

Faculté des sciences

Synthèse et évaluation pharmacologique de β -lactames bicycliques en tant qu'inhibiteurs de la FAAH

Auteur : Juhans Dechenne

Promoteur : Prof. Raphaël Robiette

Lecteurs : Prof. Benjamin Elias

Prof. Olivier Riant

Prof. Giulio Muccioli

Année académique 2019-2020

Master en sciences chimiques, à finalité spécialisée : chimie de l'industrie

Remerciements

Dans un premier temps, je voudrais remercier le Professeur Raphaël Robiette, mon promoteur de mémoire, de m'avoir permis d'effectuer celui-ci au sein de son laboratoire. Je le remercie particulièrement pour sa disponibilité et sa bienveillance mais également pour ses conseils avisés, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. De plus, je le remercie pour ses relectures et corrections du travail écrit.

Ensuite, je tiens à remercier Axel Morelle, mon encadrant, qui m'a transmis sa passion pour ce sujet. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accordé autant de temps pour me transmettre ses connaissances à la fois pratiques et théoriques en chimie organique mais également d'avoir superviser le travail en laboratoire et l'écriture du mémoire. Je le remercie pour son soutien tout au long du projet, surtout lors des impasses rencontrées.

En outre, je désire remercier tous les autres membres du laboratoire pour leur disponibilité et la bonne ambiance qui y régnait. Je remercie particulièrement Julien Caillé pour son expertise, sa patience et ses réponses à mes innombrables questions.

Enfin, je voudrais finir par remercier mes parents, Nell, Schanaëlle, Salomé, Charlie, Romain, Antoine, Thomas, Quentin, Sébastien, Jocelyn, Jean, Tanguy, Simon, Louis, Florent, Jordan, Séraphin, Eden, Youri, Ken, Nabil, Tarik et tous mes proches pour leurs encouragements tout au long de ce projet.

Juhans Dechenne

Résumé

La popularité du cannabis pour ses usages récréatifs a entraîné de nombreuses recherches à ce sujet. Cela a mené à la découverte de nombreux composés actifs dont le principal est le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). Celui-ci possède de nombreux effets médicaux intéressants. Malheureusement, des effets psychotropes indésirables sont également observés. Les différentes activités biologiques du Δ^9 -THC sont dues à son interaction avec les récepteurs cannabinoïdes. Des ligands endogènes permettent aussi l'interaction avec ces récepteurs. Ceux-ci permettent d'obtenir les effets thérapeutiques similaires au Δ^9 -THC, mais, contrairement à ce dernier, aucun effet psychotrope n'est observé.

Dans le cadre de ce projet, l'étude de l'anandamide (AEA) est effectuée. Celui-ci est régulé par une enzyme : la Fatty Acid Amid Hydrolase (FAAH). Une stratégie thérapeutique consisterait à inhiber cette enzyme afin de permettre une augmentation de la concentration d'anandamide dans le corps et d'obtenir les effets bénéfiques désirés. Différentes familles d'inhibiteurs ont été investiguées dans la littérature. Dans notre laboratoire, nous travaillons avec des inhibiteurs de type β -lactames. Le *lead* (**42**) possède un $IC_{50} = 4,2$ nM.

Ce mémoire a pour but d'optimiser l'activité inhibitrice de ce *lead* et d'étudier la relation structure/activité de différents composés. L'optimisation du *lead* s'inspire d'études de *docking* qui montrent une meilleure activité lorsque les deux carbonyles de l'imide sont en conformation *s-cis*. La synthèse d'un bicyclic a donc été envisagée pour bloquer la rotation N-C et forcer cette configuration. Les bicyclics **57** et **58** ont été synthétisés avec des rendements globaux respectifs de 19% et 24%. La synthèse de ceux-ci a également été réalisée dans le but d'effectuer une étude structure/activité de l'orientation dans l'espace de la chaîne latérale. **57** et **58** sont démunis de l'insaturation présente sur la chaîne latérale du *lead*. Le *lead* démunis de l'insaturation (**49**) a donc également été synthétisé afin d'étudier l'importance de cette dernière. Malheureusement, la pandémie de COVID-19 a empêché d'effectuer les tests pharmacologiques. Les études structure/activité n'ont donc pas pu être réalisées.

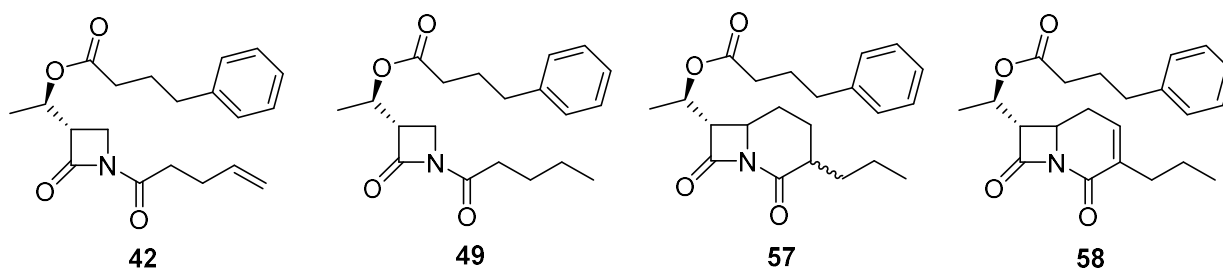


Table des abréviations

Abréviations	Significations
2-AG	2-arachidonoylglycérol
AC	Adénylyl cyclase
ACB	Canal de liaison à la chaîne acyle
AcOH	Acide acétique
AEA	Anandamide
Akt	Protéine kinase B
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
APCI	Mode d'ionisation chimique à pression atmosphérique
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
CB ₁	Récepteur cannabinoïde de type 1
CB ₂	Récepteur cannabinoïde de type 2
CBC	Cannabichromène
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigérol
CBN	Cannabinol
CCM	Chromatographie sur couche mince
DCM	Dichlorométhane
DG	Diacylglycérol
DGL	Diacylglycérol lipase
DMF	Diméthylformamide
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
EMA	European Medicine Agency
ESI	Mode d'ionisation par électronébuliseur
Et ₃ N	Triéthylamine
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
FAAH	Hydrolase des amides d'acides gras
FDA	Food and Drug Administration
His	Histidine
HMRS	Spectroscopie de masse à haute résolution

HPLC	Chromatographie sur phase liquide à haute performance
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
L.A.	Acide de Lewis
LSC	Liquid Scintillation Counting
Lys	Lysine
MAC	Canal d'accès à la membrane
MAFP	Méthyl fluorophosphate arachidonoylé
MAGL	Monoacylglycérol lipase
MAPK	Protéine kinase mitogène
MS	Spectroscopie de masse
nM	Nanomolaire
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PLA1	Phospholipase A1
PLC	Phospholipase C
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAR	Relation structure-activité
Ser	Sérine
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TMEDA	Tetraméthyléthylènediamine
TMSCl	Chlorure de triméthylsilyle
TMSOTf	Triflate de triméthylsilyle
TRPV1	Récepteur vanilloïde
UV-vis	Ultraviolet-visible
VGCC	Canal calcique voltage-dépendante
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahydrocannabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
Δ^9 -THCV	Δ^9 -tetrahydrocannabivarin

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Le système endocannabinoïde	1
1.1.1	Introduction	1
1.1.2	Récepteurs cannabinoïdes	2
1.1.3	Ligands phytocannabinoïdes	4
1.1.4	Ligands endocannabinoïdes	6
1.1.5	Activité des différents ligands endogènes et exogènes sur les récepteurs cannabinoïdes	10
1.1.6	Effets thérapeutiques résultants de l'activation des récepteurs cannabinoïdes ..	12
1.2	L'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH).....	15
1.2.1	Distribution et structure de la FAAH	15
1.2.2	Mécanisme d'action de la FAAH.....	17
1.2.3	Inhibiteurs de la FAAH.....	19
2	Résultats du laboratoire	26
2.1	Introduction	26
2.2	Etudes et compréhension des β -lactames en tant qu'inhibiteurs	27
2.2.1	Optimisation des <i>hits</i> jusqu'à l'obtention d'un <i>lead</i>	27
2.2.2	Etude du mécanisme d'action via une relation structure-activité (SAR).....	28
2.2.3	Etude de la réversibilité.....	29
2.2.4	Etude HPLC-MS	31
2.2.5	Etudes de docking	31
2.2.6	Optimisation du <i>lead</i> en s'inspirant des études de docking	33
3	Objectifs et stratégies	39
3.1	Objectifs.....	39
3.2	Stratégies	41
3.2.1	Synthèse des bicycles 57a et 57b	41

3.2.2	Synthèse du bicyclic 58	42
3.2.3	Synthèse de 49	42
3.2.4	Synthèse des bicyclics 59 et 60	43
3.2.5	Tests pharmacologiques	44
4	Résultats et discussions	45
4.1	Synthèse des bicyclics 57a et 57b	45
4.1.1	Saponification de 69	45
4.1.2	Décarboxylation de 68	46
4.1.3	Allylation de l'azétidinone commercial (41)	48
4.1.4	N-acylation de 65	49
4.1.5	Métathèse cyclisante de 64	52
4.1.6	Hydrogénation de 63	54
4.1.7	Déprotection de 62	55
4.1.8	Estérification de 61	55
4.2	Synthèse du bicyclic 58	57
4.2.1	Déprotection de 63	57
4.2.2	Estérification de 70	58
4.3	Synthèse de 49 à partir du <i>lead</i>	59
4.4	Synthèse des bicyclics 59 et 60	59
4.6	Tests pharmacologiques	65
5	Conclusions et perspectives	66
5.1	Conclusions	66
5.2	Perspectives	68
5.2.1	Tests pharmacologiques	68
5.2.2	Attribution des diastéréoisomère de 57	68
5.2.3	Synthèse des bicyclics 59 et 60	68

5.2.4	Autres perspectives	70
6	Partie expérimentale	71
6.1	Appareillages	71
6.1.1	Analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)	71
6.1.2	Analyses par spectrométrie de masse (MS)	71
6.2	Techniques	72
6.3	Synthèse des bicycles 57a et 57b	72
6.3.1	Saponification du n-propylmalonate de diéthyle (69)	72
6.3.2	Synthèse de l'acide 2-propylacrylique (68)	73
6.3.3	Allylation de 41	75
6.3.4	N-acylation de 65	76
6.3.5	Métathèse cyclisante de 64	78
6.3.6	Hydrogénation de 63	79
6.3.7	Déprotection de 62	80
6.3.8	Esterification de 61	82
6.4	Synthèse du bicyclic 58	84
6.4.1	Déprotection de 63	84
6.4.2	Estérification de 70	85
6.5	Synthèse de 49 à partir du <i>lead</i>	86
6.5.1	Hydrogénation du <i>lead</i>	86

1 Introduction

1.1 Le système endocannabinoïde

1.1.1 Introduction

L'utilisation de cannabis comme préparation médicinale, inspiration dans des rituels religieux ou encore pour ses propriétés psychotropes récréatives semble dater de plus de 4000 ans et être originaire de la Chine ancienne. La première trace écrite de l'usage du chanvre contre l'inflammation et la douleur vient du livre *The Herbal*, attribué à « l'empereur rouge », Shen Nung (2838-2698 avant J.C.), qui est considéré comme le précurseur de tous les herboristes.^[1] Des preuves récentes montrent l'usage du cannabis contre différents maux dans les pharmacopées d'ancienne Egypte, d'Inde, de Grèce, de Rome mais également en médecine médiévale islamique. Cette plante est retrouvée sous différents noms dans la littérature sanskrite et hindi : bangha, indracana ou encore jaya, dès 1400-2000 avant J.C.. Dans un premier temps, celle-ci est utilisée comme remède pour les personnes dépressives et contre les montées de fièvres.^[2] Son usage thérapeutique a été décrit plus en détail dans la médecine *ayurvédique* indienne dès 900 avant J.C. sous le nom de ganja.^[3] Les médecins grecs Claudius Galen (131-201) et Pedanius Dioscorides (40-90) ont également décrit les indications médicales du cannabis.^[4] C'est William O'Shaughnessy qui est crédité de son introduction en médecine de l'Ouest dans les années 1830. Il a suggéré son utilisation comme analgésique et comme relaxant musculaire.^[5] En 1915, le père de la médecine moderne, Sir William Osler, défendit l'usage de la marijuana contre la migraine, dans sa publication « *Les principes et la pratique de la médecine* ». ^[6] La consommation de celui-ci ne se résumait cependant pas à des utilisations médicales. Son usage comme substance psychoactive a atteint l'Europe et les Amériques à travers le monde arabe au 19^{ème} siècle.^[7] L'utilisation récréative de *Cannabis Sativa* est connue de la plupart des gens, surtout depuis l'explosion de sa consommation dans la fin des années 1960. Le cannabis a été considéré comme stupéfiant dans 73 pays à la suite de la conférence des Nations Unies pour l'adoption d'une Convention unique sur les stupéfiants qui s'est tenue en 1961. Lors d'une autre conférence des Nations Unies prenant lieu en 1971, 24 pays, dont la Belgique, s'ajoutent à la liste des pays considérant le cannabis comme drogue. Aujourd'hui, cette convention compte 183 pays signataires.^[8] La marijuana est toujours l'une des drogues illicites les plus répandues dans le monde à l'heure actuelle.^[9] C'est cette popularité qui a lancé

les recherches sur la compréhension du mécanisme de l'activité psychotrope. Cela a mené à la découverte des substances actives contenues dans le cannabis dont la principale est le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, **Figure 1**).^[10]

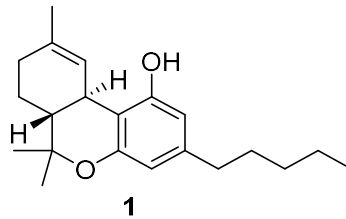


Figure 1 : Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC).

Les effets psychotropes du Δ^9 -THC tels que l'euphorie, l'altération de la perception visuelle et auditive, la perte de la notion de temps, les hallucinations ou encore les troubles de la dépersonnalisation lui confèrent une mauvaise réputation.^[11] En revanche, les applications thérapeutiques de celui-ci telles que les propriétés antalgiques, anti-inflammatoires, stimulantes d'appétit ou encore régulatrices de sommeil vont changer cette vision négative (voir section 1.1.6).^[12] Les effets secondaires vont tout de même dissuader l'usage médicinal du cannabis sauf dans certains cas extrêmes, où aucune alternative n'est possible (voir section 1.1.6). Cela a donc inspiré les laboratoires académiques ainsi que les industries pharmaceutiques à comprendre le mécanisme d'action des composés présents dans le cannabis, à chercher des alternatives, et notamment à synthétiser des analogues du Δ^9 -THC. Cela a permis, en 1988, à Howlett *et al.* de décrire la présence de sites de grande affinité pour les agents cannabinoïdes dans les membranes du cerveau et de montrer que ces sites sont couplés à l'inhibition de l'activité de l'adenylyl cyclase.^[13] Ces découvertes ont permis l'identification de récepteurs couplés aux protéines Gⁱ nommés récepteurs cannabinoïdes.^[14] Le système d'interactions de ligands avec ces récepteurs est appelé système endocannabinoïde.

1.1.2 Récepteurs cannabinoïdes

La découverte, en 1990, d'un récepteur couplé à une protéine G qui est activé par Δ^9 -THC, a établi l'identité du premier récepteur cannabinoïde, que nous appelons maintenant CB₁. Cette première trouvaille a été réalisée dans un cerveau de rat. Plus tard, un récepteur homologue a été rapporté chez l'humain et chez la souris. Ces trois récepteurs CB₁ ont 97–99% de leur séquence d'acides aminés identiques. Trois ans plus tard, en 1993, un deuxième récepteur

ⁱ Les protéines G sont des protéines membranaires qui participent aux voies de transduction des signaux, en recevant ceux-ci d'un récepteur membranaire et en les transmettant à un effecteur.

couplé aux protéines G a été identifié et nommé CB₂.^[15] Les types de récepteurs cannabinoïdes sont désignés par l'abréviation CB et numérotés dans l'ordre de leur découverte par un indice (CB₁, CB₂). La distinction entre les deux récepteurs, CB₁ et CB₂, repose sur les différences dans leur séquence d'acides aminés, leurs mécanismes de signalisation et leur distribution tissulaire. Le récepteur CB₂ humain ne partage que 44% de la séquence d'acides aminés du CB₁ humain. Il s'est également avéré possible de développer de puissants agonistesⁱⁱ et antagonistesⁱⁱⁱ avec une sélectivité marquée pour CB₁ ou CB₂ (voir section 1.1.5).^[16]

- Récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB₁)

Les CB₁ sont localisés principalement dans le système nerveux central (SNC) : dans le cerveau, la moelle épinière et les tissus neuronaux. Ils se trouvent également dans les tissus immunitaires et dans le système nerveux périphérique (SNP) mais en quantité plus faible.

La voie de signalisation principale modulée par l'activation de CB₁ est décrite à la **Figure 2**. Typiquement, le CB₁ est couplé à une protéine G. Son activation provoque l'inhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase (AC) et donc la transformation d'ATP en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Le rôle des AMPc est, notamment, d'activer la protéine kinase A (PKA). L'activité de la PKA est par conséquent inhibée et cela entraîne un dérèglement des métabolismes du glycogène, du sucre et des lipides. Plusieurs protéines kinases, comme les protéines kinases mitogènes (MAPK), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la protéine kinase B (Akt), sont quant à elle activées par les CB₁. Ces dernières interviennent dans la signalisation soit de la mort cellulaire, soit dans la survie cellulaire.^[17] Les CB₁ sont aussi capable de supprimer l'afflux de calcium via l'interaction avec le canal calcique voltage-dépendante (VGCC). Or, cet afflux de calcium est impliqué dans la transmission du signal nerveux et donc dans la douleur provoquée. Une suppression de cet afflux permet donc d'avoir un effet analgésique.^[18]

ⁱⁱ Un composé est dit agoniste s'il interagit avec un récepteur membranaire et qu'il active celui-ci.

ⁱⁱⁱ Un composé est dit antagoniste si son interaction avec un récepteur membranaire provoque un blocage de celui-ci ou une diminution de l'effet physiologique d'un autre composé.

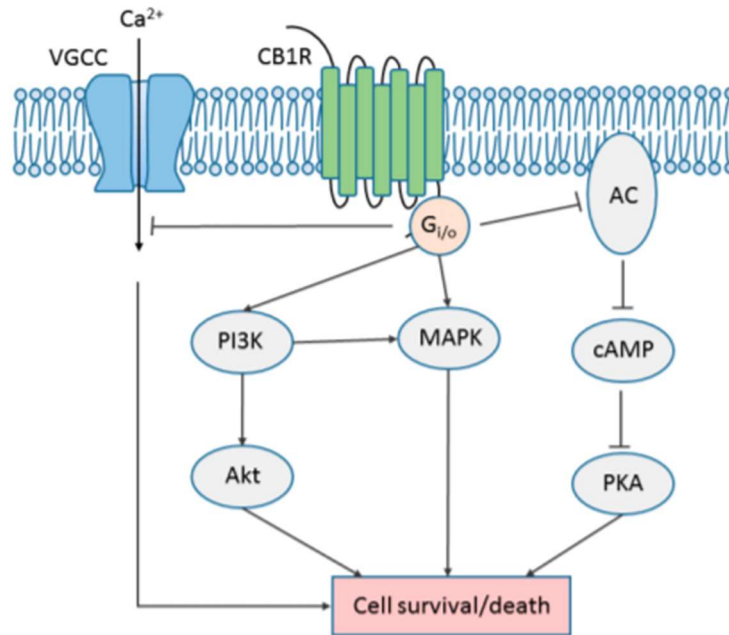


Figure 2 : Transduction des signaux entraînée par l'activation d'un récepteur CB₁. Repris de ^[17].

- Récepteurs cannabinoïdes de type 2

Les CB₂, quant à eux, se situent majoritairement dans les macrophages des tissus et organes impliqués dans l'immunité ainsi que dans le SNP. Ils se retrouvent aussi dans le cerveau et le SNC mais en plus faible quantité.

La transduction de signaux via l'activation des CB₂ a été moins étudiée mais est similaire à celle de l'activation des CB₁. Celle-ci implique également l'inhibition de l'AC, l'activation de différentes MAPK, avec comme conséquence la survie ou la mort cellulaire en fonction de la protéine kinase activée, et une augmentation transitoire des niveaux de calcium libres intracellulaires via la modulation d'une phospholipase C (PLC), avec comme conséquence un effet analgésique.^[19]

Les différents ligands, qu'ils soient endogènes ou exogènes, capables d'interagir avec ces deux récepteurs cannabinoïdes, sont détaillés dans les sections suivantes. Les effets thérapeutiques, qui découlent de cette interaction, seront également explicités.

1.1.3 Ligands phytocannabinoïdes

La plante *Cannabis Sativa* produit 421 composés dont 80 composés terpénophénoliques appelés phytocannabinoïdes qui n'ont été détectés dans aucune autre plante.^[20]

Comme mentionné précédemment, le composé principal qui confère l'activité est le Δ^9 -THC. Un autre composé est présent en abondance : le cannabidiol (**2**, CBD, **Figure 3**).^[21] D'autres substances intéressantes ont été également isolées, notamment le cannabichromène (**3**, CBC), le cannabigérol (**4**, CBG),^[10, 22] le Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (**5**, Δ^9 -THCV),^[23] le cannabinoïde (**6**, CBN) ou encore le Δ^8 -tetrahydrocannabinol (**7**, Δ^8 -THC, isomère du Δ^9 -THC).^[24] Ces différents composés sont nommés cannabinoïdes en référence à la plante dans laquelle ils ont été identifiés pour la première fois.

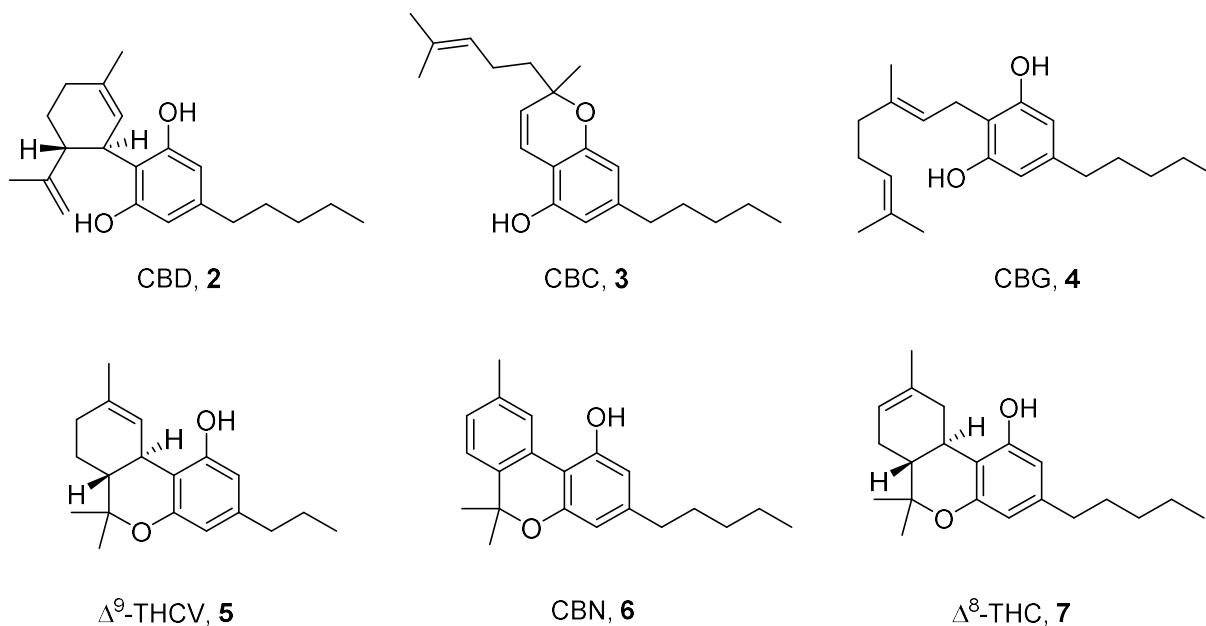


Figure 3 : Structure des cannabinoïdes suivants : le cannabidiol (**2**), le cannabichromène (**3**), le cannabigérol (**4**), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (**5**), le cannabinoïde (**6**), et le Δ^8 -tetrahydrocannabinol (**7**).

Ces phytocannabinoïdes possèdent des propriétés antalgiques, anti-inflammatoires, stimulantes d'appétit ou encore régulatrices de sommeil qui en font composés thérapeutiques intéressants (voir section 1.1.6). Cependant, certains d'entre eux causent des effets psychotropes tels qu'un changement d'humeur (euphorie), une altération des perceptions auditives et visuelles, des hallucinations, des troubles de dépersonnalisation ainsi que des pertes de la notion du temps qui diminuent leur attractivité médicale.^[11] Le composé psychoactif principal est Δ^9 -THC mais deux autres cannabinoïdes sont également connus pour proférer des effets psychotropes. Le premier est Δ^8 -THC qui possède une structure très proche de celle du Δ^9 -THC. Le deuxième est CBN, produit de l'oxydation du Δ^9 -THC, qui possède 10 % de l'activité psychoactive du Δ^9 -THC.^[20]

En revanche, CBD, Δ^9 -THCV, CBG et CBC ont l'avantage de posséder peu, ou pas du tout, d'activité psychoactive. Cela rend leur capacité thérapeutique plus prometteuse.^[25] Ils agissent notamment en tant qu'agonistes ou antagonistes des récepteurs cannabinoïdes CB₁ et CB₂. Ces cannabinoïdes non-psychotropes sont actuellement sujets de recherches plus approfondies en chimie médicinale.^[20, 26] Parmi ceux-ci, CBD est le plus prometteur. Des études ont en effet démontré que ce dernier exerce plusieurs effets pharmacologiques positifs qui en font un composé thérapeutique attractif dans le traitement de l'inflammation, du diabète, du cancer et des maladies neurodégénératives.^[27] Plus récemment, il a été montré que le Δ^9 -THCV exprime le profil pharmacologique d'un antagoniste CB₁ avec une utilisation potentielle dans le traitement de l'obésité.^[28]

Ces propriétés psychotropes conférées par certains cannabinoïdes représentent un frein dans l'usage thérapeutique de ceux-ci. Cela va donc entraîner la recherche de ligands endogènes qui ne possèdent aucune activité psychoactive. Ceux-ci sont décrits dans la section suivante.

1.1.4 Ligands endocannabinoïdes

La découverte des récepteurs cannabinoïdes a lancé la quête de leurs ligands endogènes. L'arachidonoyléthanolamide (anandamide, AEA, **8**) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG, **9**) sont les ligands endogènes les plus connus mais surtout les plus actifs (voir section 1.1.5) (**Figure 4**). Ceux-ci partagent beaucoup des propriétés pharmacologiques avec le Δ^9 -THC mais pas toutes.

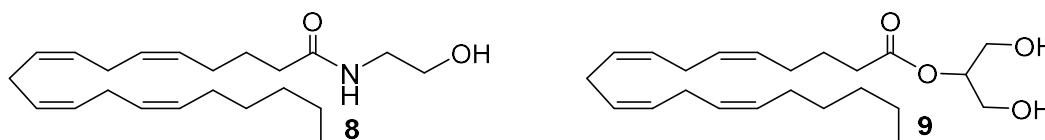


Figure 4 : Structures de l'anandamide (8) et de l'arachidonoylglycérol (9).

AEA et 2-AG sont tous deux des agonistes des récepteurs CB₁ et CB₂. Leur présence endogène a été prouvée dans le cerveau, le foie, la rate, les poumons, les reins et le plasma.^[29] L'anandamide produit également des effets sur d'autres systèmes biologiques, dont les récepteurs vanilloïdes (TRPV1)^{iv} qui ont été amplement étudié.^[12] Leur activation par l'anandamide a notamment des implications potentielles dans le traitement des troubles inflammatoires, respiratoires et cardio-vasculaires.^[30]

^{iv} Les récepteurs vanilloïdes sont des récepteurs à canaux ioniques non-sélectifs associés à la pathologie de diverses maladies.

Au cours des dernières années, d'autres ligands possédant un motif acide gras ont été isolés et identifiés comme membres de la famille des endocannabinoïdes : l'homo- γ -linolenylethanolamide (**10**), la docosatetraenylethanolamide (**13**), l'oléamide (**12**), l'arachidonoyl dopamine (**11**), la O-arachidonylethanolamine (virodhamine) (**14**), et le 2-arachidonylglyceryl ether (noladin ether, **15**) (**Figure 5**).^[12]

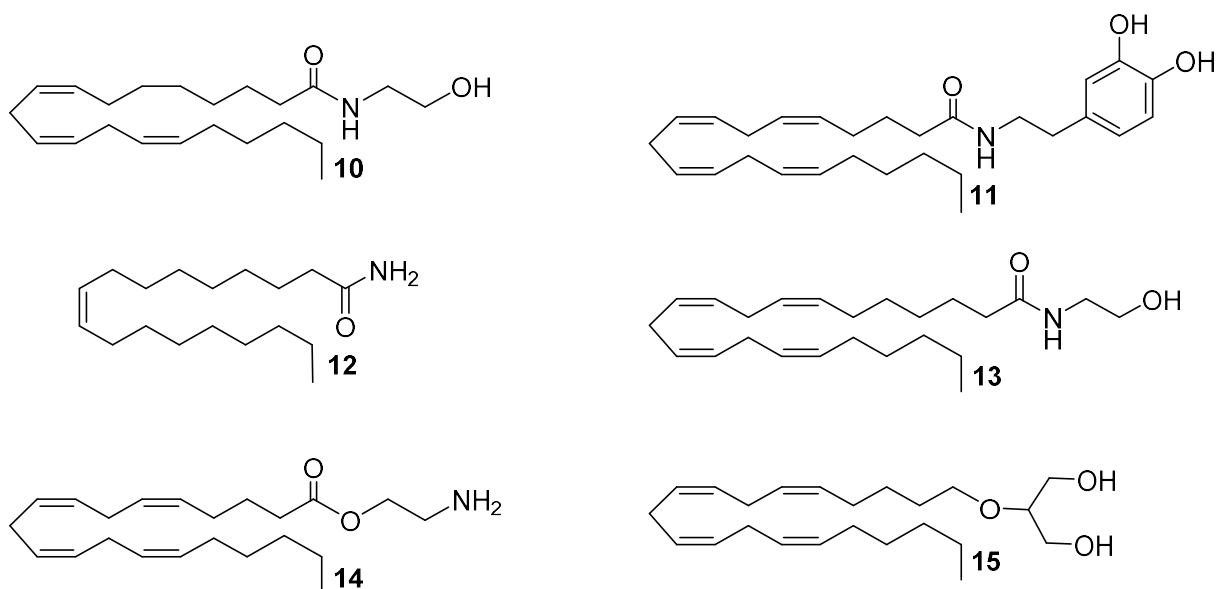


Figure 5 : Structure de différents ligands endogènes des récepteurs cannabinoïdes.

Vu leur activité et leur potentiel thérapeutique prometteurs, AEA et 2-AG sont discutés plus en détails dans les sections suivantes.

- Biosynthèse et régulation de l'anandamide

Deux voies synthétiques ont été proposées pour la biosynthèse de l'anandamide. La première consiste en la N-acylation directe de l'éthanolamine. La formation d'AEA par cette voie de condensation est la réaction inverse de dégradation de l'AEA, catalysée par la Fatty Acid Amid Hydrolase (FAAH).^[12] Ces observations suggèrent que la formation d'anandamide par cette voie n'est pas physiologiquement pertinente, mais il reste la possibilité qu'une quantité d'anandamide peut être formée par celle-ci si des concentrations élevées d'acide arachidonique et d'éthanolamine sont colocalisées à certains sites de la cellule.^[31]

La deuxième voie, celle la plus fréquemment citée, consiste en l'hydrolyse du *N*-arachidonoyl phosphatidylethanolamine (PE) catalysée par une phosphodiesterase (**Schéma 1**). Le *N*-arachidonoyl PE est quant à lui obtenu via le transfert d'un groupe arachidonate provenant d'un phospholipide vers la phosphatidylethanolamine, catalysé par une *N*-acyl transférase.^[32]

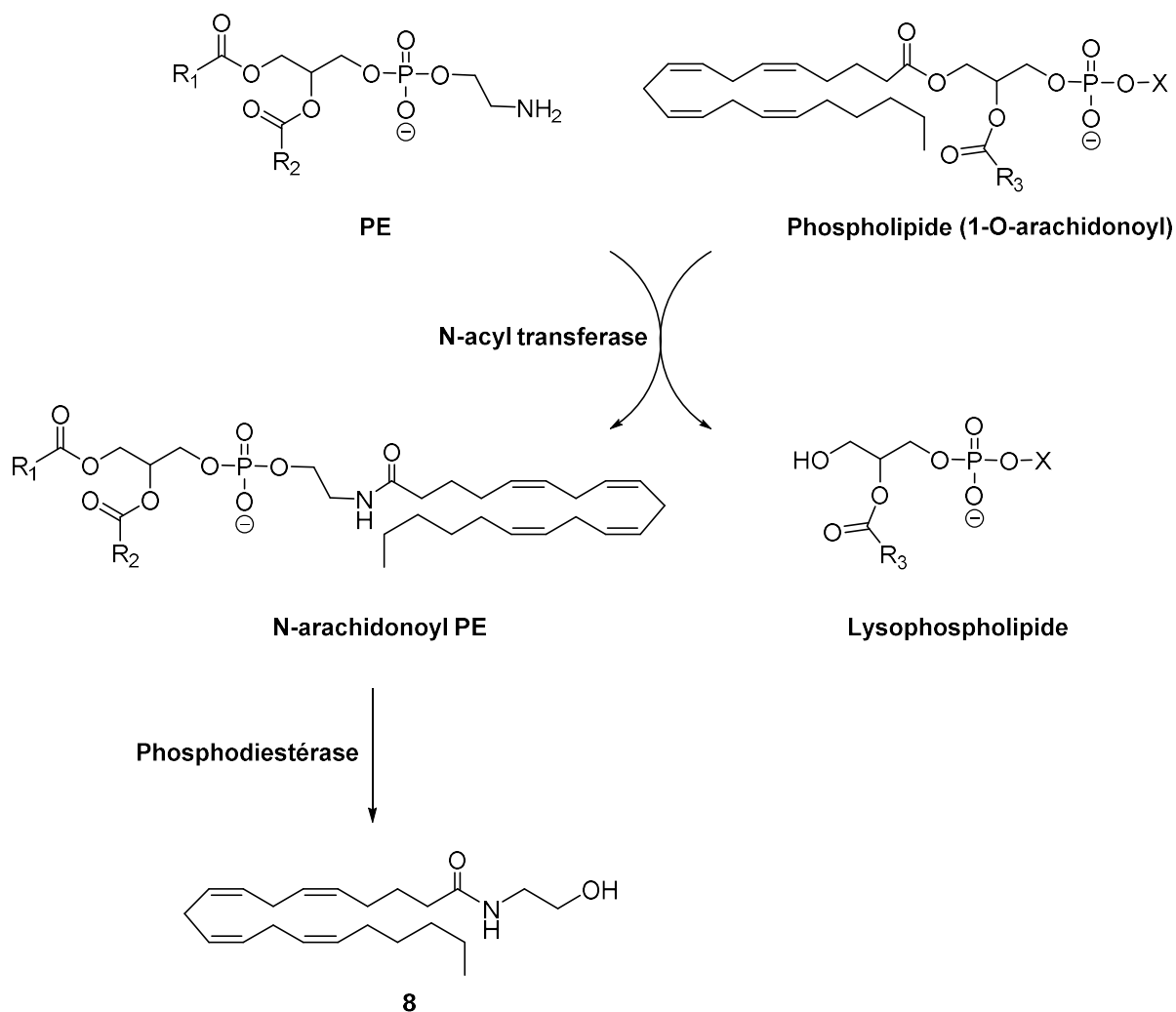


Schéma 1 : Voie principale de biosynthèse de l'anandamide.

L'anandamide s'est révélée être hydrolysée par une variété de tissus et de cellules. Les produits de dégradation sont l'acide arachidonique et l'éthanolamine.^[33] L'enzyme qui catalyse cette réaction est la FAAH (voir section 1.2 pour plus de détails concernant cette enzyme). En effet, des études neurochimiques, sur des souris où les gènes FAAH ont été inactivés, ont montré que les concentrations endogènes d'anandamide ont été multipliées par 10 à 15 dans plusieurs régions du cerveau y compris le cervelet, l'hippocampe et le cortex cérébral.^[34]

- Biosynthèse et régulation du 2-AG

Des études biochimiques ont révélé plusieurs voies de biosynthèse de 2-AG (**Schéma 2**). La voie principale est la combinaison de deux réactions successivement catalysées par la phospholipase C (PLC) et la diacylglycérol lipase (DGL). Dans un premier temps, la PLC permet l'hydrolyse des phospholipides membranaires, comme par exemple, le

phosphatidylinositol contenant de l'acide arachidonique et produit du diacylglycérol (DG) contenant de l'acide arachidonique. Ensuite, le 2-AG est produit à partir du diacylglycérol par l'action de la DGL.^[32]

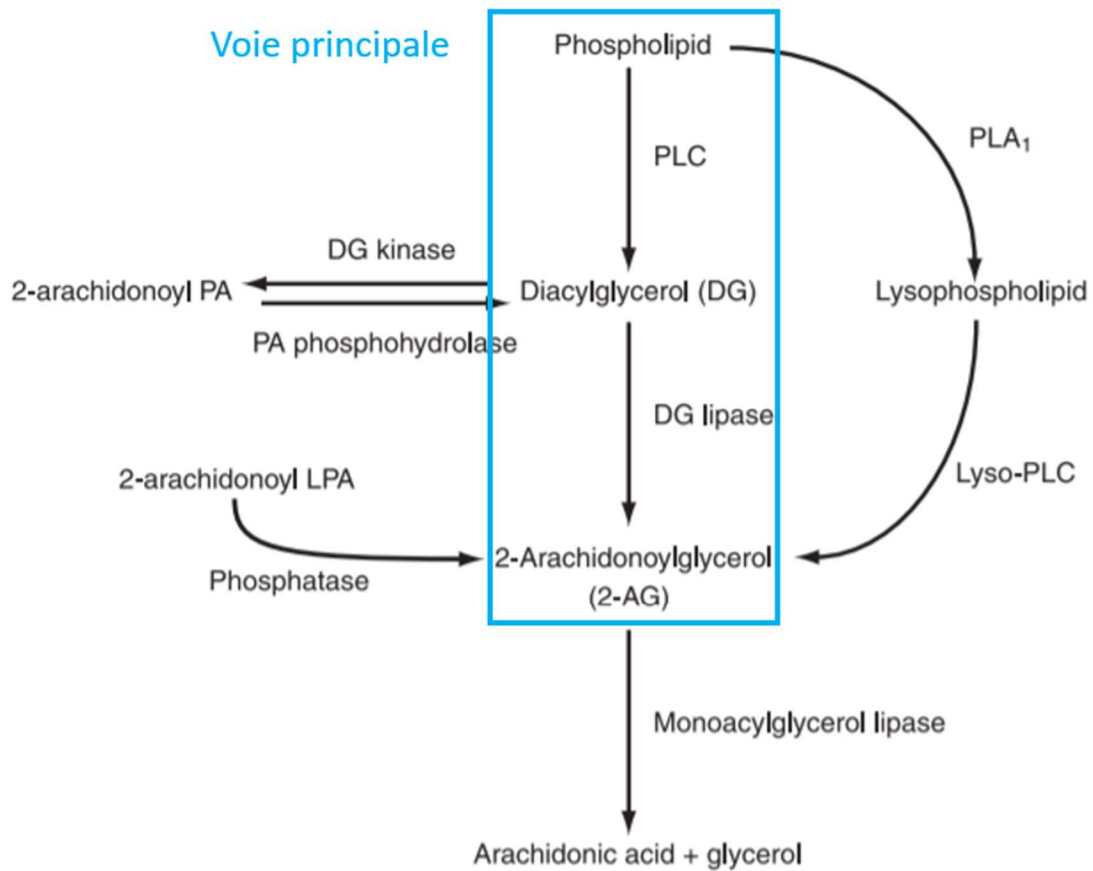


Schéma 2 : Différentes voies de biosynthèse du 2-AG. La voie principale est encadrée en bleu. Repris de [32].

Trois autres voies de biosynthèses ont également été proposées pour la formation de 2-AG (Schéma 2).^[32] La première consiste en deux réactions successives catalysées respectivement par la phospholipase A1 (PLA₁) et une PLC permettant la formation de 2-AG à partir de phospholipide membranaire. La deuxième fait intervenir la conversion de l'acide 2-arachidonoyl lysophosphatidique en 2-AG catalysée par une phosphatase. La troisième consiste en la transformation de l'acide 2-arachidonoyl phosphatidique en DG suivie de la production de 2-AG catalysée par la DGL. La voie de biosynthèse peut être différente en fonction du tissu ou de la cellule. Elle peut également dépendre des conditions de stimulation.^[35]

Le 2-AG est rapidement métabolisé par divers types de cellules pour produire de l'acide arachidonique et du glycérol. La monoacylglycérol lipase (MAGL) est reconnue comme étant l'enzyme principale catalysant la dégradation de 2-AG. MAGL est présente dans plusieurs

organes, y compris le cerveau. La FAAH catalyse également l'hydrolyse des liaisons ester de 2-AG *in vitro*. Cependant, cette activité estérase est beaucoup moins importante *in vivo*.^[35]

Le **Figure 6** représente de manière schématique la régulation et le transport de l'anandamide et du 2-AG présentés ci-dessus.

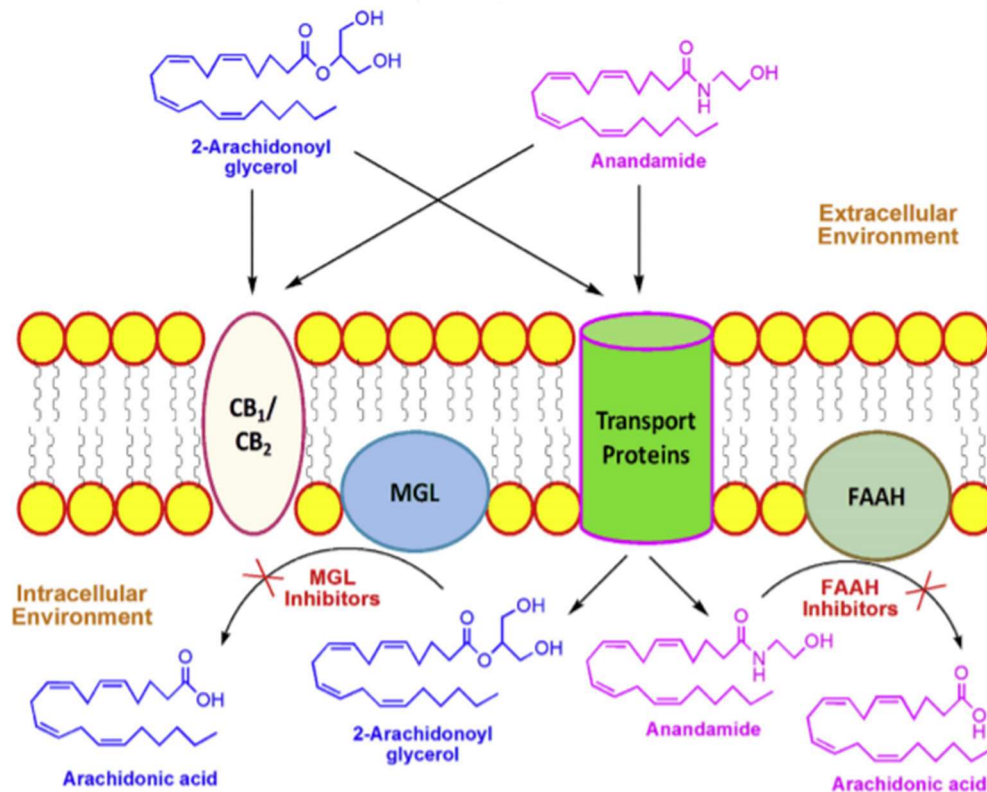


Figure 6 : Régulation et transport des deux endocannabinoïdes les plus importants : 2-AG et l'anandamide. Repris de [34].

1.1.5 Activité des différents ligands endogènes et exogènes sur les récepteurs cannabinoïdes

Le **Tableau 1** récapitule les activités des différents ligands, exogènes ou endogènes présentés précédemment (voir sections 1.1.3 et 1.1.4). Les ligands peuvent agir sur les récepteurs cannabinoïdes comme agonistes ou comme antagoniste (voir section 1.1.2). Un agoniste est représenté par une mesure d'EC₅₀ qui correspond à la concentration efficace médiane c-à-d la concentration à laquelle 50% de l'activité d'un composé, sur une fonction biologique ou biochimique spécifique, est observée. D'autre part, un antagoniste est décrit par une mesure d'IC₅₀, la concentration inhibitrice médiane qui représente la concentration nécessaire pour inhiber 50% d'une fonction biologique ou biochimique.

Tableau 1 : Activités de différents ligands, exogènes ou endogènes, sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2.

	Ligands	Mécanisme	Activité
Phytocannabinoïdes	Δ^9 -THC	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 5,05 nM ^[26]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 3,13 nM ^[26]
	Δ^8 -THC	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 44,0 nM ^[26]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 44,0 nM ^[26]
	Δ^9 -THCV	Antagoniste CB1	IC ₅₀ = 75,4 nM ^[26]
		Pas d'activité sur CB2	/
	CBD	Antagoniste CB1	IC ₅₀ = 79,0 nM ^[20]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 138,0 nM ^[20]
	CBN	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 120,2 nM ^[26]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 100,0 nM ^[26]
	CBG	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 440,0 nM ^[26]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 337,0 nM ^[26]
Ligands endogènes	AEA	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 61 nM ^[15]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 279 nM ^[15]
	2-AG	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 58,3 nM ^[15]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 145 nM ^[15]
	Virodhamine	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 912 nM ^[15]
		Pas d'activité sur CB2	/
	N-Arachidonoyl dopamine	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 250 nM ^[15]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = 12000 nM ^[15]
	Oléoamide	Antagoniste CB1	IC ₅₀ = 2630 nM ^[36]
		Pas d'activité sur CB2	/
	Noladin éther	Agoniste CB1	EC ₅₀ = 21,2 nM ^[15]
		Agoniste CB2	EC ₅₀ = > 3000 nM ^[15]

Différentes valeurs d'EC₅₀ sont retranscrites dans la littérature, principalement pour l'anandamide et 2-AG. Cependant, les mêmes observations peuvent à chaque fois être effectuées.

Tout d'abord, les ligands phytocannabinoïdes ont une affinité assez similaire pour CB₁ et CB₂ alors que les ligands endogènes ont une affinité bien supérieure pour CB₁ par rapport à CB₂. Les ligands exogènes ont en général une affinité supérieure sur les deux récepteurs par rapport aux ligands endogènes, à l'exception du CBG dont l'activité est relativement faible.

Ensuite, il peut être constaté que Δ⁹-THC est le ligand possédant la meilleure affinité pour CB₁ et CB₂ comparé aux autres ligands, ce qui explique notamment pourquoi il est le composé le plus actif dans le cannabis. Δ⁸-THC possède également une très bonne activité, ce qui est dû à sa structure proche de celle du Δ⁹-THC. Le CBD agit comme antagoniste du récepteur CB₁. Ce qui signifie qu'il bloque celui-ci et empêche son activation par d'autres ligands. En ce qui concerne les ligands endogènes, le noladin éther est le ligand endogène possédant la meilleure activité envers CB₁ suivi de près par AEA et 2-AG. Son activité en tant que stimulant d'appétit a été prouvée sur des rats par Jones *et al.*^[37] Cependant, contrairement à 2-AG et AEA, celui-ci possède une très faible activité sur CB₂.

Enfin, les autres endocannabinoïdes possèdent une activité très faible voire inexistante sur ces récepteurs et sont par conséquent moins intéressants pharmacologiquement.

1.1.6 Effets thérapeutiques résultants de l'activation des récepteurs cannabinoïdes

L'activation des récepteurs cannabinoïdes par des ligands phytocannabinoïdes ou endocannabinoïdes permet de lutter contre les pathologies mentionnées ci-dessous. Les effets des endocannabinoïdes 2-AG et AEA sont très prometteurs. Le seul problème est que la concentration de ceux-ci est régulée par des enzymes (voir section 1.1.4).

- Troubles de l'appétit

La première indication d'un rôle des endocannabinoïdes dans le contrôle de l'appétit a été la découverte de la capacité de l'anandamide, par l'administration de faibles doses, sur des animaux démunis de FAAH, d'augmenter l'apport alimentaire.^[35] Cet effet est attribué à la stimulation des récepteurs CB₁. Un effet similaire peut être provoqué par l'administration de 2-AG sur des animaux démunis de MAGL. Des études avec des antagonistes fournissent un soutien plus direct de cette propriété thérapeutique. En effet, lors du traitement d'un rat avec un

antagoniste des récepteurs CB₁, le résultat fut une diminution de l'apport alimentaire. Des preuves définitives de l'implication des endocannabinoïdes dans le contrôle de l'apport alimentaire ont été fournies grâce à l'utilisation de souris avec des récepteurs CB₁ déficients. En effet, le knockout des gènes CB₁ provoque une diminution de l'appétit des souris mutées par rapport aux souris sauvages, ce qui confirme que l'interaction entre les endocannabinoïdes et CB₁ a un impact sur la régulation de l'appétit. Les mécanismes impliqués sont cependant complexes et pas encore totalement élucidés.^[7, 35] Le Δ^9 -THC et plusieurs dérivés synthétiques (dont le nabilone) ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et par l'European Medicine Agency (EMA) pour stimuler l'appétit chez les patients atteints du SIDA.^[38]

- Douleur et inflammation

L'une des premières utilisations du cannabis a été le traitement de la douleur. Lors de douleurs aiguës, le Δ^9 -THC, le cannabidiol, les cannabinoïdes synthétiques et l'anandamide lorsqu'elle n'est pas dégradée par la FAAH, sont efficaces contre les stimuli chimiques, mécaniques et thermiques de la douleur.^[35] Les cannabinoïdes permettent de lutter contre la nociception^v, via des mécanismes complexes. Ces effets sont compatibles avec la localisation anatomique des récepteurs CB₁ dans les domaines liés à la douleur dans le cerveau, la corne dorsale vertébrale, les ganglions de la racine dorsale et le neurone afférent périphérique. En plus du rôle des récepteurs CB₁, il existe des preuves récentes de l'implication des récepteurs CB₂ dans l'activité anti-hyperalgésique des cannabinoïdes dans les modèles de douleurs neuropathiques^{vi} chroniques, principalement inflammatoires.^[7, 35]

- Troubles du système nerveux central

Le rôle émergent du système endocannabinoïde dans une variété de troubles du SNC ne devrait pas surprendre étant donné le très haut niveau d'expression des récepteurs CB₁ dans le cerveau. Des effets bénéfiques, contre les pathologies du SNC suivantes, ont été étudiés et démontrés : la neurotoxicité et les neurotraumatismes^[35] ; les accidents vasculaires cérébraux ; la sclérose en plaques et les lésions de la moelle épinière ; la maladie de Parkinson ; la maladie d'Alzheimer ; les troubles oculaires, les troubles mentaux (anxiété et dépression)^[35] ; l'épilepsie ; les insomnies ou encore l'addiction aux drogues.^[7]

^v La nociception regroupe l'ensemble des phénomènes d'intégration de stimuli douloureux par le SNC.

^{vi} Les douleurs neuropathiques sont des douleurs causées par des lésions de nerfs du système nerveux périphérique.

- Troubles cardiovasculaires et respiratoires

Outre leurs actions neurocomportementales et immunologiques bien connues, les cannabinoïdes et leurs équivalents endogènes exercent des effets importants sur les fonctions cardiovasculaires.^[35] Les mécanismes sous-jacents sont complexes, impliquant des effets directs sur le système cardiovasculaire. Les études menées jusqu'à présent indiquent que les récepteurs CB₁ sont beaucoup plus importants que les récepteurs CB₂ dans la régulation cardiovasculaire. Les CB₁ sont présents dans le myocarde où ils régulent l'inotropisme^{vii}. Ils sont également présents dans les tissus vasculaires, où leur activation entraîne une vasodilatation. Lors d'une expérience sur des rongeurs anesthésiés, ces deux effets semblent avoir été impliqués dans l'effet hypotenseur de l'anandamide sur ces rongeurs.^[7]

- Troubles oculaires

Le glaucome^{viii}, première cause de cécité irréversible aux États-Unis, se caractérise par une augmentation de la pression intraoculaire et de lésions consécutives du nerf optique. Il a été découvert fortuitement, une diminution de la pression intraoculaire d'un petit nombre de fumeurs de marijuana en bonne santé.^[35] Celle-ci a été confirmée par la suite dans une étude, avec un contrôle placebo, de bénévoles qui fumaient de la marijuana naturelle ou à qui du Δ^9 -THC synthétique avait été injecté.^[35] Le résultat fut une diminution de leur pression oculaire. L'administration de ligands cannabinoïdes synthétiques a révélé une réduction de la pression intraoculaire chez l'Homme. L'administration d'endocannabinoïdes chez des animaux dépourvus de FAAH a également montré le même effet. C'est à nouveau CB₁ qui est impliqué dans le mécanisme complexe d'action permettant cette réduction de la pression intraoculaire. Le rôle de CB₂ est mineur.^[7]

- Cancer

Les bénéfices des cannabinoïdes chez les patients cancéreux sont bien connus. Ils peuvent provoquer des effets palliatifs tels que : la stimulation de l'appétit, l'inhibition de nausées et de vomissements associés à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, le soulagement de la douleur, des sauts d'humeur et un meilleur sommeil.^[35] Le Δ^9 -THC et plusieurs dérivés synthétiques (dont le nabilone) ont été approuvés par la FDA et par l'EMA pour contrôler les nausées et les douleurs neuropathiques chez les patients cancéreux subissant une chimiothérapie.^[38] De nombreuses études récentes ont suggéré que divers cannabinoïdes, y compris le CBD,

^{vii} L'inotropisme représente la capacité des cellules musculaires du myocarde à se contracter.

^{viii} Le glaucome est une maladie dégénérative du nerf optique qui entraîne une perte progressive de la vision.

l'anandamide et 2-AG, pourraient inhiber directement la prolifération et la migration des cellules cancéreuses.^[35] Les mécanismes proposés sont complexes et impliquent à la fois CB₁ et CB₂.^[7]

Etant donné que les ligands cannabinoïdes possèdent une activité psychoactive (voir section 1.1.3) et que les ligands endogènes sont régulés par des enzymes (voir section 1.1.4), une approche thérapeutique intéressante consiste en l'élaboration d'inhibiteurs de ces enzymes afin de permettre aux ligands endogènes d'être présents en plus grande concentration, d'entraîner leur interaction avec les récepteurs cannabinoïdes et donc de profiter les effets thérapeutiques correspondants. Vu que AEA et 2-AG sont les ligands endogènes les plus actifs, deux enzymes sont principalement ciblées : la MAGL et la FAAH. Ce projet porte sur le développement d'inhibiteurs de la FAAH. Cette dernière est donc décrite dans les sections suivantes.

1.2 L'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH)

1.2.1 Distribution et structure de la FAAH

La FAAH est l'enzyme responsable, notamment, de la dégradation d'anandamide en acide arachidonique et en éthanolamine. Celle-ci a été signalée pour la première fois dans les cellules cancéreuses et nommée « anandamide amidase », puis plus tard « anandamide amidohydrolase » dans le cerveau, et enfin renommée FAAH, une fois purifiée et clonée depuis le foie de rat.^[35] Chez le rat, la FAAH se retrouve dans de nombreux organes. Il a été démontré que son activité principale se trouvait dans le foie, suivi par le cerveau et les testicules. Son activité dans le cœur est, quant à elle, très faible voire quasiment nulle. En revanche, la distribution est fort différente chez l'humain où elle est localisée principalement dans le pancréas, le cerveau, les reins et les muscles squelettiques. Une faible fraction est également présente dans le foie et le placenta. Aucune trace n'est cependant détectée dans le cœur et les poumons.^[39]

La FAAH est capable de reconnaître une variété d'amides d'acides gras mais son substrat principal est l'anandamide. Cravatt *et al.* ont mesuré les vitesses relatives d'hydrolyse d'une série d'amides d'acides gras clonés à partir de membranes plasmiques de foie de rat (**Figure 7**).^[40] Les résultats indiquent que la FAAH n'est pas sélective à l'anandamide ; elle permet également l'hydrolyse de l'oléamide, de l'amide myristique, de l'amide palmitique et de l'amide stéarique. Cependant, la vitesse d'hydrolyse de l'anandamide est la plus élevée.

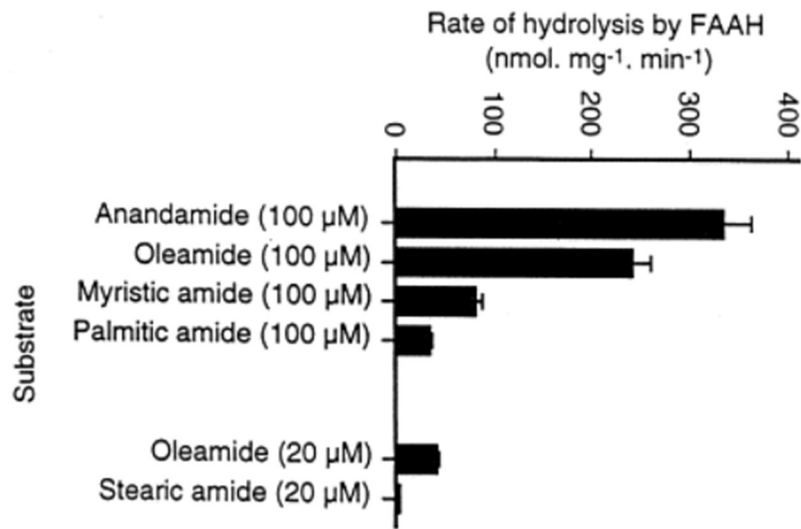


Figure 7 : Vitesses relatives d'hydrolyse relatives de différents amides d'acides gras par la FAAH. Repris de [41].

La structure cristalline de la FAAH du rat a été établie et caractérisée pour la première fois en 2002 par Bracey *et al.*, par des études cristallographiques aux rayons X en employant un complexe de la FAAH avec un inhibiteur irréversible : la méthyl fluorophosphate arachidonyle (MAFP ; voir section 1.2.3), à une résolution de 2,8 Å, par études cristallographiques aux rayons X. Cette étude a notamment permis d'observer que la FAAH prenait la forme d'un dimère (**Figure 8**).^[34]

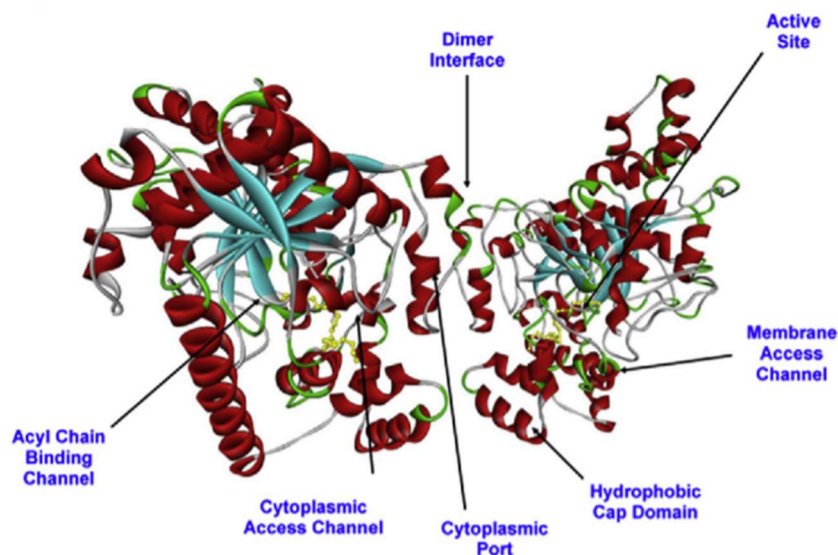


Figure 8 : Structure cristalline du complexe entre la FAAH du rat et la MAFP (bâtonnets jaunes). Repris de [34].

La FAAH est composée de canaux et de cavités cruciaux pour sa fonction biologique. Ceux-ci comprennent : le canal d'accès à la membrane (MAC), le canal d'accès cytosolique et le canal de liaison à la chaîne acyle (ACB) (voir **Figure 8**).^[42] Le MAC connecte le site actif à une ouverture située à la face d'ancrage de la membrane de l'enzyme et permet l'accès des signaux lipidiques présents dans la membrane au site catalytique de la FAAH. Le canal d'accès cytosolique, quant à lui, permet la sortie de produits hydrophiles du site actif. Le canal ACB est composé de presque tous les résidus hydrophobes et se lie à la queue hydrophobe des amides d'acides gras, aidant ainsi à positionner la molécule de sorte que les liaisons amides et esters soient correctement exposées vers le site actif. De plus, le canal ACB participe à la reconnaissance du substrat.^[42]

1.2.2 Mécanisme d'action de la FAAH

Des études ont révélé que le site actif de la FAAH était composé d'une triade catalytique sérine-sérine-lysine (Ser217-Ser241-Lys142).^[42] Celle-ci est inhabituelle, car en général, le site actif utilisé par les hydrolases à sérine comporte une triade catalytique Ser-His-Asp. La **Figure 9** représente les différentes interactions entre l'inhibiteur MAFP (voir section 1.2.3) et la FAAH qui permettent la stabilisation de ce complexe enzyme/ligand.

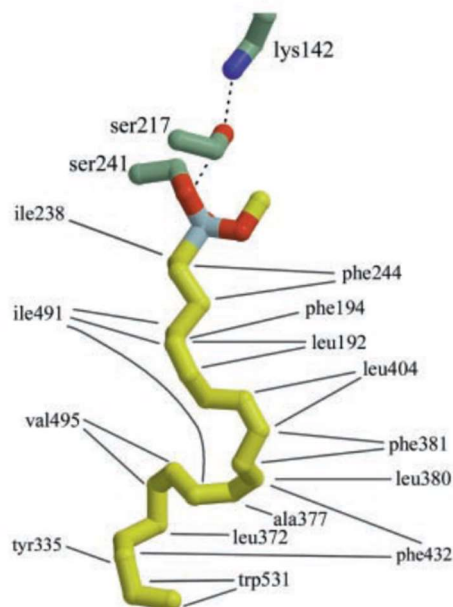


Figure 9 : Interactions entre l'inhibiteur MAFP et le site actif ainsi que les résidus aromatiques et aliphatiques de la FAAH. Les chaîne arachidonoylé de MAFP est représentée en jaune, les atomes d'oxygène en orange, les atomes d'azote en bleu, ceux de phosphore en gris et les trois a.a. de la triade catalytique en vert. Repris de ^[42].

Les résidus aromatiques (phenylalanines) et aliphatiques (leucines, isoleucines, valines, tyrosines et alanines) de la FAAH entourent et interagissent avec la chaîne arachidonoyale de MAFP. La triade catalytique Ser-Ser-Lys de la FAAH est également présentée ainsi que la liaison covalente de la Ser241 sur le phosphore de MAFP.^[42]

Des études computationnelles et expérimentales ont permis de décrire le mécanisme de catalyse de la FAAH dans l'hydrolyse d'acides d'amides gras.^[34] Celui-ci est décrit par le cycle catalytique présenté au **Schéma 3**.

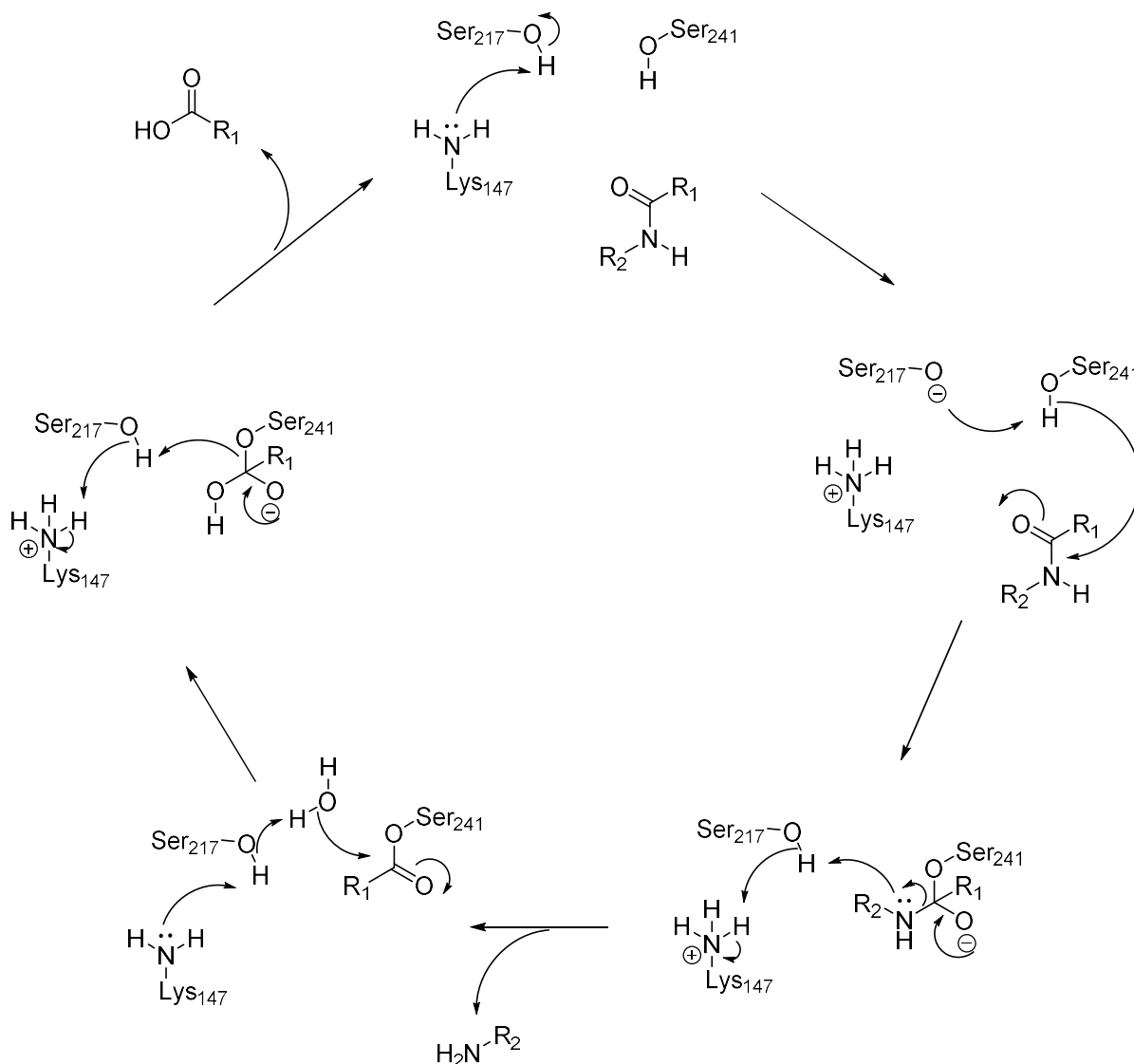


Schéma 3 : Cycle catalytique de la dégradation d'amides d'acides gras par la FAAH.

Tout d'abord, la paire libre de l'azote de la Lys142 permet de déprotoner la Ser217, ce qui entraîne la déprotonation de la Ser241 afin d'enclencher l'attaque nucléophile de cette dernière sur la fonction amide du ligand amide à hydrolyser. Un intermédiaire tétraédrique est

ainsi formé. La fonction carbonyle (C=O) est ensuite reformée grâce au départ de l'amine facilité par sa protonation par la Ser217. La Ser217 va ensuite récupérer ce proton sur l'ion ammonium de la Lys142. La partie acide gras du ligand se trouve alors sur la Ser241 (complexe acyl-enzyme). Celui-ci va être récupéré via un mécanisme d'addition d'eau/élimination.

1.2.3 Inhibiteurs de la FAAH

Comme mentionné précédemment, la FAAH est l'enzyme principale responsable de la dégradation de l'anandamide (voir section 1.1.4). L'exploration d'inhibiteurs de celle-ci est un domaine intéressant de recherche car ceux-ci permettraient une augmentation de la concentration d'anandamide, et donc une augmentation de l'activation des récepteurs CB₁ et CB₂ qui entrainerait l'apparition d'effets thérapeutiques multiples (voir section 1.1.6). Différentes familles d'inhibiteurs ont été investiguées et de multiples brevets ont été déposés.^[43]

Deux mécanismes d'inhibition sont possibles : l'inhibition réversible et l'inhibition irréversible. L'inhibition réversible peut se faire de deux manières différentes. La première est une stabilisation du complexe FAAH/inhibiteur par des interactions non-covalentes de type ponts hydrogènes, interactions de Van der Waals, π - π stacking ou encore liaisons ioniques. Un équilibre est en place et l'enzyme peut revenir avec le temps à sa forme non-complexée. La deuxième se fait via une liaison covalente instable entre l'inhibiteur et l'enzyme. Avec le temps, la liaison Ser241-ligand est rompue et la FAAH revient à sa forme non-complexée. Dans le cas d'une inhibition irréversible, l'inhibiteur forme un complexe stable, par exemple via des liaisons covalentes stables, avec l'enzyme qu'il inactive de façon permanente.

- Premiers inhibiteurs

Comme de nombreuses protéases et hydrolases, les premiers inhibiteurs identifiés de la FAAH étaient de puissants électrophiles. Dans le cas de la FAAH, ces groupes fonctionnels réactifs forment des interactions covalentes avec le site actif Ser241. Cela résulte en une inhibition irréversible de la FAAH. Le premier à être décrit fut le PMSF, un sulfonyle, découvert par Deutsch *et al.* en 1993.^[44] Ensuite, des analogues de substrats endocannabinoïdes ont été synthétisés. Bien que la réactivité et le manque de sélectivité de ces agents en font de mauvais candidats thérapeutiques, ils ont été de précieux outils pour évaluer la biochimie de la FAAH.^[43] MAFP, dont l'activité en tant qu'inhibiteur de la FAAH a été décrite en 1997 par

Deutsch *et al.*^[45], a été notamment utile pour déterminer la structure de la FAAH (voir section 1.2.1).^[43]

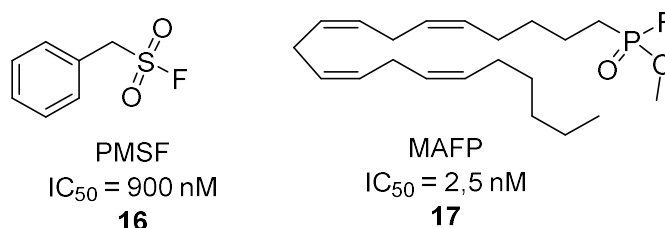


Figure 10 : Structures et activités de deux premiers inhibiteurs de la FAAH : PMSF (**16**)^[44] et MAFP (**17**)^[45].

- Les céto-hétérocycles

En 2000, Boger a signalé une percée majeure dans l'identification d'inhibiteurs de FAAH très puissants et sélectifs, possédant un céto-hétérocycle.^[46] Le mécanisme d'inhibition se base sur une attaque nucléophile de la Ser241 sur le carbonyle afin de former un intermédiaire tétraédrique réversible.^[47] Des études de relation structure-activité (SAR) ont alors débuté. L'objectif premier était de déterminer l'hétérocycle qui allait permettre la meilleure activation du carbonyle possible afin de faciliter l'attaque nucléophile de la Ser241. C'est la pyridyloxazole qui s'est avérée la meilleure. Ensuite, ils ont déterminé la chaîne latérale la plus efficace. Cela a mené à la synthèse d'un inhibiteur très puissant : OL-92 (**18**) avec un $IC_{50} = 0,2 \text{ nM}$ (Figure 11). Cependant, aucune activité ne fut détectée *in vivo*, sûrement dû à une pauvre pharmacocinétique^{ix}. Les recherches ont continué et ont mené à un des inhibiteurs les plus caractérisés jusqu'ici : OL-135 avec un $IC_{50} = 4,7 \text{ nM}$. Celui-ci s'est avéré augmenter les concentrations endocannabinoïdes endogènes dans le cerveau et la moelle épinière des souris avec en plus, des effets analgésiques significatifs chez la souris.^[43]

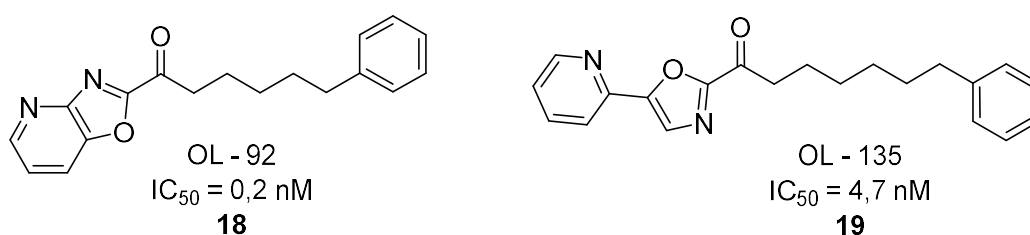


Figure 11 : Céto-hétérocycles en tant qu'inhibiteurs de la FAAH.

^{ix} La pharmacocinétique reprend tous les phénomènes qu'un médicament subit par le corps lors de son administration : la voie d'administration, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination par exemple.

Janssen a placé un brevet pour différents inhibiteurs où le groupe phenhexyl de OL-135 est remplacé par des pipéridines ou des propylpipéridines. Les deux plus puissants sont représentés à la **Figure 12**.^[43]

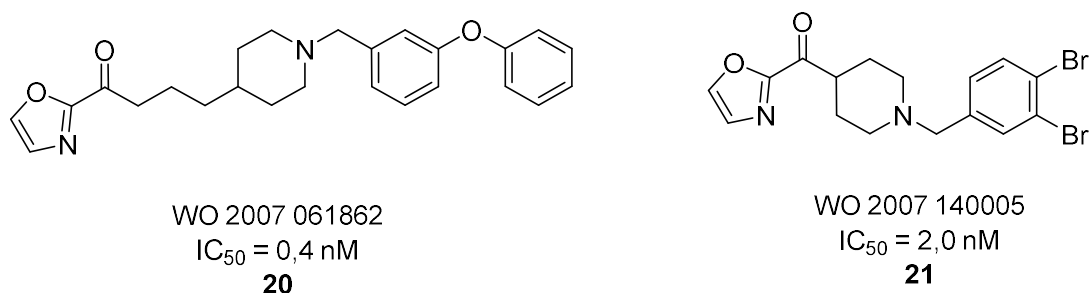


Figure 12 : Inhibiteurs placés sous brevet par Janssens Pharmaceuticals.

- Les carbamates

Une autre classe bien étudiée d'inhibiteurs de FAAH est celle des carbamates.^[43] Ces inhibiteurs sont irréversibles, ils modifient la FAAH définitivement par liaison covalente. Mor *et al.* ont été les premiers à publier ce type d'inhibiteurs. Ils ont notamment synthétisé URB-524 (**22**).^[48]

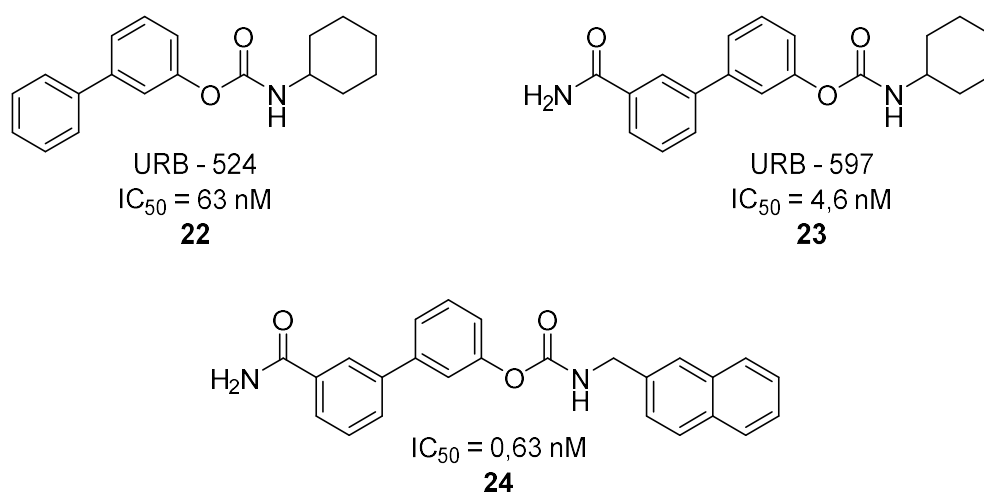


Figure 13 : Inhibiteurs de la FAAH de type carbamate.

Des études SAR ont été effectuées et ont permis de détecter que l'activité des composés était inversement corrélée à la lipophilie du groupement phénol.^[43] Ceci a permis d'obtenir le composé *lead* de cette famille : URB-597 (**23**). Ce dernier a, à ce jour, la meilleure pharmacologie de tous les inhibiteurs de la FAAH. L'administration de celui-ci à des rats et une évaluation *ex-vivo* subséquente de l'activité de la FAAH cérébrale ont montré un blocage

presque complet de l'enzyme par le composé. Le composé produit également une élévation des niveaux d'AEA endogènes dans le cerveau de ces rats. Un autre point encourageant est que le composé n'a pas produit de catalepsie^x, d'hypothermie ou d'hyperphagie^{xi}, trois des symptômes typiques des cannabinoïdes exogènes.

De nombreuses publications ont démontré les effets analgésiques de URB-597.^[49] Cependant, celui-ci n'est pas spécifique à la FAAH et inhibe d'autres hydrolases.^[49a] L'utilisation des études de modélisation en plaçant le groupe cyclohexyle de **23** dans le canal le plus hydrophobe, a permis de synthétiser de nouveaux inhibiteurs de type carbamate plus lipophiles afin d'augmenter l'activité. Le *lead* de cette série est le composé **24**.^[43] Toutefois, ces inhibiteurs, tout comme URB-597, ne sont pas spécifiques à la FAAH.

- Les urées

Le premier inhibiteur de type urée a été présenté par Lilly (**25**). Des analyses ont suggéré que ce composé était l'un des moins sélectifs, il montre une activité contre une variété d'enzymes non-ciblées.^[50]

En 2006, de nouveaux inhibiteurs de la FAAH de type urée ont été publiés.^[43] Takeda et Janssen ont été les premiers à présenter des brevets sur cette classe d'inhibiteurs. Le *lead* de Takeda (**26**) est présenté à la **Figure 14**. Le développement des inhibiteurs à base d'urée a réellement débuté lorsque Pfizer a communiqué des données sur deux inhibiteurs : PF-622 et PF-750 (**Figure 14**). Ces deux derniers montrent une sélectivité élevée pour la FAAH contrairement au premier inhibiteur découvert par Lilly.^[43] En 2008, Mileni *et al.* ont rapporté la structure cristallographique de complexe FAAH/PF-750, ce qui a permis de démontrer l'inhibition irréversible de la FAAH par PF-750.^[51] Pfizer a ensuite continué les recherches sur la synthèse et l'évaluation pharmacologiques d'inhibiteurs de type urée. Une des pistes de recherche se base sur le développement de composés plus rigides, en utilisant un motif méthylène-pipéridine, possédant un fragment polaire afin d'améliorer la pharmacocinétique.^[52] Cela a mené à la découverte de PF-04457845 (**Figure 14**) qui possède une grande sélectivité pour la FAAH, une très bonne activité ($IC_{50} = 1,5-3,9$ nM) et une bonne pharmacocinétique.^[53]

^x La catalepsie est une suspension complète du mouvement volontaire des muscles.

^{xi} L'hyperphagie est un trouble des conduites alimentaires qui se définit par une tendance à surconsommer.

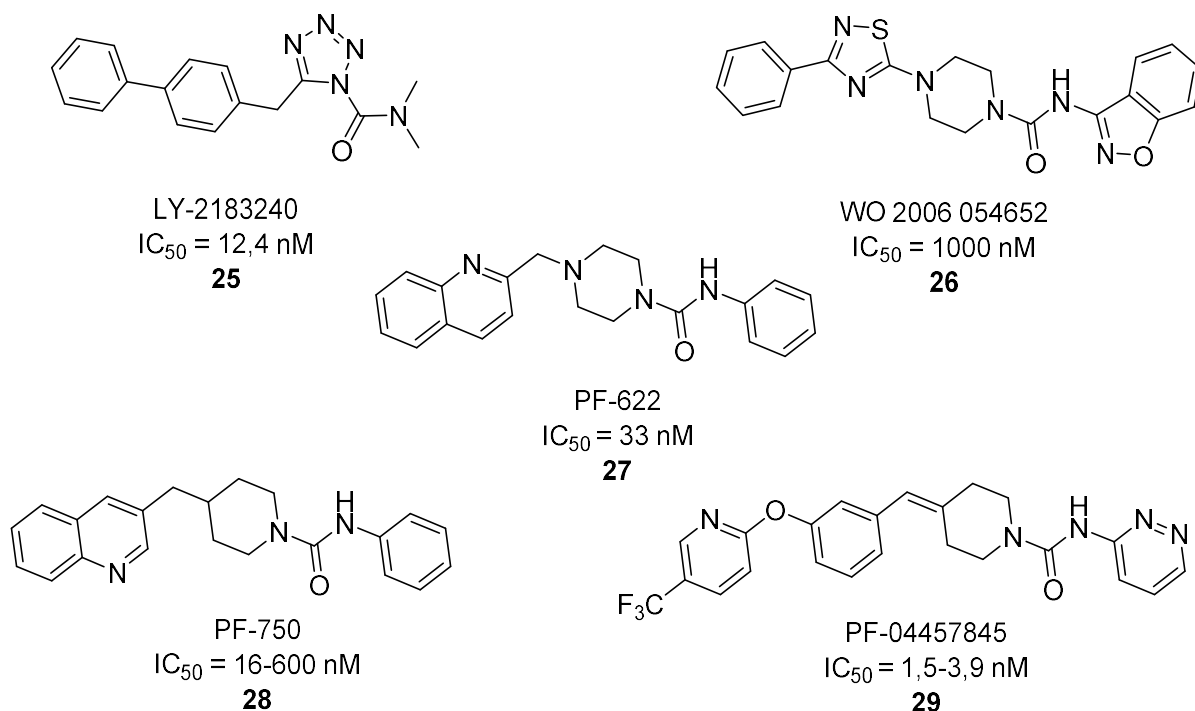


Figure 14 : Cinq exemples d'inhibiteurs de type urée : le premier présenté par Lilly (25), trois développés par Pfizer (27, 28 et 29) et un développé par Takeda (26).

- Acides boroniques

Récemment, une nouvelle classe d'inhibiteurs a été investiguée. Des inhibiteurs de la FAAH utilisant un acide boronique comme fonction électrophile ont en effet été rapportés.^[54] Cette fonction a déjà été décrite pour inhiber les protéases à sérine de manière réversible.^[43] Minkkila *et al.* ont publié en 2008, les premiers acides arylboroniques décrits comme inhibiteurs de la FAAH.^[55] Deux de ces inhibiteurs présentent des activités intéressantes ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$ pour **30** et $IC_{50} = 9,1 \text{ nM}$ pour **31**) et une inhibition réversible de l'enzyme (**Figure 15**).^[55]

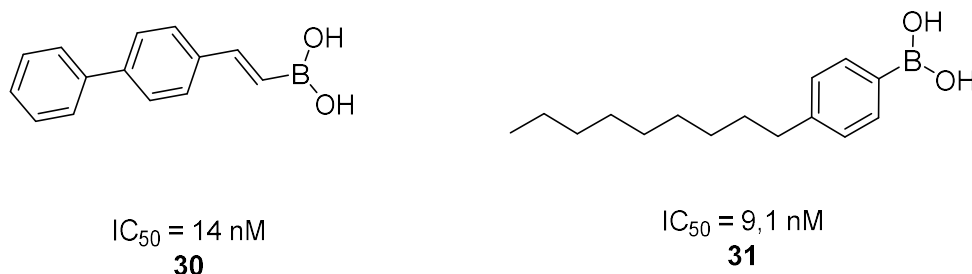


Figure 15 : Acides boroniques en tant qu'inhibiteurs de la FAAH.

- Inhibiteurs divers

D'autres inhibiteurs, qui n'appartiennent pas aux familles développées ci-dessus, sont trouvés dans la littérature et certains présentent des activités intéressantes. Merck a notamment conçu divers inhibiteurs de la FAAH à base d'hétérocycles comme l'imidazole (**32**, $IC_{50} = 0,2$ nM) ^[56] ou le pyrazole (**33**, $IC_{50} = 0,47$ nM) (**Figure 16**).^[57] Renovis a également publié plusieurs composés lipophiles et polycycliques comme modulateurs de la FAAH comme, par exemple, le composé **34** ($IC_{50} = 1,2$ nM).^[58] Janssen Pharmaceuticals a aussi développé une famille d'inhibiteurs basés sur un fragment pyrimidine avec un groupe aryle en C6 et une fonction amine en C4 (**35**, $IC_{50} = 1-3$ nM).^[59]

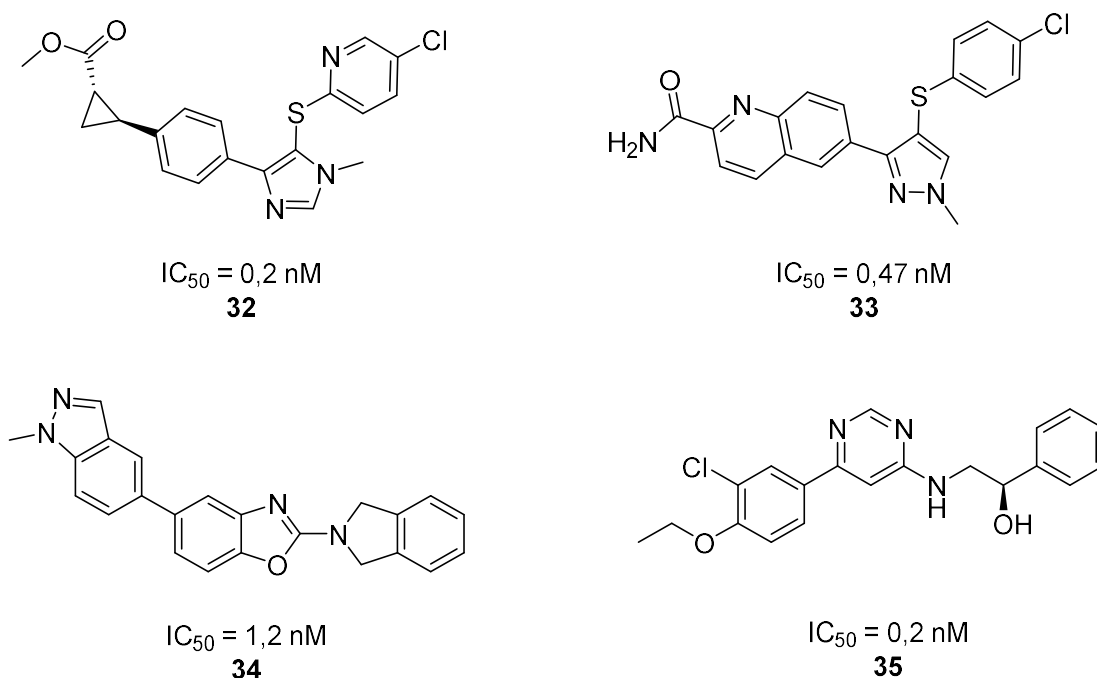


Figure 16 : Exemples d'inhibiteurs divers de la FAAH.

- Accident lors de l'essai clinique d'un inhibiteur de la FAAH

La molécule BIA 10-2474 des Laboratoires Bial, qui appartient à la famille des inhibiteurs de type urée, a été développée pour lutter contre les douleurs neuropathiques (**Figure 17**). Les tests de toxicité effectués sur les animaux (rongeurs, chiens, singes) ne semblaient pas montrer d'effets toxiques, hormis une symptomatologie pulmonaire chez le chien. Un essai de Phase 1, qui cherche à confirmer la faible toxicité sur l'homme et à évaluer la pharmacocinétique, a ensuite été effectué sur 128 volontaires sains de 18 à 55 ans. Cet essai débute avec des doses

uniques croissantes administrées à différentes personnes. Celles-ci n'ont posé aucun problème. Ensuite, débute les doses répétées croissantes. Chaque dose répétée (2,5 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg et enfin 50 mg) est testée sur 8 patients dont 2 placebo et administrée durant 10 jours consécutifs. L'augmentation de la dose administrée débute lorsqu'aucun problème n'a été détecté avec la dose précédente. Après l'administration répétée durant six jours de la dose de 50 mg, sur les 6 volontaires ayant reçu l'inhibiteur et non le placebo, les 6 ont été hospitalisés. Parmi ces 6 personnes, une est décédée et 4 autres ont subi des dommages cérébraux irréversibles. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce désastre, dont deux ressortent du lot. La première est basée sur le manque de sélectivité de cet inhibiteur. En effet, une dose trop forte aurait été injectée, ce qui favorise la fixation et l'inhibition d'autres hydrolases à sérine présentes dans le cerveau et engendre des dommages cérébraux. La deuxième repose sur l'accumulation de l'inhibiteur dû à une dose injectée trop forte. Cela aurait entraîné une toxicité *in situ* de la molécule vis-à-vis de structures cellulaires impliquées, par exemple, dans les échanges au niveau de la barrière hémato-encéphalique.^[60]

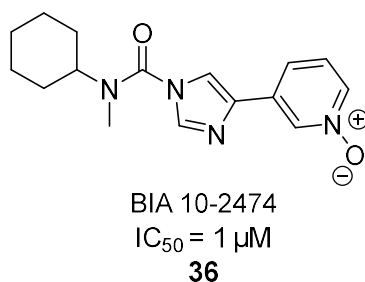


Figure 17 : Structure et activité de BIA 10-2474.

2 Résultats du laboratoire

2.1 Introduction

Le noyau β -lactame (**37**) est principalement connu pour son rôle bactéricide. D'ailleurs, en 1945, Alexander Fleming, Ernst Boris Chain et Howard Florey ont reçu le prix Nobel de physiologie-médecine pour « la découverte de la pénicilline G et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses » (**38**, **Figure 18**).^[61] En 2018, en Belgique, 55 % des antibiotiques absorbés sont des β -lactames.^[62]

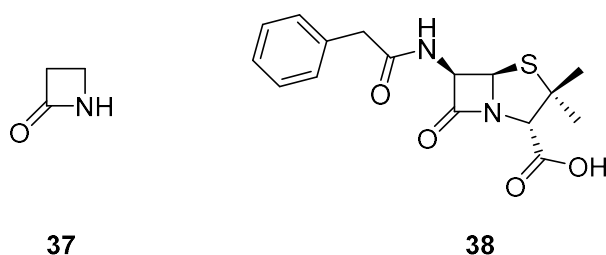


Figure 18 : Structures d'un noyau β -lactame (**36**) et de la pénicilline G (**37**).

Lorsque les β -lactames agissent en tant qu'antibiotiques, celles-ci inhibent des hydrolases à sérine selon le mécanisme présenté au **Schéma 4**. Tout d'abord, la sérine présente dans la triade catalytique Ser-His-Asp, généralement retrouvée sur les hydrolases à sérine, permet une attaque nucléophile sur le carbonyle de noyau β -lactame afin de former un intermédiaire tétraédrique. Une ouverture du cycle peut ensuite prendre place pour récupérer la fonction carbonyle et former intermédiaire acyle-enzyme très stable. Cette stabilité rend l'hydrolyse de cette liaison lente, ce qui empêche une récupération rapide de l'enzyme non-complexée. Le mécanisme d'action est donc irréversible.^[63]

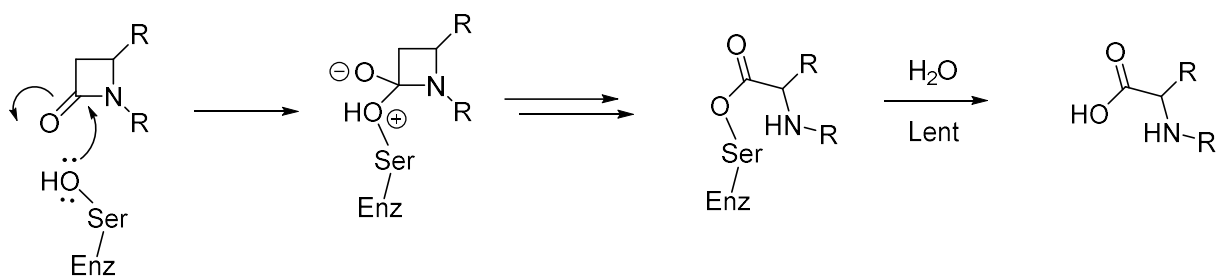


Schéma 4 : Mécanisme d'inhibition d'hydrolases à sérine par les β -lactames en tant qu'antibiotiques.

Dans notre laboratoire, nous travaillons sur les β -lactames en tant qu'inhibiteurs de la FAAH. La recherche a débuté lorsque Jacqueline Marchand, en collaboration avec Giulio

Muccioli et Didier Lambert, a constaté que certains dérivés de l'azétidinone présentaient des activités vis-à-vis de la FAAH humaine. Différents composés β -lactamiques ont ensuite été synthétisés par Allan Urbach.^[64] Trois des composés (**39**, **40**, **41**) se sont révélés être des *hits*^{xii}. Ceux-ci inhibent la FAAH avec des activités modérées (valeurs IC_{50} de 21,9 ; 4,5 et 0,098 μ M respectivement). Ce qui est intéressant, c'est qu'ils sont sélectifs à la FAAH par rapport à la MAGL (valeurs IC_{50} de 817 ; 657 et 23,3 μ M, respectivement).^[64]

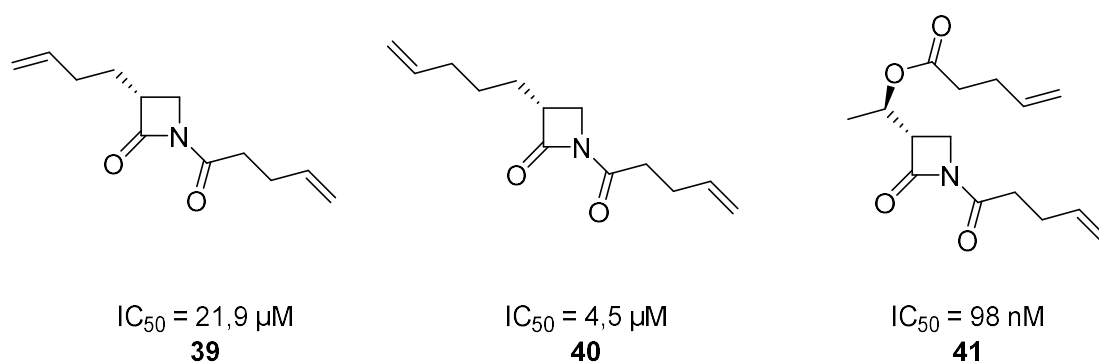


Figure 19 : Premiers β -lactames en tant qu'inhibiteurs de la FAAH.

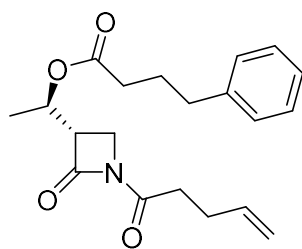
2.2 Etudes et compréhension des β -lactames en tant qu'inhibiteurs

2.2.1 Optimisation des *hits* jusqu'à l'obtention d'un *lead*

Afin d'optimiser l'activité inhibitrice de ces *hits* vis-à-vis de la FAAH, tout en conservant une bonne sélectivité pour cette dernière par rapport à MAGL, 31 nouveaux dérivés β -lactames ont été synthétisés. L'évaluation pharmacologique de tous ces composés a conduit à l'identification du composé **42** comme *lead*^{xiii}.

^{xii} Un *hit* correspond à une molécule présentant une activité contre une cible définie.

^{xiii} Un *lead* correspond au composé qui, parmi une famille de composé, présente la meilleure activité contre une cible définie.

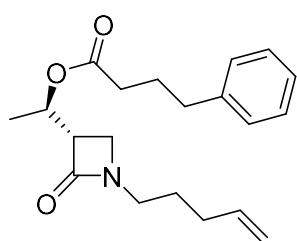


Lead
 $IC_{50} = 5,2 \text{ nM}$
42

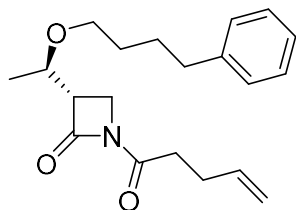
Figure 20 : Structure du lead (42).

2.2.2 Etude du mécanisme d'action via une relation structure-activité (SAR)

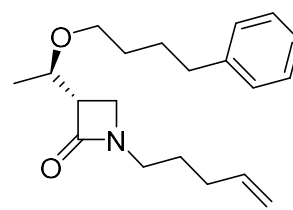
Il fut ensuite nécessaire de s'intéresser au mécanisme d'inhibition. Il a de suite été supposé qu'un des carbonyles composant le *lead* devait être important dans ce mécanisme. Pour confirmer cette hypothèse, de nouveaux analogues du *lead*, dont un ou plusieurs carbonyles ont été supprimés, ont été synthétisés et leurs IC_{50} ont été mesurés (**Figure 21**).^[65]



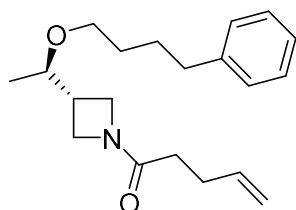
$IC_{50} = 89,8 \mu\text{M}$
43



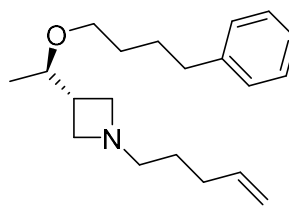
$IC_{50} = 8 \text{ nM}$
44



$IC_{50} = 88,6 \mu\text{M}$
45



$IC_{50} = 2,9 \mu\text{M}$
46



$IC_{50} = >1000 \mu\text{M}$
47

Figure 21 : Composés synthétisés dans l'étude de la relation structure-activité.

Les résultats obtenus ont permis d'observer qu'aucune molécule ne possède une activité supérieure à celle du *lead*. Une autre constatation peut être faite : dès qu'un des carbonyles présents sur la fonction imide est retiré, l'activité chute considérablement (**43**, **45**, **46**, **47**). Cette observation suggère que les deux carbonyles de la fonction imide sont nécessaires pour une bonne interaction avec la FAAH. En revanche, lorsque le carbonyle présent sur la fonction ester est manquant (**44**), l'activité est légèrement plus faible ($IC_{50} = 8 \text{ nM}$) mais ne chute pas drastiquement. Cela suggère que ce carbonyle n'est pas fondamental dans l'interaction avec la triade catalytique de la FAAH.^[65]

Cette étude nous permet d'observer l'importance de la fonction imide dans l'interaction avec la FAAH. Cependant, l'inhibition peut se faire soit par un mécanisme irréversible, soit par un mécanisme réversible (voir section 1.2.3). Les trois types d'inhibition possibles sont :

- Inhibition réversible stabilisée par des liaisons non-covalentes : l'inhibiteur s'associe à la FAAH via des interactions supramoléculaires : ponts hydrogènes, interactions de Van der Waals, π - π stacking, interactions électrostatiques,... Un équilibre est en place et l'enzyme peut revenir avec le temps à sa forme non-complexée.
- Inhibition réversible via une liaison covalente instable : dans notre cas, un des carbonyles de l'imide pourrait subir une attaque nucléophile de la Ser241. Un intermédiaire tétraédrique serait ainsi formé mais avec le temps, ce carbonyle serait récupéré, ce qui provoquerait une ouverture du cycle β -lactame. Cependant, cet intermédiaire pourrait ne pas être stable et une hydrolyse rapide permettrait de rompre la liaison Ser241-ligand et de récupérer l'enzyme non-complexée.
- Inhibition irréversible : dans ce cas, le complexe acyl-enzyme serait stable, ce qui inactiverait l'enzyme de façon permanente. Dans notre cas, cela consisterait en une liaison covalente stable entre la Ser241 et un des carbonyles présents sur la fonction imide du *lead*.

Afin de déterminer le mécanisme d'action des β -lactames en tant qu'inhibiteurs de la FAAH, Marion Feledziak^[65-66] a entrepris des études de réversibilité et HPLC-MS.

2.2.3 Etude de la réversibilité

Dans un premier temps, des études ont été effectuées afin de déterminer si l'inhibition de la FAAH par les β -lactames **38-46** est réversible ou irréversible. Pour ce faire, une dilution rapide

de solutions, contenant la FAAH et un inhibiteur, est effectuée et l'activité de la FAAH est mesurée à trois reprises : directement après la dilution, après 30 minutes et après 90 minutes (**Figure 22**). Pour un inhibiteur réversible, l'activité de l'enzyme devrait augmenter lors de la dilution puisque la probabilité de rencontre et donc d'inhibition d'un ligand avec la FAAH devient plus faible. Dans le cas d'un inhibiteur irréversible, l'activité de l'enzyme devrait rester stable et basse vu que la FAAH serait désactivée définitivement dès le début. Le test est effectué avec le *lead* (**42**). Un contrôle est effectué avec un inhibiteur réversible (OL-92, **18**) et deux inhibiteurs irréversibles de référence (URB-597, **23** et PF-750, **28**).^[66]

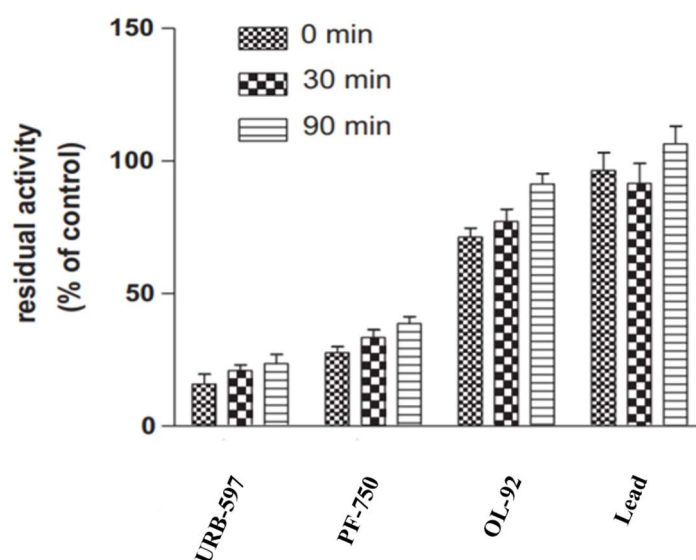


Figure 22 : Test de réversibilité d'inhibiteurs de la FAAH. L'activité résiduelle de la FAAH est mesurée à 3 reprises (0 mins, 30 mins et 90 mins) après dilution de solution contenant un inhibiteur (URB-597, PF-750, OL-92 ou le lead) et la FAAH. Repris de [66].

Ce test nous permet de constater que dans le cas des deux inhibiteurs irréversibles, l'activité de la FAAH reste très basse alors que dans le cas de OL-92 et du *lead*, l'activité de l'enzyme augmente rapidement et est quasiment entièrement récupérée après 90 minutes, ce qui signifie que le *lead* possède un mécanisme d'inhibition réversible. Les β -lactames en tant qu'inhibiteurs de la FAAH ont donc un mode d'action différent des β -lactames utilisés en tant qu'antibiotiques (voir section 2.1).^[66]

Cependant, il reste encore deux mécanismes possibles pour un mode d'inhibition réversible (voir section 2.2.2). Une étude HPLC-MS, détaillée dans la section suivante, va permettre d'obtenir cette information.

2.2.4 Etude HPLC-MS

Une étude HPLC-MS a été effectuée afin de poursuivre l'étude mécanistique d'inhibition de la FAAH par le *lead*.^[65] Cette étude se base sur diverses expériences d'incubation du *lead* dans un homogénat de foie de souris puis dans une solution contenant de la FAAH de rat humanisée afin d'observer par HPLC-MS les composés récupérés après cette incubation. Si le *lead* est récupéré après incubation, cela signifie qu'il y a une grande probabilité que celui-ci n'ait pas été hydrolysé durant l'inhibition et que cette dernière repose donc sur des liaisons non-covalentes. Cependant, si un composé correspondant à une hydrolyse du *lead* est récupéré, cela signifie qu'il est probable que l'inhibition se soit faite via une liaison covalente enzyme-ligand.^[65]

Tout d'abord, le test est effectué dans un homogénat de foie contenant la FAAH et d'autres hydrolases à sérine. En fin d'incubation, les analyses HPLC-MS montrent que le *lead* est quasiment entièrement hydrolysé.

Ensuite, pour vérifier si cette hydrolyse n'est pas due aux autres hydrolases à sérine, la même expérience est effectuée en ajoutant soit un inhibiteur sélectif à la FAAH (PF-750, **28**), soit un inhibiteur peu sélectif de la FAAH (URB-597, **23**). Avec **23**, le *lead* est récupéré en fin d'incubation alors qu'avec **28**, celui-ci est quasiment totalement hydrolysé. Cela confirme que le *lead* est hydrolysé par les autres hydrolases à sérine présentes dans l'homogénat de foie. Cependant, cela ne permet pas de savoir si la FAAH hydrolyse ou non le *lead*.

Pour finir, le *lead* est incubé dans une solution contenant de la FAAH de rat humanisée. Les analyses HPLC-MS montrent dans ce cas-ci que le *lead* est quasiment entièrement récupéré et n'est donc pas, ou très peu, hydrolysé. Cela démontre que le mécanisme d'inhibition de la FAAH par le *lead* repose uniquement sur des liaisons non-covalentes.

2.2.5 Etudes de docking

Des études de docking^{xiv} ont été effectuées afin d'obtenir une prédiction de toutes les interactions présentes entre le *lead* et la cavité enzymatique de la FAAH et qui permettent la stabilisation du complexe enzyme/ligand. Pour cela, il est nécessaire de connaître la structure tridimensionnelle de l'enzyme et du ligand. Or, la structure cristallographique de la FAAH humaine n'a pas encore été élucidée. Cependant, comme mentionné dans la section 1.2.1, celle

^{xiv} Le docking est une méthode computationnelle qui prédit l'orientation d'un ligand dans une cavité enzymatique, pour avoir le complexe le plus stable possible.

du rat a été rapportée. Afin d'obtenir les résultats les plus cohérents possibles, la structure tridimensionnelle de la FAAH du rat est utilisée, en modifiant certains acides aminés qui sont connus comme présents dans la FAAH humaine. Nous parlerons donc de FAAH de rat humanisée.

Des études de docking entre le *lead* (**38**) et la FAAH de rat humanisée ont été réalisées en 2009 en collaboration avec Catherine Michaux et Eric Perpète (UNamur).^[67]

Tout d'abord, ces études montrent l'importance du groupement phényle via les interactions de π - π stacking avec trois résidus phénylalanines (**Figure 23**, F192, F381, F388) composant une « phenyl pocket ». Ensuite, il a été démontré que les interactions de Van der Waals, de la chaîne acyle avec le canal ACB (voir 1.2.1) et du groupement méthyle avec une cavité hydrophobe, sont également stabilisantes (**Figure 23**).^[67]

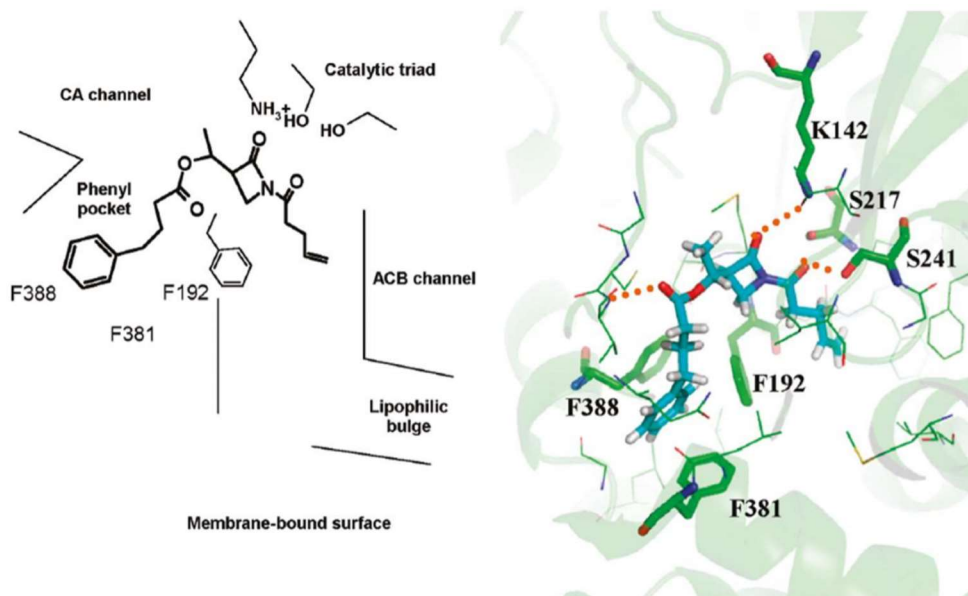


Figure 23 : Résultats de l'étude de docking effectuée sur le lead. Repris de [67].

Deux conformations sont possibles pour les deux carbonyles de l'imide : la conformation *s-trans* et la conformation *s-cis* (**Schéma 5**). La conformation *s-trans* est la plus stable thermodynamiquement, pour des raisons stériques et d'interactions dipôle-dipôle. Cependant, les études de docking indiquent que la conformation *s-cis* permettrait une meilleure stabilisation du complexe enzyme/ligand car celle-ci permet l'interaction des deux carbonyles avec la triade catalytique via des ponts hydrogène (voir **Figure 23**). Cette étude de docking permet donc d'observer toutes les liaisons non-covalentes de type ponts hydrogène, π - π

stacking et interactions de Van der Waals qui permettent la stabilisation du complexe inhibiteur/FAAH.^[67]

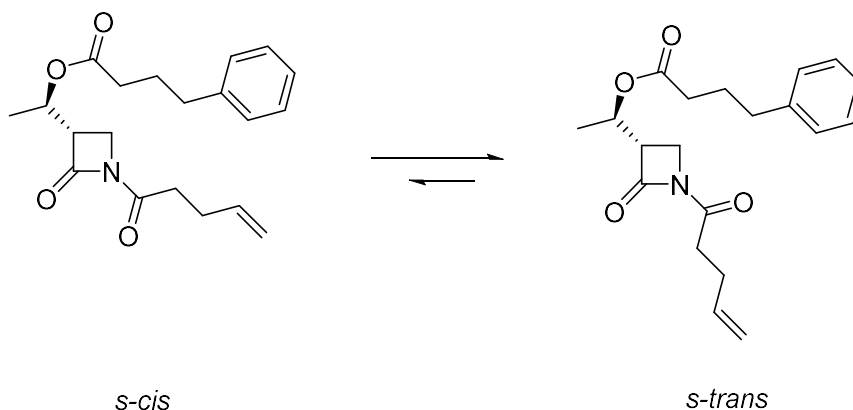


Schéma 5 : Conformations *s-cis* et *s-trans* du lead (42).

Ces études de docking ont révélé les différents paramètres nécessaires afin d'avoir une activité de l'inhibiteur la plus optimale possible :

- Une conformation *s-cis* des deux carbonyles de l'imide pour optimiser l'interaction avec la triade catalytique.
- Une chaîne latérale hydrophobe sur l'azote du β -lactame et un groupement méthyle au pied de l'oxygène du substituant en C3 pour favoriser les interactions de Van der Waals avec le canal ABC notamment.
- Un groupement ester comprenant un phényle afin d'interagir avec la « phenyl pocket » de la FAAH.

2.2.6 Optimisation du *lead* en s'inspirant des études de docking

Les études de docking ont fourni des informations permettant une meilleure compréhension de l'interaction entre le *lead* et la FAAH. Cela a donc inspiré Joséphine Caruano à continuer les études du *lead* afin d'optimiser celui-ci.^[68]

Tout d'abord, l'importance du groupement méthyle présent sur le lead a été vérifiée. Pour cela, le *lead* démunie de ce groupement a été synthétisé (**48**, **Figure 24**). Un mélange racémique a été obtenu et les deux énantiomères ont été séparés par HPLC chirale, sans savoir quel énantiomère correspondait à quelle fraction. Les deux énantiomères et le mélange racémique ont été testés pharmacologiquement. Ces tests ont montré qu'un des deux énantiomères est inactif et que l'autre a une activité fortement réduite ($IC_{50} = 12,7 \mu\text{M}$ comparé

au *lead* dont l' $IC_{50} = 4,2$ nM). Le groupement méthyle a donc une grande importance dans l'interaction avec la FAAH, tout comme le centre asymétrique présent sur le cycle à 4 (**Figure 24**).^[68]

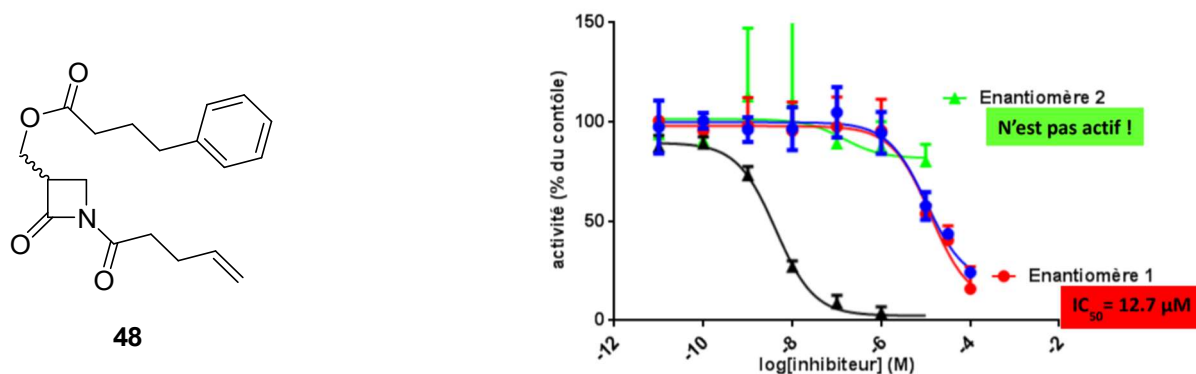


Figure 24 : Structure et résultats pharmacologiques du lead dépourvu du groupement méthyle. Le mélange racémique est représenté en bleu, les deux énantiomères en rouge/vert en comparaison au lead représenté en noir. Repris de [68].

Ensuite, l'importance de l'insaturation présente sur la chaîne acyle latérale a été investiguée. Le *lead* a été soumis à une hydrogénation afin d'obtenir le composé **49** et de pouvoir le comparer avec le *lead* (**Figure 25**).

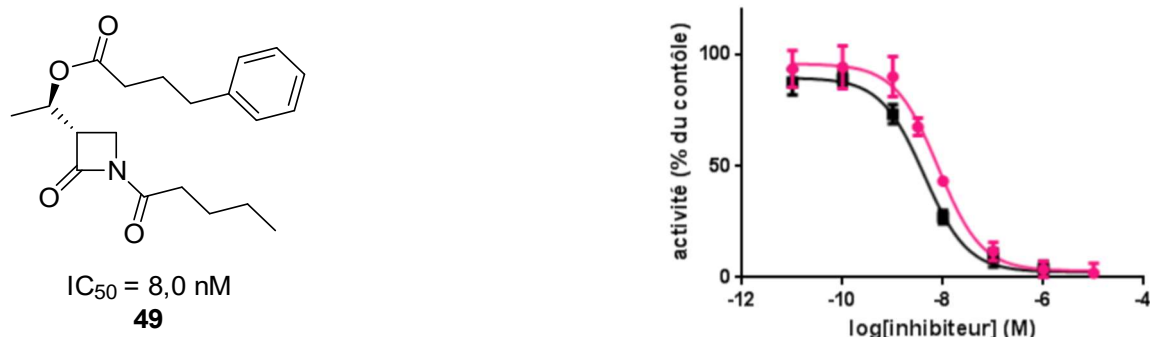


Figure 25 : Structure et résultats pharmacologiques du lead dépourvu de l'insaturation (magenta) en comparaison au lead (noir). Repris de [68].

Cela a permis de démontrer que cette insaturation n'est pas essentielle dans l'activité de l'inhibiteur, vu que le *lead* dépourvu de celle-ci permet d'obtenir un IC_{50} puissant de 8,0 nM (**Figure 25**). Cet IC_{50} reste deux fois plus faible que celui du *lead* ($IC_{50} = 4,2$ nM) mais se trouve dans le même ordre de grandeur.

Enfin, les études de docking ont montré l'importance de la conformation *s-cis* des carbonyles de l'imide. Cependant, la conformation *s-trans* est favorisée

thermodynamiquement. La synthèse de bicycles a donc été envisagée afin de bloquer la rotation de la liaison N-C et donc de forcer les carbonyles à se trouver dans la conformation *s-cis*. Joséphine Caruno a tout d'abord synthétiser les deux bicycles **50** et **51** afin de tester leur activité (**Figure 26**).^[68]

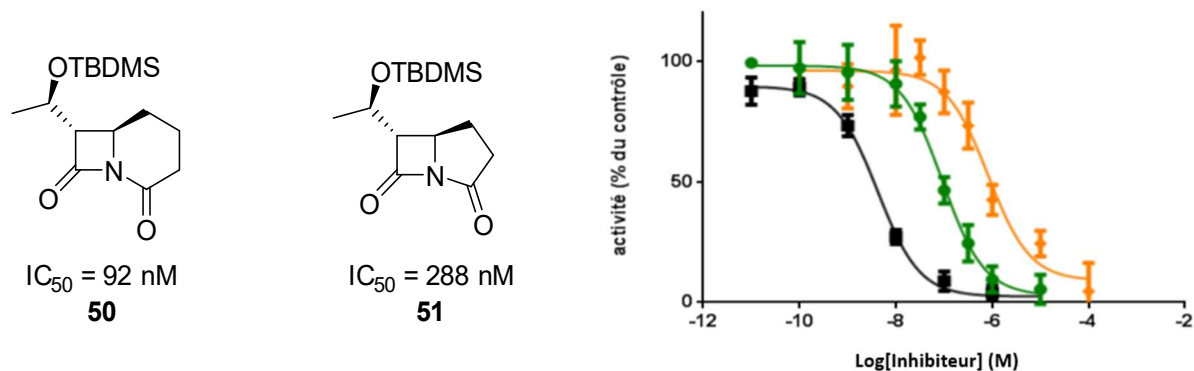


Figure 26 : Structures et résultats pharmacologiques obtenus pour le bicyclic **50** (vert) et le bicyclic **51** (jaune) en comparaison au lead (noir). Repris de [68].

Ces résultats sont intéressants car les bicycles possèdent tous les deux une activité dans le domaine du nM (IC₅₀ **50** = 92 nM et IC₅₀ **51** = 288 nM), alors que ceux-ci ne possèdent ni la chaîne acyle latérale, ni le groupement phényle qui sont tous les deux importants dans l'interaction avec la FAAH. Une autre constatation peut être faite : le bicyclic comprenant un cycle à 6 chaînons est plus actif que le bicyclic comprenant un cycle à 5 chaînons (**Figure 26**).^[68]

Axel Morelle a ensuite repris le projet et effectué la synthèse et l'évaluation pharmacologique de deux bicycles à 6 chaînons (**52** et **53**). Ceux-ci possèdent, tout comme le *lead*, les groupements ester et phényle. L'activité du *lead* est également à nouveau mesurée et présente un IC₅₀ = 2,8 nM (**Figure 27**).^[69]

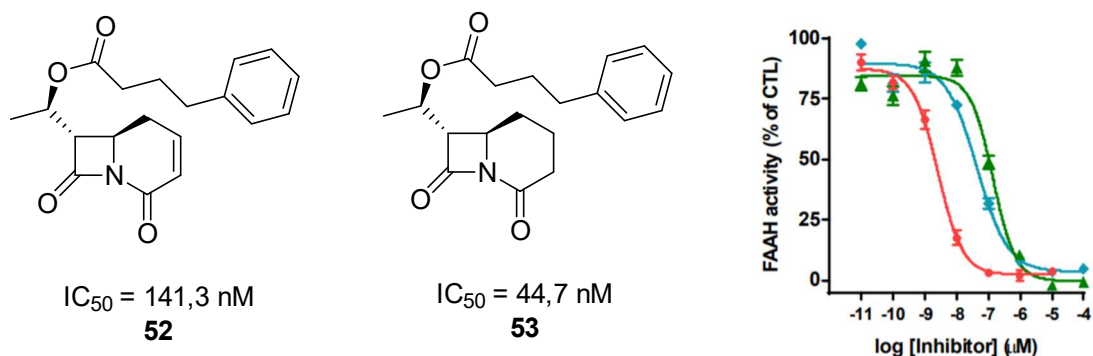


Figure 27 : Structures et résultats des tests pharmacologiques obtenus pour les bicycles 52 (vert) et 53 (bleu) en comparaison au lead (rouge). Repris de [69].

Ces deux bicycles présentent à nouveau une activité intéressante dans le domaine du nM. L'activité du composé **53** est deux fois supérieure à celle de l'équivalent protégé (**50**), ce qui montre l'importance de l'interaction du groupement phényle avec la « phenyl pocket » de la FAAH (voir section 2.2.5). Cependant, l'activité de **53** reste environ 15 fois inférieure à celle du *lead*. Il est jusqu'ici impossible de dire si cette différence vient de l'absence de la chaîne latérale ou bien de la présence du bicyclic.^[69]

Le bicyclic initialement ciblé par Axel Morelle n'était cependant ni **52** ni **53**. C'était en effet la synthèse du bicyclic **54** qui était envisagée. Ce dernier comprenant la chaîne acyle latérale et le phényle présent sur le groupement ester afin d'obtenir tous les critères stabilisants le complexe enzyme/ligand selon les études de docking.^[69] Cependant, la synthèse de ce bicyclic a posé de nombreux problèmes. En effet, l'étape d'insertion de la chaîne latérale n'a pas été réalisable. Deux voies de synthèses ont été testées pour l'insertion de celle-ci sur le bicyclic (**Schéma 6**). La première via une alkylation de **52** et la seconde via une alkylation de **56**.

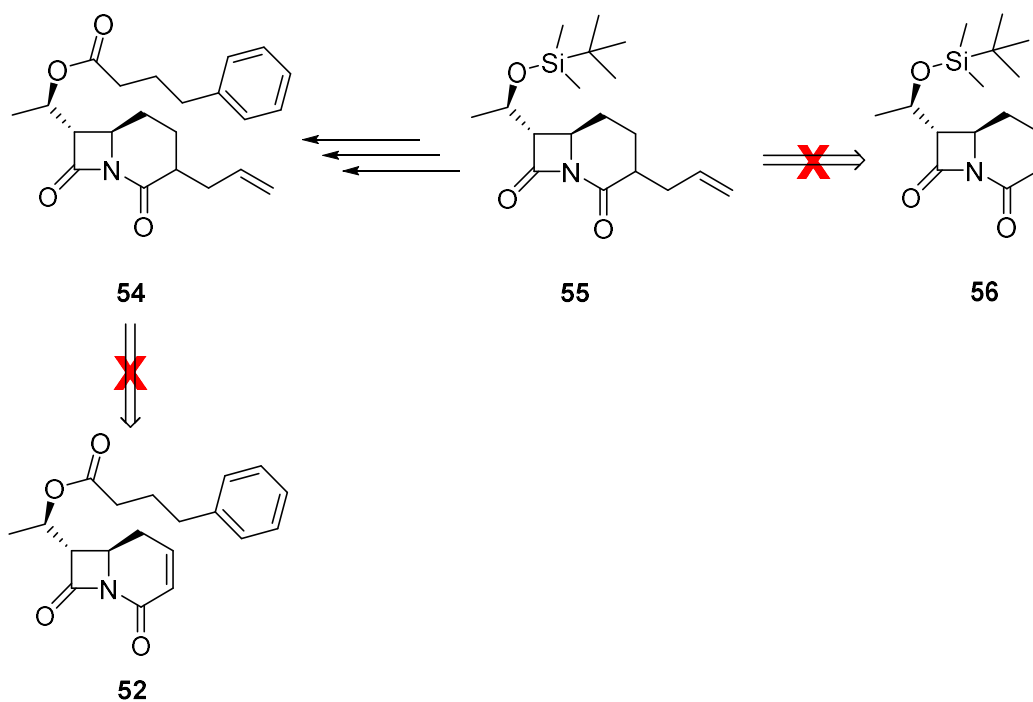


Schéma 6 : Composé ciblé par Axel Morelle (52) et l'étape qui a empêché cette synthèse.

Les deux méthodes testées pour l'alkylation de **52** sont représentées au **Schéma 7**. Dans les deux cas, la réaction n'a pas fonctionné, aucun produit n'a pu être récupéré.

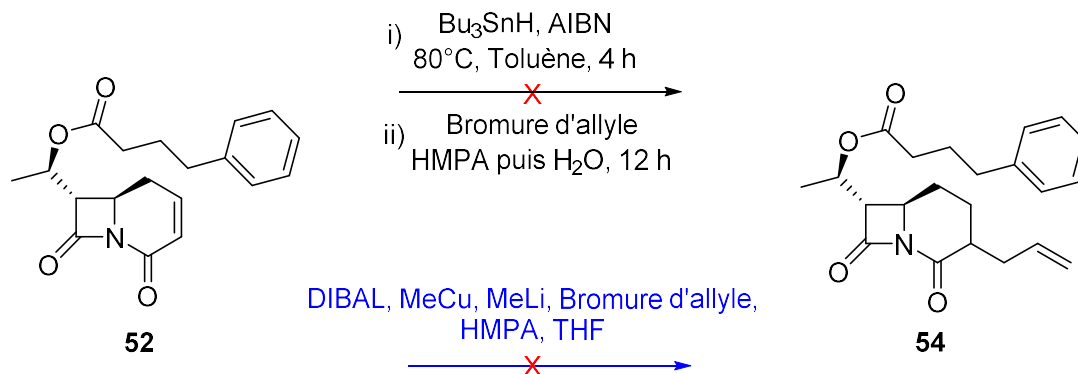


Schéma 7 : Deux méthodes testées pour l'alkylation de 52.

La première méthode testée pour l'alkylation de **56** est représentée au **Schéma 8**. Le produit désiré n'a pas été obtenu car une O-alkylation a lieu plutôt qu'une C-alkylation.

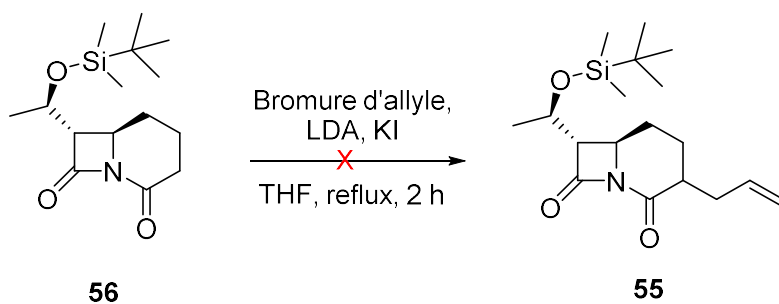


Schéma 8 : Première tentative de synthèse de 55 à partir de 56.

Le méthode a alors été adaptée en essayant de réaliser un réarrangement de Claisen afin d'obtenir le produit désiré, sans succès (Schéma 9).

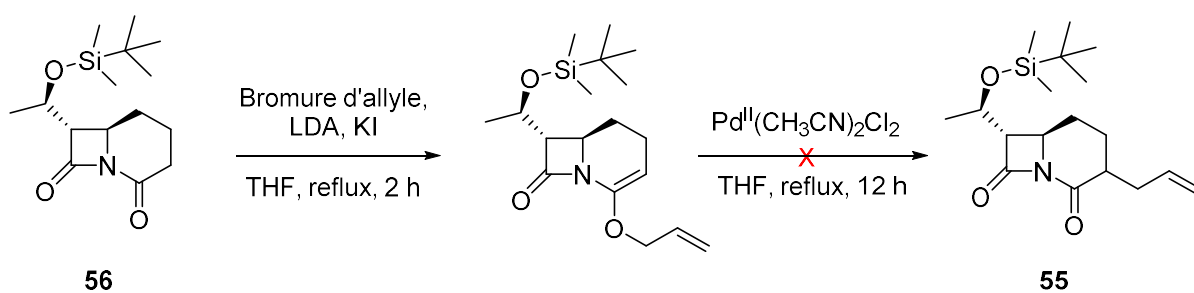


Schéma 9 : Deuxième tentative de synthèse de 55 à partir de 56.

Il serait donc intéressant d'envisager une nouvelle voie de synthèse pour permettre d'obtenir un bicyclic contenant la chaîne latérale.

3 Objectifs et stratégies

3.1 Objectifs

L'objectif global de ce projet consiste en la poursuite de la recherche sur l'optimisation du composé *lead* de la famille des β -lactames en tant qu'inhibiteurs de la FAAH. Pour ce faire, nous nous inspirons des études de docking et de relation structure-activité qui montrent les différents paramètres nécessaires pour avoir une activité de l'inhibiteur la plus optimale possible (voir sections 2.2.5 et 2.2.6).

Tout d'abord, nous allons poursuivre les efforts vers la synthèse d'un système bicyclique comportant les deux chaînes latérales du *lead*. Etant donné que les études de relation structure-activité ont montré que l'insaturation présente sur la chaîne latérale n'est pas indispensable dans l'interaction avec la FAAH (voir section 2.2.6), nous vous proposons de synthétiser les bicycles **57a**, **57b** et **58** (Figure 28).

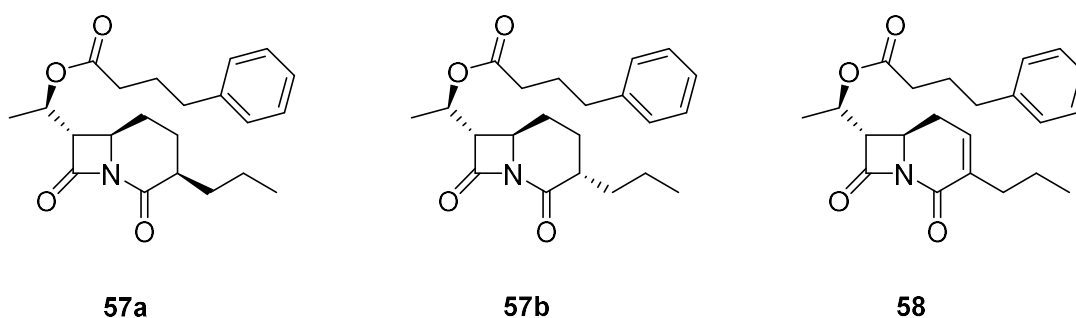


Figure 28 : Structure des bicycles 57a, 57b et 58.

Ces bicycles vont en effet permettre d'envisager une nouvelle voie de synthèse afin d'obtenir des alternatives du composé **54**. Ces composés vont également permettre d'observer si l'orientation de la chaîne latérale dans l'espace a un impact sur l'activité de l'inhibiteur.

Ensuite, la synthèse du *lead* démunie de l'insaturation (**49**) sera également effectuée afin de confirmer que cette insaturation n'est pas indispensable (Figure 29).

3.2 Stratégies

3.2.1 Synthèse des bicycles **57a** et **57b**

L'alkylation du bicycle est l'étape empêchant la synthèse du composé **54** (voir section 2.2.6). L'idée pour remédier à ce problème est d'inclure la chaîne latérale sur un réactif de départ afin que celle-ci soit présente lors de la cyclisation pour éviter cette étape d'alkylation. Cela ouvre donc une nouvelle voie de synthèse (**Schéma 10**). Le seul défaut de cette méthode est l'impossibilité d'installer une chaîne latérale comportant l'insaturation. Les études SAR ont cependant montré que celle-ci n'était pas indispensable dans l'interaction avec la FAAH.

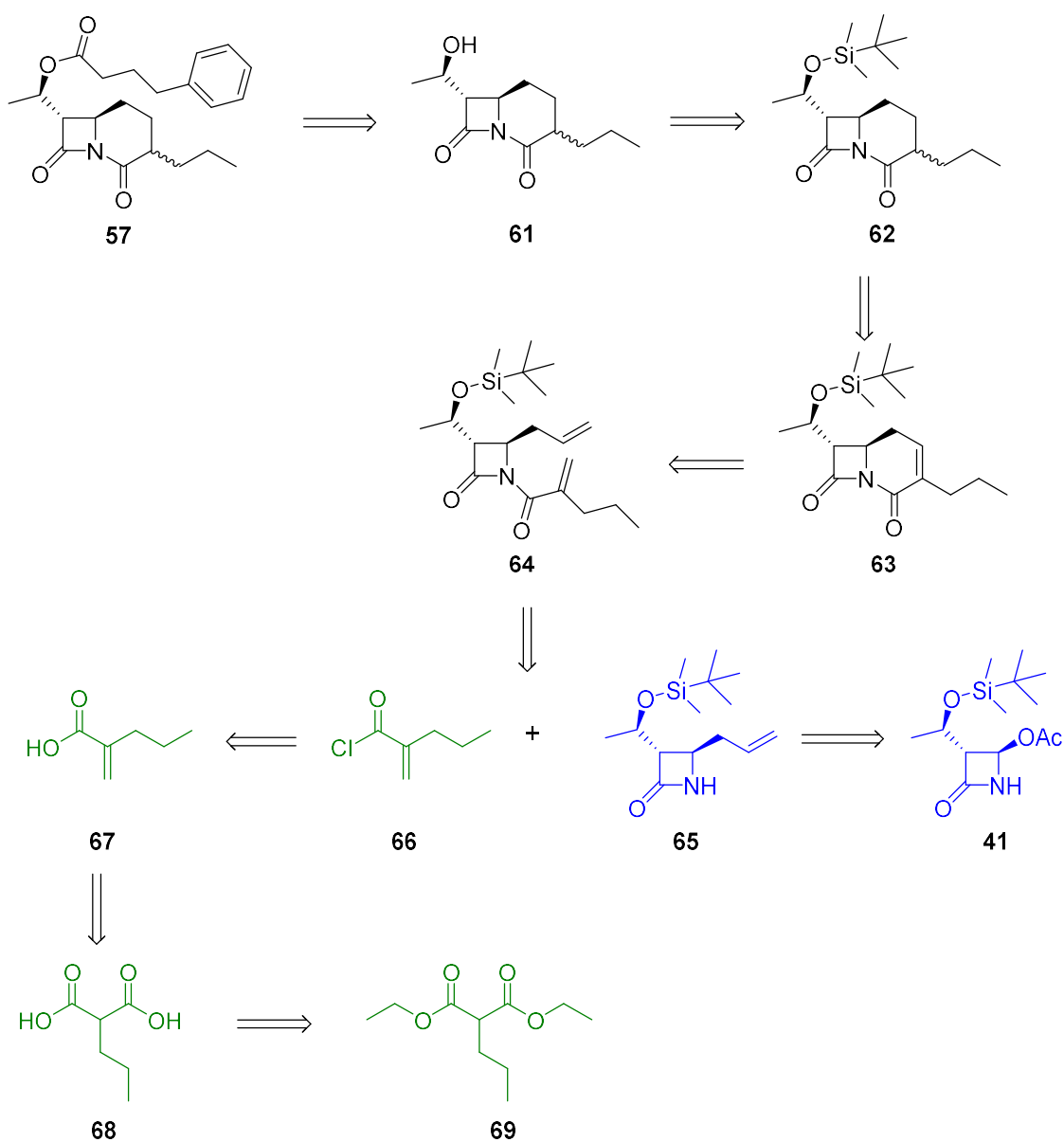


Schéma 10 : Voie rétrosynthétique des bicycles **57a** et **57b**.

La *N*-acylation du composé **65** pour obtenir le composé **64** est une étape clé de cette voie de synthèse. Celle-ci nécessite le chlorure d'acyle **66** qui n'est pas disponible commercialement et qui doit donc également être synthétisé. Celui-ci pourrait être obtenu à partir du *n*-propylmalonate de diéthyle (**69**) en 3 étapes : une saponification suivie d'une décarboxylation et d'une substitution nucléophile. Les composés **57a** et **57b** seront obtenus via 6 étapes successives à partir du composé **41** disponible commercialement. Les 6 étapes sont les suivantes : une allylation, une *N*-acylation, une cyclisation, une réduction, une déprotection et enfin une estérification. Deux diastéréoisomères devraient être obtenus après la réduction de la liaison double pour obtenir le composé **62**. Les diastéréoisomères ne seront séparés qu'à la fin pour obtenir **57a** et **57b** afin d'éviter une racémisation durant les étapes de déprotection et d'estérification.

3.2.2 Synthèse du bicyclic 58

Le bicyclic **58** diffère des bicyclics **57** uniquement par la présence de la double liaison sur le cycle à 6 chaînons. Une partie de la voie de synthèse est donc commune avec celle des bicyclics **57**. Le composé **63**, obtenu via la voie de synthèse de **57** (voir Schéma 10), subira dans ce cas directement une déprotection et une estérification. La voie de synthèse est donc similaire à l'exception de l'étape de réduction qui n'est pas effectuée (Schéma 11).

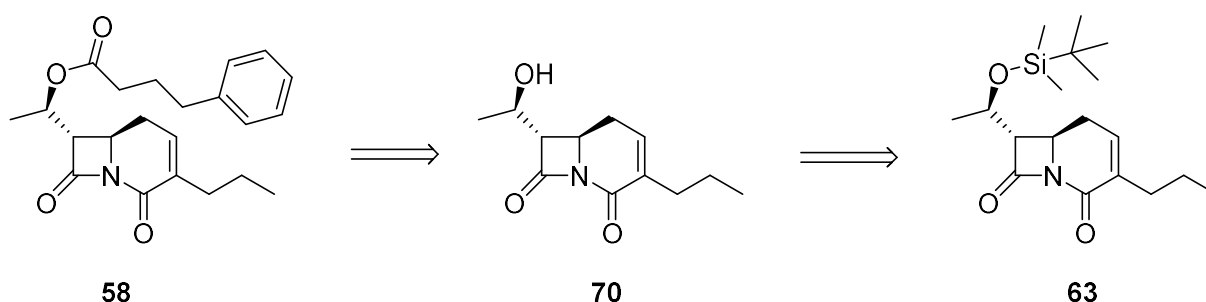


Schéma 11 : Voie rétrosynthétique du bicyclic 58.

3.2.3 Synthèse de 49

Un petit stock de *lead* est encore disponible au laboratoire. Le composé **45** sera donc obtenu via une simple étape de réduction de la double liaison du *lead* (Schéma 12).

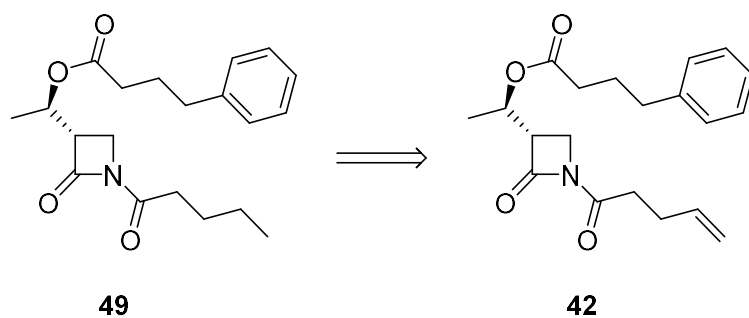


Schéma 12 : Voie rétrosynthétique du composé 49.

3.2.4 Synthèse des bicycles **59** et **60**

La stratégie de synthèse de ces composés repose sur une étape d'addition-1,4 d'un allyle sur le composé **73**, synthétisé par Axel Morelle, dont un stock est disponible dans le laboratoire. L'utilisation d'un organocuprate est envisagée afin d'effectuer cette addition-1,4 et d'obtenir le composé **72**. Le composé **71** sera ensuite obtenu via une déprotection de **72**. Enfin, une estérification suivie d'une hydrogénation vont permettre d'obtenir respectivement les bicycles **59** et **60** (Schéma 13).

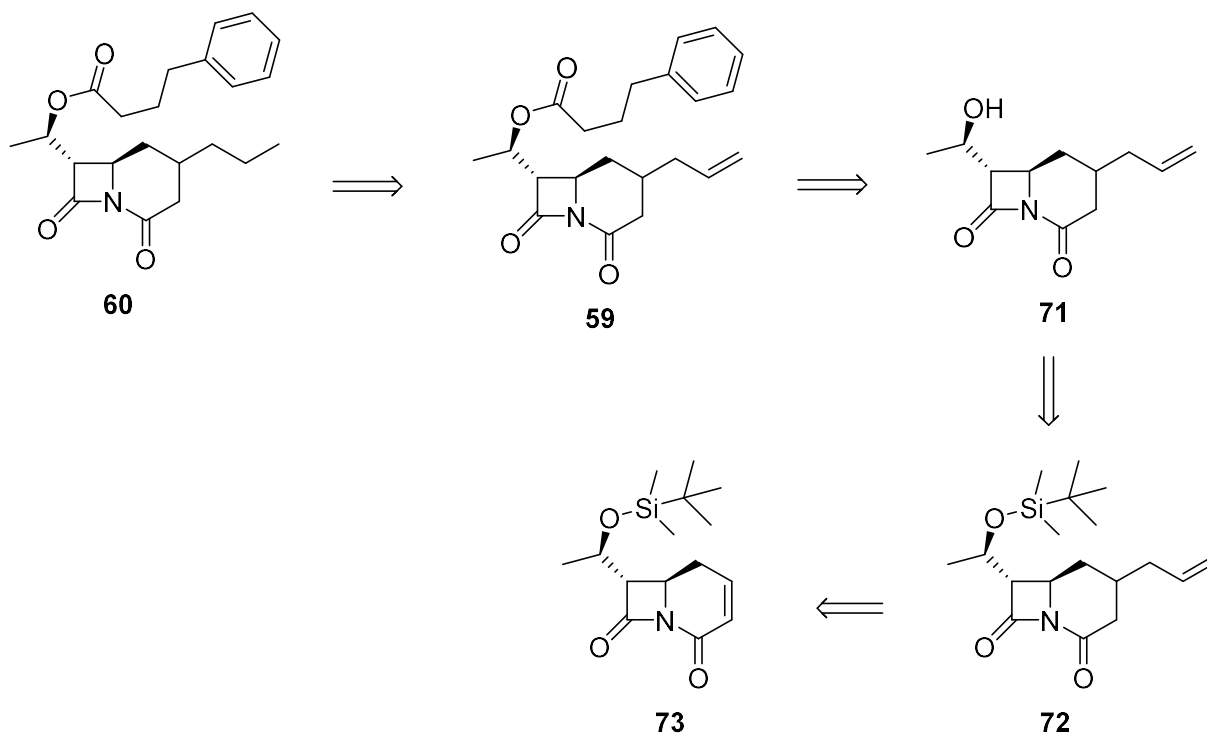


Schéma 13 : Voie rétrosynthétique des bicycles 59 et 60.

3.2.5 Tests pharmacologiques

Des mesures d'IC₅₀, obtenues par Liquid Scintillation Counting (LSC), seront effectuées sur les molécules finales ciblées dans les objectifs (**49**, **57a**, **57b**, **58**, **59**, **60**) ainsi que sur tous les intermédiaires constitués d'un bicycle (**61**, **62**, **63**, **70**, **71**, **72**). L'activité inhibitrice du *lead* envers la FAAH sera également à nouveau mesurée afin que tous les composés soient évalués dans les mêmes conditions dans le but d'obtenir la meilleure comparaison possible.

4 Résultats et discussions

4.1 Synthèse des bicycles 57a et 57b

4.1.1 Saponification de 69

La synthèse de l'acide propylacrylyque, nécessaire pour la *N*-acylation de 65 (voir section 4.1.4), débute par la saponification de 69 qui est disponible commercialement. Les conditions de cette réaction publiée dans l'article de Riber *et al.*^[70] ont été employées (Schéma 14).

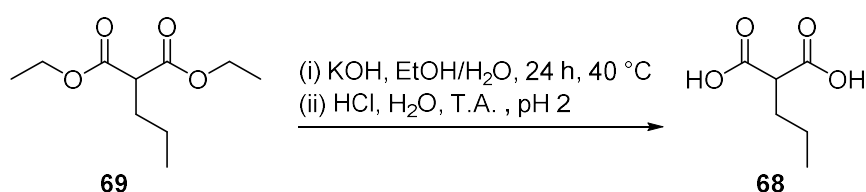


Schéma 14 : Conditions expérimentales de saponification de 69.

Le **Tableau 2** montre tous les essais effectués pour cette réaction. Tout d'abord, la réaction a été arrêtée après 3 heures car un précipité apparaît rapidement et le mélange réactionnel prend vite en masse, ce qui diminue fortement l'efficacité de l'agitation. Une analyse RMN ¹H a montré encore une présence en grande quantité de réactif de départ. Un nouvel essai a été effectué en laissant une durée de réaction de 21 h afin de permettre un maximum de conversion de 69. Un spectre RMN ¹H a alors montré une meilleure conversion du réactif. Cependant, le produit n'est pas pur, du réactif de départ persiste. Une méthode de purification était donc nécessaire. Vu la différence de polarité entre 68 et 69, des tests de solubilité ont été effectués dans l'hexane. Uniquement le réactif de départ est soluble dans ce solvant. Le produit brut a alors été lavé à l'hexane afin de purifier celui-ci.

Tableau 2 : Récapitulatif des différents essais effectués pour la saponification de 65.

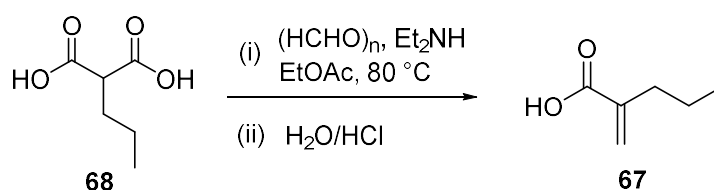
	Quantité de 69 (mmol)	Solvant utilisé	Durée de réaction	Lavage à l'hexane	Rendement
1	4,94	EtOH	3 h	Non	Pas mesuré
2	4,94	EtOH	21 h	Oui	52%
3	12,20	EtOH/H ₂ O (70/30)	20 h	Oui	94%
4	24,40	EtOH/H ₂ O (70/30)	21 h	Oui	87%
5	48,80	EtOH/H ₂ O (70/30)	22 h	Oui	97%
6	48,80	EtOH/H ₂ O (70/30)	23 h	Oui	79%

Etant donné que le rendement obtenu pour l'essai 2 est considérablement plus faible que celui obtenu dans la publication (94 %)^[70], et vu la prise rapide en masse du mélange réactionnel, ce qui empêche une agitation optimale, la réaction a été effectuée dans un mélange d'EtOH et d'H₂O. Cela a permis de solubiliser plus facilement le KOH mais également de solubiliser le produit formé. Des rendements proches de celui présenté dans la publication ont alors été obtenus. L'augmentation de quantité de réactif engagé dans la réaction ne pose aucun problème (**Tableau 2**).

4.1.2 Décarboxylation de **68**

La deuxième étape nécessaire à la synthèse d'acide propylacrylique à partir de **69** consiste en une réaction de décarboxylation de **68**. La méthode utilisée est reprise de la publication de Wu *et al.*^[71] Aucun problème n'a été rencontré en utilisant ces conditions (**Tableau 3**). Le produit a été analysé par RMN et HMRS. Le spectre RMN ¹H a indiqué que le produit brut est suffisamment pur et que donc, aucune purification n'est nécessaire.

Tableau 3 : Résultats obtenus pour les différents essais de décarboxylation de **68**.



Essai	Quantité de 68 (mmol)	Rendement
1	2,53	70%
2	21,33	Quantitatif
3	47,16	94%
4	38,44	Quantitatif

Le mécanisme correspond à celui d'une réaction de Mannich suivie d'une addition nucléophile et d'une déshydratation lors du work-up. Celui-ci débute par la formation d'un iminium à partir du formaldéhyde et de la diéthylamine (**Schéma 15**).

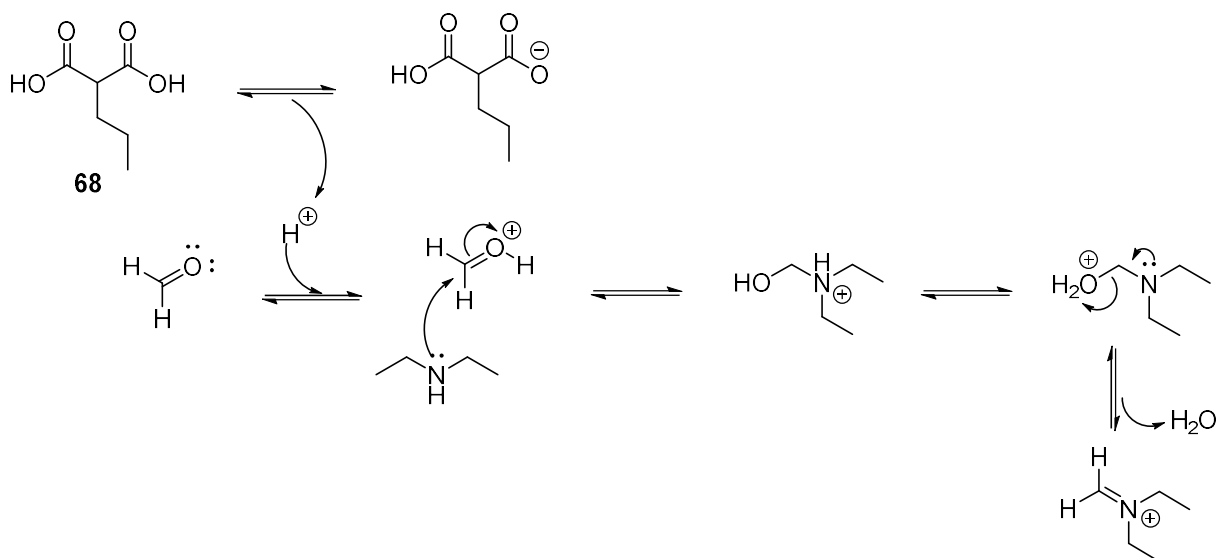


Schéma 15 : Mécanisme de formation de l'iminium via une réaction de Mannich.

Ensuite, la décarboxylation de l'acide n-propylmalonique permet l'attaque nucléophile sur l'iminium pour former l'amine correspondante. Enfin, l'addition d'un excès d'eau lors du work-up permet l'hydrolyse de l'amine qui est suivie d'une déshydratation en milieu acide afin de former le produit désiré (**Schéma 16**).

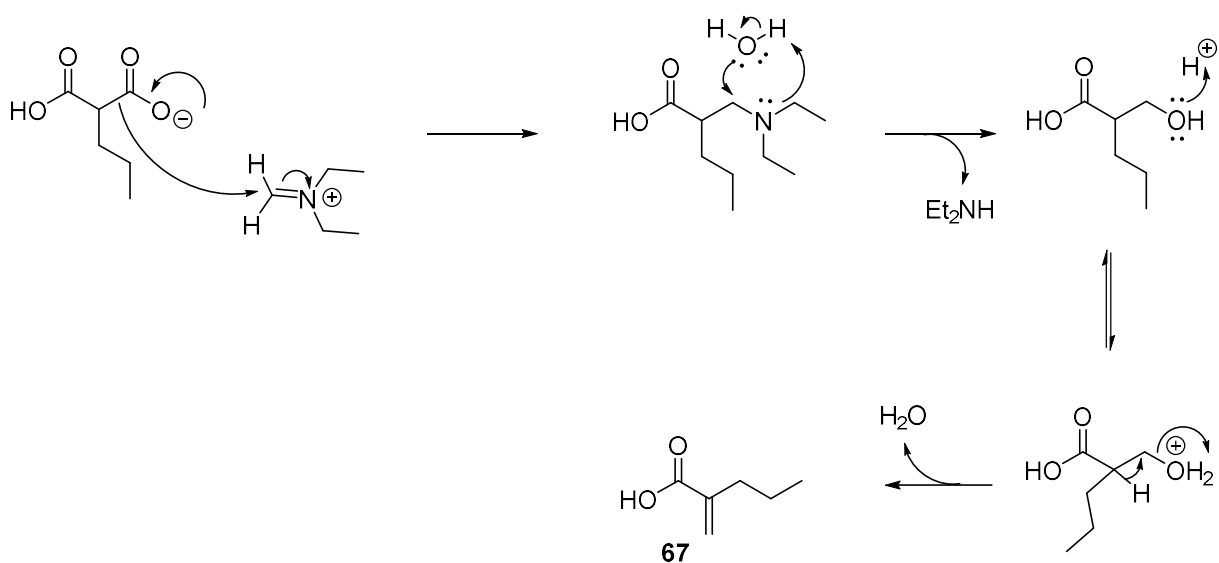
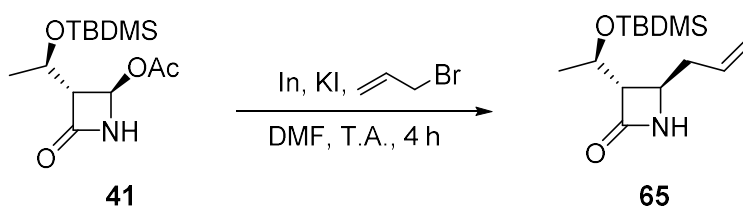


Schéma 16 : Mécanisme de formation de **67** à partir de la forme déprotonée de **68** et de l'iminium.

4.1.3 Alkylation de l'azétidinone commercial (41)

L'étape d'alkylation a pour but de remplacer l'acétate présent sur le cycle β -lactame de **41** par un groupement allyle. La méthode utilisée est inspirée de la publication de S.K. Kang *et al.*^[72]. Celle-ci a notamment été réalisée avec succès par Axel Morelle lors de la synthèse des bicycles **52** et **53**. Différents essais ont été effectués et sont répertoriés dans le **Tableau 4**. Les analyses RMN et HMRS ont montré que le produit brut ne nécessitait aucune purification supplémentaire. Lors du premier essai, le produit obtenu avait l'aspect d'une poudre jaunâtre alors que le spectre RMN ^1H ne montrait aucune impureté dans le produit. Cette couleur peut être expliquée par la présence de traces de Br_2 résiduel qui n'est pas détecté par RMN. Dans les 3 essais suivants, le work-up a été effectué plus rapidement. Dans ces cas-là, le produit a l'aspect d'une poudre blanche, ce qui amène à penser qu'aucune trace de Br_2 n'est présente. Les rendements ont alors été proches de celui obtenu par Kang *et al.* (89%). Aucune purification n'a été nécessaire car les traces de Br_2 n'interfèrent pas dans les réactions suivantes.

Tableau 4 : Récapitulatif des essais effectués pour l'alkylation du composé 37.



Essai	Quantité de 37 (mmol)	Rendement	Aspect
1	1,74	Quantitatif	Poudre jaunâtre
2	10,44	74%	Poudre blanche
3	10,44	88%	Poudre blanche
4	13,92	80%	Poudre blanche

Le mécanisme de réaction est intéressant afin de comprendre la rétention de stéréochimie. Tout d'abord, l'iodure d'allyle est formé après substitution nucléophile du bromure d'allyle par l'iodure afin de créer un meilleur groupe partant. Ensuite, une insertion d'indium (0) dans l'iodure d'allyle permet la préparation du réactif allylindium, qui est un sesquiodure d'allylindium lorsque la réaction est effectuée dans le DMF (**Schéma 17**).^[73]

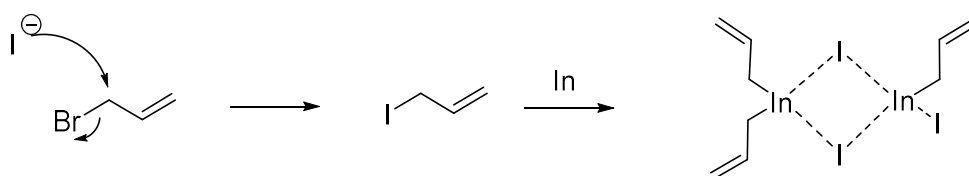


Schéma 17 : Mécanisme de formation du sesuiodure d'allylindium.

Ensuite, une substitution nucléophile d'ordre 1 permet l'addition de l'allyle sur le cycle β -lactame. La paire libre de l'azote peut se rabattre afin de favoriser le départ de l'acétate. Puis, l'azétidinone subit une attaque nucléophile de l'allylindium afin de former le produit désiré. L'attaque nucléophile est stéréosélective de par l'encombrement stérique généré par l'autre substituant ; l'addition se fait donc sur la face opposée (**Schéma 18**).

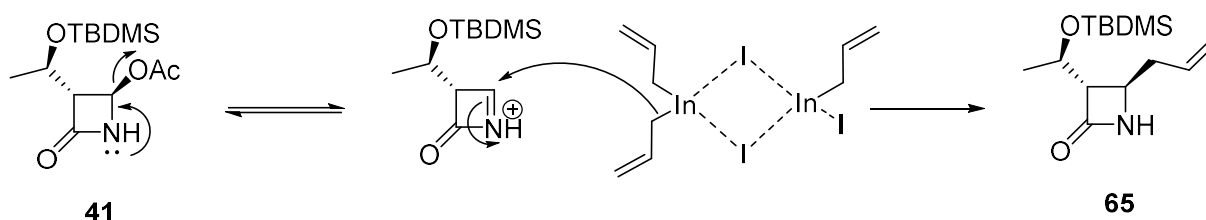


Schéma 18 : Mécanisme de formation du composé 66.

4.1.4 *N*-acylation de 65

L'étape de *N*-acylation du chlorure de 2-méthylènepropanoyl est inspirée de la publication de Wu *et al.*^[71] Celle-ci décrit la synthèse du chlorure d'acyle à partir de l'acide propylacrylique (**Schéma 19**). Ce dernier est synthétisé à partir du *n*-propylmalonate de diéthyle via une étape de saponification (voir section 4.1.1) suivie d'une étape de décarboxylation (voir section 4.1.2). Leur chlorure d'acyle était ensuite utilisé afin d'effectuer une *N*-acylation sur l'aniline (**Schéma 19**).

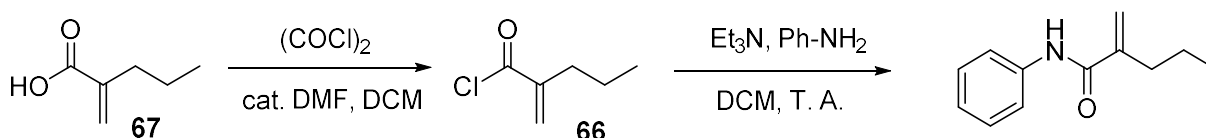
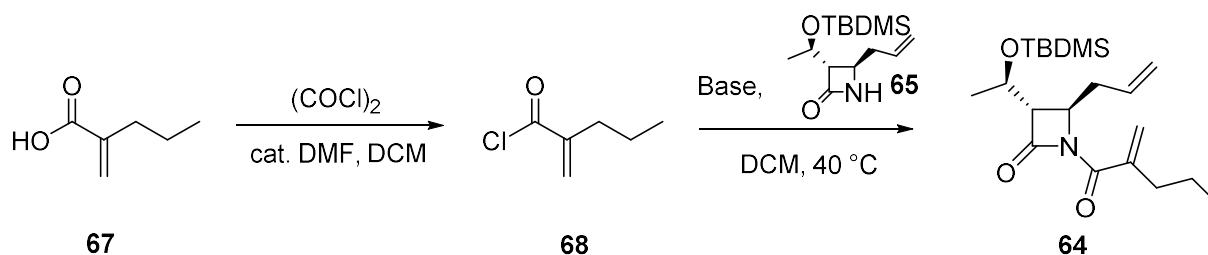


Schéma 19 : Méthode de *N*-acylation et synthèse du chlorure d'acyle selon la publication de Wu *et al.*^[71]

Pour le premier essai, les conditions de Wu *et al.* ont été appliquées en utilisant 65 comme réactif et en remplaçant la triéthylamine par le *n*BuLi car Axel Morelle a montré que la *N*-acylation sur 65, en utilisant le chlorure d'acryloyle, fonctionnait beaucoup mieux en utilisant le *n*BuLi plutôt que Et₃N ou la pyridine. Aucun produit n'a été détecté (essai 1, **Tableau 5**). Le

réactif de départ a été récupéré, ce qui signifie que le *n*BuLi n'a pas dégradé celui-ci. A priori, le *n*BuLi a déprotoné **65** mais celui-ci n'a pas réagi avec le chlorure d'acyle.

Tableau 5 : Résultats des essais permettant de déterminer les conditions idéales pour la réaction de N-acylation.



Essai	Réactif	Base	Conditions de réactions	Rendement
1	65	<i>n</i> BuLi	Wu <i>et al.</i> 3 éq. (COCl) ₂	0%
2	Aniline	Et ₃ N	Wu <i>et al.</i> 3 éq. (COCl) ₂	0%
3	Aniline	Pyridine	Wu <i>et al.</i> 3 éq. (COCl) ₂	0%
4	65	<i>n</i> BuLi	Ajout <i>in situ</i> du chlorure d'acyle ; 1 éq. (COCl) ₂	9%
Optimisation	65	<i>n</i> BuLi	Ajout <i>in situ</i> du chlorure d'acyle en 2 fois ; 1 éq. (COCl) ₂ ; Purification sur colonne plus large	67%

Trois hypothèses ressortent de cet échec. La première étant que la réaction de synthèse du chlorure de 2-méthylènepropanoyle a échoué. La deuxième suggérerait que le chlorure d'acyle, connu pour être instable, se dégraderait rapidement durant le work-up car les conditions de celui-ci décrites par Wu *et al.* ne sont pas très précises^{xv}. La troisième serait que les deux intermédiaires, le chlorure d'acide **68** et l'anion de **65**, sont bien présents mais ne réagissent pas dans ces conditions.

Afin de déterminer si le problème vient du chlorure d'acyle, nous avons effectué la N-acylation sur l'aniline dans les mêmes conditions que Wu *et al.* (voir Schéma 19). Aucun produit n'a été détecté par RMN ¹H (essai 2, Tableau 5). Le problème provient donc très probablement du chlorure d'acyle. Des conditions alternatives sont utilisées en remplaçant Et₃N par la pyridine pour voir si une modification de la base pourrait avoir une influence sur la réactivité. Aucun produit n'a à nouveau été obtenu (essai 3, Tableau 5). Etant donné que la production de chlorure d'acyle a été réalisée par Wu *et al.*, la première hypothèse paraît peu

^{xv} Les températures et pressions utilisées lors de l'évaporation du solvant ne sont notamment pas décrites.

probable. La deuxième hypothèse, la dégradation du chlorure d'acide, a donc été celle considérée comme la source du problème.

Afin de remédier au problème d'instabilité du chlorure d'acyle, un essai a été effectué en injectant celui-ci *in situ*, directement en fin de réaction, sans work-up. Avec ces nouvelles conditions, la réaction a fonctionné avec un rendement de 9% (essai 4, **Tableau 5**). Après optimisation, un rendement de 67% a pu être observé (Optimisation^{xvi}, **Tableau 5**).

L'injection *in situ* a impliqué de modifier les conditions de réaction. En effet, 3 équivalents de chlorure d'oxalyle étaient normalement utilisés pour la synthèse du chlorure de 2-méthylèneopropanoyle. Lors de l'injection *in situ*, un seul équivalent a été engagé. Cela a permis d'éviter qu'un excès de chlorure d'oxalyle, qui est plus électrophile que le chlorure d'acyle, réagisse avec **65** lors de la *N*-acylation. De plus, comme le chlorure d'acyle a été injecté en excès dans la réaction de *N*-acylation, cela n'a eu que peu d'impact sur le rendement de la réaction.

Une autre constatation a été faite : lors de la purification sur silice flash, un produit secondaire a été récupéré. Celui-ci a été identifié par RMN et par HMRS (**72**). Il s'agit de la formation d'un dimère de l'acide propylacrylique. Celui-ci est formé via un mécanisme impliquant la déprotonation de celui-ci, n'ayant pas réagi avec le chlorure d'oxalyle, afin de permettre l'attaque nucléophile sur le chlorure de 2-méthylèneopropanoyle afin de former l'anhydre **74** (**Schéma 20**).

^{xvi} Deux paramètres ont été modifiés dans le but d'optimiser la réaction. Le premier étant la réalisation de la purification par silice flash sur une colonne de plus large diamètre afin d'améliorer la séparation de ces deux composés. Le deuxième paramètre modifié correspond à l'injection en deux fois du chlorure d'acyle. La première moitié est injectée au début de la réaction et l'autre moitié est injectée après 1 heure. Ces deux adaptations ont permis d'obtenir un rendement maximal de 67%. Cependant, plus la quantité de réactif utilisée a été augmentée, plus le rendement a chuté. Cela peut être en partie expliqué par le fait que plus de produit est injecté sur la colonne lors de la purification par silice flash, ce qui entraîne une moins bonne séparation et donc une perte de produit. Il devient alors plus opportun d'effectuer plusieurs fois la réaction et la purification plutôt que d'augmenter les quantités de réactifs.

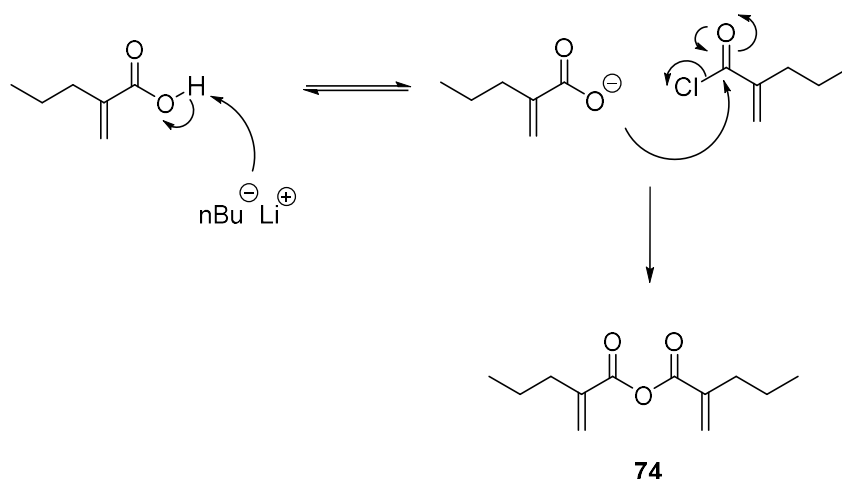


Schéma 20 : Mécanisme de formation du produit secondaire 74 de la N-acylation.

4.1.5 Métathèse cyclisante de **64**

L'étape suivante de cette voie de synthèse a pour but de former le bicyclic. La méthode utilisée est une métathèse cyclisante utilisant un catalyseur de Grubbs de 2^{ème} génération. Le mécanisme de cette réaction débute par une activation du catalyseur via l'échange du ligand phosphine par une des doubles liaisons de **64**, selon un mécanisme dissociatif, en passant par un complexe à 14 électrons de valence très réactif (**Schéma 21**).^[74] Cet échange est suivi d'une cycloaddition [2+2] et d'une rétro-cycloaddition afin d'éliminer le styrène, et de permettre la fixation de la seconde double liaison de **64**. Ensuite, le cycle catalytique débute. Deux étapes permettent la formation du produit **63** : une cycloaddition [2+2] suivie d'une rétro-cycloaddition. Enfin, un échange de ligand, avec un mécanisme dissociatif, suivi d'une cycloaddition [2+2] et d'une rétro-cycloaddition permettent de revenir au début du cycle catalytique, avec formation d'éthylène, selon un mécanisme similaire à celui d'élimination du styrène décrit pour l'activation du catalyseur.

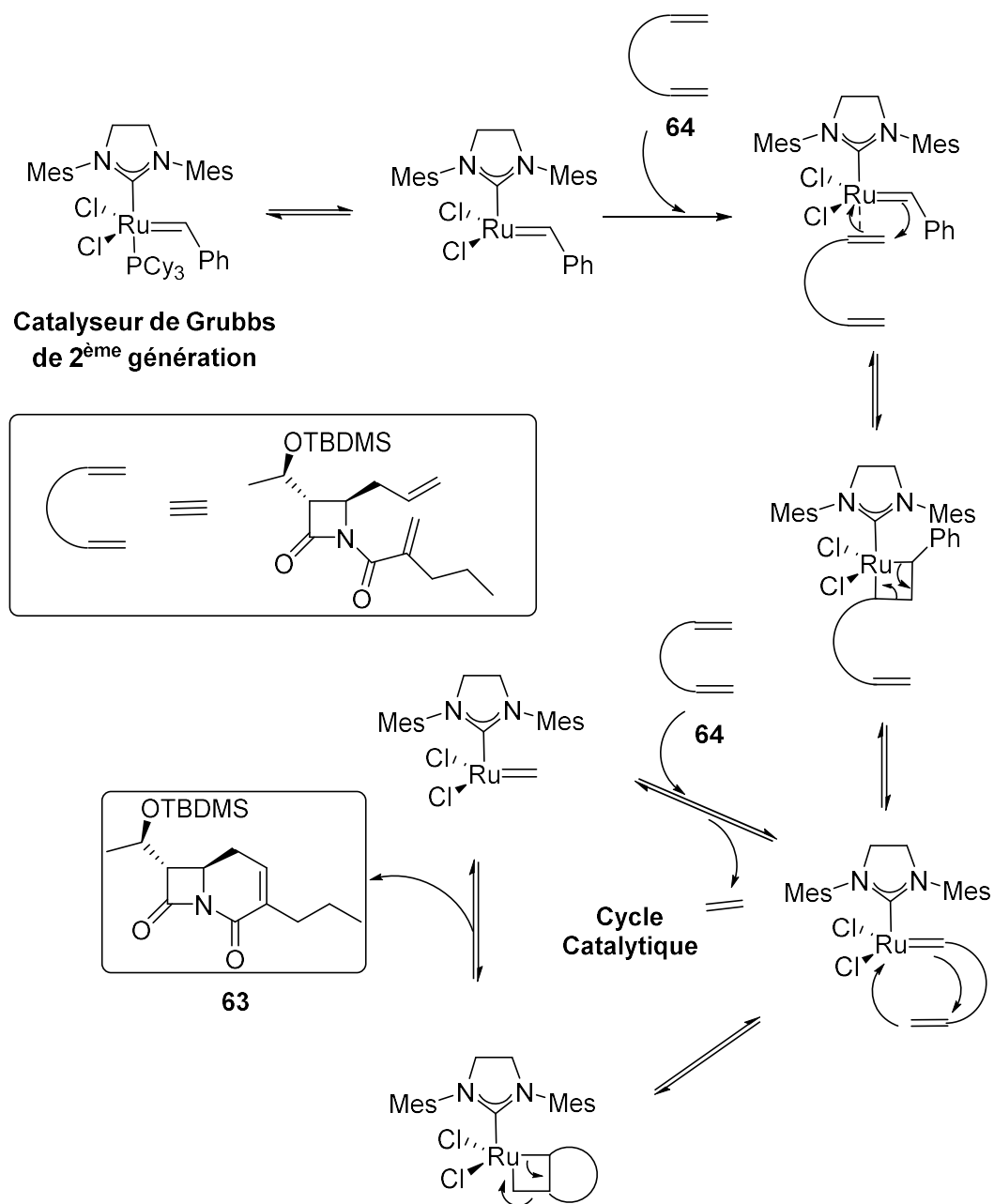
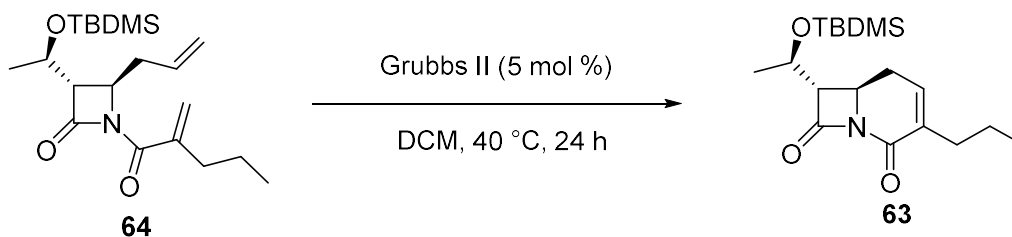


Schéma 21 : Cycle catalytique de métathèse cyclisante utilisant un catalyseur de Grubbs de 2^{ème} génération.

Cette réaction est réalisée sous atmosphère inerte afin d'éviter la dégradation du catalyseur de Grubbs. Celle-ci est effectuée à 40 °C et durant 24 heures. Différents essais ont été effectués sous ces conditions (**Tableau 6**). A chaque fois, aucun souci n'a été rencontré. Des bons rendements ont été observés. L'augmentation de quantité de réactif introduit dans la réaction n'a également posé aucun problème. Une purification a été nécessaire pour éliminer les produits secondaires issus de la dégradation du catalyseur ainsi que le réactif **64** n'ayant pas réagi.

Tableau 6 : Résultats obtenus pour les réactions de métathèse cyclisante.

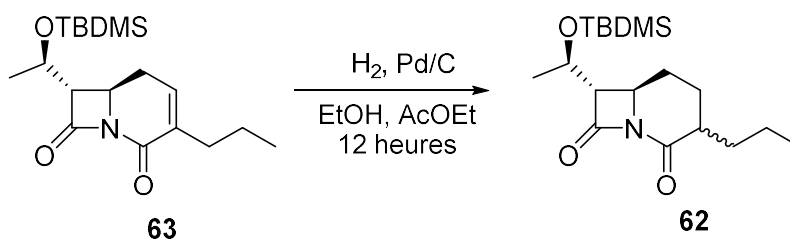


Essai	Quantité de 64 (mmol)	Rendement
1	0,59	53%
2	2,56	79%
3	2,40	83%
4	1,87	61%

4.1.6 Hydrogénation de 63

L'étape suivante correspond à une réduction de la double liaison présente sur le cycle à 6 chaînons de **63**. Une étape bien connue, très efficace et sélective aux insaturations est l'hydrogénation. Celle-ci a été effectuée en utilisant le Pd/C comme catalyseur. Deux essais ont été effectués (**Tableau 7**). A chaque fois, la conversion fut totale. Deux diastéréoisomères ont été obtenus, mais ceux-ci n'ont pas séparés afin d'éviter une épimérisation lors des deux étapes suivantes, qui rendraient la séparation inutile. Celle-ci sera donc effectuée uniquement à la dernière étape. Pour chaque essai, un mélange racémique est obtenu, ce qui suggère que l'hydrogénation n'est pas stéréosélective, les centres asymétriques présents sur la molécule ne permettent pas de favoriser la formation d'un diastéréoisomère par rapport à l'autre.

Tableau 7 : Résultats obtenus des essais effectués pour l'hydrogénation de 63.

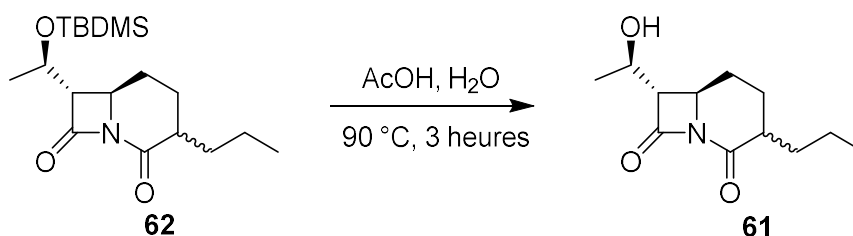


Essai	Quantité de 63 (mmol)	Rapport dia 1/ dia 2	Rendement
1	0,31	51/49	Quantitatif
2	1,98	44/56	Quantitatif

4.1.7 Déprotection de **62**

Un seul élément est manquant pour obtenir les bicycles désirés **57a** et **57b** : l'ester contenant un groupement phényle. Pour placer celui-ci sur **62**, il faut débiter par déprotéger l'alcool. Pour ce faire, le produit a été agité dans un mélange H₂O/AcOH (2,5 : 1) à 90 °C. La déprotection a été effectuée à température élevée, ce qui pourrait provoquer une épimérisation et donc une modification du rapport des diastéréoisomères obtenus lors de l'hydrogénation. Les essais 1 et 2 de la déprotection (**Tableau 8**) ont été effectués, respectivement, sur les produits des essais 1 et 2 de l'hydrogénation (voir **Tableau 7**). Dans les deux cas, une légère épimérisation est constatée, ce qui n'est pas étonnant vu les conditions de réaction.

Tableau 8 : Résultats obtenus pour les deux essais de déprotection de **62**.



Essai	Quantité de 62 (mmol)	Rapport dia 1/ Dia2	Rendement
1	0,20	40/60	91%
2	1,20	54/46	49%

4.1.8 Estérification de **61**

La dernière étape de cette voie de synthèse est l'estérification. Celle-ci est bien connue du laboratoire. Elle a été effectuée avec succès sur d'autres β-lactames par Marion Feledziak, Joséphine Caruano et Axel Morelle. Les conditions de réaction sont présentées au **Schéma 22**.

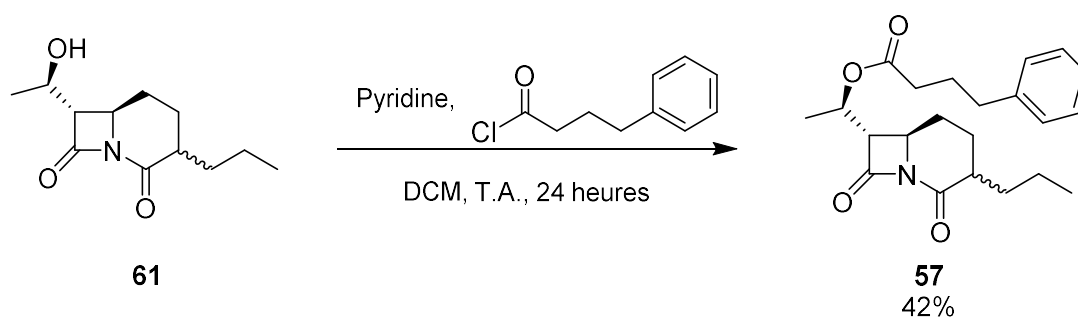


Schéma 22 : Conditions d'estérification de **62** pour obtenir les bicycles **57a** et **57b**.

L'estérification a été effectuée sur le produit résultant de l'essai 2 de la déprotection (voir **Tableau 8**). Le produit brut a montré la présence des deux diastéréoisomères et a permis de calculer le rapport diastéréoisomérique. Une première purification a été effectuée afin d'obtenir un mélange pur contenant uniquement les deux diastéréoisomères et d'éliminer le réactif de départ n'ayant pas réagi ainsi que tout autre impureté. Le rendement a alors été calculé (**Tableau 9**). Une nouvelle purification a ensuite été effectuée afin de séparer les deux diastéréoisomères. Celle-ci n'a pas été évidente car la polarité de ces deux derniers est proche. Une partie du produit a été perdue lors de cette purification mais une quantité suffisante de chaque diastéréoisomère a tout de même été récupérée afin de pouvoir effectuer les analyses RMN et les tests pharmacologiques (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Résultats obtenus pour l'estérification de 61.

Quantité de 61 utilisée pour la réaction	1,11 mmol
Rendement	42%
Rapport dias (dia 1/dia 2)	55/45
Quantité dia 1 récupérée	72 mg
Quantité dia 2 récupérée	45 mg

Les fractions récupérées pour chaque diastéréoisomère ont montré une bonne pureté et l'absence de l'autre diastéréoisomère par RMN ^1H . Les produits ont également été confirmés par HMRS. Cependant, il est impossible d'attribuer un spectre RMN ^1H au diastéréoisomère correspondant. En d'autres mots, il est impossible de savoir quelle fraction correspond à **57a** et laquelle correspond à **57b**. Les spectres RMN à deux dimensions suivants ont été réalisés : HMQC, HMBC, COSY et NOESY. Ceux-ci n'ont pas non plus permis d'attribuer les diastéréoisomères. Le problème principal vient de la complexité du spectre RMN ^1H . Plusieurs massifs de pics sont en effet observés, ce qui rend la détermination des constantes de couplage et de certaines corrélations en RMN à deux dimensions impossible.

Nous avons également tenté d'obtenir des monocristaux afin de pouvoir déterminer la structure de chaque produit par diffraction aux rayons X. Différents essais ont été réalisés en dissolvant chaque diastéréoisomère dans une quantité minimale de solvant pour ensuite laisser le solvant s'évaporer doucement. Plusieurs essais ont été effectués, sans succès, avec les solvants suivants : l'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle et le DCM.

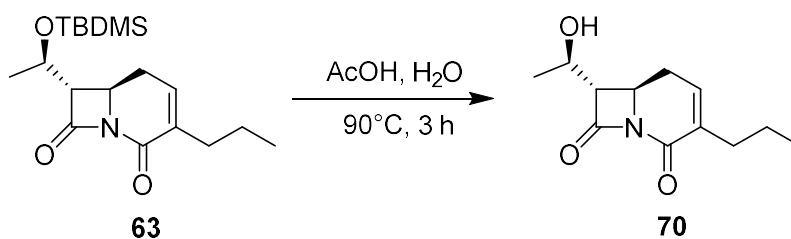


Schéma 24 : Conditions et rendement obtenu pour la déprotection de 63.

La réaction a été réalisée une seule fois et aucun problème n'a été rencontré. Un rendement supérieur à 100% a été obtenu ; le mélange brut contenant encore des traces d'acide acétique, difficile à évaporer. Du cyclohexane a été ajouté pour favoriser l'évaporation d'acide acétique. En effet, ces deux solvants forment un azéotrope (97/3 cyclohexane/AcOH) dont la température d'ébullition vaut 79,7 °C. Malgré cela, des traces d'acide acétique ont persisté. Cependant, le produit brut a tout de même été engagé dans la réaction suivante sans purification. Le produit a été confirmé par RMN et par HMRS (voir section 6.4.1).

4.2.2 Estérification de 70

Tout comme pour la réaction précédente, les conditions d'estérification sont basées sur celles utilisées avec succès pour la synthèse de 57 (voir section 4.1.8) (Schéma 25).

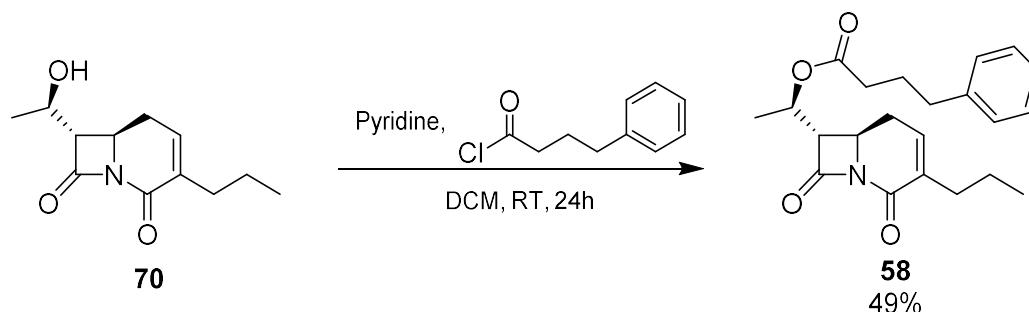


Schéma 25 : Conditions d'estérification de 70.

Cette étape a été effectuée avec succès avec un rendement de 49%. Une purification par chromatographie sur silice flash (Hexane/EtOAc 60 : 40) a été nécessaire afin d'éliminer les réactifs de départ n'ayant pas réagi. Le produit a été confirmé par RMN et HMRS (voir 6.4.2).

Le rendement global de la synthèse de 58, à partir de 41, est de 24%.

4.3 Synthèse de **49** à partir du *lead*

Afin de confirmer que l'insaturation présente sur la chaîne latérale du *lead* n'est pas indispensable, une hydrogénation est effectuée sur celui-ci afin d'obtenir son équivalent sans l'insaturation (**49**). Cela va permettre de comparer l'activité de ces deux composés afin d'être fixés. Cette analyse a déjà été effectuée par Joséphine Caruano (voir section 2.2.6). Cependant, il est intéressant d'effectuer à nouveau les tests pharmacologiques sur ces deux composés afin que leur activité soit mesurée dans les mêmes conditions que tous les autres bicycles. De plus, vu qu'un stock de *lead* est disponible au laboratoire, une seule étape d'hydrogénation a été nécessaire pour obtenir **49**. Les conditions d'hydrogénation sont similaires à celles de réduction de **63** (voir section 4.1.6). La réaction a été effectuée avec succès avec une conversion totale du réactif de départ (**Schéma 26**).

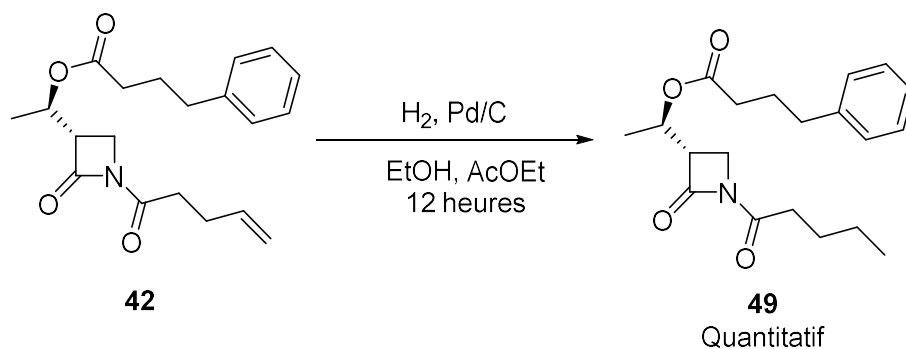


Schéma 26 : Conditions d'hydrogénation de **42**.

4.4 Synthèse des bicycles **59** et **60**

La synthèse des bicycles **59** et **60** est intéressante car elle permet d'obtenir deux bicycles dont la chaîne latérale se trouve en position β du carbonyle. Par conséquent, une comparaison de l'activité pourra être effectuée par rapport aux bicycles dont la chaîne latérale est en position α du carbonyle (**57a** et **57b**). Deux diastéréoisomères (**59a**, **59b**) peuvent être obtenus à partir de **73**. Ensuite, chaque diastéréoisomère peut être réduit pour obtenir **60a** et **60b** (**Schéma 27**).

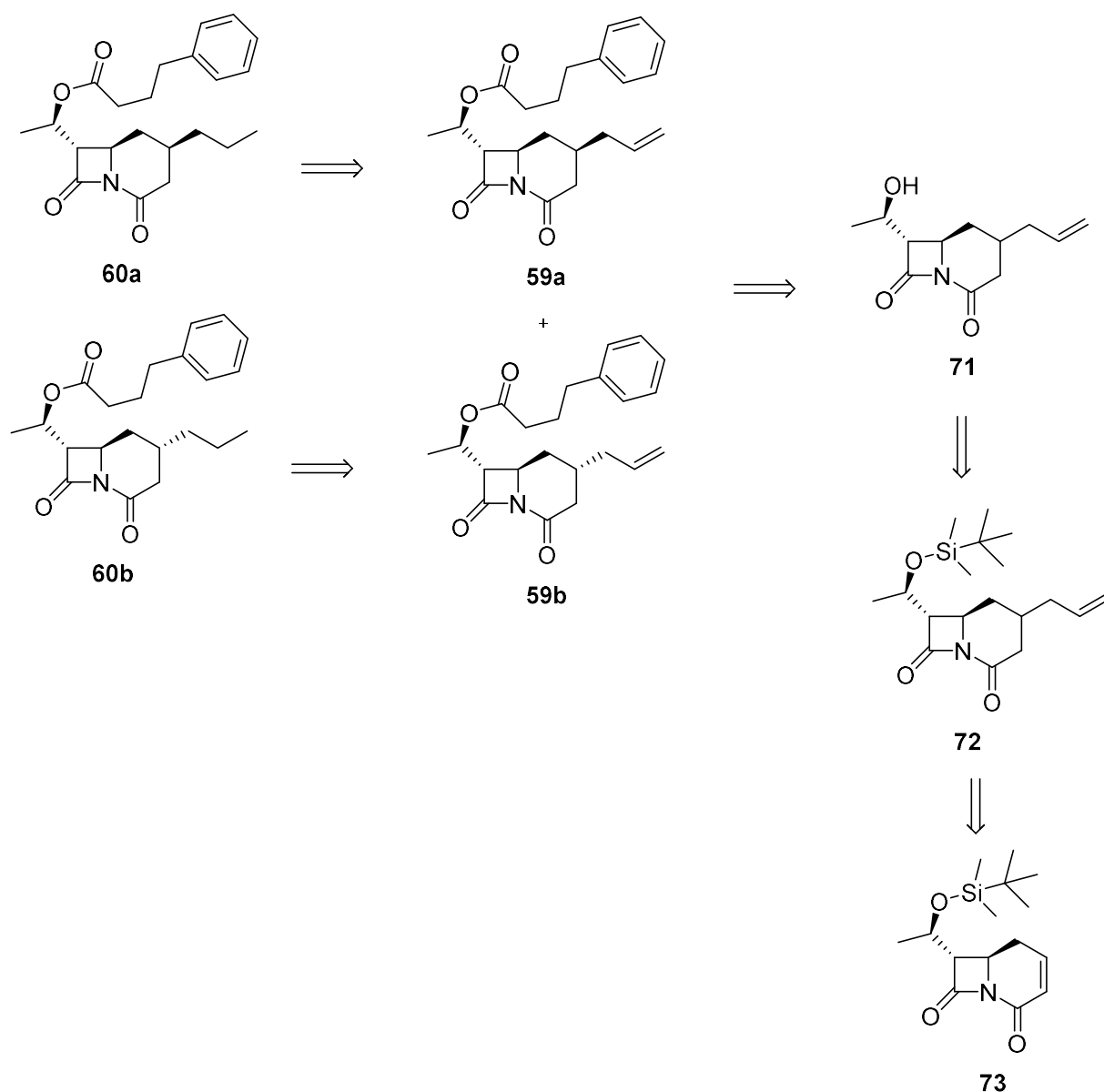
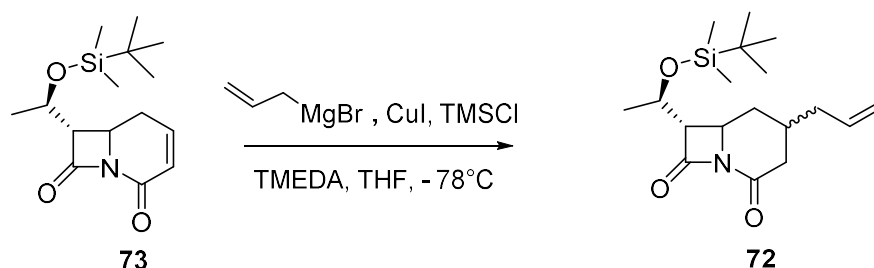


Schéma 27 : Voie rétrosynthétique des bicycles **59a**, **59b**, **60a** et **60b**.

La stratégie de synthèse de ces quatre composés consiste en la synthèse de **59** à partir de **73** via une addition-1,4 suivie d'une déprotection et d'une estérification. Du stock de **73**, synthétisé par Axel Morelle, est encore disponible au laboratoire. Ensuite, une simple hydrogénation permet d'obtenir **60** à partir de **59**. L'idéal serait d'obtenir un mélange racémique pour **59** afin de pouvoir comparer l'activité en fonction de la stéréochimie et d'obtenir en tout 4 produits (**59a**, **59b**, **60a** et **60b**) (Schéma 27).

L'estérification et la déprotection sont déjà bien connues. L'étape délicate est l'addition conjuguée. Les conditions utilisées sont inspirées de la publication de Finn *et al.*^[75]. Deux essais ont été effectués avec ces conditions en adaptant la durée de réaction et la température (**Tableau 10**). Finn *et al.* ne présentaient pas de durée de réaction. Le premier essai a été effectué en laissant la réaction sous agitation durant 2 heures. Aucun produit n'a été formé, le réactif de départ a été entièrement récupéré (**Tableau 10**). Ceci signifie que l'organocuprate formé avec le grignard n'était pas assez réactif. Une certitude est dégagée de cet essai : le sel de cuivre a bien réagi avec le grignard, car si ce n'était pas le cas, ce dernier étant très réactif aurait réagi sur un des carbonyles de **72**. Le problème venait donc du manque de réactivité de l'intermédiaire formé. Un deuxième essai a été effectué en laissant le milieu réactionnel revenir à température ambiante lentement. La réaction a été maintenue durant 24 heures. A nouveau, le réactif de départ a été entièrement récupéré, ce qui signifie que l'augmentation de la température de réaction et de la durée de réaction n'ont pas permis d'augmenter suffisamment la réactivité (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Conditions de réaction utilisées pour l'addition conjuguée sur **55**.



Essais	Quantité de 73 (mmol)	Durée de réaction	Température (°C)	Résultat
1	0,3388	2 heures	-78 °C	Réactif de départ récupéré
2	0,2710	24 heures	-78 °C → T.A.	Réactif de départ récupéré

Le mécanisme réactionnel débute par une transmetallation afin d'obtenir un organocuprate et de rendre le réactif plus « mou » pour favoriser l'addition conjuguée 1,4. L'ion magnésium est alors piégé par le tétraméthyléthylènediamine (TMEDA). Le complexe de cuivre (étage d'oxydation I) va ensuite pouvoir effectuer une addition oxydante afin de s'additionner en β du carbonyle et de former un intermédiaire de cuivre d'étage d'oxydation III. Le chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) permet alors de stabiliser l'énolate et d'augmenter la réactivité. Une élimination réductrice permet ensuite l'alkylation. Enfin, un work-up en

milieu acide permet de libérer l'énolate et de reformer le carbonyle afin d'obtenir le produit désiré **62** (Schéma 28).

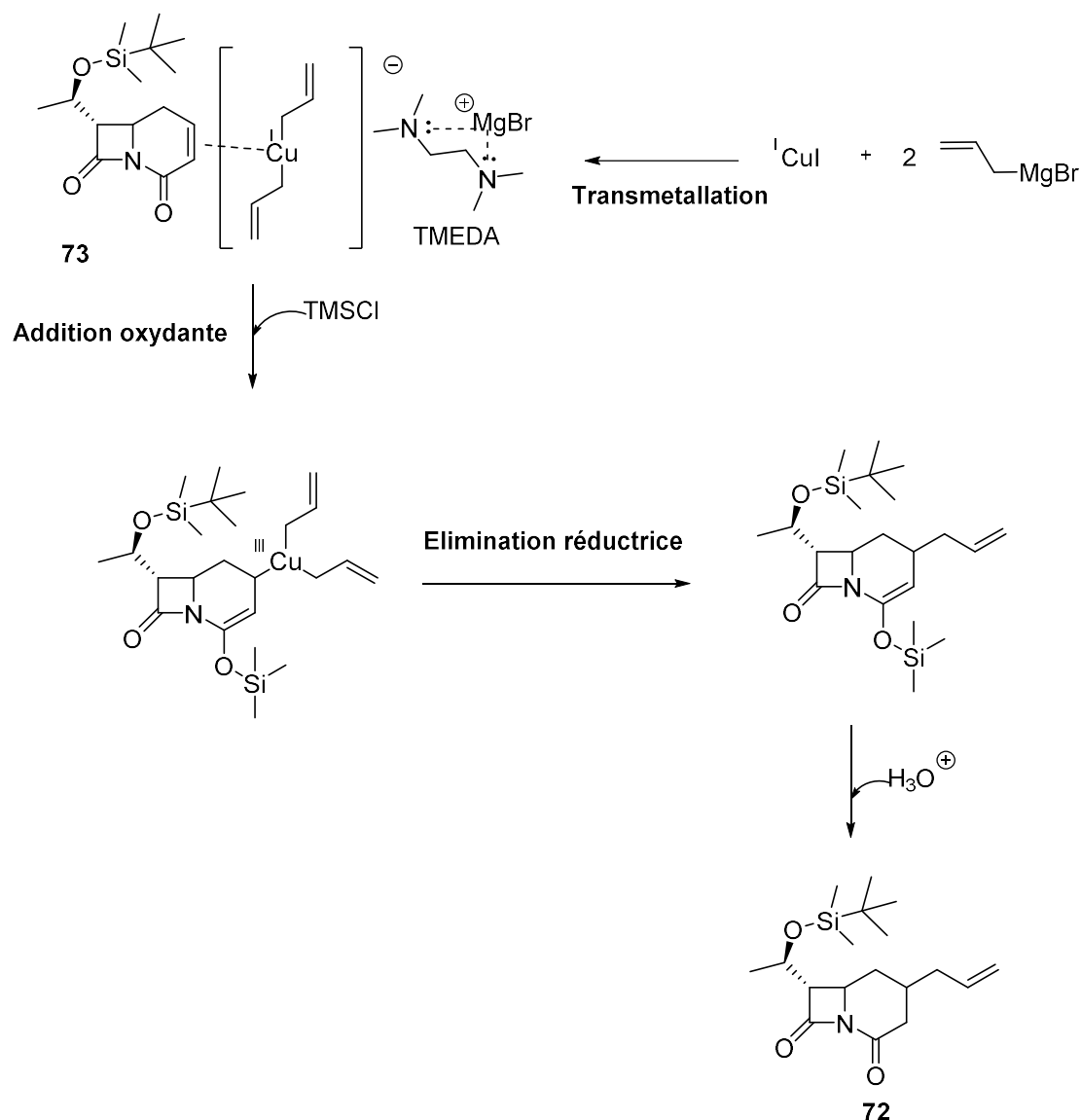


Schéma 28 : Mécanisme d'addition conjuguée utilisant un organocuprate.

Deux autres méthodes sont alors envisagées pour permettre de réaliser cette étape. Celles-ci ne pourront malheureusement pas être réalisées, par manque de temps, à cause du confinement engendré par la pandémie COVID-19. La première méthode est basée sur la publication de Rodríguez-Fernández *et al.*^[76] et décrite au Schéma 29. Cette méthode est intéressante car elle permet d'obtenir un mélange racémique, ce qui nous permettrait d'obtenir les deux diastéréoisomères et d'ensuite réduire ceux-ci.

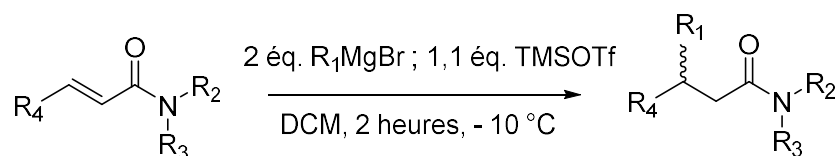


Schéma 29 : Première méthode envisagée pour l'addition 1,4.

Le triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) est un acide de Lewis permettant de complexer l'oxygène du carbonyle et d'empêcher l'addition 1,2 du grignard sur celui-ci. Dans notre cas, **72** contient 2 carbonyles, ce qui suggérerait l'utilisation de minimum 2 équivalents de TMSOTf. Ce dernier pourrait également être remplacé par $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ afin de tester l'influence de la nature de l'acide de Lewis (**Schéma 30**).

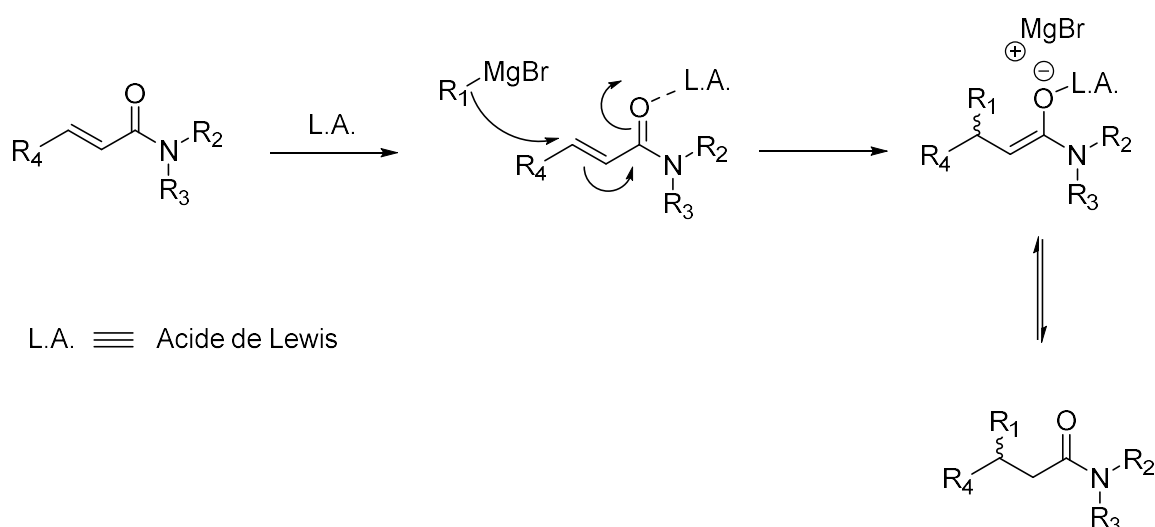


Schéma 30 : Mécanisme de réaction de la première méthode envisagée pour l'addition 1,4.

Dans le cas où cette méthode ne serait pas efficace sur notre substrat, une autre méthode, également basée sur la publication de Rodríguez-Fernández *et al.* pourrait être envisagée.^[76] Celle-ci est relativement similaire à la première, à l'exception de l'utilisation d'un catalyseur de cuivre, possédant un ligand non-chiral afin d'obtenir un mélange racémique, pour cibler l'addition-1,4 (**Schéma 31**).

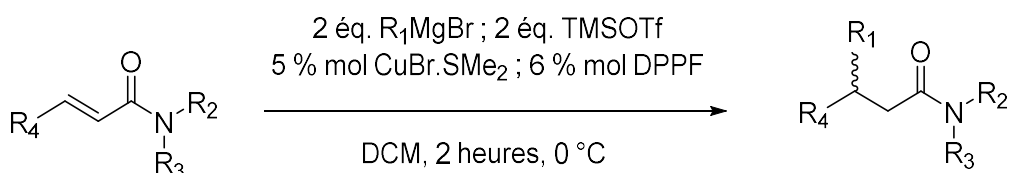


Schéma 31 : Deuxième méthode envisagée pour l'addition conjuguée 1,4.

Le cycle catalytique de cette réaction est représenté au **Schéma 32**. Tout d'abord, l'acide de Lewis permet de complexer l'amide. Ensuite, une addition oxydante permet l'addition du cuivre et la formation d'un éther d'énol silylé. Enfin, une élimination réductrice permet d'obtenir le produit désiré après work-up.^[76]

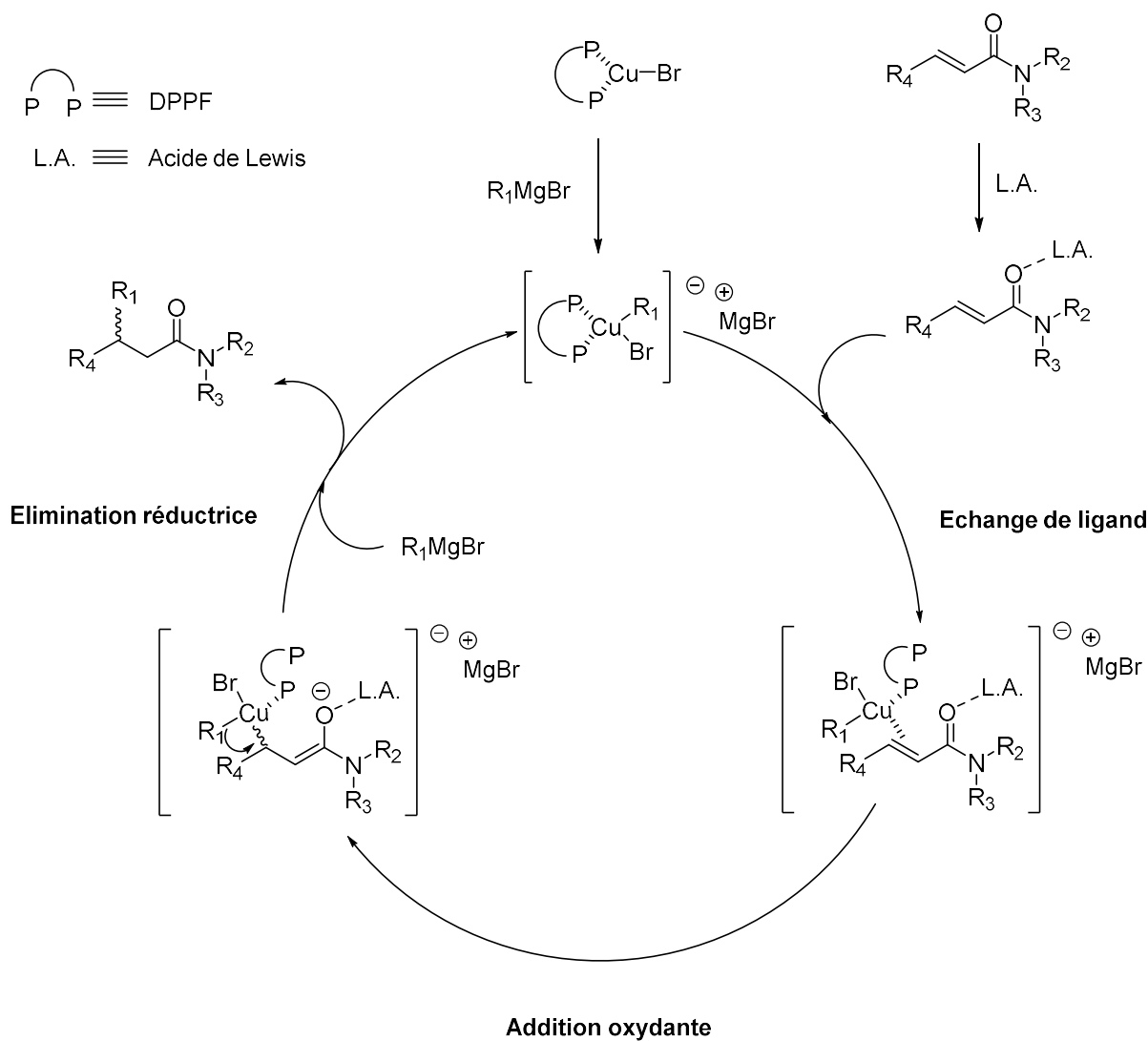


Schéma 32 : Cycle catalytique de l'addition 1,4 catalysée par un catalyseur au cuivre.

4.6 Tests pharmacologiques

Des tests pharmacologiques, par Liquid Scintillation Counting (LSC), devaient être effectués sur tous les produits finaux synthétisés (**49**, **57a**, **57b**, **58**) ainsi que sur tous les intermédiaires bicycliques obtenus (**61**, **62**, **63**, **70**) et, pour comparaison, sur le *lead*. Ces tests étaient programmés pour le mois d'avril. Cependant, le confinement engendré par la pandémie du COVID-19 a empêché la réalisation de ceux-ci. Il n'est donc pas possible de comparer l'activité de tous ces composés afin de savoir si le *lead* a pu être optimisé. De fait, il nous est également impossible d'obtenir des informations concernant l'importance de l'orientation dans l'espace de la chaîne latérale ou encore de la position de celle-ci (en α ou en β du carbonyle). L'importance de l'insaturation ne pourra pas non plus être discutée dans le cadre de ce mémoire.

5 Conclusions et perspectives

5.1 Conclusions

Le but principal de ce projet était l'optimisation de l'activité inhibitrice du *lead* en s'inspirant des conclusions issues des études de docking. Celles-ci montraient l'importance de la conformation *s-cis* des carbonyles de l'imide présents sur le *lead*. Notre stratégie a donc consisté en la synthèse d'un bicyclic afin de bloquer la rotation N-C et de forcer la configuration *s-cis* des deux carbonyles, qui est défavorable thermodynamiquement par rapport à la conformation *s-trans*. Le composé **54** a été dans un premier temps visé par Axel Morelle. Cependant, la synthèse de celui-ci n'a pas pu être réalisée, car il fut impossible d'insérer la chaîne latérale. Une voie de synthèse alternative a alors été envisagée afin de synthétiser **57**, dont l'insaturation présente sur la chaîne latérale de **42** et de **54** est manquante.

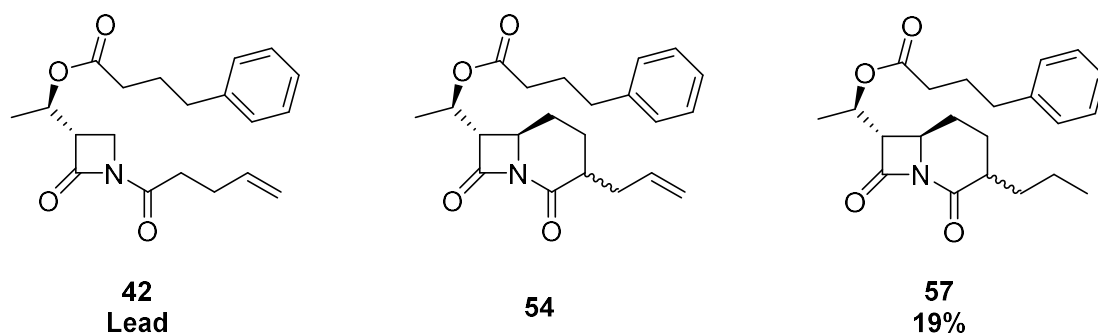


Figure 31 : Structures des composés **42**, **54** et **57**.

La synthèse de **57** a été réalisée avec succès avec un rendement global de 19%. Nous avons obtenu respectivement 72 mg et 45 mg des diastéréoisomères 1 et 2 purifiés. Il a donc été possible d'obtenir un bicyclic possédant la chaîne latérale. L'autre avantage est l'obtention d'un mélange racémique (rapport diast 55/45), ce qui va permettre de tester l'activité des deux diastéréoisomères. Cependant, il nous est toujours impossible d'identifier et d'attribuer les deux fractions récupérées avec le diastéréoisomère correspondant. L'étape la plus délicate dans la synthèse de **57** fut la *N*-acylation. L'optimisation de celle-ci a pu être réalisée grâce à une modification des conditions de réaction. L'ajout du chlorure d'acyle a été réalisé en deux fois et celui-ci a été additionné *in situ* afin d'éviter sa dégradation lors du work-up.

Ensuite, la synthèse des composés **49**, **58**, **59** et **60** a été envisagée pour une étude de relation structure/activité. Le composé **49** permet de vérifier l'importance de l'insaturation sur

la chaîne latérale en comparant son activité inhibitrice à celle du *lead*. Cette étude a déjà été faite par Joséphine Caruano mais il serait intéressant de refaire ces tests pharmacologiques en même temps que tous les autres tests pour que ceux-ci soient réalisés exactement dans les mêmes conditions. De plus, la synthèse de **49** fut aisée vu qu'il restait du *lead* en stock au laboratoire et qu'une simple hydrogénation a permis de synthétiser **49** à partir de **42** avec un rendement de 99%. Nous avons obtenu 31 mg de **49** purifié.

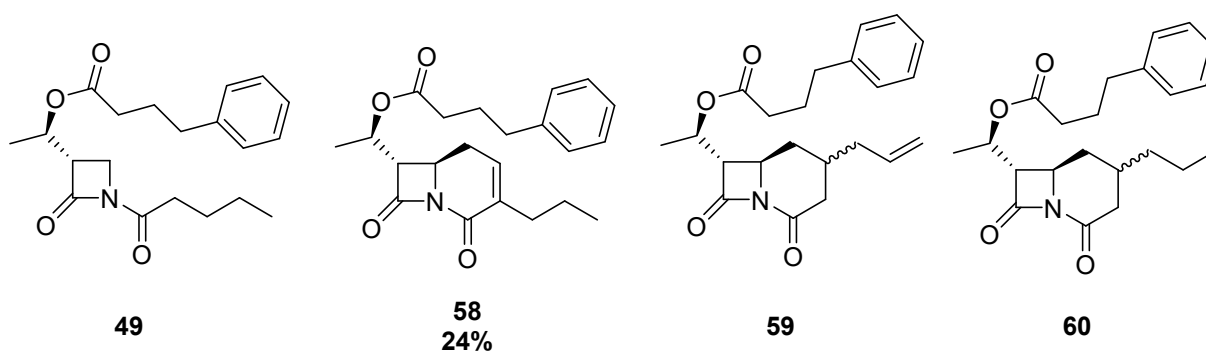


Figure 32 : Structures des composés **49**, **58**, **59** et **60**.

La comparaison des activités des deux diastéréoisomères de **57** (**57a** et **57b**) et de **58** permet de mesurer l'importance de l'orientation dans l'espace de la chaîne latérale. Le composé **58** a été synthétisé avec succès avec un rendement global de 24%. Nous avons obtenu 215 mg de **58** purifié.

Les composés **59** et **60** ont, quant à eux, pour but d'investiguer la relation entre la position de la chaîne latérale (en α ou en β du carbonyle) et l'activité inhibitrice résultante. Cependant, la synthèse de ces composés n'a pas pu être réalisée. En effet l'étape d'insertion de la chaîne latérale a posé un problème. Lors des deux tentatives effectuées, via une addition conjuguée 1,4 d'un organocuprate, le réactif de départ a été récupéré. Or, il paraît peu probable que le réactif de grignard ne réagisse pas du tout sur **73** qui possède deux fonctions carbonyles. Cela nous laisse penser que l'intermédiaire organocuprate a bien été formé entre le réactif de grignard et le sel de cuivre mais que cet intermédiaire est trop stable et ne réagit pas avec **73**. Une augmentation de la température et de la durée de réaction n'a pas permis d'augmenter la réactivité.

Malheureusement, il nous est impossible de commenter les relations structure-activité mentionnées ci-dessus car les tests pharmacologiques n'ont pas pu être réalisés en raison du confinement engendré par la pandémie de COVID-19.

5.2 Perspectives

5.2.1 Tests pharmacologiques

Tout d'abord, les tests pharmacologiques, par Liquid Scintillation Counting (LSC), seront effectués sur les composés **49**, **57a**, **57b** et **58** ainsi que sur tous les intermédiaires bicycliques obtenus lors de ces synthèses. Cela permettra également de vérifier si la synthèse de bicycles pour bloquer la rotation N-C et forcer les carbonyles à être dans la conformation *syn* aura permis d'améliorer l'activité du *lead*. Cela va également permettre d'effectuer toutes les relations structure-activité décrites dans la section 5.1. afin d'orienter éventuellement la synthèse de nouveaux composés.

5.2.2 Attribution des diastéréoisomère de **57**

Deux diastéréoisomères sont obtenus lors de la synthèse de **57**. Cependant, l'attribution de chacun n'a pas encore pu être réalisée. Il serait donc intéressant de trouver une méthode de cristallisation d'un des deux diastéréoisomères au moins afin de les identifier par diffraction aux rayons X. Différentes cristallisations ont déjà été testées sans succès. Il serait donc opportun de rééditer ces tentatives dans de nouveaux solvants ou mélanges de solvants car connaître la structure d'un principe actif est indispensable en chimie médicinale. Les tentatives consistent à dissoudre **57** dans une quantité minimale de solvant et d'ensuite laisser celui-ci s'évaporer doucement pour favoriser la cristallisation. Des tentatives peuvent également être effectuées dans des solvants dans lesquels **57** est très peu soluble. Dans ces cas-là, il faudrait favoriser la dissolution en chauffant légèrement, pour ensuite laisser le mélange refroidir doucement et en laissant le solvant s'évaporer.

5.2.3 Synthèse des bicycles **59** et **60**

L'insertion de la chaîne latérale sur le composé **73** via une réaction utilisant un organocuprate n'a pas pu être réalisée. Deux méthodes, inspirées de la publication de Rodríguez-Fernández *et al.*^[76], seront envisagées dans le futur pour débloquer cette étape et permettre la synthèse des composés **59** et **60** car toutes les autres étapes ont déjà été décrites et réalisées avec succès pour la synthèse des composés **57** et **58**.

La première méthode consiste à insérer un réactif de grignard en protégeant les fonctions carbonyles grâce à des acides de Lewis afin de favoriser l'addition-1,4 (Schéma 33).

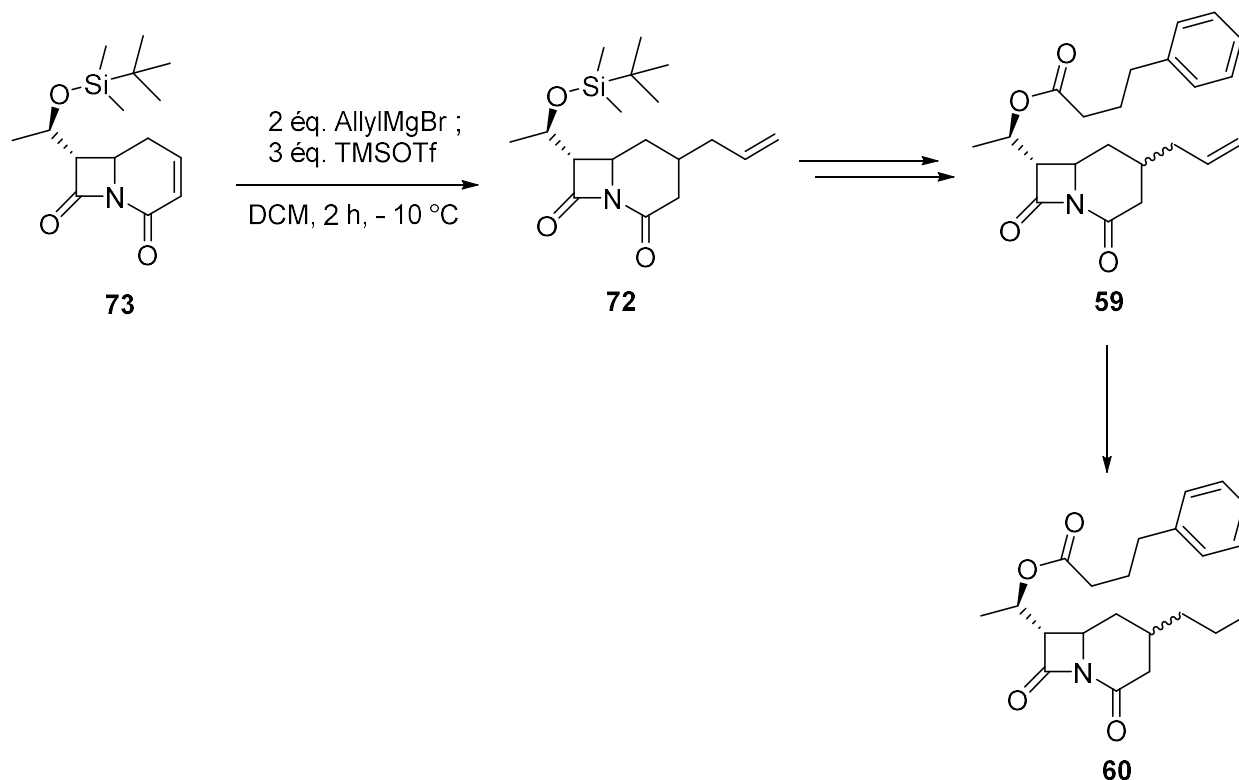


Schéma 33 : Première méthode de synthèse du composé 72 à partir du composé 73.

La deuxième possibilité consiste en une synthèse similaire, catalysée par un complexe de cuivre afin de favoriser l'addition 1,4, en utilisant un ligand non-chiral afin d'obtenir un mélange racémique dans le but d'obtenir ultérieurement **59a**, **59b**, **60a** et **60b** (Schéma 34).

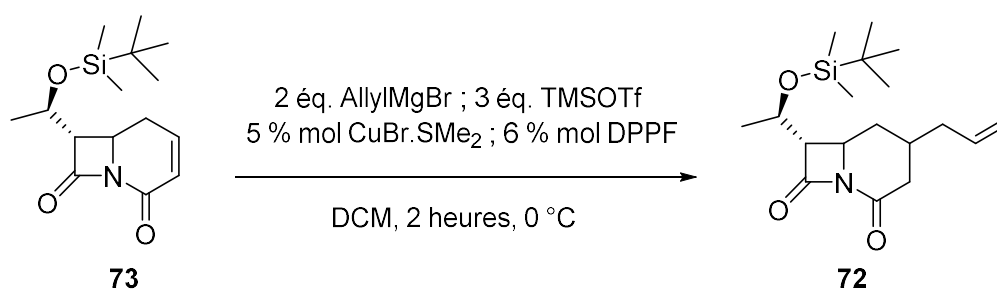


Schéma 34 : Deuxième méthode de synthèse de 72 à partir de 73 en utilisant un complexe de cuivre comme catalyseur.

5.2.4 Autres perspectives

Il serait intéressant de synthétiser des inhibiteurs de type γ -lactames ainsi que δ -lactames, possédant les différents substituants essentiels à l'interaction avec la FAAH, pour comparer leur activité inhibitrice avec celle de la molécule lead des inhibiteurs de type β -lactames.

Il pourrait également être intéressant de synthétiser le diastéréoisomère (S,S) du *lead* (**75**, **Figure 33**) afin de vérifier l'importance de la stéréochimie du carbone portant le groupement phénylbutanolate. En effet, les études de *docking* ont montré l'importance du groupement méthyle dans l'interaction avec la FAAH. Une inversion de la stéréochimie du carbone portant ce groupement méthyle permettrait donc de modifier la position de celui-ci, ce qui permettrait d'observer une éventuelle modification de l'activité inhibitrice résultante.

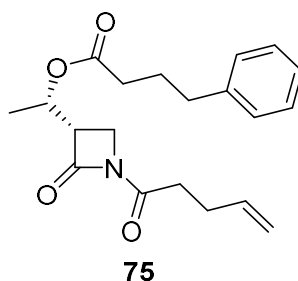


Figure 33 : Structure du diastéréoisomère (S,S) du *lead*.

6 Partie expérimentale

6.1 Appareillages

6.1.1 Analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La majorité des analyses effectuées par résonance magnétique nucléaire ont été réalisées à l'aide d'un Bruker avance II 300 équipé d'une sonde BBFO 5 mm gradients-Z, à 300 MHz pour les spectres ^1H et à 75MHz pour les spectres ^{13}C . Certaines analyses nécessitant une meilleure résolution ont été effectuées à l'aide d'un Bruker avance 500 équipé d'une sonde BBFO 5mm gradients-Z, à 500 MHz pour les spectres ^1H et à 126 MHz pour les spectres ^{13}C .

Les déplacements chimiques des spectres obtenus sont calibrés à l'aide d'une référence interne : le chloroforme pour les spectres ^1H ($\delta = 7,256$ ppm) et le chloroforme deutérié pour les spectres ^{13}C ($\delta = 77,16$ ppm).

Les spectres RMN à deux dimensions suivants ont effectués, quand cela a été nécessaire, afin de permettre l'attribution de chaque signal : HMQC (RMN ^1H - ^{13}C , couplages J^2), HMBC (RMN ^1H - ^{13}C , couplages J^3 - J^4), COSY (RMN ^1H - ^1H , couplages J^2), NOESY (RMN ^1H - ^1H , proximité spatiale).

6.1.2 Analyses par spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse (MS) et la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ont été effectuées par Raoul Rozenberg (plateforme ASM) à l'aide d'un spectromètre Thermo Fisher Q Exactive. Les masses sont exprimées en Dalton. Deux modes d'ionisation sont utilisés en MS et en HRMS : l'Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) et l'ElectroSpray Ionization (ESI).

6.1.3 Analyses par spectroscopie infra-rouge et mesures de points de fusion

Ces analyses avaient été programmées pour la fin de notre travail expérimental. Malheureusement, la crise du covid-19 et le confinement qui en a résulté nous ont empêché de réaliser ces analyses.

6.2 Techniques

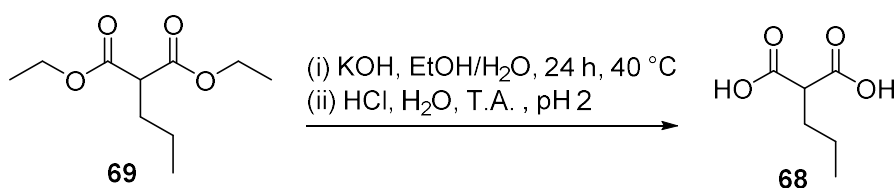
Les réactions demandant des conditions anhydres ont été effectuées sous atmosphère d'argon, dans de la verrerie flambée et séchée sous pression réduite. Les solvants utilisés pour ces réactions sont de qualité anhydre certifiée par nos fournisseurs.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur gel de silice MERCK 60 F254 sur un support en aluminium. Deux révélateurs sont utilisés : une lampe UV-vis et un révélateur au KMnO_4 .

Les étapes de purification ont été réalisées sur des colonnes de silice flash (40-60 mesh) à l'aide d'hexane et d'acétate d'éthyle de qualité HPLC.

6.3 Synthèse des bicycles 57a et 57b

6.3.1 Saponification du *n*-propylmalonate de diéthyle (69)



Référence : C. F. Riber, A. H. F. Andersen, L. A. Rolskov, K. Zuwała, P. Gajda, K. B. Løvschall, F. Dagnæs-Hansen, D. H. Banda, T. Pietschmann, M. Tolstrup, A. N. Zelikin, *ACS Macro Letters*, **2017**, 6, 935-940.

Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (g)	V (ml)
<i>n</i> -propylmalonate de diéthyle (69)	202,25	0,987	1,0	24,40	4,935	5
KOH (85%)	56,11	-	3,5	85,40	5,637	-
EtOH	-	-	-	-	-	70
H ₂ O	-	-	-	-	-	30

Mode opératoire

Le n-propylmalonate de diéthyle (**69**) est ajouté dans un ballon de 250 ml contenant une solution de KOH dans un mélange eau/éthanol (30/70). Le mélange réactionnel est agité durant 24 heures à 40 °C. Celui-ci est alors concentré sous pression réduite et redissout avec un minimum d'eau. La solution aqueuse est acidifiée goutte à goutte à l'aide d'HCl concentré jusqu'à atteindre un pH d'environ 2. Cette solution aqueuse est extraite six fois au diéthyl ether (1 x 50 ml suivi de 5 x 20 ml). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit est finalement lavé à l'hexane afin d'éliminer toute trace du réactif de départ et obtenir le produit pur ayant l'aspect d'une poudre blanche.

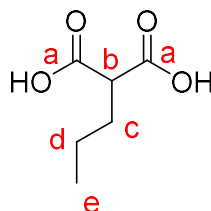
Nom IUPAC : acide 2-propylmalonique

Formule brute : C₆H₁₀O₄

Rendement : 97%

Masse molaire : 146,06 g/mol

Aspect : poudre blanche

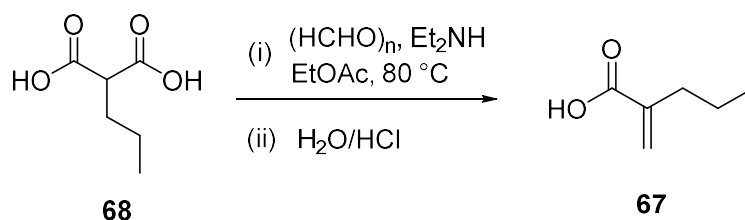


RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3,46 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, **b**), 2,04 – 1,85 (m, 2H, **c**), 1,53 – 1,32 (m, 2H, **d**), 0,96 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, **e**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 174,4 (**a**), 51,1 (**b**), 31,0 (**c**), 20,6 (**d**), 13,7 (**e**).

ESI-HRMS *m/z* calculé pour [M-H]⁻ (C₆H₉O₄) : 145,04954 ; expérimental : 145,04948 ; Δ ppm = -0,35.

6.3.2 Synthèse de l'acide 2-propylacrylique (**68**)



Référence : L. Wu, F. Wang, P. Chen, G. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 1887-1892.

Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (g)	V (ml)
Acide malonique (68)	146,06	-	1,0	21,33	3,120	-
Et ₂ NH	73,14	0,71	1,5	32,00	2,340	3,31
Paraformaldéhyde	30,03	0,88	2,0	42,66	1,280	1,46
EtOAc	-	-	-	-	-	150,00

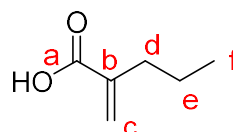
Mode opératoire

La diéthylamine est ajoutée goutte à goutte à une solution d'acide 2-propylmalonique (68) diluée dans l'acétate d'éthyle. Le paraformaldéhyde solide est ensuite additionné. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux pendant 4 heures. La réaction est stoppée par ajout d'eau et le mélange réactionnel est ajusté à un pH de 1 à l'aide d'HCl concentré. Le mélange réactionnel est extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite.

Nom IUPAC : acide 2-méthylènepropanoïque

Formule brute : C₆H₁₀O₂

Rendement : 94%



Masse molaire : 114,07 g/mol

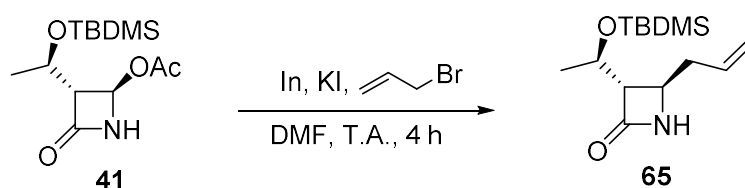
Aspect : huile incolore

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6,29 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, **c**), 5,64 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, **c**), 2,28 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H, **d**), 1,67 – 1,37 (m, 2H, **e**), 0,93 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, **f**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173,0 (**a**), 140,1 (**b**), 127,2 (**c**), 33,7 (**d**), 21,7 (**e**), 13,8 (**f**).

ESI-HMRS *m/z* calculé [M-H]⁻ (C₆H₉O₂) : 113,05971 ; expérimental : 113,05967, Δ ppm = -0,34.

6.3.3 Alkylation de **41**



Référence : S.-K. Kang, T.-G. Baik, X.-H. Jiao, K.-J. Lee, C. H. Lee, *Synlett*, **1999**, 4, 447-449.

Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (g)	V (ml)
41	287,43	-	1,0	10,44	3,000	-
Indium	114,81	-	2,0	20,88	2,400	-
KI	166,00	-	3,0	31,32	5,200	-
Bromure d'allyle	120,98	1,40	3,0	31,32	3,790	2,70
DMF anhydre	-	-	-	-	-	100,00

Mode opératoire

Le KI, l'indium et le DMF suivi du bromure d'allyle sont mélangés dans un ballon tricol. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 heure. **41** est ensuite ajoutée et le milieu est agité pendant 4 heures. Le mélange réactionnel est alors dilué avec du diéthyléther. Le mélange est lavé avec du NH₄Cl saturé puis lavé 2 fois avec de la saumure. La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le produit est ainsi obtenu avec un très bonne pureté, aucune purification supplémentaire n'est nécessaire.

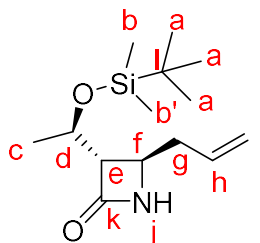
Nom IUPAC : (3S,4R)-4-allyl-3-((R)-1-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)azétidin-2-one

Formule brute : C₁₄H₂₇NO₂Si

Rendement : 88%

Masse molaire : 269,18 g/mol

Aspect : poudre blanche

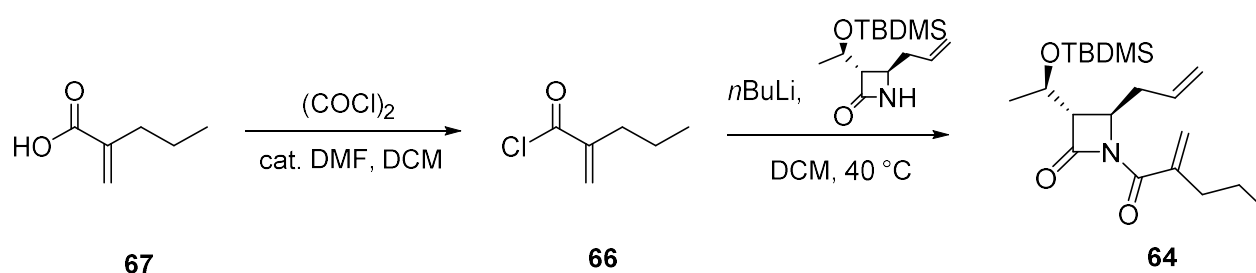


RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5,86 – 5,78 (bs, 1H, **j**), 5,78 – 5,70 (m, 1H, **h**), 5,19 – 5,11 (m, 1H, **i**), 5,09 (m, 1H, **i**), 4,17 (qd, *J* = 6,2, 4,8 Hz, 1H, **d**), 3,70 (m, 1H, **f**), 2,77 (m, 1H, **e**), 2,55 – 2,23 (m, 2H, **g**), 1,20 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H, **c**), 0,87 (s, 9H, **a**), 0,07 (2 s, 6H, **b** + **b'**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 168,6 (**k**), 133,9 (**h**), 118,2 (**i**), 65,6 (**d**), 63,9 (**e**), 50,3 (**f**), 39,6 (**g**), 25,9 (**b**), 22,9 (**c**), 18,1 (**l**), -4,1 (**b**), -4,9 (**b'**).

ESI-HRMS *m/z* calculé pour [M+Na]⁺ (C₁₄H₂₇NO₂SiNa): 292.17033 ; expérimental : 292,17014 ; Δ ppm = -0,64.

6.3.4 N-acylation de **65**



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (g)	V (ml)
Acide 2-propylacrylique (67)	114,07	0,97	3,0	3,34	0,38	0,39
Chlorure d'oxalyle	126,93	1,48	3,0	3,34	0,42	0,29
DMF anhydre	-	-	-	-	-	2 gouttes
DCM anhydre	-	-	-	-	-	30,00
65	269,18	-	1,0	1,11	0,30	-
<i>n</i> BuLi (2,5 M)	-	-	1,2	1,34	-	0,53

Mode opératoire

Le chlorure d'oxalyle est ajouté goutte à goutte, à 0 °C, sous atmosphère inerte, dans un ballon tricol contenant une solution d'acide 2-propylacrylique (**67**) dans 15 ml dichlorométhane anhydre. Cette addition est suivie directement par l'ajout de quantité catalytique de DMF. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à la fin du dégagement gazeux (environ 2 heures). Pendant ce temps, un ballon tricol est flambé et séché sous pression réduite. **65** y est mis en solution dans 15 ml de dichlorométhane anhydre et placé dans un bain de glace. Le nBuLi est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation durant 30 minutes. La solution de chlorure d'acyle est alors ajoutée goutte à goutte à 0 °C. Le milieu réactionnel est ensuite agité à reflux pendant la nuit. L'avancement de la réaction est contrôlé par CCM. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est lavé avec du NH₄Cl saturé puis 3 fois avec de la saumure avant d'être séché sur MgSO₄ et filtré. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur silice flash (Hexane/EtOAc 95 : 5).

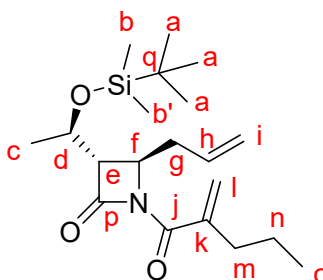
Nom IUPAC : (3S,4R)-4-allyl-3-((R)-1-((tert-butyldiméthylsilyloxy)éthyl)-1-(2-méthylène-pentanoyl)azétidin-2-one

Formule brute : C₂₀H₃₅NO₃Si

Rendement : 67%

Masse molaire : 365,24 g/mol

Aspect : Huile incolore

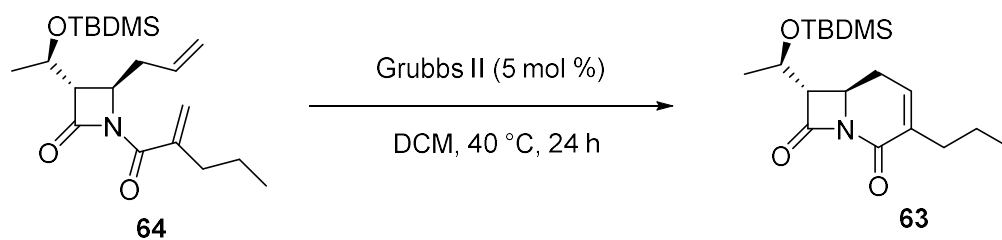


RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5,91 (s, 1H, **l**), 5,84 – 5,69 (m, 1H, **h**), 5,67 (s, 1H, **l**), 5,19 – 5,14 (m, 1H, **i**), 5,12 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, **i**), 4,27 (m, 2H, **d + f**), 2,88 (t, *J* = 3,4 Hz, 1H, **m**), 2,82 – 2,66 (m, 1H, **e**), 2,56 – 2,04 (m, 3H, **g + m**), 1,55 – 1,40 (m, 2H, **n**), 1,16 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, **c**), 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, **o**), 0,81 (s, 9H, **a**), 0,04 (s, 3H, **b**), 0,00 (s, 3H, **b'**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167,5 (**p**), 165,3 (**j**), 143,0 (**k**), 132,6 (**h**), 124,2 (**l**), 119,3 (**i**), 63,0 (**d**), 60,4 (**m**), 51,2 (**f**), 36,4 (**e**), 34,4 (**g**), 25,8 (**a**), 22,6 (**c**), 21,3 (**n**), 17,9 (**q**), 13,8 (**o**), -4,1 (**b**), -5,0 (**b'**).

ESI-HMRS *m/z* calculé pour [M+H]⁺ (C₂₀H₃₆NO₃Si) : 366,24590 ; expérimental : 366,24591, Δ ppm = 0,04.

6.3.5 Métathèse cyclisante de **64**



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
64	365,24	-	1,0	0,5859	214,0	-
Grubbs II	848,97	-	0,05	0,02929	24,9	-
DCM anhydre	-	-	-	-	-	50

Mode opératoire

Le catalyseur de Grubbs et **64** sont mis en solution dans le DCM anhydre. La solution est agitée à reflux (40 °C) pendant 24 heures. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Le DCM est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur silice flash (Hexane/EtOAc 80 : 20).

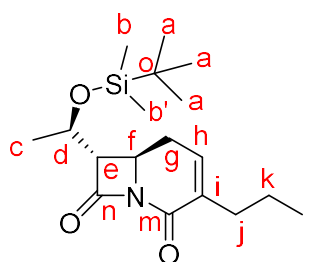
Nom IUPAC : (6R,7S)-7-((R)-1-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)éthyl)-3-propyl-1-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ène-2,8-dione

Formule brute : C₁₈H₃₁NO₃Si

Rendement : 83%

Masse molaire : 337,21 g/mol

Aspect : poudre blanche

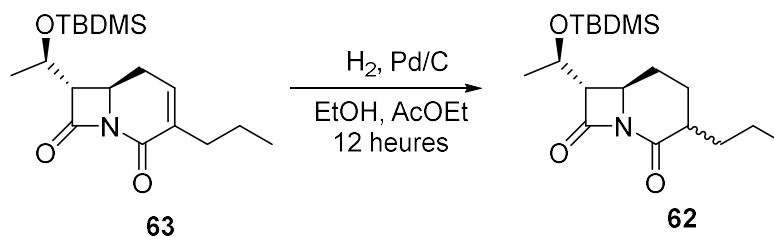


RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6,43 – 6,34 (m, 1H, **h**), 4,28 – 4,20 (m, 1H, **d**), 4,16 (m, 1H, **f**), 3,07 (dd, *J* = 4,9, 3,0 Hz, 1H, **e**), 2,67-2,58 (m, 1H, **g**), 2,48 (m, 1H, **g**), 2,42 – 2,30 (m, 1H, **j**), 2,18 (m, 1H, **j**), 1,47 (m, 2H, **k**), 1,22 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H, **c**), 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, **l**), 0,86 (s, 9H, **a**), 0,08 (2 s, 6H, **b + b'**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 200,5 (n) ; 159,3 (m) ; 136,1 (h) ; 110,1 (i) ; 66,9 (e) ; 65,2 (d) ; 50,2 (f) ; 31,9 (j) ; 28,9 (g) ; 25,8 (a) ; 22,6 (c) ; 21,7 (k) ; 18,0 (o) ; 13,8 (l) ; -4,1 (b) ; -4,9 (b').

APCI-HMRS m/z calculé pour [M+H]⁺ (C₁₈H₃₂NO₃Si) : 338,21460 ; expérimental : 338,21460 ; Δppm = 0,01.

6.3.6 Hydrogénation de **63**



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
63	337,21	-	1,0	0,3096	104,4	-
Pd/C (10%)	106,42	-	1,0	0,3096	32,9	-
EtOAc	-	-	-	-	-	10
EtOH	-	-	-	-	-	10

Mode opératoire

63 et du Pd/C (10%) sont mis en solution dans l'EtOH et l'EtOAc sont alors ajoutés. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère d'hydrogène (ballon de baudruche) durant une nuit. Une filtration sur pad de célite est effectuée, suivie d'une évaporation du solvant sous pression réduite. Deux diastéréoisomères sont obtenus mais ceux-ci ne seront séparés qu'à la dernière étape (voir 6.3.9).

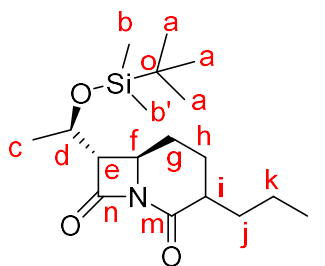
Nom IUPAC : (6R,7S)-7-((R)-1-((tert-butyltriméthylsilyloxy)éthyl)-3-propyl-1-azabicyclo[4.2.0]octane-2,8-dione

Formule brute : C₁₈H₃₃NO₃Si

Rendement : 99%

Masse molaire : 339,22 g/mol

Aspect : poudre blanche



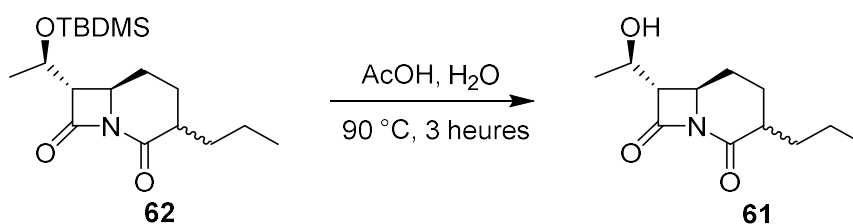
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4,25 (m, 1H, **d**), 4,06 – 3,95 (m, 1H, **f**), 3,12 (dd, *J* = 4,3, 3,6 Hz, 0,5H (dia 1, **e**), 3,00 (dd, *J* = 4,5, 3,2 Hz, 0,5H (dia 2), **e**), 2,37 (m, 0,5 H (dia 1), **i**), 2,23 (m, 0,5H (dia 2), **i**), 2,18 – 2,05 (m, 2H, **h**), 1,91 – 1,77 (m, 1H, **j**), 1,76 – 1,66 (m, 1H, **j**), 1,56 – 1,48 (m, 2H, **g**), 1,45 – 1,23 (m, 2H, **k**), 1,19 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, **c**), 0,94 – 0,88 (m, 3H, **l**), 0,86 (d, *J* = 1,7 Hz, 9H, **a**), 0,06 (2 s, 6H, **b + b'**).

Rapport diastéréoisomérique (RMN ¹H) : 51/49

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170,2 (dia 1, **n**), 169,5 (dia 2, **n**), 165,8 (dia 1, **m**), 165,4 (dia 2, **m**), 67,4 (dia 1, **e**), 67,3 (dia 2, **e**), 65,0 (dia 1, **d**), 64,9 (dia 2, **d**), 54,1 (dia 1, **f**), 52,5 (dia 2, **f**), 41,9 (dia 1, **i**), 39,9 (dia 2, **i**), 34,6 (dia 1, **j**), 32,5 (dia 2, **j**), 28,0 (dia 1, **k**), 27,1 (dia 2, **k**), 26,1 (dia 1, **h**), 26,0 (dia 2, **h**), 22,8 (**a**), 22,6 (**c**), 20,5 (dia 1, **g**), 19,9 (dia 2, **g**), 18,0 (**o**), 14,2 (**l**), -4,6 (**b**), -4,94 (**b'**).

ESI-HMRS *m/z* calculé pour [M+Na]⁺ (C₁₈H₃₃NO₃SiNa) : 362,21204; expérimental : 362,21085 ; Δppm = 3,29.

6.3.7 Déprotection de **62**



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
62	339,21	-	1,0	0,196	67	-
H₂O	18,02	1	150,0	29,40	530	0,53
AcOH	60,05	1,05	120,0	23,52	1412	1,35

Mode opératoire

62 est mis en solution dans l'eau et l'acide acétique. Le mélange réactionnel est agité, à 90 °C, pendant 3 heures. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Une fois la réaction terminée, l'eau et l'acide acétique sont complètement évaporés sous pression réduite. L'analyse RMN est concentrée sur les pics principaux car la présence des deux diastéréoisomères rend difficile l'attribution des pics de la chaîne alkyl **f**. La RMN du mélange brut confirme l'absence de réactif de base. Le produit est donc engagé directement dans la réaction suivante.

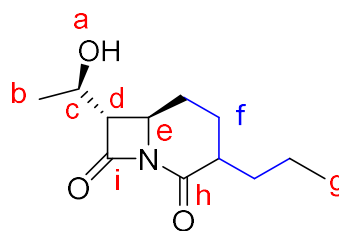
Nom IUPAC : (6R,7S)-7-((R)-1-hydroxyléthyl)-3-propyl-1-azabicyclo[4.2.0]octane-2,8-dione

Formule brute : C₁₂H₁₉NO₃

Rendement : 91%

Masse molaire : 225,14 g/mol

Aspect : huile visqueuse jaunâtre



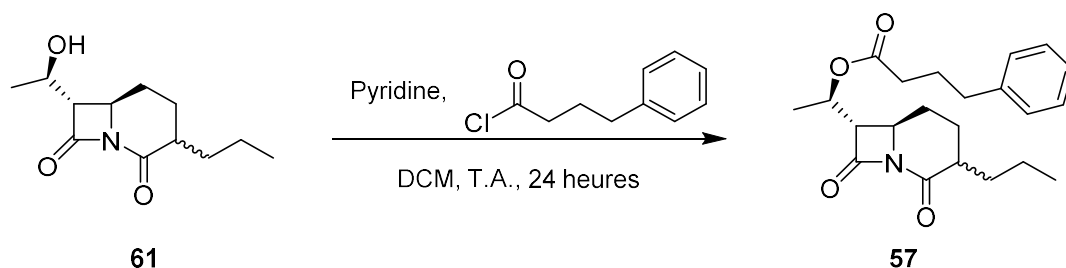
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4,27 (m, 1H, **c**), 4,07 – 3,99 (m, 1H, **e**), 3,87 (bs, 1H, **a**), 3,20 (dd, *J* = 5,3, 3,6 Hz, 0,5H (dia 1), **d**), 3,07 (dd, *J* = 5,3, 3,2 Hz, 0,5H (dia 2), **d**), 2,39 – 1,93 (m, 2H, **f**), 1,92 – 1,68 (m, 2H, **f**), 1,66 – 1,33 (m, 2H, **f**), 1,31 – 1,22 (m, 3H, **f**), 1,20 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H, **b**), 0,95 – 0,84 (m, 3H, **g**).

Rapport diastéréoisomérique (RMN ¹H) : 61/39

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170,4 (**i**), 169,6 (**i**), 165,6 (**h**), 165,2 (**h**), 66,8 (**d**), 64,7 (**c**), 53,6 (**e**), 52,8 (**e**), 42,0 (**f**), 39,9 (**f**), 32,5 (**f**), 29,8 (**f**), 28,0 (**f**), 27,1 (**f**), 26,1 (**f**), 21,8 (**f**), 20,5 (**f**), 20,0 (**b**), 14,0 (**g**).

APCI-HMRS *m/z* calculé pour [M+H]⁺ (C₁₂H₂₀NO₃) : 226,14377; expérimental : 226,14366 ; Δppm = -0,50.

6.3.8 Esterification de **61**



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
61	225,14	-	1	0,8883	200,0	-
Chlorure de phenylbutanoyl	182,05	1,13	1,6	1,4391	262,0	0,23
Pyridine	79,10	0,98	2,3	1,9988	158,1	0,16
DCM anhydre	-	-	-	-	-	20

Mode opératoire

61 est mis en solution dans le DCM anhydre. La pyridine et le chlorure d'acyle sont alors additionnés à température ambiante. Le mélange réactionnel est mis sous agitation durant 24 heures. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est lavé avec NaHCO₃ saturé puis avec HCl 1N et enfin avec NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et le solvant résiduel est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié une première fois par chromatographie sur silice Flash (Hexane/EtOAc 80 : 20) afin d'obtenir uniquement le mélange des deux diastéréoisomères sans autre impureté. Le rendement des deux diastéréoisomères est alors calculé. Ensuite, les deux diastéréoisomères sont séparés et analysés séparément et récupérés avec des masses respectives de 72 mg et 45 mg. Il nous est malheureusement, jusqu'à présent, impossible de savoir quel spectre RMN correspond à quel diastéréoisomère. Nous allons donc simplement les appeler diastéréoisomère 1 et diastéréoisomère 2.

Masse molaire : 371,21 g/mol

Formule brute : C₂₂H₂₉NO₄

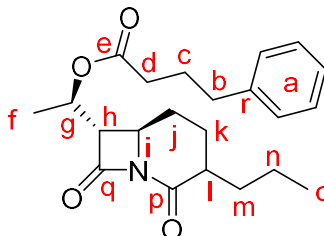
Rendement calculé sur le mélange des deux diastéréoisomères : 42 %

Rapport diastéréoisomérique (RMN ^1H) : 55/45

• Diastéréoisomère 1 :

Nom IUPAC : 4-phénylbutanoate de (R)-1-((6R,7S)-2,8-dioxo-3-propyl-1-azabicyclo [4.2.0] octan-7-yl)éthyle

Aspect : huile visqueuse jaune



RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,31 – 7,26 (m, 2H, a), 7,22 – 7,15 (m, 3H, a), 5,26 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H, g), 3,95 (m, 1H, i), 3,16 (dd, $J = 6,6, 3,3$ Hz, 1H, h), 2,69 – 2,51 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, b), 2,35 – 2,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, d), 2,27 – 2,20 (m, 1H, l), 2,19 – 2,04 (m, 2H, k), 1,98 – 1,89 (m, 2H, c), 1,85 (m, 1H, m), 1,76 – 1,67 (m, 1H, m), 1,60 (m, 2H, j), 1,46 – 1,31 (m, 5H, n + f), 0,95 – 0,89 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, o).

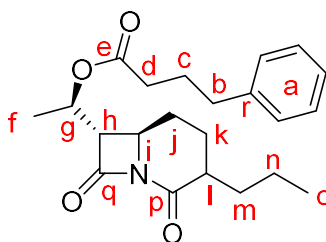
RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 172,6 (e), 170,2 (q), 163,3 (p), 141,3 (r), 128,3 (a), 128,2 (a), 126,2 (a), 67,3 (g), 64,5 (h), 54,0 (i), 39,9 (l), 35,2 (b), 33,7 (d), 32,5 (m), 26,5 (c), 26,1 (j), 25,9 (k), 20,5 (n), 18,6 (f), 14,1 (o).

ESI/HMRS m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_4$) : 372,21693 ; expérimental : 372,21688 ; $\Delta\text{ppm} = -0,15$.

• Diastéréoisomère 2 :

Nom IUPAC : 4-phénylbutanoate de (R)-1-((6R,7S)-2,8-dioxo-3-propyl-1-azabicyclo[4.2.0]octan-7-yl)éthyle

Aspect : huile jaune visqueuse



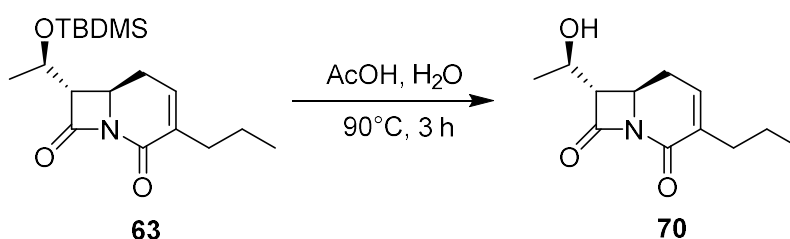
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,30 – 7,26 (m, 2H, a), 7,21 – 7,15 (m, 3H, a), 5,25 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H, g), 3,92 (dt, $J = 11,1, 3,7$ Hz, 1H, i), 3,30 (dd, $J = 6,5, 3,7$ Hz, 1H, h), 2,70 – 2,61 (m, 2H, b), 2,39 – 2,33 (m, 1H, l), 2,33 – 2,28 (m, 2H, d), 2,14 (m, 2H, j), 1,99 – 1,90 (m, 2H, c), 1,83 (m, 1H, m), 1,56 – 1,47 (m, 3H, k + m), 1,44 – 1,31 (m, 5H, f + n), 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, o).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 172,6 (e), 169,4 (q), 163,7 (p), 141,3 (r), 128,6 (a), 128,5 (a), 126,2 (a), 67,2 (g), 64,4 (h), 55,8 (i), 42,0 (l), 35,1 (b), 34,3 (m), 33,7 (d), 28,0 (k), 26,9 (c), 26,5 (j), 19,9 (n), 18,5 (f), 14,0 (o).

ESI/HMRS m/z calculé pour [M+H]⁺ (C₂₂H₃₀NO₄) : 372,21693 ; expérimental : 372,21685 ; Δppm = - 0,24.

6.4 Synthèse du bicyclic 58

6.4.1 Déprotection de 63



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
63	337,21	-	1,0	1,11	375,0	-
H ₂ O	18,02	1,00	150,0	166,81	300,3	3,00
AcOH	60,05	1,05	120,0	133,45	801,4	7,63

Mode opératoire

63 est mis en solution dans l'eau et l'acide acétique. Le mélange réactionnel est mis sous agitation à 90°C pendant 3 heures. L'avancement de la réaction est contrôlé par CCM. Une fois la réaction terminée, l'eau et l'acide acétique sont évaporés sous pression réduite.

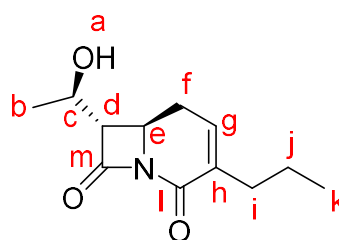
Nom IUPAC : (6R,7S)-7-((R)-1-hydroxyéthyl)-3-propyl-1-azabicyclo[4.2.0]oct-3-ène-2,8-dione

Formule brute : C₁₂H₁₇NO₃

Rendement : 99%

Masse molaire : 223,12 g/mol

Aspect : Huile visqueuse jaune

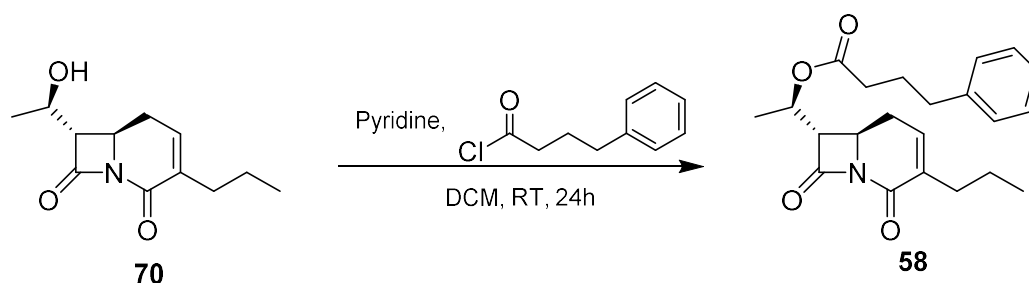


RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6,41 (m, 1H, **g**), 4,37 – 4,11 (m, 2H, **c + e**), 3,14 (dd, *J* = 5,7, 3,0 Hz, 1H, **d**), 2,66 (ddd, *J* = 17,1, 6,5, 5,6 Hz, 1H, **f**), 2,51 (m, 1H, **f**), 2,45 – 2,30 (m, 1H, **i**), 2,21 – 2,09 (m, 1H, **i**), 1,56 – 1,42 (m, 2H, **j**), 1,31 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, **b**), 0,90 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, **k**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164,1 (**m**), 159,4 (**l**), 136,8 (**g + h**), 66,2 (**d**), 64,8 (**c**), 50,5 (**e**), 32,0 (**i**), 28,9 (**f**), 27,1 (**j**), 21,8 (**b**), 13,8 (**k**).

ESI/HMRS *m/z* calculé pour [M+H]⁺ (C₁₂H₁₈NO₃) : 224,12812 ; expérimental : 224,12819 ; Δppm = 0,31.

6.4.2 Estérification de **70**



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
70	223,12	-	1	1,1846	266,7	-
Chlorure de phenylbutanoyl	182,05	1,13	1,3	1,5400	280,4	0,25
Pyridine	79,10	0,98	1,8	2,1323	168,7	0,17
DCM anhydre	-	-	-	-	-	20,00

Mode opératoire

Le composé **70** est mis en solution dans le DCM anhydre. La pyridine et le chlorure d'acyle sont alors ajoutés à température ambiante. Le mélange réactionnel est mis sous agitation durant 24 heures. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est lavé avec NaHCO₃ saturé puis avec HCl 1N et enfin avec NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et le solvant résiduel est évaporé sous pression réduite. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur silice flash (Hexane/EtOAc 60 : 40).

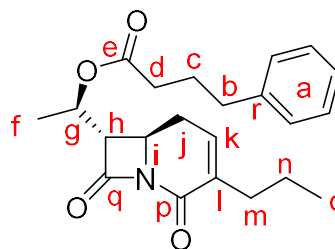
Nom IUPAC : 4-phénylbutanoate de (R)-1-((6R,7S)-2,8-dioxo-3-propyl-1-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-7-yl)éthyle

Formule brute : C₂₂H₂₇NO₄

Rendement : 49%

Masse molaire : 369,19 g/mol

Aspect : huile visqueuse jaune



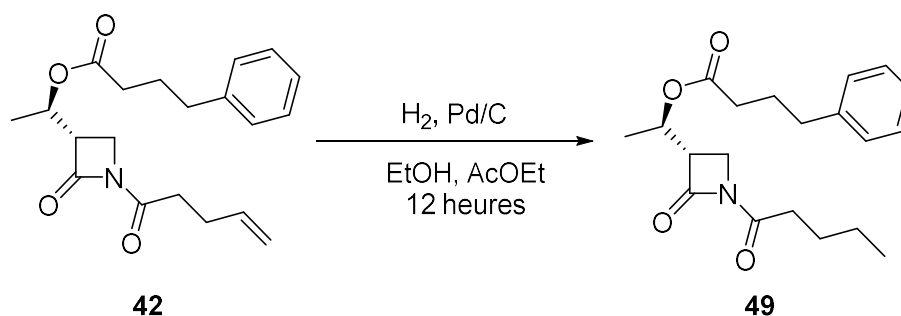
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,29 (m, 2H, a), 7,23 – 7,14 (m, 3H, a), 6,39 (m, 1H, k), 5,25 (q, *J* = 6,4 Hz, 1H, g), 4,18 – 4,04 (m, 1H, i), 3,24 (dd, *J* = 6,7, 3,1 Hz, 1H, h), 2,71 – 2,55 (m, 3H, j + b), 2,53 – 2,43 (m, 1H, j), 2,37 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, m), 2,34 – 2,29 (m, 2H, d), 2,22 – 2,09 (m, 1H, m), 2,02 – 1,87 (m, 2H, c), 1,55 – 1,40 (m, 2H, n), 1,36 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, f), 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, o).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 172,6 (e), 162,3 (q), 159,2 (p), 141,3 (r), 136,5 (l), 136,1 (k), 128,6 (a), 128,5 (a), 126,2 (a), 67,4 (g), 64,0 (h), 51,6 (i), 35,1 (b), 33,7 (d), 31,9 (m), 28,9 (j), 26,5 (c), 21,7 (n), 18,5 (f), 13,8 (o).

ESI-HMRS m/z calculé pour [M+H]⁺ (C₂₂H₂₈NO₄) : 370,20128 ; expérimental : 370,20128 ; Δppm = - 0,02.

6.5 Synthèse de 49 à partir du lead

6.5.1 Hydrogénation du lead



Réactifs	MM (g/mol)	d	Eq.	n (mmol)	m (mg)	V (ml)
<i>Lead</i>	343,18	-	1,0	0,0932	32	-
Pd/C (10%)	106,42	-	1,0	0,0932	9,9	-
AcOEt	-	-	-	-	-	10
EtOH	-	-	-	-	-	10

Mode opératoire

Le *lead* et du Pd/C (10%) sont mis en solution dans l'EtOH et l'EtOAc. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère d'hydrogène (ballon de baudruche) durant une nuit. Une filtration sur pad de célite est effectuée, suivie d'une évaporation du solvant sous pression réduite.

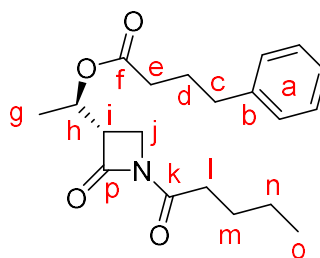
Nom IUPAC : 4-phénylbutanoate de (R)-1-((S)-2-oxo-1-pentanoylazétidin-3-yl)éthyle

Formule brute : C₂₀H₂₇NO₄

Rendement : 99%

Masse molaire : 345,19 g/mol

Aspect : huile visqueuse jaune



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,31 – 7,26 (m, 2H, **a**), 7,22 – 7,13 (m, 3H, **a**), 5,28 (q, *J* = 6,3 Hz, 1H, **h**), 3,65 (m, 1H, **j**), 3,52 (m, 1H, **j**), 3,39 (m, 1H, **i**), 2,70 – 2,56 (m, 4H, **l + e**), 2,29 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, **c**), 1,92 (p, *J* = 7,8 Hz, 2H, **d**), 1,61 (p, *J* = 8,4 Hz, 2H, **m**), 1,44 – 1,29 (m, 5H, **g + n**), 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, **o**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 172,5 (**f**), 171,4 (**k**), 164,5 (**p**), 141,2 (**b**), 128,6 (**a**), 128,5 (**a**), 126,2 (**a**), 67,4 (**h**), 53,6 (**i**), 40,0 (**j**), 36,4 (**l**), 35,2 (**e**), 33,8 (**c**), 26,6 (**d**), 26,3 (**m**), 22,4 (**n**), 18,5 (**g**), 13,9 (**o**).

APCI-HMRS *m/z* calculé pour [M+H]⁺ (C₂₀H₂₈NO₄) : 346,20128 ; expérimental : 346,20115 ; Δppm = - 0,3.

Bibliographie

- [1] M. Wood, *The book of herbal wisdom : using plants as medicines*, North Atlantic Books, Berkeley Calif., **1997**.
- [2] E. P. Baron, *Headache: The Journal of Head and Face Pain* **2015**, *55*, 885-916.
- [3] M. Kuddus, I. Ginawi, A. AlHazimi, *Emirates Journal of Food and Agriculture* **2013**, *25*.
- [4] T. F. Brunner, *Journal of Psychedelic Drugs* **2012**, *9*, 221-225.
- [5] W. B. O'Shaughnessy, *Provincial Medicinal Journal and Retrospect of the Medical Sciences* **1843**, *s1-5*, 363-369.
- [6] B. E. McGeeney, *Headache* **2013**, *53*, 447-458.
- [7] P. Pacher, S. Batkai, G. Kunos, *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 389-462.
- [8] C. Guillaing, *CRISP* **2003**, *1796*, 5-49.
- [9] I. B. Adams, B. R. Martin, *Addiction* **1996**, *91*, 1585-1614.
- [10] Y. Gaoni, R. Mechoulam, *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 1646-1647.
- [11] H. Isbell, C. W. Gorodetzsky, D. Jasinski, U. Claussen, F. von Spulak, F. Korte, *Psychopharmacologia* **1967**, *11*, 184-188.
- [12] D. M. Lambert, C. J. Fowler, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5059-5087.
- [13] aA. C. Howlett, M. Bidaut-Russell, W. A. Devane, L. S. Melvin, M. R. Johnson, M. Herkenham, *Trends in Neurosciences* **1990**, *13*, 420-423; bW. A. Devane, J. Axelrod, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 6698-6701.
- [14] aL. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **1990**, *346*, 561-564; bS. Munro, K. L. Thomas, M. Abu-Shaar, *Nature* **1993**, *365*, 61-65.
- [15] R. G. Pertwee, A. C. Howlett, M. E. Abood, S. P. H. Alexander, V. Di Marzo, M. R. Elphick, P. J. Greasley, H. S. Hansen, G. Kunos, K. Mackie, R. Mechoulam, R. A. Ross, *Pharmacological Reviews* **2010**, *62*, 588-631.
- [16] A. C. Howlett, F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam, R. G. Pertwee, *Pharmacological Reviews* **2002**, *54*, 161-202.
- [17] S. Zou, U. Kumar, *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 833.
- [18] N. Weiss, M. D. Waard, *Medicinal Sciences* **2006**, *22*, 396-404.
- [19] M. Aghazadeh Tabrizi, P. G. Baraldi, P. A. Borea, K. Varani, *Chemistry Reviews* **2016**, *116*, 519-560.
- [20] A. A. Izzo, F. Borrelli, R. Capasso, V. Di Marzo, R. Mechoulam, *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30*, 515-527.
- [21] R. Mechoulam, Y. Shvo, *Tetrahedron* **1963**, *19*, 2073-2078.
- [22] Y. Gaoni, R. Mechoulam, *Chemical Communications (London)* **1966**.
- [23] E. W. Gill, W. D. Paton, R. G. Pertwee, *Nature* **1970**, *228*, 134-136.
- [24] T. B. Wood, W. T. N. Spivey, T. H. Easterfield, *Journal of the Chemical Society* **1899**, *75*, 20.
- [25] C. E. Turner, M. A. Elsohly, E. G. Boeren, *Journal of Natural Products* **1980**, *43*, 169-234.
- [26] R. G. Pertwee, *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153*, 199-215.
- [27] A. Thomas, G. L. Baillie, A. M. Phillips, R. K. Razdan, R. A. Ross, R. G. Pertwee, *British Journal of Pharmacology* **2009**, *150*, 613-623.

- [28] G. Riedel, P. Fadda, S. McKillop-Smith, R. G. Pertwee, B. Platt, L. Robinson, *British Journal of Pharmacology* **2009**, *156*, 1154-1166.
- [29] D. Koga, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1997**, *690*, 7-13.
- [30] R. A. Ross, *British Journal of Pharmacology* **2003**, *140*, 790-801.
- [31] T. Sugiura, Y. Kobayashi, S. Oka, K. Waku, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, *66*, 173-192.
- [32] T. F. Freund, I. Katona, D. Piomelli, *Physiological Reviews* **2003**, *83*, 1017-1066.
- [33] T. Sugiura, S. Kishimoto, S. Oka, M. Gokoh, *Progress in Lipid Research* **2006**, *45*, 405-446.
- [34] R. K. P. Tripathi, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *188*, 111953.
- [35] M. Kano, T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, M. Watanabe, *Physiological Reviews* **2009**, *89*, 309-380.
- [36] J. D. Leggett, S. Aspley, S. R. G. Beckett, A. M. D'Antona, D. A. Kendall, D. A. Kendall, *British Journal of Pharmacology* **2004**, *141*, 253-262.
- [37] E. Jones, T. Kirkham, *British Journal of Pharmacology* **2012**, *166*, 1815-1821.
- [38] OEDT, (Ed.: U. publications), Luxembourg, **2018**.
- [39] N. Ueda, R. A. Puffenbarger, S. Yamamoto, D. G. Deutsch, *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, *108*, 107-121.
- [40] B. F. Cravatt, D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner, N. B. Gilula, *Nature* **1996**, *384*, 83-87.
- [41] C. J. Fowler, K.-O. Jonsson, G. Tiger, *Biochemical Pharmacology* **2001**, *62*, 517-526.
- [42] M. H. Bracey, M. A. Hanson, K. R. Masuda, R. C. Stevens, B. F. Cravatt, *Science* **2002**, *298*, 1793-1796.
- [43] M. Seierstad, J. G. Breitenbucher, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 7327-7343.
- [44] D. G. Deutsch, S. A. Chin, *Biochemical Pharmacology* **1993**, *46*, 791-796.
- [45] D. G. Deutsch, R. Omeir, G. Arreaza, D. Salehani, G. D. Prestwich, Z. Huang, A. Howlett, *Biochemical Pharmacology* **1997**, *53*, 255-260.
- [46] D. L. Boger, H. Sato, A. E. Lerner, M. P. Hedrick, R. A. Fecik, H. Miyauchi, G. D. Wilkie, B. J. Austin, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 5044-5049.
- [47] M. Mileni, J. Garfinkle, J. K. Demartino, B. F. Cravatt, D. L. Boger, R. C. Stevens, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 10497-10506.
- [48] M. Mor, S. Rivara, A. Lodola, P. V. Plazzi, G. Tarzia, A. Duranti, A. Tontini, G. Piersanti, S. Kathuria, D. Piomelli, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 4998-5008.
- [49] aD. Fegley, S. Gaetani, A. Duranti, A. Tontini, M. Mor, G. Tarzia, D. Piomelli, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *313*, 352-358; bA. Jayamanne, R. Greenwood, V. A. Mitchell, S. Aslan, D. Piomelli, C. W. Vaughan, *British Journal of Pharmacology* **2006**, *147*, 281-288.
- [50] D. Zhang, A. Saraf, T. Kolasa, P. Bhatia, G. Z. Zheng, M. Patel, G. S. Lannoye, P. Richardson, A. Stewart, J. C. Rogers, J. D. Brioni, C. S. Surowy, *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 1095-1105.
- [51] M. Mileni, D. S. Johnson, Z. Wang, D. S. Everdeen, M. Liimatta, B. Pabst, K. Bhattacharya, R. A. Nugent, S. Kamtekar, B. F. Cravatt, K. Ahn, R. C. Stevens, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 12820-12824.

- [52] L. K. Fay, Johnson, D. S., Lazerwith, S. E., Morris, M. A., Wang, L. J., Meyers, M. J., Kesten, S. R., Stiff, C. M., **2008**.
- [53] M. J. Bonifácio, F. Sousa, C. Aires, A. I. Loureiro, C. Fernandes-Lopes, N. M. Pires, P. N. Palma, P. Moser, P. Soares-Da-Silva, *British Journal of Pharmacology* **2020**.
- [54] W. Yang, X. Gao, B. Wang, *Medicinal Research Reviews* **2003**, *23*, 346-368.
- [55] A. Minkkila, S. M. Saario, H. Kasnanen, J. Leppanen, A. Poso, T. Nevalainen, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 7057-7060.
- [56] L. S. Lin, Chioda, M. D., Liu, P., Nargund, R. P. , **2009**.
- [57] L. S. Lin, Chang, L. L., Chobanian, H., Nargund, R. P., **2009**.
- [58] C. Kaub, Gowlugari, S., Kincaid, J., Johnson, R. J., O'Mahony, D. J. R., EstiarteMartinez, M. d. L. A., Duncton, M., *Vol. WO2010039186*, **2010**.
- [59] R. Apodaca, Breitenbucher, J. G., Chambers, A. L., Deng, X., Hawryluk, N. A., Keith, J. M., Mani, N. S., Merit, J. E., Pierce, J. M., Seierstad, M., Xiao, W. , **2009**.
- [60] CSST, *Rapport « Inhibiteurs de la FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) » sur les causes de l'accident survenu à Rennes lors d'un essai clinique de Phase 1 en janvier 2016* **2016**.
- [61] <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/la-penicilline-i-decouverte-dun-antibiotique-960>, *Vol. 20/04/2020* (Ed.: C. S. Chimie), **2006**.
- [62] ECDC, *Antimicrobial consumption in the EU/EEA* **2019**.
- [63] V. P. Sandanayaka, A. S. Prashad, Y. Yang, R. T. Williamson, Y. I. Lin, T. S. Mansour, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2569-2571.
- [64] A. Urbach, G. G. Muccioli, E. Stern, D. M. Lambert, J. Marchand-Brynaert, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 4163-4167.
- [65] M. Feledziak, G. G. Muccioli, D. M. Lambert, J. Marchand-Brynaert, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 6812-6823.
- [66] M. Feledziak, C. Michaux, D. M. Lambert, J. Marchand-Brynaert, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *60*, 101-111.
- [67] M. Feledziak, C. Michaux, A. Urbach, G. Labar, G. G. Muccioli, D. M. Lambert, J. Marchand-Brynaert, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 7054-7068.
- [68] J. Caruano, UCLouvain **2017**.
- [69] A. Morelle, UCLouvain **2018**.
- [70] C. F. Riber, A. H. F. Andersen, L. A. Rolskov, K. Zuwala, P. Gajda, K. B. Løvschall, F. Dagnæs-Hansen, D. H. Banda, T. Pietschmann, M. Tolstrup, A. N. Zelikin, *ACS Macro Letters* **2017**, *6*, 935-940.
- [71] L. Wu, F. Wang, P. Chen, G. Liu, *Journal of American Chemical Society* **2019**, *141*, 1887-1892.
- [72] S.-K. Kang, T.-G. Baik, X.-H. Jiao, K.-J. Lee, C. H. Lee, *Synlett* **1999**, *1999*, 447-449.
- [73] Z. L. Shen, S. Y. Wang, Y. K. Chok, Y. H. Xu, T. P. Loh, *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 271-401.
- [74] C. Citadelle, Université Claude Bernard (Lyon), **2009**.
- [75] P. B. Finn, B. P. Derstine, S. M. Sieburth, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 2536-2539.
- [76] M. Rodríguez-Fernández, X. Yan, J. F. Collados, P. B. White, S. R. Harutyunyan, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 14224-14231.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté des sciences

Place des sciences, 2 bte L6.06.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | www.uclouvain.be/sc