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 8$ Hz; NHCHH), 3.27 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 8$ Hz; NHCHH), 3.11-2.73 (m, 3H; NCHHCH₂, NCH₂CH₂); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 161.6 (CO), 137.4, 137.1, 132.9, 129.1 (2C), 127.9, 126.8, 125.9 (2C), 122.5, 119.9, 118.8, 110.0, 109.6, 52.1 (CONCH), 47.5 (CH₂Ph), 45.0 (NCHCH₂), 38.6 (NCH₂CH₂), 21.1 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3200, 1683 (C=O), 1451, 1435, 1269, 731 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}$: 318.1606 [$\text{M}+\text{H}^+$]; found: 318.1603 (error: -0.9 ppm).



S = solvent

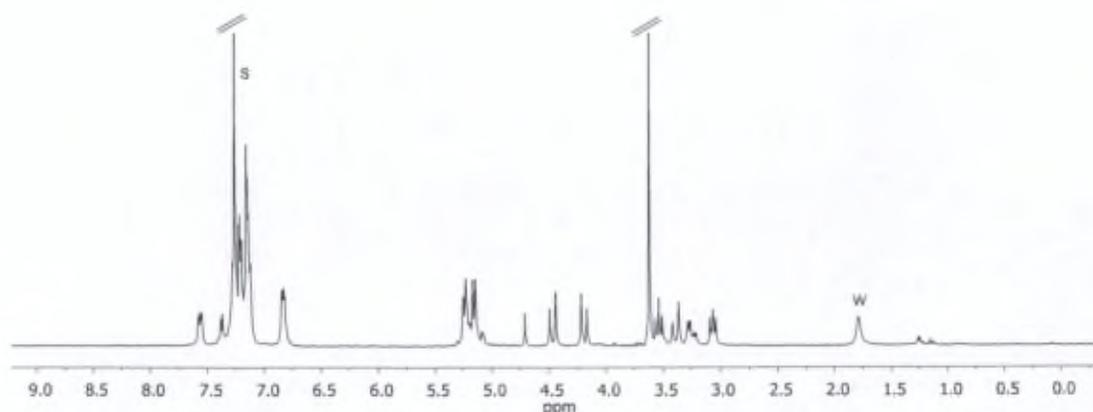
6.1.10 Other modifications of the alkylated THBCI scaffold

Synthesis of 5(*S*)-methyl 2,11-dibenzyl-3-oxo-2,3,5,6,11,11b-hexahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole-5-carboxylate



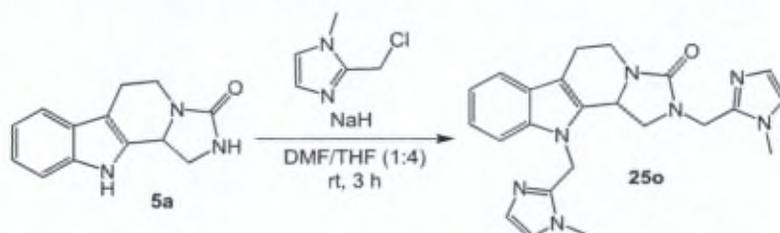
To a solution of (+)-**25m** (0.030 g, 0.055 mmol) in methanol (10 mL), PTSA (0.005 g, 0.026 mmol) was added and the solution was stirred at reflux for 7 days. After cooling the solvent was concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 98/2 to 95/5 to afford the desired compound (+)-**25n**. White powder; 0.017 g, yield: 66%; mp 132 °C; HPLC Purity: 87%; [α]_D²⁰ = +72.3 (*c* = 0.53 in CH₂Cl₂);

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.56 (m, 1H; ArH), 7.44-7.04 (m, 11H; ArH), 6.83 (m, 2H; ArH), 5.34-5.03 (m, 4H; CNCH₂Ph, NCHCH₂N, COCH), 4.46 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHPh), 4.19 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz; CONCHPh), 3.62 (s, 3H; CH₃), 3.54 (dd, 1H, *J*₁ \approx *J*₂ \approx 9 Hz; NCHHCH), 3.39 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz; NCHCHC), 3.25 (ddd, 1H, *J*₁ = 2.1 Hz, *J*₂ = 6.9 Hz, *J*₃ = 15.9 Hz; NCHCHC), 3.06 ppm (dd, 1H, *J*₁ = 6.6 Hz, *J*₂ = 8.1 Hz; NCHHCH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.9 (OCO), 159.3 (NCO), 137.4, 136.9, 136.5, 132.5, 129.0 (2C), 128.8 (2C), 128.2 (2C), 127.8, 127.7, 126.9, 125.8 (2C), 122.6, 120.0, 118.8, 109.7, 107.2, 52.5 (CH₃), 51.4 (CHCO), 48.7 (NCH₂CH), 48.0 (CONCH₂C), 47.6 (NCHCH₂N), 47.5 (CHCNCH₂), 23.7 ppm (COCHCH₂); IR: ν = 2161, 1979, 1736 (C=O), 1696 (C=O), 1436, 734, 698 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₉H₂₈N₃O₃: 466.2131 [M+H⁺]; found: 466.2129 (error: -0.4 ppm).



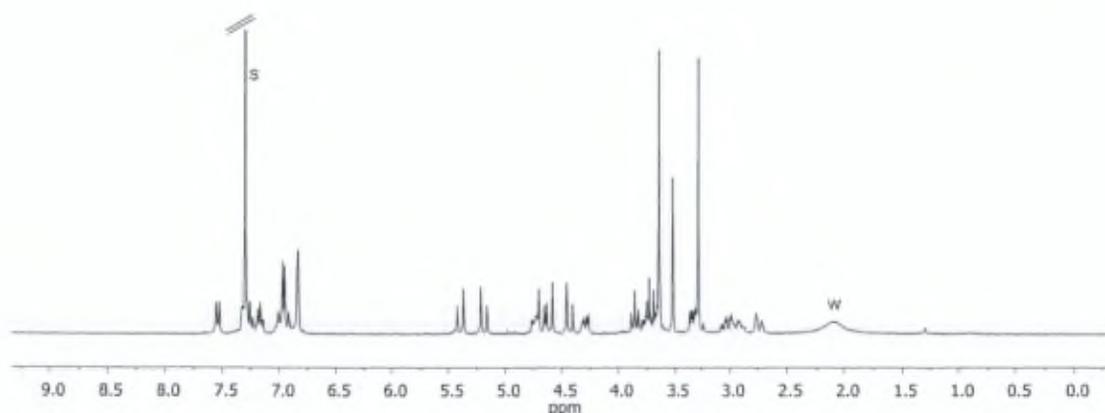
S = solvent, W = water

Synthesis of 2,11-bis((1-methyl-1H-imidazol-2-yl)methyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



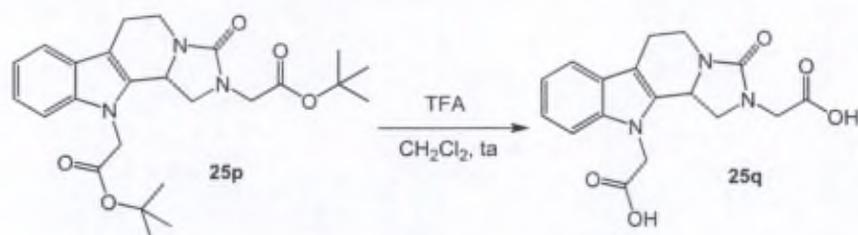
5a (0.095 g, 0.419 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (2 mL/8 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.102 g, 2.550 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 2-(chloromethyl)-1-methyl-1H-imidazole hydrochloride (0.174 g, 1.042 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 3 h then concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH gradient from 98/2 to 90/10, to give the desired compound **25o**. Yellow powder; 0.139 g, yield: 80%; mp 56 °C (dec.); HPLC Purity: 95%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.50 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz; ArH), 7.31-7.17 (m, 1H; ArH), 7.12 (m, 1H; ArH), 7.01-6.70 (m, 5H; ArH), 5.35 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz; CNCHHIm), 5.14 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz; CNCHHIm), 4.74-4.45 (m, 2H; CONCH, CONCHHIm), 4.37 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz; CONCHHIm), 4.25 (dd, 1H, *J*₁ = 12.0 Hz, *J*₂ = 3.9 Hz; NCHHCH₂), 3.80 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHCHH), 3.60 (s, 3H; CH₃), 3.29 (dd, 1H, *J* = 9.0, *J* = 5.4 Hz; NCHCHH), 3.23 (s, 3H; CH₃), 3.06-2.78 (m, 2H; NCHHCH₂, NCH₂CHH), 2.69 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 159.6 (CO), 143.6, 142.6, 137.1, 133.4, 128.0, 127.5, 126.8, 122.7 (2C), 122.0, 120.1, 119.0, 110.9, 109.0, 49.7 (CONCH), 48.7 (NCHCH₂), 41.2 (CNCH₂Im), 40.2 (CONCH₂Im), 39.2 (NCH₂CH₂), 33.0 (2C, CH₃), 20.8 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3390, 2942, 1688 (C=O), 1501, 1454, 1262, 747 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₃H₂₆N₇O: 416.2199 [M+H⁺]; found: 416.2199 (error: 0 ppm).



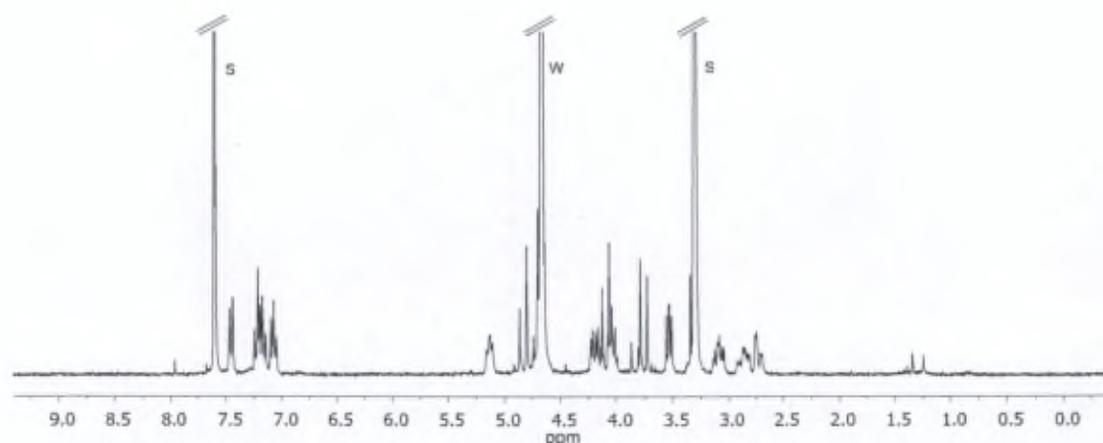
S = solvent, W = water

Synthesis of 2,2'-(3-oxo-5,6-dihydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole-2,11(3H,11bH)-diyl)diacetic acid (**9q**):



25p (0.024 g, 0.053 mmol) was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (3.5 mL) under argon and TFA was added (0.260 mL, 3.395 mmol). The solution was stirred at room temperature until the substrate was no longer detected by TLC (48 h). The solvent was removed under vacuum and the compound **25q** was purified by trituration in acetonitrile (3×0.200 mL). Brown powder; 0.014 g, yield: 78%; mp 244 °C; HPLC Purity: 92%;

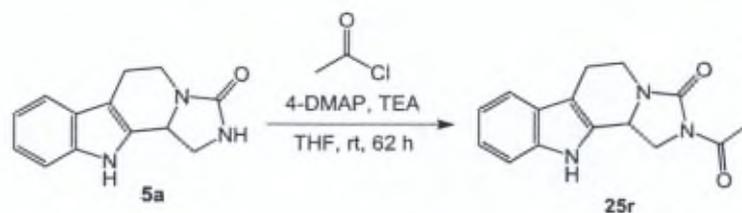
^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 3:4): δ = 7.46 (d, 1H, J = 7.8 Hz; ArH), 7.27-7.13 (m, 3H; ArH), 7.08 (m, 1H; ArH), 5.14 (m, 1H; NCH), 4.83 (d, 1H, J = 18.3 Hz; CNCHHCO), 4.77-4.57 (m, 1H; CNCHHCO), 4.20 (dd, 1H, J_1 = 13.2 Hz, J_2 = 4.3 Hz; NCHHCH $_2$), 4.14-3.96 (m, 2H, CONCHHCO, NCHCHH), 3.76 (d, 1H, J = 18.3 Hz; CONCHHCO), 3.54 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 6.3 Hz; NCHCHH), 3.09 (m, 1H; NCHHCH $_2$), 2.86 (m, 1H; NCH $_2$ CHH) 2.72 ppm (m, 1H; NCH $_2$ CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 5:6): δ = 170.9, 170.3, 160.3, 137.1, 132.3, 126.5, 121.9, 119.4, 118.0, 109.2, 108.4, 49.1 (NCH), 48.6 (NCHCH $_2$), 44.8 (CNCH $_2$ CO), 44.4 (CONCH $_2$ CO), 38.6 (NCH $_2$ CH $_2$), 20.1 ppm (NCH $_2$ CH $_2$); IR: ν = 3261, 2918, 2872, 1752 (C=O), 1371, 1145, 998 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$: 344.1246 [$\text{M}+\text{Na}^+$]; found: 344.1248 (error: 0.6 ppm).



S = solvent, W = water

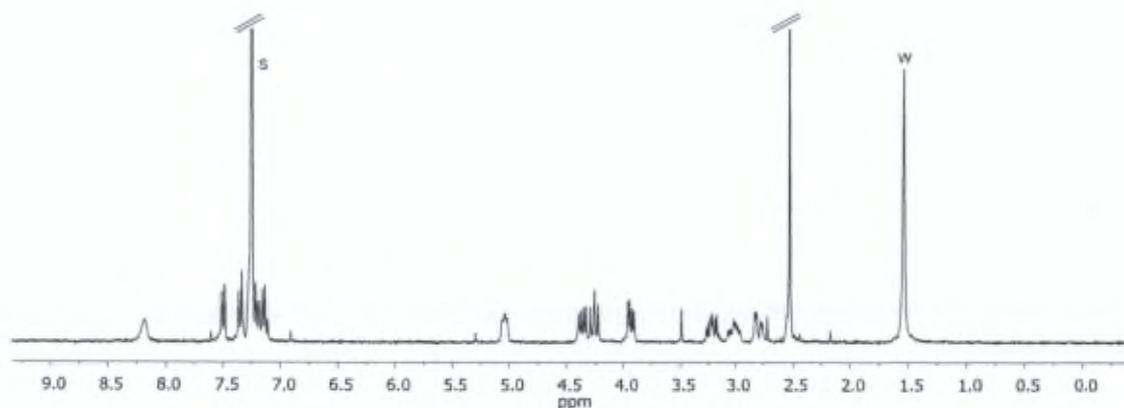
6.1.11 Acylation of compound **5a**

Synthesis of (11-acetyl-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3(2H)-one



To a solution containing **5a** (0.194 g, 1.015 mmol) and 4-DMAP (0.016 g, 0.130 mmol) in anhydrous THF (40 mL) triethylamine was added dropwise (0.135 mL, 0.968 mmol). The reaction was stirred for 10 min at room temperature then acetyl chloride (0.075 mL, 1.054 mmol) was added. The mixture was stirred for 65 h at room temperature. After this delay more triethylamine (total of: 0.165 mL, 1.184 mmol) and acetyl chloride (total of: 0.325 mL, 4.570 mmol) were added and the mixture was stirred for a total of 18 h at room temperature. The solvent was evaporated and the crude residue was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (gradient from 100/0 to 50/50), then CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 96/4 to 92/8) as eluents to obtain the compound **25r**. Brown powder; 0.101 g, yield: 49 %; mp 254-256 °C; HPLC Purity: 91%;

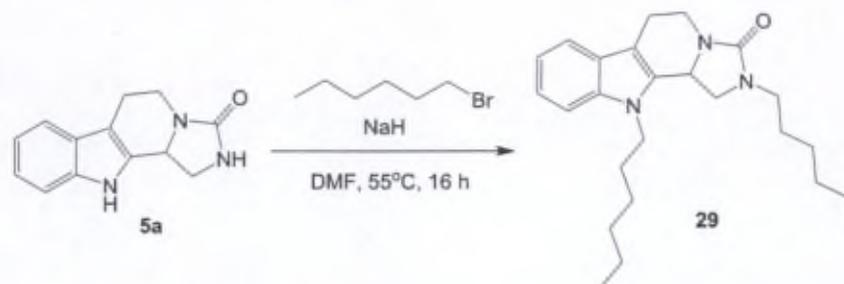
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.19 (bs, 1H; NH), 7.50 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; NCCCH), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz; NCCCH), 7.31-7.08 (m, 2H; NCCCH, NCCCHCH), 5.04 (m, 1H; NCH), 4.36 (dd, 1H, *J*₁ = 6.0 Hz, *J*₂ = 13.2 Hz; NCHH), 4.26 (m, 1H; NCHCHH), 3.93 (dd, 1H, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 11.1 Hz, NCHCHH), 3.22 (ddd, 1H, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 6.6 Hz, *J*₃ = 13.5 Hz; NCHH), 3.01 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.79 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.53 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 5:1): δ = 171.6 (COCH₃), 154.4 (CO), 136.6, 131.1, 126.4, 122.2, 119.4, 118.1, 111.3, 108.2, 48.4 (NCH), 45.6 (NCHCH₂), 39.1 (NCH₂), 23.2 (CH₃), 20.2 ppm (NCH₂CH₂); IR (KBr): ν = 3328, 1717 (C=O), 1665 (C=O), 1383, 1246, 733, 623 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₅H₁₆N₃O₂: 270.1243 [M+H⁺]; found: 270.1248 (error: 0 ppm).



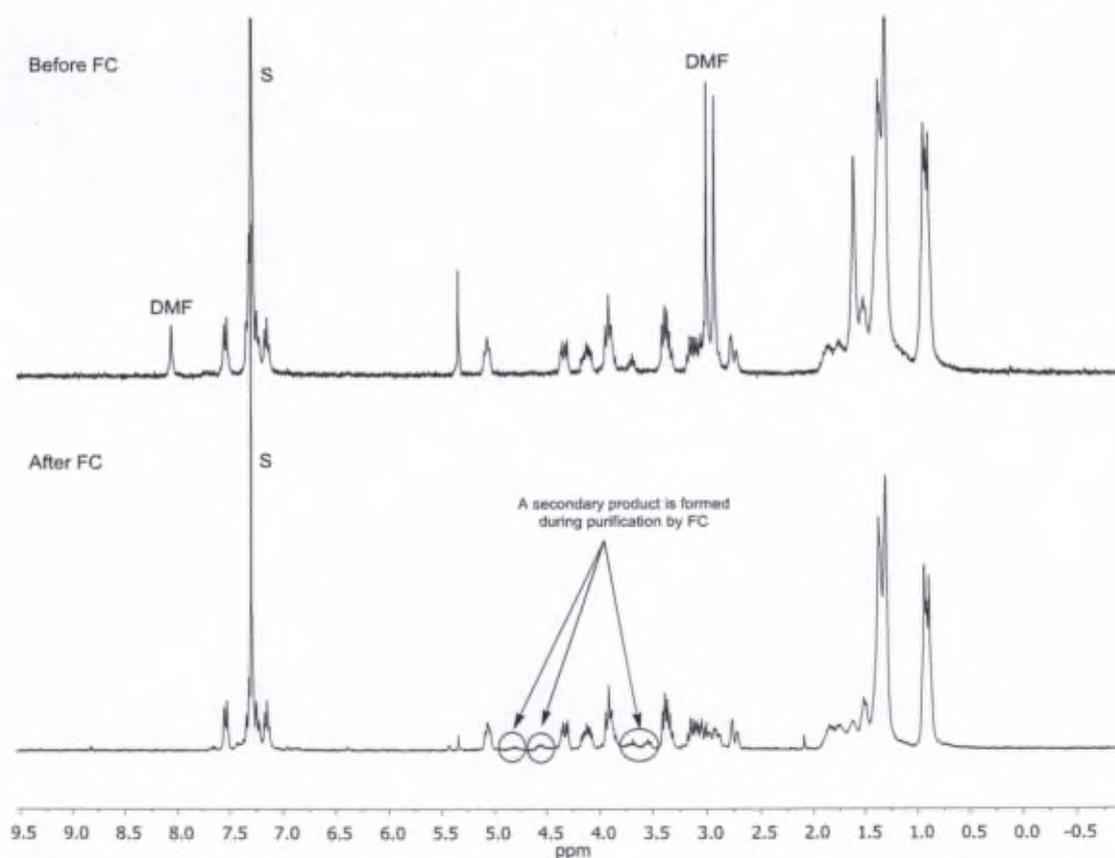
S = solvent, W = water

6.1.12 Other synthesis assays described in Chapter II – section 2.6

Synthesis of 2,11-dihexyl-1,2,5,6,11,11b-hexahydro-3H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indol-3-one

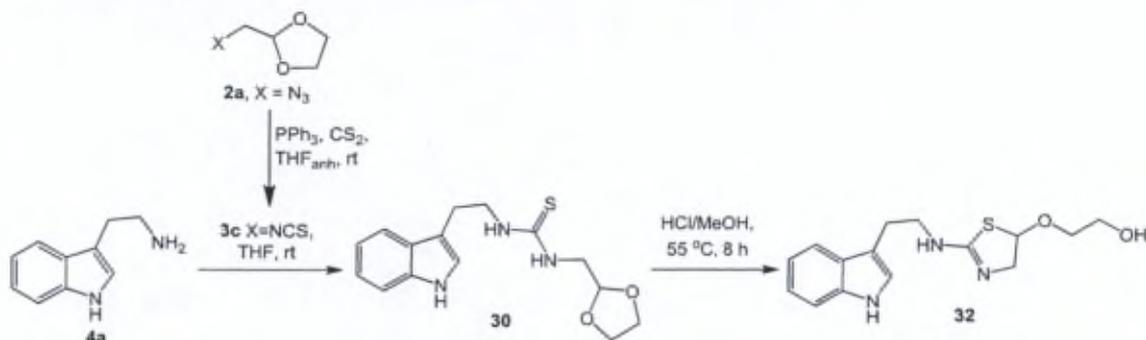


5a (0.070 g, 0.308 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (4 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.042 g, 1.050 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 1-bromohexane (0.135 mL, 0.962 mmol) was added. The suspension was stirred at 50 °C for 16 h then quenched with a few drops of water and concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 95/5 to 90/10, but compound **29** was obtained impure (yellow oil). The compound was not sufficiently pure nor stable for further characterization.



NMR ¹H spectrum of compound **29** before and after purification. 300 MHz, CDCl₃.
S = solvent

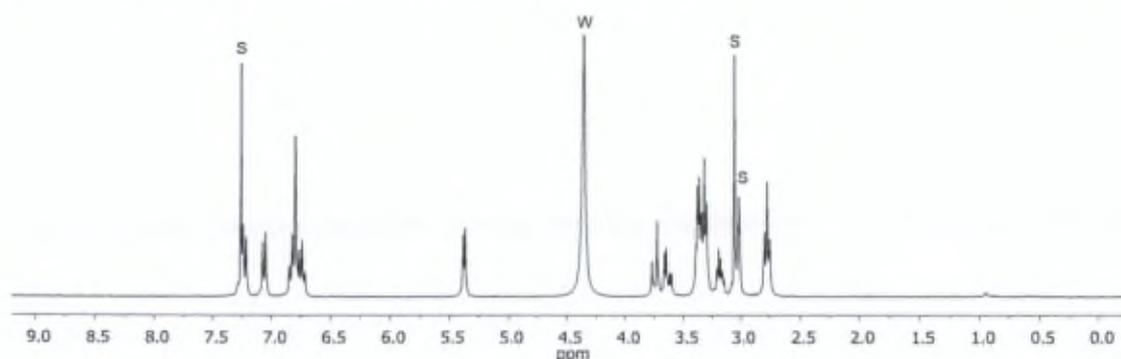
Synthesis of 2-((2-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-4,5-dihydrothiazol-5-yl)oxy)ethan-1-ol



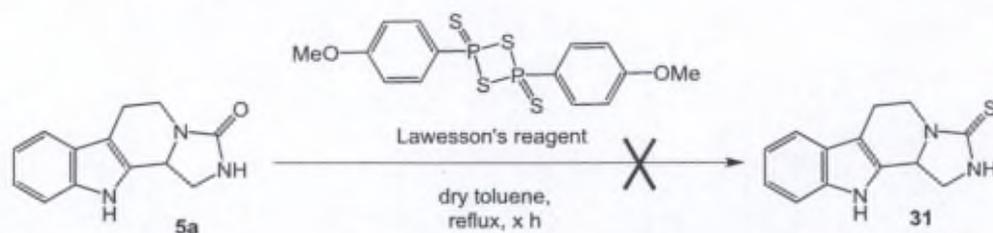
To a solution of PPh_3 (0.793 g, 3.020 mmol) in anhydrous THF (15 mL) under argon, azide **2a** (0.300 mL, 3.020 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 15 min then CS_2 (0.450 mL, 7.450 mmol) was added. The reaction was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated to dryness using a liquid nitrogen trap in order to remove the excess CS_2 and to the crude isocyanate **3c**, tryptamine **4a** (0.403 g, 2.520 mmol) was immediately added. Inert atmosphere was ensured and anhydrous THF (20 mL) was added via a syringe. After stirring at room temperature for 17 h, the solvent was removed. A flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient from 98/2 to 90/10) was performed and the urea was isolated 0.682 g, yield: 84 %. This purification step is only necessary because the desired compound **32** is more difficult to separate from SPPH_3 .

The urea was dissolved in MeOH (20 mL). HCl (2.8M, 6 mL) was added and the mixture was stirred at 55 °C for 22 h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue was purified by flash chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient from 98/2 to 80/20) was performed on the resulting solid and on the supernatant separately to afford product **32**. Beige powder; 0.402 g, yield: 65%; mp 70 °C (dec.);

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 1:1): δ = 7.52 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NHCCCH), 7.35 (d, 1H, J = 7.8 Hz; NHCCH), 7.16-6.97 (m, 3H; ArH), 5.67 ppm (d, 1H, J = 4.5 Hz; $\text{N}=\text{CH}$), 4.04 (d, 1H, J = 13.2 Hz; $\text{CH}=\text{NCHH}$), 3.93 (dd, 1H, J_1 = 13.2 Hz, J_2 = 4.8 Hz; $\text{CH}=\text{NCHH}$), 3.74-3.54 (m, 5H; HOCH_2CH_2 , HOCH_2CHH , NHCH_2), 3.47 (m, 1H; HOCH_2CHH), 3.07 ppm (t, 2H, J = 6.8 Hz, NHCH_2CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 1:1): δ = 136.3, 126.6, 122.6, 121.1, 118.5, 117.5, 111.0, 110.0, 88.9 ($\text{CH}=\text{N}$), 70.4 (HOCH_2CH_2), 60.1 (HOCH_2), 57.5 ($\text{CH}=\text{NCH}_2$), 46.5 (NHCH_2CH_2), 24.3 ppm (NHCH_2CH_2); IR: ν = 3259, 2931, 1644, 1066, 746 cm^{-1} ; ESI-MS: m/z found 306 [$\text{M}+\text{H}^+$], 611 [$2\text{M}+\text{H}^+$].



S = solvent, W = water

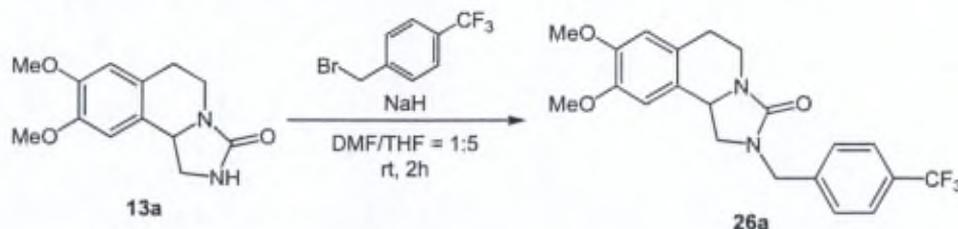
Synthesis of 1,2,5,6,11,11b-hexahydro-3H-imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole-3-thione using Lawesson's reagent

5a (0.025 g, 0.109 mmol) was dissolved in anhydrous toluene (2 mL) under argon. Lawesson's reagent was then rapidly added (0.027 g, 0.060 mmol) and the inert atmosphere was re-established. The suspension was stirred at reflux for 48 h but substrate **5a** did not react.

Since **5a** is not soluble in toluene, the solvent was removed and changed to THF (2 mL). Lawesson's reagent was added again (0.034 g, 0.084 mmol) and the solution was heated at reflux for 24h but the substrate remained unchanged.

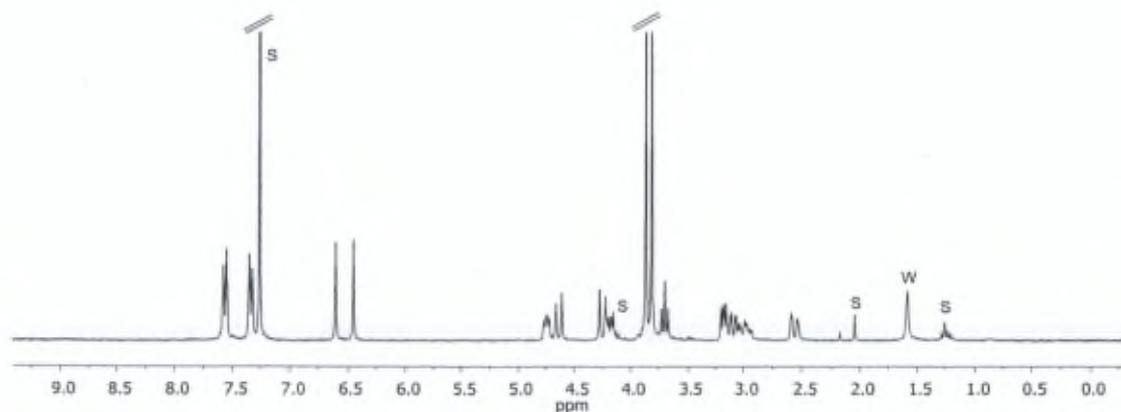
6.1.13 Synthesis of alkylated THIQI

Synthesis of 8,9-dimethoxy-2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,5,6,10b-tetrahydroimidazo[5,1-a]isoquinolin-3(2H)-one



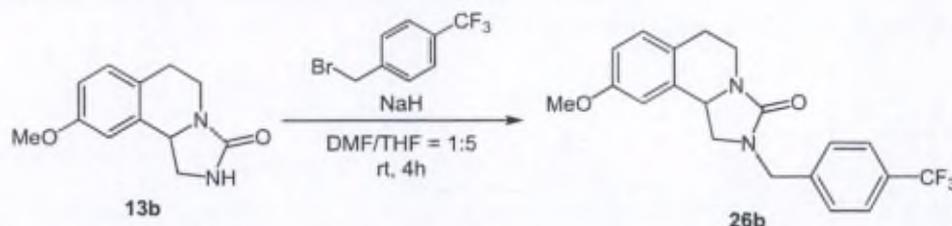
Compound **13a** (0.101 g, 0.41 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous THF and anhydrous DMF (10 mL/2 mL) and the solution was cooled to 0°C before adding NaH (34.4 mg, 0.86 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 15 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (160 mg, 0.67 mmol) were added. The suspension was stirred at room temperature for 2h. After that, the excess NaH was neutralized with water and the reaction was concentrated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (95/5) then CH₂Cl₂/MeOH (gradient form 98/2 to 95/5) to afford compound **26a**. White powder; 0.128 g, yield: 78 %; HPLC Purity: 100 %;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.56 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz; CF₃CCH), 7.33 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz; CF₃CCHCH), 6.45 (s, 1H; Ar-H), 6.60 (s, 1H; Ar-H), 4.74 (m, 1H; NCH), 4.63 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz; NCHH), 4.12-4.30 (m, 2H, NCHH; NCHH), 3.86 (s, 3H; OCH₃), 3.81 (s, 3H; OCH₃), 3.70 (t, 1H, *J* = 8.6 Hz; NCHH), 2.89-3.23 (m, 3H; NCH₂CHH, NCHH, NCHH), 2.56 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.19, 148.34, 148.27, 141.43, 129.83 (*J* = 32.5 Hz), 128.32, 127.90, 126.95, 125.72 (*J* = 3.6 Hz), 124.22 (*J* = 272.1 Hz), 112.01, 107.87, 56.19, 56.05, 52.39, 50.59, 47.76, 38.89, 27.12 ppm; IR (KBr): ν = 2937, 1701 (C=O), 1326, 1106 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₁H₂₂F₃N₂O₃: 407.1583 [M+H⁺]; found: 407.1586 (error: 0 ppm).



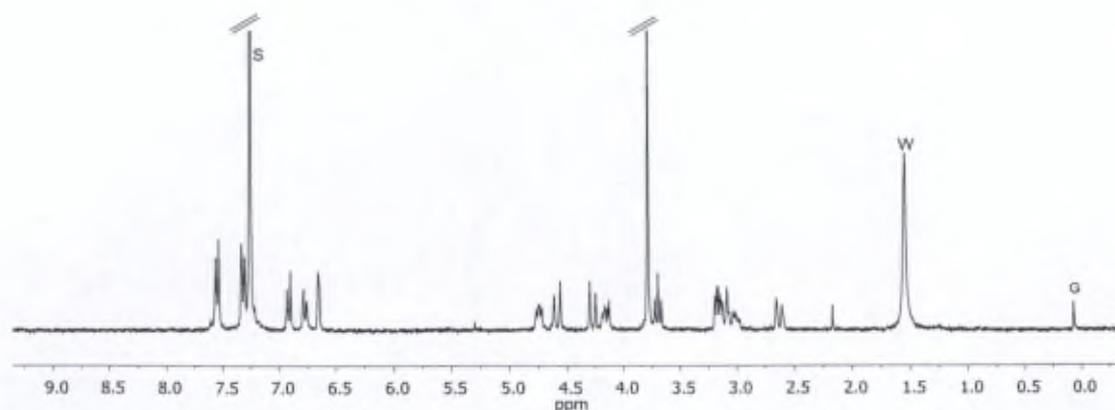
S = solvent, W = water

Synthesis of 9-methoxy-2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,5,6,10b-tetrahydroimidazo[5,1-a]isoquinolin-3(2H)-one



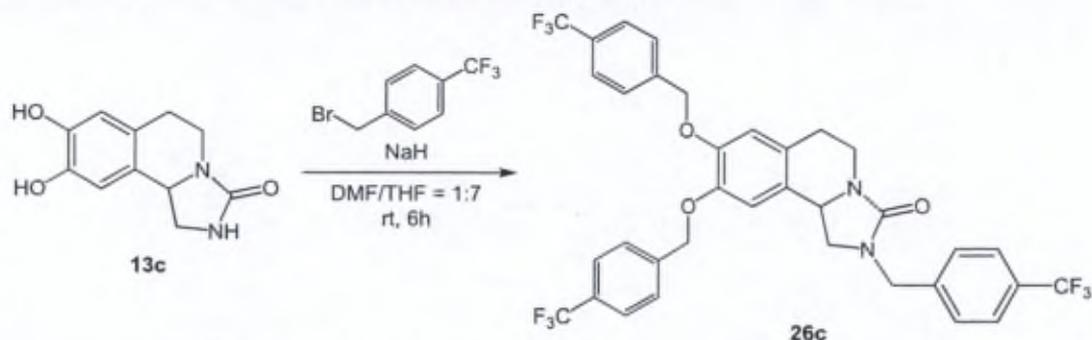
Compound **13b** (0.150 g, 0.69 mmol) was dissolved in a mixture of anhydrous THF and anhydrous DMF (10 mL/2 mL) and the solution was cooled to 0°C before adding NaH (0.0421 g, 1.08 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 15 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.256 g, 1.07 mmol) were added. The suspension was stirred at room temperature for 4h. After that, the excess NaH was neutralized with water and the reaction was concentrated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (gradient from 95/5 to 90/10) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford compound **26b**. White powder; 0.140 g, yield: 54 %; mp 100-102 °C; HPLC Purity: 98 %;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.55 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz; CF₃CCH), 7.32 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz; CF₃CCHCH), 6.91 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz; Ar-H), 6.77 (dd, 1H, *J*₁ = 2.5 Hz, *J*₂ = 8.5 Hz; Ar-H), 6.65 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz; Ar-H), 4.75 (m, 1H; NCH), 4.59 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz; NCHH), 4.28 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz; NCHH), 4.16 (m, 1H; NCHH), 3.79 (s, 3H; OCH₃), 3.70 (t, 1H, *J* = 8.6 Hz; NCHH), 2.94-3.22 (m, 3H; NCH₂CHH, NCHH, NCHH), 2.63 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.24, 158.63, 141.40, 136.18, 129.35 (*J* = 32.6 Hz), 128.45, 128.30, 126.24, 125.71 (*J* = 3.9 Hz), 124.24 (*J* = 271.8 Hz), 113.96, 113.41, 55.42, 52.26, 50.60, 47.75, 38.76, 27.90 ppm; IR (KBr): ν = 2932, 1677 (C=O), 1326, 1106 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₀H₂₀F₃N₂O₂: 377.1474 [M+H⁺]; found: 377.1474 (error: 0 ppm).



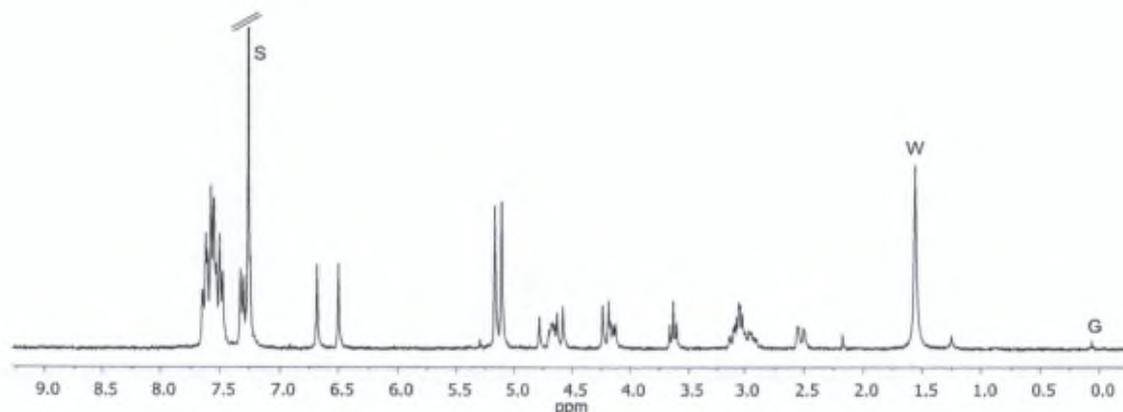
S = solvent, W = water, G = grease

Synthesis of 2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-8,9-bis((4-(trifluoromethyl)benzyl)oxy)-1,5,6,10b-tetrahydroimidazo[5,1-a]isoquinolin-3(2H)-one



Compound **13c** (0.048g, 0.21 mmol) were dissolved in a mixture of anhydrous THF and anhydrous DMF (7 mL/1 mL) and the solution was cooled to 0°C before adding the NaH (0.35 g, 0.87 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 15 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.200 g, 0.84 mmol) were added. The suspension was stirred at room temperature for 6h. After that, the excess NaH was neutralized with water and the reaction was concentrated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and filtrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (95/5) to obtain compound **26c**. White powder; 0.077 g, yield: 51 %; HPLC Purity: 91 %;

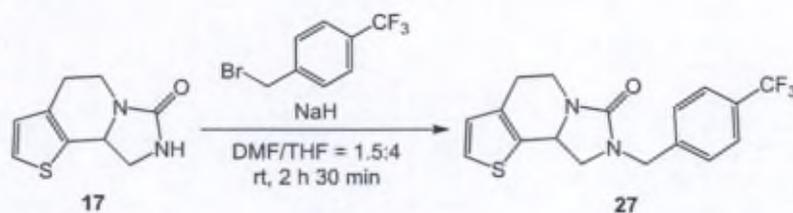
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.43-7.67 (m, 11H; Ar-H), 7.31 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz; Ar-H), 6.69 (s, 1H; Ar-H), 6.51 (s, 1H; Ar-H), 5.17 (s, 2H; OCH₂), 5.12 (s, 2H; OCH₂), 4.68 (m, 1H; NCH), 4.60 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz, NCHH), 4.09-4.27 (m, 2H, NCHH, NCHH), 3.63 (m, 1H, NCHH), 2.85-3.16 (m, 3H, NCH₂CHH, NCHH, NCHH), 2.52 ppm (m, 1H, NCH₂CHH); HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₅H₂₈F₉N₂O₃: 695.1938 [M+H⁺]; found: 695.1945 (error: 0 ppm).



S = solvent, W = water, G = grease

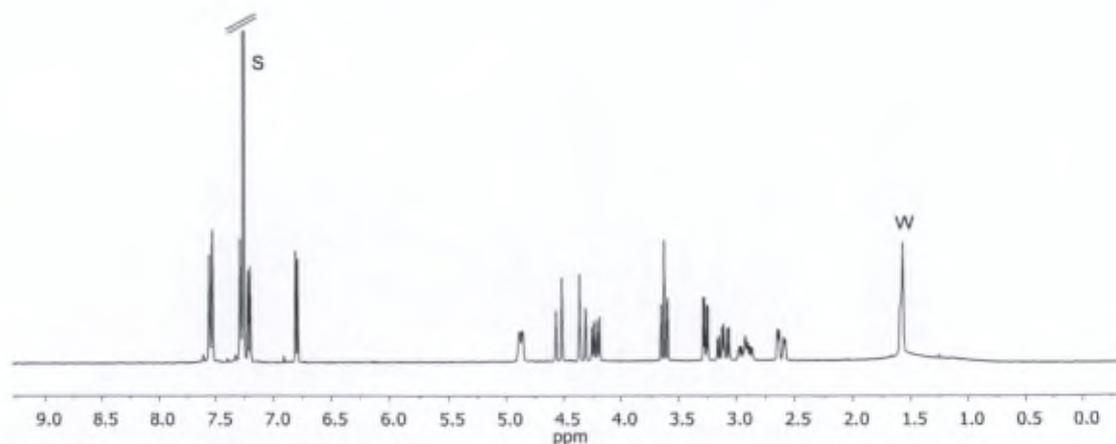
6.1.14 Synthesis of alkylated THTPI and THBTPI

Synthesis of 8-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-4,8,9,9a-tetrahydroimidazo[1,5-a]thieno[2,3-c]pyridin-7(5H)-one



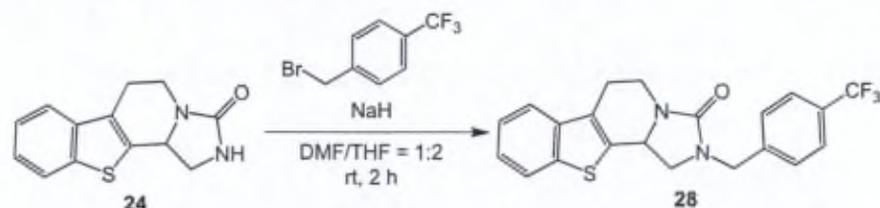
To a solution of **17** (0.048 g, 0.251 mmol) in a mixture of anhydrous DMF/THF (1.5 mL/4 mL), under Ar, cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.020 g, 0.500 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.114 mg, 0.476 mmol) was added. After 2 h and 30 min the reaction mixture was quenched with water and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/cyclohexane 90/10 then CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 100/0 to 90/10 to afford the desired product **27**. White powder; 0.052 g, yield: 60%; mp 74 °C; HPLC Purity: 95%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.54 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz; ArH), 7.28 (m, 2H; ArH), 7.21 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz; ArH), 6.80 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz; ArH), 4.86 (m, 1H; CONCH), 4.54 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz; NCHHPh), 4.33 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz; NCHHPh), 4.22 (dd, 1H, *J*₁ = 5.7 Hz, *J*₂ = 13.2 Hz; NCHHCH₂), 3.63 (dd, 1H, *J*₁ ≈ *J*₂ ≈ 9 Hz; NCHHCH), 3.26 (dd, 1H, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 8.7 Hz; NCHHCH), 3.11 (m, 1H; NCHHCH₂), 2.92 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.61 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.4 (C=O), 141.1, 135.6, 135.1, 128.2 (2C, CF₃CCH), 127.7, 125.7 (2C, *J* = 4 Hz, CF₃CCH), 123.9, 52.0 (NCHCH₂), 50.8 (NCH₂CH), 47.5 (NCH₂Ph), 39.1 (NCH₂CH₂), 24.4 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2930, 1679 (C=O), 1324, 1120, 1067, 699 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 353 [M+H]⁺, 375 [M+Na]⁺, 727 [2M+Na]⁺. The chemical shifts of CF₃ and CF₃C carbon atoms are not reported.



S = solvent, W = water

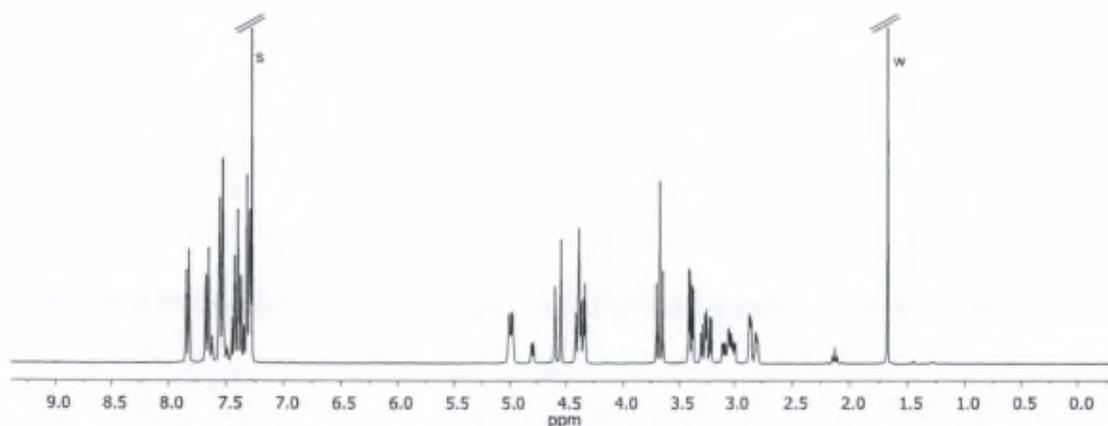
Synthesis of 2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,5,6,11b-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-c]imidazo[1,5-a]pyridin-3(2H)-one



To a solution of **24** (0.244 g, 0.434 mmol) in a mixture of anhydrous DMF/THF (3 mL/6 mL), under Ar, cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.033 g, 0.817 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and a solution of 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.239 mL, 0.826 mmol) in dry THF (2 mL) was added dropwise. After stirring for 2h at rt, the reaction mixture was quenched with water and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 98/2 to 90/10 then CH₂Cl₂/MeOH 95/5 to afford the desired product **28**. White foam; 0.151 g, yield: 86%; mp 188 °C; HPLC Purity: 96%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.81 (m, 1H; ArH), 7.64 (m, 1H; ArH), 7.52 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz; CH₂CCH), 7.44-7.32 (m, 2H; ArH), 7.29 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz; CF₃CCH), 4.97 (m, 1H; CONCH), 4.56 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz; NCHHPh), 4.42-4.29 (m, 2H; NCHHPh, NCHHCH₂), 3.65 (dd, 1H, *J*₁ = *J*₂ = 9 Hz; NCHHCH), 3.37 (dd, 1H, *J*₁ = 3.3 Hz, *J*₂ = 8.7 Hz; NCHHCH), 3.23 (m, 1H; NCHHCH₂), 3.02 (m, 1H; NCH₂CHH), 2.80 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.3, 140.9, 138.9, 138.7, 136.0, 130.2, 128.2 (2C, CF₃CCHCH), 125.8 (2C, *J* = 4 Hz, CF₃CCH), 125.7* (CF₃C), 125.0, 124.7, 122.8, 122.4, 121.3, 52.1 (NCHCH₂), 50.0 (NCH₂CH), 47.6 (NCH₂Ph), 38.8 (NCH₂CH₂), 22.8 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2945, 1677 (C=O), 1318, 1130, 1065, 749 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 403 [M+H]⁺, 827 [2M+Na]⁺.

* Chemical shift estimated using the HMBC spectrum. The chemical shift of the CF₃ carbon atom is not reported.

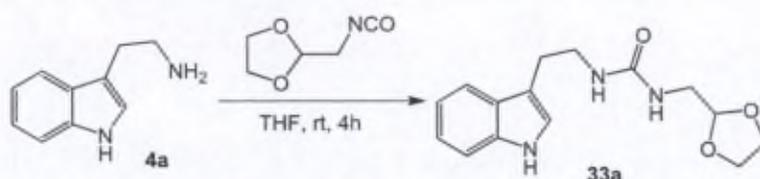


S = solvent, W = water

6.1.15 Synthesis of substrates for enantioselective cyclisation

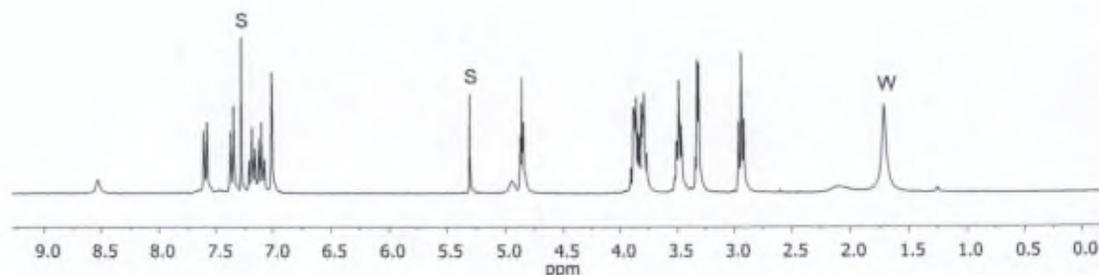
Synthesis of ureas

Synthesis of 1-((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)-3-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)urea



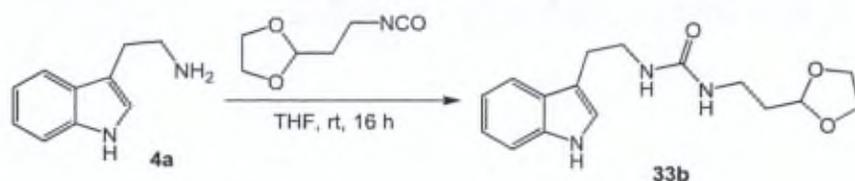
A solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 1.208 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added to a solution of tryptamine **4a** (0.167 g, 1.040 mmol) in anhydrous THF (10 mL) under argon. After stirring at room temperature for 4 h the solvent was evaporated to dryness and the residue purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford the desired product **33a**. Beige foam; 0.283 g, yield: 94%, mp 132 °C;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.51 (bs, 1H; ArNH), 7.57 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz; ArH), 7.17 (td, 1H; *J*₁ = 0.9 Hz, *J*₂ = 6.9 Hz ArH), 7.08 (m, 1H; ArH), 6.99 (s, 1H; NHCH), 4.93 (bs, 1H; NH urea), 4.84 (t, 1H, *J* = 3.9 Hz; OCH), 3.90-3.71 (m, 4H; OCH₂), 3.45 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz; NHCH₂CH₂), 3.30 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz; NHCH₂CH), 2.92 ppm (t, 1H, *J* = 6.6 Hz; NHCH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.8 (C=O), 136.4, 127.5, 122.3, 122.0, 119.3, 118.8, 113.0, 111.4, 102.6 (OCH), 65.2 (OCH₂), 43.0 (NHCH₂CH), 40.7 (NHCH₂CH₂), 25.8 ppm (NHCH₂CH₂); IR: ν = 3303, 2872, 1614, 1575, 1149, 751 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 579 [2M+H]⁺, 601 [2M+Na]⁺, 617 [2M+K]⁺, 890 [3M+Na]⁺.



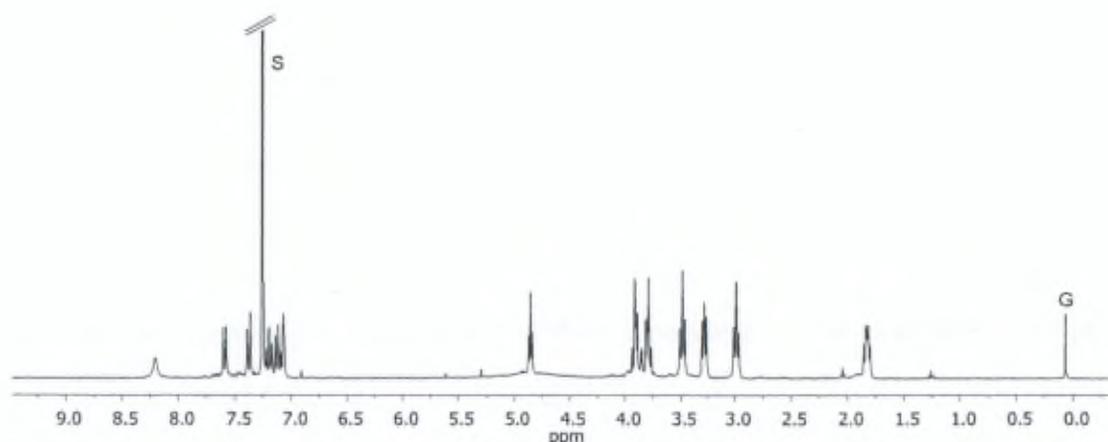
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl)-3-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)urea



A solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 2.23 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added to a solution of tryptamine **4a** (0.317 g, 1.970 mmol) in anhydrous THF (20 mL) under argon. After stirring at room temperature for 4 h the solvent was evaporated to dryness and the residue purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (95/5) to afford the desired product **33b**. Pale pink powder; 0.446 g, yield: 75%, mp 96 °C;

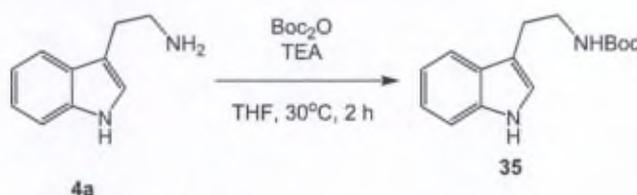
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.25 (bs, 1H; ArNH), 7.64 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.42 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz; ArH), 7.24 (td, 1H; *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz ArH), 7.16 (m, 1H; ArH), 7.11 (s, 1H; NHCH), 4.89 (t, 1H, *J* = 4.2 Hz; OCH), 4.00-3.77 (m, 4H; OCH₂), 3.53 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz; NHCH₂CH₂), 3.32 (m, 1H; NHCH₂CH₂CH), 3.03 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz; NHCH₂CH₂), 1.87 ppm (m, 1H; NHCH₂CH₂CH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.4 (C=O), 136.5, 127.5, 122.4, 122.2, 119.5, 118.8, 113.2, 111.4, 103.8 (OCH), 65.0 (OCH₂), 40.9 (NHCH₂CH₂C), 35.9 (OCHCH₂CH₂), 33.5, (OCHCH₂CH₂), 26.1 ppm (NHCH₂CH₂C); IR: ν = 3365, 2872, 1606, 1575, 1151, 738 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 629 [2M+Na]⁺.



S = solvent, G = grease

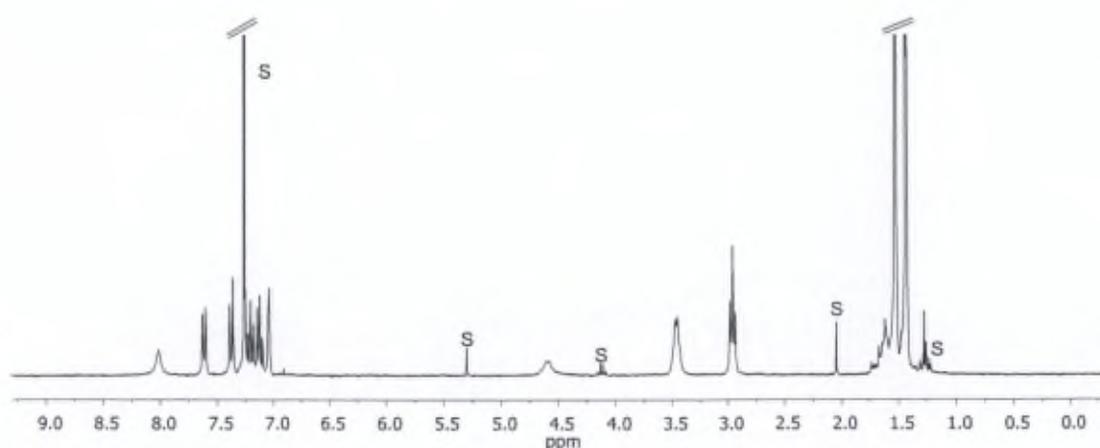
Synthesis of imidazolone 34

Synthesis of tert-butyl (2-(1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate



Di-tert-butyl dicarbonate (1.000 mL, 4.352 mmol) was heated on a water bath (35 °C) and added dropwise to a solution of tryptamine **4a** (0.500 g, 3.120 mmol) and triethylamine (0.610 mL, 4.340 mmol) in anhydrous THF (50 mL). After stirring at 30°C for 2 h the solvent was evaporated to dryness. The residue was then dissolved in AcOEt (10 mL) and washed with water (20 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (2 × 10 mL), the combined organic fractions were washed once more with water (5 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound **35**. That still contained 20 % *t*-BuOH. Transparent oil; 1.100 g, yield: quant.

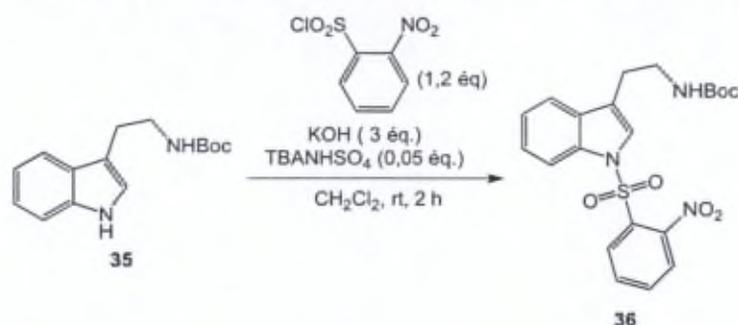
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (bs, 1H; ArNH), 7.61 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.37 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz; ArH), 7.21 (td, 1H, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 6.9 Hz; ArH), 7.13 (dd, 1H, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 6.9 Hz; ArH), 7.04 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz; NHCH), 4.59 (bs, 1H; NHBoc), 3.46 (m, 2H, NHCH₂), 2.96 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz; NCH₂CH₂), 1.43 ppm (s, 9H; *t*-Bu). The ¹H NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) is in accordance with the one described in the literature.¹⁹¹



S = solvent

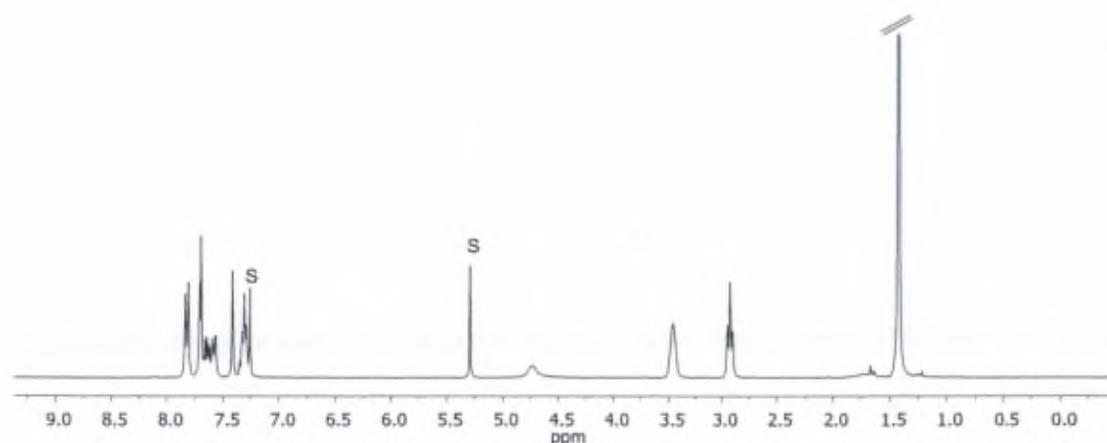
¹⁹¹ In, J.; Hwang, S.; Kim, C.; Seo, J. H.; Kim, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 965-971.

Synthesis of tert-butyl (2-(1-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate



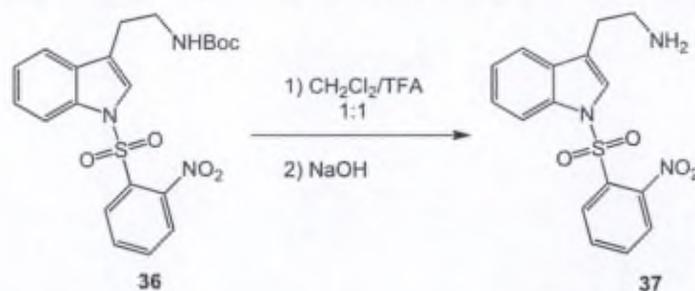
Boc protected tryptamine **35** (2.130 g, 8.182 mmol), KOH (1.388 g, 24.741 mmol), and tetrabutylammonium hydrogensulfate (0.139 g, 0.409 mmol) were placed in a round bottom flask. CH_2Cl_2 (40 mL) was added and the suspension was stirred for 15 minutes at rt. Nosyl chloride (2.380 g, 10.739 mmol) was then added in small portions and the mixture was stirred at room temperature for another 2 h. Water was afterwards added (25 mL) and the two layers were separated. The organic phase was washed with brine (2×25 mL), dried with MgSO_4 , filtered and concentrated. The crude product was purified using automatic flash chromatography system ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient from 100:0 to 99:1) to afford the desired compound **36**. Brown oil; 2.800 g, yield: 79 %;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.82 (d, 2H, J = 7.5 Hz; ArH), 7.75-7.52 (m, 4H; ArH), 7.42 (s, 1H; ArH), 7.38-7.28 (m, 2H, ArH), 4.73 (bs, 1H; NHBoc), 3.46 (m, 2H, NHCH_2), 2.93 (t, 2H, J = 6.6 Hz; NCH_2CH_2), 1.43 ppm (s, 9H; *t*-Bu). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 156.0 (C=O), 148.0, 135.1, 134.9, 132.5, 132.0, 130.9, 130.0, 125.2, 125.0, 124.4, 123.9, 120.0, 113.6, 40.1 (NHCH_2CH_2), 28.5 (*t*-Bu), 25.8 (NHCH_2CH_2); IR: ν = 3433, 2977, 1698, 1545, 1177, 736 cm^{-1} ; ESI-MS: m/z found 468 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 484 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 913 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.



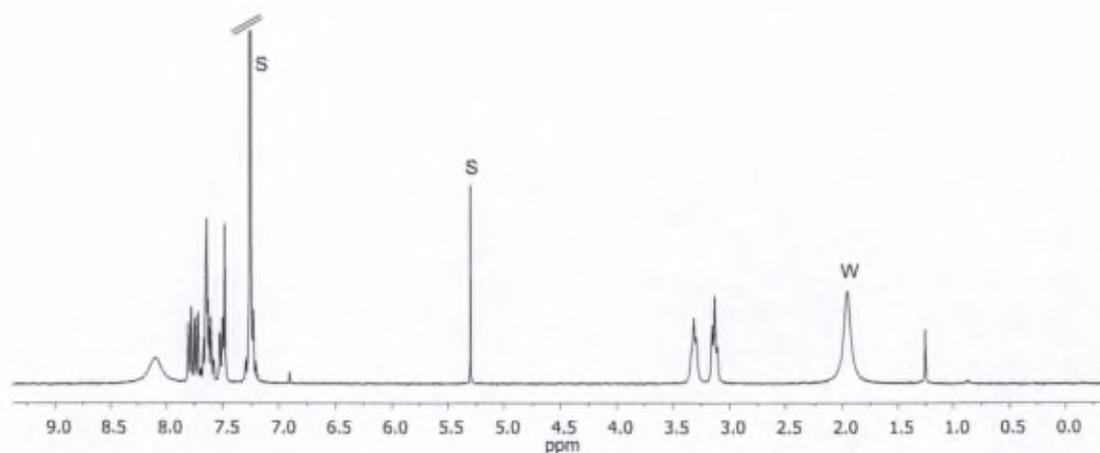
S = solvent

Synthesis of 2-(1-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethan-1-amine



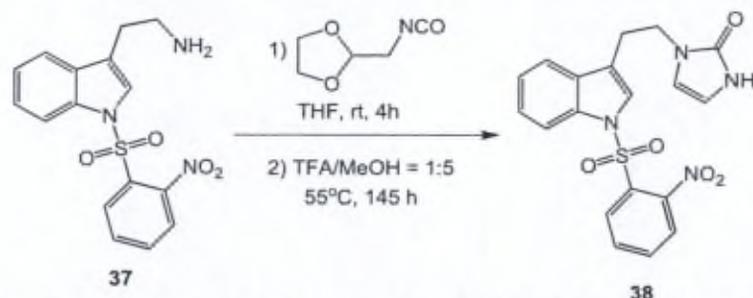
Compound **36** (0.400 g, 0.898 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL), TFA (2.5 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 4 h. The solvent was evaporated to dryness and the solid residue was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL). NaOH was added (3M, 5 mL) and the new mixture was stirred at room temperature for 2 h. The two layers were then separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3×10 mL). The combined organic layers were dried on MgSO_4 and concentrated to give compound **37**. Brown oil; 0.279 g, yield: 90 %;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.79 (d, 1H, J = 7.5 Hz; ArH), 7.73 (dd, 1H, J_1 = 1.5 Hz, J_2 = 7.2 Hz; ArH) 7.68-7.56 (m, 3H; ArH), 7.55-7.45 (m, 2H, ArH), 7.32-7.18 (m, 2H, ArH), 3.32 (t, 2H, J = 6.6 Hz; NHCH_2), 3.13 (t, 2H, J = 6.9 Hz; NCH_2CH_2).



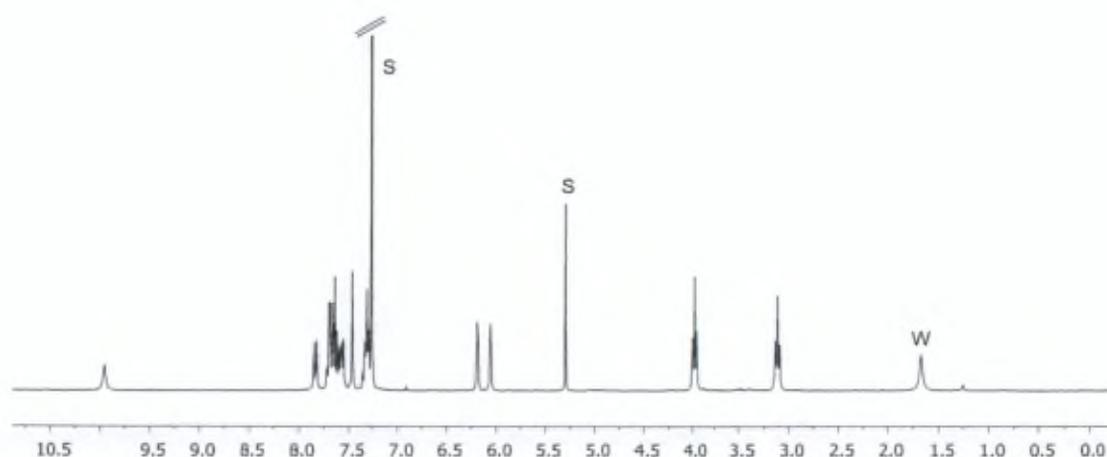
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(2-(1-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



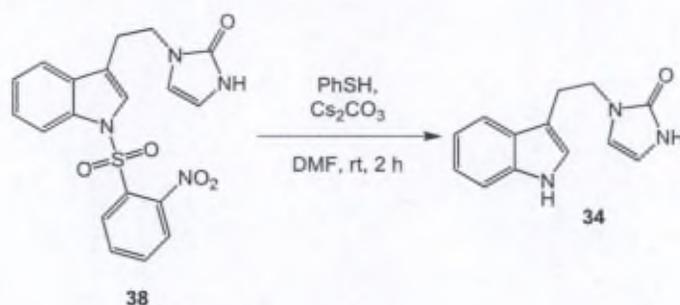
A solution of freshly prepared crude isocyanate **3a** (theor. 1.057 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added to a solution of amine **37** (0.279 g, 0.8078 mmol) in anhydrous THF (5 mL) under argon. After stirring at room temperature for 5 h, the solvent was removed and the residue was dissolved in MeOH (15 mL). TFA (3 mL) was added and the mixture was stirred at 50 °C for 145 h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and the residue suspended in dichloromethane (30 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 × 10 mL). The combined organic layers were dried on MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified using an automatic flash chromatography system [CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 100:0 to 90:10)] to afford the desired compound **38**. Pale yellow powder; 0.213 g, yield: 64%; mp 214 °C; HPLC Purity: 97%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.96 (bs, 1H; NH), 7.83 (dd, 1H, *J*₁ = 1.8 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz; ArH), 7.75-7.51 (m, 5H; ArH), 7.46 (s, 1H; ArH), 7.31 (m, 1H, ArH), 6.19 (m, 1H; CH=CH), 6.06 (m, 1H; CH=CH), 3.98 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂), 3.12 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 154.6, 148.0, 135.2, 134.8, 132.6, 132.1, 130.7, 129.7, 125.4, 125.0, 124.6, 124.0, 119.7, 119.2, 113.8, 111.6 (CH=CH), 108.2 (CH=CH), 42.8 (NCH₂CH₂), 25.3 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 1673, 1547, 1374, 1178, 752 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 435 [M+H]⁺, 451 [M+H]⁺, 847 [2M+H]⁺, 863 [2M+K]⁺.



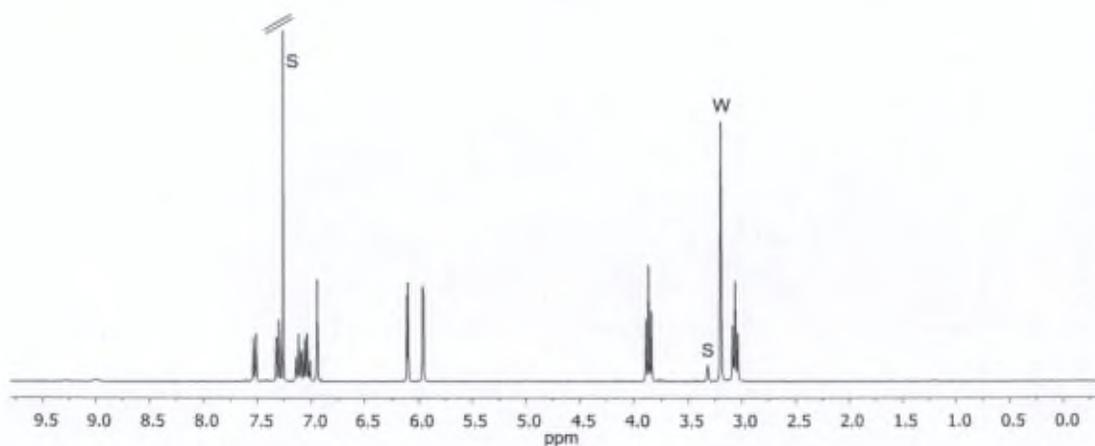
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



Cs_2CO_3 (1.070 g, 3.284 mmol) is dispersed in DMF (10 mL), then thiophenol (0.280 mL, 2.719 mmol) is added and the mixture is stirred for 10 minutes at room temperature. Compound **38** (0.456 g, 1.105 mmol) is dissolved in DMF (8 mL) and added dropwise to the suspension containing the thiophenolate. After stirring at room temperature for 2 h CH_2Cl_2 and MeOH (15:5 mL) was added and the mixture was filtered. The supernatant was concentrated and purified by flash chromatography [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (1/1) then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient from 97:3 to 90:10)] to afford the desired compound **34**. White powder; 0.178 g, yield: 71%; mp 180 °C; HPLC Purity: 98%;

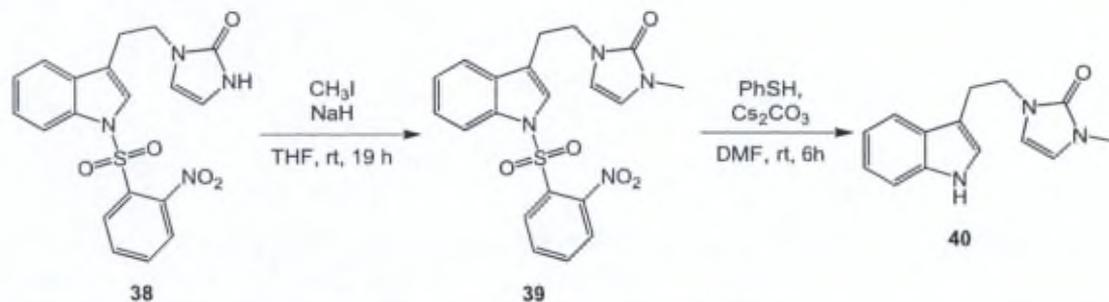
^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 10:1): δ = 9.00 (bs; ArNH), 7.53 (m, 1H; ArH), 7.31 (m, 1H; ArH), 7.12 (td, 1H, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz; ArH), 7.04 (td, 1H, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz; ArH), 6.94 (s, 1H; NHCHC), 6.10 (d, 1H, $J = 3$ Hz; CH=CH), 5.96 (d, 1H, $J = 3$ Hz; CH=CH), 3.87 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz; NCH_2), 3.06 ppm (t, 2H, $J = 7.2$ Hz; NCH_2CH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 10:1): δ = 154.0, 136.3, 127.2, 122.5, 121.8, 119.1, 118.3, 112.2 (CH=CH), 111.6, 111.3, 107.5 (CH=CH), 43.8 (NCH_2CH_2), 25.5 ppm (NCH_2CH_2); IR: ν = 3243, 1678, 1456, 1235, 739, 676 cm^{-1} ; ESI-MS: m/z found 477 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 493 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$, 704 [$3\text{M}+\text{Na}$] $^+$.



S = solvent, W = water

Synthesis of alkylated imidazolones

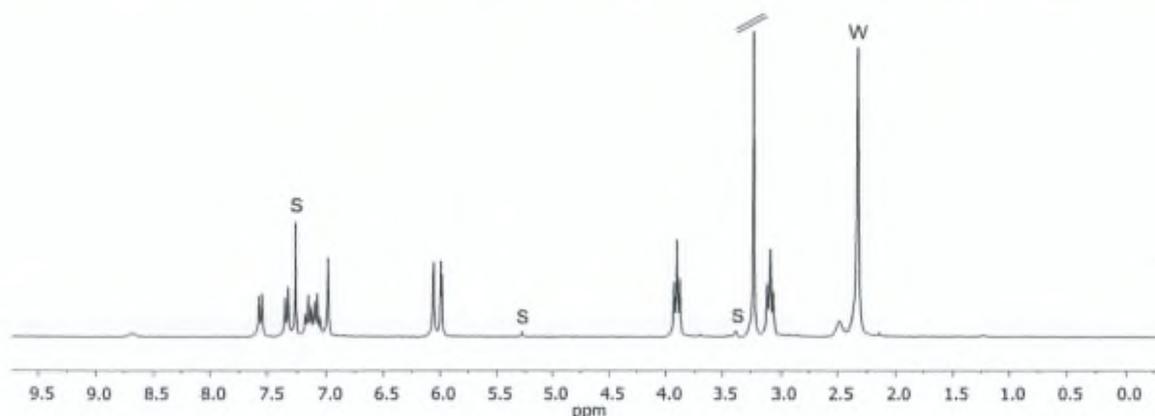
Synthesis of 1-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-3-methyl-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



To a solution of **38** (0.050 g, 0.1212 mmol) in anhydrous THF (3 mL), cooled to 0 °C, NaH (60% in mineral oil, 0.006 g, 0.155 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature and methyl iodide (0.011 mL, 0.176 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 19 h and concentrated to dryness. After 2h the reaction was not completed, while after 7 h compound **40** was observed on TLC. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH gradient from 99/1 to 90/10 to give a mixture of the desired product **39** and **40**.

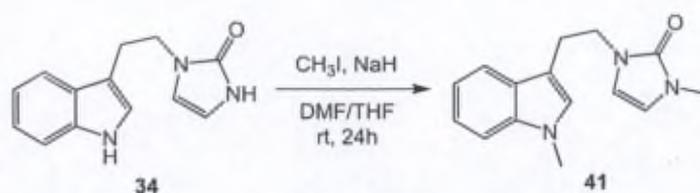
This mixture was dissolved in DMF (1 mL) and added to a suspension containing CsCO₃ (0.090 g, 0.276 mmol) and thiophenol (0.023 mL, 0.225 mmol) in DMF (0.5 mL, rinse with another 0.5 mL). After stirring at room temperature for 6 h CH₂Cl₂ and MeOH (10:3 mL) was added and the mixture was filtered. The supernatant was concentrated and purified by flash chromatography [CH₂Cl₂/AcOEt (1/1) then CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 95:5 to 90:10)] to afford the desired compound **40**. White powder; 0.024 g, yield: 82%; mp 164 °C;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 25:1): δ = 8.68 (bs; ArNH), 7.56 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz; ArH), 7.15 (m, 1H; ArH), 7.08 (m, 1H; ArH), 6.98 (s, 1H; NHCHC), 6.06 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 5.99 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 3.91 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂), 3.22 (s, 3H; CH₃), 3.09 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD; 25:1): δ = 153.3 (C=O), 127.3, 122.4, 121.9, 119.3, 118.5, 112.0, 111.3, 111.2 (CH=CH), 110.8 (CH=CH), 44.3 (NCH₂CH₂), 30.5 (CH₃), 25.6 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3180, 1657, 1485, 1237, 745, 666 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 505 [2M+Na]⁺, 521 [2M+K]⁺.



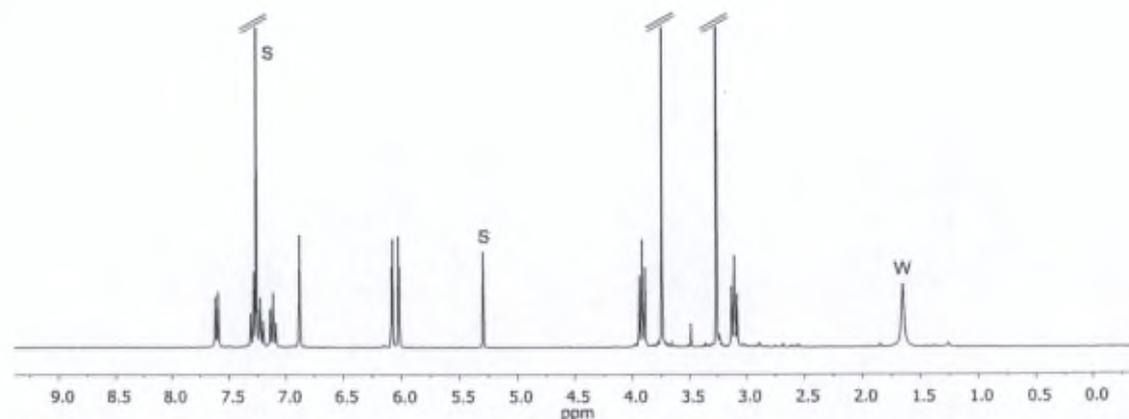
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-methyl-3-(2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)ethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



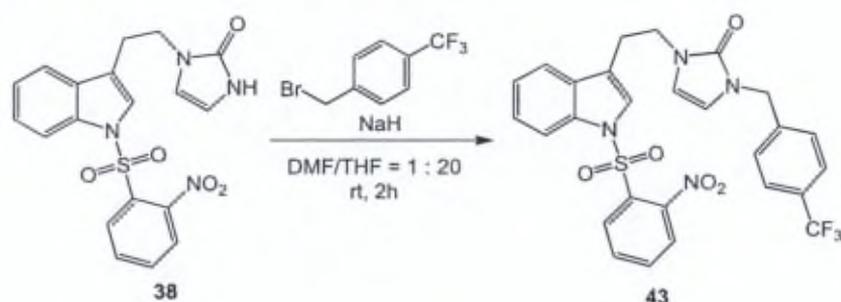
Compound **34** (0.100 g, 0.440 mmol) and NaH (60% in mineral oil, 0.053 g, 1.325 mmol) were placed in a round bottom flask and anhydrous THF (2 mL) was added. The mixture was stirred for 10 min at room temperature and methyl iodide (0.070 mL, 1.124 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 24 h, the methyl iodide excess was neutralised with sodium acetate and the solvent was evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/MeOH gradient from 98/2 to 95/15 to give the desired product **41**. Pale yellow powder; 0.108 g, yield: 96%; mp 20 °C;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.61 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.34-7.18 (m, 2H; ArH), 7.11 (m, 1H; ArH), 6.88 (s, 1H; NHCHC), 6.08 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 6.02 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 3.91 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂), 3.74 (s, 3H; CH₃), 3.26 (s, 3H; CH₃), 3.11 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 153.3 (C=O), 137.1, 127.8, 127.1, 121.8, 119.0, 118.9, 111.1, 111.0 (CH=CH), 110.5 (CH=CH), 109.4, 44.4 (NCH₂CH₂), 32.8 (CH₃), 30.5 (CH₃), 25.6 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 2933, 1668, 1472, 1236, 736, 676 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 533 [2M+Na]⁺, 549 [2M+K]⁺.



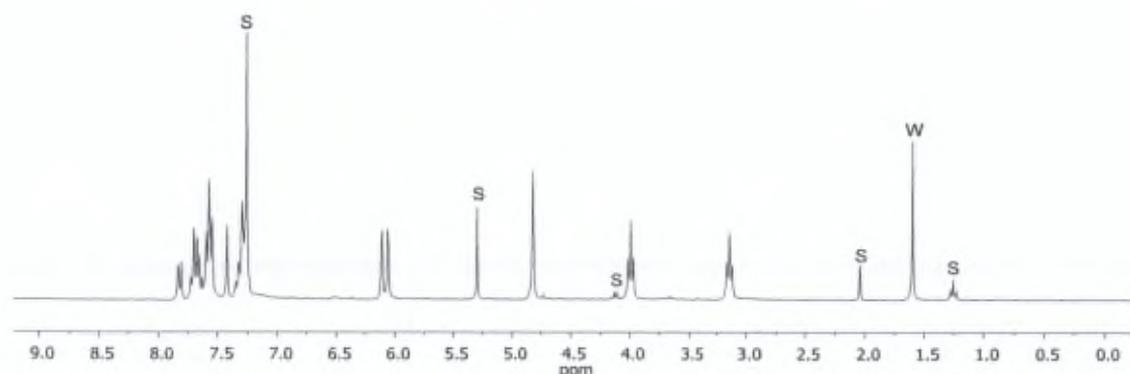
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(2-(1-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)-3-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one



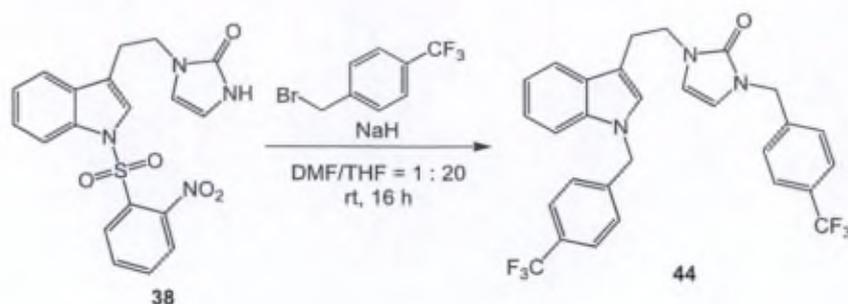
Compound **38** (0.300 g, 0.727 mmol) was dissolved in anhydrous THF (30 mL) and the solution was cooled to 0 °C prior to adding the NaH (60% in mineral oil, 0.060 g, 1.500 mmol). 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.207 g, 0.866 mmol) was then added, followed by anhydrous DMF (1.5 mL). The suspension was stirred at room temperature for 2 h then quenched with MeOH and concentrated in vacuum. The crude product was purified using an automatic flash chromatography system [CH₂Cl₂/MeOH gradient from 100/0 to 90/10] to give compound **43**. The fraction containing the product was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with brine to remove the DMF traces. Bright yellow foam; 0.114 g, yield: (52%) - calculated based on the NMR spectrum of different fractions; mp 56 °C (dec.); HPLC Purity: 95%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.81 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz; ArH), 7.76-7.61 (m, 3H; ArH), 7.61-7.48 (m, 3H; ArH), 7.42 (s, 1H; ArH), 7.37-7.20 (m, 4H; ArH), 6.13 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 6.06 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 4.82 (s, 2H; CH₂Ph), 3.99 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂), 3.14 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 141.1, 135.1, 134.7, 132.6, 132.1, 130.7, 129.9, 127.9 (2C, CF₃CCHCH), 125.9 (2C, *J* = 3.8 Hz; CF₃CCH), 125.3, 125.0, 124.7, 124.0, 119.8, 119.1, 113.7, 111.2 (CH=CH), 110.1 (CH=CH), 46.8 (CH₂Ph), 43.8 (NCH₂CH₂), 25.2 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 1679, 1543, 1325, 1121, 743 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 571 [M+H]⁺, 593 [M+Na]⁺, 1141 [2M+H]⁺. The chemical shifts of CF₃ and CF₃C carbon atoms are not reported.



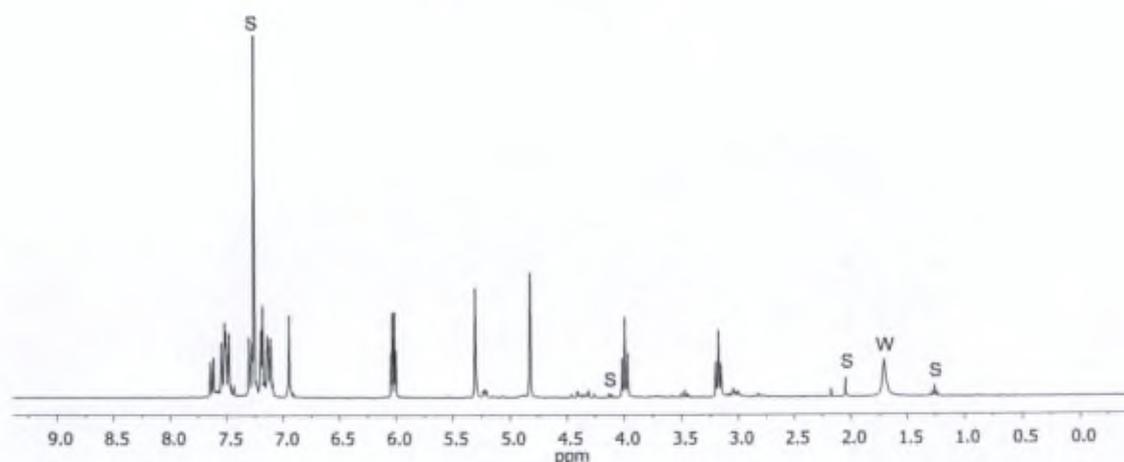
S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-3-(2-(1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-indol-3-yl)ethyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one

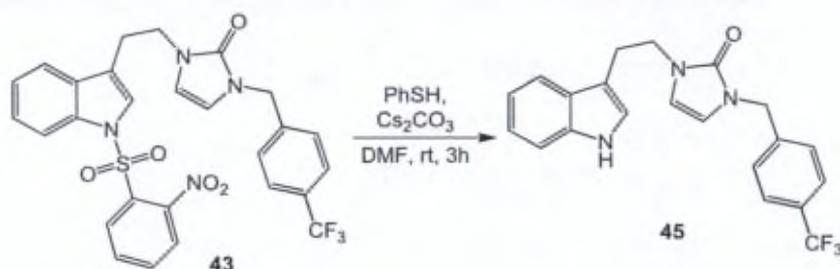


Compound **38** (0.150 g, 0.364 mmol) and NaH (60% in mineral oil, 0.029 g, 0.727 mmol) were placed in a round bottom flask and a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (0.150 mL/10 mL) was added. The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.109 g, 0.457 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 16 h then concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 95/5 to 90/10 to give compound **44**. Yellow foam; 0.075 g, yield: 38%; mp 52°C (dec.); HPLC Purity: 80%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.63 (m, 1H; ArH), 7.56-7.45 (m, 4H; CF₃CCH), 7.29 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz; CF₃CCHCH), 7.22-7.16 (m, 2H; ArH), 7.13 (m, 2H; CF₃CCHCH) 6.95 (s, 1H; NCHC), 6.04 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 6.01 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 5.30 (s, 2H; ArNCH₂Ph), 4.83 (s, 2H; CONCH₂Ph), 3.99 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂), 3.18 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 153.1, 141.8, 141.3, 136.6, 128.2, 128.0 (2C; ArNCH₂CCH), 126.9 (2C; CONCH₂CCH), 126.5, 125.8 (2C, *J* = 3.7 Hz, CF₃CCH), 122.3, 119.6, 119.1, 112.2, 111.5 (CH=CH), 109.7, 109.5 (CH=CH), 49.5 (ArNCH₂Ph), 46.8 (CONCH₂Ph), 44.4 (NCH₂CH₂), 25.4 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 1678, 1467, 1324, 1112, 1066, 742 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 544 [M+H]⁺. The chemical shifts of CF₃ and CF₃C carbon atoms are not reported.

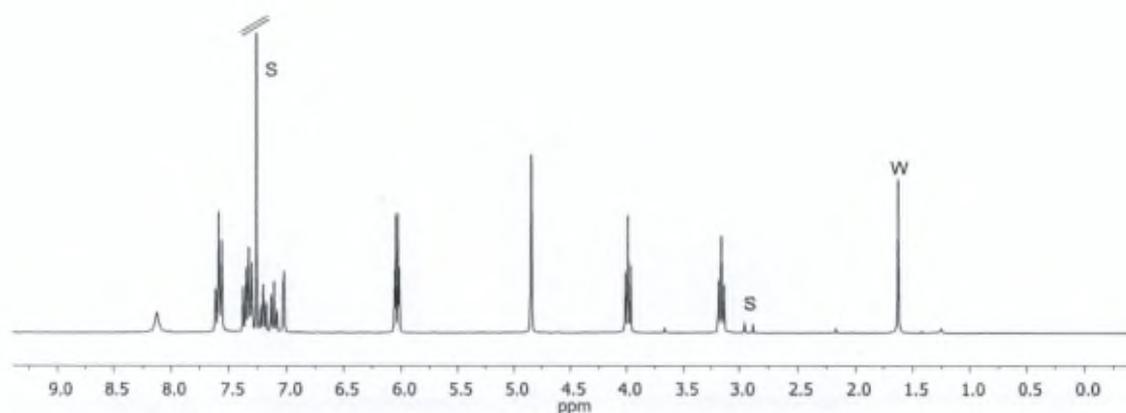


S = solvent, W = water

Synthesis of 1-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-3-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-one


CsCO₃ (0.336 g, 1.031 mmol) is dispersed in DMF (2 mL), then thiophenol (0.090 mL, 0.874 mmol) is added and the mixture is stirred for 10 minutes at room temperature. Compound **43** (0.200 g, 0.350 mmol) is dissolved in DMF (2 mL) and added dropwise to the suspension containing the thiophenolate. After stirring at room temperature for 3 h the mixture was filtered. The supernatant was concentrated and purified by flash chromatography [CH₂Cl₂/AcOEt (8/2) then CH₂Cl₂/MeOH (gradient from 95:5 to 90:10)] to afford the desired compound **45**. Yellow powder; 0.108 g, yield: 80%; mp 140 °C; HPLC Purity: 99%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.13 (bs, 1H; NH), 7.65-7.53 (m, 3H; ArH), 7.40-7.28 (m, 3H; ArH), 7.20 (td, 1H, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 7.0 Hz; ArH), 7.11 (m, 1H; ArH), 7.02 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz; NHCH), 6.05 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 6.02 (d, 1H, *J* = 3 Hz; CH=CH), 4.85 (s, 2H; CONCH₂Ph), 3.99 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂), 3.16 ppm (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; NCH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 153.4 (C=O), 136.6, 128.3 (2C; NCH₂CCH), 127.7, 126.1 (2C, *J* = 3.8 Hz, CF₃CCH), 122.6, 122.5, 119.8, 119.0, 112.7, 111.7, 111.6 (CH=CH), 109.8 (CH=CH), 47.1 (NCH₂Ph), 44.6 (NCH₂CH₂), 25.9 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 1658, 1328, 1123, 1067, 664 cm⁻¹; ESI-MS: *m/z* found 386 [M+H]⁺, 793 [2M+Na]⁺. The chemical shifts of CF₃ and CF₃C carbon atoms are not reported.



S = solvent, W = water

6.1.16 Asymmetric cyclisation assays

All laboratory glassware and magnetic stirrers were dried in the oven and cooled in an inert atmosphere prior to use.

Solvents were freshly dried and distilled as follows:

- Dioxane – using Na/ benzophenon
- Toluene, Dichloroetane, DMF – using CaH_2

The HPLC method, used to determine the *ee* values for each compound is described in section 5.3.2.

General method for the asymmetric cyclisation of ureas (33a and 33b) and imidazolones (21, 23a-b, 24 and 34) assays using a 80 mM concentration of the substrate: experiments described in Tables 3.4, 3.5 and 3.8, Chapter III

The substrate (10-25 mg), a magnetic stirrer and the catalyst (different BINOL phosphoramides or BINOL phosphoric acids) are placed in a test tube, that is afterwards sealed with a rubber septum and an argon atmosphere is made. The freshly distilled dry solvent is then added via a syringe (0.5-1 mL – substrate concentration of 80 mM) and the mixture is stirred in different temperature and catalyst loading conditions (see Table 3.4, 3.5, 3.6 and 3.8 - Chapter III for details). In the case of bis(trifluoromethane)sulfonimide (Tf_2NH) a solution of 0.25 M in CH_2Cl_2 stored under inert atmosphere, was injected to the solution containing the substrate. Reactions were monitored by TLC. When heating was performed, only the bottom of the reactor was placed in an oil bath, at the appropriate temperature. No condenser was used. The solvent condenses on the walls of the tube and falls back in the reaction medium (Figure 6.1). If reactions take place, the solvent is evaporated and the crude product is purified by flash chromatography or by preparative TLC in order to measure the enantiomeric excess.

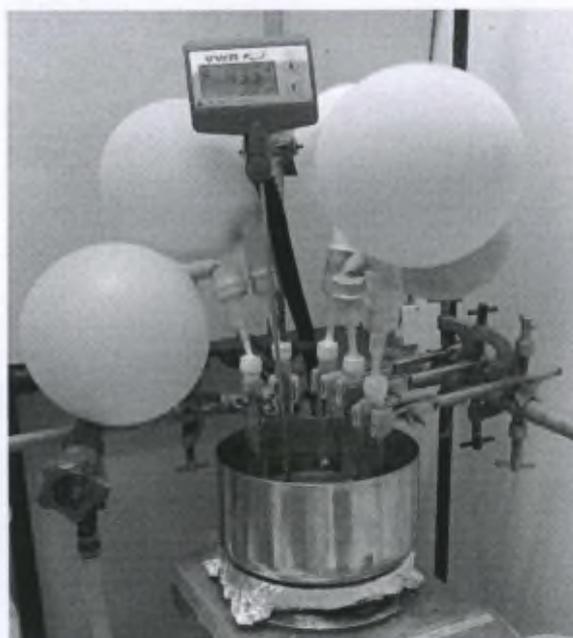
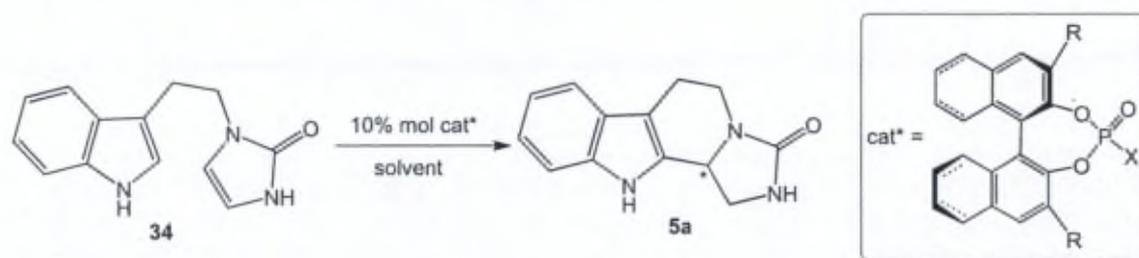


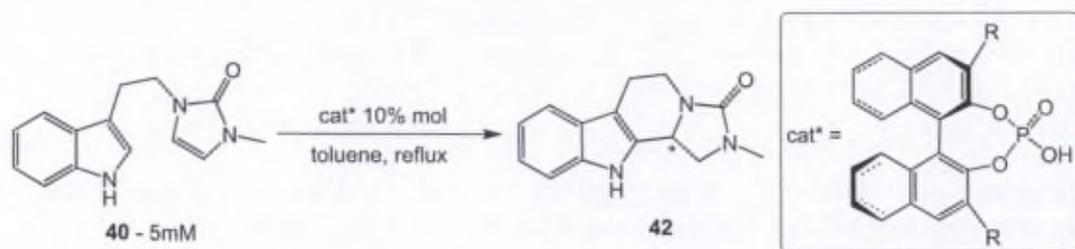
Figure 6.1 – Installation used for the catalyst and substrate screening for assays performed at a substrate concentration of 80 mM

Jacobsen's thiourea assay: experiments described in Table 3.7, Chapter III

The substrate (10-20 mg), a magnetic stirrer and the thiourea (10% mol - if used) are placed in a test tube, that is afterwards sealed with a rubber septum and an argon atmosphere is made. The freshly distilled dry dioxane is then added via a syringe (0.5-0.8 mL; substrate concentration of 80 mM), followed by the HCl (1 equiv.; 0.1 M in dry dioxane prepared under argon atmosphere from a 4 M solution) and the mixture is stirred in different temperature and catalyst loading conditions (see Table 3.4, 3.5 and 3.8 – Chapter III for details)

Asymmetric cyclisation assays of imidazolone 34 using a 5 Mm concentration of the substrate: experiments described in Tables 3.6, 3.9 and 3.10, Chapter III


The substrate (0.010 g, 0.041 mmol), a magnetic stirrer and the catalyst (10 % mol) are placed in a 25 mL two-neck round-bottom flask. A condenser is placed at the vertical neck and the other one is afterwards sealed with a rubber septum to allow sample withdraw and NMR ^1H control. An argon atmosphere is afterwards ensured. The freshly distilled dry solvent is then added via a syringe (8.3 mL – for a substrate concentration of 5 mM) and the mixture is stirred using different temperatures, solvents and catalyst (see Table 3.10 - Chapter III for details). The solvent is the evaporated and the crude product is purified by flash chromatography to afford compound **5a**.

Asymmetric cyclisation assays for imidazolones **40**, **41**, **44** and **45**Asymmetric cyclisations of imidazolone **40**

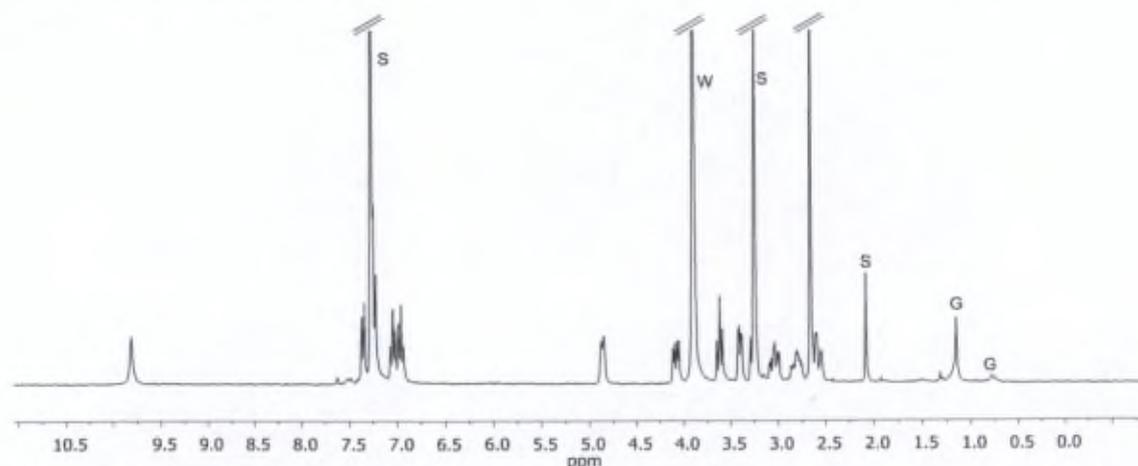
Imidazolone **40** (0.010 g, 0.041 mmol), a magnetic stirrer and the catalyst (10 % mol) are placed in a 25 mL two-neck round-bottom flask. A condenser is placed at the vertical neck and the other one is afterwards sealed with a rubber septum to allow sample withdraw and NMR ^1H control. An argon atmosphere is afterwards ensured. The freshly distilled dry toluene is then added via a syringe (8.3 mL –substrate concentration of 5 mM) and the mixture is stirred at reflux for 24h. The solvent is the evaporated and the crude product is purified by flash chromatography [first AcOEt 100% to remove the catalyst, then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, gradient from 95/5 to 90/10] to afford the desired compound **42**. White powder; mp. 208 °C;

R = $\text{SiPh}_3 \rightarrow ee = 87\%$, yield = 91%

R = 3,5-di- CF_3 -Ph $\rightarrow ee = 83\%$, yield = 97%

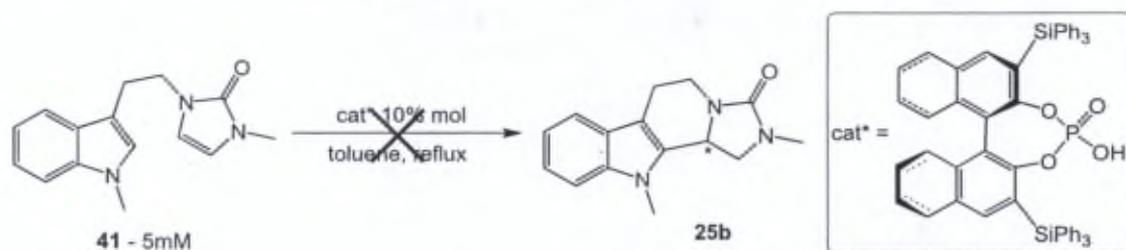
The cyclisation of compound **40** (0.008 g, 0.0357 mol) was also performed using HCl (0.500 mL, 2.8 M) as a catalyst in order to obtain the racemic version of compound **42** and validate the HPLC method used for determining the *ee* values.

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 11:1$): $\delta = 9.91$ (bs, 1H; NH), 7.36 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz; ArH), 7.32-7.17 (m, 1H; ArH), 7.05 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz; ArH), 6.97 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz; ArH), 4.87 (m, 1H; NCH), 4.09 (dd, 1H, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 13.5$ Hz; NCHHCH $_2$), 3.62 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NCHCHH), 3.40 (dd, 1H, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz; NCHCHH), 3.04 (m, 1H; NCHHCH $_2$), 2.80 (m, 2H; NCH $_2$ CHH), 2.66 (s, 3H; CH $_3$), 2.57 (dd, 1H, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 15.3$ Hz; NCH $_2$ CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 10:1$): $\delta = 161.6$ (C=O), 136.4, 131.9, 126.8, 122.0, 119.4, 118.2, 111.1, 109.2, 50.6 (NCHCH $_2$), 50.2 (NCH), 39.8 (NCH $_2$ CH $_2$), 30.8 (NCH $_3$), 19.9 ppm (NCH $_2$ CH $_2$); IR: $\nu = 2920, 2852, 1660$ (C=O), 1438, 782 cm^{-1} ESI-MS: *m/z* found 505 [2M+Na], 746 [3M+Na] $^+$.



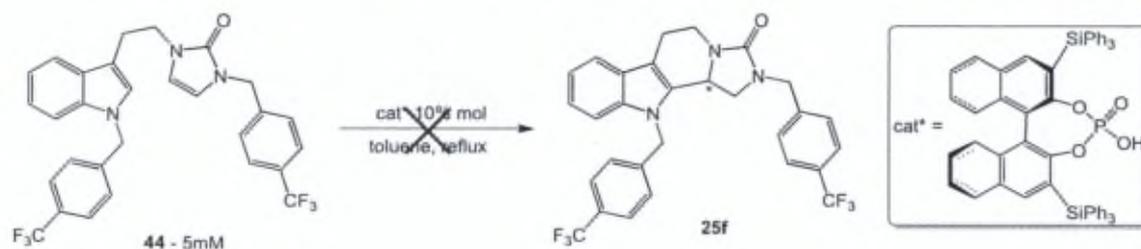
S = solvent, W = water, G = grease

Asymmetric cyclisation assays of imidazolone 41



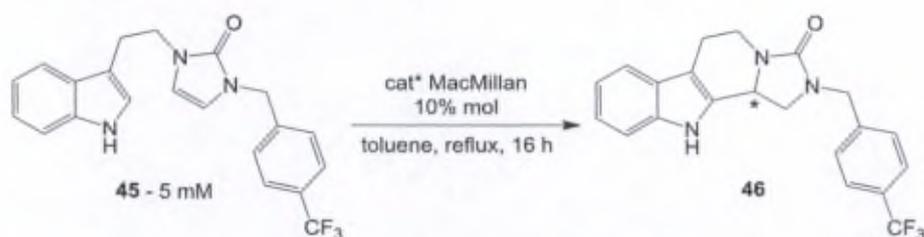
Imidazolone **41** (0.010 g, 0.039 mmol), a magnetic stirrer and the catalyst (3.3 mg, 10 % mol) are placed in a 25 mL two-neck round-bottom flask. A condenser is placed at the vertical neck and the other one is afterwards sealed with a rubber septum to allow sample withdraw and NMR ¹H control. An argon atmosphere is afterwards ensured. The freshly distilled dry toluene is then added via a syringe (7.8 mL –substrate concentration of 5 mM) and the mixture is stirred at reflux for 114 h but no reaction occurred.

Asymmetric cyclisation assays of imidazolone 44



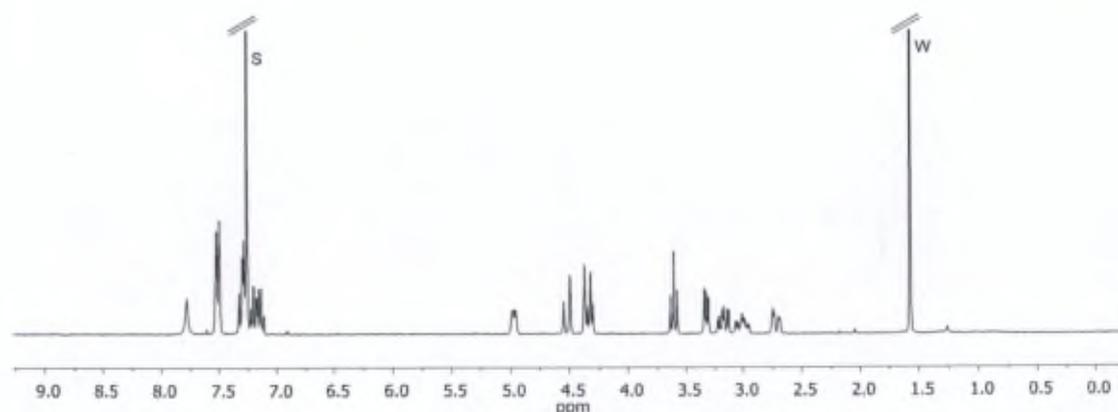
Imidazolone **44** (0.019 g, 0.037 mmol), a magnetic stirrer and the catalyst (3.3 mg, 10 % mol) are placed in a 25 mL two-neck round-bottom flask. A condenser is placed at the vertical neck and the other one is afterwards sealed with a rubber septum to allow sample withdraw and NMR ¹H control. An argon atmosphere is afterwards ensured. The freshly distilled dry toluene is then added via a syringe (7.3 mL –substrate concentration of 5 mM) and the mixture is stirred at reflux for 24 h but no reaction occurred.

Asymmetric cyclisation of imidazolone 45

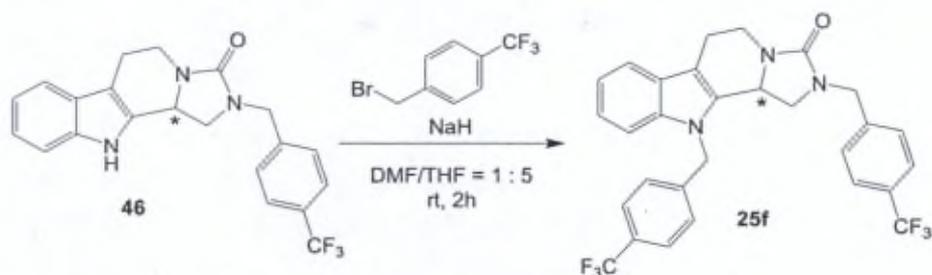


Imidazolone **45** (0.080 g, 0.207 mmol), a magnetic stirrer and the catalyst (20 mg, 10 % mol) are placed in a 100 mL two-neck round-bottom flask. A condenser is placed at the vertical neck and the other one is afterwards sealed with a rubber septum to allow sample withdraw and NMR ^1H control. An argon atmosphere is afterwards ensured. The freshly distilled dry toluene is then added via a syringe (41 mL – substrate concentration of 5 mM) and the mixture is stirred at reflux for 16h. The solvent is the evaporated and the crude product is purified by flash chromatography [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, gradient from 98/2 to 90/10] to afford the desired compound **46**. White powder; 0.075 g, yield: 94%; mp. 210°C, HPLC Purity: 99%; *ee*: 77%

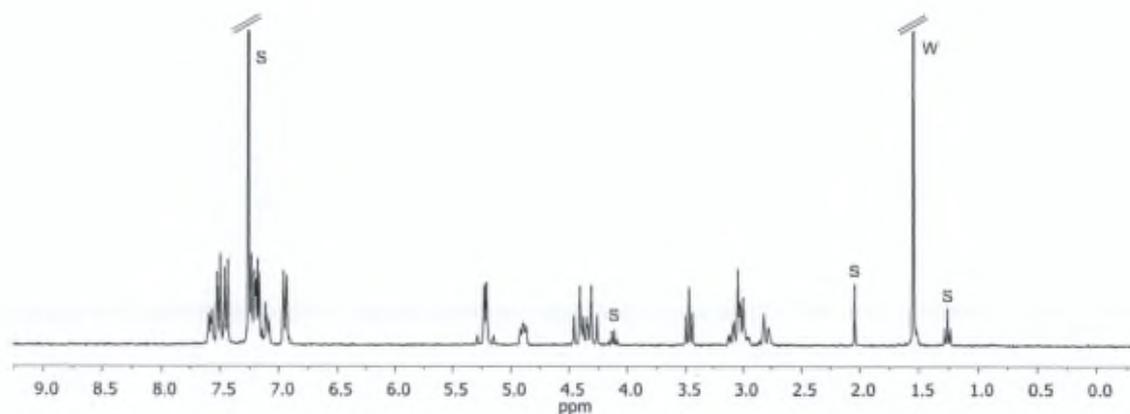
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.78 (bs, 1H; NH), 7.56-7.46 (m, 3H; ArH), 7.35-7.24 (m, 3H; ArH), 7.20 (td, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz; $J_2 = 7.2$ Hz; ArH), 7.14 (td, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz; $J_2 = 7.2$ Hz; ArH), 4.97 (m, 1H; CONCH), 4.52 (d, 1H, $J = 15.3$ Hz; NCHHPh), 4.41-4.27 (m, 2H; NCHHPh, NCHHCH₂), 3.60 (dd, 1H, $J_1 \approx J_2 \approx 9$ Hz; NCHCHH), 3.32 (dd, 1H, $J_1 = 3.6$ Hz; $J_2 = 8.4$ Hz; NCHCHH), 3.17 ppm (m, 1H; NCHHCH₂), 3.00 ppm (m, 1H; NCH₂CHH), 2.72 ppm (m, 1H; NCH₂CHH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 160.7 (C=O), 141.1, 136.4, 131.5, 128.2 (2C; CF_3CCHCH), 127.1, 125.8 (q, 2C, $J = 3.7$ Hz; CF_3CCH), 122.7, 120.1, 118.7, 111.1, 110.6, 50.2 (CONCH), 48.0 (NCHCH₂), 47.7 (NCH₂Ph), 39.8 (NCH₂CH₂), 20.1 ppm (NCH₂CH₂); IR: ν = 3307, 1671 (C=O), 1321, 1123, 1065, 743 cm^{-1} ; ESI-MS: m/z found 793 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$. The chemical shifts of CF_3 and CF_3C carbon atoms are not reported.



S = solvent, W = water

6.1.17 Alkylation of enantioenriched compound **46** to give compound **25f**

Compound **46** (0.039 g, 0.101 mmol) and NaH (60% in mineral oil, 0.014 g, 0.340 mmol) were placed in a round bottom flask and a mixture of anhydrous DMF and anhydrous THF (1 mL/5 mL) was added via syringe. The reaction was stirred at room temperature for 10 min then 4-(trifluoromethyl)benzyl bromide (0.052 g, 0.215 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 2 h then concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/AcOEt gradient from 98/2 to 90/10 to give compound **25f**. White foam; 0.051 g, yield: 93%; HPLC Purity: 94%; $[\alpha]_D^{20} = +55$ ($c = 0.98$ in CH₂Cl₂).



S = solvent; W = water

6.2 Physicochemical properties evaluation by HPLC

6.2.1 Purity test

Hewlett Packard 1100 MSD system

Column: Waters SymmetryShield RP₈, 4.6x150mm, 3.5 μ m (Serial No : T203011); injection volume: 10 μ L; mobile phase: MeOH/ H₂O (containing 0.05% TFA, pH = 3.14) or MeOH/ H₂O (containing 5% TEA and HCl, pH = 8.4). 5 wavelengths were monitored: 220, 254, 278, 285 and 320. The purity was evaluated using the wavelength where the compound had a maximum area. The purity values were corrected if supplementary peaks were observed at 320 nm.

a) mobile phase: MeOH/ H₂O (+ 0.05% TFA, pH = 3.14);

Compound	Purity (%)	% MeOH	RT (min) / λ_{max} (nm)	Concentration (mg/mL) in sample solvent	Flow (mL/min)
(+)-5d	94	55	6.274 / 278	0.1 in CH ₂ Cl ₂ /MeOH; 95:5	0.6
25a	93	55	7.145 / 282		
25b	89	55	8.578 / 282		
25d	98	70	10.554 / 282		
25r	91	55	9.662 / 278		
5h	91	40	5.336 / 278		
(-)-5d	94	55	6.843 / 278	0.5 in DMSO	0.6
25i	98	70	8.919 / 282		
(+)-25m	97	70	17.211 / 282		
25c	87	70	6.209 / 282		
5e	100	45	14.655 / 278		
(+)-5f	100	45	10.462 / 278		
25e	94	70	9.427 / 278		
25f ^a	92	75	10.457 / 278		
25p	98	70	6.453 / 278		
25t	97	60	9.645 / 282		
5g	99	55	4.684 / 278	0.5 in DMSO	1
25j	92	75	6.086 / 278		
25g	99	75	6.353 / 278		
25h	99	75	11.305 / 278		
25q	92	55	7.021 / 278		
25k	99	75	6.207 / 278		
25l	94	75	8.297 / 278		
25f ^b	100	75	9.144 / 278		
5a	92	55	6.608 / 278		
5b	99	55	5.822 / 278		
5c	97	55	6.150 / 278		
(+)-25n	87	70	5.460 / 282		
13a	100	35	5.042 / 265		
13b	99	35	7.408 / 278		

13c	100	25	4.163 / 282
26a	100	60	6.585 / 220
26b	100	60	9.756 / 220
26c	91	80	8.129 / 282
17	100	35	5.918 / 254
27	91	65	5.896 / 220

Table 6.1 - Compounds analysed using a HP system. Mobile phase: MeOH/ H₂O (+ 0.05% TFA, pH = 3.14). a) Samples coming from two different synthesis.

b) mobile phase: MeOH/ H₂O (250 mL H₂O +20 μ L TEA + HCl, pH = 8.7).

Compound	Purity (%)	RT (min) / λ_{max} (nm)	% MeOH	Concentration (mg/mL) in sample solvent	Flow (mL/min)
25o	95	4.802 / 278	60	0.5 in DMSO/MeOH; 97.5 : 2.5	0.8

Table 6.2 - Compounds analysed using a HP system. Mobile phase: MeOH/ H₂O (250 mL H₂O +20 μ L TEA + HCl, pH = 8.7)

ThermoQuest Surveyor System

Column: Waters SymmetryShield RP₈, 4.6x150mm, 3.5 μ m (Serial No : T203011); injection volume: 20 μ L; flow: 0.9 mL/min; mobile phase: MeOH/ H₂O (containing 0.1% HCOOH). Samples were injected at a concentration of 0.5 mg/mL in MeOH. The entire UV interval (200-400 nm) was monitored and the total scan chromatogram was used to determine the purity.

Compound	Purity (%)	% MeOH	RT (min)
21	95	50	6.21
22	99	50	5.85
(+)-25f	94	75	7.48
28	96	65	11.06
34	98	40	5.65
38	97	55	5.64
43	95	65	8.99
42	91	50	5.13
44	80	65	22.46
46	99	65	7.72

Table 6.3 - Compounds analysed using a ThermoQuest Surveyor system

6.2.2 Stability test

MeOH stability test

A 10^{-2} M solution of each compound is prepared using DMSO as a solvent. 100 μ L of this solution were mixed with 900 μ L of MeOH. The samples were then incubated at 37 °C. At each time of the analysis ($t = 0, 1, 2, 3$ and 7 days) 100 μ L of the solution is diluted with 900 μ L of MeOH and injected in the HPLC system according to the method described in the previous paragraph (2.1). $t = 0$ refers to a freshly prepared solution that is immediately injected in the HPLC system. Three injections were performed for each sample. The stability of a compound was calculated using the formula:

$$\text{Stability after } X \text{ days} = \frac{\text{Average peak area at } t = X \text{ days}}{\text{Average peak area at } t = 0 \text{ days}}$$

Culture medium stability test

A 10^{-2} M solution of each compound was prepared using DMSO as a solvent. 50 μ L of this solution is mixed with 450 μ L of cell culture media (RPML, EMEM or MEM). For each compound to be tested, 5 such solutions were prepared in HPLC vials, corresponding to $t = 0, 1, 2, 3$ and 7 days. The samples were then incubated at 37 °C. At each time of the analysis ($t = 0, 1, 2, 3$ and 7 days) a vial is taken out of the incubator, 1 mL of MeOH is added and the sample is analysed by HPLC according to the method described in the previous paragraph (2.1). $t = 0$ refers to a freshly prepared solution that is immediately injected in the HPLC system. Three injections were performed for each sample and the stability was calculated with the formula described above.

6.3 Other HPLC analysis

6.3.1 Chiral HPLC resolution of compound 25f

Column: Daicel Chiralpak - IB (Celulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilised on 5 μ m silica gel, 1 \times 25 cm); mobile phase n-hexane/2-propanol = 75/25; flow = 3.5 mL/min; injection volume: 500 μ L; sample concentration: 10 mg/mL; sample solvent: n-hexane/2-propanol=60/40. Fractions were collected manually.

Analytical assays.

Column: Daicel Chiralpak IA-3 (Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilised on 3 μ m silica gel, 0.46 \times 25 cm); mobile phase: n-hexane/2-propanol = 85/15; flow = 1 mL/min; injection volume: 100 μ L; Sample solvent: n-hexane/2-propanol = 75/25; detection: total scan from 210 to 400 nm.

Compound	RT (min)	Purity (%)
(-) 25f	11.473	99
(+) 25f	6.741	93

Table 6.4 – HPLC analysis of the two enantiomers of compound **25**

6.3.2 Enantiomeric excess evaluation

Column: Daicel Chiralpak IA-3 (Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilised on 3 μm silica gel, 0.46 \times 25 cm); mobile phase: n-hexane/2-propanol (see table); flow = 1 mL/min; injection volume: 20 μL ; detection: total scan from 210 to 400 nm.

Sample: compound dissolved in n-hexane/2-propanol = 1/1 at 0.25 mg/mL; Samples were filtered through 0.45 μM filters prior to analysis.

The *ee*% value was calculated with the formula:

$$ee = \frac{\text{Area of peak 1} - \text{Area of peak 2}}{\text{Area of peak 1} + \text{Area of peak 2}} \times 100$$

Compound	Mobile phase (n-heptane : 2-propanol)	RT1	RT2
5a	70 : 30	4.9	10.4
42	90 : 10	13.6	17.0
46	90 : 10	15.5	20.5
25f	80 : 20	9.3	11.2

Table 6.5 – HPLC methods used for the evaluation of the enantiomeric excess of THBCI derivatives

6.4 Pharmacology

6.4.1 Cell lines and cell culture media

Human and murine normal and cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), the European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, UK), the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany), Cell Line Services (Eppenheim, Germany) and PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). The code number and histological type of each of the cell lines used in the current study are:

- Human cancer cell lines: Hs683 oligodendroglioma (ATCC code HTB-138), U373 glioblastoma (ECACC code 08061901), SKMEL-28 melanoma (ATCC code HTB-72), A549 NSCLC (DSMZ code ACC107), MCF-7 breast cancer (DSMZ code ACC115) and PC-3 prostate cancer (DSMZ code ACC465);
- Human normal cell lines: NHDF dermic fibroblasts (PromoCell, code c-12300) and HaCat keratinocytes (Cell Line Services, code 330493);
- Mouse cancer cell line : B16F10 mouse melanoma (ATCC code CRL-6475).

The U373, Hs683, SKMEL-28, A549, PC-3, MCF-7 and HaCat cell lines were cultured in RPMI culture medium (Lonza; code 12-115F) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Lonza, FBS South America code DE14-801F). Cell culture media were supplemented with 4 mM glutamine (Lonza code BE17-605E), 100 µg/ml gentamicin (Lonza code 17-5182), and penicillin-streptomycin (200 units/ml and 200 µg/ml) (Lonza code 17-602E). The NHDF fibroblasts were cultured in Lonza medium (CC3132 KT FGM-2 BulletKit).

Cells were incubated at 37 °C in sealed (airtight) Falcon plastic dishes (Nunc, Invitrogen SA, Merelbeke, Belgium) in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

6.4.2 MTT assay

The overall growth level of human and mouse cancer cell lines, and human normal cell lines, was determined using the colorimetric MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, Belgium) assay.

The cell lines were incubated for 24 h in 96-microwell plates (cell concentration is shown in Table 6.6) to ensure adequate plating prior to cell growth evaluation. After 24 hours, cells were treated with increasing concentrations of the compound to be tested (9 concentrations ranging from 10⁻⁴ to 10⁻⁸ M in a semi logarithmical manner). After 72 hours of treatment, the cell culture medium is replaced with a solution of MTT (0.5 mg / mL) in RPMI medium without phenol red. After 3-5 hours of incubation, the 96-well plates are centrifuged for 10 min at 1000 rpm and are then inversed gently on absorbent paper to remove the MTT-containing medium.

The formazan crystals from the reduction reaction are then dissolved in DMSO (100 μ L/ well). The number of living cells after 72 h of culture in the presence (or absence: control) of the various compounds is directly proportional to the intensity of the violet colour, which is quantitatively measured by spectrophotometry—in our case using a Biorad Model 680XR (Biorad, Nazareth, Belgium) at a 570 nm wavelength (with a reference of 630 nm). Each experiment was carried out in sextuplicate.

	Cell line	Seeding concentration (cells/ mL)
Human cancer	U373 glioblastoma	10.000 - 18.000
	SKMEL-28 melanoma	18.000 - 20.000
	A549 lung cancer	10.000
	Hs683 olligodendrogloma	10.000
	PC3 prostate cancer	18.000 - 35.000
	MCF-7 breast cancer	18.000 - 20.000
Human normal	NHFD dermal fibroblasts	50.000
	HaCaT keratinocytes	50.000
Murine	B16F10 melanoma	8.000

Table 6.6 – Seeding concentration of the cell lines used in the MTT assay

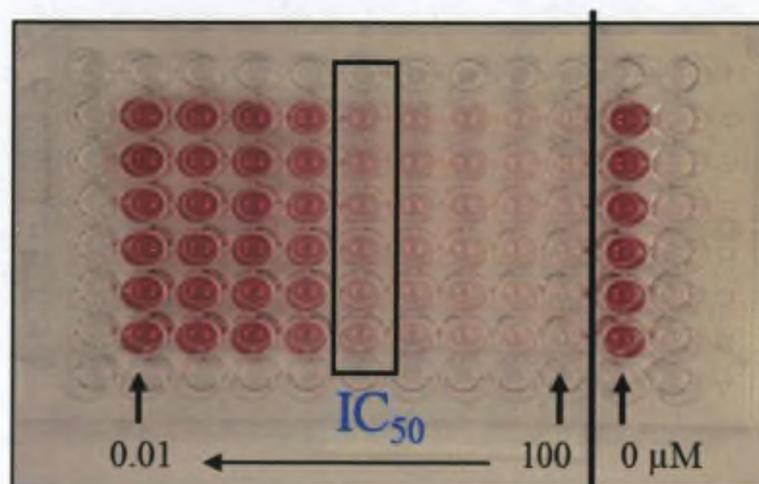


Figure 6.2 – A 96 well plate at the end of the MTT assay

6.4.3 Computer-assisted quantitative phase-contrast microscopy

Cells to be analysed were seeded in 25cm² culture flasks at 45.000 cells per flask. After 3 days, the medium is replaced with a solution containing either the compound (at its IC₅₀ determined by MTT assay), either 1% DMSO in cell culture media. These culture dishes were then placed under a contrast phase microscope situated in a thermostatically controlled (at 37°C) Plexiglas box. This microscope is connected to a camera that takes a picture of chosen

field of the culture dish, every 4 min, for the duration of the analysis (Figure 6.3). This image scanning and storage were accomplished using a software developed by Dr. Olivier Debeir (Laboratoire de l'Image, Synthèse et Analyse (LISA), Faculté des Sciences Appliquées, ULB).¹⁷⁸ Analyses usually last for three days and thus 1080 images are obtained for each of the experimental conditions. These 1080 can be put together to make an approximately one minute film that allows an accurate assessment of the influence of the treatment on the behaviour of a population of cells. Thus cell proliferation, migration, differentiation and death are analyzed quantitatively using a number of variables described in Chapter IV (§4.1.3).

Each experimental condition was performed in triplicate or quadruplicate.



Figure 6.3 – Left: The device used for computer-assisted videomicroscopy. Right: Illustration of cells seen in the microscope's field of view (A594 NSCLC cell line).

6.4.4 Kinase inhibition screening

Buffers

Kinase activities were assayed in triplicate using one of the following buffers:

- Buffer A (10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA (ethyleneglycoltetraacetic acid), 1 mM DTT (dithiothreitol), 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 µg heparin/mL),
- Buffer C (60 mM β-glycerophosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 25 mM Mops (pH 7.2), 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenylphosphate)
- Buffer D (10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris/HCl, 50 mg/ml Heparin)

Protocole

Kinase activities were assayed at 30 °C, in the presence of 15µM [γ-³³P] ATP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) at a final ATP concentration of 15 mM. After 30 min incubation at 30°C, the reaction was stopped by harvesting onto P81 phosphocellulose papers (Whatman) using a FilterMate harvester (Packard) and were washed in 1% phosphoric acid. Scintillation fluid was added and the radioactivity measured in a Packard counter. Blank values were subtracted and

activities expressed as % of the maximal activity in the absence of inhibitors. Controls were performed with appropriate dilutions of DMSO. IC_{50} values were calculated from dose response curves. The kinase peptide substrates were obtained from Proteogenix (Oberhausbergen, France).

Kinase Preparations and Assays

Dyrk1A (rat, recombinant, expressed in *E. coli* as a GST fusion protein) was purified by affinity chromatography on glutathione-agarose and assayed using Woodtide (KKISGRLSPIMTEQ) (1.5 μ g/ assay) as a substrate. Its kinase activity was assayed in buffer D.

CLK1 (mouse, recombinant, expressed in *E. coli* as a GST fusion protein) was assayed with RS peptide (GRSRSRSRSR) (1 μ g/assay). Its kinase activity was assayed in buffer D.

CDK5/p25 (human, recombinant) was reconstituted by mixing equal amounts of recombinant mammalian CDK5 and p25 expressed in *E. coli* as glutathione S-transferase fusion proteins and purified by affinity chromatography on glutathione-agarose (p25 is a truncated version of p35, the 35-kDa CDK5 activator). Its kinase activity was assayed in buffer C, with 1 mg histone H1/ml.

GSK-3 α/β (porcine brain, native) was assayed in Buffer A and using a GSK-3 specific substrate (GS-1:YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE) (Sp stands for phosphorylated serine).

CK1 δ/ϵ (porcine brain, native) was assayed in three-fold diluted buffer C, using 25 μ M CKS peptide (RRKHAAIGpSAYSITA), a CK1-specific substrat.

CDK1/cyclin B was extracted in from M phase starfish (*Marthasterias glacialis*) oocytes and purified by affinity chromatography on p9^{CKShs1}-Sepharose beads, from which it was eluted by free p9^{CKShs1}. Its kinase activity was assayed in buffer C, with 1 mg histone H1 per ml.

CDK2/cyclin A was reconstituted from extracts of SF9 insect cells infected with various baculoviruses. Cyclin A was a fusion protein with glutathione S-transferase and the complex was purified on glutathione-agarose beads. Its kinase activity was assayed in buffer C, with 1 mg histone H1 per ml.

CDK9/cyclin T (human, recombinant, expressed in insect cells) was assayed as described for CDK1/cyclin B, but using a pRB fragment (amino acid, 773–928) (3.5 μ g per assay) as a substrate.

6.4.5 Fluorescence microscopy

Hs683 oligodendroglioma and U373 glioma cells were cultured on glass coverslips, in 6 well plates to approximately 70-80% confluence. After a 3 h, 6 h and 24 h treatment in the presence (or absence: control) of the compound (tested at its IC_{50} obtained by the MTT assay), the cells were rinsed with PBS and fixed with a solution containing 4% formaldehyde (20 min at 4°C). Three coverslips were analyzed for each experimental condition. The cells are washed twice with PBS and then their plasma membrane is permeabilized with Tris buffer (10 mM Tris, 0.15 M

NaCl, pH 7.4) containing 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dithiothreitol (DTT), 10% (v/v) glycerol and 0.01% (v/v) Triton X-100. After several rinses in PBS, cells were incubated for two hours at room temperature in the dark with fluorescent phalloidin conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen) and DNase conjugated with Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Invitrogen) in a buffer containing 0.1% (m/v) BSA and 10% (v/v) glycerol. Coverslips were mounted on microscope slides with 10 μ L Vectashield agent. Pictures were obtained using a \times 40 microscope objective (Zeiss observer.Z1, Zeiss, Oberkochen, Germany) and an AxioCam HRm Zeiss camera controlled by software Vision.Rel.4.6 system Axio. Three pictures were taken (with the same exposure time) as follows:

Hs683

- Alexa 488 (green) : $\lambda_{\text{excitation}} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emission}} = 518 \text{ nm}$; excitation time = 220 ms
- Alexa 594 (red) : $\lambda_{\text{excitation}} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emission}} = 617 \text{ nm}$; excitation time = 3200 ms
- Brightfield : without excitation of the fluorochromes ; exposition time = 100 ms

U373n

- Alexa 488 (green) : $\lambda_{\text{excitation}} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emission}} = 518 \text{ nm}$; excitation time = 200 ms
- Alexa 594 (red) : $\lambda_{\text{excitation}} = 594 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emission}} = 617 \text{ nm}$; excitation time = 4090 ms
- Brightfield : without excitation of the fluorochromes ; exposition time = 90 ms

For each coverslip 10 images (containing the 3 pictures described above) were recorded. The most representative images are shown.

6.4.6 Analysis of the AP-1 family of transcription factors activity

The effect of compounds **25d**, **25f** and **25i** on the AP-1 transcription factor family was performed using the TransAM AP-1 Family kit from Active Motif. The kit contains a 96-well plate on which oligonucleotides that are specific for the different proteins belonging to the AP-1 are hybridized on the bottom of the wells.

The Hs683 cells were treated during 3 hours with 20 μ M of **25d**, **25f** or **25i**. After this treatment the nuclear proteins were extracted using the nuclear extraction kit from Active Motif (Active Motif, Rixensart, Belgium) according to the manufacturer instructions. Total protein concentration of the extracts was measured using the Bradford method since the BCA method and the BSA Folin reagent method interacted with the lysis buffer used in the extraction kit.

The first step of the AP-1 transcription factor assay was the binding of AP-1 to its consensus sequence. For this, 30 μ l of complete binding buffer, contained in the kit, was added to each well. Five micrograms of positive control nuclear extract diluted in 20 μ l of complete lysis buffer was added in the positive control wells, 20 μ l of complete lysis buffer was added in the blank well and 2.5 μ g of Hs683 nuclear extract (treated or not) diluted in 20 μ l of complete

lysis buffer was added in the other wells and incubated one hour at room temperature with mild agitation. Four replicates were assayed for each condition. After this incubation, the wells were washed three times. The second step of the experiment is the binding of the primary antibody. The different antibodies were diluted in the antibody binding buffer contained in the kit (phospho-c-jun: 1/500, c-Fos: 1/1000, FosB: 1/1000, Fra-1: 1/1000, JunB: 1/1000, and JunD: 1/1000) and 100µl was added on the attributed wells during one hour at room temperature without agitation. After this incubation, the wells were washed three times. The third step was the binding of the secondary antibody. For this, 100µl of diluted HRP-conjugated antibody (dilution 1/1000) was added to each wells and incubated for one hour at room temperature without agitation. After this incubation, the wells were washed four times. The last step was the colorimetric reaction where 100µl of developing solution was added to the wells during 10 min at room temperature protected from the light. The reaction was stop by addition of 100µl of stop solution and the absorbance was read on a spectrophotometer at 450nm with a reference wavelength of 655nm.

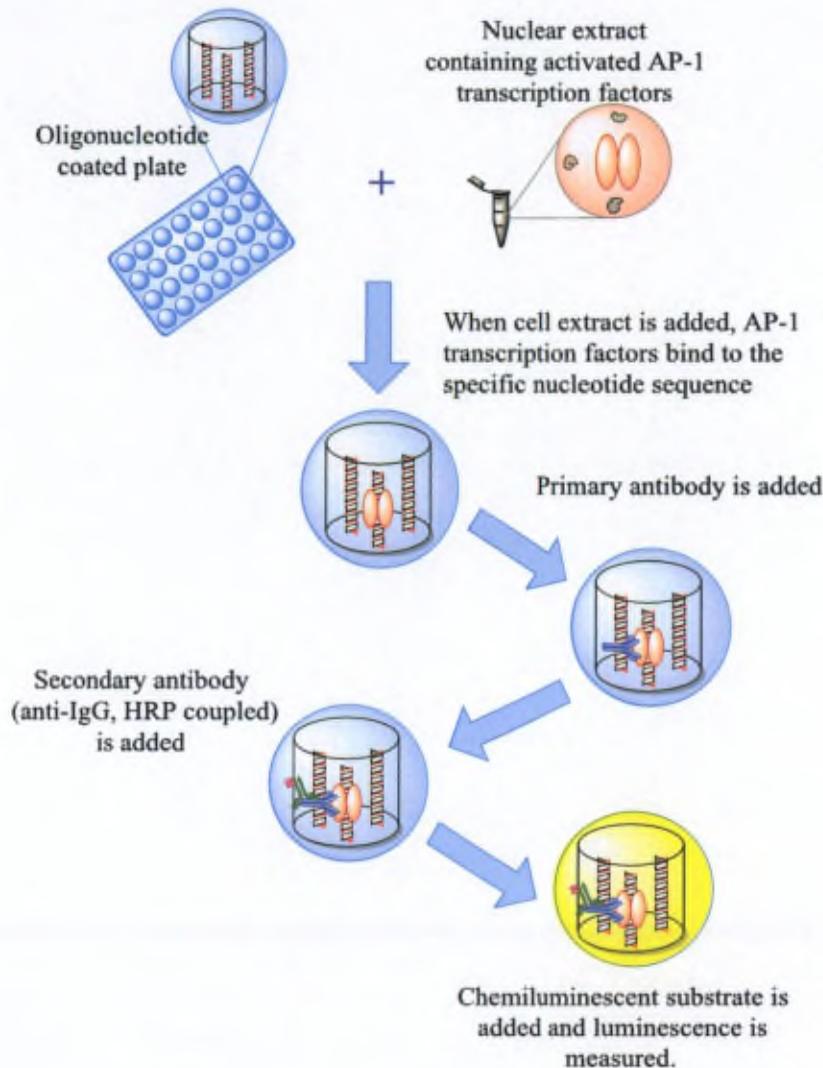


Figure 6.4 – Active Motif AP-1 family transcription factor assay kit

6.4.7 Cytokine secretion analysis

After 72 h of treatment with **25f**, cell culture supernatants were collected. The assay was performed according to the manufacturer's instructions with the Mosaic™ ELISA Human Cytokine Panel 1 kit (R&D Systems, # MEA001, Oxon, United Kingdom). The concept of this assay is based on classical ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) techniques. The assay allows the simultaneous quantitative determination of 8 different cytokines in a single sample through multiplex microarray technology.

After adding 50µL of Assay Diluent to each well, 50µL of standard or sample per well were added. The plate was then incubated for 2 hours at room temperature on a horizontal orbital microplate shaker set at approximately 500 rpm. Each well was aspirated and wash (for a total of four washes) with Wash Buffer (400µL). 50 µL was afterwards added of the Detection Mix to all wells, followed by incubation for 2 hours at room temperature on the shaker set at 500. Each well was aspirated and wash again (for a total of four washes) with Wash Buffer (400µL). 50 µL of Streptavidin-HRP was then added to all wells followed by incubation for 30 minutes at room temperature on the shaker. After aspirating each well and six wash steps were performed as mentioned previously. 50 µL of Substrate Solution to each well.

The microplate was placed into the imager for luminescence detection (BioRad® ChemiDoc™ XRS Imager). The results were analyzed using Quansys Q-View™ Software from R&D Systems.

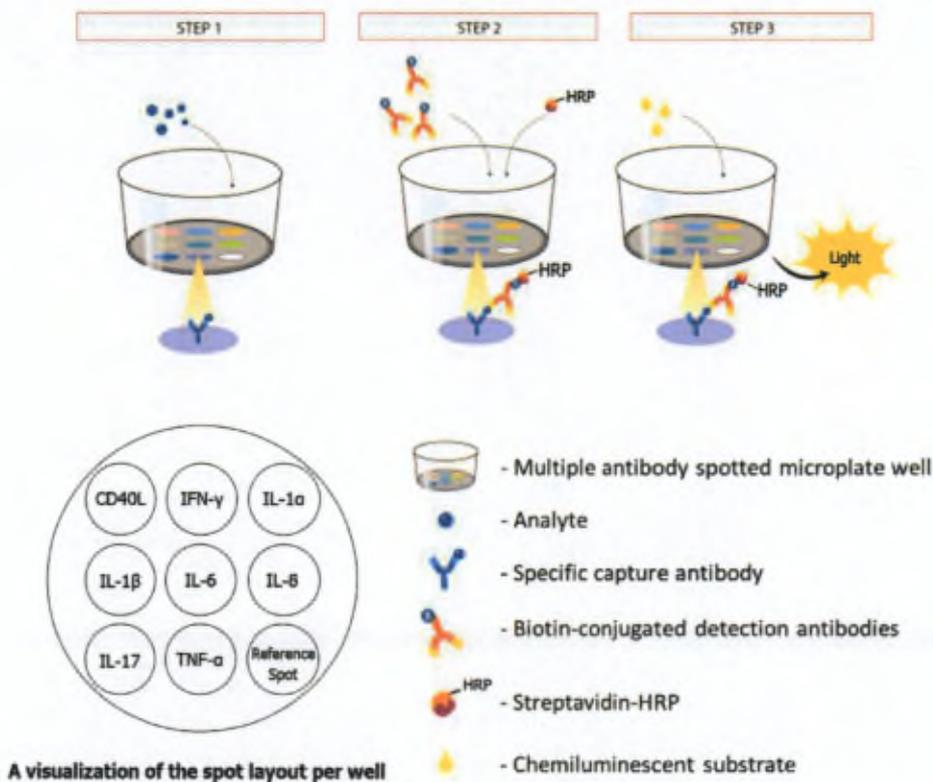


Figure 6.5 - Mosaic Human Cytokine Panel Immunoassay principle

Chapitre VII

Bibliographie

1. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; Taylor & Francis: New York, 2007.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
4. Jiang, B.-H.; Liu, L.-Z. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 150-158.
5. Sherr, C. J.; McCormick, F. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 103-112.
6. Wong, R. S. *J. Exp. Clin. Cancer Res* **2011**, *30*, 87.
7. Simpson, C. D.; Anyiwe, K.; Schimmer, A. D. *Cancer Lett.* **2008**, *272*, 177-185.
8. Pour des revues sur l'angiogenèse voir : a) Bergers, G.; Benjamin, L. E. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401-410; b) Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2011**, *473*, 298-307.
9. Fidler, I. J. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 453-458.
10. Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033.
11. Qian, B.-Z.; Pollard, J. W. *Cell* **2010**, *141*, 39-51.
12. Johansson, M.; DeNardo, D. G.; Coussens, L. M. *Immunol Rev* **2008**, *222*, 145-154.
13. Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2010**, *11*, 220-228.
14. Grivnikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. *Cell* **2010**, *140*, 883-889.
15. Meijer, L. *Oncologie* **2003**, *5*, 311-326.
16. Taylor, W. R.; Stark, G. R. *Oncogene* **2001**, *20*, 1803-1815.
17. Pour une revue sur les CDKs, voir : Malumbres, M.; Barbacid, M. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 153-166
18. Scholey, J. M.; Brust-Mascher, I.; Mogilner, A. *Nature* **2003**, *422*, 746-752.
19. Fededa, J. P.; Gerlich, D. W. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 440-447.
20. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/mitosis-and-cell-division-205#>.
21. Yamazaki, D.; Kurisu, S.; Takenawa, T. *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 379-386.
22. Lefranc, F.; Brothi, J.; Kiss, R. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2411-2422.
23. Parsons, J. T.; Horwitz, A. R.; Schwartz, M. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2010**, *11*, 633-643.
24. Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355-366.
25. Shaulian, E.; Karin, M. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E131-E136.
26. Shaw, R. J.; Cantley, L. C. *Nature* **2006**, *441*, 424-430.
27. World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, **2012**.
28. American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*, Atlanta, **2011**
29. Secretan, B.; Straif, K.; Baan, R.; Grosse, Y.; El Ghissassi, F.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Freeman, C.; Galichet, L.; Coglian, V.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 1033-1034
30. Mao, Y.; Pan, S.; Wen, S. W.; Johnson, K. C. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 831-837.
31. Terry, P.; Giovannucci, E.; Michels, K. B.; Bergkvist, L.; Hansen, H.; Holmberg, L.; Wolk, A. *J Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 525-533.

32. Durko, L.; Malecka-Panas, E. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2014**, *10*, 45-54.
33. De Flora, S.; Bonanni, P. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 787-795.
34. Petrucelli, N.; Daly, M.B.; Feldman, G.L. *BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. In *GeneReviews* [Internet]. University of Washington, Seattle; 1998 [Updated 2013]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
35. Kornienko, A.; Mathieu, V.; Rastogi, S. K.; Lefranc, F.; Kiss, R. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4823-4939.
36. a) Lesterhuis, W. J.; Haanen, J. B. A. G.; Punt, C. J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 591-600; b) Jones, K. L.; Buzdar, A. U. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 391-406; c) Schulz, W.A. *Molecular Biology of Human Cancers – An advanced student's textbook*; Springer: Dordrecht, 2007.
37. Lind, M. J. *Medicine* **2011**, *39*, 711-716.
38. Lemke, T.L.; William, D.A.; Roche, V.F.; Zito, S.W. *Foye's Principals of Medicinal Chemistry*, 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2008.
39. Weiner, L. M.; Surana, R.; Wang, S. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317-327.
40. Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 278-287.
41. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
42. Fedorov, O.; Müller, S.; Knapp, S. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 166-169.
43. Knight, Z. A.; Lin, H.; Shokat, K. M. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 130-137.
44. Jänne, P. A.; Gray, N.; Settleman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 709-723.
45. Morphy, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1413-1437.
46. Yun, C.-H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K.-K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 2070-2075.
47. Gossage, L.; Eisen, T. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1973-1978.
48. Bain, J.; McLauchlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 199-204.
49. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2007**, *408*, 297-315.
50. Strumberg, D.; Voliotis, D.; Moeller, J. G.; Hilger, R. A.; Richly, H.; Kredtke, S.; Beling, C.; Scheulen, M. E.; Seeber, S. *Int J Clin Pharmacol Ther* **2002**, *40*, 580-581.
51. Wegiel, J.; Gong, C.-X.; Hwang, Y.-W. *FEBS J.* **2011**, *278*, 236-245.
52. Frost, D.; Meechoovet, B.; Wang, T.; Gately, S.; Giorgetti, M.; Shcherbakova, I.; Dunckley, T. *PLoS One* **2011**, *6*, e19264.
53. Becker, W.; Sippl, W. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 246-256.
54. Laguna, A.; Aranda, S.; Barallobre, M. J.; Barhoum, R.; Fernández, E.; Fotaki, V.; Delabar, J. M.; de la Luna, S.; de la Villa, P.; Arbonés, M. L. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 841-853.
55. Seifert, A.; Allan, L. A.; Clarke, P. R. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268-6280.
56. Gwack, Y.; Sharma, S.; Nardone, J.; Tanasa, B.; Iuga, A.; Srikanth, S.; Okamura, H.; Bolton, D.; Feske, S.; Hogan, P. G.; Rao, A. *Nature* **2006**, *441*, 646-650.
57. Daniel, C.; Gerlach, K.; Vāth, M.; Neurath, M. F.; Weigmann, B. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1767-1775.

58. Mao, J.; Maye, P.; Kogerman, P.; Tejedor, F. J.; Toftgard, R.; Xie, W.; Wu, G.; Wu, D. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35156-35161.
59. Wiechmann, S.; Czajkowska, H.; de Graaf, K.; Grötzinger, J.; Joost, H.-G.; Becker, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 403-408.
60. Masuda, M.; Wakasaki, T.; Suzui, M.; Toh, S.; Joe, A.; Weinstein, I. *Curr. Cancer Drug Targets* **2010**, *10*, 117-126.
61. Fernandez-Martinez, J.; Vela, E. M.; Tora-Ponsioen, M.; Ocaña, O. H.; Nieto, M. A.; Galceran, J. *J. Cell. Sci.* **2009**, *122*, 1574-1583.
62. Pozo, N.; Zahonero, C.; Fernandez, P.; Linares, J. M.; Ayuso, A.; Hagiwara, M.; Perez, A.; Ricoy, J. R.; Hernandez-Lain, A.; Sepulveda, J. M.; Sanchez-Gomez, P. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2475-2487.
63. Ionescu, A.; Dufrasne, F.; Gelbcke, M.; Jabin, I.; Kiss, R.; Lamoral-Theys, D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1315-1329.
64. Göckler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F. J.; Becker, W. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6324-6337.
65. Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; Hosoya, T.; Ito, N.; Hagiwara, M. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 86.
66. Santillo, M. F.; Liu, Y.; Ferguson, M.; Vohra, S. N.; Wiesenfeld, P. L. *Toxicol. in Vitro* **2014**, *28*, 403-410.
67. Adayev, T.; Wegiel, J.; Hwang, Y.-W. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 212-218.
68. Ma, Y.; Wink, M. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 146-149.
69. Frédérick, R.; Bruyère, C.; Vancraeynest, C.; Reniers, J.; Meinguet, C.; Pochet, L.; Backlund, A.; Masereel, B.; Kiss, R.; Wouters, J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6489-6501.
70. Skouta, R.; Hayano, M.; Shimada, K.; Stockwell, B. R. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5707-5713.
71. a) Cao, R.; Chen, H.; Peng, W.; Ma, Y.; Hou, X.; Guan, H.; Liu, X.; Xu, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 991-1001; b) Cao, R.; Chen, Q.; Hou, X.; Chen, H.; Guan, H.; Ma, Y.; Peng, W.; Xu, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 4613-4623. c) Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Hou, X.; Guan, H.; Chen, Q.; Ma, Y.; Xu, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 249-257.
72. Encyclopædia Britannica
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1255831/transcription-factor>.
73. Libermann, T.; Zerbini, L. *Curr. Gene Ther.* **2006**, *6*, 17-33.
74. Komeili, A.; O'Shea, E. K. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 355-360.
75. Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1172-1183.
76. Shaulian, E.; Karin, M. *Oncogene* **2001**, *20*, 2390-2400.
77. Eferl, R.; Wagner, E. F. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 859-868.
78. Eferl, R.; Ricci, R.; Kenner, L.; Zenz, R.; David, J.-P.; Rath, M.; Wagner, E. F. *Cell* **2003**, *112*, 181-192.
79. Whitfield, J.; Neame, S. J.; Paquet, L.; Bernard, O.; Ham, J. *Neuron* **2001**, *29*, 629-643.

80. Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A.; Kuby, J. *Kuby Immunology*, 4th ed.; W.H. Freeman: New York, 2007.
81. Dranoff, G. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 11-22.
82. Paul, W. E. *Cell* **1989**, *57*, 521-524.
83. Balkwill, F. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 540-550.
84. Waugh, D. J. J.; Wilson, C. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735-6741.
85. Lin, W.-W.; Karin, M. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1175-1183.
86. Almasan, A.; Ashkenazi, A. *Cytokine Growth F. Rev.* **2003**, *14*, 337-348.
87. Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 479-500.
88. Moloudizargari, M.; Mikaili, P.; Aghajanshakeri, S.; Asghari, M. H.; Shayegh, J. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *7*, 199-212.
89. Pfau, W.; Skog, K. *J. Chromatogr. B* **2004**, *802*, 115-126.
90. a) http://www.drugs-forum.com/forum/showwiki.php?title=Syrian_Rue
b) USDA, NRCS. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. 2014.
91. Herraiz, T. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4900-4904.
92. Gutsche, B.; Herderich, M. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1998**, *360*, 836-839.
93. Herraiz, T.; Huang, Z.; Ough, C. S. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 455-459.
94. Herraiz, T. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4883-4887.
95. Herraiz, T.; Galisteo, J. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7156
96. Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Ma, Y.; Liu, X.; Hou, X.; Guan, H.; Xu, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 1557-1563.
97. Kim, H.; Sablin, S. O.; Ramsay, R. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 137-142.
98. Youdim, M. B. H.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295-309.
99. Song, Y.; Wang, J.; Teng, S. F.; Kesuma, D.; Deng, Y.; Duan, J.; Wang, J. H.; Qi, R. Z.; Sim, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1129-1132.
100. Shen, Y.-C.; Chen, C.-Y.; Hsieh, P.-W.; Duh, C.-Y.; Lin, Y.-M.; Ko, C.-L. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 32-36.
101. Kumar, R.; Gupta, L.; Pal, P.; Khan, S.; Singh, N.; Katiyar, S. B.; Meena, S.; Sarkar, J.; Sinha, S.; Kanaujiya, J. K.; Lochab, S.; Trivedi, A. K.; Chauhan, P. M. S. *Eur. J. M. Chem.* **2010**, *45*, 2265-2276.
102. Liu, F.; Yu, L.-Q.; Jiang, C.; Yang, L.; Wu, W.-T.; You, Q.-D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4167-4177.
103. Leteurtre, F.; Madalengoitia, J.; Orr, A.; Cuzi, T. J.; Lehnert, E.; Macdonald, T.; Pommier, Y. *Cancer Res* **1992**, *52*, 4478-4483.
104. Bertrand, M.; Poissonnet, G.; Théret-Bettioli, M.-H.; Gaspard, C.; Werner, G. H.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Léonce, S.; Dodd, R. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2155-2164.
105. Chaniyara, R.; Tala, S.; Chen, C.-W.; Zang, X.; Kakadiya, R.; Lin, L.-F.; Chen, C.-H.; Chien, S.-I.; Chou, T.-C.; Tsai, T.-H.; Lee, T.-C.; Shah, A.; Su, T.-L. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1544-1563.
106. Lake, R.; Blunt, J.; Munro, M. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 1201-1206.

107. Kobayashi, J.; Cheng, J. F.; Ohta, T.; Nozoe, S.; Ohizumi, Y.; Sasaki, T. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3666-3670.
108. Song, H.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Wang, Q. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1010-1018.
109. Stöckigt, J.; Antonchick, A. P.; Wu, F.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538-8564.
110. Pictet, A.; Spengler, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 2030-2036.
111. Tatsui, G. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1928**, *48*, 92 [*Chem. Abs.* **1928**, *22*, 3415].
112. Bailey, P. D. *J. Chem. Res. Syn.* **1987**, *6*, 202-203.
113. Singh, V.; Hutait, S.; Batra, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 6211-6216.
114. Ito, T.; Kitajima, M.; Takayama, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4506-4508.
115. Kundu, B.; Sawant, D.; Partani, P.; Kesarwani, A. P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4889-4892.
116. Verma, A. K.; Jha, R. R.; Sankar, V. K.; Aggarwal, T.; Singh, R. P.; Chandra, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6998-7010.
117. Tolkunov, V. S.; Eresko, A. B.; Mazepa, A. V.; Tolkunov, S. V. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2011**, *47*, 1170-1175.
118. Gracia, S.; Marion, C.; Rey, J.; Popowycz, F.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3165-3168.
119. Bischler, A.; Napieralski, B. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 1903-1908.
120. Whaley, W. M.; Govindachari, T. R. *The Preparation of 3,4-Dihydroisoquinolines and Related Compounds by the Bischler-Napieralski Reaction*. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc., **2004**, 74-150.
121. Fodor, G.; Nagubandi, S. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1279-1300.
122. Lee, C.-S.; Liu, C.-K.; Chiang, Y.-L.; Cheng, Y.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 481-484.
123. a) Speckamp, W. N.; Moolenaar, M. J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3817-3856; b) Maryanoff, B. E.; Zhang, H.-C.; Cohen, J. H.; Turchi, I. J.; Maryanoff, C. A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1431-1628; c) Yazici, A.; Pyne, S. *Synthesis* **2009**, *2009*, 339-368; d) Yazici, A.; Pyne, S. *Synthesis* **2009**, *2009*, 513-541.
124. Mémoire réalisé par Sébastien Soriano ; Laboratoire de Chimie Organique, **2010**.
125. Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8056-8066.
126. Diness, F.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7044-7047.
127. Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 130-144.
128. a) Pulka, K.; Feytens, D.; Misicka, A.; Tourwé, D. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 97-108; b) Pulka, K.; Kulis, P.; Tymecka, D.; Frankiewicz, L.; Wilczek, M.; Kozminski, W.; Misicka, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1506-1514.
129. Fisyuk, A. S.; Mukanov, A. Y.; Novikova, E. Y. *Mendeleev Commun.* **2003**, *13*, 278-279.

130. a) Fisyuk, A. S.; Mukanov, A.Y. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2003**, *39*, 277-279; b) Fisyuk, A. S.; Mukanov, A. Y.; Poendaev, N. V. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 455-462.
131. Klein, G.; Ostresh, J. M.; Nefzi, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2211-2215.
132. van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806-8827.
133. Cossío, F. P.; Alonso, C.; Lecea, B.; Ayerbe, M.; Rubiales, G.; Palacios, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2839-2847.
134. Kovács, J.; Pintér, I.; Messmer, A.; Tóth, G. *Carbohydr. Res.* **1985**, *141*, 57-65.
135. Alvarez, S. G.; Alvarez, M. T. *Synthesis* **1997**, *4*, 413-414.
136. Clayden, J.; Pickworth, M.; Jones, L. H. *Chem. Commun.* **2009**, 547-549..
137. Mémoire réalisé par Céline Guissart, sous mon encadrement; Laboratoire de Chimie Organique, ULB, **2012**
138. a) Scott, J. D.; Williams, R. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669-1730; b) Dong, W.; Liu, W.; Yan, Z.; Liao, X.; Guan, B.; Wang, N.; Liu, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 239-244.
139. D'Incalci, M.; Badri, N.; Galmarini, C. M.; Allavena, P. *Br J Cancer* **2014**, 646-650.
140. Semenova, M. N.; Kiselyov, A. S.; Tsyganov, D. V.; Konyushkin, L. D.; Firgang, S. I.; Semenov, R. V.; Malyshev, O. R.; Raihstat, M. M.; Fuchs, F.; Stielow, A.; Lantow, M.; Philchenkov, A. A.; Zavelevich, M. P.; Zefirov, N. S.; Kuznetsov, S. A.; Semenov, V. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7138-7149.
141. Liao, Z. K.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4745-4752.
142. Saavedra, J. Z.; Resendez, A.; Rovira, A.; Eagon, S.; Haddenham, D.; Singaram, B. *J. Org. Chem.* **2011**, *77*, 221-228.
143. Etudes effectués dans le cadre du mémoire réalisé par Sébastien Soriano sur la synthèse des imidazolones. Laboratoire de Chimie Organique, **2010**.
144. a) Thanigaimalai, P.; Lee, K.-C.; Bang, S.-C.; Lee, J.-H.; Yun, C.-Y.; Roh, E.; Hwang, B.-Y.; Kim, Y.; Jung, S.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1555-1562; b) Ryoda, A.; Yajima, N.; Haga, T.; Kumamoto, T.; Nakanishi, W.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Ishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 133-141.
145. Development of new stereoisomeric drugs.
<http://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucml22883.htm>
146. Cox, E. D.; Hamaker, L. K.; Li, J.; Yu, P.; Czerwinski, K. M.; Deng, L.; Bennett, D. W.; Cook, J. M.; Watson, W. H.; Krawiec, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 44-61.
147. Nielsen, T. E.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3765-3773.
148. Ducrot, P.; Rabhi, C.; Thal, C. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 2683-2692.
149. Gremmen, C.; Willemse, B.; Wanner, M. J.; Koomen, G.-J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1955-1958.
150. Soe, T.; Kawate, T.; Fukui, N.; Nakagawa, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1857-1860.

151. Pour une revue sur le concept ACDC, voir : Mahlau, M.; List, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 518-533.
152. Pour une revue sur la catalyse effectuée par des paires d'ions, voir : Brak, K.; Jacobsen, E. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 534-561.
153. a) Akiyama, T.; Itoh, J.; Yokota, K.; Fuchibe, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1566-1568 ; b) Uraguchi, D.; Terada, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5356-5357.
154. Pour des revues sur les acides phosphoriques dérivés du BINOL, voir : a) Kampen, D.; Reisinger, C. M.; List, B. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *291*, 395-456 ; b) Akiyama, T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5744-5758 ; c) Connon, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3909-3912 ; d) Terada, M. *Chem. Commun.* **2008**, 4097-4112 ; e) Zamfir, A.; Schenker, S.; Freund, M.; Tsogoeva, S. B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5262-5276 ; f) Terada, M. *Synthesis* **2010**, *2010*, 1929-1982.
155. Seayad, J.; Seayad, A. M.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1086-1087.
156. a) Muratore, M. E.; Holloway, C. A.; Pilling, A. W.; Storer, R. I.; Trevitt, G.; Dixon, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10796-10797 ; b) Holloway, C. A.; Muratore, M. E.; Storer, R. I.; Dixon, D. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4720-4723.
157. Aillaud, I.; Barber, D. M.; Thompson, A. L.; Dixon, D. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2946-2949.
158. Storer, R. I.; Carrera, D. E.; Ni, Y.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 84-86.
159. Nakashima, D.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9626-9627.
160. García-García, P.; Lay, F.; García-García, P.; Rabalakos, C.; List, B. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4427-4430.
161. Chen, L.-Y.; He, H.; Chan, W.-H.; Lee, A. W. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7141-7147.
162. Christ, P.; Lindsay, A. G.; Vormittag, S. S.; Neudörfl, J.-M.; Berkessel, A.; O'Donoghue, A. C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8524-8528.
163. Bou-Hamdan, F.R.; Leighton, J. L. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2439-2442.
164. Kubota, K.; Leighton, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 946-948.
165. Taylor, M. S.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10558-10559.
166. Raheem, I. T.; Thiara, P. S.; Peterson, E. A.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13404-13405.
167. Klausen, R. S.; Jacobsen, E. N. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 887-890.
168. Kuwano, R.; Kashiwabara, M.; Sato, K.; Ito, T.; Kaneda, K.; Ito, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 521-535.
169. Mizoguchi, H.; Oguri, H.; Tsuge, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3016-3019.
170. Thèse d'Ilija Čorić, **2012** - promoteur Prof. Dr. Benjamin List, Max-Planck Institut für Kohlenforschung.
171. Branle, F.; Lefranc, F.; Camby, I.; Jeuken, J.; Geurts-Moespot, A.; Sprenger, S.; Sweep, F.; Kiss, R.; Salmon, I. *Cancer* **2002**, *95*, 641-655.

172. Dumont, P.; Ingrassia, L.; Rouzeau, S.; Ribaucour, F.; Thomas, S.; Roland, I.; Darro, F.; Lefranc, F.; Kiss, R. *Neoplasia* **2007**, *9*, 766-776.
173. Van Goietsenoven, G.; Hutton, J.; Becker, J.P.; Lallemand, B.; Robert, F.; Lefranc, F.; Pirker, C.; Vandebussche, G.; Van Antwerpen, P.; Evidente, A.; Berger, W.; Prévost, M.; Pelletier, J.; Kiss, R.; Kinzy, T.G.; Kornienko, A.; Mathieu, V. *FASEB J.* **2010**, *24*, 4575-4584.
174. Mathieu, A.; Rimmelink, M.; D'Haene, N.; Penant, S.; Gaussin, J.F.; Van Ginckel, R.; Darro, F.; Kiss, R.; Salmon, I. *Cancer* **2004**, *101*, 1908-1918.
175. Bruggisser, R.; von Daeniken, K.; Jundt, G.; Schaffner, W.; Tullberg-Reinert, H. *Planta Med.* **2002**, *68*, 445-448.
176. Lamoral-Theys, D.; Pottier, L.; Kerff, F.; Dufrasne, F.; Proutière, F.; Wauthoz, N.; Neven, P.; Ingrassia, L.; Antwerpen, P. V.; Lefranc, F.; Gelbcke, M.; Pirotte, B.; Kraus, J.-L.; Nève, J.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Dubois, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3823-3833.
177. Thèse de Delphine Lamoral-Theys, ULB **2013**.
178. Debeir, O.; Mégalizzi, V.; Warzée, N.; Kiss, R.; Decaestecker, C. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 2985-2998.
179. Ce test a été effectué au sein du Laboratoire de Toxicologie par le Dr. Céline Bruyère (ULB).
180. Foletta, V. C.; Segal, D. H.; Cohen, D. R. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *63*, 139-152.
181. Malumbres, M.; Barbacid, M. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 630-641.
182. Schitteck, B.; Sinnberg, T. *Mol. Cancer* **2014**, *13*.
183. Knippschild, U.; Milne, D. M.; Campbell, L. E.; DeMaggio, A. J.; Christenson, E.; Hoekstra, M. F.; Meek, D. W. *Oncogene* **1997**, *15*, 1727-1736.
184. Heng, Y.-W.; Koh, C.-G. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2010**, *42*, 1622-1633.
185. Uzbekov, R.; Kireyev, I.; Prigent, C. *Biol. Cell* **2002**, *94*, 275-288.
186. Polak, P.; Oren, A.; Ben-Dror, I.; Steinberg, D.; Sapoznik, S.; Arditi-Duvdevany, A.; Vardimon, L. *Oncogene* **2006**, *25*, 665-676.
187. Albulescu, R.; Codrici, E.; Popescu, I. D.; Mihai, S.; Necula, L. G.; Petrescu, D.; Teodoru, M.; Tanase, C. P. *Mediat. Inflamm.* **2013**, *2013*, e979748.
188. Campos, S. B.; Ashworth, S. L.; Wean, S.; Hosford, M.; Sandoval, R. M.; Hallett, M. A.; Atkinson, S. J.; Molitoris, B. A. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2009**, *296*, F487-F495.
189. Enfange, S. M. N.; Mash, D. C.; Khare, A. B.; Ouyang, Q. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4486-4491.

Chapitre VIII

Annexes



Efficient 'one-pot' methodology for the synthesis of novel tetrahydro- β -carboline, tetrahydroisoquinoline and tetrahydrothienopyridine derivatives



Alexandra Ionescu^a, Damien Cornut^a, Sébastien Soriano^a, Céline Guissart^a, Pierre Van Antwerpen^b, Ivan Jabin^{a,*}

^aLaboratoire de Chimie Organique, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles (ULB), avenue F. D. Roosevelt, 50 CP160/06, B-1050 Brussels, Belgium

^bPlate-Forme Analytique, Faculté de Pharmacie, ULB, boulevard du Triomphe, CP205/01, 1050 Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2013

Revised 19 August 2013

Accepted 28 August 2013

Available online 10 September 2013

Keywords:

Tetrahydro- β -carbolines

N-Carbamyliminium

Pictet–Spengler

Tetrahydroisoquinoline

Tetrahydrothienopyridine

ABSTRACT

A simple and efficient 'one-pot' methodology was developed to generate a new series of tetrahydro- β -carboline (THBC), tetrahydroisoquinoline (THIQ) and tetrahydrothienopyridine (THTP) derivatives. The key step of the methodology is based on a Pictet–Spengler type cyclization of a reactive *N*-carbamyliminium ion. This methodology was applied to the synthesis of a library of 32 compounds with potential anti-tumoral activity.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Sub-families of natural or synthetic alkaloids with a partly reduced β -carboline moiety are known to possess interesting pharmacological properties.¹ Among these alkaloids, several tetrahydro- β -carbolines (THBCs) with anticancer activity have been reported.^{2–4} Some of them display a tetracyclic core with an additional fused heterocyclic ring, including for example eudistomine K⁵ and azatoxin.⁶

The synthesis of such tetracyclic THBC derivatives with a fused imidazolone or tetrahydropyrimidin-2-one ring was recently developed by the group of Meldal through an intramolecular *N*-carbamyliminium Pictet–Spengler reaction, using an elegant multistep solid phase methodology.^{7,8} However, due to the cleavage from the resin, this methodology is limited to the formation of compounds possessing an amino acid residue on the main scaffold. A second inconvenience of this method is the multi-step synthesis of the precursors.⁹ A multi-step method based on the Pictet–Spengler condensation of α -Cbz protected α -aminoaldehydes with tryptophane was also described.¹⁰ In this case, the fused imidazolidin-2-one ring was elaborated through removal of the Cbz group and reaction of the amino group with 1,1'-carbonyldiimidazole. Another way to synthesize similar tetracyclic derivatives is by reaction of 1,3-isothiocyanocarbonyl compounds with β -arylethylamines¹¹ or by heating α,β -unsaturated carbonyl compounds with ureas¹² but these meth-

ods only give access to THBC scaffolds with a fused six-member tetrahydropyrimidin-2-one or tetrahydropyrimidin-2-thione ring. Finally, a solid-phase Pictet–Spengler reaction of a resin-bound tryptophane derivative followed by a two-step sequence and cleavage from the resin led to THBC derivatives with a fused imidazolidin-2-one ring. In this case, the additional ring is formed in position 1,6 of the pyrimidine moiety.¹³

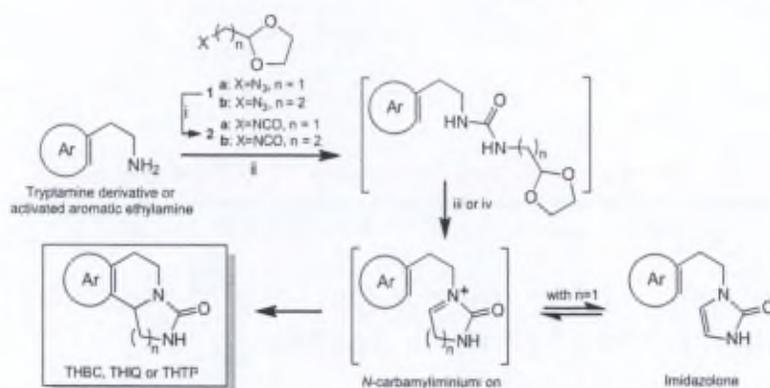
All in all, only a few examples of THBC derivatives with a fused imidazolidin-2-one or tetrahydropyrimidin-2-one ring have been reported in the literature and only solid phase or multi-step processes have been described. The current study aims at describing a general and efficient 'one-pot' synthetic methodology that leads to the THBC, tetrahydroisoquinoline (THIQ) or tetrahydrothienopyridine (THTP) skeleton in good yields. The usefulness of this methodology was illustrated by the synthesis of a library of 32 compounds with potential anti-tumoral activity.

A general one-pot methodology for the synthesis of THBC THIQ or THTP derivatives. Our approach for the synthesis of THBC, THIQ or THTP derivatives relies on a one-pot multi-step reaction sequence that involves a Pictet–Spengler type cyclization of an *N*-carbamyliminium ion as a key step (Scheme 1).

In the case of the THBC derivatives, isocyanates **2a** and **2b** were first generated in situ from the known azides **1a**¹⁴ and **1b**¹⁵ through a domino Staudinger/aza-Wittig reaction.¹⁶ A subsequent addition of a tryptamine derivative to the reaction mixture led to

* Corresponding author. Tel.: +32 2 650 3537; fax: +32 2 650 2798.

E-mail address: ijabin@ulb.ac.be (I. Jabin).



Scheme 1. General strategy for the one-pot synthesis of the THBC, THIQ, THTP and imidazolone derivatives. Reagents: (i) PPh_3 , CO_2 , THF, rt; (ii) THF, rt; (iii) in situ addition of aq. HCl (2.8 M), 55 °C; (iv) evaporation of the solvent and aq. HCl (2.8 M)/MeOH or TFA/MeOH or TFA, 55 °C.

the corresponding ureido derivatives. Acidic treatment of the mixture produced the intermediate *N*-carbamyliminium ion through an intramolecular cyclization and the elimination of ethylene glycol. Pictet–Spengler cyclization of this highly reactive intermediate provided the desired THBC derivatives, which were purified by flash chromatography (FC) (Scheme 2).

This straightforward and efficient methodology can be achieved in a one-pot process from compounds **1a** and **1b**, or the ureido intermediate can be isolated by FC and subjected to the cyclization step under acidic conditions in a second time. High overall yields (61–92%) were obtained for the pure THBC derivatives **4a–e** from amines **3a–d** (Scheme 2).

When enantiopure tryptophan derivative (*S*)-**3d** or (*R*)-**3d** was employed, the reaction proceeded with a high diastereoselectivity (ca. 9:1), and the major diastereomer was obtained pure after FC. It is noteworthy to mention that the protons of the imidazolidinone ring of this major diastereomer display similar chemical shifts and coupling constants than the corresponding protons of a known and related Pictet–Spengler product.⁷ These NMR data thus suggest that the protons of the two asymmetric centres display a *trans* relationship (see Supplementary Information for details).

The methodology was also successfully extended to activated phenyl ethylamines **5a–c** and thiophenethylamine **7**, resulting in the formation of THIQs **6a**, **17b**, **6c** and THTP **8** in moderate to good overall yields (37–60%) (Scheme 2). In the case of compounds **5a**, **5b** and **7**, NMR monitoring of the acidic cyclization reaction [i.e. aq. HCl (2.8 M)/MeOH or TFA/MeOH] clearly showed the formation of an imidazolone as the main product. It is noteworthy to mention that, as previously reported,⁹ the intermediate iminium ion can also lead to the formation of an imidazolone through its deprotonation at the α -position (Scheme 1). This process is reversible under acidic conditions, the irreversible Pictet–Spengler type

cyclization displacing the equilibrium toward the formation of the cyclized products. Thus, the conversion of these intermediates into the cyclization products **6a–c** and **8** was possible, but stronger acidic conditions were required (i.e. pure TFA) to reduce the reaction time.

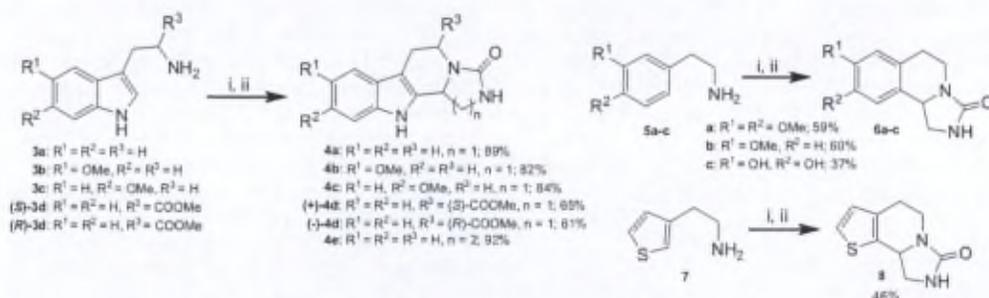
Synthesis of a small library of THBC derivatives. Among promising kinase inhibitors appears harmine which belongs to the large chemical family of alkaloids displaying a β -carboline skeleton.¹⁸ Because it was reported that *N*-acylation and *N*-benzylation of harmine provides compounds with growth inhibitory activity and reduced neurotoxicity,¹⁹ the synthesis of a library of THBCs bearing various alkyl and acyl groups on the indolic and urea nitrogen atoms was achieved.

First, diversity was introduced on the THBC scaffold by modifying the substituents R^1 , R^2 and R^3 (Scheme 3). Phenolic compound **4b** was obtained by the demethylation of compound **4a** in the presence of BBr_3 . LiOH/THF hydrolysis of methyl ester (+)-**4d** afforded acid (+)-**4f** which was further coupled with benzylamine to yield amide (+)-**4g**.

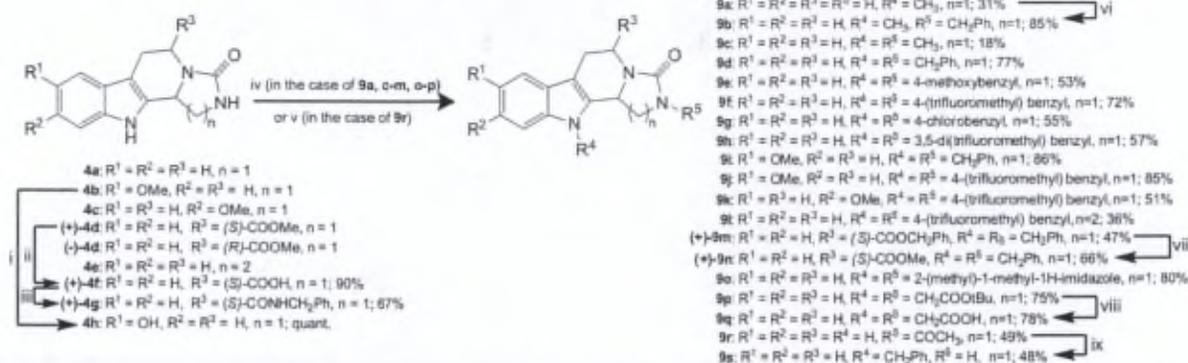
The general *N*-alkylation method used in our study consisted in the deprotonation with NaH of the indole and the urea nitrogens, followed by reaction with at least 2 equiv. of an alkylating agent. Hence, dialkylated products **9d–l**, **9o** and **9p** were readily obtained from either **4a–c** or **4e** (yields range from 36% to 86%).

It is noteworthy to mention that the enantiomeric resolution of compound **9f** was performed by semi-preparative chiral HPLC in order to test the biological activity of both enantiomers (see Supplementary Information for details).

In the case of the reaction of (+)-**4d** with benzyl bromide, besides the benzyl ester (+)-**9m**, a small amount of benzylated methyl ester (+)-**9n** was also obtained. It was possible to purify (+)-**9m** by FC, (+)-**9n** being accessible by the *trans*-esterification



Scheme 2. Synthesis of THBC, THIQ and THTP derivatives. Reagents: (i) **2a** or **2b**, THF, rt; (ii) evaporation of THF then addition to the crude ureido intermediate of either HCl (2.8 M)/MeOH for compounds **3a–c**, **5a**, or 25% TFA/MeOH for **3d**, or TFA for compounds **5b**, **5c** and **7**; 55 °C.



Scheme 3. Modification of the THBC scaffold. Reagents: (i) BBR_3 , CH_2Cl_2 , 0 °C–rt; (ii) LiOH , THF, rt; (iii) BnNH_2 , TBTU, DIPEA, CHCl_3/DMF , rt; (iv) DMF/THF , NaH , R^4Br or R^5Br , rt; (v) CH_3COCl , TEA, 4-DMAP, THF, rt; (vi) NaH , PhCH_2Br , DMF, rt; (vii) PTSA, MeOH, reflux; (viii) TFA, CH_2Cl_2 , rt; (ix) NaH , PhCH_2Br , DMF/THF (1:4), rt, then H_2O .

of (+)-9m in MeOH. In addition, when 4a was alkylated with only 1.5 equiv. of CH_3I , a mixture of mono- and dialkylated products 9a and 9c was obtained. These two compounds were separated by FC, and a subsequent alkylation of 9a with 1 equiv. of benzyl bromide yielded the unsymmetrically dialkylated product 9b.

Finally, acylation of the THBC scaffold was performed in anhydrous THF with acetyl chloride (4.5 equiv.)/triethylamine in the presence of catalytic amounts of 4-DMAP. Interestingly, under these reaction conditions, only the nitrogen atom of the urea group is acylated, leading to compound 9r. A subsequent alkylation of the indole ring with benzylbromide followed by the hydrolysis of the acyl moiety led to the monobenzylated product 9s. Since this compound could be further alkylated on the urea nitrogen, the selective acylation provides a convenient way for the orthogonal introduction of substituents on the nitrogen atoms and thus opens new paths for modulating the pharmacological properties of the tetracyclic THBC derivatives.

In conclusion, we have developed a simple, general and efficient 'one-pot' methodology for the synthesis of tetracyclic tetrahydro- β -carboline, tetrahydroisoquinoline and tetrahydrothienopyridine derivatives via a Pictet–Spengler type intramolecular cyclization of an *N*-carbamyliminium intermediate. Further functionalization at the nitrogen atoms was also used to increase molecular diversity allowing preparation of a library of 32 novel compounds in good yields and high purities.²⁰ The biological activity of these compounds against several cancer cell lines will be reported elsewhere.

Acknowledgments

A. I. is a Ph.D. student who received a Grant from the *Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture* (FRIA-FRS, Belgium). The Analytical Platform of the Faculty of Pharmacy is supported by Grants from the *Fonds National de la Recherche Scientifique* (FNRS-FRS, Belgium).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.08.135>.

References and notes

- Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 479–500.
- Skouta, R.; Hayano, M.; Shimada, K.; Stockwell, B. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5707–5713.
- Kumar, R.; Gupta, L.; Pal, P.; Khan, S.; Singh, N.; Katiyar, S. B.; Meena, S.; Sarkar, J.; Sinha, S.; Kanaujia, J. K.; Lochab, S.; Trivedi, A. K.; Chauhan, P. M. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2265–2276.
- Shen, L.; Park, E.-J.; Kondratyuk, T. P.; Guendisch, D.; Marler, L.; Pezzuto, J. M.; Wright, A. D.; Sun, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6182–6195.
- Lake, R.; Blunt, J.; Munro, M. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 1201–1206.
- Leteurtre, F.; Madalenoitola, J.; Orr, A.; Cuzi, T. J.; Lehnert, E.; Macdonald, T.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4478–4483.
- Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8056–8066.
- Diness, F.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7044–7047.
- Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 130–144.
- Pulka, K.; Feytens, D.; Misicka, A.; Tourwé, D. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 97–108.
- Fisyuk, A. S.; Mukanov, A. Y.; Poendaeve, N. V. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 455–462.
- Fisyuk, A. S.; Mukanov, A. Y.; Novikova, E. Y. *Mendeleev Commun.* **2003**, *13*, 278–279.
- Klein, G.; Ostresh, J. M.; Nefzi, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2211–2215.
- Wu, J.-P.; Emeigh, J.; Gao, D. A.; Goldberg, D. R.; Kuzmich, D.; Miao, C.; Potocki, I.; Qian, K. C.; Sorcek, R. J.; Jeanfavre, D. D.; Kishimoto, K.; Mainolfi, E. A.; Nabozny, G.; Peng, C.; Reilly, P.; Rotblein, R.; Sellati, R. H.; Woska, J. R.; Chen, S.; Gunn, J. A.; O'Brien, D.; Norris, S. H.; Kelly, T. A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5356–5366.
- Carboni, B.; Vaultier, M.; Carrié, R. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1799–1810.
- Kovács, J.; Piniér, I.; Messmer, A.; Tóth, G. *Carbohydr. Res.* **1985**, *141*, 57–65.
- Liao, Z. K.; Kohn, H. J. *Org. Chem.* **1984**, *49*, 4745–4752.
- Ionescu, A.; Dufresne, F.; Gelbecke, M.; Jabin, I.; Kiss, R.; Lamoral-Theys, D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1315–1329.
- Cao, R.; Chen, Q.; Hou, X.; Chen, H.; Guan, H.; Ma, Y.; Peng, W.; Xu, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4613–4623.
- The purity of each compound was evaluated by NMR spectroscopy and RP HPLC analysis and was estimated to be satisfactory for biological testing (see Supplementary Information for details).

DYRK1A Kinase Inhibitors with Emphasis on Cancer

A. Ionescu^{†,§}, F. Dufresne[‡], M. Gelbcke[‡], I. Jabin[‡], R. Kiss^{§,*} and D. Lamoral-Theys[†]

[†]Laboratoire de Chimie Organique, Faculté des Sciences; [§]Laboratoire de Toxicologie; [‡]Laboratoire de Chimie Pharmaceutique Organique; [‡]Laboratoire de Chimie BioAnalytique, Toxicologie et Chimie Physique Appliquée; Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (ULB); Brussels, Belgium

Abstract: Various types of cancers (including gliomas, melanomas, and esophageal, pancreas and non-small-cell lung cancers) display intrinsic resistance to pro-apoptotic stimuli, such as conventional chemotherapy and radiotherapy, and/or the activation of a multidrug resistance phenotype, which are major barriers to effective treatment and lead to poor patient prognosis. The DYRK1A kinase is directly implicated in the resistance of cancer cells to pro-apoptotic stimuli and drives several pathways that enhance proliferation, migration, and the reduction of cell death, leading to very aggressive biological behavior in cancer cell populations. The DYRK1A kinase is also implicated in neurological diseases and in neoangiogenic processes. Thus, the DYRK1A kinase is of great interest for both cancer and neuroscience research. During the last decade, numerous compounds that inhibit DYRK1A have been synthesized. The present review discusses the available molecules known to interfere with DYRK1A activity and the implications of DYRK1A in cancer and other diseases and serves as a rational analysis for researchers who aim to improve the anti-DYRK1A activity of currently available compounds.

Keywords: DYRK1A kinase, cancer, neurological diseases, anti-DYRK1A compounds.

INTRODUCTION

DYRK1A Kinase

Dual-specificity tyrosine-regulated kinases (DYRKs) belong to the CGMC kinome group that includes cyclin-dependent kinases (CDKs), glycogen synthase kinases (GSKs), mitogen-activated protein kinase (MAPKs), and CDK-like kinases (CLKs). The DYRK family includes DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4A and DYRK4B [1]. DYRK family kinases are evolutionarily conserved from yeast to humans and have recently been reviewed [2]. Among the members of this family, research has focused primarily on DYRK1A because of its localization on chromosome 21 and its association with Down's syndrome [3,4]. DYRK1A is expressed ubiquitously in mammalian tissues [5] with high expression levels in the brain during development [6].

As its name implies, DYRK1A has dual substrate specificity. During protein synthesis, DYRK1A undergoes autophosphorylation at a conserved tyrosine residue (Tyr321) in the activation loop of the catalytic domain [7] by the intramolecular formation of a transitory intermediate, which produces a constitutively active form of DYRK1A [7]. Once matured, DYRK1A only targets substrates at serine or threonine residues [7]. The DYRK1A domain structure includes an N-terminal nuclear localization signal, a kinase domain, a PEST domain for protein degradation, a

13-consecutive-histidine repeat for nuclear targeting and an S/T rich region [8].

DYRK1A substrates comprise both nuclear and cytosolic proteins, including transcription factors (CREB, NFAT, STAT3, Kfhr, Gli1), splicing factors (cyclin L2, SF2, SF3), a translation factor (eIF2Be), synaptic proteins (dynamins I, amphiphysin I, synaptojanin I), and miscellaneous proteins (glycogen synthase, caspase-9, Notch) [4,9-11]. DYRK1A activity is mediated by a second autophosphorylation at a C-terminal serine (Ser520) [13], which can be increased through its binding to 14-3-3 proteins [12].

DYRK1A plays a major role in cell proliferation and cell death, which is further emphasized below.

It is well established that DYRK1A is associated with some Down's syndrome phenotypes, mental retardation, motor defects [14-16] and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's [17-19], Parkinson's and Huntington's diseases [20-22]. Park and colleagues [4] recently reviewed the molecular mechanisms implicating DYRK1A in Down's syndrome.

The current review focuses on the implications of DYRK1A in cancer development, aggressiveness and resistance to conventional chemotherapy and radiotherapy. Thus, particular attention is paid to compounds that display anticancer activity through the targeting of DYRK1A.

The DYRK1A Kinase and Its Implication in Cancer Biology

Epidemiological studies suggest that although individuals with Down's syndrome have an increased risk of leukemia,

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (ULB); Brussels, Belgium; Tel: 0032 477 62 20 83; E-mail: rkiss@ulb.ac.be

they have a considerably reduced incidence of most solid tumors [23-27]. Cancer protection in the Down's syndrome population may, in part, be due to suppression of angiogenesis. Indeed, increased levels of DYRK1A seem to act in concert with RCAN1 (regulator of calcineurin 1) to suppress tumor angiogenesis by attenuating VEGF-calcineurin-NFAT signaling in endothelial cells [27]. By disrupting NFAT phosphorylation, DYRK1A blocks transactivation of NFAT-dependent target genes [28,29]. Moreover, Down's syndrome individuals have a reduced incidence of other angiogenesis-related diseases, such as diabetic retinopathy [30] and atherosclerosis [31].

DYRK1A belongs to the family of NFAT1 upstream kinases that affect the cellular localization and transcriptional activity of NFAT1 [29,32]. In addition to promoting angiogenesis in endothelial cells, NFAT1 has also been reported to increase the migration and invasion of breast cancer [33,34].

Various studies have identified a number of potential DYRK1A family substrates that directly implicate this kinase in cancer development and aggression. DYRK1A potentiates the transcriptional activity of one such substrate, Gli1 (glioma-associated oncogene homologue 1), a transcription factor that acts as a terminal effector of hedgehog signaling, which is a key pathway for embryogenesis, stem cell maintenance and tumorigenesis [35]. The implications of the hedgehog pathway in cancer biology have been assessed by Peukert and Miller-Moslin [36]. STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) is another transcription factor that can be activated by DYRK1A and is known to play critical roles in the development and progression of a variety of tumors by regulating cell proliferation, cell cycle progression, apoptosis, angiogenesis, immune evasion, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and by other effects in cancer stem cells [37]. STAT3 is over-expressed in various cancers and represents an interesting target to impede cancer progression [38,39].

In addition, DYRK1A is demonstrated to attenuate Notch1 signaling in neuroblastomas [11]. Notch1 signaling is associated with angiogenesis, down-regulation of caspase-3 [42] and Notch1 oncogenic activity has been demonstrated in gliomas [40] and other malignancies [41]. Interestingly, DYRK1A acts as a negative regulator of apoptosis by phosphorylating Thr125 of caspase-9 [43,44]. Subsequently, inhibition of DYRK1A by harmine leads to the activation of caspase-9 and causes massive apoptosis in various human cell types [43, 10]. Thus, inhibiting DYRK1A activity in cancer cells could offer a new strategy to combat the dismal prognosis associated with cancers that display resistance to pro-apoptotic stimuli. Indeed, approximately 90% of cancer patients die from their metastases, which is largely due to the intrinsic resistance of metastatic cancer cells to pro-apoptotic stimuli because of their inherent resistance to the anoikis process [45,46]. In addition, approximately one-third of solid tumors in adult patients are intrinsically resistant to pro-apoptotic stimuli, and thus to conventional chemotherapy and radiotherapy, before metastasizing, which is the case for non-small-cell lung cancers [47], melanomas [48,49], esophageal cancers [50], pancreatic cancers [51] and gliomas [52]. Thus, an elegant strategy for overcoming the intrinsic

resistance of various cancer types to pro-apoptotic stimuli would be to combine DYRK1A inhibitors with conventional radiotherapy and/or chemotherapy.

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP (SAR) ANALYSES WITH RESPECT TO DYRK1A INHIBITORS

How DYRK1A Inhibitors Interact with their Target?

Regarding all compounds that have been described as DYRK1A inhibitors, it is difficult to draw clear-cut SAR analyses to direct further chemical syntheses. However, docking experiments and co-crystallization performed with ATP competitive inhibitors could highlight amino acids residues within DYRK1A that are important for interactions with DYRK1A inhibitors [8] (Fig. 1). Most DYRK1A inhibitors are ATP-competitor and act by binding within the DYRK1A kinase domain [8]. Inhibitors could also bind to other regions of DYRK1A to prevent the functionality of the ATP-binding site and, thus, act as an indirect ATP-competitor [8]. Furthermore, compounds could interact directly or indirectly with the DYRK1A activation loop to prevent autophosphorylation and to inhibit kinase activity [8].

The X-ray structure of DYRK1A has been solved recently by complexing the protein with the indazole compound, D15 (N-(5-((2S)-4-amino-2-(3-chlorophenyl)butanoyl)amino)-1H-indazol-3-yl)benzamide) (PDB: 2WO6) [53]. D15 interacts with the ATP-binding site, forming hydrogen bonds with Asp307, Glu239, Asn292 and Leu241. D15 could also interact with Val306 and Val173, given their close proximity [53] (Fig. 1A).

Harmine has also been co-crystallized with the DYRK1A kinase domain (PDB: 3ANR) [54], which confirms that harmine acts as an ATP-competitor. Harmine (48) (Table 3) forms hydrogen bonds with Leu242 and Lys188 and could interact with Leu294, Val222, Val306, Phe238, Glu203, Glu239 and Asp307 [55] (Fig. 1B).

The third molecule that has been co-crystallized with DYRK1A is the benzothiazole INDY (13), which forms hydrogen bonds with Lys188 and Leu241 within the ATP binding-pocket and could possibly interact with Ala186 and Val173 (PDB: 3ANQ) [54] (Fig. 1C).

Before the X-ray structure of DYRK1A was determined, several docking experiments were performed to design specific inhibitors. Initial DYRK1A *in silico* models were based on either the crystal structure of GSK-3 β [20] or the homology model of the phosphorylated MAP kinase extracellular signal-regulated kinase-2 (ERK2) [56]. These templates were chosen due to their similarity with the kinase domain of DYRK1A, although they only share ~30% of the overall sequence identity. Compounds 1-3 (Table 1) were designed from these docking experiments [20,57].

The means by which other DYRK1A inhibitors interact with their target remain poorly understood. Most directly compete with ATP, although docking experiments and co-crystallization have not been performed on DYRK1A in all cases. Quinazolinone IQA (53) (Table 3) and quinolone derivatives (18 and 19) (Table 2) are known to bind to the

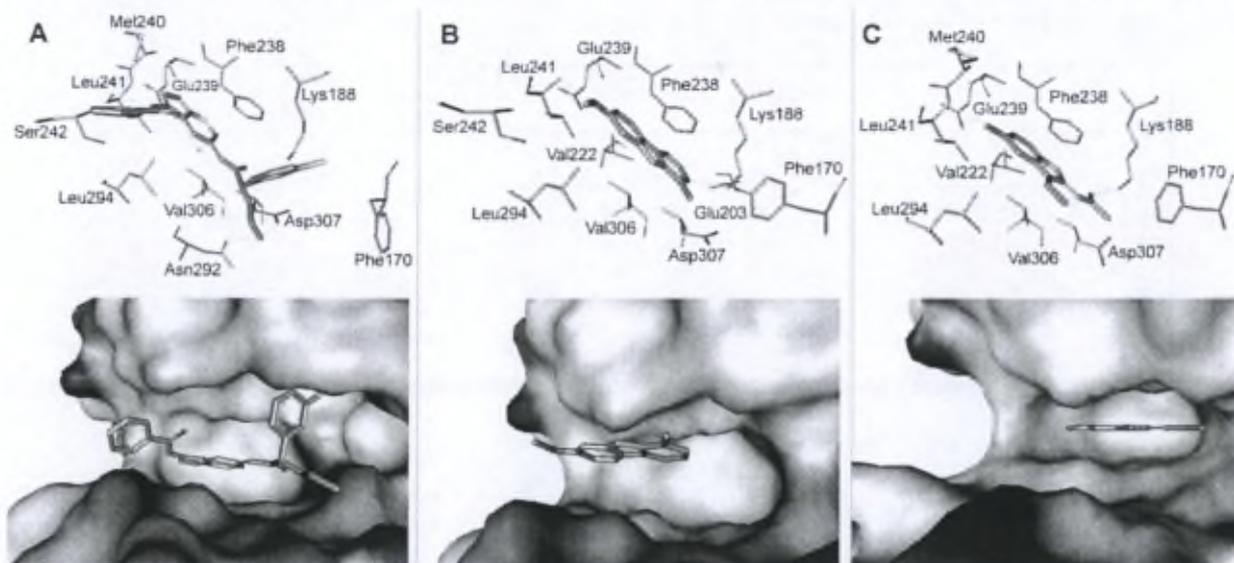


Fig. (1). Crystal structure of the DYRK1A/D15 (A), DYRK1A/harmine (B) and DYRK1A/INDY (C) complexes. Up: stereo views of the ligand-binding site of the DYRK1A/ligand complex. The dotted lines indicate hydrogen bonds. Down: surface representation of the ATP-binding site of DYRK1A in complex with each ligand. The following interactions are visible: D15 interacts with Asp307, Asn292 and Leu241. D15 could also interact with Val306 and Phe238. Harmine interacts with Leu241 and Lys188. It could also interact with Val222 and Phe238. INDY interacts with Lys188 and Leu241.

kinase domain of CK2 [58,59]. Meriolin derivatives (29, 31) and variolin (39) (Table 2) have been co-crystallized with CDK2 and bind the protein kinase domain (PDB: 3BHT / 3BHU) [60].

Interestingly, one of the most potent DYRK1A inhibitors, epigallocatechin gallate (EGCG; 66) (Table 5), does not compete with ATP when inhibiting DYRK1A activity [61], and its mechanism of action still remains unknown.

HOW DID WE CLASSIFY DYRK1A INHIBITORS?

Numerous DYRK1A inhibitors have been described in the literature over the past decade. To inhibit DYRK1A activity, compounds prevent protein autophosphorylation or bind to the mature protein, most frequently at the ATP binding site. All of the DYRK1A inhibitors described in the literature are either nitrogenous heterocycles or polyphenols. For this review, we categorized the nitrogenous heterocyclic derivatives into six different compound families according to the number of fused cycles in their scaffold, from monocyclic to octacyclic scaffold derivatives. We dedicated the last class to polyphenolic compounds. Tables 1-5 describe the most active DYRK1A inhibitors belonging to the seven distinct chemical classes mentioned above.

The Various Classes of DYRK1A Inhibitors

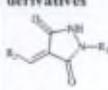
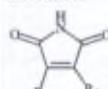
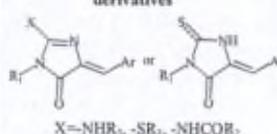
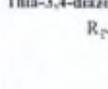
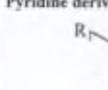
The first family of nitrogenous heterocycles possesses a monocyclic core (Table 1). Compound 1, with a pyrazolidine-3,5-diones core, was identified in the field of learning and memory by Kim and colleagues [20] as a DYRK1A inhibitor in a patient with neurological deficits, by utilizing a combination of *in silico*, *in vitro* and cell-based

screening. Later, the same team developed two series of pyrazolidine-3,5-diones derivatives to perform SARs between DYRK1A and different substitutes.

Compounds 2 and 3 emerged as hits and also showed inhibitory activity against DYRK1A autophosphorylation (Table 1) [57].

Small molecules, such as SB216763 (4) and SB415286 (5) pyrrole-2,5-dione derivatives, were first identified as GSK-selective, ATP-competitive inhibitors (IC_{50} concentrations ranging between 100 and 200 nM) and were later reported to inhibit DYRK1A activity *in vitro* at slightly higher concentrations (IC_{50} from 0.8 to 2 μ M) (Table 1) [62,63]. The specificity of 4 has been examined against a panel of 71 protein kinases, which revealed that the compound only interacts with four protein kinases (extracellular signal-regulated kinase 8 (ERK8), GSK3 β , inositol phosphate kinase 2 (IPK2) and serine-rich protein kinase 1 (SRPK1)) in addition to DYRK1A [63]. Interestingly, within the DYRK1A family, this compound is specific for DYRK1A [63]. Within the framework of drug discovery for the learning and memory deficits in Down's syndrome, thia-3,4-diazole derivative 7 emerges as a potent DYRK1A inhibitor [20] and inhibits both autophosphorylation and mature protein activity [20]. The specificity of compound 7 for DYRK1A was confirmed by screening 15 other protein kinases that were structurally close to DYRK1A (Table 1). MADE 44 (6) is the lead compound from a series of alkaloid leucettamine B derivatives that were developed and patented as DYRK1A inhibitors [64].

Table 1. DYRK1A Inhibitors Displaying Monocyclic Scaffolds (Class I)

Chemical Structures ⁱ	Inhibits Mature Protein (IC ₅₀ ⁱⁱ ; μ M)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ⁱⁱ ; μ M)	Specificity ⁱⁱⁱ (IC ₅₀ in μ M)	Inhibition Mechanism	Clinical Indications	
Pyrazolidine-3,5-dione derivatives 	1 (R ₁ =3,4-dichlorophenyl, R ₂ =3-methoxy-4-hydroxyphenyl) [20]	< 10	2.5	CLK3 < 10 (tested on 15 kinases)	Docking in model DYRK1A ATP binding site	-
	2 (R ₁ =3,4-dichlorophenyl, R ₂ =3-nitro-4-hydroxyphenyl) [57]	1.3	0.6	Dyrk2 < 15	Docking in the ATP binding site	-
	3 (R ₁ =4-cyanophenyl, R ₂ =3-methoxy-4-hydroxyphenyl) [57]	6	0.6	-	Unknown	-
Pyrrrole-2,5-dione derivatives 	4 (SB 216763): (R ₁ =3-(N-methyl)indolyl, R ₂ =2,4-dichlorophenyl)	0.8 [62]	- 50 (Ser720 Auto-phosphorylation) [13]	[63]: ERK8, GSK3 β , CDK2-Cyclin A, RSK1, PIM3, SRPK1, HIPK2, HIPK2 < 2 [62]: GSK3 β : 0.10 CDK2-cyclin A: 0.95 CHK1, RSK1, PKC < 10	Unknown	Type II diabetes [94]
	5 (SB 415286): (R ₁ =2-nitrophenyl, R ₂ =amino(3-chloro-4-hydroxy)phenyl)	0.9 [62]	-	[62]: GSK3 β : 0.20 CDK2-Cyclin A: 0.80 [63]: MKK, ERK8, RSK1, RSK2, PRK2, PKCo, CaMKK β , AMPK, MARK3, BRSK2, PIM1, PIM2, PIM3, MST2 < 10	Unknown	Type II diabetes [94]
Imidazolone (Leucettamine) derivatives 	6 (MADE 44) [64]	34 compounds with IC ₅₀ < 1 6: 0.07	-	No selectivity assay reported.	Unknown	-
Thia-3,4-diazole derivatives 	7 [20]	< 10	5	CLK3, GSK3 β , Dyrk2 < 10	Unknown	-
Pyridine derivatives 	8 (A-443654) [65]	< 0.01	-	ERK8, RSK1, RSK2, PKBa, PKB β , S6K1, PKA, ROCK2, PRK2, PKCo, PKD1, MSK1, SmMLCK, GSK3 β , CDK2-Cyclin A, DYRK2, DYRK3, PIM1, PIM2, PIM3, MST2, HIPK2 < 0.10	Unknown	-

i) the activity of the most efficient DYRK1A inhibitors are presented at the levels of phosphorylation or autophosphorylation with IC₅₀ < 10 μ M.

ii) the assays were carried out with variable reaction conditions.

iii) other kinases that are inhibited at a concentration close to DYRK1A's IC₅₀ are listed.

Pyridine derivative **8** (from Abbott labs, referenced as A-443654) was initially identified as a potent Akt inhibitor for use in the anticancer research field [65]. However, **8** also inhibits other members of the AGC subfamily of protein kinases as well as DYRK1A at slightly lower potency (Table 1). Its anticancer properties have been reported in the literature [65,66] and could be related to its pan-anti-kinase effects.

Table 2 details bicyclic scaffold-related compounds that efficiently inhibit DYRK1A kinase.

Among the purine derivatives and analogs, purvalanol A (**9**) and roscovitine (**10**) are several-fold more potent inhibitors of cyclin dependent kinases (CDKs) compared to DYRK1A. (Table 2) Thus, their use for neurodegenerative diseases may be limited due to their effects on the cell cycle [67]. The (*R*)-roscovitine (Siliciclib) has already entered clinical trials as an anticancer drug for solid and non-solid cancers. In an effort to identify new roscovitine analogs with increased antitumor potency, two compounds closely related to roscovitine, N-&-N1 and N-&-N2 (**11** and **12**), were synthesized and studied by Laurent Meijer's team, who previously discovered roscovitine (Table 2). Similar to roscovitine, these two compounds are more potent inhibitors of CDKs compared to DYRK1A [68].

The benzothiazole derivative **13**, referred to as INDY (INhibitor of DYrk1A) by Ogawa and colleagues [54], displays potent and selective inhibition of DYRK1A (Table 2). Its selectivity has been tested against a panel of 66 kinases, and it only inhibited other members of the DYRK family, including DYRK1B, DYRK2, DYRK3 and DYRK4, as well as Clk family kinase [54]. The potential antitumor activity and/or neural benefits of INDY have not yet been reported. The related TG003 compound **14** was profiled against a panel of 402 protein kinases and was found to bind to DYRK1A, Clk1, Clk2 and Clk4 selectively (Table 2) [69].

The tetrabromobenzimidazole derivatives, TBB, TBI and DMAT (**15** -**17**) (Table 2), were first investigated to specifically inhibit casein kinase 2 (CK2) but also display marked activity on kinases that belong to the DYRK family as well as three other kinase groups [70].

Quinolone derivatives **18** and **19** (Table 2) show higher activity against CK2 than DYRK1A but remain selective for both kinases compared to a panel of five serine/threonine kinases and two tyrosine kinases [71]. The quinazoline derivative **20** (Table 2) was profiled against a panel of 402 kinases and was found to be remarkably selective for DYRK1A, Clk1 and Clk4, which all belong to the CGMC kinase group [69]. Quinazoline derivative **23** (Table 2) inhibits the autophosphorylation of DYRK1A at 5 μ M but does not display significant anti-DYRK1A effects at this concentration [20]. In the cancer research field, hydroxy-quinoline-carboxylic acids were designed to interact with the CGMC threonine/serine Pim-1 kinase, which has been labeled as an oncogene [72]. Compounds **24** and **25** (Table 2) display significant anti-kinase activity against DYRK1A [73]. Compound **26** (Table 2) inhibits autophosphorylation and kinase activity at a concentration of 10 μ M [20].

Meriolin derivatives (**27**-**38**; Table 2), which we included in the pyrimidinyl azaindole chemical subgroup, are chemical hybrids between the marine alkaloids, meridianin and variolin (**39**) (Table 2). Meriolins display anti-DYRK1A activity and marked antiproliferative and pro-apoptotic effects in tumor cells [60].

Synthetic analogues of meridianins, with diverse substitutions at the C-5 position of the pyrimidine ring and both unmethylated and methylated forms of the indole nitrogen (compounds **40** - **44**), displayed sub-micromolar inhibition of DYRK1A (Table 2). However, none of these compounds displayed significant cytotoxic effects on primary cultured fibroblasts or two human solid-tumor cell lines (MCF7 and PA1) [74].

The two amino-imidazopyridine-oxadiazole derivatives (compounds **45** and **46**; Table 2) have been synthesized to selectively inhibit mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1); they also display inhibitory effects toward DYRK1A but at concentrations of approximately one thousand times higher than for MSK-1 [75].

Compound **47** (Table 2) and its analogs have been patented for leukemia treatment and display anti-DYRK1A activity [76].

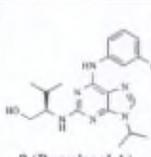
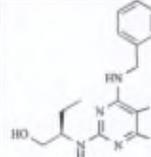
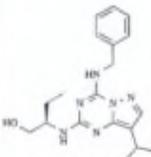
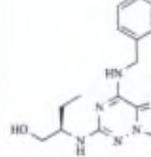
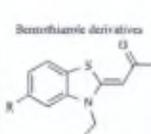
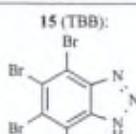
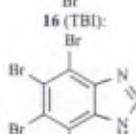
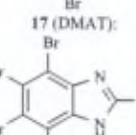
The alkaloid compound harmine (**48**) (Table 3) has been identified as a potent and selective inhibitor of DYRK1A [63] and has primarily been used to identify the role of DYRK1A substrates *in vivo* and as a negative control for the pathological effects of DYRK1A overexpression [44]. Additionally, harmine (**48**) has been commonly used as a chemotherapeutic drug for a number of diseases [43,77,78]. In a study unrelated to DYRK1A, harmine and related β -carbolines (**49**-**52**) display cytotoxic activity toward human tumor cell lines in culture (Table 3) [79], which suggests their potential use in anticancer therapeutics [80].

However, in addition to being an effective DYRK1A inhibitor, harmine is an even more potent inhibitor of monoamine oxidase A (MAOA) [81]. Harmine could inhibit the resistance of cancer cells to apoptotic stimuli by inhibiting DYRK1A, thus preventing the autophosphorylation of caspase-9 [43]. A study performed on breast cancer cell lines that overexpress BCRP (breast cancer resistance protein), a protein that leads to DNA topoisomerase I inhibitor resistance, showed that co-treatment with a non-toxic dose of harmine with camptothecin reversed BCRP-mediated resistance [82].

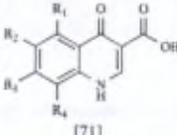
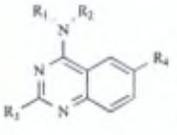
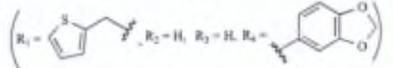
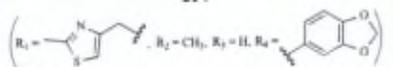
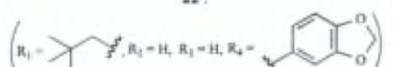
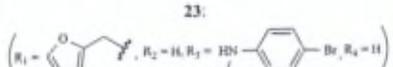
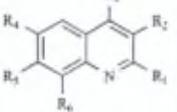
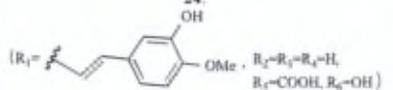
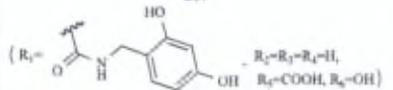
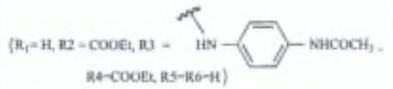
The quinazolinone IQA (**53**; Table 3) was developed to specifically target CK2 (casein kinase) for use as an anticancer therapeutic. It also targets DYRK1A, with an IC₅₀ that is twenty-fold weaker than its IC₅₀ on CK2 [59].

The DYRK1A inhibitors that displayed five fused cycles (**54**-**62**; Table 4) were derived from marine invertebrates and were termed lamellarins. These compounds are potent inducers of apoptosis and have been shown to revert to the multidrug resistance phenotype [83-85]. The kinases selectively targeted by these compounds include DYRK1A, CDK1, GSK and CK1 [83].

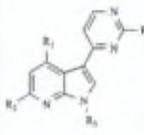
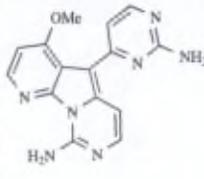
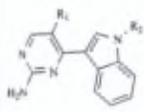
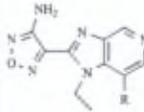
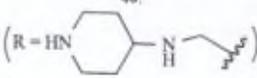
Table 2. DYRK1A Inhibitors Displaying Bicyclic Scaffolds (Class II)

Chemical Structures ^a	Inhibits mature protein (IC ₅₀ ^b , μM)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ^c , μM)	Specificity ^d (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical indication
Purine derivatives and analogs					
 <p>9 (Purvalanol A)</p>	 <p>10 (Roscovitine)</p>		<p>9 [63]: CDK2: 0.03 PAK4: 0.1 Src < 0.1 μM MAPK/ERK2, MAPKAP-K1a, PHK, LCK, CSK : < 10</p> <p>[67]: CDK2/cyclin A: 0.1 RSK1: 1.5</p> <p>10 ERK2 < 1 CDK2: 0.1 PAK4: 7 [63]</p> <p>CDK2/cyclin A: 0.25 CK1δ: 17 [67]</p> <p>11 CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, CDK5/p25, CDK7/cyclin H, CDK9/cyclin T, CK1, Erk2 < 4 [68]</p> <p>12 CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, CDK5/p25, CDK7/cyclin H, CDK9/cyclin T, CK1 < 1.3 [68]</p>	<p>10 & 11: Crystallization with CDK2/cyclin A shows that they dock in the ATP binding site. [68]</p>	<p>10: Phase 2 clinical trials for B-cell malignancies, lung and breast cancer Phase 1 trials for glomerulonephritis, and Phase 2 trials in IgA nephropathy. [96]</p>
 <p>11 (N-&N 1)</p>	 <p>12 (N-&N 2)</p>	<p>9: 0.3 [67] 10: 3.1 [67, 68] 11: 1.3 [68] 12: 2.0 [68]</p> <p>10: 5 [62]</p>			
Benzothiazole derivatives					
 <p>13 (INDY: R=OH) 14 (TG003: R=CH₃O)</p>			<p>13 [54]: DYRK1B : 0.24 CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK5/p25, CLK1, CLK2, CLK3, CLK4, CSNK1A1 (CK1a1), CSNK1D (CK1δ), CSNK1G2 (CK1γ2), PIM1, MET, DYRK2, DYRK3, DYRK4, FLT3, GSK3α, GSK3β, LRPK2 ≤ 10</p> <p>14 [95]: DYRK1B : 2 mCik1 : 0.02 mCik2 : 0.2 Dyrk1B: 0.1 Kd [69] versus: Cik3: 3 CSNK1D: 0.2 CSNK1E: 0.3 Dyrk1B: 0.1 PIM1: 0.1 PIM3: 0.3 Ysk4: 0.3 CSNK1G2: 0.3 CSNK1G3: 0.3 Ysk4: 0.3</p>	Unknown	-
4,5,6,7-Tetrabromobenzimidazole (TBI) derivatives and analogs					
 <p>15 (TBB):</p>  <p>16 (TBI):</p>  <p>17 (DMAT):</p>	<p>15: 4.4 [70] 1.1 [55] 16: 2.1 [70] 17: 0.1 [93] 0.4 [70]</p>		<p>15 [70]: CK2: 0.2 PIM1: 1 PIM2: 4 PIM3: 1 HIPK2: 5 HIPK3: 5 DYRK2: 1 DYRK3: 5 PKD1: 6 CDK2: 14 CDK2: 0.5 [59]</p> <p>16 [70]: CK2: 0.6 PIM1: 0.1 PIM2: 0.2 PIM3: 0.07 HIPK2: 0.7 HIPK3: 1.2 DYRK2: 0.3 DYRK3: 4 PKD1: 0.3 CDK2: 0.6</p> <p>17 [70]: PIM1: 0.2 PIM2: 2 PIM3: 0.1 HIPK2: 0.4 HIPK3: 0.6 DYRK2: 35 DYRK3: 2 PKD1: 0.2 CDK2: 0.6</p> <p>[93]: CK2: 0.1 MKK: 11 MAPKAP-K1a: 10 SGK: 4 Phosphorylase kinase: 7 CDK2/cyclin A: 2</p>	Unknown	-

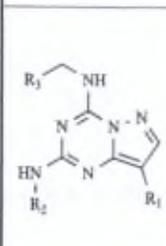
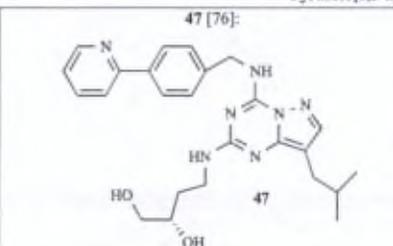
(Table 2) contd....

Chemical Structures ^a	Inhibits mature protein (IC ₅₀ ^b , μM)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ^b , μM)	Specificity ^{ab} (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical Indication	
Quinolones/ Quinazolines/ Quinolines						
<p>3-Carboxy-4(1H)-quinolone derivatives</p>  <p>[71]</p>	<p>18: (R₁=R₂=R₃=Cl, R₄=H)</p> <p>19: (R₁=R₂=H, R₃=R₄=phenyl)</p>	<p>18: < 10</p> <p>19: > 10</p>	-	<p>CK2</p> <p>C7: 0.3</p> <p>C9: 1</p>	<p>In inhibiting CK2, 18 & 19 are ATP competitive</p>	-
<p>4-amino-6-arylquinazolines derivatives</p> 	<p>20: </p> <p>21: </p> <p>22: </p> <p>23: </p>	<p>20: K_dⁱⁿ: 0.03 [69] 0.07 [92]</p> <p>21: 0.01 [92] 22: 0.02 [92]</p> <p>28 compounds with 10 > IC₅₀ > 0.1 and 17 compounds with 0.1 > IC₅₀ > 0.01 [92]</p> <p>23: >10 [20]</p>	<p>21: 5 [62]</p> <p>23: 5 [20]</p>	<p>20 [92]: Clk1: 0.06 Clk2: 2 Clk3: 7 Clk4: 0.04 [Dyrk1B: 0.7 Clk4 : 0.06 [69] K_d [69]: Clk1: 0.04 Clk4: 50 EGFR: 230 Clk2: 680 Clk3: 470 Dyrk1B: 430 21 [92]: Clk1: 0.02 Clk2: 0.2 Clk3: 2 Clk4: 0.01 Dyrk1B: 0.03 22 [92]: Clk1: 0.2 Clk2: 584 Clk3: 0.4 Clk4: 0.07 Dyrk1B: 0.08</p>	<p>Unknown</p>	-
<p>Quinoline derivatives:</p> 	<p>24: </p> <p>25: </p> <p>26: </p>	<p>24: 1.3 [73] 25: 4.5 [73]</p> <p>26: 10 [20]</p>	<p>26: 10 [20]</p>	<p>24 [73]: Pim-1: 0.5 DYRK2: 1 CLK: 8</p> <p>25 [73]: Pim-1: 0.4 DYRK2: 6</p>	<p>Unknown</p>	-

(Table 2) contd....

Chemical Structures ¹	Inhibits mature protein (IC ₅₀ ^a , μM)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ^a , μM)	Specificity [#] (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical indication
Pyrimidinylindol/azaindole derivatives					
<p>Meriolins (3-(4-pyrimidinyl)-7-azaindole) [60]</p>  <p>27: (R₁=H, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 28: (R₁=OH, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 29: (R₁=OMe, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 30: (R₁=OEt, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 31: (R₁=OPr, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 32: (R₁=OiPr, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 33: (R₁=OH, R₂=H, R₃=Me, R₄=NH₂) 34: (R₁=Cl, R₂=H, R₃=H, R₄=NH₂) 35: (R₁=H, R₂=Br, R₃=H, R₄=NH₂)</p>	<p>36: (R₁=OMe, R₂=H, R₃=H, R₄=SMe) 37: (R₁=OH, R₂=H, R₃=H, R₄=H) 38: (R₁=OMe, R₂=H, R₃=H, R₄=H) 39 (Variolin B):</p> 	<p>27: 0.1 28-32: ≤ 0.04 33: 1.2 34-38: ≤ 1 39: 0.08</p>	<p>Variolin B and Meriolins 27-32: CDK1/ cyclin B, CDK2/ cyclin A, CDK5/p25, CDK9/cyclinT, GSK-3 α/β, CK1 < 0.8</p> <p>Meriolin 33: CDK1/ cyclin B, CDK2/ cyclin A, CDK5/p25, CDK9/cyclinT, GSK-3 α/β, CK1 < 6</p> <p>Meriolins 34-38 : CDK1/ cyclin B, CDK2/ cyclin A, CDK5/p25, CDK9/cyclinT, GSK-3 α/β, CK1 < 30</p>	<p>X-ray Crystallographic structure of meriolin 5 and variolin B in complex with CDK2/cyclin A show that they fit inside the ATP-binding site.</p>	-
<p>Aminopyrimidinyl-indole Derivatives [74]</p> 	<p>40: (R₁=(3-methoxy)phenyl, R₂=H) 41: (R₁=(3-amino)phenyl, R₂=H) 42: (R₁=(4-amido)phenyl, R₂=H) 43: (R₁=(4-carboxy)phenyl, R₂=CH₃) 44: (R₁=I, R₂=CH₃)</p>	<p>40: 0.6 41: 0.6 42: 0.6 43: 0.9 44: 0.4</p>	<p>40: CK1δ/c GSK3α/β Erk2 < 4</p> <p>41: CK1δ/c GSK3α/β Erk2 < 7</p> <p>42: CK1δ/c GSK3α/β Erk2 < 4</p> <p>44: CDK5/p25 CK1δ/c GSK3α/β Erk2 < 5</p>	<p>Unknown</p>	-
1H-Imidazo[4,5-c]pyridin-2-yl)-3-amino-1,2,5-oxadiazole derivatives					
	<p>45: (R=H) 46:</p>  <p>(R = HN)</p>	<p>45: 0.1 46: 4.9</p> <p>[75]</p>	<p>45: GSK3b: 0.005 MSK-1 : 0.03 RSK-1: 0.02 P70S6K : 0.07 ROCK : 0.01 CDK2 : 0.2 AMPK, DYRK1a, MAPKAP-K1a, PKA, PKCa, SGK < 10</p> <p>46: MSK-1 : 0.0005 GSK3b : 2 RSK-1: 0.2 P70S6K : 0.3 ROCK : 0.1</p>	<p>Unknown</p>	-

(Table 2) contd....

Chemical Structures ¹	Inhibits mature protein (IC ₅₀ ^a , μM)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ^a , μM)	Specificity ⁱⁱ (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical indication	
Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine derivatives						
	 <p>47 [76]:</p>	18 Compounds with IC ₅₀ between 0.3 - 3 47: 0.3	-	18 Compounds tested on 7 kinases 47: CDK1/cyclin B : 0.02 CDK2/cyclin: 0.01 CDK5/p25: 0.01 CDK9/cyclin T: 0.04 CKI: 0.06	Unknown	-

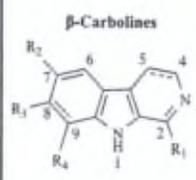
i) the activity of the most efficient DYRK1A inhibitors are presented at the levels of phosphorylation or autophosphorylation with IC₅₀ < 10 μM.

ii) the assays were carried out with variable reaction conditions.

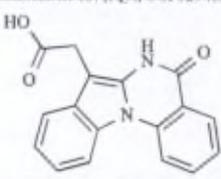
iii) other kinases that are inhibited at a concentration close to DYRK1A's IC₅₀ are listed.

iv) K_d = kinase binding: % of kinase bound to an immobilized ligand in the presence and absence of the test reagent as compared to DMSO.

Table 3. DYRK1A Inhibitors Displaying tri- (Class III) and Tetracyclic (Class IV) Scaffolds

Chemical Structures ¹	Inhibits Mature Protein (IC ₅₀ ^a , μM)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ^a , μM)	Specificity ⁱⁱ (IC ₅₀ in μM)	Inhibition Mechanism	Clinical Indications	
Class III: Tricyclic Scaffold						
	<p>48 (Harmine): (R₁=Me, R₂=H, R₃=OMe, R₄=H, 4-5: =)</p> <p>49 (Harmaline): (R₁=Me, R₂=H, R₃=H, R₄=H, 4-5: =)</p> <p>50 (Harmalol): (R₁=Me, R₂=H, R₃=OH, R₄=H, 4-5: -)</p> <p>51 (Harmaline): (R₁=Me, R₂=H, R₃=OMe, R₄=H, 4-5: -)</p> <p>52 (PS-1145): (R₁=H, R₂=Cl, R₃=H, R₄=3-pyridinecarboxamide, 4-5: =)</p>	<p>48: 0.03 [91] 0.08 [63] 0.4 [54] 0.08 [55]</p> <p>49: 2 [55] < 1 [63]</p> <p>50: > 1 [63]</p> <p>51: 5 [55] < 1 [63]</p> <p>52: < 10 [63]</p>	<p>48: Tyr321: 2 [91] Ser520: 5 [10]</p>	<p>DYRK 1B : 0.2 (85% sequence identity in catalytic domain) [91]</p> <p>[54]: DYRK1B : 0.3 CLK1, CLK2, CLK3 < 10</p> <p>[91]: DYRK2 : 2 DYRK4 : 80 MNB: 0.2</p> <p>[4]: CK1: 2</p> <p>[63]: DYRK2 : 1 DYRK3 : 1 PIM3: 4</p> <p>K_d [81]: MAO: 0.005</p> <p>Inhibits other kinases at concentrations > 1 [63, 55]</p> <p>Inhibits other kinases at concentrations > 1 [63]</p> <p>ERK8, DYRK3 < 1 DYRK2 > 1 [63, 55]</p> <p>ERK8, MNK1, DYRK3, IKKβ, PIM1, PIM2, PIM3 < 10 [63]</p>	<p>Crystallographic structure of Dyrk1A in complex with harmine shows that the inhibitor binds in the ATP site. [54]</p> <p>Unknown</p> <p>Unknown</p> <p>Unknown</p> <p>Unknown</p>	-

(Table 3) contd....

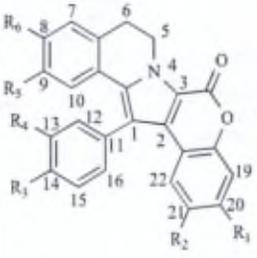
Chemical Structures ¹	Inhibits mature protein (IC ₅₀ ² ; μM)	Inhibits Auto-phosphorylation (IC ₅₀ ³ ; μM)	Specificity ^{2b} (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical indications
Class IV: Tetracyclic Scaffold					
Quinazolinone 53: (IQA, CGP029482) [59] 	53: 8	-	CK2: 0.4 PKA: 16 GSK3β: 14 Lck: 11	X-ray crystallography of CK2/IQA shows that IQA binds to CK2 at the ATP-binding site.	-

i) the activity of the most efficient DYRK1A inhibitors are presented at the levels of phosphorylation or autophosphorylation with IC₅₀ < 10 μM.

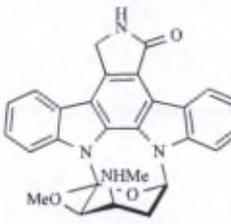
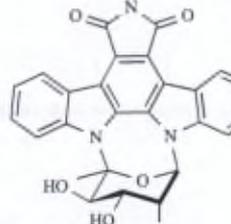
ii) the assays were carried out with variable reaction conditions.

iii) other kinases that are inhibited at a concentration close to DYRK1A's IC₅₀ are listed.

Table 4. DYRK1A Inhibitors Displaying Penta- (Class V) and Octacyclic (Class VI) Scaffolds

Chemical Structures ¹	Inhibits Mature Protein (IC ₅₀ ² ; μM)	Specificity ^{2b} (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical Indications	
Class V: Pentacyclic Scaffold					
 Lamellarins [83]	54 (Lam. D): (R ₁ =OH, R ₂ =OMe, R ₃ =OH, R ₄ =OMe, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: =) 55 (Lam. α): (R ₁ =OH, R ₂ =OMe, R ₃ =OH, R ₄ =OMe, R ₅ =OMe, R ₆ =OMe, 5-6: =) 56 (di-H-Lam.D): (R ₁ =OH, R ₂ =OMe, R ₃ =OH, R ₄ =OMe, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: -) 57 (Lam. N): (R ₁ =OH, R ₂ =OMe, R ₃ =OMe, R ₄ =OH, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: =) 58 (Lam. L): (R ₁ =OH, R ₂ =OMe, R ₃ =OMe, R ₄ =OH, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: -)	59 (Lam. 3): (R ₁ =OH, R ₂ =H, R ₃ =OH, R ₄ =OMe, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: =) 60 (Lam. 4): (R ₁ =H, R ₂ =OMe, R ₃ =OH, R ₄ =OMe, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: =) 61 (Lam. 6): (R ₁ =OH, R ₂ =OMe, R ₃ =OH, R ₄ =H, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: =) 62 (Lam. 8): (R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =OH, R ₄ =OMe, R ₅ =OMe, R ₆ =OH, 5-6: =)	54: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 < 0.6 55: CDK1/cyclin B GSK-3α/β PIM1 CK1 < 8 56: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 CK1 < 6 57: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 < 0.07 AMPKα, CaMK2α, CHK2, CSK, FGFR2, FLT-1, FLT-3, Fyn, JNK 2, KDR, Lek, Lyn, PDGFRβ, Ret, RSK2, TRKA < 10	58: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 < 0.04 59: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 CK1 < 0.6 60: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 CK1 < 2 61: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1, CK1 < 0.2 62: CDK1/cyclin B CDK5/p25 GSK-3α/β PIM1 < 5	Unknown

(Table 4) Contd....

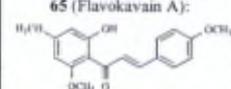
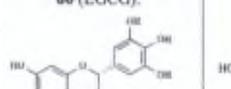
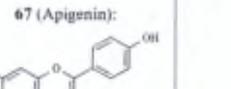
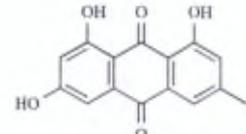
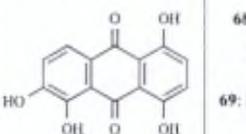
Chemical Structures ⁱ	Inhibits Mature Protein (IC ₅₀ ⁱⁱ , μM)	Specificity ⁱⁱⁱ (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical Indications	
Class VI: Octacyclic Scaffold					
Glycosylated indolocarbazole derivatives					
63 (Staurosporine) [86]: 	64 [86]: 	63: Aurora A: 0.0072 Aurora B: 0.02 Chk1: 0.001 Fd3: 0.003 HGK: 0.001 Ikkb: 0.0005 Jak2: 0.001 KDR: 0.01 SYK: 0.004 64: 0.004	64: Chk1: 0.001 Fd3: 0.0006 FGFR1: 0.009 HGK: 0.0008 Ikkb: 0.002 Jak2: 0.0005 KDR: 0.004 SYK: 0.001	X-ray crystallographic structures of PI3K-γ with staurosporine shows this compound binds into the ATP site. [97]	

i) the activity of the most efficient DYRK1A inhibitors are presented at the levels of phosphorylation or auto-phosphorylation with IC₅₀ < 10 μM.

ii) the assays were carried out with variable reaction conditions.

iii) other kinases that are inhibited at a concentration close to DYRK1A's IC₅₀ are listed.

Table 5. DYRK1A Inhibitors with Polyphenolic Structures (Class VII)

Chemical Structures ⁱ	Inhibits mature protein (IC ₅₀ ⁱⁱ , μM)	Specificity ⁱⁱⁱ (IC ₅₀ in μM)	Inhibition mechanism	Clinical indications	
Class VII: Polyphenols					
65 (Flavokavain A):  Piper methysticum (Kava) derivatives	66 (EGCG): 	67 (Apigenin): 	65 [88]: Aurora B < 10 μM (Tested on 52 protein kinases) 66 [67]: PRAK: 1 μM PDK: 10 μM 67 [59]: CK2: 1 μM SGK, CDK2/cyclinA, Lck, c-Fgr < 10 μM 68 [58]: PIM3: 0.08 μM CK2: 2.5 μM CK2: 0.9 μM [59] 69 [58]: K _s : CK2: 0.05 μM (IC ₅₀ = 0.1 μM) PIM1: 1 μM PIM3: 1 μM (IC ₅₀ = 2 μM) HIPK2: 2 μM (Specific inhibitor of CK2)	66: Not competitive with ATP [61] 69: CK2 inhibition is competitive with ATP. [58]	66: 28 clinical trials on cancer, one clinical trial on down syndrome, 63 clinical trials in total (Administered as drug or as tea/tea extracts dietary supplements) [clinicaltrials.gov] 67: Phase II - suspended clinical trial on prevention of neoplasia recurrence [clinicaltrials.gov]
68 (Emodin): 	69 (Quinalizarin): 	65: < 10 [88] 66: 0.3 [67] 0.04 [61] 67: < 10 [59] 68: < 10 [59] 0.7 [55] 69: K _s ^{iv} = 5.9 [58]			

i) the activity of the most efficient DYRK1A inhibitors are presented at the levels of phosphorylation or auto-phosphorylation with IC₅₀ < 10 μM.

ii) the assays were carried out with variable reaction conditions.

iii) other kinases that are inhibited at a concentration close to DYRK1A's IC₅₀ are listed.

iv) K_s = kinase binding: % of kinase bound to an immobilized ligand in the presence and absence of the test reagent as compared to DMSO.

The octacyclic core compounds that have been reported to display anti-DYRK1A properties include the glycosylated indolocarbazole derivative staurosporine (**63**) and the close analogue **64** (Table 4), which inhibits 11 out of a panel of 57

kinases tested, including DYRK1A, at or below single-digit nanomolar concentrations, [86]. When compared to **63**, **64** displays slightly higher selectivity [86].

The last class of DYRK1A protein kinase inhibitors includes polyphenolic compounds (Table 5). Polyphenols are known to display antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor properties [87]. We recently reviewed the general topic of natural polyphenols that display anticancer properties through anti-kinase activity [87]. Among them, flavokavain A (65), EGCG (66), apigenin (67), emodin (68) and quinalizarin (69) show anti-DYRK1A properties with IC₅₀ values in the low and sub-micromolar range.

Marc Diederich's team reports that flavokavain A (65) substantially decreases the activity of DYRK1A and that of two other kinases, Aurora B and PRAK, and it does not interact with the remaining subset of 49 kinases that were also tested [88]. Furthermore, 65 is reported to possess anticancer activity that is associated with its ability to induce a loss of mitochondrial potential and cytochrome C release [89].

The green tea polyphenol extract EGCG (66) emerges as an effective and specific DYRK1A inhibitor (Table 5) [67,90]. However, EGCG is not a selective inhibitor of DYRK1A [87].

The apigenin (67) (Table 5) is a flavonoid, which is found at high concentrations in several herbs, including parsley, thyme and peppermint, and its anti-DYRK1A properties have already been highlighted [59]. Similar to emodin (68) and quinalizarin (69) (Table 5), numerous ATP-competitive inhibitors developed against CK2 are also effective against DYRK1A [55].

The phenolic compound emodin (68), obtained from rhubarb or frangula bark, (Table 5) has also been studied for its DYRK1A inhibitory properties [55,59]. Emodin (68) inhibits DYRK1A and CK2 with comparable efficacy and remained selective for those two kinases when used at 10 μM among a panel of 33 protein kinases [55,59]. Interestingly, another anthraquinone derivative, quinalizarin (69), (Table 5) has been identified as a potent CK2 inhibitor, but it displays ten-fold weaker inhibition toward DYRK1A compared to CK2 and to the inhibition of DYRK1A induced by emodin [55,58].

CONCLUSIONS

The protein kinase DYRK1A has mostly been investigated within the framework of neurodegenerative diseases, in which it must be as selective as possible in order to not disturb the cell cycle and general cell metabolism. In contrast, in cancer treatment, absolute selectivity may not be essential for a kinase inhibitor to be a drug candidate, and some promiscuity may actually be an advantage in terms of clinical efficiency, as it is the case with roscovitine (10).

There are dozens of currently available compounds that inhibit DYRK1A activity with differential selectivity. The majority of DYRK1A inhibitors reviewed here were initially designed to target the active site of some other kinases such as quinazolinone and quinolone derivatives (53, 58, 59) for CK2 inhibition, or pyrrole-2,5-dione derivatives for GSK inhibition (4, 5). Because its X-ray structure has only been solved quite recently, too few studies of the actual selective inhibition of DYRK1A have yet been carried out in order to

draw any general conclusions about its structure-activity relationship (SAR).

ACKNOWLEDGEMENTS

Grant Support

R. Kiss is a Director of Research with the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium). A. Ionescu is a PhD student granted by the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA, Belgium).

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Becker, W.; Weber, Y.; Wetzel, K.; Eirnbter, K.; Tejedor, F.J.; Joost, H.G. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*(40), 25893-25902.
- [2] Aranda, S.; Laguna, A.; de la Luna, S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.*, **2011**, *25*(2), 449-462.
- [3] Becker, W.; Joost, H.G. Structural and functional characteristics of Dyk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, **1999**, *62*, 1-17.
- [4] Park, J.; Song, W.J.; Chung, K.C. Function and regulation of Dyk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2009**, *66*(20), 3235-3240.
- [5] Guimera, J.; Casas, C.; Estivill, X.; Pritchard, M. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics*, **1999**, *57*(3), 407-418.
- [6] Okui, M.; Ide, T.; Morita, K.; Funakoshi, E.; Ito, F.; Ogita, K.; Yoneda, Y.; Kudoh, J.; Shimizu, N. High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics*, **1999**, *62*(2), 165-171.
- [7] Loehhead, P.A.; Sibbet, G.; Morrice, N.; Cleghon, V. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell*, **2005**, *121*(6), 925-936.
- [8] For a recent review about DYRK1A regulation see: Becker, W.; Sippl, W. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.*, **2011**, *278*(2), 246-256.
- [9] Skurat, A.V.; Dietrich, A.D. Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(4), 2490-2498.
- [10] Laguna, A.; Aranda, S.; Barallobre, M.J.; Barhoum, R.; Fernández, E.; Fotaki, V.; Delabar, J.M.; de la Luna, S.; de la Villa, P.; Arbonés, M.L. The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev. Cell.*, **2008**, *15*(6), 841-853.
- [11] Fernandez-Martinez, J.; Vela, E.M.; Tora-Ponsioen, M.; Ocaña, O.H.; Nieto, M.A.; Galceran, J. Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A. *J. Cell Sci.*, **2009**, *122*(Pt 10), 1574-1583.
- [12] Kim, D.; Won, J.; Shin, D.W.; Kang, J.; Kim, Y.J.; Choi, S.Y.; Hwang, M.K.; Jeong, B.W.; Kim, G.S.; Joe, C.O.; Chung, S.H.; Song, W.J. Regulation of Dyk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *323*(2), 499-504.
- [13] Alvarez, M.; Altafaj, X.; Aranda, S.; de la Luna, S. DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol. Biol. Cell.*, **2007**, *18*(4), 1167-1178.
- [14] Ahn, K.J.; Jeong, H.K.; Choi, H.S.; Ryoo, S.R.; Kim, Y.J.; Goo, J.S.; Choi, S.Y.; Han, J.S.; Ha, I.; Song, W.J. DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol. Dis.*, **2006**, *22*(3), 463-472.

- [15] Altafaj, X.; Dierssen, M.; Baamonde, C.; Marti, E.; Visa, J.; Guimerà, J.; Oset, M.; González, J.R.; Flórez, J.; Fillat, C.; Estivill, X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **2001**, *10*(18), 1915-1923.
- [16] Smith, D.J.; Stevens, M.E.; Sudanagunta, S.P.; Bronson, R.T.; Makhinson, M.; Watabe, A.M.; O'Dell, T.J.; Fung, J.; Weier, H.U.; Cheng, J.F.; Rubin, E.M. Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genet.*, **1997**, *16*(1), 28-36.
- [17] Burger, P.C.; Vogel, F.S. The development of the pathologic changes of Alzheimer's disease and senile dementia in patients with Down's syndrome. *Am. J. Pathol.*, **1973**, *73*(2), 457-476.
- [18] Olson, M.I.; Shaw, C.M.; Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain.*, **1969**, *92*(1), 147-156.
- [19] Wisniewski, K.E.; Wisniewski, H.M.; Wen, G.Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.*, **1985**, *17*(3), 278-282.
- [20] Kim, N.D.; Yoon, J.; Kim, J.H.; Lee, J.T.; Chon, Y.S.; Hwang, M.K.; Ha, L.; Song, W.J. Putative therapeutic agents for the learning and memory deficits of people with Down syndrome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*(14), 3772-3776.
- [21] Sitz, J.H.; Baumgärtel, K.; Hämmerle, B.; Papadopoulos, C.; Hekerman, P.; Tejedor, F.J.; Becker, W.; Lutz, B. The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. *Neuroscience*, **2008**, *157*(3), 596-605.
- [22] Park, J.; Oh, Y.; Chung, K.C. Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1. *BMB Rep.*, **2009**, *42*(1), 6-15.
- [23] Hasle, H.; Clemmensen, L.H.; Mikkelsen, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet.*, **2000**, *355*(9199), 165-169.
- [24] Satgé, D.; Sascio, A.J.; Carlsen, N.L.; Stiller, C.A.; Rubie, H.; Hero, B.; de Bernardi, B.; de Kraker, J.; Coze, C.; Kogner, P.; Langmark, F.; Hakvoort-Cammel, F.G.; Beck, D.; von der Weid, N.; Parkes, S.; Hartmann, O.; Lippens, R.J.; Kamps, W.A.; Sommelet, D. A lack of neuroblastoma in Down syndrome: a study from 11 European countries. *Cancer Res.*, **1998**, *58*(3), 448-452.
- [25] Patja, K.; Pukkala, E.; Sund, R.; Iivanainen, M.; Kaski, M. Cancer incidence of persons with Down syndrome in Finland: a population-based study. *Int. J. Cancer*, **2006**, *118*(7), 1769-1772.
- [26] Yang, Q.; Rasmussen, S.A.; Friedman, J.M. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet.*, **2002**, *359*(9311), 1019-1025.
- [27] Baek, K.H.; Zaslavsky, A.; Lynch, R.C.; Britt, C.; Okada, Y.; Siarey, R.J.; Lensch, M.W.; Park, I.H.; Yoon, S.S.; Minami, T.; Korenberg, J.R.; Folkman, J.; Daley, G.Q.; Aird, W.C.; Galdzicki, Z.; Ryeom, S. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature*, **2009**, *459*(7250), 1126-1130.
- [28] Arron, J.R.; Winslow, M.M.; Polleri, A.; Chang, C.P.; Wu, H.; Gao, X.; Neilson, J.R.; Chen, L.; Heit, J.J.; Kim, S.K.; Yamasaki, N.; Miyakawa, T.; Francke, U.; Graef, I.A.; Crabtree, G.R. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*, **2006**, *441*(7093), 595-600.
- [29] Gwack, Y.; Sharma, S.; Nardone, J.; Tanasa, B.; Iuga, A.; Srikanth, S.; Okamura, H.; Bolton, D.; Feske, S.; Hogan, P.G.; Rao, A. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*, **2006**, *441*(7093), 646-650.
- [30] Fulcher, T.; Griffin, M.; Crowley, S.; Firth, R.; Acheson, R.; O'Meara, N. Diabetic retinopathy in Down's syndrome. *Br. J. Ophthalmol.*, **1998**, *82*(4), 407-409.
- [31] Patterson, D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum. Genet.*, **2009**, *126*(1), 195-214.
- [32] Cockerill, G.W.; Bert, A.G.; Ryan, G.R.; Gamble, J.R.; Vadas, M.A.; Cockerill, P.N. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. *Blood*, **1995**, *86*(7), 2689-2698.
- [33] Jauliac, S.; López-Rodríguez, C.; Shaw, L.M.; Brown, L.F.; Rao, A.; Toker, A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat. Cell Biol.*, **2002**, *4*(7), 540-544.
- [34] Fougère, M.; Gaudineau, B.; Barbier, J.; Guaddachi, F.; Feugeas, J.P.; Auboeuf, D.; Jauliac, S. NFAT3 transcription factor inhibits breast cancer cell motility by targeting the Lipocalin 2 gene. *Oncogene*, **2010**, *29*(15), 2292-2301.
- [35] Mahindroo, N.; Panchibewa, C.; Fujii, N. Hedgehog-Gli signaling pathway inhibitors as anticancer agents. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*(13), 3829-3845.
- [36] Peukert, S.; Miller-Moslin, K. Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. *Chem. Med. Chem.*, **2010**, *5*(4), 500-512.
- [37] Masuda, M.; Wakasaki, T.; Suzui, M.; Toh, S.; Joe, A.K.; Weinstein, I.B. Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers? *Curr. Cancer Drug Targets*, **2010**, *10*(1), 117-126.
- [38] Liu, Y.; Li, C.; Lin, J. STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2010**, *10*(7), 512-519.
- [39] Guschin, D.; Rogers, N.; Briscoe, J.; Witthuhn, B.; Watling, D.; Horn, F.; Pellegrini, S.; Yasukawa, K.; Heinrich, P.; Stark, G.R.; Ihle, J.N.; Ke, L.M. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.*, **1995**, *14*(7), 1421-1429.
- [40] Jiang, L.; Wu, J.; Chen, Q.; Hu, X.; Li, W.; Hu, G. Notch1 expression is upregulated in glioma and is associated with tumor progression. *J. Clin. Neurosci.*, **2011**, *18*(3), 387-390.
- [41] Purow, B.W.; Haque, R.M.; Noel, M.W.; Su, Q.; Burdick, M.J.; Lee, J.; Sundaresan, T.; Pastorino, S.; Park, J.K.; Mikolaenko, I.; Maric, D.; Eberhart, C.G.; Fine, H.A. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.*, **2005**, *65*(6), 2353-2363.
- [42] Limbourg, F.P.; Takeshita, K.; Radtke, F.; Bronson, R.T.; Chin, M.T.; Liao, J.K. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*, **2005**, *111*(14), 1826-1832.
- [43] Seifert, A.; Allan, L.A.; Clarke, P.R. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potentially inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.*, **2008**, *275*(24), 6268-6280.
- [44] Seifert, A.; Clarke, P.R. p38alpha- and DYRK1A-dependent phosphorylation of caspase-9 at an inhibitory site in response to hyperosmotic stress. *Cell Signal.*, **2009**, *21*(11), 1626-1633.
- [45] Simpson, C.D.; Anyiwe, K.; Schimmer, A.D. Anoinis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.*, **2008**, *272*(2), 177-185.
- [46] Lamoral-Theys, D.; Pottier, L.; Kerff, F.; Dufresne, F.; Proutière, F.; Wauthoz, N.; Neven, P.; Ingrassia, L.; Van Antwerpen, P.; Lefranc, F.; Gelbeck, M.; Piroette, B.; Kraus, J.L.; Nève, J.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Dubois, J. Simple di- and trivanillates exhibit cytostatic properties toward cancer cells resistant to proapoptotic stimuli. *Bioorg Med. Chem.*, **2010**, *18*(11), 3823-3833.
- [47] Allen, T.D.; Zhu, C.Q.; Jones, K.D.; Yanagawa, N.; Tsao, M.S.; Bishop, J.M. Interaction between MYC and MCL1 in the Genesis and Outcome of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Res.*, **2011**, *71*(6), 2212-2221.
- [48] Soengas, M.S.; Lowe, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, **2003**, *22*(20), 3138-3151.
- [49] Mathieu, V.; Pirker, C.; Martin de Lassalle, E.; Vernier, M.; Mijatovic, T.; De Neve, N.; Gausin, J.F.; Dehoux, M.; Lefranc, F.; Berger, W.; Kiss, R. The sodium pump alpha1-subunit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *J. Cell. Mol. Med.*, **2009**, *13*(9B), 3960-3972.
- [50] Bruyère, C.; Lonz, C.; Duray, A.; Cludts, S.; Ruyschaert, J.M.; Saussez, S.; Yeaton, P.; Kiss, R.; Mijatovic, T. Considering temozolomide as a novel potential treatment for esophageal cancer. *Cancer*, **2011**, *117*(9), 2004-2016.
- [51] Ristorelli, E.; Lombardo, D. Targeting Notch signaling in pancreatic cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2010**, *14*(5), 541-552.
- [52] Lefranc, F.; Brotchi, J.; Kiss, R. Possible future in the treatment of glioblastoma: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*(10), 2411-2422.
- [53] Roos, A.K.; Soundararajan, M.; Elkins, J.M.; Fedorov, O.; Eswaran, J.; Phillips, C.; Pike, A.C.W.; Ugochukwu, E.; Muniz, J.R.C.; Burgess-Brown, N.; Von Delft, F.; Arrowsmith, C.H.; Wikstrom, M.; Edwards, A.; Bountra, C.; Knapp, S. Human dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A in a complex with a consensus substrate peptide. **2009**, Protein Data Bank entry 2WO6.

- [54] Ogarwa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; Hosoya, T.; Ito, N.; Hagiwara, M. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.*, **2010**, *7*, 1-9.
- [55] Adayev, T.; Wegiel, J.; Hwang, Y.W. Harmine is an ATP-competitive inhibitor for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A). *Arch. Biochem. Biophys.*, **2011**, *507*(2), 212-218.
- [56] Himpel, S.; Panzer, P.; Eirnbter, K.; Czajkowska, H.; Sayed, M.; Packman, L.C.; Blundell, T.; Kentrup, H.; Grötzinger, J.; Joost, H.G.; Becker, W. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.*, **2001**, *359*(Pt 3), 497-505.
- [57] Koo, K.A.; Kim, N.D.; Chon, Y.S.; Jung, M.S.; Lee, B.J.; Kim, J.H.; Song, W.J. QSAR analysis of pyrazolidine-3,5-diones derivatives as Dyrk1A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*(8), 2324-2328.
- [58] Cozza, G.; Mazzorana, M.; Papinutto, E.; Bain, J.; Elliott, M.; di Maira, G.; Gianoncelli, A.; Pagano, M.A.; Sarno, S.; Ruzzene, M.; Battistutta, R.; Meggio, F.; Moro, S.; Zagotto, G.; Pinna, L.A. Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem. J.*, **2009**, *421*(3), 387-395.
- [59] Sarno, S.; De Moliner, E.; Ruzzene, M.; Pagano, M. A.; Battistutta, R.; Bain, J.; Fabbro, D.; Schoepfer, J.; Elliott, M.; Furet, P.; Meggio, F.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl] acetic acid (IQA). *Biochem. J.*, **2003**, *374*(Pt 3), 639-646.
- [60] Echalié, A.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Clément, M.; Valette, A.; Liger, F.; Marquet, B.; Morris, J.C.; Endicott, J.A.; Joseph, B.; Meijer, L. Meriolins (3-(pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): synthesis, kinase inhibitory activity, cellular effects, and structure of a CDK2/cyclin A/meriolin complex. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*(4), 737-751.
- [61] Adayev, T.; Chen-Hwang, M.C.; Murakami, N.; Wegiel, J.; Hwang, Y.W. Kinetic properties of a MNB/DYRK1A mutant suitable for the elucidation of biochemical pathways. *Biochemistry*, **2006**, *45*(39), 12011-12019.
- [62] Murray, J.T.; Campbell, D.G.; Morrice, N.; Auld, G.C.; Shpiro, N.; Marquez, R.; Pegg, M.; Bain, J.; Bloomberg, G.B.; Grahmmer, F.; Lang, F.; Wulff, P.; Kuhl, D.; Cohen, P. Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem. J.*, **2004**, *384*(Pt 3), 477-488.
- [63] Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C.J.; McLauchlan, H.; Kievernec, I.; Arthur, J.S.C.; Alessi, D.R.; Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.*, **2007**, *408*(403), 297-315.
- [64] Carreaux, F.; Bazureau, J.P.; Renault, S.; Meijer, L.; Lozach, O. Preparation of imidazolone derivatives, derivatives of marine alkaloid Leucettamine B as dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A inhibitors. W.O. Patent 2009050352, April 23, 2009.
- [65] Falà, F.; Blalock, W.L.; Tazzari, P.L.; Cappellini, A.; Chiarini, F.; Martinelli, G.; Tafuri, A.; McCubrey, J.A.; Cocco, L.; Martelli, A.M. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor (2S)-1-(1H-indol-3-yl)-3-[5-(3-methyl-2H-indazol-5-yl)pyridin-3-yl]oxypropan-2-amine (A443654) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Pharmacol.*, **2008**, *74*(3), 884-95.
- [66] Liu, X.; Shi, Y.; Woods, K.W.; Hessler, P.; Kroeger, P.; Wilsbacher, J.; Wang, J.; Wang, J.Y.; Li, C.; Li, Q.; Rosenberg, S.H.; Giranda, V.L.; Luo, Y. Akt inhibitor a-443654 interferes with mitotic progression by regulating aurora kinase expression. *Neoplasia*, **2008**, *10*(8), 828-837.
- [67] Bain, J.; McLauchlan, H.; Elliot, M.; Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.*, **2003**, *371*(Pt1), 199-204.
- [68] Bettayeb, K.; Sallam, H.; Ferandin, Y.; Popowycz, F.; Fournet, G.; Hassan, M.; Echalié, A.; Bernard, P.; Endicott, J.; Joseph, B.; Meijer, L. N-6-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*(9), 2713-2724.
- [69] Mott, B.T.; Tanega, C.; Shen, M.; Maloney, D.J.; Shinn, P.; Leister, W.; Marugan, J.J.; Inglese, J.; Austin, C.P.; Misteli, T.; Auld, D.S.; Thomas, C.J. Evaluation of substituted 6-aryloquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (Cdk). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*(23), 6700-6705.
- [70] Pagano, M.A.; Bain, J.; Kazmierczuk, Z.; Sarno, S.; Ruzzene, M.; Di Maira, G.; Elliott, M.; Orzeszko, A.; Cozza, G.; Meggio, F.; Pinna, L.A. The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochem. J.*, **2008**, *415*(3), 353-365.
- [71] Golub, A. G.; Yakovenko, O.Y.; Bdzholo, V.G.; Sapelkin, V.M.; Zien, P.; Yarmoluk, S.M. Evaluation of 3-Carboxy-4(1H)-quinolones as inhibitors of human protein kinase CK2. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*(22), 6443-6450.
- [72] Wang, Z.; Bhattacharya, N.; Meyer, M.K.; Seimiya, H.; Tsuruo, T.; Tonani, J.A.; Magnuson, N.S. Pim-1 negatively regulates the activity of PTP-U2S phosphatase and influences terminal differentiation and apoptosis of monoblastoid leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *390*(1), 9-18.
- [73] Sliman, F.; Blairvacq, M.; Durieu, E.; Meijer, L.; Rodrigo, J.; Desmaële, D. Identification and structure-activity relationship of 8-hydroxy-quinoline-7-carboxylic acid derivatives as inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(9), 2801-2805.
- [74] Akue-Gedu, R.; Debiton, E.; Ferandin, Y.; Meijer, L.; Prudhomme, M.; Anizon, F.; Moreau, P. Synthesis and biological activities of aminopyrimidyl-indoles structurally related to meridianins. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*(13), 4420-4424.
- [75] Bamford, M.J.; Bailey, N.; Davies, S.; Dean, D.K.; Francis, L.; Panchal, T.A.; Parr, C.A.; Sehmi, S.; Steadman, J.G.; Takle, A.K.; Townsend, J.T.; Wilson, D.M. (1H-imidazo[4,5-c]pyridin-2-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-ylamine derivatives: further optimisation as highly potent and selective MSK-1-inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*(14), 3407-3411.
- [76] Meijer, L.; Galons, H.; Joseph, B.; Popowycz, L.; Oumata, N. Preparation of pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine derivatives as inhibitors of cyclin-dependent kinases, casein kinase 1 and DYRK1A kinase for treating diseases including B-cell chronic lymphoid leukemia. W.O. Patent 2010103486, September 16 2010.
- [77] Coulthard, C.E.; Levene, H.H.; Pyman, F.L. The chemotherapy of derivatives of harmine and harmaline. *J. Biochem. J.*, **1933**, *27*(3), 727-739.
- [78] Sanchez-Ramos, J.R. Banisterine and Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.*, **1991**, *14*(5), 391-402.
- [79] Ishida, J.; Wang, H.K.; Bastow, K.F.; Hu, C.Q.; Lee, K.H. Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and beta-carboline analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*(23), 3319-3324.
- [80] Hamsa, T.P.; Kuttan, G. Harmine inhibits tumour specific neovessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, **2010**, *649*(1-3), 64-73.
- [81] Kim, H.; Sablin, S.O.; Ramsay, R.R. Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *337*(1), 137-142.
- [82] Ma, Y.; Wink, M. The beta-carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse resistance to the anticancer drug mitoxantrone and camptothecin in breast cancer cells. *Phytother. Res.*, **2010**, *24*(1), 146-149.
- [83] Baunback, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, P.; Rucirawat, S.; Ishibashi, F.; Iwao, M.; Meijer, L. Anticancer alkaloid lamellarins inhibit protein kinases. *Mar. Drugs*, **2008**, *4*(6), 514-527.
- [84] Ballot, C.; Kluzza, J.; Lancel, S.; Martoriati, A.; Hassoun, S.M.; Mortier, L.; Vienne, J.C.; Briand, G.; Formstecher, P.; Bailly, C.; Nevière, R.; Marchetti, P.; Inhibition of mitochondrial respiration mediates apoptosis induced by the anti-tumoral alkaloid lamellarin D. *Apoptosis*, **2010**, *15*(7), 769-781.
- [85] Gallego, M.A.; Ballot, C.; Kluzza, J.; Hajji, N.; Martoriati, A.; Castéra, L.; Cuevas, C.; Formstecher, P.; Joseph, B.; Kroemer, G.; Bailly, C.; Marchetti, P. Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration of an AIF-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, **2008**, *27*(14), 1981-1992.
- [86] Sánchez, C.; Salas, A.P.; Braña, A.F.; Palomino, M.; Pineda-Lucena, A.; Carbajo, R.J.; Méndez, C.; Moris, F.; Salas, J.A. Generation of potent and selective kinase inhibitors by combinatorial biosynthesis of glycosylated indolocarbazoles. *Chem. Commun. (Camb.)*, **2009**, (27) 4118-4120.
- [87] Lamoral-Theys, D.; Pottier, L.; Dufresne, F.; Nève, J.; Dubois, J.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Ingrassia, L. Natural polyphenols that

- display anticancer properties through inhibition of kinase activity. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*(9), 812-825.
- [88] Folmer, F.; Blasius, R.; Morceau, F.; Tabudravu, J.; Dicato, M.; Jaspars, M.; Diederich, M. Inhibition of TNF α -induced activation of nuclear factor kappaB by kava (Piper methysticum) derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *71*(8), 1206-1218.
- [89] Zi, X.; Simoneau, A.R. Flavokawain A, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax protein-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res.*, **2005**, *65*(8), 3479-3486.
- [90] Guedj, F.; S bri , C.; Rivals, I.; Ledru, A.; Paly, E.; Bizot, J.C.; Smith, D.; Rubin, E.; Gillet, B.; Arbones, M.; Delabar, J.M. Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One*, **2009**, *4*(2), e4606.
- [91] Göckler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F.J.; Becker, W. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.*, **2009**, *276*(21), 6324-6337.
- [92] Rosenthal A. S.; Tanega C.; Shen M.; Mott B. T.; Bougie J. M.; Nguyen D-T.; Misteli T.; Auld D.S.; Maloney D. J.; Thomas C. J. Potent and selective small molecule inhibitors of specific isoforms of Cdc2-like kinases (Clk) and dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases (Dyrk) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*(10), 3152-3158.
- [93] Pagano, M. A.; Andrzejewska, M.; Ruzzene, M.; Samo, S.; Cesaro, L.; Bain, J.; Elliott, M.; Meggio, F.; Kazimierczuk, Z.; Pinna, L.A. Optimization of Protein Kinase CK2 Inhibitors Derived from 4,5,6,7-Tetrabromobenzimidazole. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 6239-6247.
- [94] Vadivelan, S.; Sinha, B. N.; Tajne, S.; Jagarlapudi, S.A. Fragment and knowledge-based design of selective GSK-3 β inhibitors using virtual screening models. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*(6), 2361-2371.
- [95] Muraki, M.; Ohkawara, B.; Hosoya, T.; Onogi, H.; Koizumi, J.; Koizumi, T.; Sumi, K.; Yomoda, J-L.; Murray, M.V.; Kimura, H.; Furuichi, K.; Shibuya, H.; Krainer, A.R.; Suzuki, M.; Hagiwara, M. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 24246-24254.
- [96] Meijer, L.; Bettayeb, K.; Galons, H. In Monographs on enzyme inhibitors; Yue, E.; Smith, J.P. Ed.; CRC Press, Taylor and Francis: Boca Raton, FL, **2006**; Vol. 2, pp. 187-226.
- [97] Walker, E.H.; Pacold, M.E.; Perisic, O.; Stephens, L.; Hawkins, P.T.; Wymann, M.P.; Williams, R.L. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell.*, **2000**, *6*(4), 909-19.

