

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



**Ministère De L'Enseignement Supérieur
Et De La Recherche Scientifique
Université Mohamed Seddik Ben Yahia- JIJEL
Faculté des Sciences Exactes & Informatique
Département de Chimie**



THÈSE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Chimie
Option : Chimie organique

Par

DOUARA Bachir

THEME

**Conception et Synthèse de Nouveaux Hétérocycles,
Evaluations Biologiques et Etude Théorique.**

Soutenue publiquement le 02/07/2018

Devant les membres de jury:

Président	KHELILI Smail	Pr. U. M. Seddik Ben Yahia-Jijel
Directrice de Thèse	MERABET Naima	M. C. A. U. Med Seddik Ben Yahia-Jijel
Examineur	BELKHIRI Lotfi	Pr. U. Constantine 1
Examineur	BELFAITAH Ali	Pr. U. Constantine 1
Examinatrice	OULED-HADDAR Houria	M. C. A. U. Med Seddik Ben Yahia-Jijel

*A tous ceux qui m'ont soutenu,
et surtout à ma famille.*

Remerciements

*Je remercie **ALLAH** tout puissant pour m'avoir donné la force, le courage et la foi qui m'ont permis de finaliser cette thèse dans les meilleures conditions.*

*Je remercie tout particulièrement Madame **BOURAOUI-MERABET Naima**, pour avoir accepté de diriger de ma thèse, je la remercie énormément pour son encouragement, pour sa patience, sa grande motivation, sa disponibilité et ses précieux conseils qui m'ont été utiles au cours de mon parcours malgré les moments difficiles que j'ai dû affronter.*

*Tous mes remerciements à Monsieur **KHELILI Smail**, Professeur à l'Université de Jijel pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse.*

*Je remercie également Mr **BELFAITAH Ali**, Professeur à l'Université de Constantine 1, **BELKHIRI Lotfi** , Professeur à l'Université de Constantine 1, Mme **OULEDHADDAR Houria**, **M. C. A. U. Med Seddik Ben Yahia-Jijel** et **EL ABBASSI Mohamed**, Professeur à l'Université de Hadj Lakhdar-Batna pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.*

Une partie de ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie organique du Département de chimie à la Faculté des sciences exactes et informatiques et au laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie de l'Université de Jijel. Je tiens à remercier tout le personnel de ces deux laboratoires.

*Je tiens à remercier Monsieur **BELGHOBSSI Mabrouk**, Maître de conférences à l'Université de Jijel, respectivement ancien et actuel directeurs de laboratoire de phytochimie et de pharmacologie avec lesquels j'ai eu l'honneur de travailler.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame **Pascale Moreau**, Professeur, à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (UMR-6296) de l'Université Clermont Auvergne et responsable de la thématique Inhibiteurs de kinases pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche pour réaliser le projet de « Synthèse et évaluation antiproliférative des analogues pyrazole glucosylés de K252c » , de m'avoir permis d'effectuer des*

analysesspectrales et pour les discussions philosophiques que nous avons pu entretenir. Je garderai toujours un excellent souvenir de mon passage à l'ICCF de Clermont-Ferrand.

*Je souhaite également remercier vivement Mr **Fabrice Anizon** Professeur à l'ICCF de Clermont-Ferrand, pour m'avoir guidé au cours de la réalisation de ce projet, pour ses conseils et points de vue qui m'ont beaucoup aidé à la réalisation du projet, ainsi que le Docteur Elisabeth Pereira, Maître de Conférences, pour tout l'aide qu'elle m'a apportée.*

*Au Docteur **Francis Giraud**, Maître de Conférences à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (UMR-6296), je témoigne ma gratitude pour ses conseils et son aide constante au laboratoire.*

*Je remercie les collaborateurs biologistes : Le Professeur **Alexander Shtil** et les Docteurs **Yulia L. Volodina**, **Dmitry N. Kaluzhny**, pour les différentes évaluations biologiques de nos dérivés de staurosporine.*

*Je remercie aussi mes collègues de laboratoire, les jeunes chercheurs **Fatiha Belferdi**, **Meryem Chemchem**, **Karima Boussafi**, **Tahar Habila**, **Med Zakaria Stiti**, **Yannick J. Esvan**, **Hilmi Tazerki** et **Alexia Visseq** pour leur soutien.*

Mes remerciements vont également à tous mes collègues ingénieurs et techniciens de laboratoire et enseignants du département chimie et celui de génie des procédés de l'Université de Jijel pour leurs soutiens et leurs encouragements toutes ces années de travail et d'enseignement.

*Et enfin, je remercie ma famille : j'adresse mes remerciements à mon **père** et à ma **mère** qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans mon travail comme dans la vie, et à qui je souhaite une longue vie pleine de bonheur, de joie, de santé et de prospérité...*

*Un remerciement particulier à mes **frères** et **sœurs** pour leur soutien à l'accomplissement de cette thèse.*

*Un grand merci également à ma femme « **Karima** » mes deux filles « **Nour** » et « **Kaouter** » qui ont été la lune et les étoiles pour éclairer ma voie dans les moments les plus sombres.*

Liste des abréviations

Ac	Acétyle
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ar	Aromatique
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Réflectance totale atténuée
Bn	Benzyl
Boc	Tert-butoxycarbone
BuLi	n-Butyllithium
°C	Degré Celsius
Cq	Carbone quaternaire
CCM	Chromatographie sur couche mince
d	Doublet
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet de doublet
ddd	Doublet de doublet de doublet
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DFT	Density Functional Theory
DIAD	Diisopropyl azodiformate
DMF	N, N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dppf	[1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène]dichloropalladium(II)
δ	Déplacement chimique
ePK	Eukaryotic Protein Kinases
Eq	Équivalent
ESI	Electron Spray Ionisation
Et	Éthyle
EtOH	Éthanol
Et ₃ N	Triéthylamine

F	Intensités de fluorescence
FT-IR	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heure
His	Histidine
HMBC	Corrélation hétéronucléaires à liaisons multiples
HRMS	Spectrométrie de masse de haute résolution
HSQC	Corrélation quantique hétéronucléaire
Hz	Hertz
h ν	Irradiation UV
IC50	Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition
IR	Infrarouge
<i>J</i>	Constante de couplage
Kb	Constantes de liaison à l'ADN
KD	Constante de dissociation à l'équilibre des ligands des récepteurs
LDA	Diisopropylamide de lithium
M	Molaire
m	Multiplet
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
mmol	Millimol
MS	Spectroscopie de masse
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
nM	Nanomolaire
NOE	Effet Overhauser Nucléaire
OLED	Diode électroluminescente organique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDB	Protein Data Bank
pH	Potentiel d'hydrogène

Pht	phtalimide
Pim	Site d'intégration proviral pour le virus de la leucémie murine de Moloney
PKC	Protéines kinases C
POCl ₃	Oxychlorure de phosphore
PPA	Acide polyphosphorique
ppm	Parties par million
p-TSA	Acide para toluène sulfonique
Ph	Phényle
Py	Pyridine
q	Quadruplet
Rdt	Rendement
R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN 2D	Résonance Magnétique Nucléaire à deux dimensions
s	Singulet
SM	Spectrométrie de masse
t	Triplet
TA	Température ambiante
<i>t</i> BuOH	Tert-butanol
Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
T _{fus}	Température de fusion
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétramétylsilane
V	Volume
VIH	Virus de l'immunodeficiency humaine
W	Watt
μg	Microgramme
μL	Micro litre
μM	Micromol
Δ	Chauffage à température de reflux

Table des matières

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I : les protéines kinase	
I. 1. Introduction à la signalisation cellulaire	4
I. 2. Les protéines kinases et la phosphorylation	4
I. 2. 1. Familles des protéines kinases humaines et Rôle enzymatique	6
I. 2. 2. Structure des protéines kinases	10
I. 2. 2. 1. Le lobe N-terminal	11
I. 2. 2. 2. Le lobe C-terminal	12
I. 2. 2. 3. Site de fixation de l'ATP	13
I. 2. 3. Nomenclature et conformation	15
I. 2. 3. 1. Conformation inactive	15
I. 2. 3. 1. 1. Conformation inactive C _{helix out}	15
I. 2. 3. 1. 2. Conformation inactive DGF out	15
I. 2. 3. 2. Conformation active et mécanisme de la catalyse	16
I. 3. Les inhibiteurs de protéines kinases et modèle pharmacophore	18
I. 3. 1. Type d'inhibiteurs	21
I. 3. 2. Développement du modèle pharmacophore	23
I. 4. Conclusion	25
Chapitre II : Les indolo[2,3-a]carbazoles	
II. 1. Introduction	26
II. 2. La biosynthèse des indolo[2,3-a]carbazoles	27
II. 3. Synthèse chimique des indolo [2,3-a] carbazoles	28
II. 3. 1. Synthèses du noyau indolo [2,3-a] carbazole	28
II. 3. 2. Méthodes de synthèse des dérivés d'indolo [2,3-a] carbazole	29
II. 3. 2. 1. Synthèse de Winterfeld	30
II. 3. 2. 2. Synthèse de Bergman & Pelcman	31
II. 3. 2. 3. Synthèse de Faul	31
II. 3. 2. 4. Synthèse de Steglich et Weinreb	32
II. 3. 2. 5. L'approche de Raphaël	32

II. 3. 2. 6. Synthèse de Kaneko	32
II. 3. 2. 7. Synthèse de Wood	33
II. 3. 2. 8. Synthèse de Magnus	33
II. 3. 2. 9. Synthèse de Moody	34
II. 3. 2. 10. Synthèse de Saulnier	34
II. 3. 2. 11. Synthèse de Bergman et Gribble	35
II. 3. 3. Approches récentes	36
II. 4. Conclusions	38

Chapitre III: Méthodes de synthèse des dérivés de la quinoléine (utilisation et intérêts biologiques)

III. 1. introduction	41
III. 2. Utilisation et intérêts biologiques des dérivés quinoléiques	42
III. 2. 1. Les dérivés de la quinoléine comme inhibiteurs de la topoisomérase	42
III. 2. 2. Les dérivés de la quinoléine Inhibiteurs de protéines kinases	43
III. 2. 3. Les dérivés de la quinoléine comme Agents d'intercalation de l'ADN	44
III. 2. 4. Les dérivés de la quinoléine comme Agents antimitotiques et inhibiteur de la polymérisation de la tubuline	45
III. 2. 5. Les dérivés de la quinoléine comme Agents antipaludiques et Antiplasmodiales	45
III. 3. Méthode de synthèse des quinoléines	46
III. 3. 1. Méthodes de synthèse classiques de la quinoléine	46
III. 3. 1. 1. A partir d'arylamines et de composés carbonyles α , β insaturés	46
III. 3. 1. 2. A partir des amines aromatiques et des composés 1,3-dicarbonylés	47
III. 3. 1. 3. A partir d'o-acylanilines et de composés carbonyles énolisables	48
III. 3. 1. 4. A partir des dérivés nitres ortho substitués	50
III. 3. 1. 5. Réactions multi-composantes dans la synthèse des quinoléines	51
III. 3. 1. 6. Réactions de Vilsmeier-Haack dans la synthèse des quinoléines	52
III. 3. 1. 7. Réactions catalysée par le palladium dans la synthèse des quinoléines	53
III. 3. 1. 8. Autres synthèses de dérivés de la quinoléine	54
III. 3. 1. 8. 1. La Synthèse de Riehm	54
III. 3. 1. 8. 2. Par transformation des indoles	54
III. 3. 2. Approches récentes dans la synthèse des quinoléines	55
III. 3. 2. 1. Réactions assistées par micro-ondes	55

III. 3. 2. 2. Réactions assistées par ultrasons	57
III. 3. 2. 3. Synthèse photocatalytique	58
III. 3. 2. 4. Synthèse biocatalytique	59
III. 4. Conclusion	59

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV. 1. Première partie : Synthèse des analogues pyrazol (on) e glucosylés de la staurosporine aglycone K252c et évaluation biologique	60
IV. 1. 1. But et objectifs du travail	60
IV. 1. 2. Analyses rétrosynthétiques et synthèses réalisées	61
IV. 1. 3. Evaluation biologique	71
IV. 1. 3. 1. Tests d'activités antiprolifératives	71
IV. 1. 3. 2. Tests d'inhibition des kinases Pim-1 et PKC α	72
IV. 1. 3. 3. Interaction avec l'ADN double brin	73
IV. 2. Deuxième partie : Synthèse des dérivés de quinoléine par de légères modifications autour de la réaction standard de Skraup: études DFT	74
IV. 2. 1. Introduction	74
IV. 2. 2. But et objectifs du travail	74
IV. 2. 2. Résultats et discussion	76
IV. 2. 3. Etude théorique des dérivés de la quinoléine par des méthodes DFT	82
IV. 2. 3. 1. Détails de calcul	82
IV. 2. 3. 2. Indices de réactivité globale	82
IV. 2. 3. 3. Les indices de réactivité locale	83
IV. 2. 3. 4. Analyse théorique	83

Chapitre V : Partie expérimentale

V.1. Général	94
V. 2. Première partie : Synthèse des analogues pyrazol(on)e glucosylés de la staurosporine aglycone K252c	94
V. 2. 1. Partie chimique	94
V. 2. 1. 1. <i>1-(tert-butoxycarbonyl)-1H-indole-3-carboxylic acid (3)</i>	94
V. 2. 1. 2. <i>1-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (5)</i>	95

V. 2. 1. 3.	<i>1-(2, 3, 4, 6-Tetra- O -benzyl-1-deoxy- β – D -glucopyranos- 1 -yl)-1H-indole-3-carbaldehyde (6)</i>	99
V. 2. 1. 4.	<i>1-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole-3-carboxylic acid (7)</i>	98
V. 2. 1. 5.	<i>Di-<i>t</i>-butyl 3, 3'-(3-ethoxy-1,3-dioxopropane-1,2-diyl)bis(1H-indole-1-carboxylate) (2)</i>	99
V. 2. 1. 6.	<i>tert-Butyl 3-(1-ethoxy-3-(1H-indol-3-yl)-1,3-dioxopropan-2-yl)-1H-indole-1-carboxylate (8)</i>	100
V. 2. 1. 7.	<i>3-(4-(1H-Indol-3-yl)-1H-pyrazol-5-yl)-1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (9)</i>	101
V. 2. 1. 8.	<i>13-(2, 3, 4, 6-Tetra- O -benzyl- 1 -deoxy- β – D -glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-<i>a</i>]pyrazolo[3,4-<i>c</i>]carbazole (10)</i>	104
V. 2. 1. 9.	<i>13-(1-deoxy- β –D -glucopyranos- 1- yl)-12, 13 – dihydro -5 H- indolo [2,3-<i>a</i>]pyrazolo[3,4-<i>c</i>]carbazole (11)</i>	105
V. 2. 1. 10.	<i>Ethyl 2-(1-(2,3,4,6-tetra- O -benzyl-1-deoxy-β –D -glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate (12)</i>	106
V. 2. 1. 11.	<i>Ethyl 2-(1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β –D -glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)acetate (13)</i>	107
V. 2. 1. 12.	<i>Tert-Butyl 3-(4-(1-(2,3,4,6-tetra –O -benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrazol-5-yl)-1H-indole-1-carboxylate (16)</i>	108
V. 2. 1. 13.	<i>3-(5-(1H-Indol-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (17)</i>	111
V. 2. 1. 14.	<i>12-(2, 3, 4, 6- Tetra - O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-<i>a</i>]pyrazolo[3,4-<i>c</i>]carbazole (18)</i>	113
V. 2. 1. 15.	<i>12-(1-Deoxy- β- D- glucopyranos- 1- yl)- 12, 13- dihydro-5 H- indolo [2,3-<i>a</i>]pyrazolo[3,4-<i>c</i>]carbazole (19)</i>	114
V. 3.	Deuxième partie : Synthèse des dérivés de quinoléine par de légères modifications autour de la réaction standard de Skraup	116
V. 3. 1.	Procédure de synthèse générale des composés 20-23	116
V. 3. 1. 1.	<i>2,3-dihydroxypropyl-8-methylquinoléine-5-carboxylate (20)</i>	116
V. 3. 1. 2.	<i>2,3-dihydroxypropyl-8-methoxyquinoléine-5-carboxylate (21)</i>	117
V. 3. 1. 3.	<i>2,3-dihydroxypropyl-7-methoxyquinoléine-5-carboxylate (22)</i>	117
V. 3. 1. 4.	<i>2,3-dihydroxypropyl quinoléine-5-carboxylate (23)</i>	117
V. 3. 1. 5.	<i>Acide 8-chloroquinoléine-5-carboxylique (24)</i>	119

V. 3. 1. 6. <i>Acide 7-bromoquinoléine-5-carboxylique (25)</i>	118
V. 3. 1. 7. <i>Acide 8-quinoléinecarboxylique (26)</i>	119
V. 3. 1. 8. <i>Acide 6-méthylquinoléine-8-carboxylique (27)</i>	119
V. 3. 1. 9. (Z)-5-(hydroxyméthyl)-9-méthoxy-7H-oxépino [5,4,3-de]quinolin-7-one (C)	119
V. 4. Protocole expérimentale des tests biologiques	120
V. 4. 1. Tests d'activités antiprolifératives	120
V. 4. 2. Tests d'inhibition des kinases Pim-1 et PKC α	120
V. 4. 3. Tests d'interaction avec l'ADN double brin	121
Conclusion générale	122
Références bibliographiques	125
Annexe	140

Introduction générale

Introduction générale

Les composés organiques hétérocycliques sont très présents dans les produits naturels, ils constituent, entre autres, le noyau de base de l'ADN, l'ARN et de l'ATP. Ils sont utilisés dans différents domaines particulièrement dans l'industrie pharmaceutique où ils ont trouvé des applications dans le traitement de nombreuses maladies. En effet, on les trouve comme anti-VIH (Renukadevi *et al.* **1997** et Baures *et al.* **1991**), anti-histaminiques (Mohan *et al.* **2002**), tranquilisants (Shealy *et al.* **1962**), anti-parkinsoniens (shri *et al.* **1990**), anti-muscarines (Miyachi *et al.* **1998**), antiarthriques (Sharpe *et al.* **1985**), cardiotoniques (Sircar *et al.* **1987**)...

La demande de l'industrie chimique et pharmaceutique en nouvelles molécules hétérocycliques, aux propriétés thérapeutiques de plus en plus intéressantes et aux modes de préparation de plus en plus respectueux de l'environnement, ne cesse de croître. Vu l'importance de ce sujet, nous nous sommes intéressés à cette famille de molécules et nous en avons fait l'objet de cette thèse comme l'indique l'intitulé : **Conception et Synthèse de Nouveaux Hétérocycles, Evaluations Biologique et Etude Théorique.**

Le présent travail a été réalisé en deux parties distinctes :

La première partie porte sur la synthèse de deux dérivés d'indolocarbazoles (deux régioisomères, analogues pyrazolones de la staurosporine) et leur évaluation en tant qu'inhibiteurs de la Kinase.

La deuxième partie porte sur la synthèse de nouveaux dérivés de la quinoléine et leur étude théorique par la théorie fonctionnelle de la densité (DFT).

Le manuscrit est structuré en **cinq chapitres**, dont **le premier** est consacré à une étude bibliographique sur les protéines kinases. Une description de ces enzymes, de leur rôle biologique dans l'organisme et des principaux inhibiteurs des protéines kinases décrits dans la littérature y est présentée.

Le deuxième chapitre porte sur les méthodes de synthèse chimique, classiques et récentes des indolocarbazoles, qui forment une famille particulière des inhibiteurs de la kinase. Ce sont des analogues de la staurosporine qui est un alcaloïde, isolé par un groupe de chercheurs japonais en 1977, à partir des bactéries *Streptomyces staurosporus* (Omura *et al.* **1977**) et dont la structure a été publiée en 1994 (Funato *et al.* **1994**) et la synthèse totale publiée en 1996 (Link *et al.* **1996**). Les activités biologiques des indolocarbazoles extrêmement intéressantes y sont aussi mentionnées.

Le troisième chapitre est consacré aux méthodes de synthèse des dérivés de la quinoléine, auxquels un intérêt particulier est porté par la communauté scientifique, vu l'intérêt biologique, y compris comme inhibiteur des protéines kinases (Kumar *et al.* 2009, Afzal *et al.* 2015, Hu *et al.* 2017,). Les méthodes de synthèse classiques et récentes y sont présentées.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit, présente les objectifs de ce travail, la conception des molécules cibles, l'analyse rétrosynthétique et les diverses voies de synthèse explorées seront présentées ainsi qu'une discussion des résultats obtenus. Il est réparti en deux volets. Le premier volet concerne la synthèse de deux dérivés régioisomères, analogues de pyrazolones glucosylés portant une β -D-glucosyle de la staurosporine aglycone K252c. L'évaluation antiproliférative des formes protégées (OBn) **10** et **18** et déprotégées (OH) **11** et **19** de ces deux composés a été réalisée et les résultats obtenus sont présentés et discutés. (**Figure 1**)

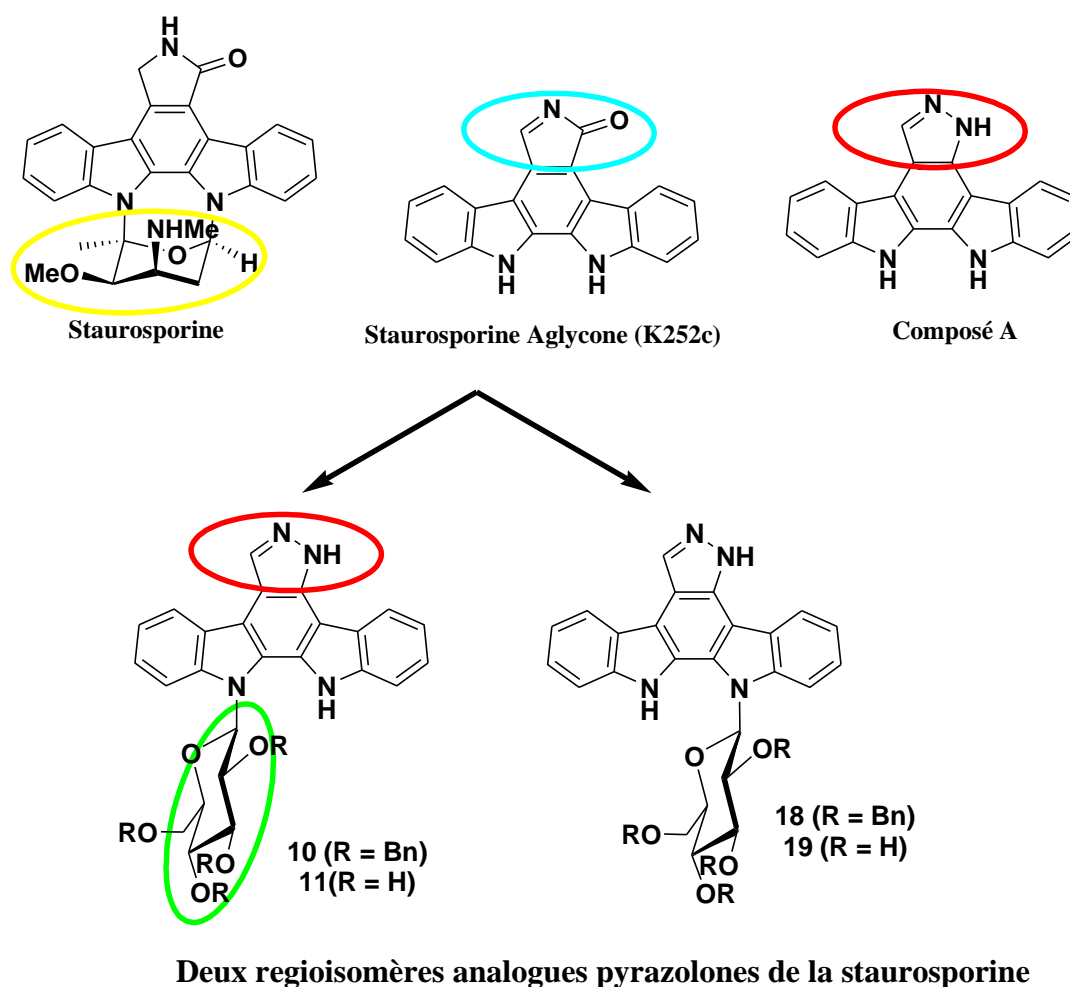


Figure 1 : Conception d'analogues pyrazolone glucosylés de la staurosporine.

Le deuxième volet rapporte la synthèse de nouveaux dérivés de la quinoléine obtenus en une seule étape (**Schéma 2**) par la réaction de Skraup légèrement modifiée. Une étude théorique par la DFT (Density Functional Theory) pour expliquer et confirmer les résultats expérimentaux a été menée et les résultats sont présentés.

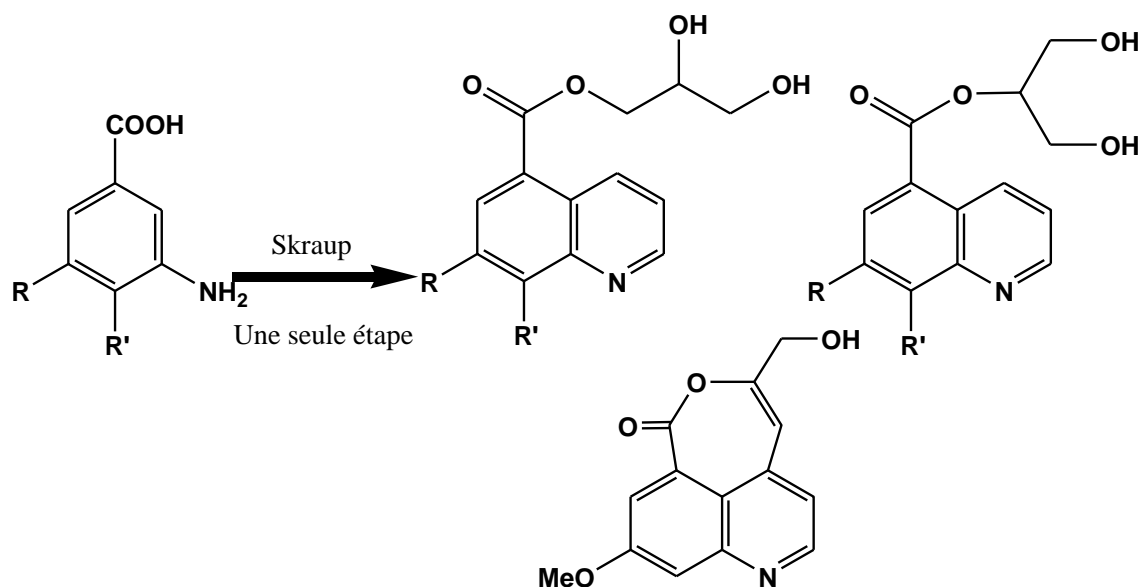


Schéma 1: nouveaux dérivés de la quinoléine estérifiée par le glycérol

Le cinquième chapitre est consacré aux protocoles expérimentaux suivis.

Les travaux réalisés au cours de la première partie ont conduit à une publication intitulée «Synthesis and antiproliferative evaluation of glucosylated pyrazole analogs of K252c» *Tetrahedron* 74, 892-901, **2018**, dont une copie figure en annexe, et les travaux réalisés au cours de la deuxième partie sont en cours de correction pour une prochaine soumission.

Chapitre I

Les protéines Kinases

I. 1. Introduction à la signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire est le système de communication qui régit les activités vitales des cellules et coordonne tous les processus qui s'y développent tels que les métabolismes, développements et organisation des activités cellulaires. La perturbation ou le dysfonctionnement dans le traitement de la signalisation cellulaire peut induire de graves pathologies telles que le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives.

L'aptitude des cellules à discerner leur microenvironnement et à apporter une réponse adéquate «transduction du signal» aux différents stimulus, serait donc d'une importance majeure dans la vie des organismes multicellulaires dont fait partie l'être humain. La régulation des voies de signalisation cellulaire se retrouve donc au front de la lutte contre les maladies générées par la perturbation de ces voies et est devenue un moyen de prévention et/ou de traitement de certaines maladies telles que le cancer. Une connaissance préalable des principaux agents de régulation ainsi que des voies impactées par la régulation devient alors indispensable.

Parmi les principaux agents de régulation connus, notre étude sera principalement portée sur les protéines kinases qui ont été identifiées pour la première fois à la fin des années 1950 par Edmond H. Fischer et Edwin G. Krebs (Nobel de physiologie et médecine en 1992 (Fischer *et al.* **1955** et **1959**, Krebs *et al.* **1958**).

Depuis ce temps-là, les chercheurs doublent d'efforts autour de cette famille de protéines, aussi bien les biologistes qui essaient d'expliquer au mieux l'implication des protéines kinases dans les processus biologiques que les chimistes qui tentent de synthétiser de nouvelles molécules dans le but de développer de nouvelles thérapies.

I. 2. Les protéines kinases et la phosphorylation

Les protéines kinases (PKs) constituent l'une des plus grandes familles de protéines identifiées, elles sont présentes chez tous les eucaryotes. En 2002 Manning et al. a recensé 518 gènes codants les protéines kinases chez l'homme (dont 478 gènes de protéines kinases humaines typiques et 40 atypiques) constituant environ 2% du génome humain.

Les PKs jouent le rôle de médiateur dans la plupart des transductions du signal dans les cellules eucaryotes, en modifiant l'activité des substrats par phosphorylation. Elles contrôlent aussi d'autres processus cellulaires, y compris le métabolisme, la transcription, la progression du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, le mouvement cellulaire, l'apoptose, et la différenciation. La phosphorylation des protéines joue aussi un rôle critique dans

la communication intercellulaire pendant le développement, dans les réponses physiologiques, dans l'homéostasie et dans le fonctionnement du système nerveux et immunitaire.

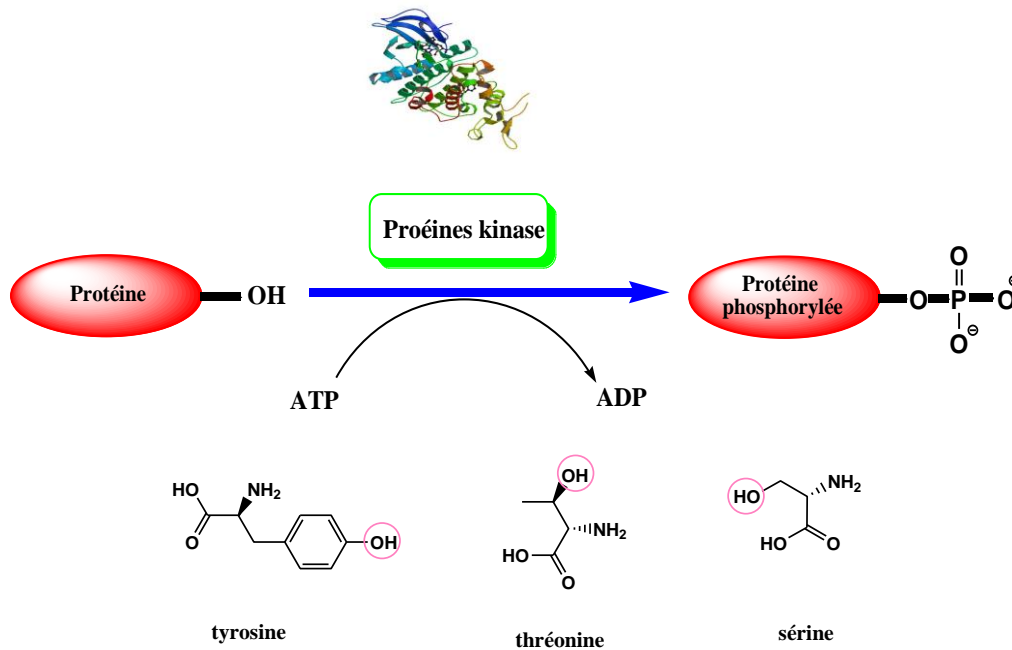


Schéma 2: Phosphorylation des protéines par les PKs.

La phosphorylation consiste en l'addition d'un groupe γ -phosphate (PO_3^{2-}), généré par l'ATP (qui serait réduit en ADP) à un substrat, qui peut être une protéine ou une petite molécule, telle le glucose ou l'adénine. (**Schéma 2**)

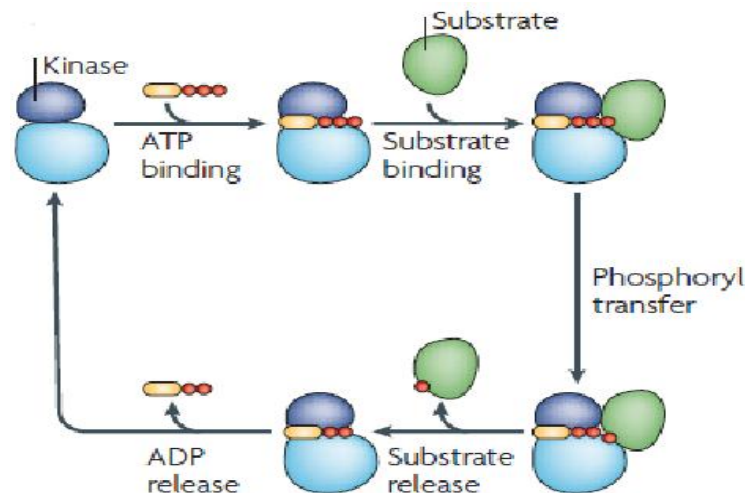


Figure 2: Le cycle catalytique de phosphorylation substrat par une kinase (Ubersax et al. 2007)

De nombreux enzymes sont activés/désactivés par phosphorylation (catalysée par les protéines kinases) ou déphosphorylation (catalysées par les phosphatases). Cette activation est due à la création d'un nouveau site d'interaction ou par changement de la conformation de

la protéine et s'effectue sur les chaînes latérales des acides aminés présentant un groupement –hydroxyle OH d'une sérine (Ser, S), thréonine (Thr, T) ou moins fréquemment des tyrosines (Tyr, Y).(Schéma 2)

I. 2. 1. Familles des protéines kinases humaines et Rôle enzymatique

Les ePK comprennent l'une des plus grandes familles de protéines et de gènes homologues (1,7% de gènes humains). L'analyse et la comparaison des séquences dans le fragment catalytique des 518 protéines kinases humaines réalisées par Hanks & Hunter en 1995 et achevées par Manning *et al.* en 2002 ont permis d'arranger 478 de ces enzymes et de les représenter sous la forme d'un arbre phylogénétique appelé le kinome (Figure 5). Chacune des kinases a été assignée à un groupe constitué de nombreuses familles et certaines familles sont divisées en plusieurs sous-familles regroupant les kinases ayant des caractéristiques structurelles communes et reflétant ainsi des fonctions connexes. Les autres 40 kinases restantes sont réparties en 13 familles de protéines kinases et classées comme protéines kinases atypiques (aPKs) car elles manquent de similitude de séquence avec le domaine ePK mais que les études ont rapportées comme ayant une activité kinase biochimique (Manning *et al.* en 2002).

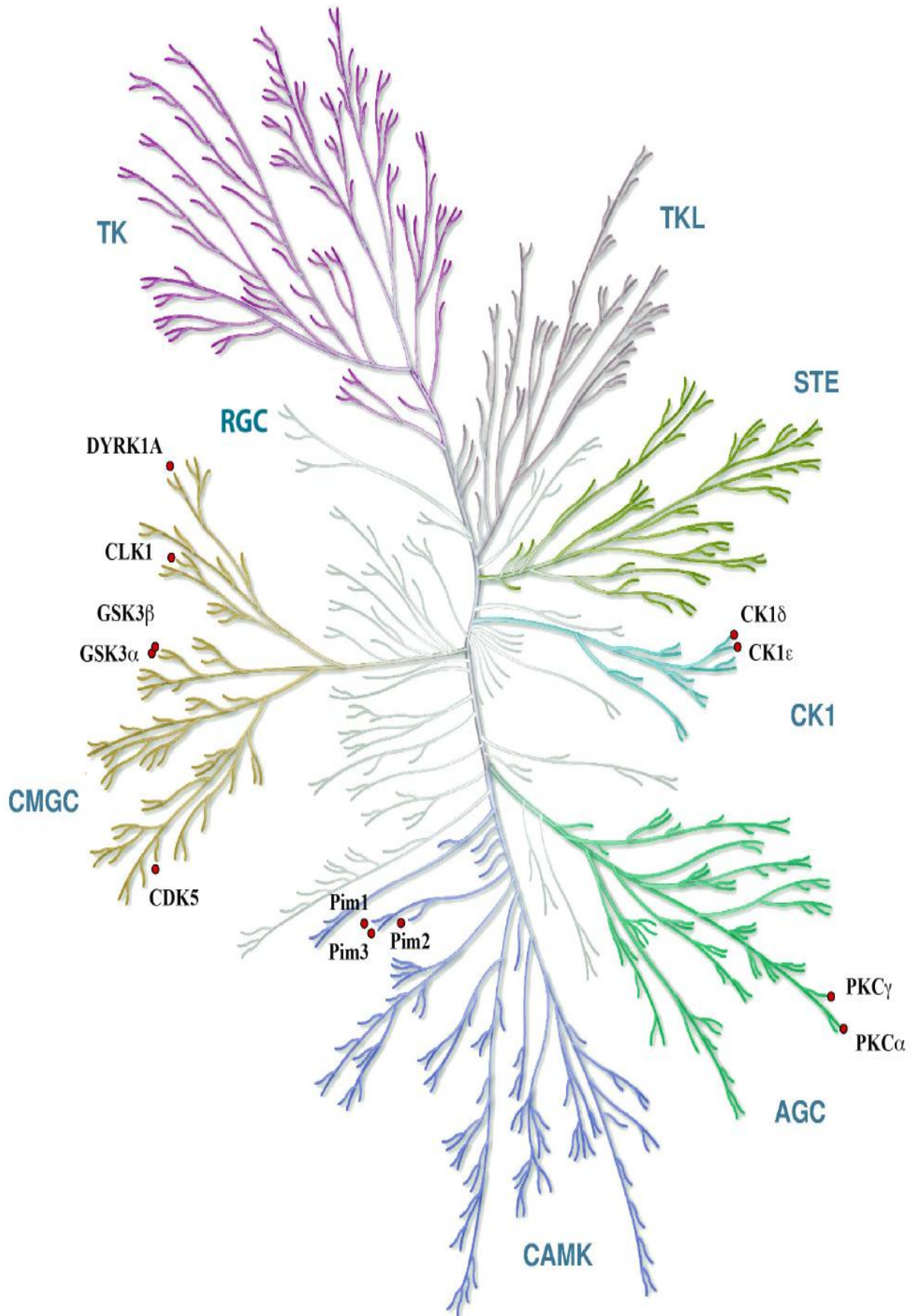


Figure 3 : Le kinome humain.

Groupe TK (Tyrosine kinases)

Les protéines tyrosine kinases ou plus simplement tyrosine kinases (TK) sont les enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate de l'ATP à un résidu tyrosine d'un substrat. Ce groupe est composé de 90 membres (Manning et al. **2002**), réparti majoritairement entre deux sous-groupes : les récepteurs tyrosine kinases (RTKs, 58 kinases) et les non-récepteurs tyrosine kinases (NRTKs, 32 kinases). L'activité des tyrosines kinases (TK) est soit au niveau de la partie intracellulaire du récepteur comme pour les RTKs, soit à l'intérieur du cytoplasme comme pour les NRTKs, ils jouent un rôle essentiel dans la transduction transmembranaire du signal, conduisant à la multiplication et à la différenciation cellulaires impliquées dans les processus de cancérisation. Comme ils interviennent dans divers processus biologiques comme la croissance, le métabolisme et l'apoptose.

Groupe TKL (Tyrosine-like kinase)

Leur nom provient de la forte similitude de séquence avec les tyrosine kinases. Ce groupe dénombre 43 kinases et fait partie des groupes les plus diversifiés, ce sont majoritairement des Ser/Thr kinases. Les TKL interviennent dans la régulation de la prolifération comme dans le cas des RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) (Deborah T.**2007**), ou dans l'activation des voies apoptotiques impliquées dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson comme dans le cas des MLK (Mixed Lineage Kinases) (Parkinson Study Group PRECEPT Investigators **2007**).

Groupe AGC

Ce groupe est nommé d'après les trois familles membres qui le composent : PKA, PKG et PKC, il comprend 63 kinases.

Les PKA: Les protéines kinases A sont des enzymes sérine/thréonine cytoplasmiques, ils sont activées par l'AMP cyclique (AMPc) suite à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G.

Les PKC : ce sont des sérine/thréonine kinases sensibles à la signalisation lipidique, impliquées dans différentes fonctions physiologiques de la cellule comme l'apoptose et la prolifération cellulaire. (Toker A. **1998**)

Les PKG : Les protéines kinase G sont des Ser/Thr kinases, activées par le GMPc. Elles sont impliquées dans plusieurs fonctions, y compris la biologie des muscles lisses, des plaquettes, le cerveau et les cartilages.

Groupe CAMK : (Ca²⁺/calmodulin-dependant protein kinase)

Le groupe CAMK ou CaM Kinases comprend 74 kinases ayant une grande variété structurelles et fonctionnelles. Les CAMKs sont régulées par un complexe Calcium/Calmoduline et sont impliquées dans les cascades de signalisation, métabolisme énergétique et dans l'apprentissage et la mémoire (Yamauchi T.2005), la dérégulation de l'activité des CAMKs entraîne de nombreuses pathologies telle que la maladie d'Alzheimer (Anshua G. 2015), le cancer (Rokhlin OW.2007) et l'arythmie cardiaque.

Groupe CK1 (Casein kinase 1)

Nommé ainsi parce que la caséine est utilisée comme substrat pour les tests de l'activité kinase de ce groupe. Avec 12 membres, c'est l'un des plus petits groupes de PKs mais essentiel chez tous les eucaryotes. Les CK1 sont impliquées dans le contrôle de la différenciation cellulaire, de la prolifération, de la ségrégation des chromosomes et des rythmes circadiens (Knippschild U. et al.2005).

Groupe CMGC

Ce groupe comprend 61 membres et son nom provient des initiales des quatre grandes familles de PKs qui le composent (cyclin-dependent kinase (CDKs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), glycogen synthase kinases (GSKs) et CDK-like kinases (CLKs ou CDC-Like kinase), ces kinases sont impliquées dans des cascades de transduction du signal, la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, et notamment dans la progression du cycle cellulaire et le contrôle métabolique.

Groupe « Autres » kinases (Others)

Ce groupe comprend 83 PKs, il se compose de plusieurs familles, et de kinases uniques avec un domaine ePK qui n'appartient à aucun des huit autres principaux groupes de kinases décrits. Certaines sont des cibles de choix dans les processus de cancérisation telles que les Aur et TOPK et d'autre sont impliquées dans la régulation de la synthèse de l'ADN telle que les kinases du cycle cellulaire CDC7.

Groupe STE

Ce groupe se compose de 47 kinases réparties entre trois familles principales (STE20, STE11 et STE7) qui s'activent séquentiellement pour ensuite activer la famille MAPK (Mitogen-activated protein kinases) qui appartient au groupe CMGC. Elles jouent un rôle fondamental dans la transduction de signaux extracellulaires et intracellulaires ce qui permet de transmettre les signaux de la surface de la cellule au noyau.

Groupe RGC (Receptor Guanylate Cyclase)

Avec ses 5 membres ce groupe constitue l'un des plus petits groupes de PKs avec des séquences du domaine similaires à celle des tyrosine kinases. Ils sont classés comme pseudokinases car ils sont dépourvus de certains résidus (DRH) critiques pour le transfert de phosphate (Manning et al., 2002). Ces enzymes sont des guanylyle cyclases qui convertissent le GTP en GMP cyclique (second messenger).

Groupe aPKs (Atypical kinases)

Ce groupe comprend 40 kinases, réparties sur 8 sous-groupes. Les aPKs n'ont pas de similarité de séquence avec les ePKs pour pouvoir y être classées, ils sont impliqués dans l'expression des protéines, la prolifération et la croissance cellulaire (Foster et al. 2010 et Zhou et al. 2010). Le dysfonctionnement des aPKs entraîne des manifestations pathologiques telles que l'immunodéficience et le cancer (Chiang GG. 2007).

I. 2. 2. Structure des protéines kinases

Les analyses de séquence peptidique des protéines kinases chez les eucaryotes ont permis de mettre en évidence la présence d'un noyau catalytique se constituant de 11 sous-domaines conservés séparés par des régions de conservation inférieure (Hanks et Hunter, 1995). Ce noyau catalytique lie l'ATP avec les cations Mg^{2+} et catalyse la phosphorylation des substrats.

Ce n'est que dans les années 90, que les premières structures cristallines des domaines kinases ont été élucidées par les rayons X. D'abord, la kinase PKA, (cAMP-dependent protein kinase ou protein kinase A, Ser/Thr kinase) par Knighton *et al.*, en 1991 (code PDB : 2CPK), ensuite la protéine tyrosine kinase (PTK) du récepteur de l'insuline IRK, par Hubbard *et al.*, en 1994 (code PDB: 1IRK).

Ces structures ont révélé que tous les domaines PKs sont constitués principalement de deux lobes (N-terminal ou NH₂-terminal et C-terminal ou COOH-terminal), reliés par une petite chaîne peptidique appelée région charnière (hinge), qui constitue le site de fixation de l'ATP, avec de petites différences structurales, ce qui assure une catalyse et une régulation de manières différentes selon le rôle biologique de chaque protéine kinase.

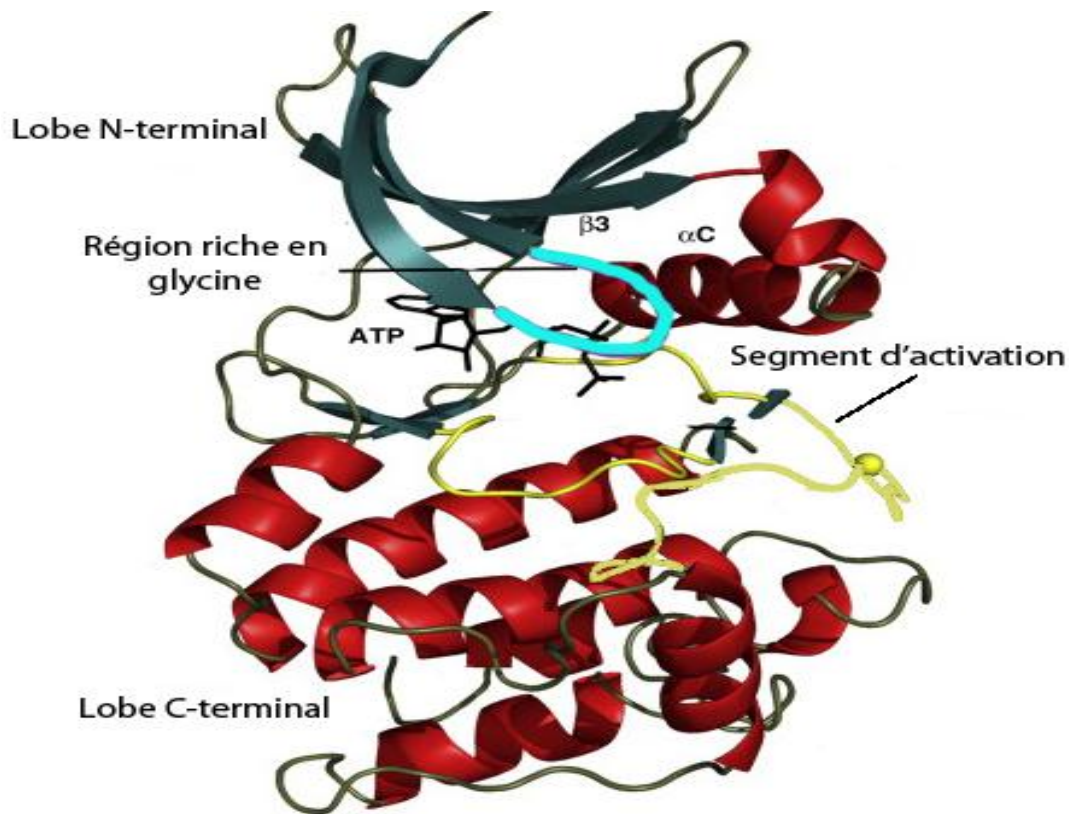


Figure 4 : Structure générale des protéines kinases.

I. 2. 2. 1. Le lobe N-terminal

C'est le plus petit des deux lobes (sous-domaines I-IV), il contient un feuillet β antiparallèle à cinq brins (β 1- β 5) avec au moins une hélice α (sous-domaines III). L'hélice α C contient un glutamate conservé qui forme une liaison ionique avec une lysine conservée (feuillet β 3 sous domaine II). Cette liaison ionique (pont Lys-Glu) permet la stabilisation et l'orientation des groupements phosphates de l'ATP, une boucle riche en Glycine (boucle P ou boucle G) se situant entre les brins β 1 et β 2 (sous-domaine I) ce qui permet de stabiliser l'adénosine de l'ATP, et contient un important résidu hydrophobe à son extrémité, ce qui contribue à la coordination des phosphates de l'ATP (Nolen et al., **2004**; Taylor et Kornev, **2011**). Ce lobe est la partie la plus flexible du lobe N, qui se replie sur le nucléotide positionnant le γ -phosphate de l'ATP pour la catalyse. Après l'extrémité N-terminale de la

région charnière se trouve un résidu appelé « gatekeeper », cet acide aminé est généralement un peu encombrant et est toujours orienté vers l'intérieur de la cavité déterminant ainsi la taille du site de liaison de l'ATP, il est donc particulièrement important pour la liaison et la spécificité des inhibiteurs de kinases.

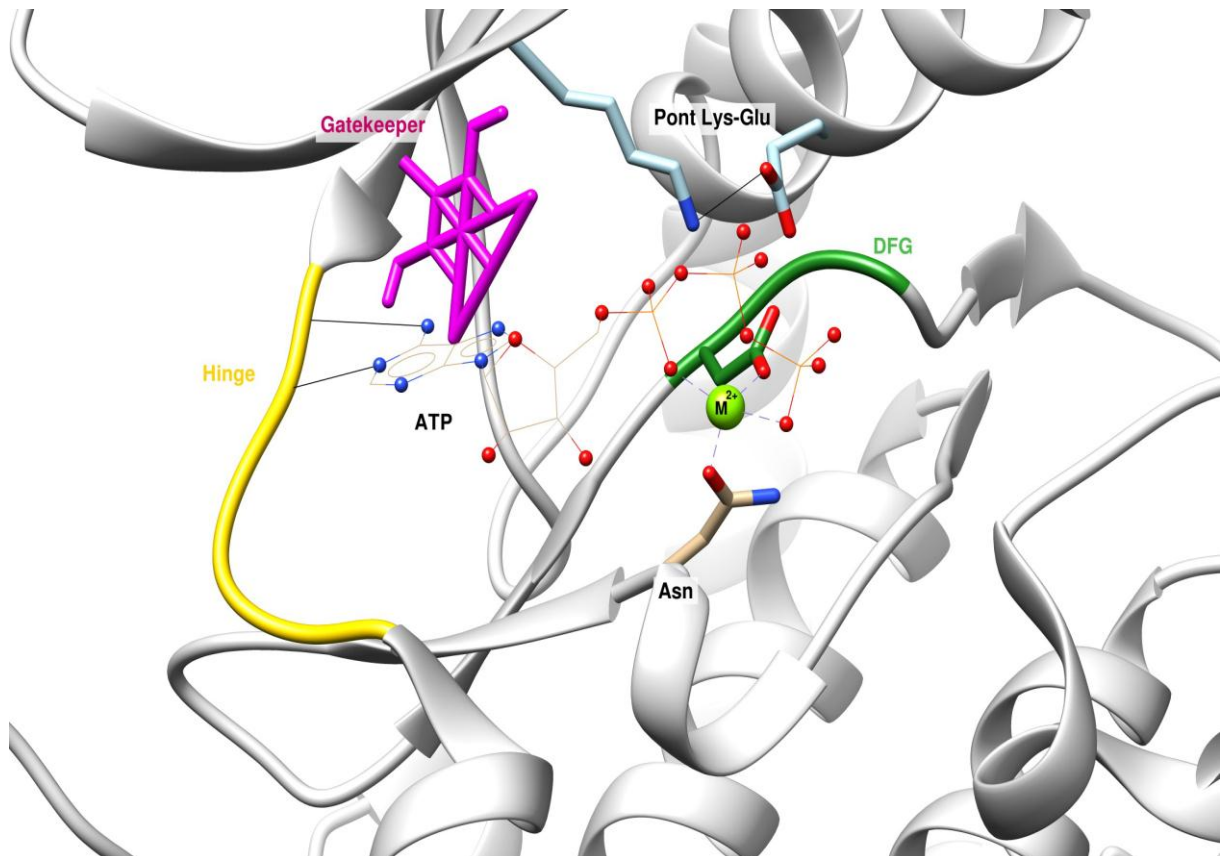


Figure 5 : Représentation générale du site actif d'une kinase. (Source PDB : code 4WB518)

La molécule d'ATP est représentée en fils avec les atomes en bille. Le DFG est en vert. La région charnière est en jaune (Hinge). Les liaisons hydrogènes sont en traits pleins. Les liaisons de coordinations sont en pointillés. Le gatekeeper est en rose. Les résidus du pont Lys-Glu sont en bleu clair.

I. 2. 2. 2. Le lobe C-terminal

Le lobe C-terminal est le plus grand et le plus stable des deux lobes (sous-domaines VIa-XI), il est principalement formé par des hélices α et deux brins β . Il forme le noyau de la kinase et sert également de surface d'ancrage pour les substrats peptidiques.

Le lobe C contient la grande partie de l'outil catalytique associée au transfert du phosphate de l'ATP au substrat protéique. La boucle catalytique et la boucle d'activation (boucle A), cette dernière commence par les motifs peptidiques Asp-Phe-Gly (motif DFG) et termine par les

motifs Ala-Pro-Glu (APE), le résidu Asp du motif DFG est capitale pour la chélation d'un des ions Mg^{2+} liés à l'ATP à travers des ponts salins, pour positionner et stabiliser les groupements phosphates de l'ATP pour la catalyse.

Ce segment est présent chez toutes les kinases constituant une des particularités de cette famille d'enzymes (Nolen *et al.*2004).

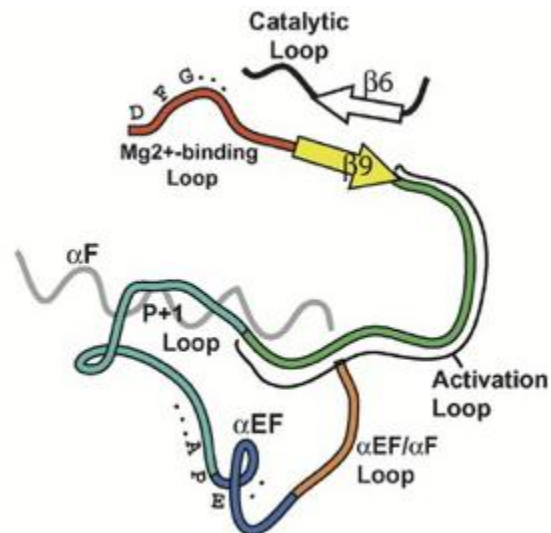


Figure 6 : Définition du segment d'activation (boucle A). (Nolen *et al.*2004)

I. 2. 2. 3. Site de fixation de l'ATP

Une petite chaîne polypeptidique flexible (appelée région charnière, «linker» ou «hinge») se situant entre les deux lobes (sous-domaine V) fonctionne comme une charnière et permet la rotation des lobes et l'ouverture ou la fermeture de la poche de liaison ATP. La région charnière permet la fixation de l'ATP en formant deux liaisons hydrogènes entre l'adénosine de l'ATP et les résidus peptidiques de cette dernière.

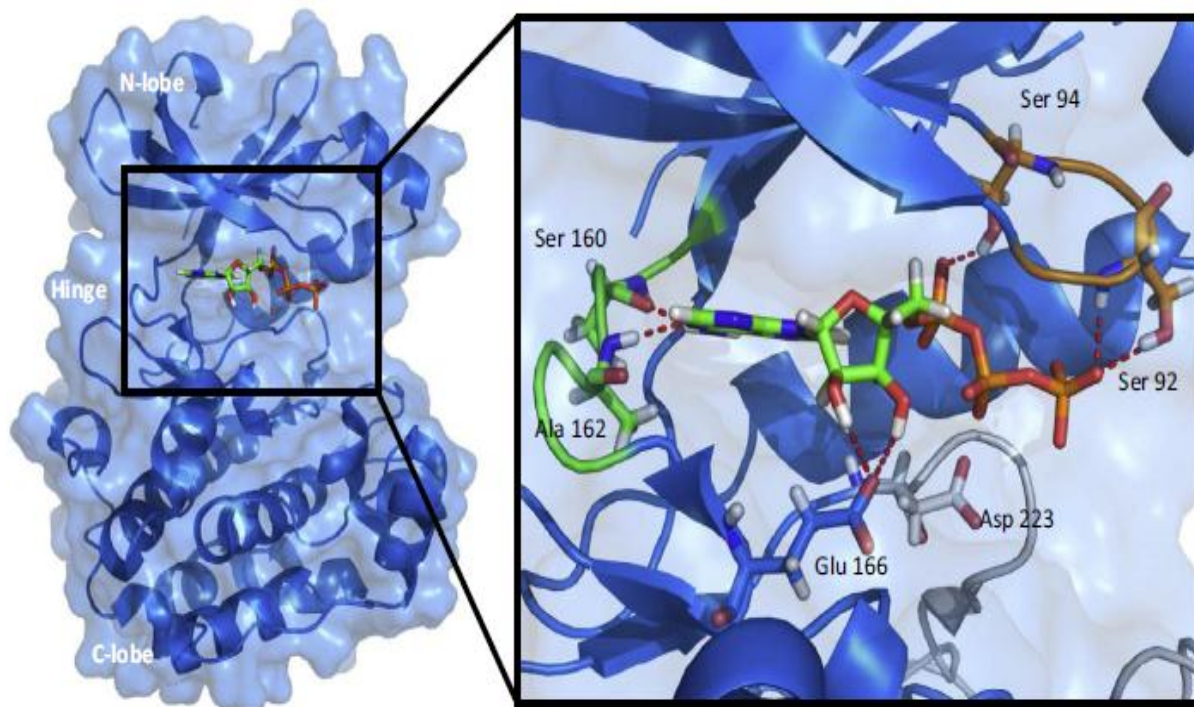


Figure 7: Structure co-cristalline de PDK1 avec ATP (source PDB : code 4RRV) (Wu et al. 2015)

Les séquences d'acides aminés de cette région charnière sont bien conservées pour la plupart des protéines kinases ce qui confirme l'importance de celles-ci dans l'activité des PKs et comme étant une cible privilégiée pour la conception d'inhibiteurs de PKs compétitif de l'ATP.

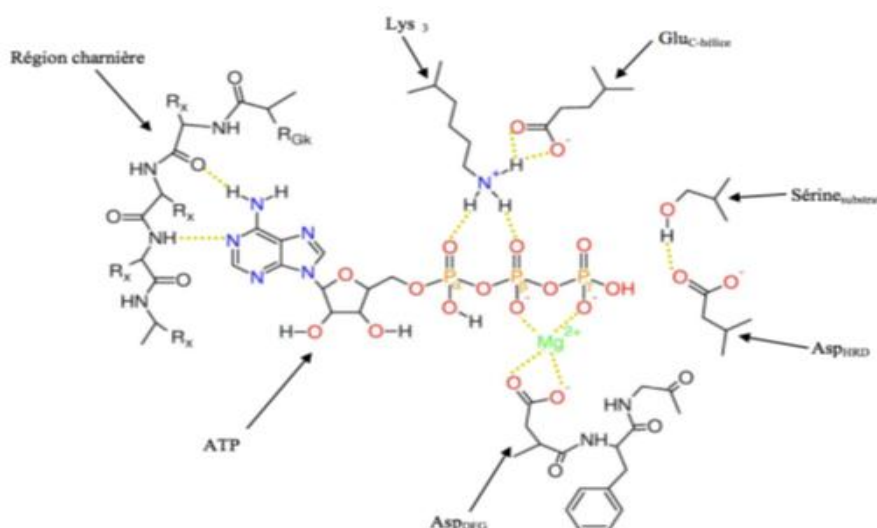


Figure 8 : Représentation 2D du positionnement de l'ATP, et du résidu phosphorylable sur le substrat (*Sérine_{substrat}*), dans le site catalytique et rôle supposés des quatre résidus catalytiques (*Lys₃*, *Gluc-hélice*, *Asp_{DFG}*, *Asp_{HRD}*). Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés jaunes. Les résidus du lobe C-terminal stabilisant le ribose ne sont pas représentés.

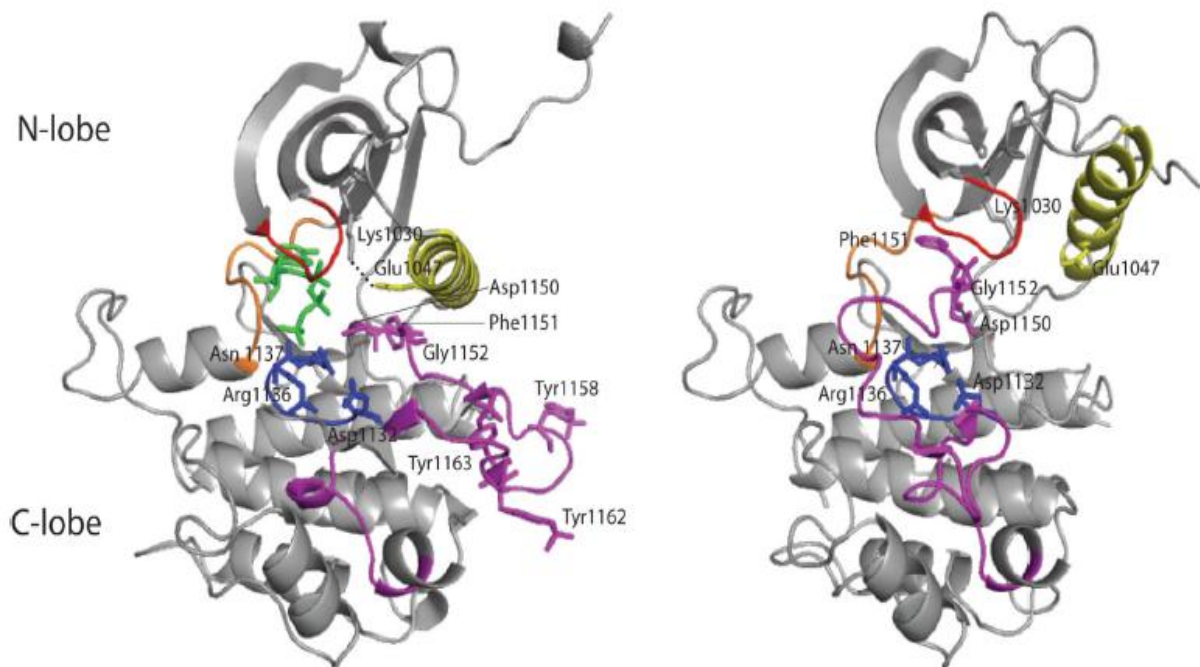
I. 2. 3. Nomenclature et conformation

I. 2. 3. 1. Conformation inactive

I. 2. 3. 1. 1. Conformation inactive C_{helix} out

Dans cette conformation, les phosphates α et β de l'ATP ne sont pas alignés pour la catalyse, du fait qu'ils ne sont pas stabilisés par la liaison ionique créée par la formation du pont salin, qui s'effectue entre la Lysine du brin $\beta 3$ et l'acide glutamique de l'hélice αC , (le pont Lys $_{\beta 3}$ -Glu $_{C\text{-hélice}}$ est rompu suite au recul de la c-hélice par rapport au site catalytique).

La boucle d'activation (A-loop) change aussi de position par rapport à celle adoptée dans la conformation active, empêchant ainsi le substrat de se fixer, néanmoins dans cette conformation, l'accès au site de fixation de l'ATP est dégagé.



A: active insulin receptor kinase

B: inactive insulin receptor kinase

Figure 9 : La conformation des états inactifs (source PDB: code 1IRK) et actifs (source PDB: code 1IR3) du domaine kinase dans IR. Les éléments de signification spéciale sont surlignés en couleur: C-hélice (jaune), P-boucle (rouge), région charnière (orange), boucle catalytique (bleu), boucle d'activation (violet). La ligne pointillée indique le pont de sel entre Glu1074 de l'hélice C et Lys1030 (Duong-Ly et al. 2013)

I. 2. 3. 1. 2. Conformation inactive DGF out

Dans la conformation active des kinases, le résidu Asp du motif DFG pointe vers le site de liaison de l'ATP, tandis que dans la conformation inactive, l'aspartate de la séquence DFG et la reste de la A-Loop pointent vers l'extérieur du site ATP, empêchant ainsi la

fixation du substrat. La phénylalanine de la séquence DFG (qui ne participe pas dans la catalyse de la phosphorylation) subit une rotation de 180° et sort de la poche hydrophobe pour aller se positionner dans le site de fixation de l'ATP créant une petite poche hydrophobe et bloquant stériquement l'accès de l'ATP a ce site. On parle de configuration « DFG-out » (ou « Pheout ») représentée sur la Figure 9A.

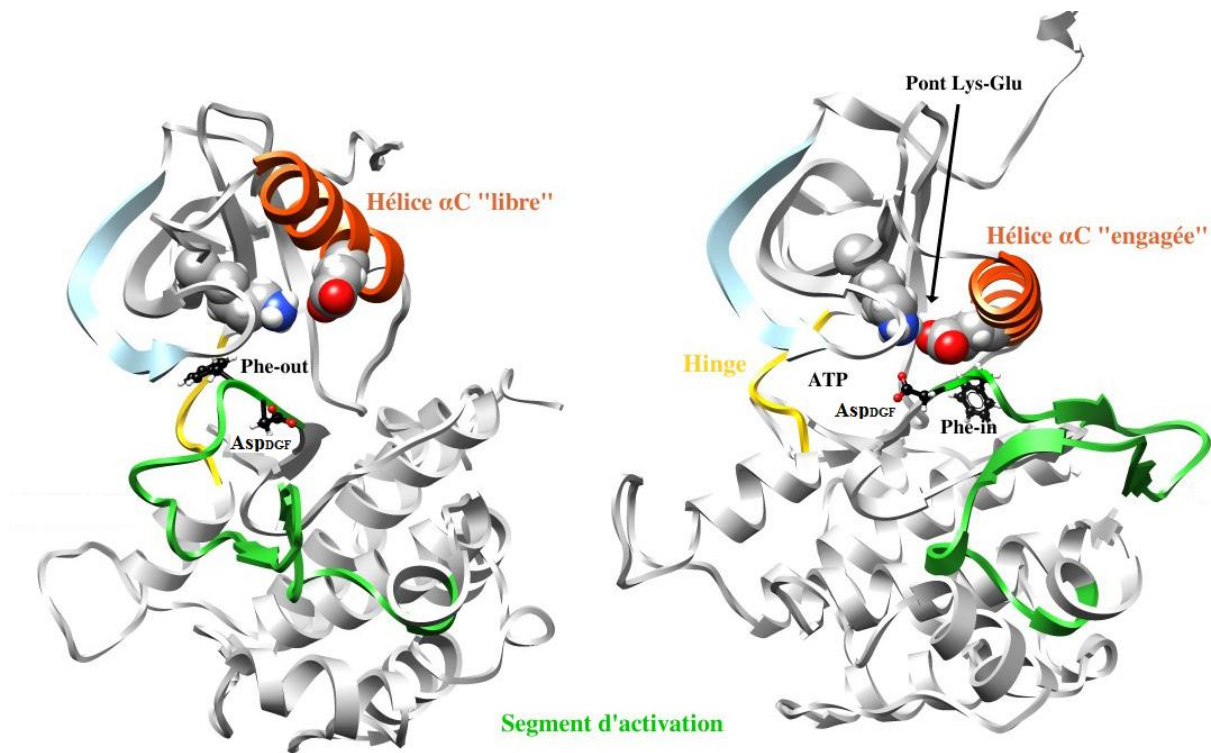


Figure 10 : Eléments caractéristiques d'une conformation inactive (A) (Source PDB : code 1IR3) et active (B) (Source PDB : code 1IRK) d'une kinase.

I. 2. 3. 2. Conformation active et mécanisme de la catalyse

Le mécanisme de la catalyse des différentes protéines kinases est très similaire, à l'exception de quelques spécificités, il résulte des contraintes sur l'arrangement spatial des résidus impliqués dans la catalyse constituant le noyau catalytique, et qui résulte par le transfert du γ -phosphate de l'ATP à l'hydroxyle du substrat (tyrosine ou autre) en présence d'ions métalliques divalent (Mg^{2+}).

L'adénine de l'ATP forme des liaisons hydrogène avec les résidus de la région charnière entre les deux lobes de la protéine kinase dans une poche formée de résidus **hydrophobes**.

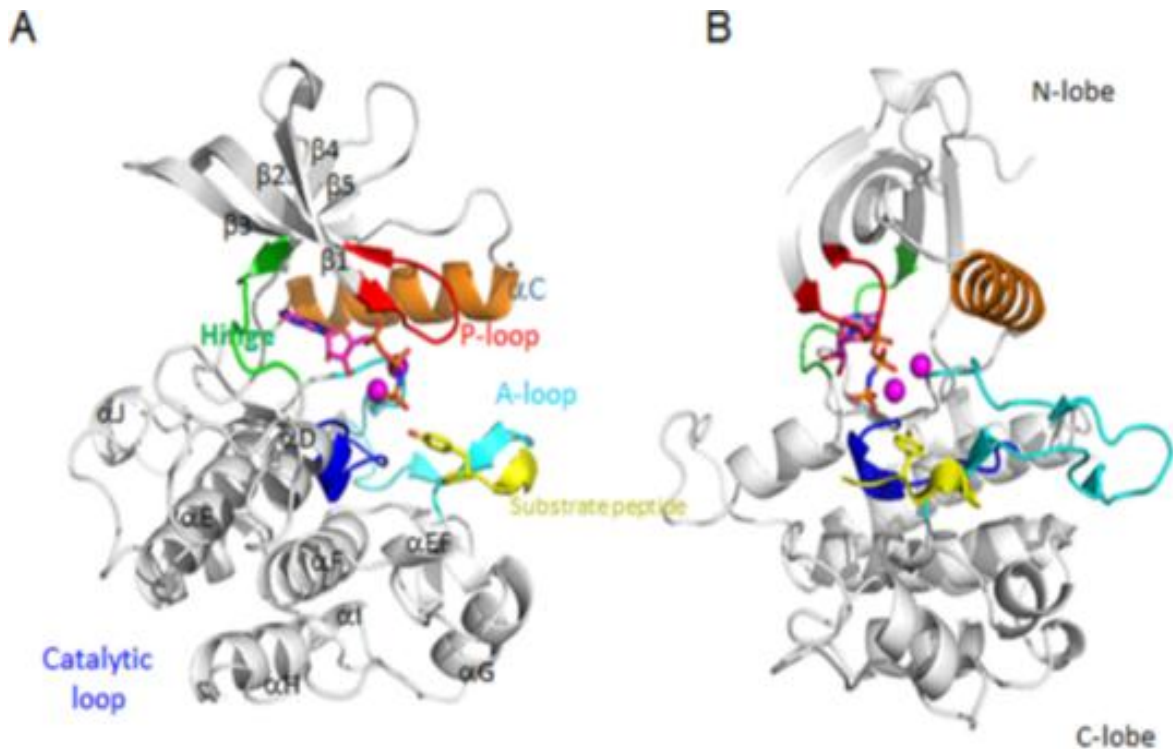


Figure 11 : La conformation active des protéines kinases (Récepteurs de l'insuline : InsR).
 (A) Vue avant (B) Vue latérale (Source PDB : code 1ir3)

Le ribose de l'ATP forme des liaisons hydrogène avec les résidus du lobe C-terminal dans une poche dite “ **Sugar pocket**”

Le bon positionnement de l'hélice αC met le résidu hautement conservé acide glutamique ($\text{Glu}_{C\text{-helice}}$) et une Lysine située au milieu du brin $\beta 3$ ($\text{Lys}_{\beta 3}$) en interaction par un pont salin (liaison ionique), contribuant ainsi à la stabilisation des deux groupements phosphates α et β de l'ATP et facilitant ainsi le transfert du groupe phosphoryle γ

L'acide aspartique situé dans le motif conservé DFG (Asp_{DFG}) au début de la A-Loop est orienté vers la poche de liaison à l'ATP. Il interagit avec un cation Mg^{2+} qui chélate les phosphates β et γ de l'ATP pour assurer leur bon positionnement ou masquer la charge du phosphate γ lors de la phosphorylation (Adams *et al.* 2001).

L'acide aspartique situé dans le motif conservé HRD (Asp_{HRD}) sur le brin $\beta 6$ et qui fait partie de la boucle catalytique, oriente le groupe hydroxyle du substrat par chélation d'un autre cation Mg^{2+} facilitant ainsi l'attaque et la dissociation après le transfert.

Après la phosphorylation, suite au transfert du phosphate γ de l'ATP vers l'hydroxyle du résidu sérine (ou thréonine ou tyrosine) du substrat (Adams et al. 2001), le substrat phosphorylé et l'ADP issue de la réaction sont libérés

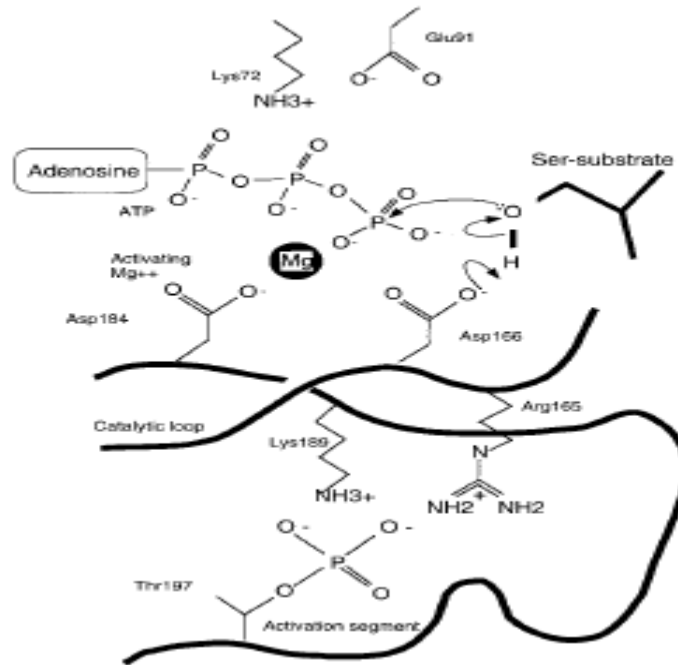


Figure 12: Mécanisme possible de phosphorylation (Johnson et al. 1996)

I. 3. Les inhibiteurs de protéines kinases et modèle pharmacophore

Le dérèglement ou la perturbation des voies de signalisation cellulaire, que ce soit par surexpression ou par mutation provoque une activation anormale de la phosphorylation chez les protéines kinases et induit des conséquences graves sur la santé humaine, car ils mettent ces dernières dans une position dite constitutivement activée et cela peut être la cause de nombreuses maladies graves telles que le cancer (Lugo et al. 1990. Nemoto et al. 1997. Yang et al. 2003. Dhillon et al. 2007), les maladies neurodégénératives (Wagey et al. 1998) et cardiovasculaires (Dhalla et al. 2010), d'où vient le concept de bloquer ou d'inhiber l'activité catalytique de ces protéines kinases défectueuses, en ce qui sera communément connue comme des "thérapies ciblées" (Blay et al. 2005).

L'ATP constitue, chez les PKs, un facteur commun dans le processus de signalisation cellulaire. De ce fait les chercheurs se sont inspirés de l'ATP pour la conception et la synthèse de petites molécules, qui seraient capables de se lier réversiblement au site actif des PKs empêchant ainsi l'ATP d'accéder à ce site ou d'en bloquer l'accès, empêchant par

conséquent la phosphorylation de substrats, ces petites molécules seraient donc inhibitrices de ces protéines kinases défectueuses.

La rapamycine (sirolimus, Rapamune®), du groupe pharmaceutique Pfizer, fut la première molécule à être approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en 1999, comme inhibiteur de la kinase mTOR. **(Figure 13)** Cette molécule est utilisée comme immunosuppresseur, mais les études ont révélé son impact négatif sur la fertilité des patients traités (Bererhi *et al.* 2003, Skrypek *et al.* 2007, Cure *et al.* 2004) ainsi que d'autres effets secondaires tels que la leucopénie (diminution du nombre de globules blancs) et l'hypertriglycémie.

En 2001, **l'Imatinib** (Glivec®), produit par le groupe pharmaceutique NOVARTIS, obtient une autorisation de mise sur le marché (AMM) par la FDA en tant qu'inhibiteur de l'activité de la tyrosine kinase (TK) BCR-ABL, pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC), un cancer du sang, avec beaucoup moins d'effets secondaires que les médicaments anticancéreux et la chimiothérapie. **(Figure 13)** De plus, les tests réalisés par la suite ont révélé son efficacité contre la prolifération des tumeurs stromales gastro-intestinales appelées GIST (Gastro Intestinal Stromal Tumors).

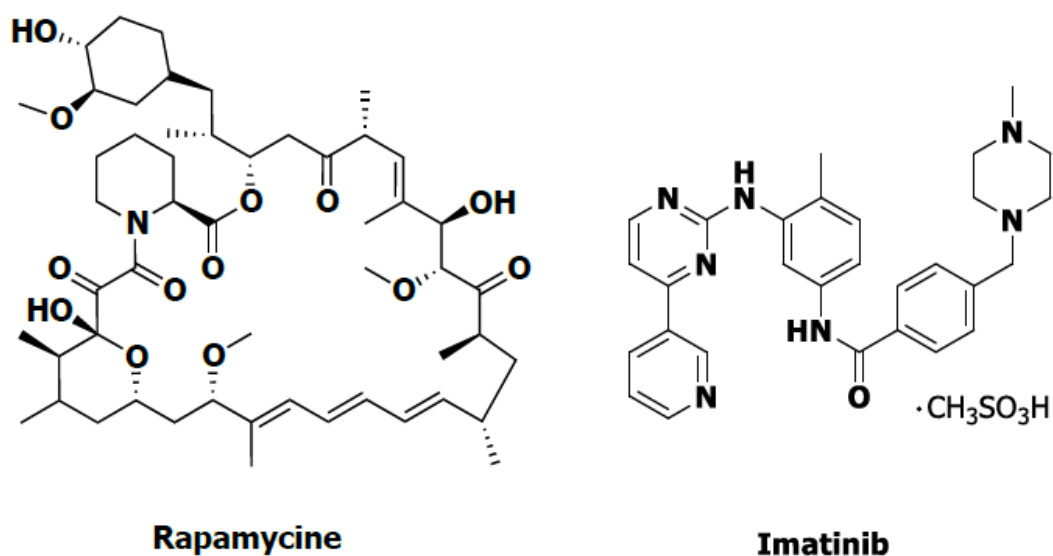


Figure 13 : Structures de la rapamycine et de l'imatinib.

Depuis, l'Imatinib a ouvert la voie à beaucoup d'autres médicaments pour être utilisé comme inhibiteurs de protéines kinases. On dénombre de nos jours une trentaine de molécules qui ont reçu leurs AMM (Wu *et al.* 2015 et 2016). **(Figure 14)**

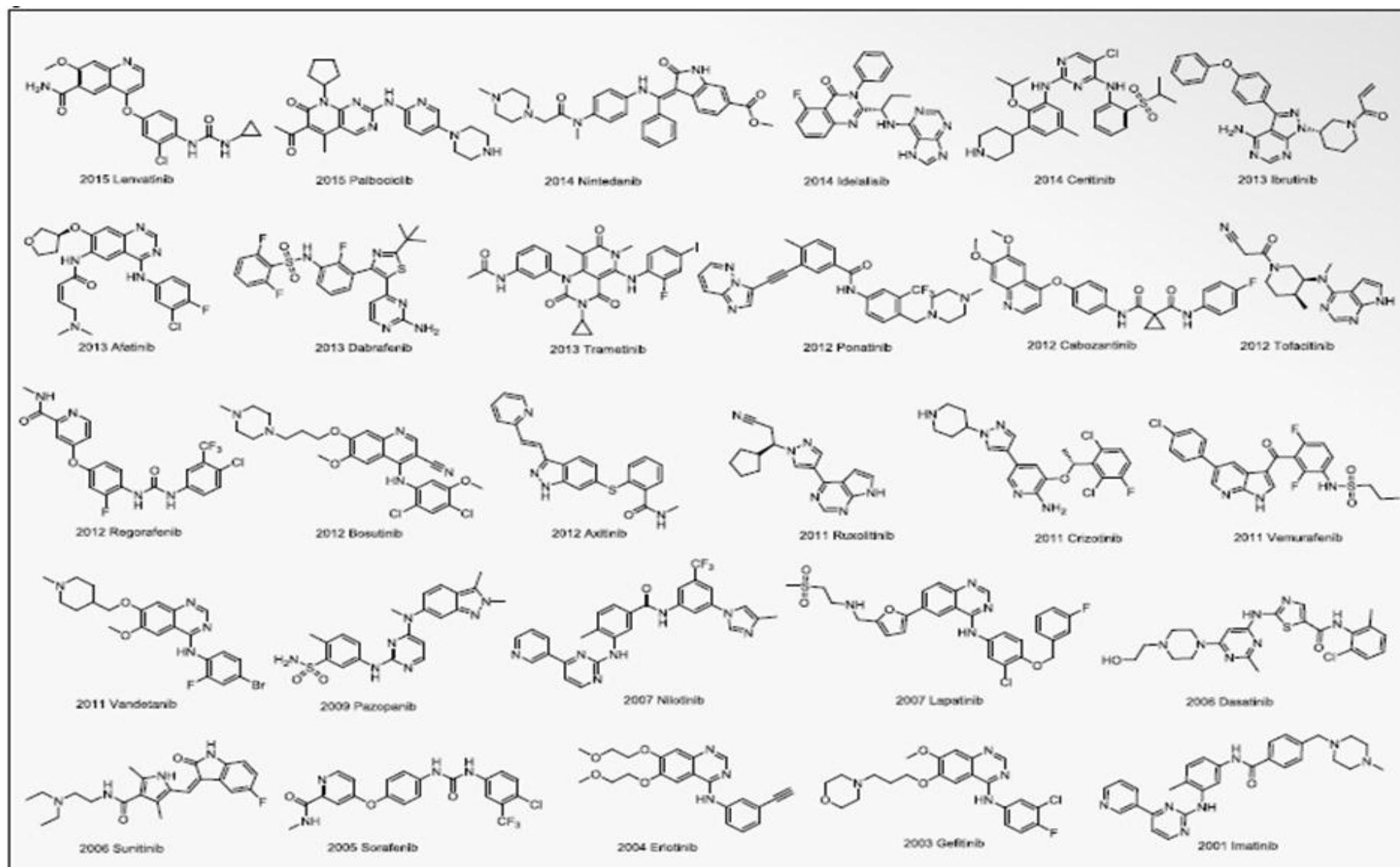


Figure 14 : Structures des 28 inhibiteurs de kinase homologués (Wu et al. 2016)

I. 3. 1. Types d'inhibiteurs

Selon le mode et/ou le site d'interaction des inhibiteurs avec les kinases cibles, les inhibiteurs sont classés en deux groupes : les inhibiteurs non covalents et les inhibiteurs covalents.

I 3.1.1 Inhibiteurs non-covalents

Ce sont des inhibiteurs qui se lient de façon réversible à leurs sites d'interaction. Ils sont répartis en trois sous-groupes :

Inhibiteurs de Type I, II et I^{1/2}

Ce sont des inhibiteurs qui occupent réversiblement le site de fixation de l'ATP et établissent des liaisons hydrogènes similaires à celles établies par l'ATP avec les résidus de la région charnière (ce sont les inhibiteurs ATP mimétiques), ce sont les inhibiteurs de types I, I^{1/2} et II.

Les inhibiteurs de type I se lient de façon réversible au site de fixation de l'ATP de leur protéine kinase cible à la conformation active (DFG-in et l'hélice α C engagée). Ils portent généralement un noyau hétérocyclique central qui mime l'adénine de l'ATP et forment de une à trois liaisons hydrogènes avec les résidus peptidique de la région charnière («hinge»), ces inhibiteurs sont donc compétitifs vis-à-vis de l'ATP. Actuellement, la plupart des inhibiteurs de kinase sont des inhibiteurs de type I.(Zhao *et al.* 2016) l'erlotinib et le géfitinib, sont des inhibiteurs de type I.

Les inhibiteurs de type II sont compétitifs de l'ATP et réversibles et se lient à la conformation inactive DGF-out des protéines kinase (Liu et Gray, 2006).

Parmi les 28 inhibiteurs commerciaux, 9 d'entre eux sont de Type II dont l'Imatinib (Zhang *et al.* 2009).

Les inhibiteurs de type I^{1/2} sont un sous-type des inhibiteurs de type I, ils se lient de manière réversible au site de fixation de l'ATP des kinases cibles à une conformation inactive (DFG-in typique d'une kinase active avec l'hélice α C en conformation *C-helix out* catalytiquement inactive) (Roskoski *et al.* 2016, Zuccotto *et al.* 2010).

Le vémurafénib est un inhibiteur de type I^{1/2} avec une conformation inactive «DFGin» (Cowan-Jacob *et al.* 2014)

Les inhibiteurs de type III et IV

Ce sont des inhibiteurs qui se lient à d'autres sites distaux de l'appareil catalytique (autre que le site de fixation de l'ATP) sans avoir des interactions avec les résidus de la région charnière, n'empêchant pas ainsi l'ATP de se fixer à son site de fixation (Ils sont dits

allostériques). Les inhibiteurs de type III et IV sont non compétitifs de l'ATP mais demeurent réversibles.

Les inhibiteurs de type III se lient exclusivement à des poches adjacentes au site de liaison à l'ATP et ceux de type VI se lient à des poches relativement éloignées de la poche de liaison à l'ATP, mettant la boucle catalytique (*A-Loop*) dans une conformation catalytiquement inactive (Cox *et al.* 2011) sans empêcher l'ATP de se fixer (Kirkland *et al.* 2009). Les inhibiteurs de type III n'établissent pas de liaisons avec les résidus peptidiques de la région charnière, ils sont dits allostériques et présentent plus de sélectivité en exploitant des sites de liaison et des mécanismes de régulation spécifique aux kinases cibles. (Barnett *et al.* 2005, Lindsley *et al.* 2005).

La rapamycine qui a été commercialisée comme immunosuppresseur et ses dérivés, qui ciblent spécifiquement la mTOR kinase, font partie des inhibiteurs de type III et IV (Wang *et al.* 2009 ; Yang *et al.* 2013).

Inhibiteurs de Type V

Ce sont des inhibiteurs qui occupent réversiblement deux sites distincts, ils occupent à la fois le site de fixation de l'ATP et une autre poche, ce sont les inhibiteurs de type V.

Ils sont capables de se lier à deux sites différents de la kinase de façon réversible. Ils possèdent généralement une extrémité ATP mimétique, qui offre une affinité accrue à l'inhibiteur, et une extrémité non-compétitive de l'ATP qui est dirigée vers une poche autre que celle de l'ATP pour offrir une sélectivité améliorée à l'inhibiteur. Les inhibiteurs connus de ce type peuvent être divisés en deux catégories: **les inhibiteurs bi-substrat** qui ciblent à la fois l'ATP et les sites de liaison du substrat et **les inhibiteurs bivalents** qui ciblent le site de liaison de l'ATP et toute autre surface sur la protéine kinase autre que le site de liaison du substrat. (Lamba *et al.* 2012).

I. 3.1.2 Les inhibiteurs covalents : Inhibiteurs de Type VI

Les inhibiteurs de type VI sont dits "irréversibles" parce qu'ils se lient de façon covalente à leurs cibles. Le mécanisme le plus commun est la réaction de Michael, dans laquelle l'inhibiteur agit comme un accepteur de Michaël (électrophile) qui implique l'addition d'un groupement hydroxyle (nucléophile) d'un résidu peptidique, tel que la cystéine, pour former des adduits d'une grande stabilité. L'afatinib et l'ibrutinib forment un exemple d'inhibiteurs covalents. (**Figure 16**)

Actuellement, la plupart des inhibiteurs de kinases approuvés sont des inhibiteurs ATP-compétitifs (Noble, *et al.* 2004), qui comprennent des inhibiteurs de type I, I^{1/2} et II qui se lient au site adénine de la poche ATP, il est donc évident que le site de fixation de l'ATP des protéines kinases demeure comme une cible privilégiée pour la conception rationnelle d'inhibiteurs de kinases (Figure 15).

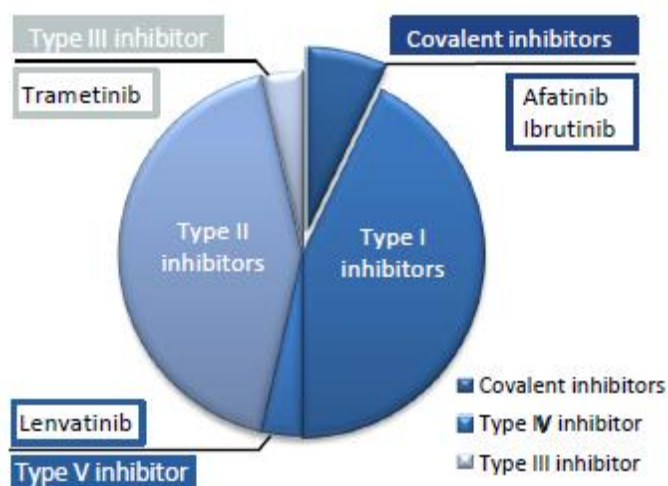


Figure 15 : Classification des inhibiteurs de kinases par mécanisme fonctionnel (Wu *et al.* 2016)

I. 3. 2. Développement du modèle pharmacophore

Concevoir et développer de nouveaux inhibiteurs de kinases plus sélectifs, dotés d'une meilleure affinité vis-à-vis de ces kinases et susceptibles d'avoir un débouché thérapeutique reste une tâche pénible pour les chimistes.

Dans le but de mieux comprendre les types d'interaction kinase-ligand, les chercheurs ont résolu des milliers de structures cristallographiques de complexes kinase/Inhibiteurs (ou kinase/ATP) de centaines de kinases humaines différentes disponibles dans la PDB (Zhao *et al.* 2016). Sur la base des données bio-informatique recueillies, un modèle pharmacophore pour la conception rationnelle d'inhibiteurs ATP-compétitifs a été construit par Traxler *et al.* 1996 Ils découpent le site de fixation de l'ATP en cinq régions: (**Figure 16**)

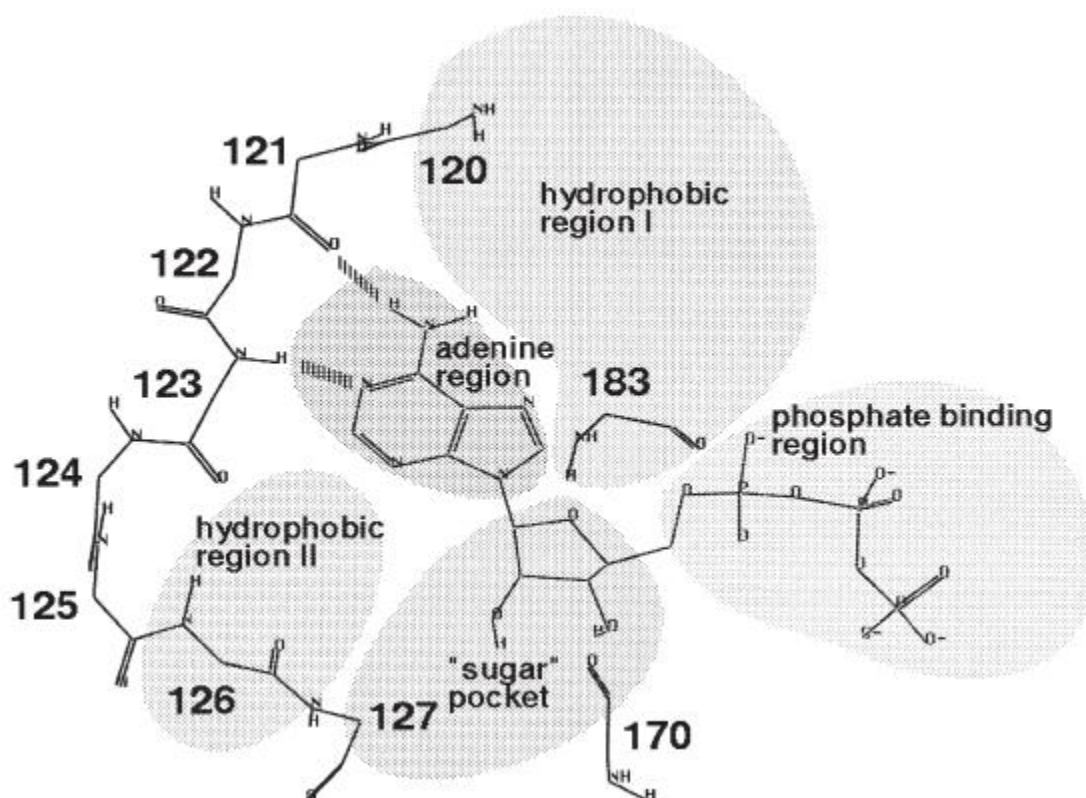


Figure 16 : Modèle pharmacophore de Traxler & Furet (numérotation PKA)

Région de l'Adénine

Cette région a généralement un caractère hydrophobe. Les ligands établissent des liaisons hydrogènes, dans un système donneur-accepteur, avec les résidus peptidiques de la région charnière (les azotes N1 et N6 du cycle adénine de l'ATP sont engagés dans des liaisons hydrogènes). C'est la zone cible de nombreux inhibiteurs puissants ATP-compétitifs.

Poche à sucre

Cette zone est de caractère hydrophile chez la plupart des PKs, elle est exploitée pour concevoir des inhibiteurs avec plus de sélectivité et d'affinité. L'utilisation d'isostères du ribose de l'ATP peut être envisageable (Traxler *et al.*, 1996).

Région hydrophobe I

La région hydrophobe I qui s'étend vers le doublet libre de l'azote N7 de l'adénine n'est pas utilisée par l'ATP dans la plupart des protéines kinases. Elle pourrait constituer une opportunité pour la conception de nouveaux inhibiteurs. La taille de cette poche varie en fonction de la taille du « gatekeeper », jouant ainsi un rôle important dans l'amélioration de la sélectivité de l'inhibiteur.

Région hydrophobe II

Cette région ressemble plus à une fente hydrophobe exposée au solvant, elle n'est pas utilisée par l'ATP mais qui pourrait permettre toutefois d'augmenter l'affinité de liaison de l'inhibiteur.

Région de liaison au phosphate

Hautement exposée au solvant, cette zone ne permet pas d'augmenter l'affinité de liaison de l'inhibiteur pour la kinase. Mais tant qu'elle contient des résidus peptidiques rarement conservés, cette région, pourrait être utile pour améliorer la sélectivité des inhibiteurs.

I. 4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une étude bibliographique pour décrire de façon générale, les kinases (structure, familles et rôle enzymatique) et donner un aperçu sur les inhibiteurs de kinases. Les différentes classes des inhibiteurs et les caractéristiques structurales qui leur permettent d'assurer leur rôle et ainsi expliquer l'utilité de synthétiser des molécules hétérocycliques aromatiques mimant l'adénine de l'ATP et/ou contenant une partie sucre mimant le ribose de l'ATP afin de favoriser l'ancrage des inhibiteurs potentiels dans le site ATP de la kinase.

Chapitre II

Les indolo[2,3-a]carbazoles

II. 1. Introduction

Une large gamme de dérivés naturels ou synthétiques d'indolocarbazole a montré des activités biologiques importantes telles que des propriétés antibiotiques et antitumorales (Prudhomme M.2004).

La staurosporine, fut la première à être isolée en 1977 par un groupe de chercheurs Japonais à partir des bactéries *Streptomyces staurosporus* (Omura et al. 1977), sa structure a été élucidée par analyse aux rayons-X en 1994 révélant un aminopyranose lié à un indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole par les deux azotes indoliques (Funato et al.1994). Sa synthèse totale a été publiée en 1996 (Link et al.1996). (Figure 17)

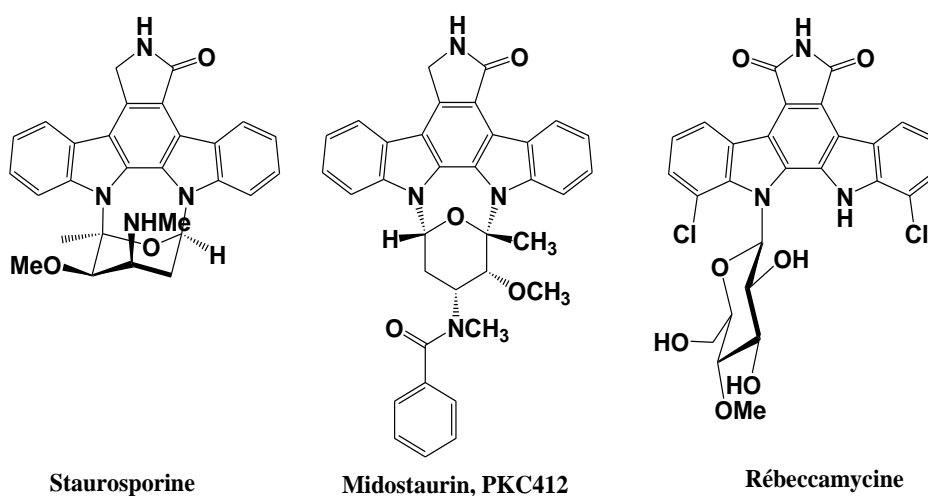


Figure 17 : Composés naturels d'indolocarbazole et dérivés synthétiques

Cet alcaloïde naturel s'est révélé doté de diverses activités biologiques, telles que l'activité antibiotique, antitumorale, hypotensive, antifongique, cytotoxiques, l'activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire et des protéines kinases C (PKC) (Omura et al.1977 et 1995, Tamaoki T.1986, Funato et al.1994, Prudhomme M.2004). Depuis, la staurosporine a été intensivement étudiée, sa biosynthèse, la synthèse chimique de ses analogues son activité biologique ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques. La staurosporine s'est avérée être un très puissant inhibiteur à large spectre de protéines kinase (Karaman MW.2008). Cependant, en raison de cette large gamme d'inhibition de la protéine kinase, la staurosporine est beaucoup trop toxique pour être utilisée comme médicament.

Par conséquent, de nombreuses études de relation structure-activité comprenant la modification de la partie hétéroaromatique et / ou de la fraction sucre ont été entreprises pour

améliorer le profil inhibiteur / pharmacologique de nouveaux analogues de la staurosporine et augmenter la sélectivité de ces analogues qui pourraient être utilisés en thérapie.

Cette approche a été couronnée de succès pour le midostaurin (PKC412) (Figure 19) qui est un inhibiteur de protéine kinase à ciblage multiple qui a récemment atteint le marché pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë avec mutation FLT3 en combinaison avec d'autres médicaments antitumoraux. Le midostaurin (RYDAPT®) a également été approuvé pour le traitement de la mastocytose systémique agressive, la mastocytose systémique avec néoplasme hématologique associé, ou la leucémie mastocytaire.

La rebeccamycine (une indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole) et ses dérivés, possédant une seule liaison glycosidique, agissent comme des composés antitumoraux efficaces en stabilisant le complexe clivable par l'ADN topoisomérase I, ils empêchent ainsi la réplication de l'ADN (Yamashita *et al.* **1992**).

Depuis quelques années, le développement des méthodologies de synthèse des produits naturels ont permis d'explorer et de mieux comprendre leurs biosynthèses et d'exploiter ces connaissances aussi bien dans les biosynthèses combinatoires des produits naturels que dans le développement de méthodes de synthèse chimiques mimant la biosynthèse. Ainsi, la biosynthèse de la staurosporine et de la rebeccamycine a permis de mettre au point la synthèse chimique.

II. 2. La biosynthèse des indolo[2,3-*a*]carbazoles

Les études réalisées En 1988 par Meksuriyen et Pearce portant sur la biosynthèse de l'indolocarbazole. (Meksuriyen, D. **1988** et Pearce, C. P. **1988**), en utilisant des précurseurs en tant que traceurs isotopiques, ont montré que la structure indolocarbazole de la staurosporine et de la rebeccamycine provenait de deux molécules de tryptophane, et que la fraction glucidique est dérivée du glucose et de la méthionine. (Yang, S. W. **1996** et Nakano H. **2009**). (Figure 20)

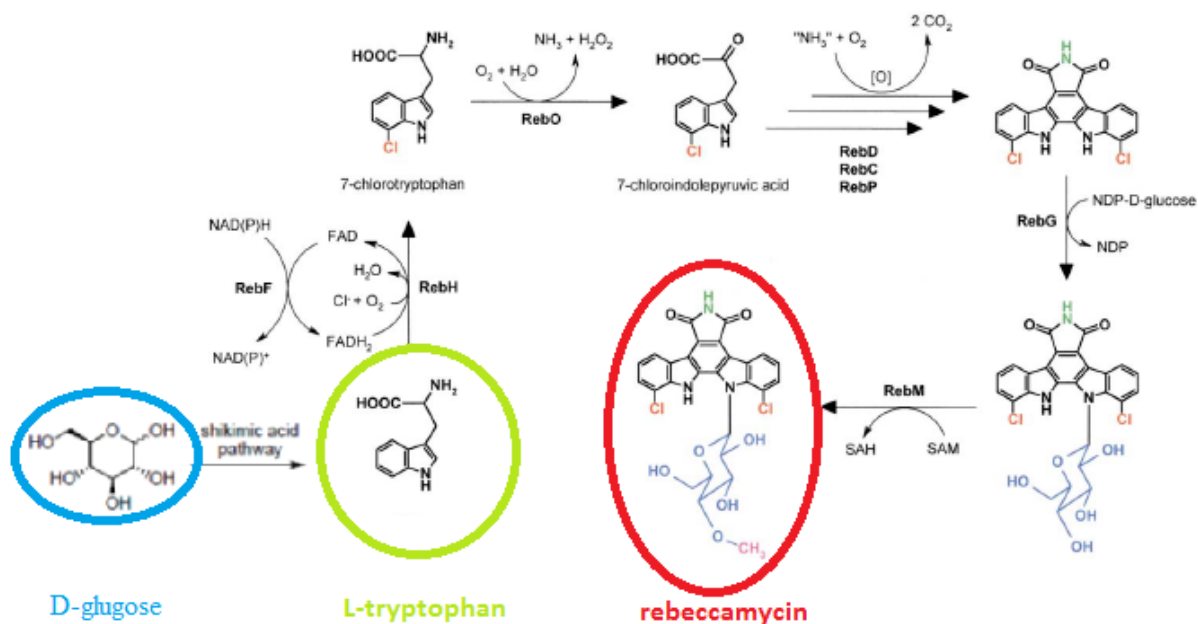


Schéma 3 : Voie biosynthétique de la rébeccamycine (Sánchez, C. 2002)

II. 3. Synthèse chimique des indolo[2,3-*a*]carbazoles

Vu l'intérêt thérapeutique apporté par les indolocarbazoles, leur synthèse chimique s'est développée de façon accrue. L'intérêt était au début entre 1950-1970, simplement porté au noyau indolocarbazole lui-même, puis depuis l'isolement de la staurosporine en 1977, la synthèse chimique de ses analogues a été intensivement explorée et a conduit à la mise au point de plus d'une dizaine de méthode de synthèse entre 1980 et 1995.

A partir de cette période, l'intérêt des chercheurs a été réorienté vers la synthèse des regioisomères (Delarue *et al.* 2009), l'amélioration des approches synthétique (Raju *et al.* 2015 et Borrero *et al.* 2015), l'étude des propriétés pharmacologiques de la staurosporine et ses analogues, la biosynthèse (Nakano *et al.* 2009), la biosynthèse combinatoire et l'extraction des analogues à partir d'autres sources naturelles où plus de 60 nouveaux indolocarbazoles naturelles ont été mises en évidence (Speck K. 2013).

Nous exposerons, les méthodes de synthèse établies et les récentes approches des indolocarbazoles.

II. 3 1 Synthèses du noyau indolo [2,3-*a*] carbazole

En 1956 Brunton a rapporté que la condensation du tétrahydrocarbazole avec l'acyloïne cyclique suivie d'une déshydrogénation conduit à l'indolocarbazole (Brunton, R. J. 1956). (Schéma 4)

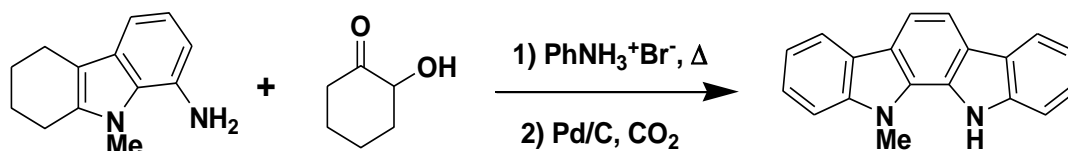


Schéma 4 : Synthèse de Winterfeldt.

Suite à ce résultat, d'autres chercheurs ont développé une nouvelle stratégie de synthèse basée sur une double indolisation de Fischer, par réaction de deux phénylhydrazines sur l'acycloïne cyclique, suivie d'une oxydation pour fournir directement l'indolo[2,3-a]carbazole. (Bhide G. V.1957, Mann F. G.1958 et Moldenhausser W. 1969) (Schéma 5)

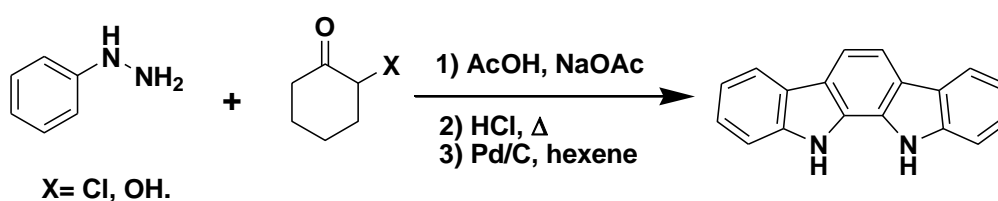


Schéma 5 : Synthèse de Bhide.

II. 3 2 Méthodes de synthèse des dérivés d'indolo [2,3-a] carbazole

Sur la **figure 18**, quelques stratégies synthétiques pour préparer le noyau indolo [2,3-a] carbazole basées sur des formations de liaisons clés, du type de structure synthétisée (aglycone) sont décrites et résumées. Ces méthodologies seront décrites et présentée plus en détail par la suite.

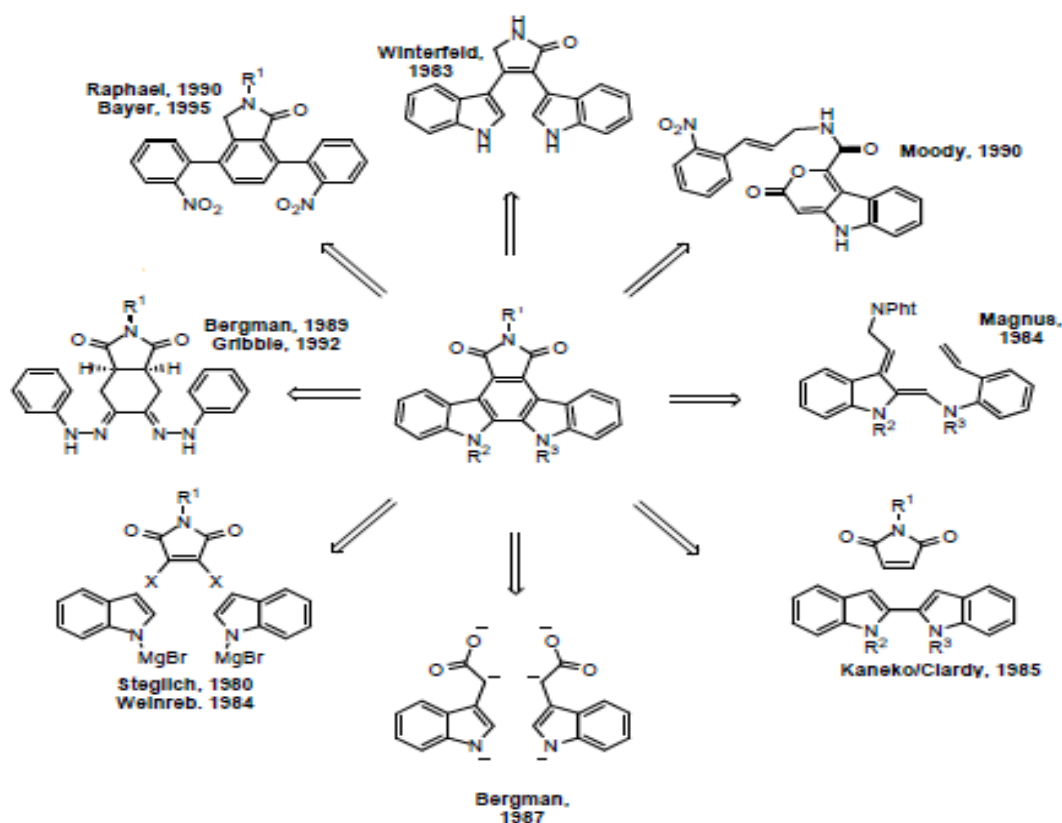


Figure 18 : Stratégies synthétiques pour préparer le noyau indolo [2,3-a] carbazole

II. 2. 2. 1. 1. Synthèse de Winterfeld

L'équipe de Winterfeld a publié en 1983 la première synthèse de K252c à partir d'un amide portant deux noyaux indoles **I-a** comme c'est montré dans le schéma 6 (Winterfeld E. 1983 et 1994). L'amide **I-a** est préparé à partir du chlorure d'acide et du tryptamine correspondants. Après une oxydation en dicétoammonium par DDQ, puis réduction au borohydrure de sodium, la synthèse du lactame **I-c** a été réalisée par réaction d'aldolisation intramoléculaire du cétoamide **I-b** puis suivie d'une désoxygénation par le titane (J.E. Mc Murry. 1974). La photocyclisation oxydative de **I-c** a entraîné l'indolocarbazole K252c (Staurosporine aglycone).

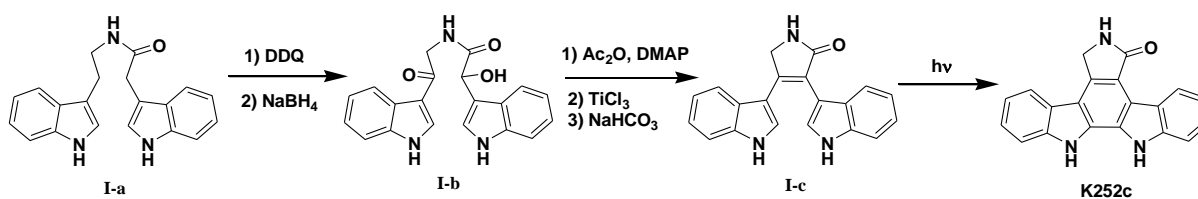


Schéma 6: Synthèse de Winterfeld.

II. 2. 2. 1. 2. Synthèse de Bergman & Pelcman

Bergman & Pelcman se sont inspirés de la biosynthèse des indolo[2,3-*a*]carbazoles qui se fait par condensation de deux tryptophanes, pour proposer une synthèse via la condensation de deux molécules de l'esters d'acide indole-3-acétique **II-a** ou de deux molécules de l'acide indole-3-acétique en présence d'iode, conduisant au diester **II-b** ou à l'acide bisindolesuccinique correspondant. Le chauffage de **II-b** avec la benzylamine a donné une succinimide, qui par oxydation avec DDQ/*p*-TsOH, conduit à l'indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole **II-c** (Bergman *et al.* 1987). (Schéma 7)

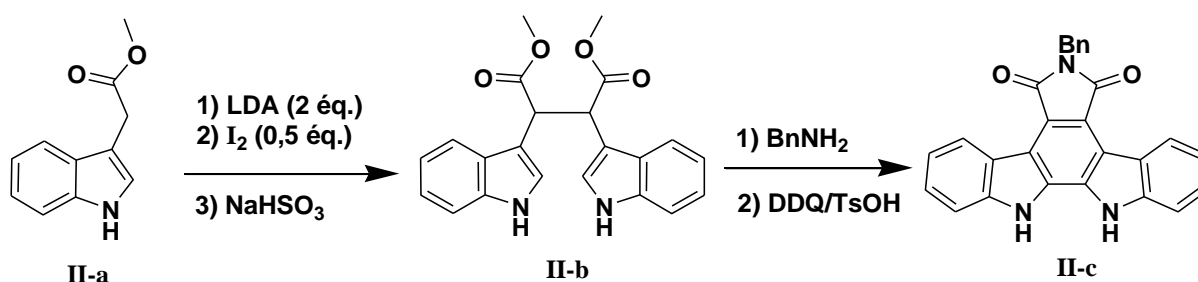


Schéma 7 : Synthèse de *Bergman & Pelcman*.

II. 2. 2. 1. 3. Synthèse de Faul

La méthode de Faul permet, en peu d'étapes, la formation d'indolocarbazole. En effet, en partant de deux indoles différents convenablement substitués. Au départ, la synthèse de bisindolylmaléimide **III-c** par condensation de l'indole-3-acétamide **III-a** avec l'indolyl-3-glyoxylate de méthyle **III-b** en milieu basique (Faul M. 1998). Le bisindolylmaléimide **III-c** est transformé en staurosporine aglycone **K252c** par une séquence de cyclisation oxydative / réduction (Harris, W. 1993). (Schéma 8)

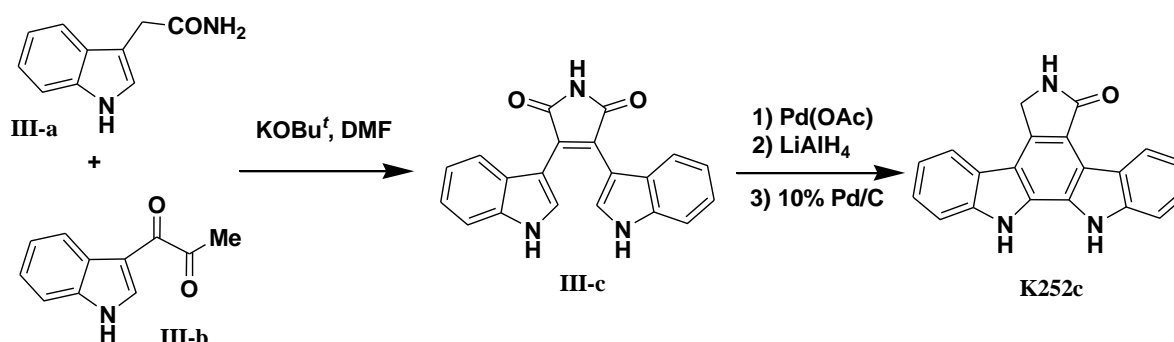


Schéma 8 : Synthèse de *Faul*.

II. 2. 2. 1. 4. Synthèse de Steglich et Weinreb

En 1989, Steglich propose une synthèse simple de la staurosporine aglycone **K252c**, par condensation de l'iodure d'indolylmagnésium avec du N-benzyl-2,3-dibromomaléimide dans du toluène pour donner le bisindolylmaléimide **IV-a**. L'hydrolyse alcaline du produit **IV-a**, suivie du chauffage de l'anhydride résultant avec de l'acétate d'ammonium, donne le composé **IV-b**. (Steglich, W. 1989). La cyclisation oxydative avec DDQ/p-TsOH suivie d'une réduction de Clemmensen de l'imide en lactame conduit à la staurosporine aglycone **K252c**. (Schéma 9)

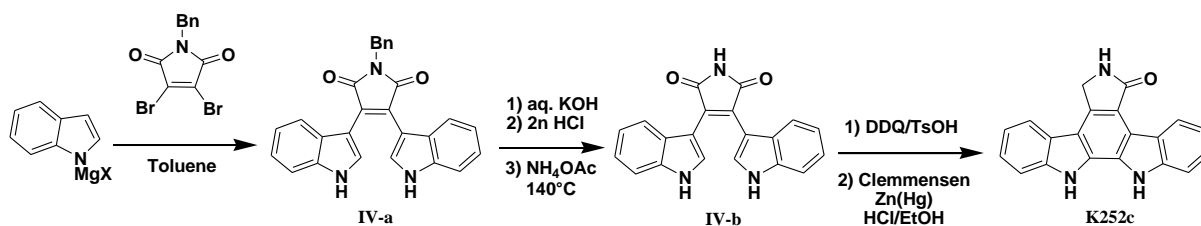


Schéma 9: Synthèse d'indolocarbazoles de Steglich et de Weinreb.

II. 2. 2. 1. 5. L'approche de Raphaël

La synthèse de Raphael est basée sur une réaction de Diels-Alder intermoléculaire, mettant en jeu un diène, suivie d'une insertion de nitrène. En effet, le chauffage de **V-a** avec du maléimide donne un adduit de Diels-Alder, qui par oxydation avec du DDQ (déshydrogénation) conduit au terphényle substitué **V-b**. La réduction (désoxygénation) de **V-b** avec de la triphénylphosphine dans de la collidine a reflux donne le produit de la double insertion de nitrène attendu **V-c** (Hughes et Raphaël. 1983) (Schéma 10)

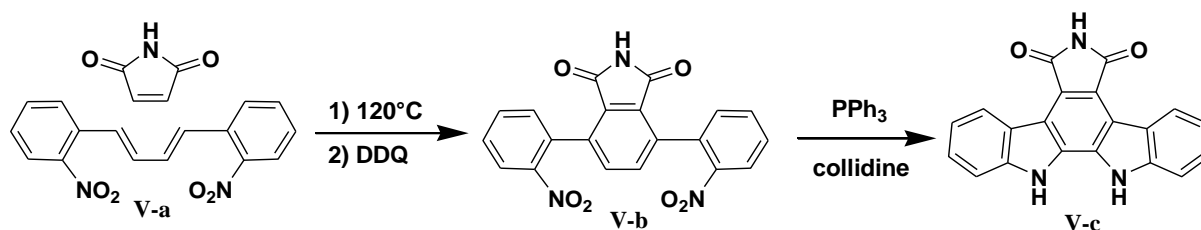


Schéma 10: Synthèse de Raphaël.

II. 2. 2. 1. 6. Synthèse de Kaneko

La méthode de Kaneko pour la synthèse de dérivés aglycone de la rebeccamycine consiste à réduire l'indigo **VI-a** (7,7'-dichloroindigo) pour obtenir un 2-2'- bisindole dans les conditions de Wolff-Kishner, suivi d'une acétylation pour donner un monoacétyl bisindole

VI-b. Cet intermédiaire est engagé par la suite dans une cycloaddition de type Diels-Adler avec le N-benzyloxyméthylmaléimide pour obtenir l'indolocarbazole désiré **VI-c** (Kaneko T. 1985). (Schéma 11)

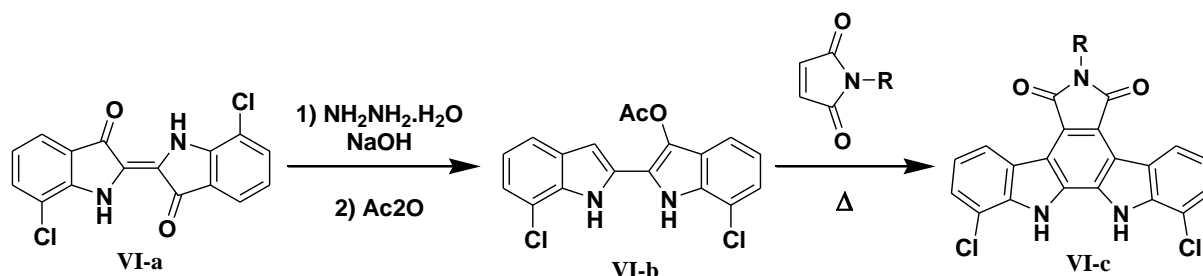


Schéma 11: Synthèse de Kaneko.

II. 2. 2. 1. 7. Synthèse de Wood

Dans sa synthèse Wood a adopté une stratégie basée sur la chimie carbénoïde de rhodium dans la construction de l'indolocarbazole. Une étape critique dans l'approche de Wood est la condensation catalysée par le rhodium (II) du 2,2'-biindole **VII-a** et le diazo lactame **VII-b** pour obtenir un aglycone protégé **VII-c**. Cette condensation fournit directement la staurosporine aglycone (K252c), par un mécanisme d'électrocyclisation / déshydratation (Wood, J. L. 1997) (Schéma 12).

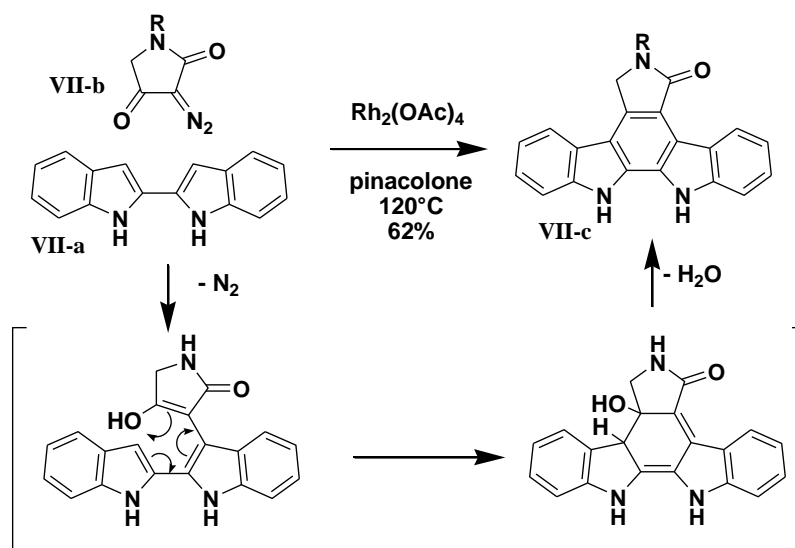


Schéma 12: Synthèse de Wood.

II. 2. 2. 1. 8. Synthèse de Magnus

Magnus a publié une stratégie de synthèse pour préparer les staurosporinones, (Magnus, et al. 1983) en partant de l'imine **VIII-a** qui a été préparée à partir de la

condensation d'un dérivé de tryptamine et du 2-aminostyrène. La cycloaddition intramoléculaire de Diels-Alder de l'indole-2,3-quinidométhane **VIII-b** qui est généré (in situ) suite à l'acylation de l'imine **VIII-a**, est l'étape clé dans cette synthèse. Une oxydation par le DDQ conduit à l'indolocarbazole **VIII-c**. La déprotection du groupe phtalimide sur **III** suivie d'une acylation donne la staurosporinone **VIII-d**. (Schéma 13)

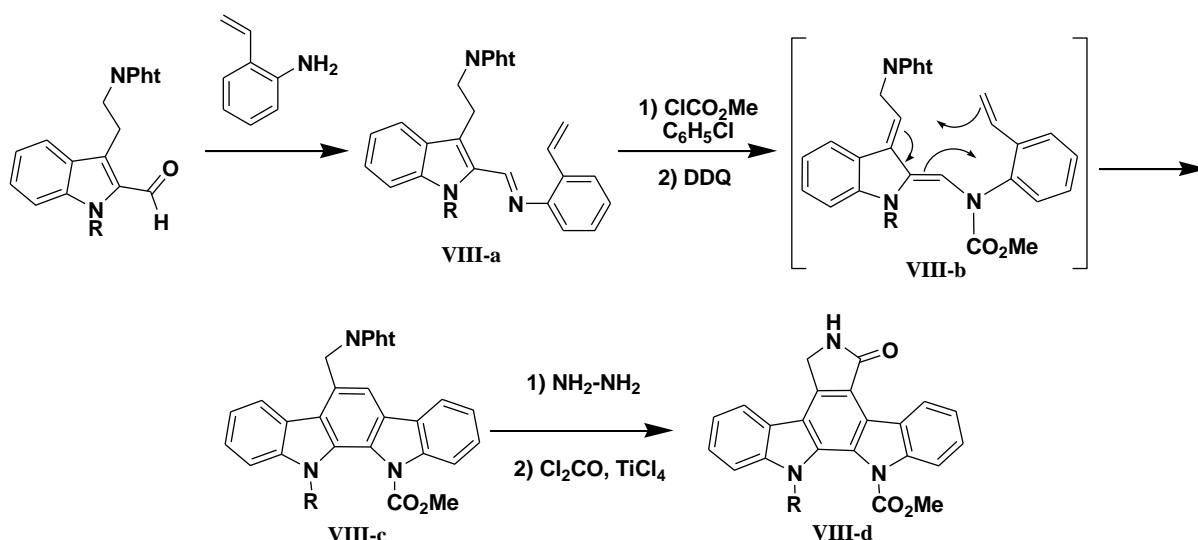


Schéma 13: Synthèse de *Magnus*.

II. 2. 2. 1. 9. Synthèse de Moody

Moody a utilisé la pyranoindolone **IX-a**, qui par chauffage dans le bromobenzène, subit une réaction intramoléculaire de Diels-Alder. La perte de dioxyde de carbone provoque l'aromatisation par oxydation aérienne pour donner le carbazole **IX-b**. Formation de nitrile par désoxygénation à l'aide de phosphite de triéthyle conduit à l'étape de fermeture du cycle final et donne la staurosporine aglycone **K252c**. (Moody *et al.* 1990). (Schéma 14)

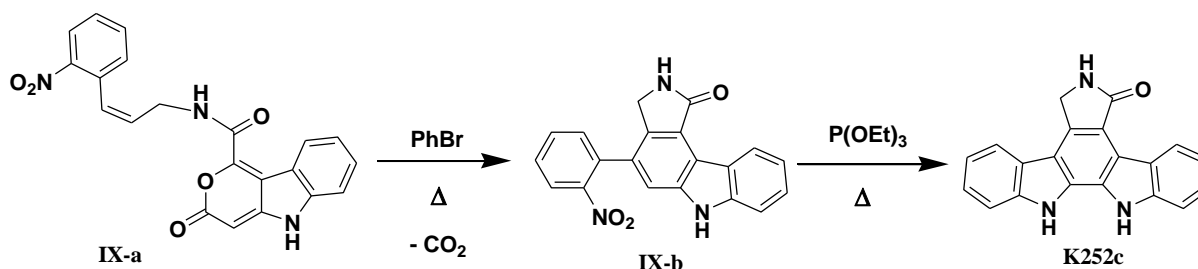


Schéma 14: Synthèse de *Moody*.

II. 2. 2. 1. 10. Synthèse de Saulnier

La méthode de Saulnier fait aussi appel à une réaction de type Diels-Alder, mettant en jeu un diène. Cette méthode permet de former simultanément les cycles indoliques et indolocarbazoliques pour obtenir des molécules symétriques. En effet la réaction de

polyannulation catalysée par le palladium (0) sous forme de Tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0), entre le 1,3-diacétylène et le N-benzyl-3,4-dibromomaléimide en présence de K_2CO_3 anhydre, fournit l'indolo[2,3-a]carbazole avec un rendement de 52 % (Saulnier et al 1996). (Schéma 15)

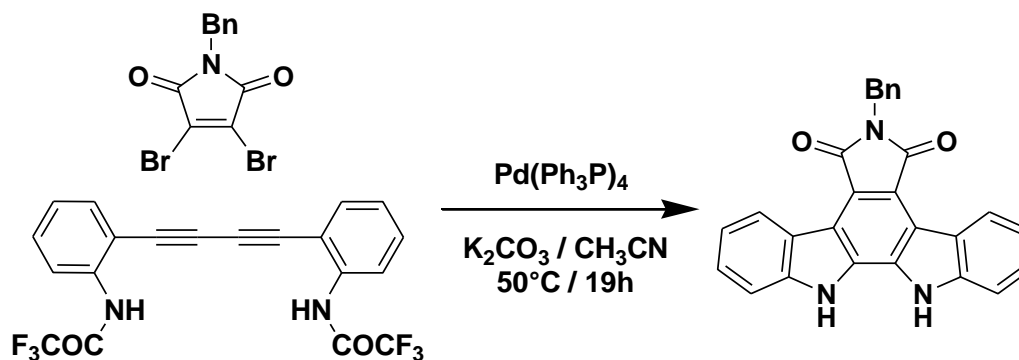


Schéma 15: Synthèse de Saulnier.

II. 2. 2. 1. 11. Synthèse de Bergman et Gribble

Bergman et Gribble ont développé indépendamment une synthèse d'indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole, qui repose sur une double indolisation de Fischer du bis(phénylhydrazones) **XI-c**, avec l'utilisation de l'ester triméthylsilylé de l'acide polyphosphorique (PPSE) dans le nitrométhane comme catalyseur (agent de cyclisation).

Les bis (phénylhydrazones) **XI-c** requises ont été préparées par une réaction de Diels-Alder du 2,3-bis [(triméthyl-silyl) oxy]butadiène **XI-b** avec les maléimides (diénophiles) **XI-a** pour former un cycloadduit, qui peut être considéré comme un α -hydroxycétone bis(triméthylsilyl)-protégée. Cette dernière réagit avec des arylhydrazines pour donner le bis (phénylhydrazone) **XI-c**. (Bergman, J. 1989 et Gribble, G. 1992) (Schéma 16)

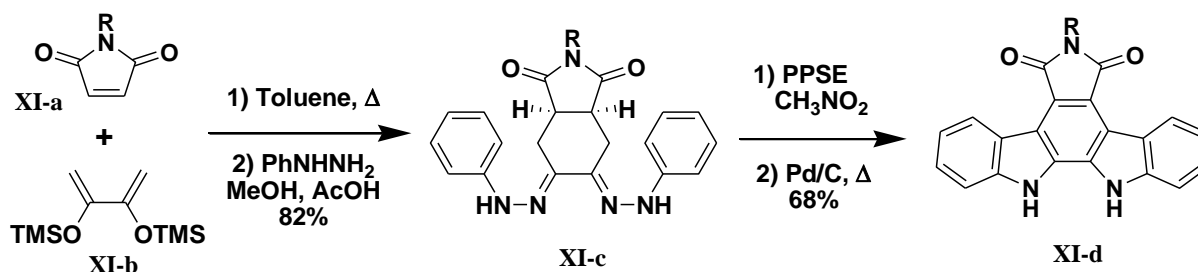


Schéma 16: Synthèse de Bergman et Gribble.

II. 2. 2. Approches récentes

En 2015, Raju *et al.* propose une synthèse de la staurosporine aglycone et de ses analogues, basée sur un réarrangement sigmatropique à partir du 2-méthylindole, avec un rendement global de 28-36% (Raju *et al.* 2015). Les principales étapes clés de la synthèse des alcaloïdes d'indolocarbazole ont impliqué des réactions d'électrocyclisation et d'insertion de nitrène

L'indole bromée **XII-a** est obtenu en trois étapes à partir du 2-méthylindole sous forme d'un mélange d'isomères *E* et *Z* (selon la littérature). Suivie d'une réaction de Michaelis-Arbusov et de Wittig-Horner permettant d'obtenir le 2'-nitrophenylvinylindoles **XII-b**. Une électrocyclisation suivie d'une aromatisation du système sont réalisées par chauffage du 2,3-divinylindoles **XII-b** dans du xylène en présence de palladium donne le 2-nitroarylcarbazole **XII-c** avec d'excellents rendements. Une bromation allylique du 2-nitroarylcarbazoles **XII-c**, réalisée avec NBS suivie d'un traitement à l'ammoniaque a donné les amides intermédiaires **XII-d**. Enfin, la cyclisation de **XII-d** est réalisée à l'aide d'une réaction utilisant la réactivité des nitrènes. (Hughes & Raphael. 1983), suivi du clivage de l'unité phénylesulfonyle avec K_2CO_3 dans MeOH / THF pour donner une aglycone de staurosporine (K252c) avec un rendement global de 35% sur 11 étapes. (Schéma 17)

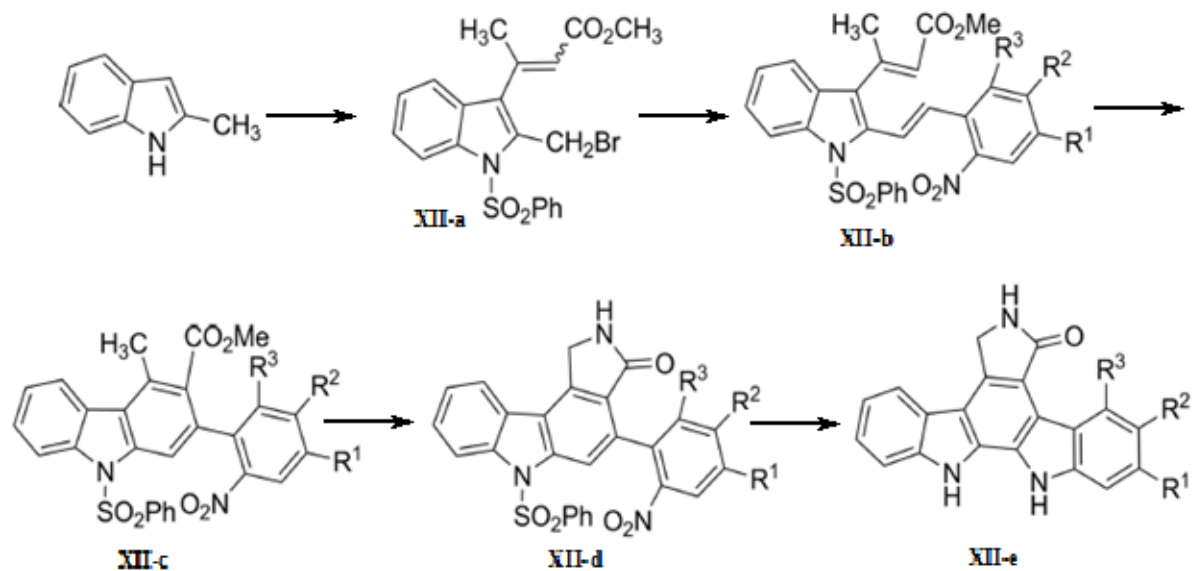


Schéma 17 : Analyse rétrosynthétique de construction de K252c. Illustration de Raju et al.2015.

En 2015 aussi, Borrero *et al.* ont rapporté une synthèse facile d'indolocarbazole par une réaction de cyclisation déshydratante d'oxodiènes cycliques, catalysée par l'or, en tandem avec une réaction Diels-Alder. L'intermédiaire clé **XIII-b** du diène est obtenue à partir de la cyclisation catalysée par l'or du substrat **XIII-a**, qui proviendrait d'une simple alcynylation d'un aldéhyde avec un alcyne. La réaction de Diels-Alder entre le diène **XIII-b** et le maléimide fournirait le composé **XIII-c** qui subirait une réaction d'insertion de CH pour former la liaison carbone-azote finale et obtenir ainsi l'indolo[2,3-a]carbazole attendue **XIII-d**. "Cette stratégie de synthèse a été conçue pour assembler le noyau d'indolocarbazole à partir de trois composants différents pour permettre de futures synthèses en faisant varier la substitution sur ces fragments. Ce qui permettrait l'introduction régiosélective du fragment d'hydrate de carbone". (Borrero, N. V, 2015) (Schéma 18)

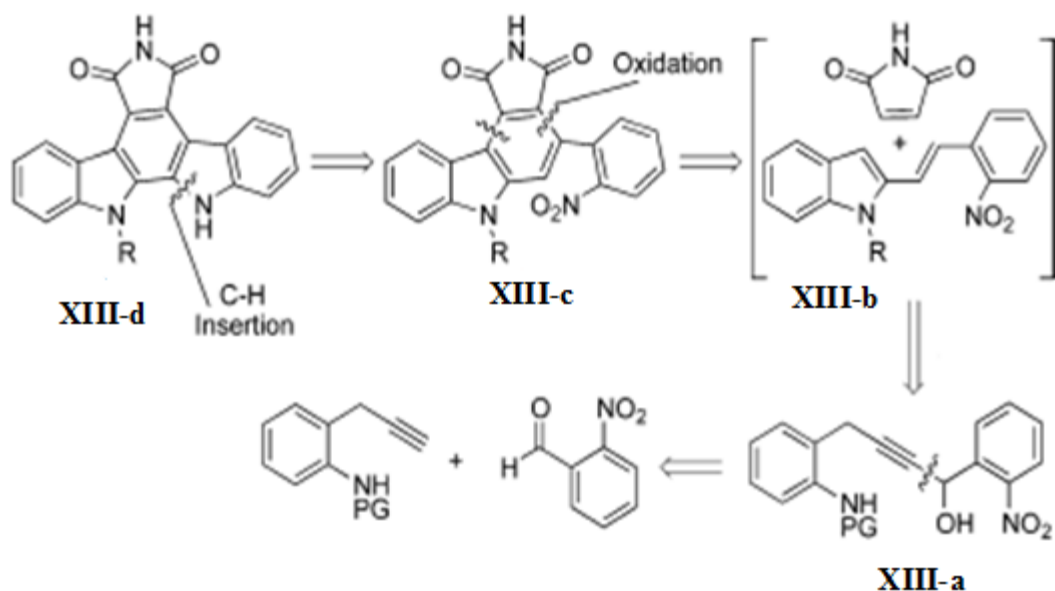


Schéma 18 : Analyse rétrosynthétique de construction de K252c. Illustration de Borrero *et al.* 2016

En 2016, Fox *et al.* réalise la synthèse de l'alcaloïde indolocarbazole K-252c (staurosporinone) en dix étapes en exploitant des réactions de fonctionnalisation directes autour d'un noyau aromatique simple (la *para*-toluidine). La voie de synthèse comprend deux arylations C-H hautement sélectives catalysées au cuivre, une amination C-H catalysée par cuivre et une carbonylation C-H catalysée par palladium avec un rendement global de 12,7%. Seul le schéma rétrosynthétique général sera présenté ici (Schéma 19)(Fox *et al.* 2016).

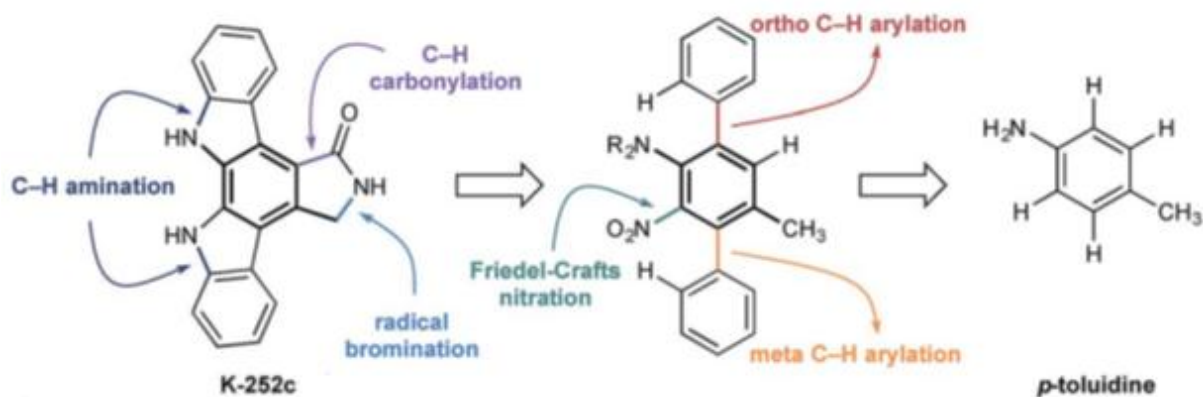


Schéma 19 : Analyse rétrosynthétique de construction de K252c par C-H fonctionnalisation. Illustration de Fox et al. 2016 .

II. 4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons exposé un aperçu historique sur les dérivés d'indolo [2,3-a] carbazole, et l'intérêt biologique et thérapeutique de ces dérivés. Une étude bibliographique a été réalisée dans ce chapitre portant sur la biosynthèse des indolo[2,3-a]carbazoles et la synthèse chimique des indolo [2,3-a] carbazoles, les méthodes de synthèse les plus connues ainsi que les plus récentes ont été cités .

Chapitre I I

Méthodes de Synthèse et intérêt des Dérivés de la Quinoléine

III. 1. Introduction

La quinoléine, nommée aussi benzo[b]pyridine, 1-benzazine, 1-azanaphthalène ou leucoline, est un composé organique aromatique hétérocyclique de formule chimique C_9H_7N . Ce liquide incolore hygroscopique possédant une odeur forte est une base très faible de pK_a 4,94 et peu soluble dans l'eau (Figure 19).

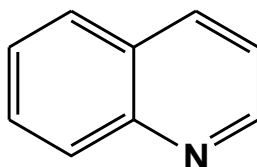


Figure 19 : Structure de la quinoléine

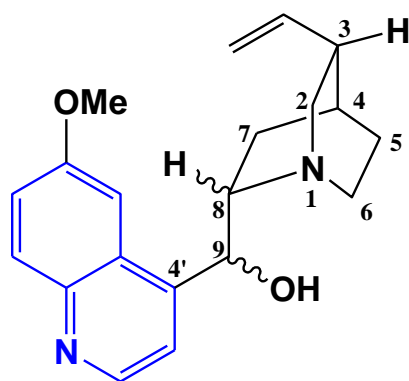
Le premier dérivé de la quinoléine, la quinine, a été extraite et isolée, la première fois en **1820** par les chimistes français **Joseph Pelletier** et **Joseph Caventou** de l'écorce de quinquina, (un arbuste originaire d'Amérique du Sud). Initialement utilisé comme fébrifuge, il a trouvé usage dans le traitement du paludisme qui, selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) publié en Novembre **2017**, est une maladie potentiellement mortelle due à des parasites *Plasmodium* transmis à l'homme par des piqûres de moustiques femelles infectés du genre *Anophèle*, qui a touché en **2016** 216 millions de personnes dans 91 pays et a entraîné 445 000 décès. Les deux chimistes ont réussi par la suite à isoler d'autres isomères la cinchonine, la quinidine et la cinchonidine.

En **1834**, le chimiste allemand **Friedlieb Ferdinand Runge** a pu extraire la quinoléine du goudron de houille, qu'il nomma le *Leukol* (*huile blanche* en grec). En **1842**, **Charles Frédéric Gerhardt** obtient par distillation de la quinine une huile incolore identique au *Leukol* qu'il appela alors *Chinoilin* (*huile de quinine*).

En **1853**, **Louis Pasteur** a réussi à obtenir deux dérivés proches de la quinoléine par réarrangement de la quinine, la quinotoxine et la cinchotoxine (**Figure 20**).

La structure de la quinoléine, étant hétérocyclique rigide constituée de la fusion d'un benzène avec une pyridine, n'a été dévoilée qu'en **1871** par **Dewar**.

La synthèse totale de la quinine a été réalisée en **1944** par **Robert Woodward** et **William von Eggers Doering** de l'Université d'Harvard. La quinine obtenue par ce procédé coûtait alors beaucoup trop cher pour avoir une utilité pratique.



R= OCH₃ ; C9 (R) / C8 (S) : quinine
 R= OCH₃ ; C9 (S) / C8 (R) : quinidine
 R= H ; C9 (S) / C8 (R) : cinchonine
 R= H ; C9 (R) / C8 (S) : cinchonidine

Figure 20 : Structure de la quinine et ces dérivés ; la quinidine, la quinothoxine et la cinchotoxine.

La formule brute de la quinine fut établie en **1854** par **Adolph Strecker** et sa structure chimique fut décrite vers la fin du siècle par **Zdenko Skraup** et **Wilhelm Königs**.

III. 2. Utilisation et intérêts biologiques des dérivés quinoléiques

La quinoléine et ses dérivés sont utilisés largement dans l'industrie chimique dans la fabrication de polymères, de colorants, de conservateurs alimentaires, désinfectant et de produits agrochimiques ainsi que dans des procédés métallurgiques. De même, des dérivés de la quinoléine ont trouvé des utilisations dans les OLED et comme des nano et chimio-capteurs [Pimpalshende (2014) et Zhang (2014)].

L'utilisation des quinoléines est très répandue dans le domaine pharmaceutique. Plusieurs médicaments ou composés à propriétés pharmaceutiques potentielles comportent un anneau quinoléique comme motif de base.

On les trouve dans la structure de certains inhibiteurs d'enzymes responsables de la duplication du VIH-1 [Sekgota (2017), Ahmed (2010) et Savarino (2006)], dans ceux du traitement de la malaria (Quinine, Quinidine, Chloroquine, Méfloquine, Amodiaquine, Primaquine, etc.) [Hu (2017), Nqoro (2017)], dans les médicaments antimicrobiens [Singh (2016), Oliphant (2002) et Kayukova (2000)], cardiovasculaires (Vesnarinone) [Khan (2000)], dans des médicaments à activités anticonvulsantes et antihypertensives [Kumar (2015), Wei (2010) et Muruganantham (2004)] dans les médicaments pour le traitement de

l'allergie et de l'asthme (Montélukast) [Chabukswar (2016)], dans les médicaments antidépresseurs (Aripiprazole, Brexpiprazole, etc.) [Zajdel (2013), Hino (1987) et Alhaider (1985)], et ceux à effets sur le système nerveux central [Nevin (2014)]. Les dérivés de la quinoléine présentent aussi d'importantes applications pharmacologiques en raison de leurs activités anticancéres et antitumorales [Kumar (2009), Advani (2010) et Batalha (2016)]. (Figure 21)

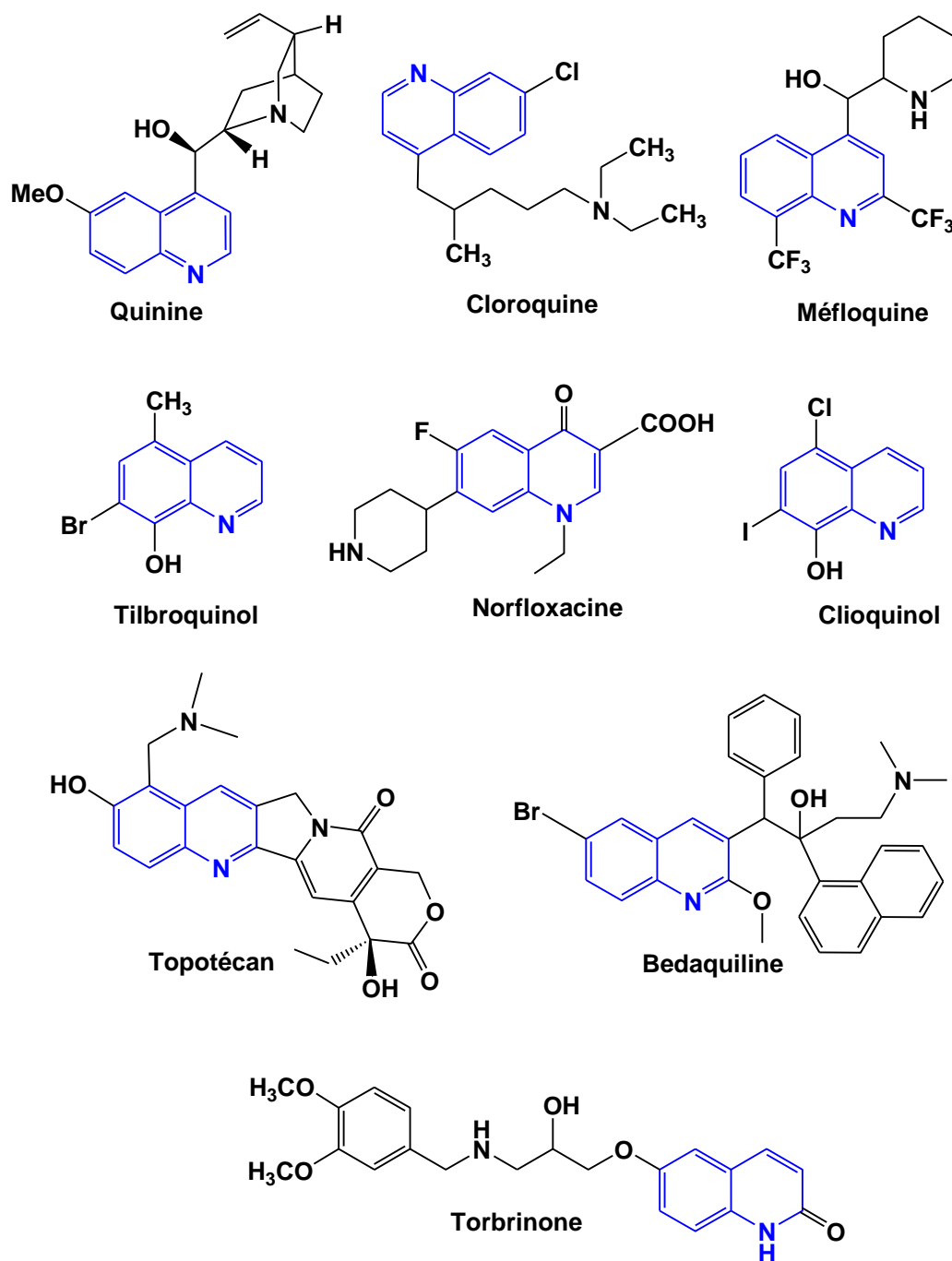


Figure 21 : Structure des dérivés de la quinoléine ayant d'importantes propriétés pharmacologiques

En effet depuis la découverte de la Camptothécine par M. E. Wall et M. C. Wani en 1966, et la synthèse de ses analogues Topotecan, Irinotecan et Exatecan comme médicaments anticancéreux contenant un motif quinoléine, les chimistes médicinales s'appuient sur la quinoléine comme échafaudage pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. Car les dérivés de la quinoline ont démontré un potentiel anticancéreux sur diverses lignées cellulaires cancéreuses et comme d'excellents inhibiteurs de processus impliqués dans le cancer tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, l'inhibition de l'angiogenèse, la perturbation de la migration cellulaire et la modulation de la réponse des récepteurs nucléaires. (Figure 22)

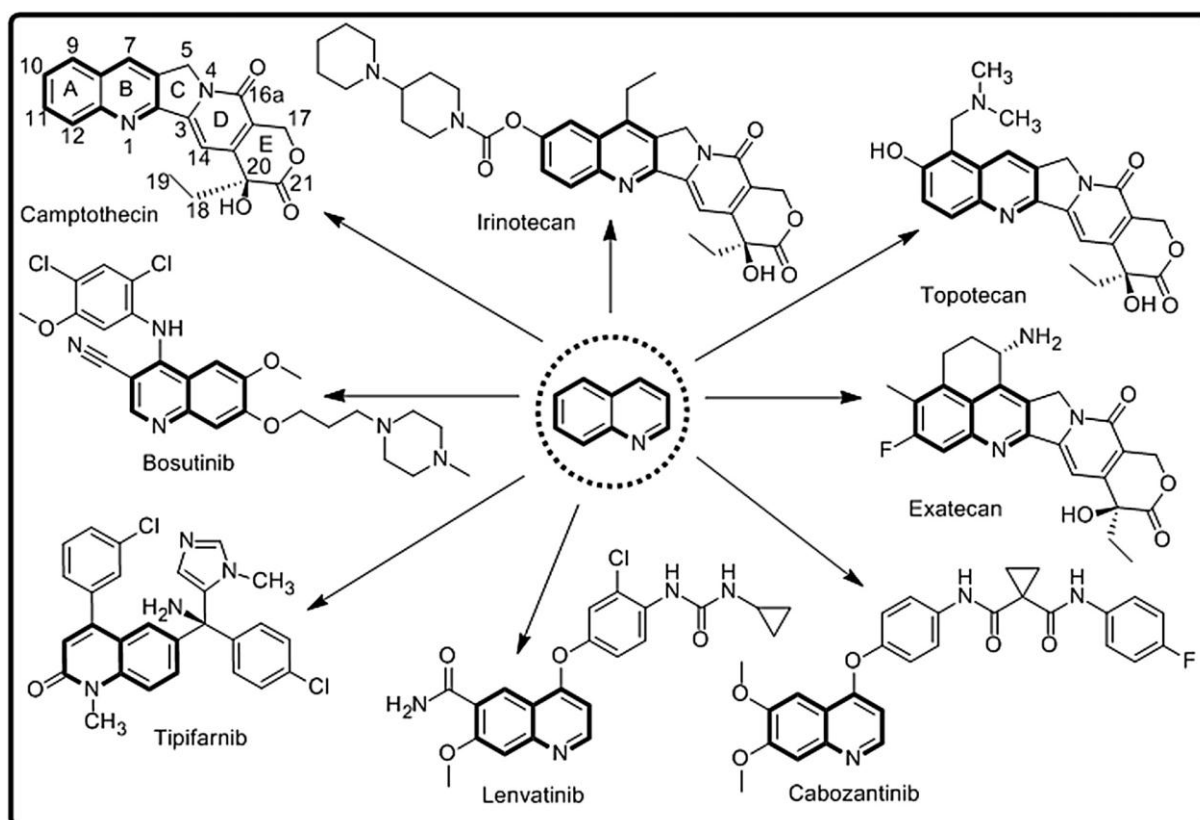


Figure 22 : Médicaments anticancéreux contenant de la quinoléine. (Afzal et al. 2015)

III. 2. 1. Les dérivés de la quinoléine comme inhibiteurs de la topoisomérase

La camptothécine qui a été isolée de l'écorce et de la tige de *Camptotheca acuminata* (*Camptotheca*, Happy tree) (Wall et al. 1966) était utilisée pour le traitement du cancer dans la médecine traditionnelle chinoise en agissant comme un inhibiteur de la topoisomérase en se

liant au complexe topoisomérase I/ADN provoquant des lésions de l'ADN qui aboutissent à l'apoptose. La faible solubilité de la camptothécine a conduit les chimistes à envisager de nombreux analogues. Aujourd'hui la Topotecan et Irinotecan sont déjà approuvés pour être utilisés dans la chimiothérapie anticancéreuse.

Dans la figure 23, nous présenterons les structures de divers dérivés de la quinoléine ayant des effets inhibiteurs de topoisomérase I et II.

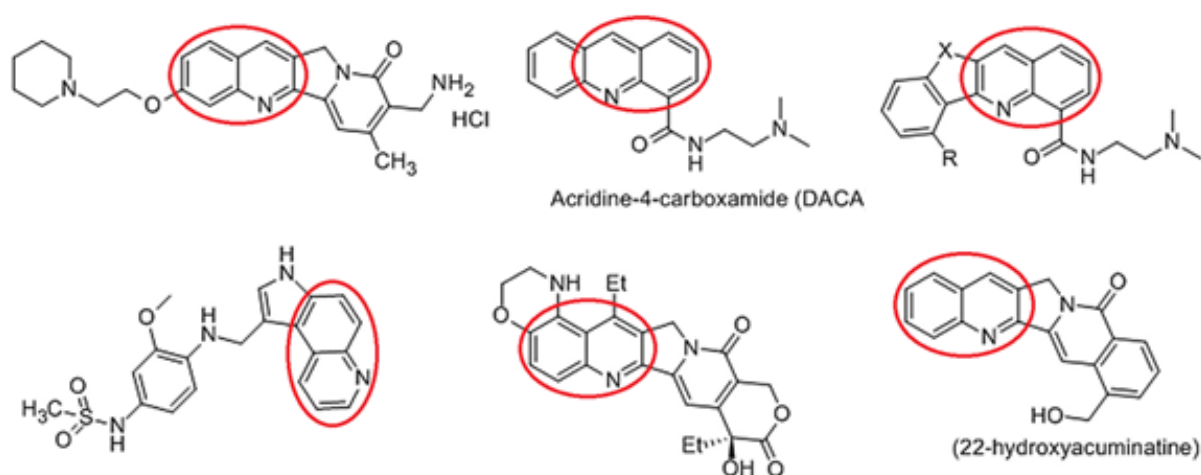


Figure 23 : Inhibiteurs de la topoisomérase I et II contenant un motif quinoléine. (Hu et al, 2017)

III. 2. 2. Les dérivés de la quinoléine Inhibiteurs de protéines kinases

Les protéines kinases sont une famille d'enzymes qui peuvent activer ou désactiver une protéine par l'ajout d'un groupe phosphate (PO_4^{3-}) à la sérine, la thréonine ou la tyrosine de cette protéine.

Divers dérivés de quinoléine ayant trouvé usage comme inhibiteur de protéine kinase sont présentés sur la **figure 24**.

III. 2. 4. Les dérivés de la quinoléine comme Agents antimittotiques et inhibiteur de la polymérisation de la tubuline

Plusieurs composés ayant un motif quinoléine sont classés comme agents antimittotiques (induisaient un arrêt du cycle cellulaire) et inhibiteur de la polymérisation de la tubuline. Quelques exemples sont présentés sur la figure 26. (Hu *et al*, 2017)

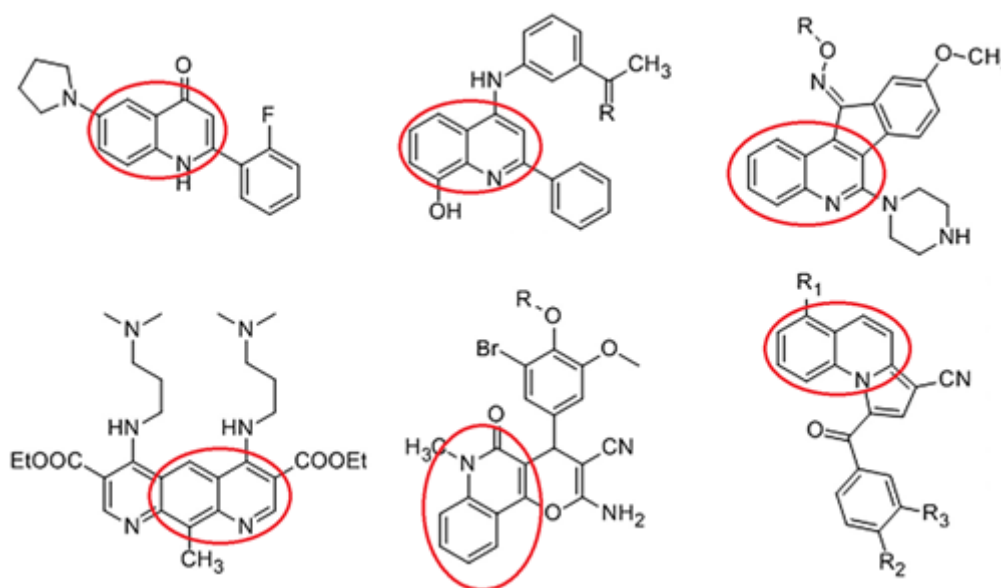


Figure 26 : Agents antimittotiques et inhibiteur de polymérisation de la tubuline contenant de la quinoléine. (Hu *et al*, 2017)

III. 2. 5. Les dérivés de la quinoléine comme Agents antipaludiques et antiplasmodiales

Le paludisme est l'une des maladies infectieuses, les plus ravageuses. Les dérivés de la quinoléine ont longtemps été utilisés dans le traitement clinique du paludisme, mais l'apparition de souches de *P. falciparum* résistantes à presque tous les antipaludiques a incité à la synthèse de nouvelles molécules plus efficaces et moins toxiques avec un mécanisme d'action alternatif.

Des études ont indiqué que l'hybridation de petits fragment aux quinoléines tels que de petits peptides ou de petits noyau aza-hétérocyclique ou par la synthèse de structures hybrides Bis/tris ou même tetraquinoléine n'interférait pas avec l'activité antiplasmodiale et fournissait

un moyen d'optimiser les propriétés antiplasmodiales et pharmacocinétiques (Hu *et al*, 2017). (Figure 27)

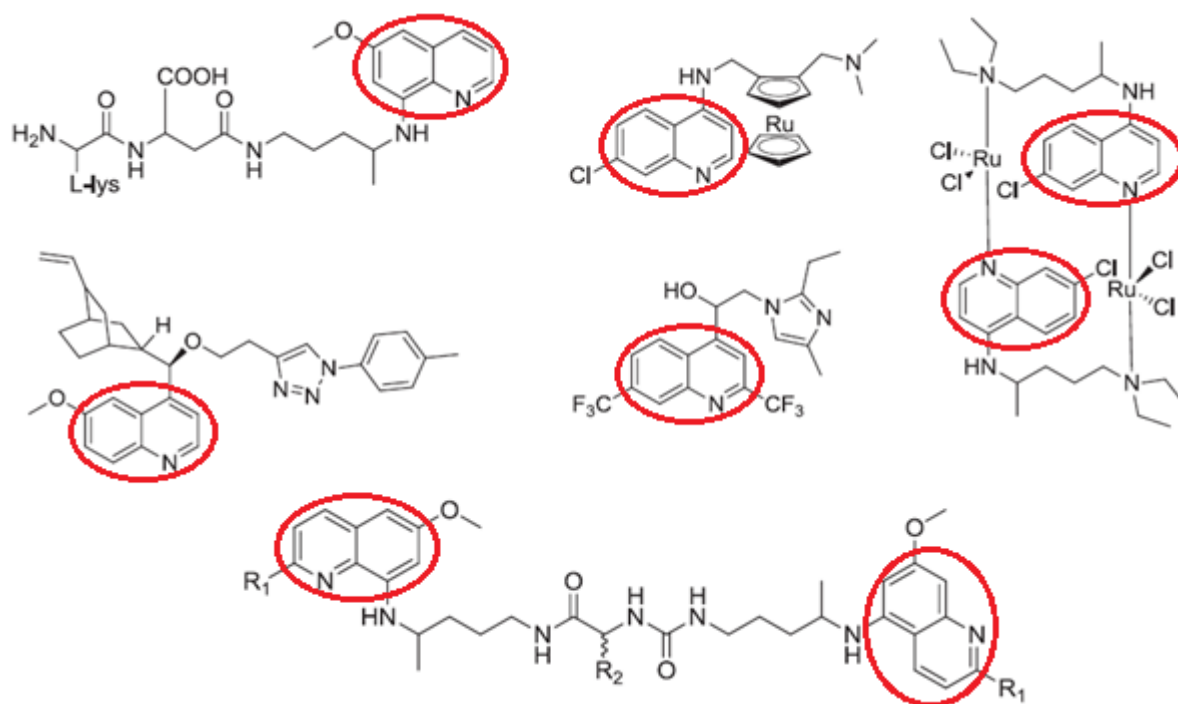


Figure 27 : Agent antipaludiques a structure hybride contenant de la quinoléine.

III. 3. 1. Méthodes de synthèse des quinoléines

Depuis sa découverte, le goudron de houille est resté la principale source de la quinoléine commerciale, bien qu'elle-même ait peu d'applications, plusieurs réactions ont été développées pour la synthèse de dérivés de la quinoléine avec des structures plus complexes.

Dans la suite, nous exposerons les méthodes de synthèse classiques les plus courantes des dérivés de la quinoléine, classées par auteurs et par produits de départ ainsi que les approches récentes.

III. 3. 1. Méthodes de synthèse classiques de la quinoléine

III. 3. 1. 1. A partir d'arylamine et de composés carbonyles α , β insaturés

Les deux principales méthodes qui utilisent les dérivés de l'aniline et un composé carbonylé α, β insaturé pour la synthèse du cycle quinoléique sont la synthèse de **Doebner-Von Miller (1881)** qui implique la réaction entre les anilines et les dérivés carbonylés α, β insaturé, et celle de **Skraup (1880)** qui se fait par chauffage des anilines avec l'acroléine générée *in-situ* à partir du glycérol (Schéma 20).

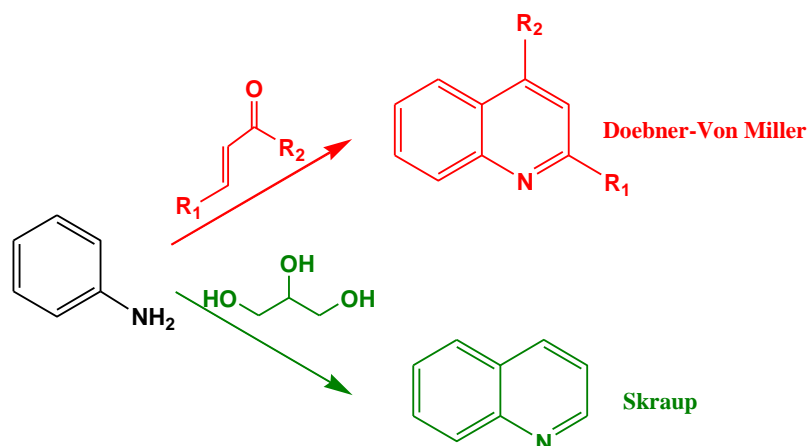


Schéma 20 : Schéma décrivant les réactions pour la synthèse des quinoléines à partir d'arylamine et de composés carbonylés α, β insaturés.

III. 3. 1. 2. A partir des amines aromatiques et des composés 1,3-dicarbonylés

La méthode de **Knorr (1886)** conduit à une 2-quinolone par chauffage des anilines avec les β -cétoesters à une température supérieure à 100°C permettant ainsi d'accéder au produit thermodynamiquement favorisé, tandis que la méthode de **Conrad-Limpach (1888)** permet d'obtenir le produit cinétiquement favorisé, la 4-quinolone, en laissant réagir les anilines avec les β -cétoesters à température ambiante (25°C) pour donner un β -arylaminoacrylate, qui est cyclisé à 250°C (Schéma 21).

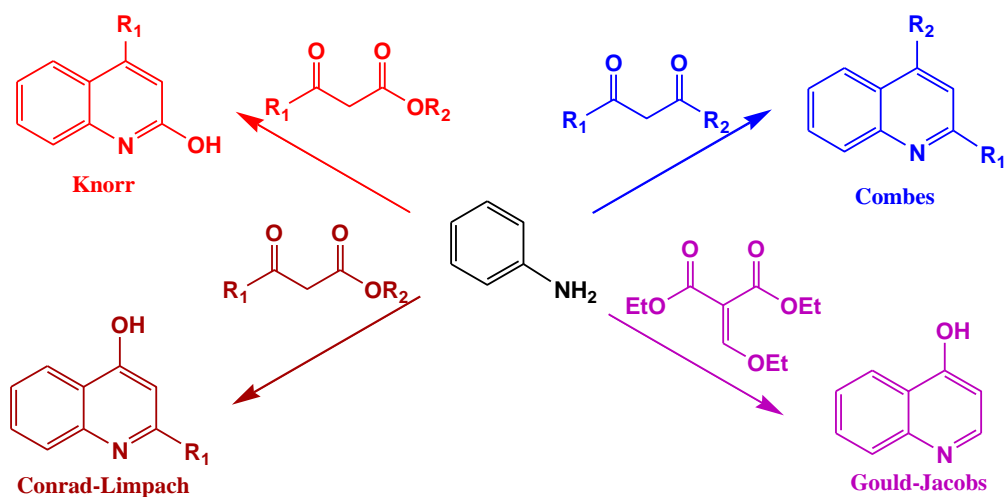


Schéma 21 : Schéma décrivant les réactions pour la synthèse des quinoléines à partir des amines aromatiques et des composés 1,3-dicarbonylés.

Avec la méthode de **Gould-Jacobs (1939)** les 4-hydroxyquinoléines sont préparées par condensation des anilines avec l'ester diéthylique de l'acide éthoxyméthylène malonique avec une cyclisation thermique, suivie d'une hydrolyse et décarboxylation (Schéma 21).

III. 3. 1. 3. A partir d'*o*-acylanilines et de composés carbonylés énolisables

La synthèse de **Pfitzinger (1886)** permet la formation des acides cinchoniniques par condensation de l'isatine avec les composés carbonylés ayant un groupe méthylène en α . (Schéma 22).

La synthèse de **Friedländer (1882)** est la réaction qui permet d'accéder aux quinoléines à partir de l'*o*-aminobenzaldéhydes avec les composés carbonylés ayant un groupe méthylène en α .

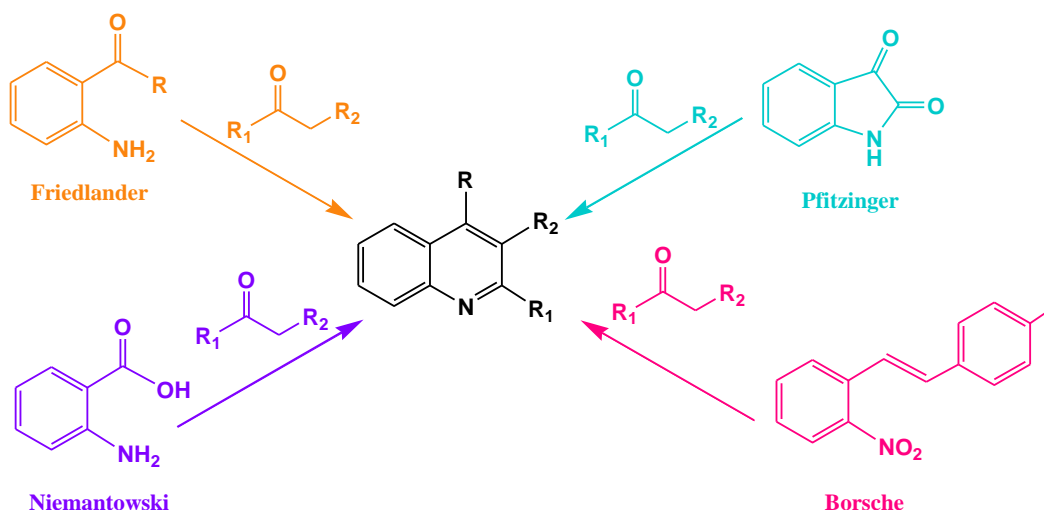


Schéma 22 : Schéma décrivant les réactions pour la synthèse des quinoléines à partir d'o-acylanilines et de composés carbonyles ayant un groupe méthylène en α

Dans la synthèse de **Niemantowski (1894)** une cyclocondensation de l'acide anthranilique avec les composés carbonyles contenant un groupe méthylène en α conduit aux 4-hydroxyquinoléines correspondantes.

Borsche (1943) a apporté des modifications sur la réaction de Friedlander telles que l'o-nitrobenzaldéhyde est converti en imine avant la réduction du groupe nitro en amine, et cela pour essayer de réduire les problèmes dus à l'instabilité de l'o-aminobenzaldéhyde.

La synthèse de **Walther (1908)** et celle de **Halberkann (1921)** sont deux variantes de la synthèse de Pfitzinger, dans la première modification Walther a remplacé des composés carbonyles par les iminonitriles (Schéma 23).

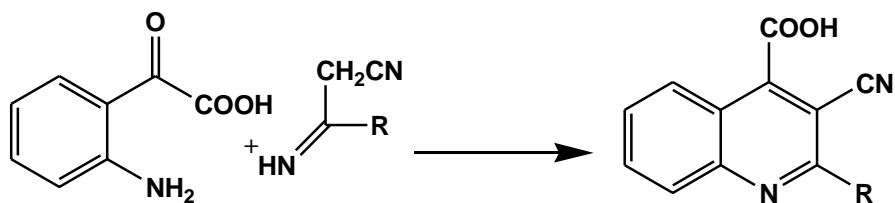


Schéma 23 : Réaction de *Walther*.

Dans la seconde modification Halberkann a chauffé des N-acétylisatines dans une solution alcaline pour obtenir des acides 2-hydroxyquinoléine-4-carboxyliques (Schéma 24).

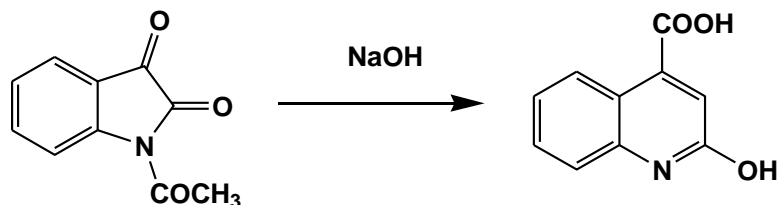


Schéma 24 : Réaction de Halberkann.

Dans la synthèse de **Camps (1899)** la cyclisation des O-acylaminoacétophones en milieu alcalin donne lieu à la formation d'un mélange d'hydroxyquinoléines (Schéma 25).

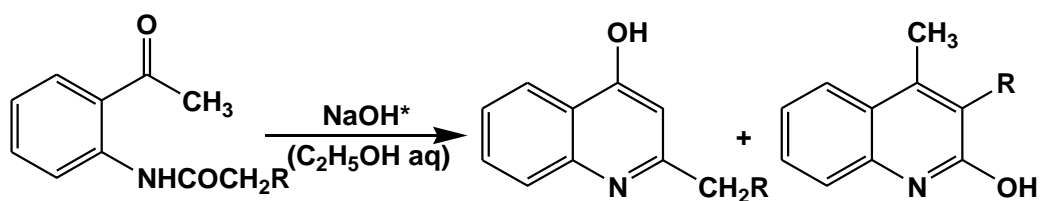
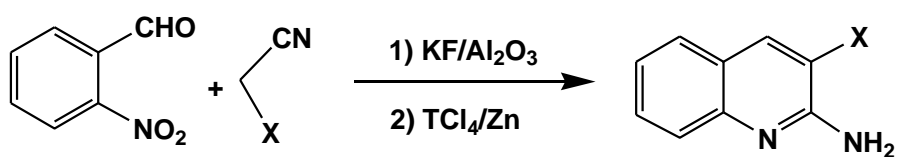


Schéma 25: Réaction de Camps.

Les proportions relatives des isomères sont déterminées par la nature de R. En effet dans le cas de R=H, C₆H₅, COC₆H₅ il y a prépondérance de α -hydroxy-quinoléines. Le rendement global en produit est proche de 90 %.

III. 3. 1. 4. A partir des dérivés nitrés ortho substitués

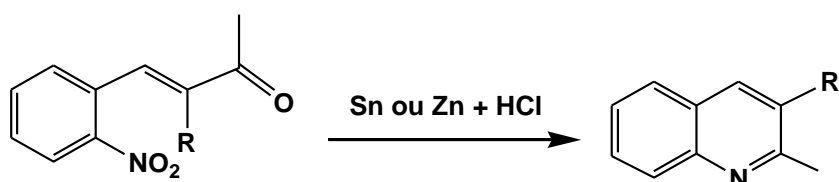
Dans la synthèse de **Zhou (1998)**, la 2-aminoquinoléine 3-substituée est préparée par condensation de l'o-nitrobenzaldéhyde avec un dérivé d'acétonitrile en présence d'un complexe KF/AL₂O₃ dans l'éthanol, et cyclisation ultérieure du produit intermédiaire sous l'effet du complexe réducteur (Zn/TiCl₄) à la température ambiante dans le THF (Schéma 26).



X=CN, CO₂Me, CO₂Et.

Schéma 26 : Réaction de Zhou.

Tandis que dans la synthèse de **Baeyer-Drewsen (1882)** l'*o*-aminobenzylideneacétone, obtenu suite à la réduction de l'*o*-nitrobenzylideneacétone, se cyclise pour donner lieu à la formation des quinoléines. (Schéma 27)



R=H, CH₃.

Schéma 27: Réaction de Baeyer-Drewsen.

III. 3. 1. 5. Réactions multi-composantes dans la synthèse des quinoléines

La synthèse de **Doebner (1887)** consiste en la préparation des acides quinoléine-4-carboxyliques par condensation des amines aromatiques avec les aldéhydes en présence de l'acide pyruvique. (Schéma 28)

Dans la réaction de **Povarov (1963)**, l'aniline réagit avec le benzaldéhyde et un alcène activé par un électrodonneur, cette réaction est généralement catalysée par un acide de Lewis. (Schéma 28)

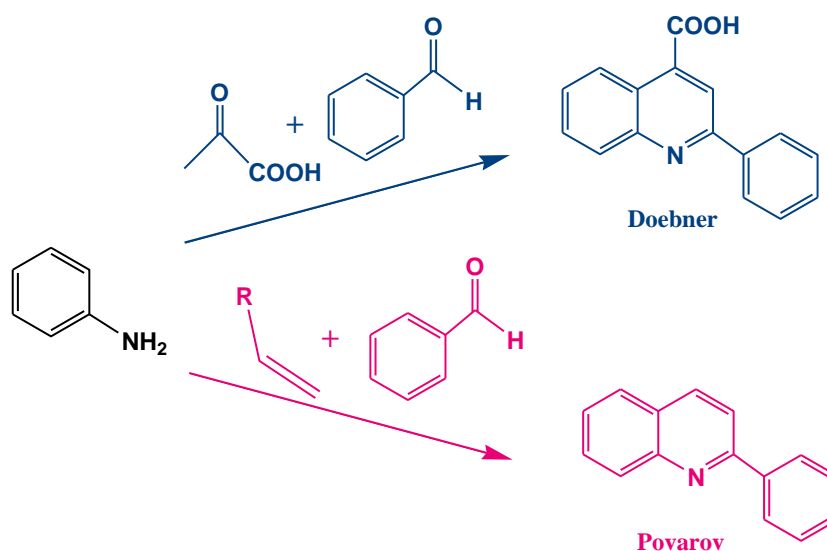


Schéma 28 : Réaction de Doebner et de Povarov.

III. 3. 1. 6. Réactions de Vilsmeier-Haack dans la synthèse des quinoléines

Dans la synthèse d'**Amaresh (1997)** les o-aminoacétophénonnes réagissent avec le réactif de Vilsmeier-Haack pour donner les dérivés de 4-chloroquinoléines. (Schéma 29)

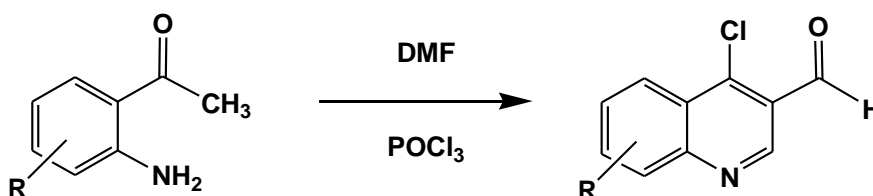


Schéma 29 : Synthèse d'Amaresh des 4-chloroquinoléines.

Lors de la synthèse de **Meth-Cohn (1981)**, ce sont les acylanilides qui sont mis à réagir avec le réactif de Vilsmeier-Haack pour donner les dérivés de 2-chloroquinoléines avec de bons rendements. (Schéma 30)

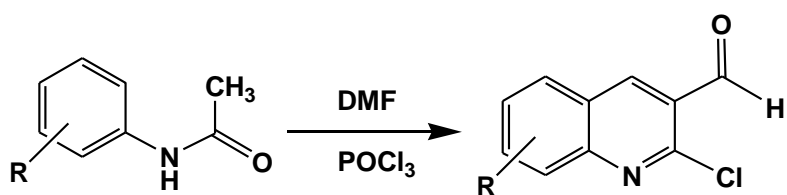
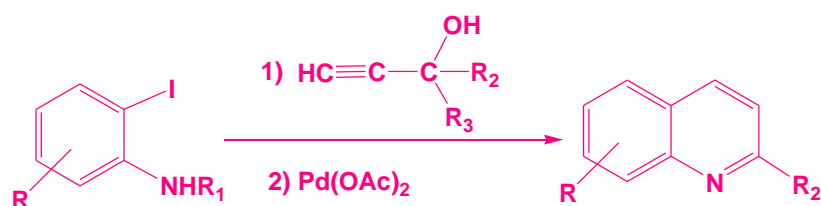


Schéma 30: Synthèse de Meth-Cohn des 2-chloroquinoléines.

III. 3. 1. 7. Réactions catalysées par le palladium dans la synthèse des quinoléines

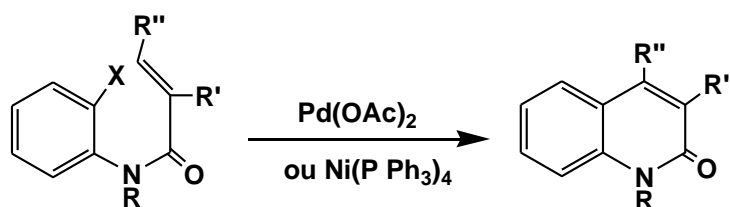
La synthèse de **Mahanty (1997)** permet de préparer des quinoléines par réaction de 2-acétaminoiodoaryles ou de 2-aminoiodoaryles avec des alcools propargyliques. Cette stratégie de synthèse impliquait un couplage catalysé par le palladium. (Schéma 31)



R₁ = H, COR'

Schéma 31 : Réaction de Mahanty.

Selon la synthèse de **Terpko (1979)** les acryloylanilines peuvent être cyclisées en 2-quinolones par des complexes de palladium ou de nickel, l'un des inconvénients de cette réaction est la formation de dérivés de l'oxindole comme composés secondaires. (Schéma 32)



X = Cl, R = CH₃, R' = H, R'' = H, COOCH₃ ou Ph.

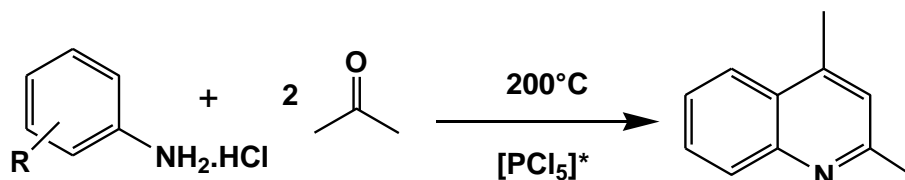
X = Br, R = R' = H, R'' = CH₃ ou Ph.

Schéma 32 : Réaction de Terpko.

III. 3. 1. 8. Autres synthèse de dérivés de la quinoléine

III. 3. 1. 8. 1. La Synthèse de Riehm (1885)

La synthèse de la 2,4-diméthylquinoléine à partir de la condensation thermique du chlorhydrate d'aniline et de l'acétone. (Schéma 33)



* AlCl₃ ou sans catalyseur.

Schéma 33: Réaction de Riehm.

Cette réaction a été appliquée à la synthèse de quinolines 2,4-disubstituées en utilisant les méthylcétones comme produit de départ mais la formation d'un mélange d'isomères et les conditions opératoires rudes délimitent sensiblement le domaine de l'emploi de cette réaction.

III. 3. 1. 8. 2. Par transformation des indoles

Le chauffage de la 2-méthylindole conduit à la quinoléine. Une 2-quinolone est produite lorsqu'un 3,3-diméthyl oxindole N-substitué est chauffé à haute température. (Schéma 34)

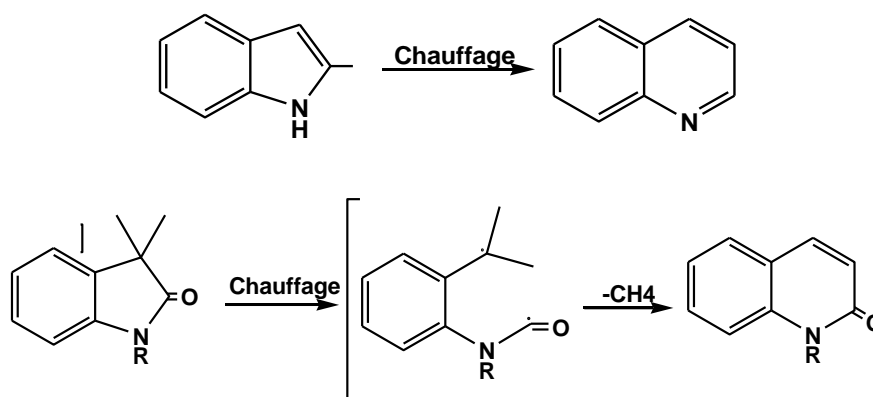


Schéma 34 : Schémas de la transformation de l'indole en quinoléine.

Patterson (1972) a utilisé la chimie des carbènes dans la synthèse de quinoléines à partir de l'indole. En effet la réaction des carbènes, générés thermiquement, sur l'indole peut conduire à la formation de quinoléines, même si elle est accompagnée d'autres produits dérivés de l'indole. C'est une réaction d'expansion de cycle (Schéma 35).

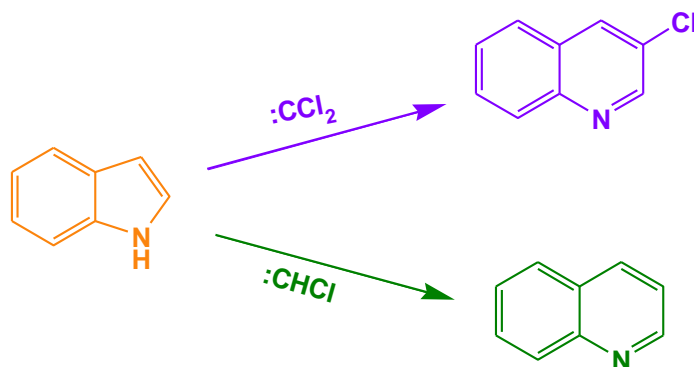


Schéma 35 : Réaction de Patterson.

III. 3. 2. Approches récentes dans la synthèse des quinoléines

Les méthodes classiques de synthèse de quinoléines nécessitent l'utilisation de produits de départ et des solvants polluants et toxiques ainsi que de conditions drastiques de température et de pression élevées et prolongées.

De nos jours la préservation de la nature par la mise au point de processus de synthèse plus écologiques est très demandée.

Dans cet objectif, quelques méthodes écologiques (réactions assistées par micro ondes, ultrasons...) utilisées dans la synthèse des dérivés de la quinoléine ont été développées, et sont présentées.

III. 3. 2. 1. Réactions assistées par micro-onde

Moloi *tal.* (2017) ont décrit un procédé efficace et rapide pour la synthèse de dérivés de quinoléine basé sur une réaction multi composant à température ambiante dans un solvant vert (l'éthanol) avec d'excellents rendements (92-98%), après 10 minutes d'irradiation par micro-ondes et sans aucun sous-produit. (Schéma 36)

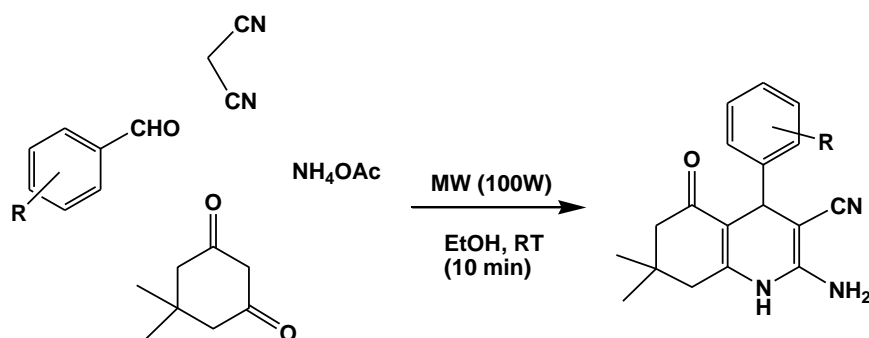


Schéma 36 : Réaction de Moloi.

Dans la synthèse de **Park (2015)** des oligoquinolines sont préparés après 12 minutes d'irradiation par micro-ondes en utilisant un catalyseur, le diphénylphosphate (DPP), et sans solvant avec des rendements allant jusqu'à 98%. (Schéma 37)

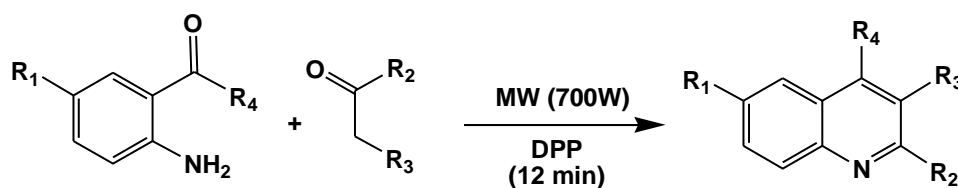


Schéma 37 : Réaction de Park.

Bhatt et al. (2015) ont repris la synthèse de **Doebner** pour préparer l'acide 7-chloro-6-fluoro-2-phénylquinoléine-4-carboxylique à partir d'un dérivé d'aniline, de benzaldéhyde et d'acide pyruvique en utilisant un réacteur à micro-ondes, en l'absence de solvant, avec un temps de réaction qui varie de 110 à 210 s et un rendement de 91-96%. (Schéma 38)

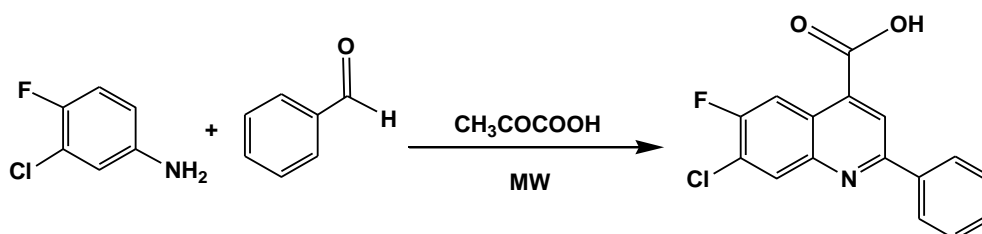


Schéma 38: Réaction de Bhatt.

III. 3. 2. 2. Réactions assistées par ultrasons

Avec une réaction assistées par ultrasons, **Venkanna (2015)** a décrit la synthèse de 2-chloroquinoline-3-carbaldéhydes à partir d'acétanilide en utilisant un réactif de type Vilsmeier-Haack fabriqué à partir de chlorure cyanurique et de N, N-diméthylformamide (TCTA / DMF). Les temps de réaction sous sonication sont nettement plus courts que les méthodes conventionnelles même si les rendements obtenus sous sonication sont comparables à ceux obtenus dans des conditions de reflux. (Schéma 39)

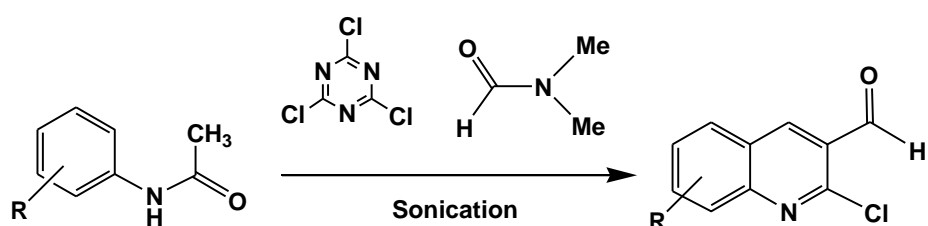


Schéma 39 : Réaction de Venkanna.

Pagadala (2014) a réussi, en utilisant un protocole multicomposant sans catalyseur, à synthétiser une large gamme de dihydroquinoléines par la condensation du malononitrile, du 2-résorcinol, des aldéhydes et de l'acétate d'ammonium en milieu aqueux sous irradiation aux ultrasons à 60°C. Cette réaction donne de haut rendement (90-97%) avec des temps de réaction courts (60 -90 min). L'utilisation de l'eau comme solvant est un aspect écologique intéressant dans cette réaction. (Schéma 40)

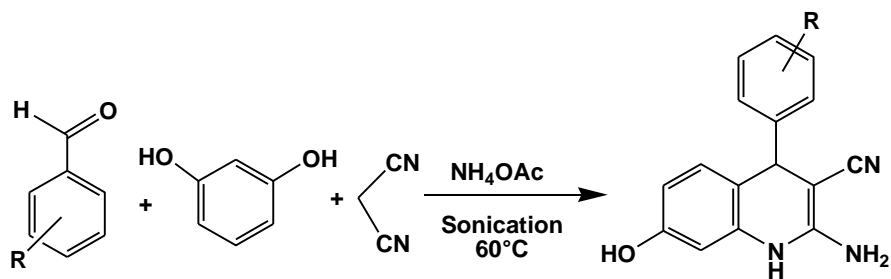


Schéma 40 : Réaction de Pagadala.

III. 3. 2. 3. Synthèse photocatalytique

La méthode de **Zhou (2018)** décrit la synthèse photo-induite de dérivés de quinoléine catalysée par un photocatalyseur organique, la 10-méthyl-9,10-dihydroacridine (AcrH2), à température ambiante par une réaction d'annulation en cascade à trois composants de sels d'aryl diazonium facilement disponibles, de nitriles et d'alcyne. Cette nouvelle approche pour construire des dérivés de quinoléine substitués avec de bons rendements allant jusqu'à 92%, est favorisée par la lumière UV. (Schéma 41)

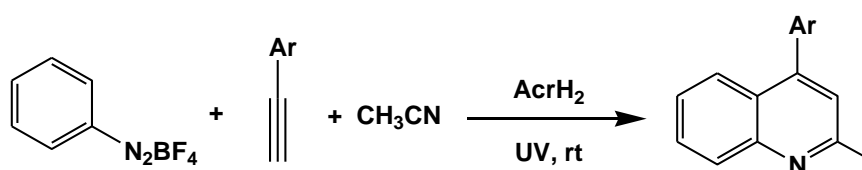


Schéma 41 : Réaction de Zhou.

La synthèse de **Jiang (2015)** décrit la préparation de quinoléines à partir d'acyl-oximes via la formation de radicaux iminyl à température ambiante, avec un sel d'iridium comme catalyseur photoredox dans du DMF, en utilisant des lampes LED blanches. Grâce à la technologie LED (lampes de 5 W), une faible consommation d'énergie a pu être atteinte même si le temps de réaction est de 10 heures avec un rendement élevé. (Schéma 42)

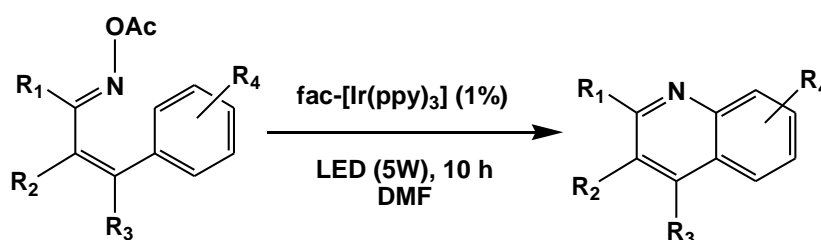


Schéma 42 : Réaction de Jiang.

III. 3. 2. 4. Synthèse biocatalytique

Avec une approche biocatalytique, **Le (2017)** a réalisé la synthèse de dérivés de la quinoléine via la réaction de Friedländer catalysée par l' α -chymotrypsine dans une solution aqueuse de liquide ionique avec d'excellents rendements à basse température. (Schéma 43)

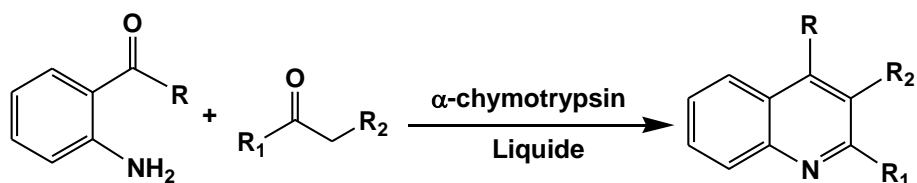


Schéma 43 : Réaction de Le.

III. 4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons donné une esquisse historique sur les quinoléines, et nous avons montré l'importance de ces dérivés principalement dans le domaine pharmaceutique. Un aperçu bibliographique sur les méthodes de synthèse des dérivés de la quinoléine par les méthodes classiques ainsi que les méthodes récentes basées sur l'utilisation des micro-ondes, des ultrasons, des irradiations UV et visibles ainsi que de biocatalyseurs.

Chapitre IV

Résultats et discussions

Première partie

Synthèse des analogues pyrazol(on)e glucosylés de la staurosporine aglycone K252c

But et objectifs du travail

Le travail effectué dans cette partie de la thèse a été réalisé en France, à l'institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF, UMR 6296) de l'Université de Clermont-Auvergne. Il rentre dans la thématique de recherche « inhibiteurs de la kinase ».

Ce projet est basé sur les résultats encourageants de travaux antérieurs concernant la synthèse et l'activité d'un analogue pyrazol(on)e de la staurosporine aglycone K252c (Composé **A** ; Esvan *et al.* 2016) qui inhibe les protéines kinase Pim, qui sont impliquées dans les cancers humains (Chen LS. 2011, Weirauch U. 2013).

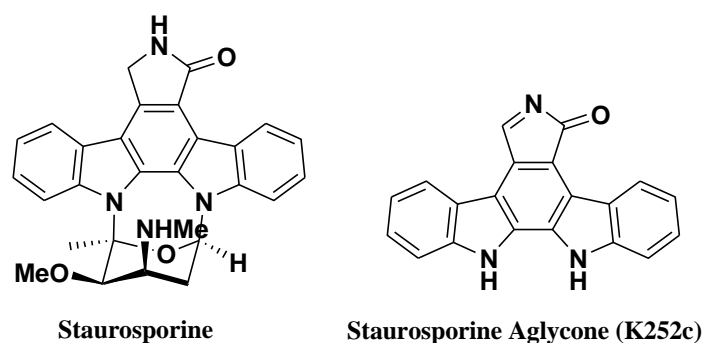


Figure 28: Structure de la staurosporine et de la staurosporine aglycone.

L'importance du noyau pyrazole, partie hétérocyclique de l'indazole, dans la structure des inhibiteurs de kinase a été rapportée par le groupe de chercheurs de l'ICCF. (Giraud *et al.* 2015, Moreau *et al.* 2016, Esvan *et al.* 2016) et ont conduit à la synthèse d'un nouvel analogue de la staurosporine aglycone (K252c) pour lequel, la partie pyrrolidinone est remplacée par un noyau pyrazole (composé **A**) (Figure 29).

D'autre part, des résultats ont démontré que la présence d'une fraction de sucre augmente la puissance inhibitrice de plus de 100 et jusqu'à 250 fois (Liu R. 2007, Sanchez-Martinez C. 2003, Yang X. 2010, Markwalder JA. 2004) en raison d'une meilleure pénétration cellulaire.

Afin d'améliorer les activités cellulaires du composé **A**, nous avons envisagé de préparer des analogues glucosylés portant une unité β -D-glucosyle en position 12 ou 13 du

fragment indolocarbazole et d'évaluer leur activité antiproliférative, s'inspirant ainsi de la structure d'un autre inhibiteur des protéines kinases la rebeccamycine.

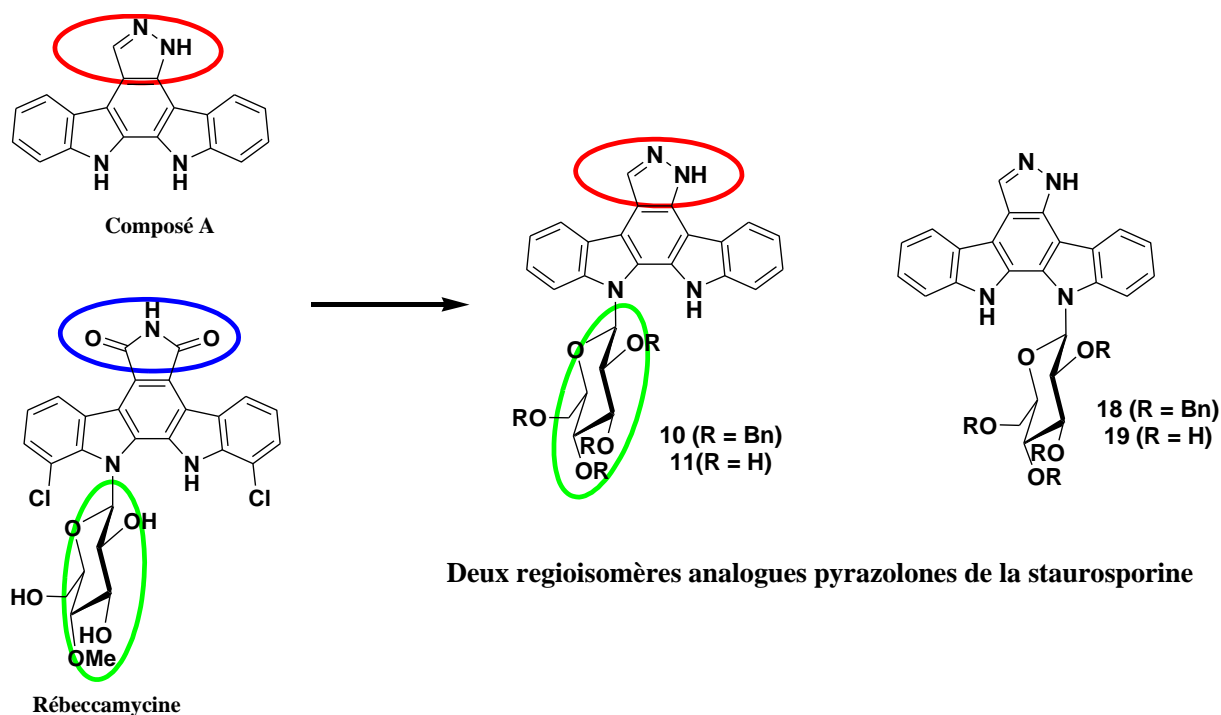


Figure 29: Conception des composés synthétisés et évalués et structures des composés de références.

Quatre nouveaux composés ont été synthétisés, dont deux régioisomères **10** et **18** ayant la fraction glucosilique protégées par un groupement benzyle (OBn) et deux régioisomères **11** et **19** avec la fraction glucosilique déprotégées (OH). Les propriétés antiproliférative de ces quatre composés ont été évaluées.

Analyses rétrosynthétiques et synthèses réalisées

La méthode de synthèse suivie pour la préparation du composé A est celle de Bergman & Pelcman (Bergman *et al.*1987). Il s'agit d'une condensation croisée de type Claisen selon les conditions de Braña (Braña *et al.*2006) conduisant à un β -cétoester selon le schéma rétrosynthétique suivant (Esvan YJ. 2016).

Comme indiqué sur le schéma 44, la fraction pyrazolone a été synthétisée à partir du cétoester **2** racémique en présence d'hydrazine et d'acide acétique, avec clivage concomitant des groupes protecteurs Boc. Le noyau pyrazole a ensuite été obtenu en deux étapes (triflation et

réduction) avant une cyclisation / oxydation photo-induite en présence d'iode pour donner le composé **A**.

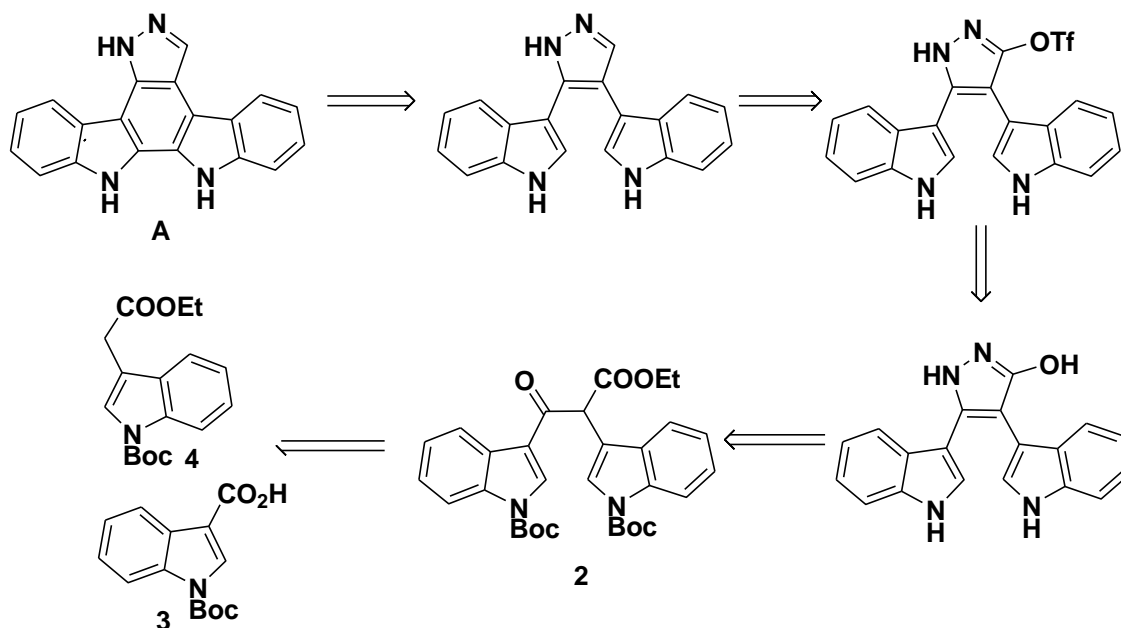


Schéma 44 : Schéma rétrosynthétique du composé A

Afin de préparer les deux analogues glucosylés régioisomères du composé **A**, nous avons d'abord prévu que cette réaction de couplage pourrait également être réalisée à partir des composés **7** et **13**, analogues glucosylés, respectivement de **3** et **4** (Schéma 45).

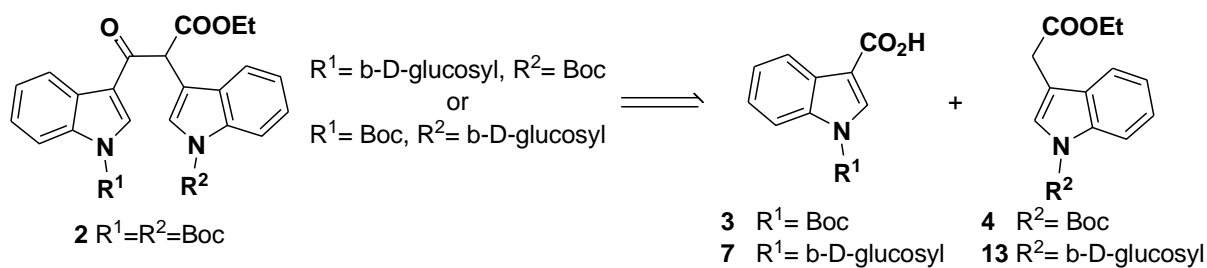


Schéma 45 : Schéma rétrosynthétique des réactions de couplage.

Par conséquent, pour le premier régioisomère, l'indole **4** est préparé en deux étapes à partir de l'acide indole-3-acétique par une estérification de type Fischer suivie d'une protection du noyau indole par le Boc dans les conditions décrites dans la littérature (Sato *et al.* 2009) (Schéma 46).

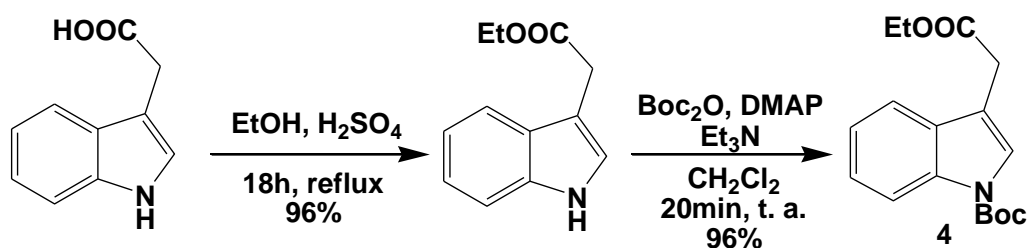


Schéma 46 : Synthèse du composé 4

Le composé β -D-glucopyranosyl-1H-indole benzylé **5** dont la synthèse est basée sur une version améliorée d'une procédure décrite précédemment (Messaoudi *et al.* 2004) et montrée dans le schéma rétrosynthétique présenté sur le Schéma 47. Dans cette procédure, le composé **5** ayant la fraction glucidique protégée est préparé après oxydation de l'indoline.

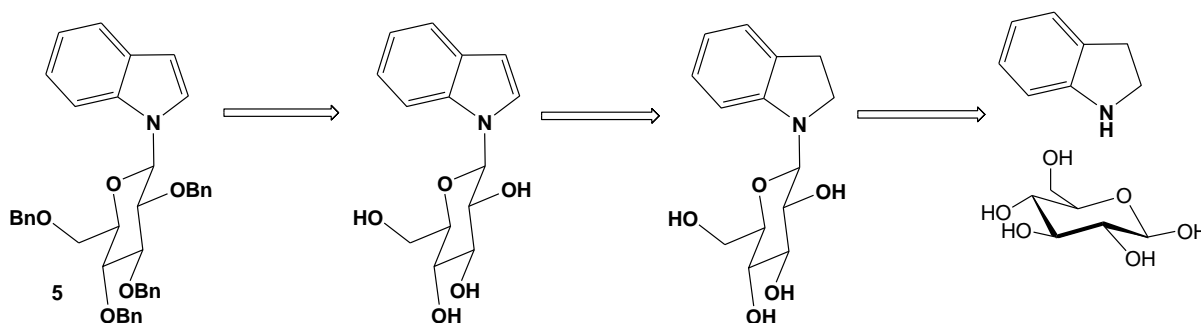


Schéma 47 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse du composé 5 Messaoudi *et al.* (2004)

Nous avons synthétisé le composé **5** en adoptant un ordre différent, c'est-à-dire en procédant à la protection de la fraction glucidique de l'indoline, ce qui a permis de synthétiser une nouvelle molécule **5'**. Celle-ci a été ensuite oxydée pour donner le composé **5**, purifié par chromatographie sur colonne. Le rendement sur les trois étapes est de 58%. La procédure s'est avérée être plus économique (Schéma 48).

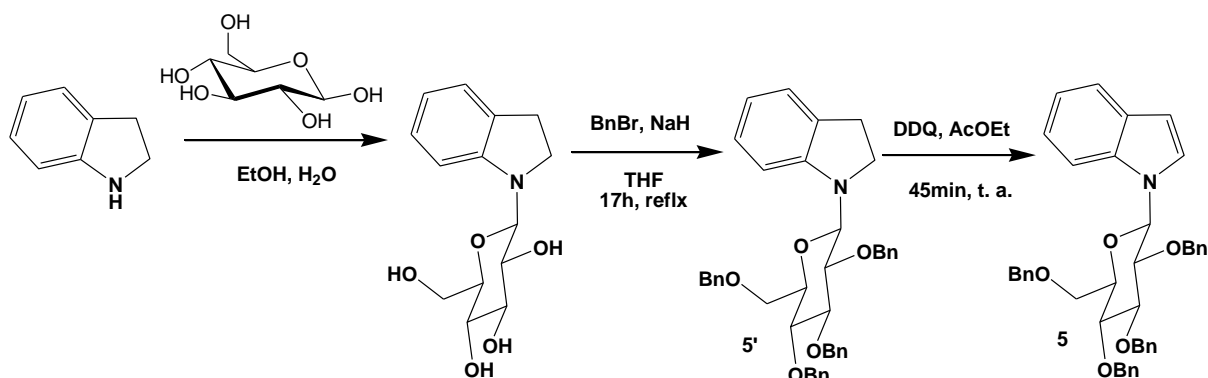


Schéma 48 : Synthèse du composé 5 (présent travail).

Le deuxième partenaire (l'indole **7**) est obtenu à partir de β -D-glucopyranosyl-1H-indole benzylé **5** avec une première étape de formylation selon les conditions de Vilsmeier-Haack suivie d'une oxydation de Pinnick (Pedras *et al.* 2004) (Schéma 49).

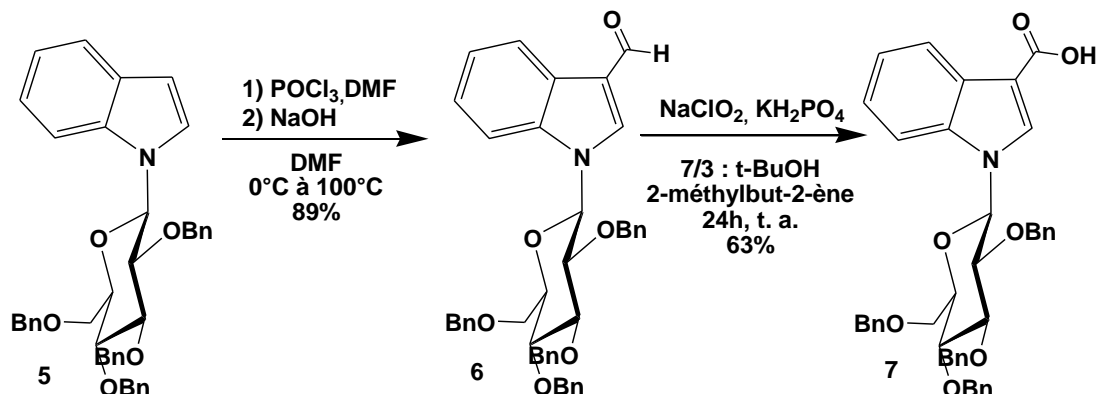


Schéma 49 : Synthèse du composé 7

Malheureusement, l'acide carboxylique activé sous forme de chlorure d'acide, préparé à partir du composé **7** par réaction avec le chlorure d'oxalyle (Nagaoka *et al.* 2006) ou sous forme d'ester méthylique mis à réagir avec l'énolate préparé à partir de l'ester **4**, ne donne pas le composé souhaité.

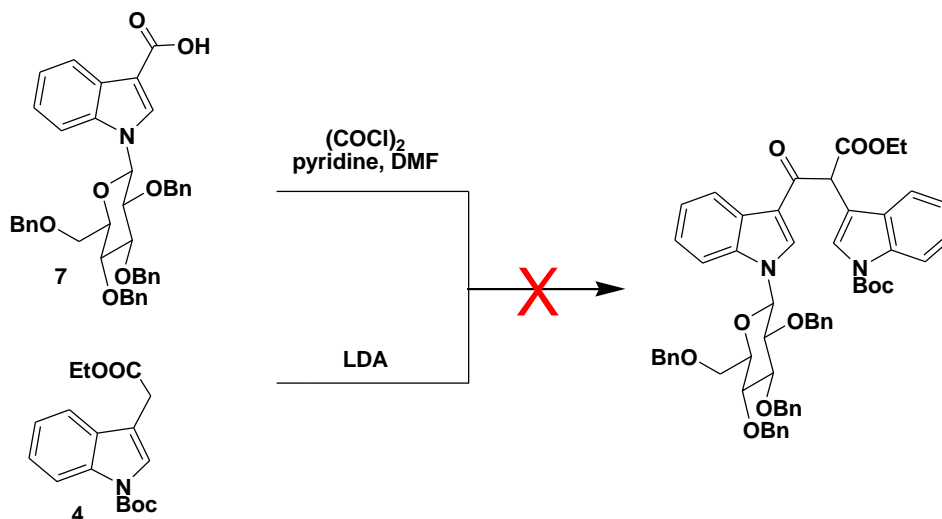


Schéma 50: Schéma de la première tentative de couplage

Par conséquent, une autre voie de synthèse a été examinée. Cette voie est celle déjà utilisée pour la synthèse du composé **A** à partir de **2**, qui a été synthétisé par condensation entre le dérivé activé de l'acide **3** et l'énolate préparé *in-situ* à partir de l'ester **4** (Schéma 51).

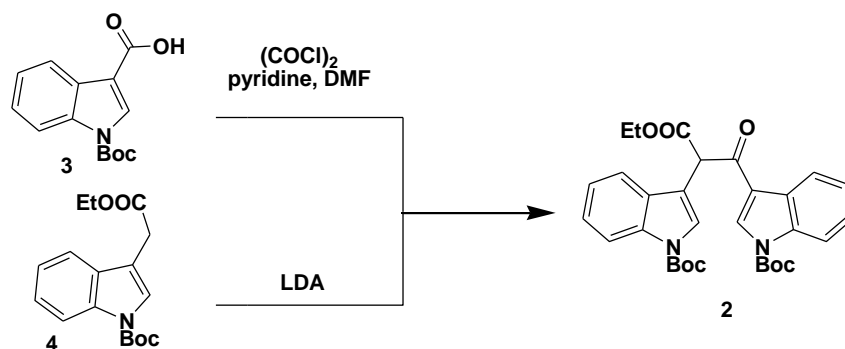


Schéma 51 : Synthèse du composé 2.

l'utilisation de chlorure d'oxalyle (Nagaoka *et al.* 2006) conduit à l'obtention de deux produits différents séparés par chromatographie sur colonne, l'analyse spectrale ^1H et ^{13}C , et IR correspondant aux deux produits montre qu'il s'agit d'un mélange de chlorure d'acide et de l'anhydride d'acide, soit deux formes activées de l'acide, ce qui a déjà été reporté dans la littérature (Adams *et al.* 1918) (Schéma 52).

Par la suite, le mélange lui-même sans séparation préalable a été utilisé pour la réaction de condensation pour la formation des β -cétoesters **2** et **14**.

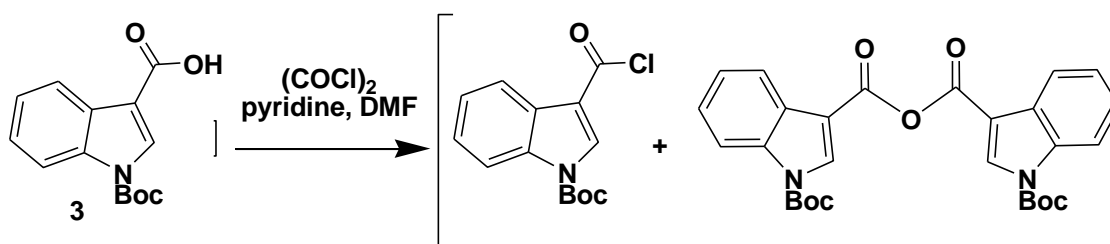


Schéma 52: Synthèse des dérivés d'acide activés du composé 3.

Lors de nos tentatives pour former la pyrazolone avec de l'hydrazine, nous avons appliqué une méthode rapportée par Braña en utilisant l'hydrate d'hydrazine en présence d'acide camphorique (Braña *et al.* 2006). Dans ces conditions, la pyrazolone ne s'est pas formée mais le clivage d'un seul groupe protecteur Boc a été obtenu, conduisant au cétoester **8** (Schéma 53)

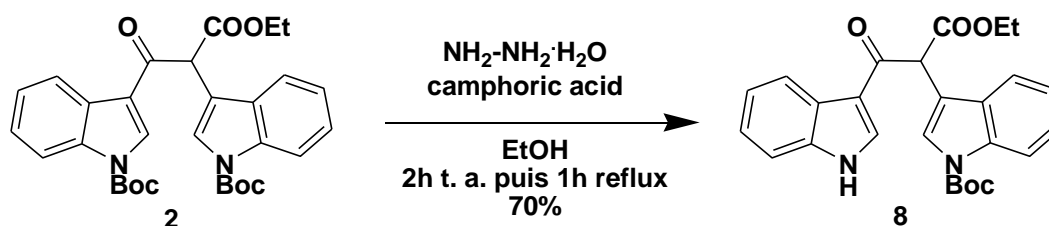


Schéma 53: Synthèse du composé 8.

La structure exacte du composé **8** est confirmée par des expériences de RMN 1D et 2D, montrant que l'indole déprotégé est celui fixé en position C3 à la fonction cétone. La corrélation directe du H2 avec le carbone de la cétone n'est pas observée. Cependant trois autres corrélations ^1H - ^{13}C visibles par analyse HMBC permettent de conclure sur la régiosélectivité de la déprotection (Esvan *et al.* 2016).

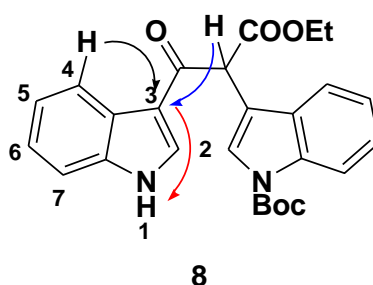


Figure 30: Corrélations ^1H - ^{13}C observées en HMBC prouvant la régiosélectivité de la déprotection.

Cette mono-déprotection offre donc l'occasion d'effectuer une glycosylation régiosélective. En conséquence, le NH étant plus acide en raison de la présence du groupe carbonyle en position C3, une réaction de Mitsunobu (Hénon *et al.* 2005) pourrait être réalisée entre le composé **8** et le 2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranose pour obtenir un mélange de deux diastéréoisomères. Ensuite, le dérivé de pyrazole **9** a été synthétisé après formation de la pyrazolone en présence d'hydrazine mono hydraté dans un mélange éthanol/acide acétique, puis triflation (Raimundo *et al.* 2004), suivie d'une réduction catalysée au palladium (Fischer *et al.* 2010). Le rendement global des réactions est de 15% (Schéma 54).

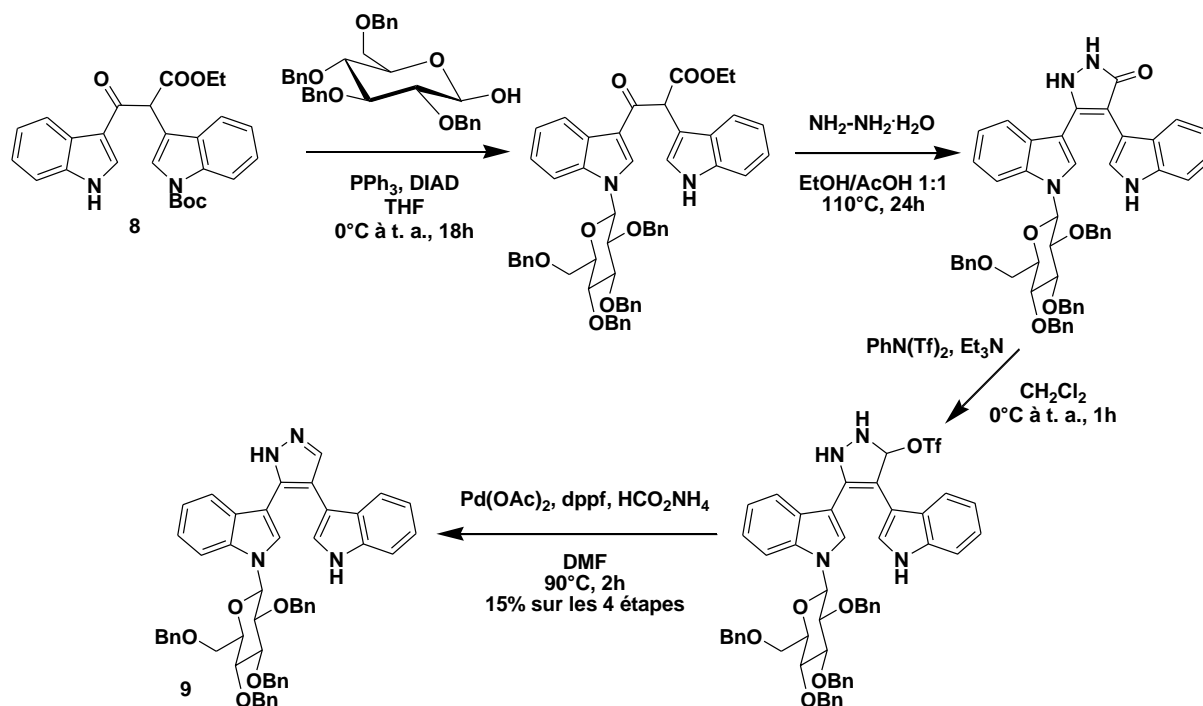


Schéma 54 : Synthèse du composé 9.

L'indolocarbazole glucosylé **10** a ensuite été obtenu après cyclisation oxydative photo-induite (photochimique) en présence d'iode selon la réaction de Winterfeldt (Lefoix *et al.* **2008**), avec un rendement de 60%. Enfin, la débenzylation en utilisant du tribromure de bore a été obtenue avec un rendement de 76% pour produire de l'indolo [2,3-a] pyrazolo [3,4-c] carbazole glucosylé **11** (Schéma 55).

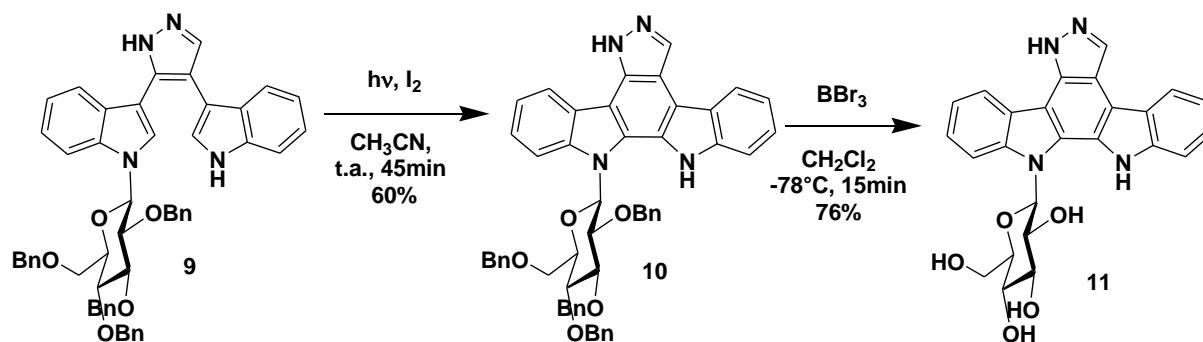


Schéma 55 : Synthèse du composé 11.

Pour la synthèse du régioisomère **19** glucosylé en position N12, nous avons utilisé une stratégie similaire à celle du schéma 44 : l'indole-3-acétate glycosylé **13** a été initialement préparé à partir du composé **5** (Schéma 56). Tout d'abord, l'oxoacétate d'éthyle **12** est synthétisé

par une substitution électrophile sur le composé **5**. La formation du composé **12** est effectuée en deux étapes avec une acylation en utilisant du chlorure d'oxalyle suivie d'un traitement avec une base en présence d'éthanol avec un rendement de 83%, puis une réduction régiosélective avec du triéthylsilane permet d'obtenir le composé **13** avec un rendement de 43%.

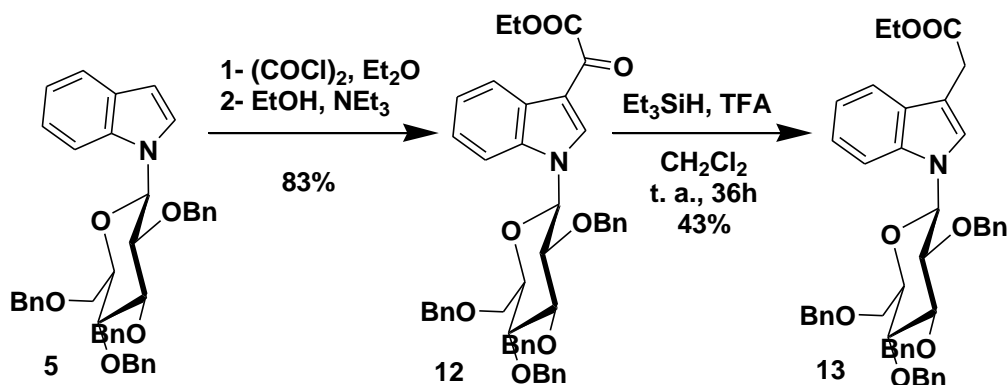


Schéma 56: Synthèse du composé 13.

L'énolate de lithium de l'ester **13** a été préparé et mis à réagir avec de l'acide carboxylique activé synthétisé à partir de **3** pour donner le cétoester **14** sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères.

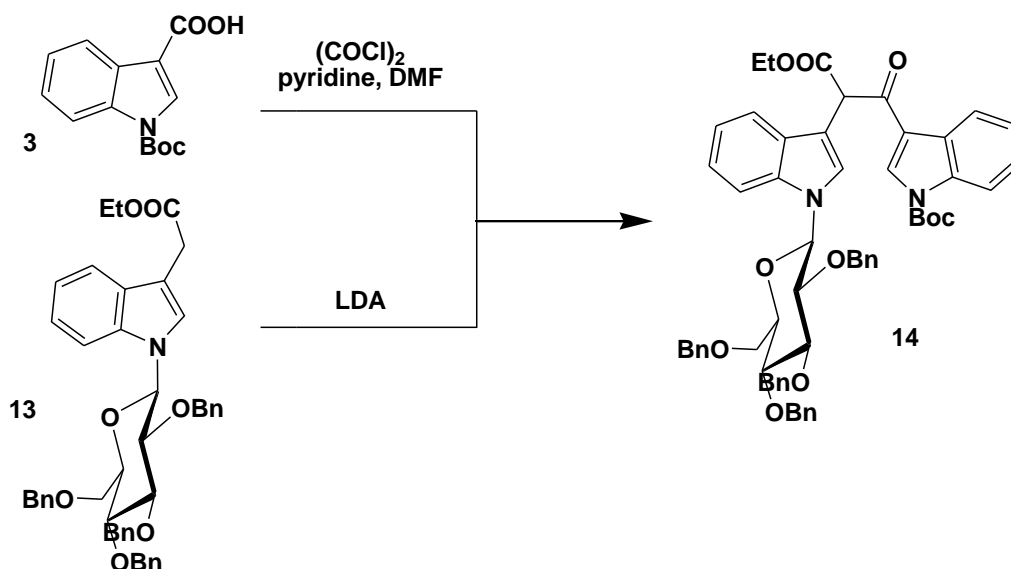


Schéma 57 : Synthèse du composé 14.

La formation du pyrazole a ensuite été réalisée à partir du céto-ester **14** comme présenté ci-dessous. Commencant par la formation de pyrazolone en présence d'hydrazine mono hydraté dans un mélange éthanol/acide acétique, puis triflation. Cependant, avec les

conditions utilisées pour la formation de pyrazolone / pyrazole, le groupe protecteur Boc n'a été que partiellement clivé. Cela a conduit à un mélange de produits Boc-protégés majoritaires et Boc-déprotégés minoritaires (composés **15a** et **15b**) qui ont été séparés avant la réduction catalysée par le palladium des intermédiaires triflate (Schéma 58).

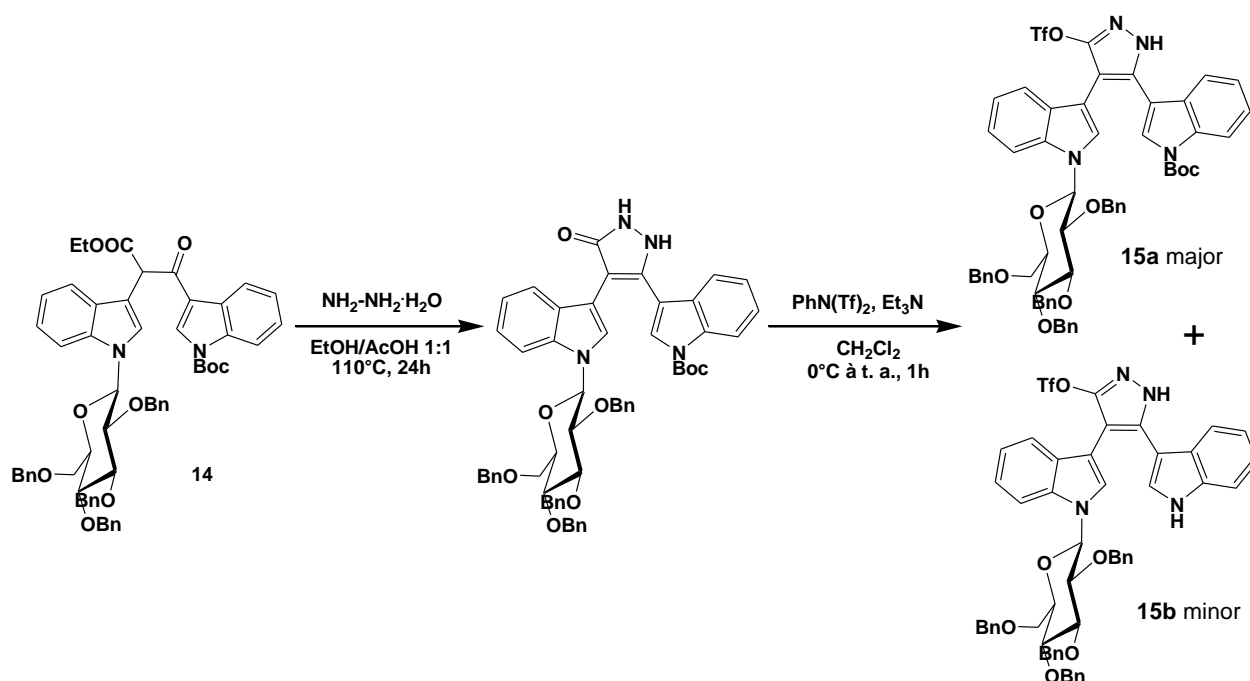


Schéma 58 : Synthèse des composés 15a et 15b

Le produit principal **15a** conduit au pyrazole **16** après réduction, et une étape supplémentaire de déprotection Boc avec K_2CO_3 / MeOH / H_2O donne le composé **17**. Le composé **17** peut également être préparé à partir de l'intermédiaire triflate secondaire Boc-déprotégé **15b**. Pour résumer, le pyrazole **17** a été obtenu avec un rendement de 42% à partir du matériau de départ **13** (soit sur 5 étapes) (Schéma 59).

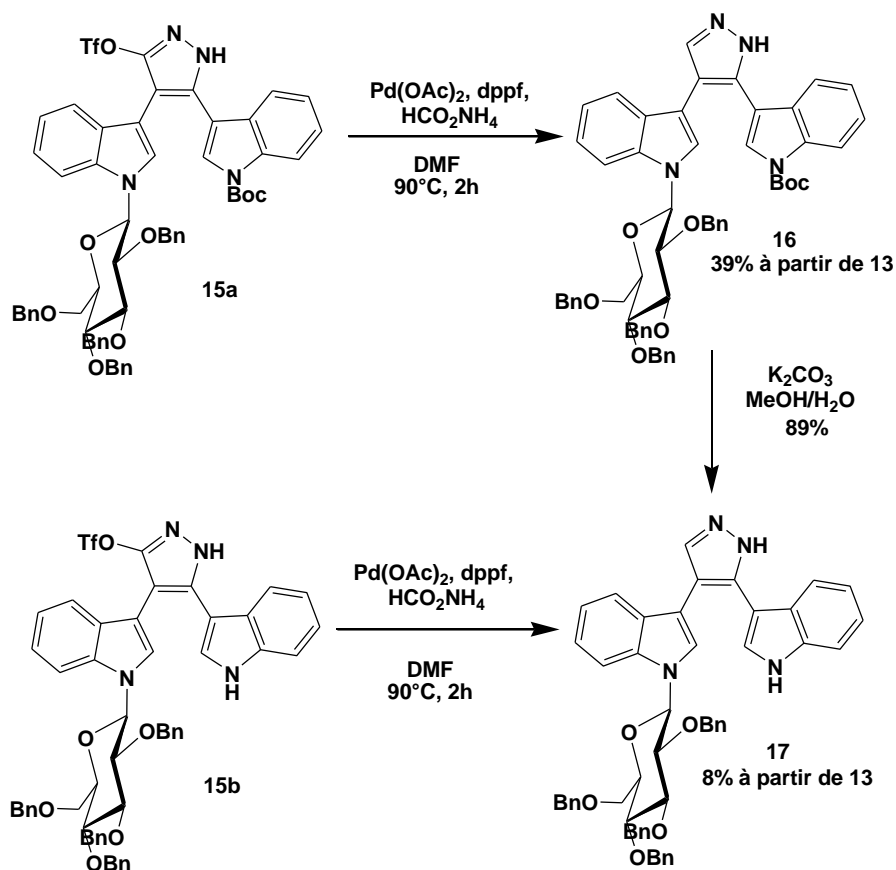


Schéma 59: Synthèse du composé 17.

Ensuite, le composé **18**, comme décrit ci-dessus pour le composé **10**, a été obtenu par cyclisation oxydative photo-induite (photochimique) en présence d'iode avec un rendement de 65%. Enfin le composé **18** est déprotégé (débenzylation) en utilisant du tribromure de bore, pour donner le composé **19** avec un rendement de 69% (Schéma 60).

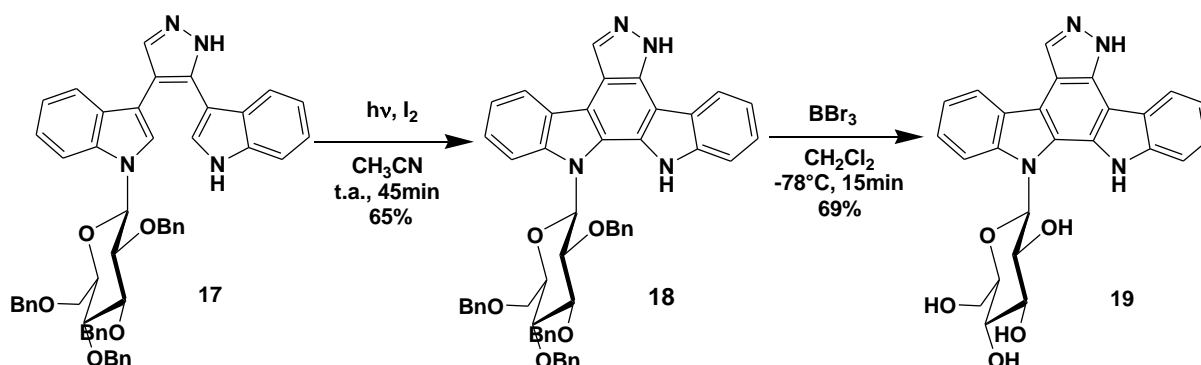


Schéma 60 : Synthèse du composé 19.

V. 2. 2. Evaluation biologique

V. 2. 2. 1. Tests d'activités antiprolifératives

Dans un premier temps, nous avons évalué les activités antiprolifératives des composés **10**, **11**, **18** et **19** vis-à-vis de la lignée cellulaire de carcinome du côlon humain HCT116. Les résultats sont exprimés en CI_{50} (en μM), concentration du composé inhibant de 50% la prolifération des cellules. Comme indiqué dans le **tableau 1**, seuls les composés **11** et **19** portant une fraction β -D-glucosyle déprotégée aux positions N13 ou N12 se sont révélés actifs avec des valeurs de CI_{50} similaires de 12 μM et 11 μM , respectivement. Les composés **10** et **18** portant une fraction de sucre benzylée étaient inactifs avec des valeurs de $CI_{50} > 50 \mu M$. Ces résultats ont démontré que dans cette série de pyrazole, contrairement à ce qui a été observé pour le K252c et la staurosporine (Liu, R.2007, Sanchez-Martinez, C. 2003, Yang, X. 2010, Markwalder, J. 2004), l'introduction d'un fragment β -D-glucosyle n'a pas amélioré la puissance antiproliférative.

A titre comparatif, l'activité antiprolifératives du composé **A**, sur la même lignée cellulaire décrite, est reportée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Activités antiprolifératives des composés **A**, **10**, **11**, **18** et **19** déterminées après une exposition de 72 h de cellules (test MTT).

Cpds	cLogP	HCT116 cell line (CI_{50} , μM)
A	3.58	4.2
10	9.06	> 50
11	1.68	12
18	9.06	> 50
19	1.68	11

V. 2. 2. 2. Tests d'inhibition des kinases Pim-1 et PKC α

Pour évaluer davantage l'influence de la glycosylation sur l'activité des composés nouvellement synthétisés, nous avons étudié s'ils inhibaient Pim-1 et PKC α . Par rapport à l'analogue **A** non glycosylé, nous avons observé une diminution significative de l'activité vis-à-vis de Pim-1, indiquant que la glycosylation était préjudiciable à l'inhibition de Pim-1. Concernant l'inhibition de la kinase, seulement **11** présentaient une activité modérée vis-à-vis de la PKC α (30% d'inhibition à une concentration de 10 μ M) qui n'était pas inhibée par le composé **A**.

Tableau 2. Les puissances inhibitrices des kinases des composés A, 10, 11, 18 et 19 sont exprimées en% d'activité kinase résiduelle à une concentration de composé de 10 μ M.

Cpds	% residual activity (\pm SD)	
	Pim-1	PKC α
A	2 \pm 0	108 \pm 3
10	118 \pm 5	118 \pm 3
11	101 \pm 2	70 \pm 2
18	95 \pm 33	95 \pm 9
19	86 \pm 5	117 \pm 32

V. 2. 2. 3. Interaction avec l'ADN double brin

Enfin, comme les composés étudiés représentaient des systèmes hétéroaromatiques planaires, nous avons évalué leur capacité à interagir avec l'ADN double brin in vitro.

Les indolocarbazoles **10**, **11**, **18** et **19** possèdent de très bonnes propriétés de fluorescence par excitation UV, L'augmentation de la concentration en ADN (ADN double brin de thymus de veau) conduit à une extinction de fluorescence pour tous les composés. Comme le montrent la *Figure 31* et le *Tableau 3*, aucun des composés testés n'a démontré une forte affinité de liaison à l'ADN. Des résultats similaires ont été obtenus précédemment pour le composé **A** (Esvan *et al.* 2016).

Table 3. Constantes de liaison à l'ADN (K_b) déterminées par titrage fluorescent. K_D a été calculé comme une réciproque de K_b des composés **A**, **10**, **11**, **18** et **19**.

Cpds	DNA K_b	DNA K_D
	$10^4 M^{-1}$	$10^2 \mu M$
A	IC ₅₀ = 16 μM	
10	4.6±0.4	21.7±2.2
11	1.92±0.03	52.1±0.8
18	2.35±0.05	42.5±0.8
19	2.12±0.04	47.1±0.8

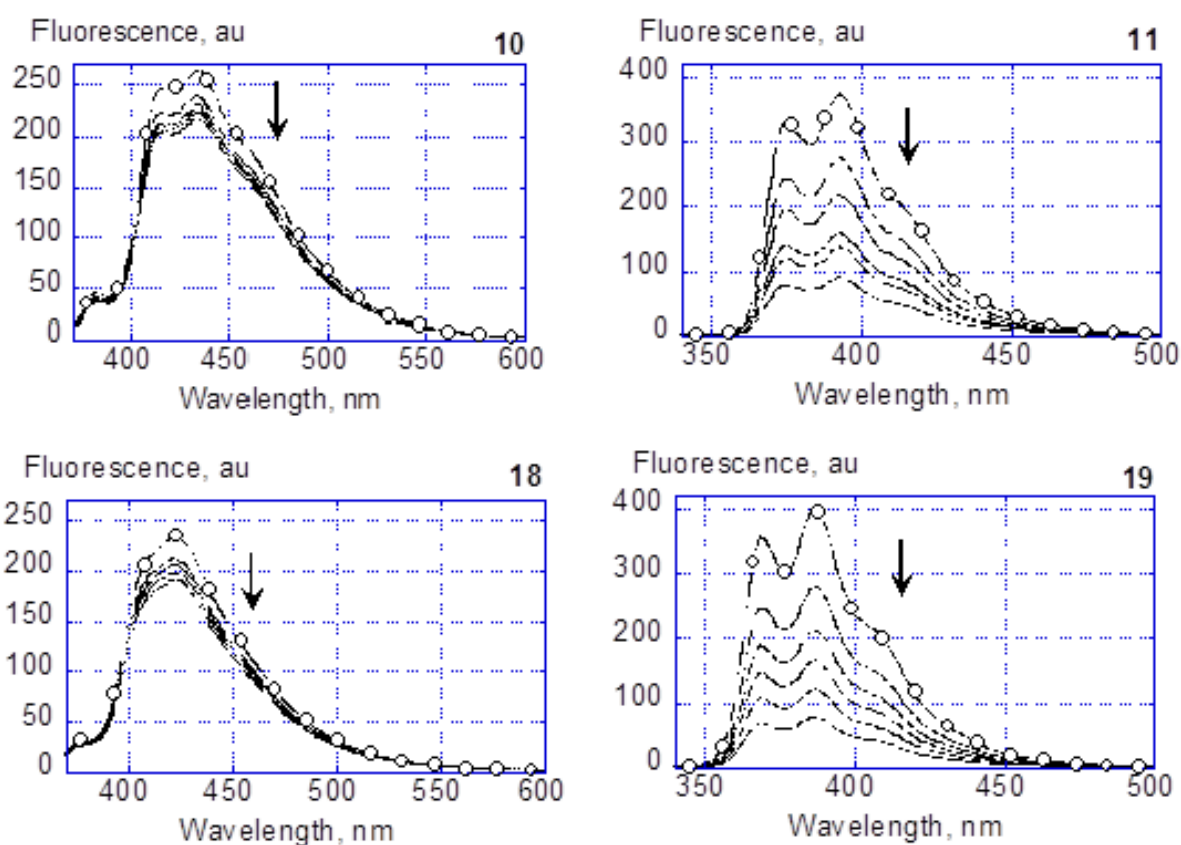


Figure 31. L'extinction de la fluorescence lors de l'interaction de nouveaux dérivés K252c avec l'ADN. Conditions: NaCl 100 mM, tampon Na-phosphate 10 mM pH 6,5. Concentrations: chaque composé 5 μM , ADN 20-200 μM (paires de bases), température 25 ° C.

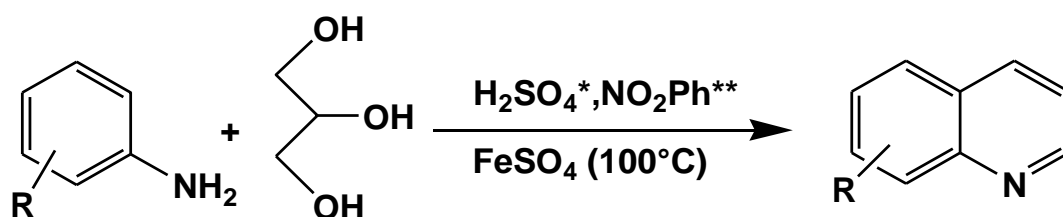
Deuxième partie

Synthèse des dérivés de quinoléine par de légères modifications autour de la réaction standard de Skraup: études DFT

Introduction

Parmi les premières procédures de synthèse dans la préparation de quinoléines, la réaction de Skraup a été largement utilisée.

Le scientifique tchèque Zdenko Hans Skraup (1850-1910) est le premier qui a étudié cette réaction qui porte son nom. Elle est utilisée pour synthétiser des quinoléines par condensation d'aniline et de glycérol en milieu acide fort (H_2SO_4 concentré) en présence d'agent oxydant. Cette réaction a lieu dans des conditions drastiques. Bien que ses conditions de réaction extrêmes, la réaction de Skraup a été réalisée à l'échelle industrielle.



R=H, Hal, NO_2 , OH, OR', NR'_2 .

* H_2SO_4 (conc.), H_3PO_4 , H_3BO_3 .

** As_2O_5 , I_2 , SnCl_4 , $m\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_4$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$.

Schéma 61 : Réaction de Skraup

But et objectifs du travail

Le but de ce travail est de :

- Revisiter la réaction de Skraup, explorer le rôle et le potentiel du glycérol dans la production de quinolines à structure complexe, en suivant des conditions légèrement modifiées par rapport à la réaction standard, où le glycérol est utilisé en excès.
- Tenter, par la suite de proposer une variante plus écologique de la réaction de Skraup

Dans cette objective, la synthèse de quelques esters de glycérol d'acide quinoléine-5-carboxylique à partir des anilines correspondantes (dérivés de l'acide 3-aminobenzoïque) a été réalisée en utilisant la réaction de Skraup légèrement modifiée (excès de glycérol).

Il s'est avéré que l'utilisation d'un excès de glycérol en réaction avec l'acide 3-aminobenzoïque avec I_2 comme oxydant, dans le H_2SO_4 concentré aboutit à la formation de deux isomères acycliques de l'ester de glycérol dont l'un est prédominant et un troisième isomère cyclique intéressant obtenu sous la forme de traces.

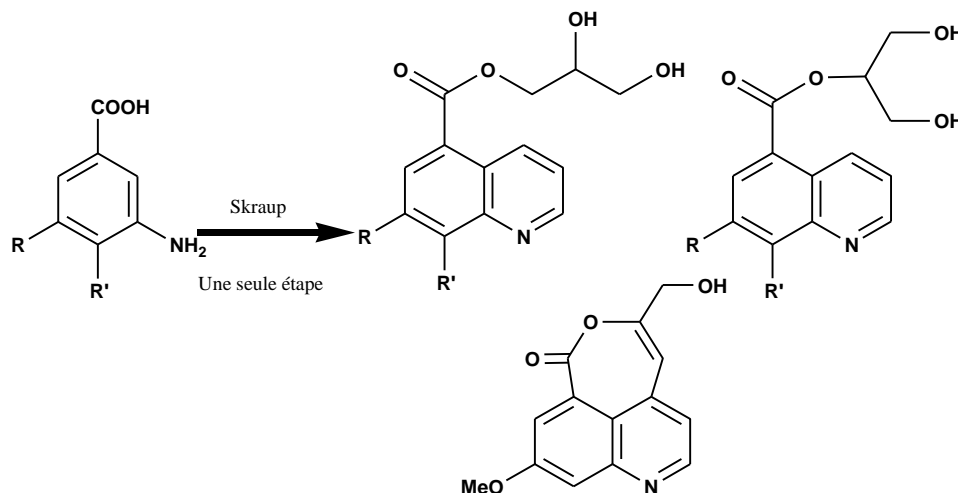


Schéma 62 : nouveaux dérivés de la quinoléine estérifiée par le glycérol

Alors que l'obtention des isomères acycliques, en une seule étape, peut être facilement expliquée, la formation de l'isomère cyclique intéressant obtenu sous forme de traces est à étudier de plus près, puisque c'est le composé qui répond à notre attente.

Après plusieurs tentatives infructueuses de le reproduire, nous avons décidé de confronter nos résultats expérimentaux aux calculs théoriques DFT.

Mécanisme de la réaction de Skraup

Le mécanisme de la réaction est susceptible de passer par la formation d'acroléine en tant qu'intermédiaire. L'acroléine est obtenue par déshydratation catalysée par l'acide du 1,2,3-propanetriol (glycérol) pour former du propenal (aldéhyde α , β -insaturé). Les étapes du mécanisme sont décrites ci-dessous :

Etape 1: La formation d'acroléine (**Schéma 63**), par l'action de H_2SO_4 , la déshydratation du glycérol, conduit à la perte de deux molécules d'eau aboutit finalement à la formation d'acroléine.

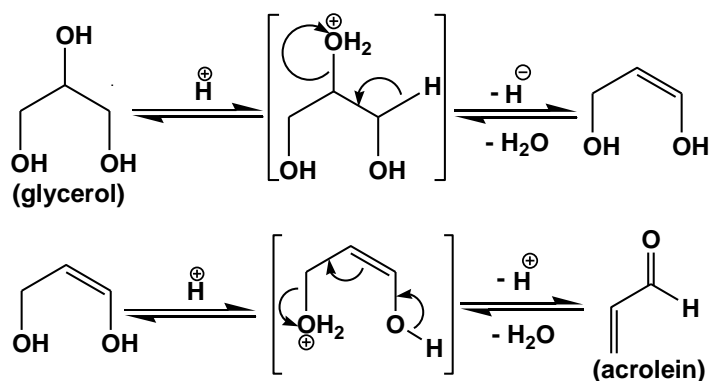


Schéma 63 : Schéma de la formation d'acroléine In-Situ.

Etape 2: l'action de l'acroléine sur l'aniline donne le produit d'addition de Michael (1,4) et la cyclisation par addition intramoléculaire électrophile suivie de rendements de protonation, de déshydratation et d'oxydation en produit de quinoléine (**Schéma 64**).

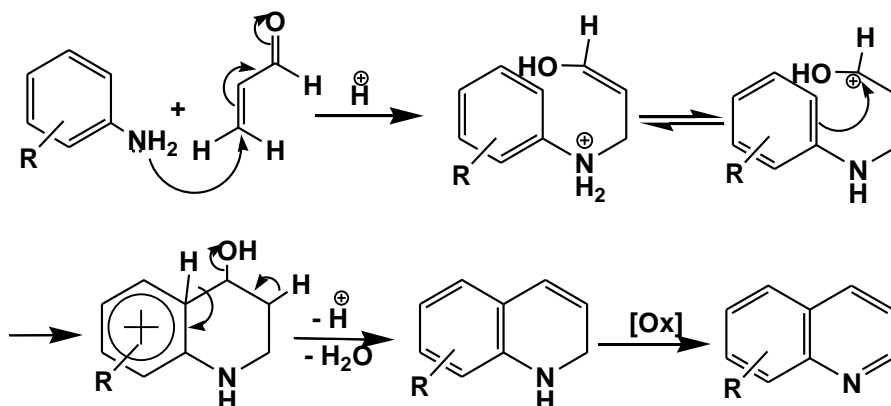


Schéma 64: Mécanisme de la réaction de Skraup.

Résultats et discussion

Dans le présent travail, un procédé pour la synthèse d'esters de glycérol d'acide quinoléine carboxylique à partir d'acides aminobenzoïques commerciaux et de glycérol est réalisé.

Dans une procédure typique de Skraup, un mélange d'aniline (1 équiv.) et de glycérol (2 équiv.) est chauffé avec de l'acide sulfurique concentré (1,5 équiv.) et du nitrobenzène comme oxydant, pendant six heures à des températures supérieures à 150 °C.

Les légères modifications apportées au procédé de Skraup dans ce travail sont résumées dans le **tableau 4**. Elles consistent à utiliser du glycérol en excès (16 équiv. Au lieu de 2 équiv.), De l'acide sulfurique concentré en léger excès (2,7 équiv.) contrôler la température de réaction (palier de température?) telle que: 110 C pendant 1 heure et 170 C pendant une heure supplémentaire et en respectant l'ordre de mise en présence des réactifs.

Tableau 4 : Présentation des modifications apportées à la réaction de Skraup

Réaction de Skraup Traditionnelle	Réaction de Skraup Modifié
aniline (1 équiv.)	dérivés de l'acide 3-Aminobenzoïque (1 équiv.)
glycérol (2 équiv.)	glycérol (16 équiv.)
nitrobenzène comme oxydant	I ₂ comme oxydant
6h à 150°C	110° C (1h) puis 170°C (1h) (Palier de température)
H ₂ SO ₄ (1.5 équiv.)	H ₂ SO ₄ (2.7 équiv.)

Par conséquent, à un mélange du dérivé d'acide aminobenzoïque (1 équiv.), du glycérol (16 équiv.) et I₂ (0,018 équiv.) est ajouté goutte à goutte, sous agitation, de l'acide sulfurique concentré (2,72 équiv.). Le mélange est progressivement chauffé à 110 ° C et maintenu à cette température pendant une heure, la température est ensuite augmentée jusqu'à 170 ° C et le mélange est laissé à réagir pendant une heure supplémentaire.

La réaction conduit à la formation de deux isomères acycliques de l'ester de glycérol correspondant dont l'un est prédominant et d'un troisième isomère cyclique obtenu en traces exceptionnellement avec R = OMe (Schéma 65).

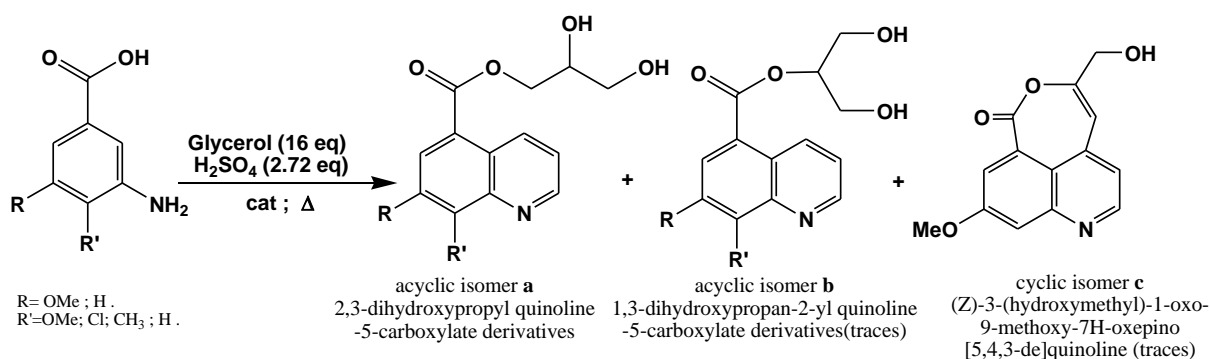


Schéma 65: Structure des trois isomères obtenus lors de la réaction de Skraup modifiée.

Sur la base du mécanisme de réaction déjà connu pour la réaction de Skraup, la formation des isomères acycliques pourrait être expliquée de deux manières :

Soit le noyau de quinoléine est formé en premier, soit le groupe carboxyle est estérifié en premier (**Schéma 66**). Comme le glycérol a deux groupes hydroxyle primaires et un groupe hydroxyle secondaire, le groupe carboxyle peut estérifier chacun d'entre eux. Par conséquent, deux isomères acycliques sont formés, car le groupe hydroxyle primaire est plus réactif, l'ester correspondant est prédominant.

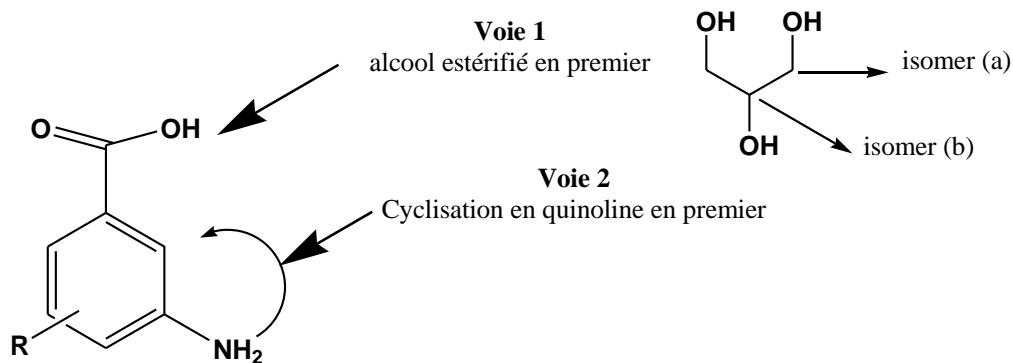


Schéma 66 : Schéma montrant les voies possible pour la formation des isomères.

Dans les deux cas, l'idée d'utiliser un excès de glycérol dans la synthèse de quionoléine à structure complexe semble validée, puisque deux équivalents de glycérol ont été utilisés en une seule étape.

Mécanisme proposé pour les isomères acycliques

La réaction commence par une addition de Michael (1,4) du doublet électronique sur l'atome d'azote de l'acide 3-aminobenzoïque sur l'acroléine pour donner un intermédiaire énol, suivi d'une tautomérisation, d'une cyclisation intramoléculaire et d'une déshydratation pour donner la dihydroquinoléine. L'oxydation catalysée par l'iode conduit à l'acide quinoléine carboxylique qui, une fois protoné, subit une attaque nucléophile par le doublet électronique de l'oxygène du glycérol (en excès), une protropie suivie d'une déshydratation et d'une déprotonation conduit à l'ester de glycérol d'acide quinoléine carboxylique.

Le Schéma 67 montre le mécanisme de réaction de la voie 1, où la formation du noyau de quinoléine a lieu en premier, suivie par l'estérification de Fisher de l'acide carboxylique.

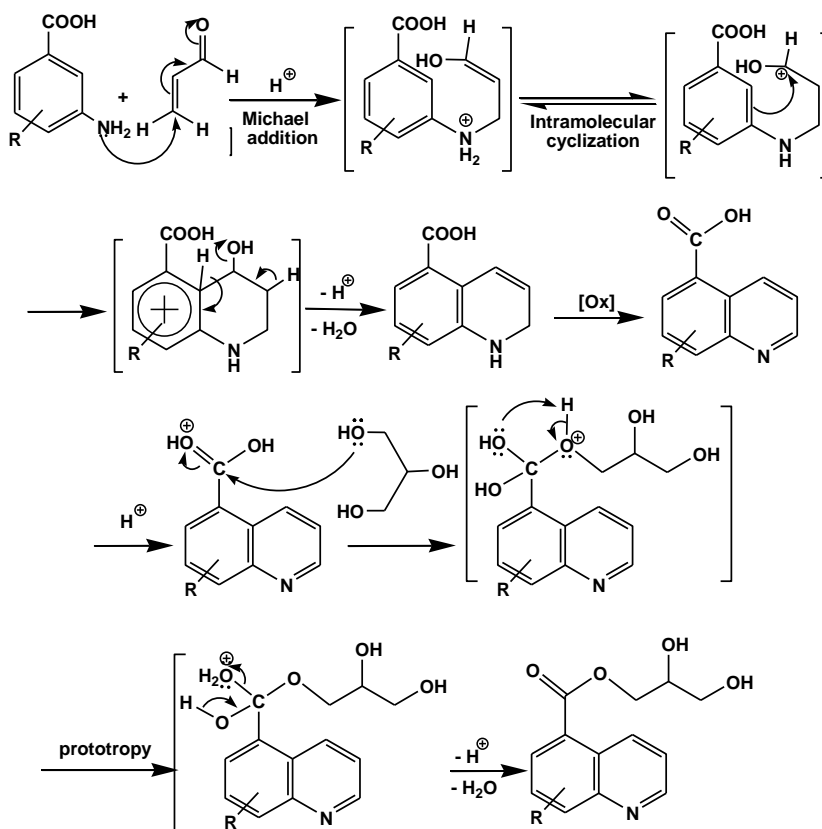


Schéma 67: Mécanisme avec la formation du noyau de quinoléine en premier lieu.

De même, le schéma 68 montre le mécanisme de la voie 2 où, l'estérification a lieu en premier lieu. Afin d'éviter la répétition, le groupe hydroxyle secondaire est impliqué, conduisant à l'isomère acyclique (b).

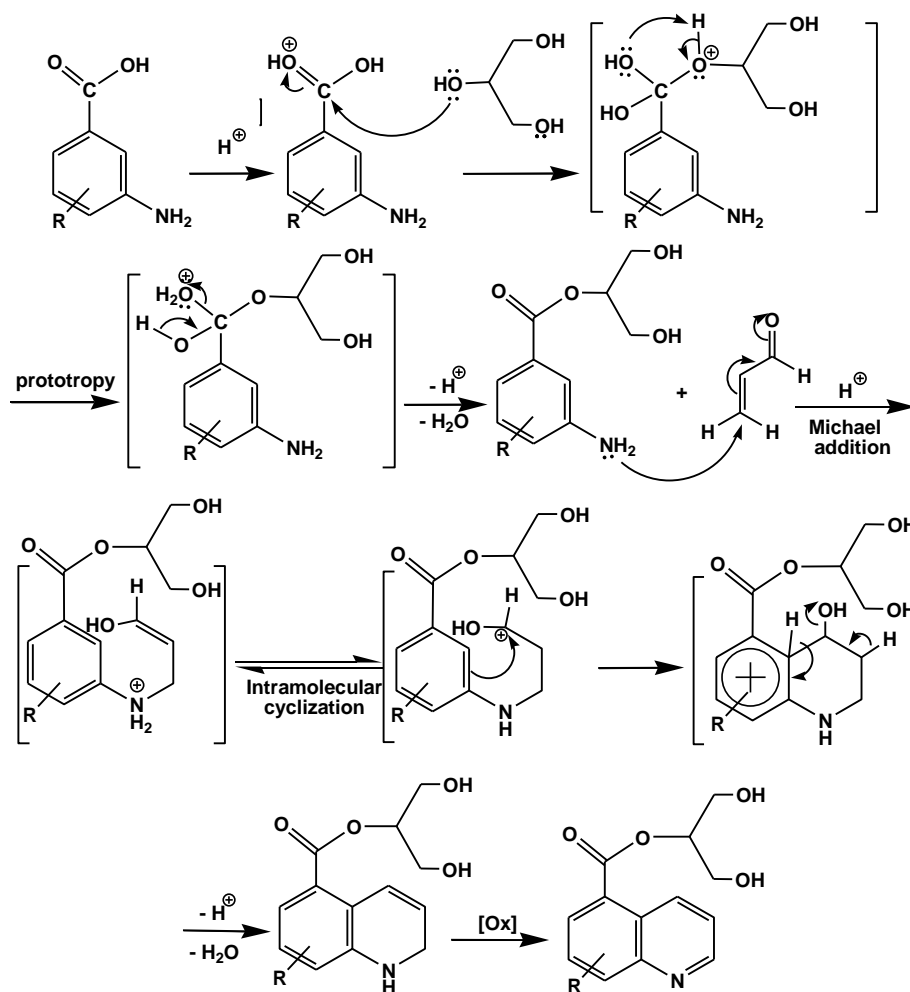


Schéma 68 : Mécanisme avec estérification en premier lieu.

En ce qui concerne l'isomère cyclique, le spectre RMN ^1H 1D et 2D montrent qu'il a bien été formé. Les tentatives infructueuses de le re-préparer laisse penser qu'il est probablement formé à partir de l'isomère moins prédominant (b) aux étapes du mécanisme montré dans le **Schéma 69**.

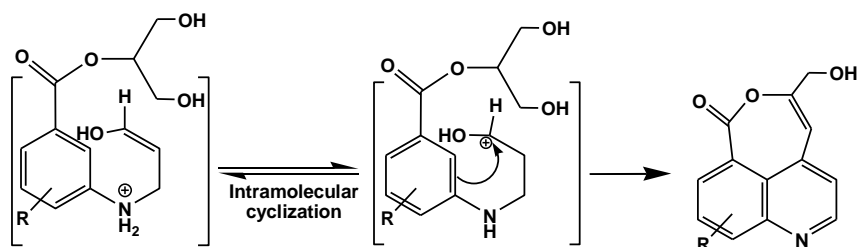


Schéma 69 : Mécanisme probable de la formation de l'isomère cyclique.

La réaction de skraup a été réalisée avec succès avec quatre dérivés différents de l'acide 3-aminobenzoïque pour donner l'isomère acyclique prépondérant (a), l'autre isomère acyclique 'b'. Les rendements modérés sont dus à la perte de matière pendant le traitement.

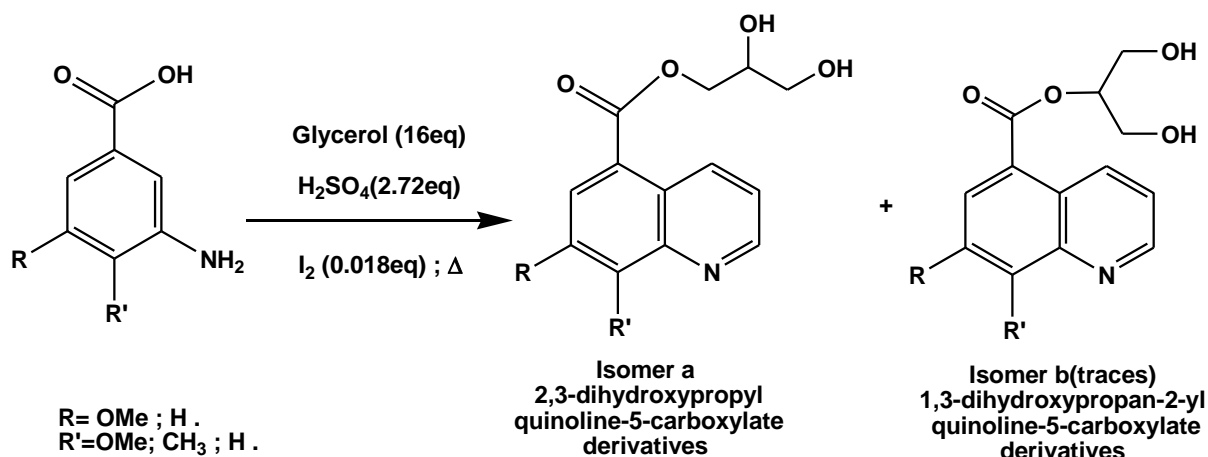


Schéma 70: Nouvelle réaction de Skraup avec différents dérivés de l'acide 3-aminobenzoïque.

Il est à souligner que la réaction avec l'acide 3-amino-4-chlorobenzoïque ou l'acide 3-amino-5-bromobenzoïque ainsi que l'acide anthranilique conduit à la cyclisation en les quinoléines correspondantes 5 et 6 sans autre estérification du groupe acide carboxylique par le glycérol.

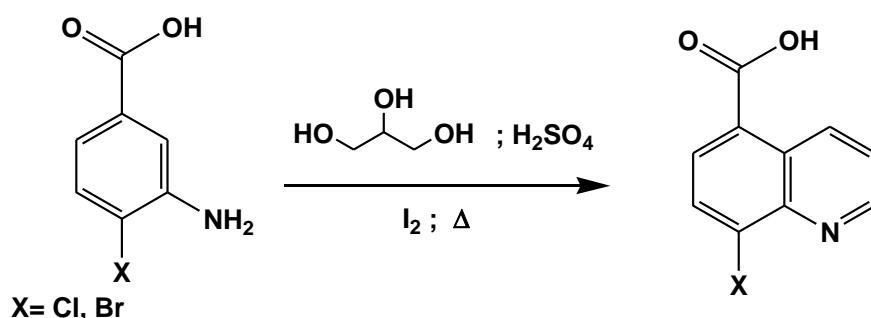


Schéma 71: Nouvelle réaction de Skraup avec les dérivés de l'acide 3-aminobenzoïque halogéné.

De même, l'utilisation de l'acide 2-amino-5-méthylbenzoïque donne de l'acide quinolin-8-carboxylique. L'estérification n'a pas eu lieu.

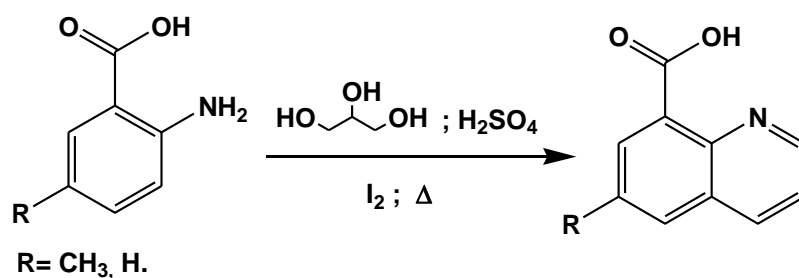


Schéma 72 : La nouvelle réaction de Skraup avec différents dérivés de l'acide anthranilique.

V. 3. 2. Etude théorique des dérivés de la quinoléine par des méthodes DFT

V. 3. 2. 1. Détails de calcul

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Gaussian 09 (Frisch *et al.* 2009). L'optimisation géométrique des réactifs a été réalisée à l'aide de méthodes DFT au niveau B3LYP / 6-31 ++ G (d, p) de la théorie (Lee *et al.* 1988). Les descripteurs conceptuels de la DFT ont été calculés en utilisant l'approximation du noyau gelé et le théorème de Koopmans (Koopmans. 1933). Ainsi, les indices globaux ont été calculés en utilisant les densités de frontière, les énergies de frontière et les indices locaux à travers les populations atomiques comme une forme approximative de leur expression de la densité du système. Les structures électroniques des points stationnaires ont été analysées par la méthode orbitale de liaison naturelle (NBO) (Reed *et al.* 1988 et Frisch *et al.* 2010).

V. 3. 2. 2. Indices de réactivité globale

Afin de décrire la réactivité et la stabilité d'un système, des concepts chimiques qualitatifs populaires dérivés du DFT conceptuel (Chebbi *et al.* 2017, Harrath *et al.* 2015) tels que le potentiel chimique μ (Parr *et al.* 1983) (Eqs. 1), dureté η (Eqs. 2) et même l'indice d'électrophilie ω (Eqs. 5), ont été calculées (Chermette, 1998 et Geerlings *et al.* 2003)

$$\mu = \left(- \right) v(r) \quad (1)$$

$$\eta = \left(\frac{2E}{2} \right) v(r) \quad (2)$$

E: est l'énergie totale du système,

N: représente son nombre d'électrons.

$v(r)$: indique que les dérivés sont pris à potentiel externe constant (Parr *et al.* 1984)

Ces indices sont souvent approximés par des valeurs propres orbitales de frontière, alors les équations ci-dessus peuvent être réécrites, en utilisant le théorème de Koopmans comme:

$$\mu \cong (\epsilon_{\text{HOMO}} - \epsilon_{\text{LUMO}})/2 \quad (3)$$

$$\eta \cong (\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}}) \quad (4)$$

Avec ϵ_{HOMO} et ϵ_{LUMO} sont les énergies des orbitales moléculaires les plus occupées et les plus basses inoccupées (HOMO et LUMO) (Klopman G. **1986**).

L'indice d'électrophilie tel que défini par (Parr *et al.* **1999**) est l'énergie stabilisatrice qu'un système obtient lorsqu'il acquiert suffisamment d'électrons pour être saturé. C'est donc une mesure de sa capacité à accueillir des électrons supplémentaires.

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (5)$$

V. 3. 2. 3. Les indices de réactivité locale

Les fonctions de Fukui condensées f_k^+ et f_k^- (Chermette *et al.* **2002**) ont été considérées comme décrivant la sélectivité du site ou la réactivité d'un atome k dans une molécule. Ce dernier peut être réalisé par analyse de population électronique.

$$f_k^+ = [q_k(N + 1) - q_k(N)] \quad (6)$$

Pour l'attaque nucléophile.

$$f_k^- = [q_k(N) - q_k(N - 1)] \quad (7)$$

Pour une attaque électrophile.

Dans les Equations. (6) et (7), k est la numérotation du site atomique, $q_k(N)$, $q_k(N - 1)$ et $q_k(N + 1)$ représentent les charges atomiques sur le site k dans les systèmes neutres, cationiques et anioniques, respectivement.

V. 3. 2. 4. Analyse théorique

Les trois isomères P1, P2 et P3 précédemment notés a, b et c respectivement, avec différents substituants R, R' (Tableau 5) tels que définis dans le schémas 65 ont été calculés pour les séries numérotées de 1 à 8 en phase gazeuse (vide). La fig. 32 représente leurs structures DFT optimisées P1-3, P2-3 et P3-3 pour la série 3 (R = OCH3, R' = H).

Il est à noter que les calculs réalisés correspondent aux quatre composés effectivement synthétisés dans l'objectif de donner une explication aux résultats expérimentaux obtenus, alors que les composés 5-8 sont considérés dans le but d'étudier l'influence des substituants.

Tableau 5 : Différents substituants R, R' considérés

série	R	R'
Composés synthétisés		
1	H	CH₃
2	H	OCH₃
3	OCH₃	H
4	H	H
Composés de référence		
5	OCH ₃	CH ₃
6	OCH ₃	Cl
7	OCH ₃	OCH ₃
8	H	Cl

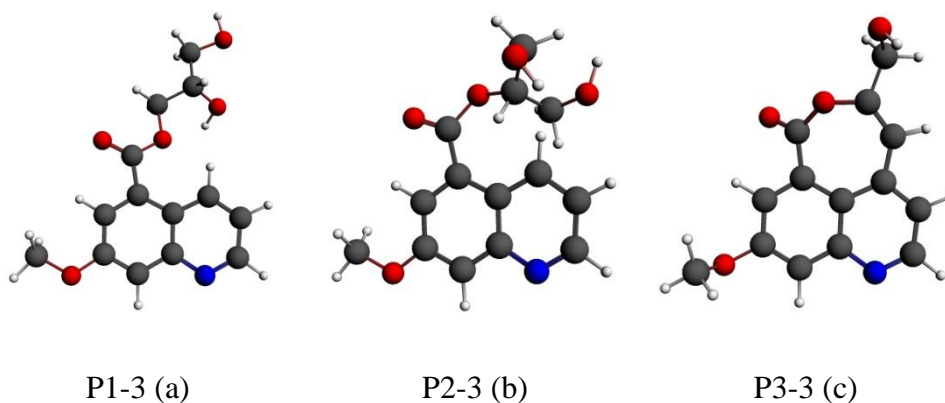


Figure 32. Structure optimisées par DFT de P1, P2 et P3 de la série 3.

Afin d'expliquer la stabilité de tous les isomères P1, P2 et P3, les paramètres thermodynamiques: énergie libre de Gibbs (ΔG), enthalpie (ΔH), énergie du point zéro (ZPE) et énergie totale corrigée ($\Delta E + ZPE$) ont été calculés. Les résultats sont résumés dans (tableau 6).

Tableau 6 : Energie de Gibbs DFT / B3LYP (ΔG), variation d'enthalpie (ΔH) ainsi que la correction des énergies relatives du point zéro ($\Delta E + ZPE$) (kcal / mol) des différents produits.

série	isomères	ΔG	ΔH	$\Delta E+ZPE$
3	P1	0	0	0
	P2	5.65	5.45	5.65
	P3	48705.10	48700.75	48734.00
5	P1	0	0	0
	P2	5.64	5.49	5.69
	P3	48704.90	48700.91	48734.20
6	P1	0	0	0
	P2	5.86	5.44	5.62
	P3	48705.40	48701.05	48734.30
7	P1	0	0	0
	P2	5.38	5.46	5.72
	P3	48705.00	48700.61	48733.90
4	P1	0	0	0
	P2	5.38	5.19	5.41
	P3	48705.10	48700.98	48734.30
1	P1	0	0	0
	P2	5.42	5.25	5.45
	P3	48705.10	48700.86	48734.10
8	P1	0	0	0
	P2	5.25	5.13	5.35
	P3	48705.40	48701.30	48734.60
2	P1	0	0	0
	P2	1.08	0.18	0.18
	P3	48700.40	48695.51	48542.9

Il a été trouvé expérimentalement que les deux isomères a et b (nommés P1 et P2) ont été isolés contrairement à l'isomère cyclique c (P3). Pour conforter ce résultat, la différence d'énergie entre les isomères a été calculée, en prenant comme référence l'isomère P1 le plus stable, ayant l'énergie de Gibbs la plus négative pour l'ensemble de la série. La forme b (P2), est formée à l'énergie légèrement supérieure avec $\sim 5,5$ kcal / mol ci-dessus. Alors que l'isomère P3 cyclique est prédit à très haut niveau d'énergie, ce qui explique sa synthèse infructueuse.

De plus, la nature du substituant ne change pas l'ordre de stabilité mais peut être améliorée. En effet, quel que soit le substituant utilisé, l'isomère P1 reste le plus stable. Pour en revenir à la régiosélectivité, le premier isomère (a) est obtenu par la protonation de **R2** (glycerol) tandis que le second (b) est obtenu par la protonation de **R1** (acide 3-aminobenzoïque). Cette protonation influence la nature électrophile et nucléophile des réactifs et par conséquent la nature de l'isomère obtenu. En effet pour la formation de P1, le noyau de quinoléine se produit d'abord tandis que pour l'isomère P2, l'estérification a lieu d'abord. Pour avoir une vision plus précise sur cette régiosélectivité, nous avons procédé à une optimisation globale de la géométrie des réactifs à la même base pour expliquer la sélectivité de la région et la réactivité des réactifs (R1 et R2).

En ce qui concerne l'isomère P1, la formation du noyau de quinoléine se produit d'abord, suivie de l'estérification de Fisher de l'acide carboxylique. Pour illustrer plus de cette façon, nous avons présenté à la Fig. 33 les deux interactions d'énergie relative possibles ΔE_1 et ΔE_2 définies comme suit:

$$\Delta E_1 = \text{LUMO}_{R2} - \text{HOMO}_{R1} \quad \text{et} \quad \Delta E_2 = \text{LUMO}_{R1} - \text{HOMO}_{R2}$$

Comme représenté sur la fig. 105, l'analyse FMO pour cette réaction montre que les interactions principales se produisent entre la HOMO (R1) et la LUMO (R2), situés à **-5,96** et **-2,38** eV, respectivement. Par conséquent, à partir des résultats rapportés dans (Tableau 7), on peut déduire que l'entité R2 joue le rôle d'électrophile (accepteur d'électrons) et quelle que soit la nature du substituant, l'acide 3-aminobenzoïque de l'ensemble considéré joue le rôle de nucléophile.

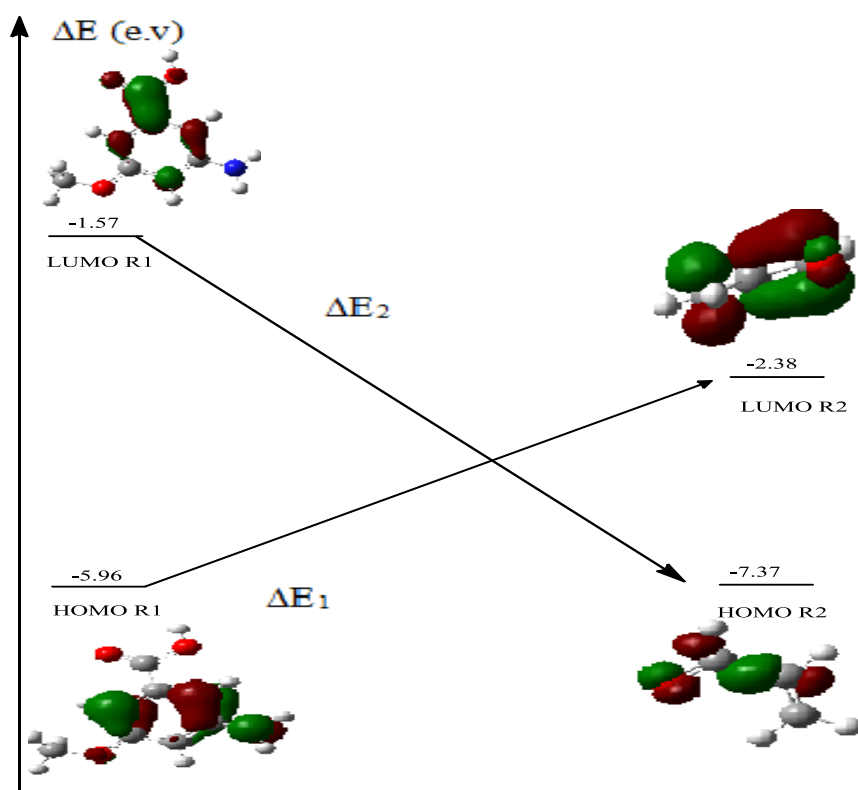


Figure 33 : Schéma orbitales moléculaire frontière des réactions entre l'acide 3-aminobenzoïque et l'acroléine.

Tableau 7 : Energie orbitale frontière HOMO, LUMO (eV) et les descripteurs de réactivité globale (μ , η , S , w) pour l'acide 3-aminobenzoïque et l'acroléine.

Reagents	HOMO	LUMO	μ (eV)	η (eV)	S (eV ⁻¹)	ω (eV)
R1-3	-5.969	-1.578	-3.773	2.195	0.227	3.242
R1-5	-5.904	-1.450	-3.677	2.227	0.224	3.036
R1-6	-6.138	-1.721	-3.930	2.208	0.226	3.496
R1-7	-5.932	-1.505	-3.719	2.213	0.225	3.124
R1-4	-6.068	-1.623	-3.846	2.222	0.224	3.327
R1-1	-5.995	-1.493	-3.744	2.250	0.222	3.114
R1-8	-6.276	-1.821	-4.049	2.227	0.224	3.679
R1-2	-5.751	-1.304	-3.528	2.223	0.224	2.799
R2	-7.378	-2.380	-4.879	2.498	0.200	4.763

Dans le tableau 7, nous rapportons les énergies des FMO, HOMO, LUMO et les descripteurs de réactivité globale à savoir, le potentiel chimique électronique μ (eV), la dureté globale η (eV), la douceur globale S (eV⁻¹) et l'électrophilie globale ω (eV). D'après le tableau 7, on peut également conclure que dans le cas de la réaction 1 entre l'acide 3-aminobenzoïque (R1) et l'acroléine (R2), le potentiel chimique électronique de R1 (-3,773 eV) est supérieur à celui de R2 (-4,879 eV), ce qui indique que le transfert d'électrons aura lieu de R1 à R2. De plus, l'indice électrophile global de R1 ($\omega = 3.242$ eV) est inférieur à celui de R2 ($\omega = -4.763$ eV) et par conséquent, R1 se comporte comme un nucléophile, donc R2 se comporte comme un électrophile. Tous les autres descripteurs comme la dureté globale et la douceur globale convergent vers les mêmes résultats.

Tableau 8: Différences d'énergie ΔE entre les deux interactions possibles ΔE_1 et ΔE_2 pour l'isomère P1

Gap energetic	P1-3	P1-5	P1-6	P1-7	P1-4	P1-1	P1-8	P1-2
ΔE_1	3.588	3.524	3.757	3.552	3.688	3.614	3.896	3.370
ΔE_2	5.800	5.927	5.656	5.872	5.754	5.884	5.556	6.073

* $\Delta E_1 = \text{LUMO}_{R2} - \text{HOMO}_{R1}$ and $\Delta E_2 = \text{LUMO}_{R1} - \text{HOMO}_{R2}$

De plus, les réactions chimiques sont soit sous contrôle de charge soit contrôle orbitaire frontières (réactivité locale). Dans ce contexte, chaque réactif (R1 et R2) a été caractérisé par des indices conceptuels de DFT supposés décrire les deux effets. Ensuite, la charge et / ou le contrôle orbital de la réaction est discuté dans les tableaux 9 et 10.

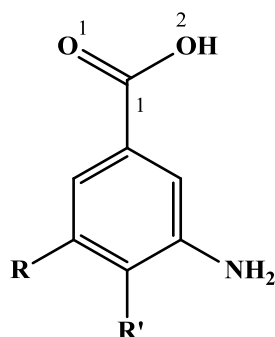


Figure 34 : Sélection d'atomes indexés pertinents (C1, O1, O2 et N) dans l'acide 3-aminobenzoïque.

Nous pouvons voir dans le tableau 6 que les valeurs de f_k^- (0,014) indiquent que C₁ du réactif R1 devrait être le site le plus réactif pour l'attaque nucléophile, et dans le tableau 7, les valeurs de f_k^+ sont toutes négatives et négatives l'indice de réactivité n'a pas de sens. Les résultats théoriques des indices de réactivité locale f_k^- et f_k^+ ne nous conduisent pas aux produits expérimentaux, donc la réaction n'est pas sous contrôle orbitalaire.

Les charges nettes ont été calculées à l'aide du système d'analyse de la population naturelle (NPA). Les charges calculées sont indiquées dans les tableaux 9 et 10.

Pour la série (1-8) de l'acide 3-aminobenzoïque (tableau 9), la charge naturelle négative la plus faible appartient à l'azote en tant que centres nucléophiles avec une charge naturelle partielle autour de -0,846e, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux la réaction est sous contrôle de charge. Pour l'acroléine (fig.107) la charge de population naturelle sélectionnée q (NPA) et le descripteur de réactivité locale f_k^+ sont rapportés dans le tableau 10, nous pouvons voir que la charge naturelle positive la plus élevée appartient au carbone C1 comme centre électrophile dans R2 (q = 0,373e, C₁).

Tableau 9: Charge de la population naturelle sélectionnée (NPA) q et descripteur de la réactivité locale f_k^- pour la série des substituants de l'acide 3-aminobenzoïque

series	3		5		6		7		4		1		8		2	
Index	q	-	q	-	q	-	q	-	q	-	q	-	q	-	q	-
N	-0.846	-0.186	-0.849	-0.191	-0.839	-0.205	-0.846	-0.226	-0.848	-0.237	-0.850	-0.221	-0.840	-0.229	-0.849	-0.204
C ₁	0.804	0.014	0.803	0.013	0.803	0.014	0.801	0.015	0.802	0.016	0.802	0.017	0.802	0.017	0.800	0.017
O ₁	-0.614	-0.058	-0.617	-0.058	-0.612	-0.058	-0.612	-0.066	-0.609	-0.062	-0.612	-0.068	-0.606	-0.067	-0.619	-0.074
O ₂	-0.724	-0.013	-0.725	-0.013	-0.723	-0.013	-0.727	-0.015	-0.726	-0.014	-0.727	-0.014	-0.725	-0.014	-0.729	-0.017

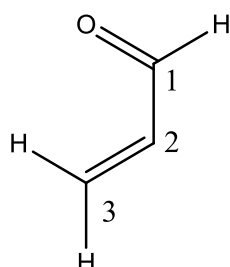


Figure 35: Sélection des atomes indexés pertinents (C₁, C₂, C₃ et O) dans la molécule d'acroléine.

Tableau 10: Charge de population naturelle sélectionnée q (NPA) et descripteur de réactivité locale f_k^+ pour l'acroléine.

atome	q (NPA)	f^+
O	-0.544	-0.194
C ₁	0.373	-0.196
C ₂	-0.355	-0.082
C ₃	-0.312	-0.342

Pour la seconde voie, où l'estérification a lieu d'abord et permet la formation du second isomère P2. De même que pour la première manière liée au produit P1, nous avons présenté sur la figure 36, les deux interactions possibles ΔE_1 et ΔE_2 pour lesquelles les résultats numériques sont reportés dans le tableau 11.

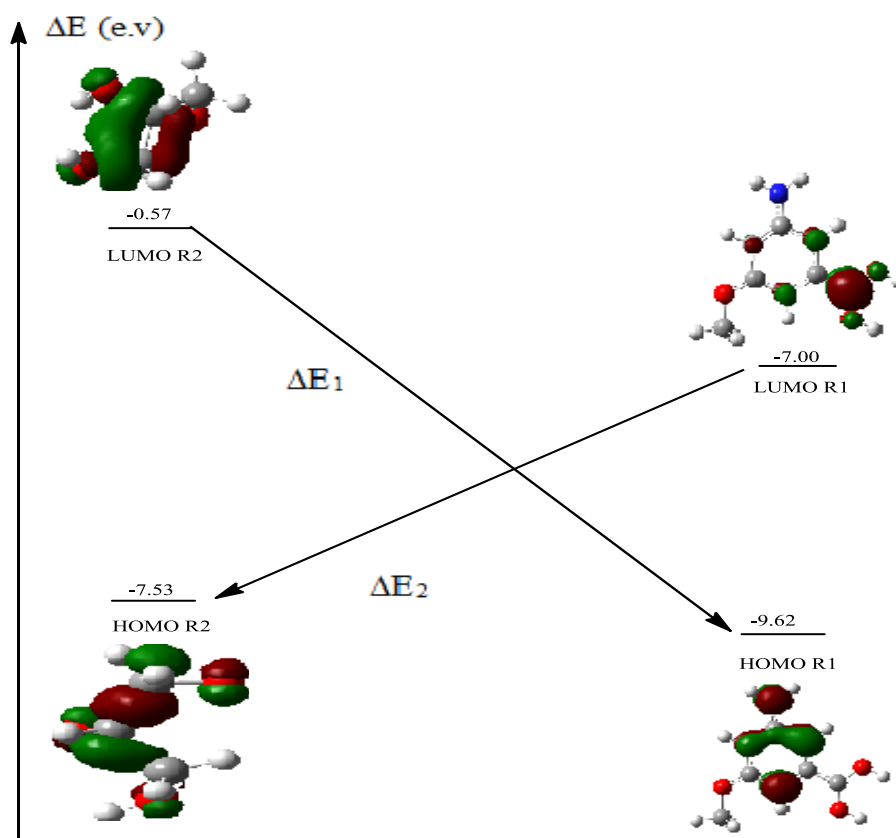


Figure 36 : Schémas des orbitales moléculaires frontières des réactions entre l'acide protoné 3-aminobenzoïque et le glycérol

L'analyse FMO pour cette réaction montre que les interactions principales se produisent entre le HOMO_{R2} et le LUMO_{R1}. Ainsi, à partir des résultats du tableau 11, on peut conclure qu'il y

a maintenant une inversion du caractère nucléophile et électrophile des réactifs, par conséquent le glycérol est devenu plus nucléophile que l'acide 3-aminobenzoïque avec la protonation de l'acide carboxylique. Le réactif R1 a la plus faible valeur du potentiel chimique électronique μ (**-8,31 eV**) indiquant son comportement électrophile et le glycérol (R2) a le potentiel chimique le plus élevé (**-4,056 eV**). Ces résultats indiquent que le transfert d'électrons aura lieu de R2 à R1. En outre, sur la base de la valeur de l'indice d'électrophilie (ω) et de la faible valeur de dureté globale (η), on peut voir que R1 est le plus électrophile avec ω plus élevé et η inférieur, égal à **26.36 eV** et **1.318 eV**, respectivement (tableau 11).

Tableau 11: Énergie orbitale de frontière (HOMO et LUMO) et descripteurs de réactivité globale pour les composés protonés et glycérolés de l'acide 3-aminobenzoïque dans eV.

Reagents	HOMO	LUMO	μ	η	S (eV ⁻¹)	ω
R1-3	-9.622	-7.002	-8.312	1.310	0.381	26.365
R1-5	-9.536	-6.799	-8.168	1.368	0.365	24.376
R1-6	-9.781	-7.083	-8.432	1.349	0.370	26.349
R1-7	-9.259	-6.459	-7.859	1.400	0.357	22.059
R1-4	-9.740	-7.103	-8.421	1.318	0.379	26.901
R1-1	-9.656	-6.895	-8.275	1.380	0.362	24.808
R1-8	-9.862	-7.153	-8.507	1.354	0.369	26.720
R1-2	-9.387	-6.556	-7.972	1.415	0.353	22.454
R2	-7.537	-0.575	-4.056	3.480	0.143	2.363

* μ : potentiel chimique électronique; η : dureté globale; S: douceur globale; ω : électrophilie globale

Tableau 12: Les différences d'énergie entre les deux interactions possibles ΔE_1 et ΔE_2 pour l'isomère P2

Gap energetic	P2-3	P2-5	P2-6	P2-7	P2-4	P2-1	P2-8	P2-2
ΔE_1	9.047	8.961	9.206	8.684	9.164	9.080	9.287	8.811
ΔE_2	0.535	0.737	0.453	1.077	0.433	0.641	0.383	0.980

* $\Delta E_1 = \text{LUMO}_{R2} - \text{HOMO}_{R1}$ et $\Delta E_2 = \text{LUMO}_{R1} - \text{HOMO}_{R2}$

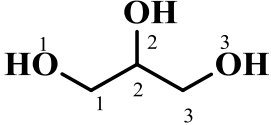
Il a été noté que l'écart énergétique de l'isomère P2 (**0,535 eV**, tableau 12) est inférieur à celui de l'isomère P1 (**3,588 eV**, tableau 8) avec une diminution des valeurs du potentiel chimique de **-3,528 à -7,972 eV**, en passant de P2 à P1. Par conséquent, le transfert de charge est plus facile pour l'isomère P2. De plus, l'indice d'électrophilie ω de l'acide 3-aminobenzoïque protoné (26,36 eV) est meilleur que dans les cas d'acroléine (4,763 eV), ce qui en fait un meilleur électrophile. Selon la valeur élevée de dureté η du glycérol (3.480 eV) par rapport à l'acide 3-aminobenzoïque (2.195 eV) qui fait de lui un meilleur nucléophile. Concernant la réactivité locale, les charges calculées q et l'indice de Fukui f_k^+ et f_k^- sont rapportés dans les tableaux 13 et 14 pour l'acide 3-aminobenzoïque protoné (R1) et le glycérol (R2), respectivement.

Concernant la réactivité locale de l'isomère P2, l'indice de Fukui montre que les valeurs de f_k^- (0.024) indiquent que C_1 du réactif R2 devrait être le site le plus réactif pour l'attaque nucléophile, les indices de réactivité locale (indice de Fukui) ne sont pas en bon accord avec le produit obtenu expérimentalement. Cependant, les charges calculées rapportées dans les tableaux 13 et 14 montrent que, pour la série du réactif R1, nous avons la charge naturelle positive la plus élevée, à savoir $q \sim 0,852e$ portant le carbone C_1 le faisant comme centre électrophile dans R1. Pour le glycérol, la charge naturelle négative la plus basse appartient à l'oxygène O_2 en tant que centre nucléophile avec une charge naturelle partielle autour de ($q(O_2) = -0,789e$, tableau 14). Ce qui est en accord avec le produit expérimental donc la réaction est sous contrôle de charge.

Table 13: Selected natural population charge q and local reactivity descriptor f_k^+ for the series of the protonated 3-aminobenzoic acid.

ways	1		2		3		4		5		6		7		8	
Index	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+	$q_{(NPA)}$	f_k^+
N	-0.821	-0.031	-0.826	-0.028	-0.815	-0.032	-0.825	-0.032	-0.819	-0.219	-0.824	-0.031	-0.814	-0.034	-0.822	-0.035
C_1	0.852	-0.232	0.839	-0.223	0.848	-0.224	0.806	-0.201	0.862	-0.240	0.846	-0.228	0.849	-0.224	0.822	-0.214
O_1	-0.631	-0.082	-0.637	-0.078	-0.632	-0.08	-0.652	-0.073	-0.634	-0.082	-0.634	-0.081	-0.632	-0.080	-0.642	-0.076
O_2	-0.631	-0.083	-0.637	-0.079	-0.631	-0.080	-0.653	-0.067	-0.631	-0.710	-0.631	-0.081	-0.629	1.338	-0.642	-0.075

Tableau 14: Charge de la population naturelle sélectionnée q et descripteur de la réactivité locale f_k^- pour le glycérol.

Structure	Number of atoms	q (NPA)	f_k^-
	C1	-0.118	0.024
	C2	0.021	-0.023
	C3	-0.127	0.001
	O ₁	-0.778	-0.209
	O ₂	-0.789	-0.152
	O ₃	-0.769	-0.252

Revenant à l'isomère P3 cyclique, celui-ci est supposé formé à partir de l'isomère P2 selon le modèle du schéma 69 repris au schéma 73.

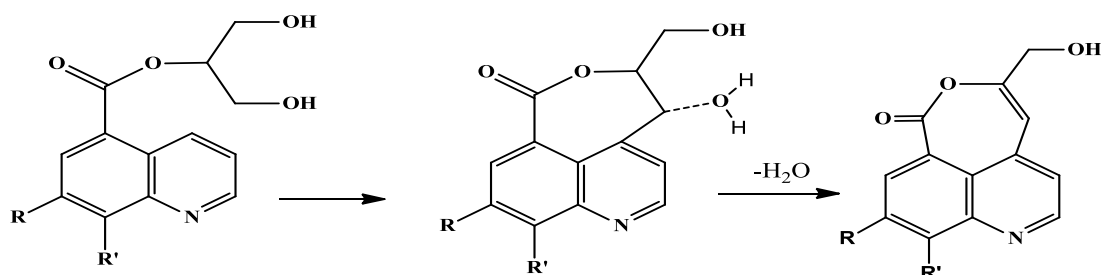


Schéma 73: Voie supposée de la formation de l'isomère cyclique P3.

On peut remarquer que l'isomère P3 est calculé à très haute énergie par rapport aux deux isomères P2 et P1 (tableau 2) quels que soient les substituants R et R', ce qui le rend peu stable. De plus, l'isomère P3 présente une énergie d'activation élevée ($E_a = 865,613$ kcal / mol) Fig.37, donc la conversion de P2 en l'isomère cyclique P3 est très peu probable dans ces conditions, expliquant sa synthèse infructueuse.

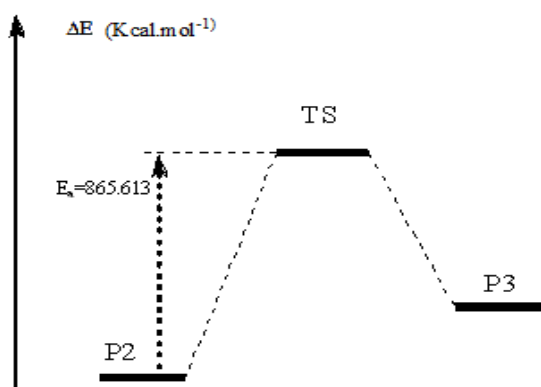


Figure 37 : Profil énergétique de la formation de l'isomère cyclique P3.

Chapitre V

Partie expérimentale

V. Partie expérimentale

V.1. Général

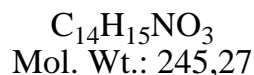
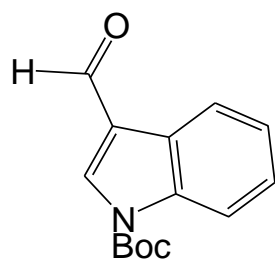
Les produits de départ ont été obtenus auprès de fournisseurs commerciaux et utilisés sans autre purification. Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer Spectrum 65 FT-IR (en cm^{-1}). Les spectres de RMN, effectués sur un AVR 400 Hi HD de Bruker (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 101 MHz), ou sur un Bruker AVANCE III HD 500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz) sont indiqués en ppm en utilisant le solvant résiduel pic comme standard interne; les abréviations suivantes sont utilisées: singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), doublet de doublets (dd), doublet de doublet de doublets (ddd), multiplet (m), signal large (br s). Les spectres de masse à haute résolution ont été déterminés sur un appareil à haute résolution Micro Q-ToF ou Thermo Scientific Q Exactive Q-Orbitrap de Waters (UCA START, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France). Les purifications chromatographiques ont été effectuées par Chromatographie sur colonne en utilisant du gel de silice de 40-63 μm . Les réactions ont été contrôlées par CCM en utilisant des plaques de gel de silice fluorescentes (60 F254 de Merck). Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Stuart SMP3 et ne sont pas corrigés.

V. 2. Première partie : Synthèse des analogues pyrazol(on)e glucosylés de la staurosporine aglycone K252c et évaluation biologique

V. 2. 1. Partie chimique

V. 2. 1. 1. *1-(tert-butoxycarbonyl)-1H-indole-3-carboxylic acid (3)*.

1^{ère} étape : *1-(tert-butoxycarbonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde* .

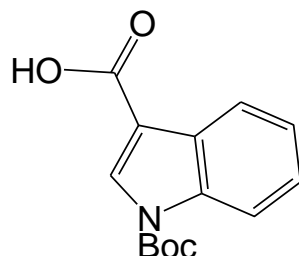


A une solution de 1H-indole-3-carbaldéhyde (2,2 g, 15,3 mmol) dans 50 ml d'acétonitrile anhydre à température ambiante, on a ajouté du DMAP (0,34 g, 2,7 mmol) et du Boc20 (4,5 g, 20,6 mmol). Le mélange a été agité à température ambiante pendant 2 heures, puis le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le résidu brut a été purifié par Chromatographie éclair (EtOAc / Cyclohexane, 1: 1) pour donner 89 (3,7 g, 15,1 mmol) sous la forme d'un solide blanc. Les données spectrales étaient conformes à la littérature (Giraud *et al.*2012).

Rdt : 98%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 1.66 (s, 9H), 7.39 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 10.08 (s, 1H, NH).

2^{ème} étape :



$C_{14}H_{15}NO_4$
Mol. Wt.: 261,27

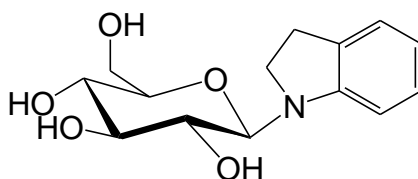
De l'indole 3' (3.7 g, 15.1 mmol) a été dissous dans un mélange de t-butanol (70 ml) et de 2-méthylbut-2-ène (30 ml). Une solution de NaClO₂ (13.6 g, 151 mmol) et de KH₂PO₄ (15.4 g, 113 mmol) dans de l'eau (20 ml) a ensuite été ajoutée et le mélange a été vigoureusement agité à température ambiante. Après 2 h, la couche organique a été séparée, la couche aqueuse a été extraite avec CH₂Cl₂ / MeOH (95: 5), le mélange les extraits organiques ont été séchés sur MgSO₄ et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Précipitation du résidu (CH₂Cl₂-Pentane) On obtient le composé **3** (3.9 g, 149 mmol) sous la forme d'une poudre blanche. Les données spectrales sont conformes à la littérature (Magoulas *et al.* **2003**)

Rdt : 98%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.71 (s, 9H), 7.34-7.43 (m, 2H), 8.17-8.24 (m, 2H), 8.40 (s, 1H).

V. 2. 1. 2. 1-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (5)

1^{ère} étape :

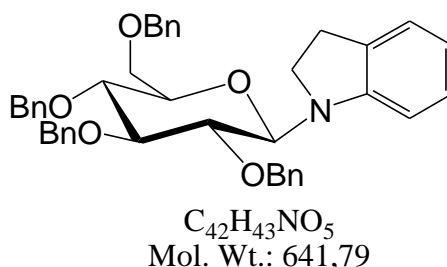


$C_{14}H_{19}NO_5$
Mol. Wt.: 281,31

A une solution d'indoline (9.4mL, 84mmol, 2.15eq) dans de l'éthanol (200mL) et H₂O (10mL) est ajouté D-glucose (7.05g, 39.1mmol, 1eq), le mélange est ensuite chauffé a reflux pendant 24h, le solvant est ensuite évaporé pour obtenir un résidu huileux (16.85g).

R_f : 0.33 (AcOEt/MeOH : 9/1)

2^{ème} étape : *1-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indoline(5')*



A une solution de l'intermédiaire de la 1^{ère} étape (5g, 11.6mmol, 1eq) dans THF anhydre (120mL) à 0°C est ajouté NaH (60% dispersion dans l'huile minérale, 5.52g, 138mmol, 12eq) puis BnBr(12.6mL, 136mmol, 12eq), la solution est laissée revenir à TA puis chauffée a reflux pendant 17h, le solvant est ensuite évaporé est le résidu qui se forme est dissout dans AcOEt (250mL), lavé à l'eau puis séché par MgSO₄. TLC R_f = 0.26 (cyclohexane/AcOEt 9:1). La solution est directement utilisée dans l'étape 3.

Pour caractériser l'indoline intermédiaire **5'**, une partie du brut de l'étape 2 a également été purifiée par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt) pour donner 1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-2,3-dihydro-1H-indole sous forme de solide beige.

T_{fus} : 119°C.

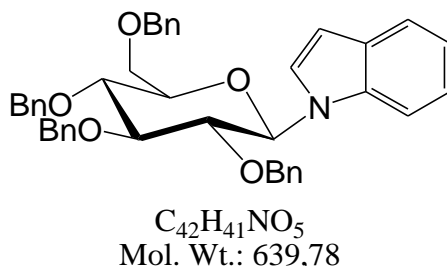
IR (ATR, ν cm⁻¹): 1606, 1491, 1454.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 2.83–3.01 (2H, m), 3.44–3.65 (5H, m), 3.66–3.72 (1H, m), 3.74 (1H, t, J = 9 Hz), 3.82 (1H, t, J = 9 Hz), 4.40 (1H, d, J = 12 Hz), 4.47 (1H, d, J = 12 Hz), 4.56 (1H, d, J = 11 Hz), 4.73–4.89 (5H, m), 5.07 (1H, d, J = 9 Hz), 6.66 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.77 (1H, d, J = 8 Hz), 7.02 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.07 (1H, d, J = 7 Hz), 7.17–7.34 (20H, m);

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 27.7, 46.0, 68.6, 72.1, 73.1, 74.0, 74.6 (CH₂), 75.4, 78.0, 78.5, 84.4, 85.3 (CH), 108.1, 118.3, 124.5, 127.0, 127.339, 127.344, 127.41, 127.47, 127.49, 127.54, 127.6, 127.7, 128.08, 128.14, 128.20, 128.22 (CH_{arom}), 129.8, 138.2 (2C), 138.61, 138.64, 150.4 (C_{arom}).

HRMS (ESI+) calculé pour $C_{42}H_{44}NO_5$ ($M+H$)⁺ 642.3214, trouvé 642.3217.

3^{ème} étape:



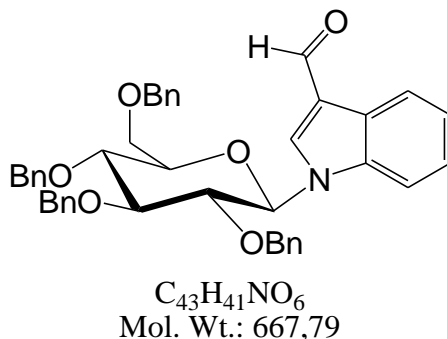
A la solution de l'AcOEt (250mL) de la deuxième étape est ajouté peu à peu DDQ (6g, 26.2mmol, 1.05eq) et le mélange est agité à TA pendant 45min, le mélange est lavé par une solution de Na_2SO_3 à 10%, la phase organique est séchée par $MgSO_4$ puis évaporée et le résidu qui se forme est purifié par colonne (Cyclo/AcOEt : 9/1) pour obtenir le produit **5** sous forme d'une huile marron (4.33g, 6.76mmol). Le spectre RMN 1H du produit correspond à celui de 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1*H*-indole rapporté dans la littérature (Messaoudi S. **2004**).

Rdt : 58% sur les trois étapes

R_f : 0.21 (Cyclo/AcOEt 9:1)

RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm : 3.65 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz); 3.75 (m, 2H); 3.81 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz); 3.95 (m, 2H); 4.15 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz); 4.25 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz); 4.50 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz); 4.55 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz); 4.65 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz); 4.85 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz); 4.90 (br s, 2H); 5.82 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H1'); 6.65 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz); 6.74 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz); 7.09–7.39 (m, 20H); 7.65 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 7.70 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz); 7.74 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz).

V. 2. 1. 3. 1-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1*H*-indole-3-carbaldehyde (**6**)



$POCl_3$ (0.43mL, 4.57mmol, 1.1eq) est ajouté lentement a du DMF anhydre (1.5mL) à 0°C sous atmosphère Argon. La solution est agitée à 0°C pendant 40min et une solution de **5** (2.66g,

4.16mmol, 1eq) dans DMF anhydre (1mL) à 0°C est ajoutée, et le mélange est agité encore pendant 1h à 35°C. De la glace et une solution de NaOH (1.85g, 46.12mmol, 11eq) dans H₂O (5mL) sont ajoutés et la température est portée à 100°C pendant 30min. Après refroidissement et extraction avec AcOEt, la phase organique est lavée à l'eau, avec du brine puis séchée avec MgSO₄ puis évaporée, le résidu est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 8/2) pour obtenir le produit **6** sous forme de gomme beige (2.47g, 3.7mmol).

Rdt : 89%

R_f : 0.47 (cyclohexane/EtOAc 7:3).

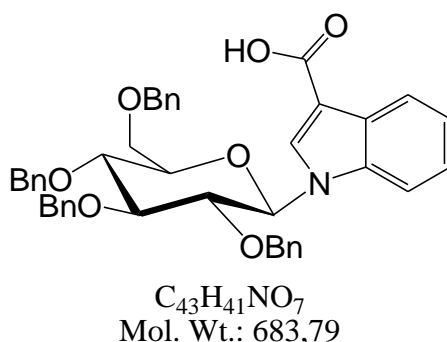
IR (ATR, ν cm⁻¹): 1662, 1535, 1455.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 3.67–3.74 (2H, m), 3.77 (1H, d, *J* = 11 Hz), 3.80 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.94–3.99 (1H, m), 3.95 (1H, t, *J* = 9 Hz), 4.14 (1H, t, *J* = 9 Hz), 4.36 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.47 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.52 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.63 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.81 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.86 (2H, s), 5.93 (1H, d, *J* = 9 Hz), 6.67 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.04 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.12 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.21–7.36 (17H, m), 7.78–7.84 (1H, m), 8.13–8.20 (1H, m), 8.56 (1H, s), 9.97 (1H, s).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 68.5, 72.3, 73.7, 74.2, 74.6 (CH₂), 76.5, 77.5, 80.0, 84.0, 84.5 (CH), 112.1, 121.2, 123.1, 124.0, 127.47, 127.54, 127.56, 127.59, 127.62, 127.65, 127.67, 127.8, 127.9, 128.23, 128.26, 128.28, 138.7 (CH_{arom}), 118.5, 124.6, 136.9, 137.1, 138.0, 138.1, 138.4 (C_{arom}), 185.3 (C=O).

HRMS (ESI+) calculé pour C₄₃H₄₂NO₆ (M+H)⁺ 668.3007, trouvé 668.3010.

V. 2. 1. 4. *1-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole-3-carboxylic acid (7)*



Une solution de NaClO₂ (80% non stabilisé, 4.16g, 36.83mmol, 10eq) et de KH₂PO₄ (3.76g, 27.62mmol, 7.5eq) dans H₂O (15mL) est ajoutée à une solution de **6** (2.46g, 3.68mmol, 1eq) dans le tert-butanol (20mL) et le 2-méthylbut-2-ène (8mL) et le mélange est agité vigoureusement à TA pendant 24h, les deux phases ensuite séparées et la phase aqueuse est extraite par AcOEt, les

phases organiques combinées, séchées par MgSO₄ puis évaporées, le produit est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 8/2) pour obtenir le produit **7** (1.58g, 2.31mmol) sous forme de solide beige.

Rdt : 63%

R_f : 0.48 (Cyclo/AcOEt : 6/4).

T_{fus} : 70 °C.

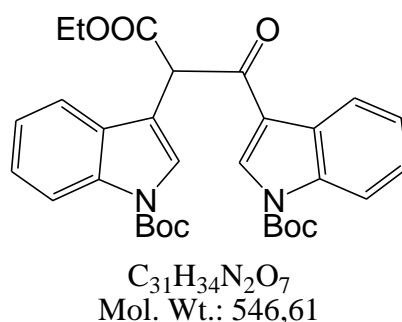
IR (ATR, ν cm⁻¹): 1662, 1537, 1455.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 3.65 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 3.68–3.74 (2H, m), 3.80 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.89–3.94 (1H, m), 3.91 (1H, t, *J* = 9 Hz), 4.16 (1H, d, *J* = 9 Hz), 4.30 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.47 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.53 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.62 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.81 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.85 (2H, s), 5.88 (1H, d, *J* = 9 Hz), 6.68 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.06 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.10–7.15 (1H, m), 7.21–7.36 (17H, m), 7.76–7.81 (1H, m), 8.09–8.14 (1H, m), 8.30 (1H, s), 12.24 (1H, br s).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 68.6, 72.3, 73.6, 74.2, 74.5 (CH₂), 76.6, 77.4, 80.0, 84.1, 84.5 (CH), 112.0, 121.1, 122.0, 122.8, 127.46, 127.51, 127.56, 127.59, 127.64, 127.7, 127.8, 127.9, 128.23, 128.24, 128.3, 133.0 (CH_{arom}), 108.4, 126.5, 136.3, 137.2, 138.09, 138.11, 138.5 (C_{arom}), 165.5 (C=O); entre 127,4 et 128,3 ppm, un pic de CH_{arom} benzylique n'a pas pu être observé.

HRMS (ESI⁻) calculé pour C₄₃H₄₀NO₇ (M-H)⁻ 682.2799, trouvé 682.2808.

V. 2. 1. 5. *Di-*t*-butyl 3,3'-(3-ethoxy-1,3-dioxopropane-1,2-diyl)bis(1H-indole-1-carboxylate) (2).*



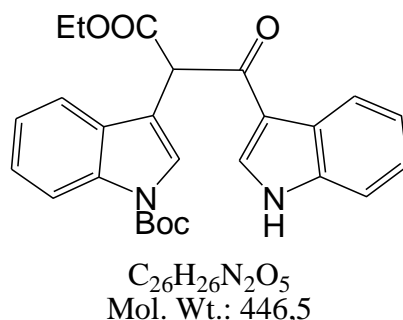
Du chlorure d'oxalyle (0.96 ml, 11.2 mmol) a été ajouté goutte à goutte à une solution d'indole **3** (1.5 g, 5.7 mmol), de pyridine (2.8 ml, 34.8 mmol) et de DMF (0.02 ml) dans CH₂Cl₂ (18 ml) sous argon. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 15 h et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été purifié par Chromatographie éclair (AcOEt / cyclohexane : 2/8) pour donner un mélange d'acides carboxyliques activés **X** sous la forme d'un solide blanc (1.45 g).

Du BuLi (1.6 M dans de l'hexane, 5.0 ml, 8 mmol) a été ajouté à une solution de diisopropylamine (1.3 ml, 9.3 mmol) dans du THF (14 ml) sous argon à 0 ° C. Après 30 minutes d'agitation, la solution a été refroidie à -78 ° C et une solution d'indole **4** (1.11 g, 3.67 mmol) dans du THF (4 ml) a été lentement ajoutée. Au bout d'une heure, une suspension de l'acide indole carboxylique activé dans du THF (15 ml) et du CH₂Cl₂ (5 ml) a été lentement ajoutée et le mélange a été laissé atteindre la température ambiante. Après achèvement de la réaction, les solvants ont été évaporés sous pression réduite et le produit brut a été dissous dans AcOEt, lavé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ à 8%, séché sur MgSO₄ et concentré sous pression réduite. Le produit a été purifié par Chromatographie éclair (EtOAc / Cyclohexane : 9/1) pour donner **2** (1.49 g, 2.72 mmol) sous la forme d'une mousse jaunâtre. Les données spectrales sont conformes à la littérature (Esvan YJ. 2016).

Rdt : 74%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆ + 10% D₂O) δ ppm : 1.16 (3H, t, *J* = 7 Hz), 1.53 (9H, s), 1.58 (9H, s), 4.15 (2H, q, *J* = 7 Hz), 6.33* (s, 1H, CH), 7.20 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.25–7.35 (3H, m), 7.78 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7.79 (1H, s), 7.97–8.01 (2H, m), 8.17 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 8.84 (1H, s). * disparaissent après un échange de deutérium complet.

V. 2. 1. 6. *tert*-Butyl 3-(1-ethoxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-1,3-dioxopropan-2-yl)-1*H*-indole-1-carboxylate (8**)**



A une solution du produit **2** (330 mg, 0.6 mmol) et de l'acide camphorique (120 mg, 0.6 mmol) dans EtOH (6 mL) est ajoutée de l'hydrazine monohydrate (30 µL, 0.6 mmol). Après 2h d'agitation à température ambiante, l'hydrazine monohydrate (0.3mL) supplémentaire est ajoutée et le mélange est agité a reflux pendant 1h, après évaporation du solvant, le résidu est dissout dans AcOEt, la solution est lavée par solution aqueuse de NaHCO₃, avec du brine puis séchée avec MgSO₄ puis évaporée, , le résidu est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 8/2) pour obtenir le produit **8** (188 mg, 0.42 mmol) sous forme de mousse jaunâtre.

Rdt : 70%.

R_f : 0.3 (cyclohexane/AcOEt 7:3).

T_{fus} : 179 °C.

IR (ATR, ν cm^{-1}): 3193, 1740, 1724, 1619, 1147.

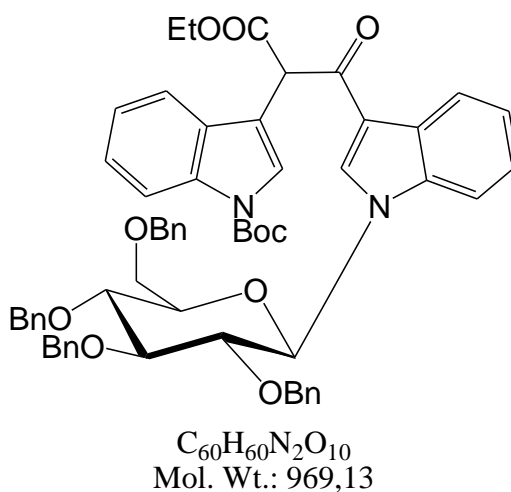
RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm : 1.17 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.62 (9H, s), 4.09–4.23 (2H, m), 6.11 (1H, s), 7.16–7.25 (3H, m), 7.30 (1H, ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, $J_3 = 1.4$ Hz), 7.44–7.50 (1H, m), 7.81 (1H, s), 7.82 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 8.14–8.17 (1H, m), 8.63 (1H, s), 12.11 (1H, br s).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm : 14.0, 27.7 (CH_3), 61.0 (CH_2), 52.0 (CH), 84.0 (C), 112.3, 114.6, 120.8, 121.3, 122.2, 122.5, 123.3, 124.4, 125.3, 135.5 (CH_{arom}), 114.9, 115.0, 125.6, 129.3, 134.6, 136.7 (C_{arom}), 148.9, 168.8, 187.6 (C=O).

HRMS (ESI^+) calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$)⁺ 447.1915, trouvé 447.1924.

V. 2. 1. 7. 3-(4-(1H-Indol-3-yl)-1H-pyrazol-5-yl)-1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (9) :

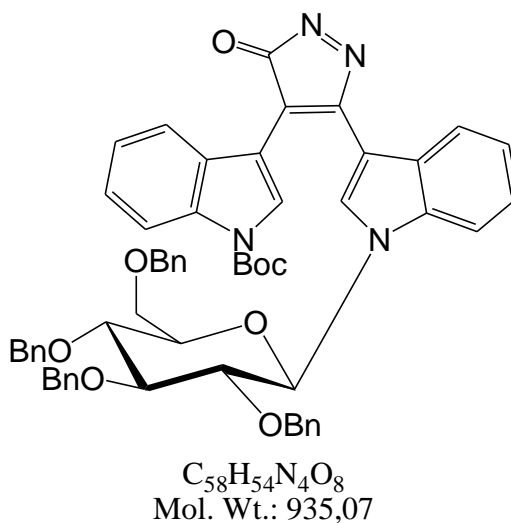
1^{ère} étape: *tert-butyl 3-(1-ethoxy-1,3-dioxo-3-(1-((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5 tris(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-1H-indole-1-carboxylate*



L'azodicarboxylate de diisopropyl (738 μL , 3.75 mmol) est ajouté goutte à goutte a une solution refroidit de **8** (405 mg, 0.91 mmol), triphenylphosphine (1.0 g, 3.81 mmol) et de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -*D*-glucopyranose (2.02 g, 3.74 mmol) dans THF (25 mL). Le mélange est laissé revenir à température ambiante puis agité pendant 18h. Le solvant est évaporé et le résidu qui se forme est purifié par chromatographie sur gel de silice (allant du Cyclohexane a AcOEt/Cyclohexane 1:9) pour donner les deux diastéréoisomères des produits β -glucosylés (530

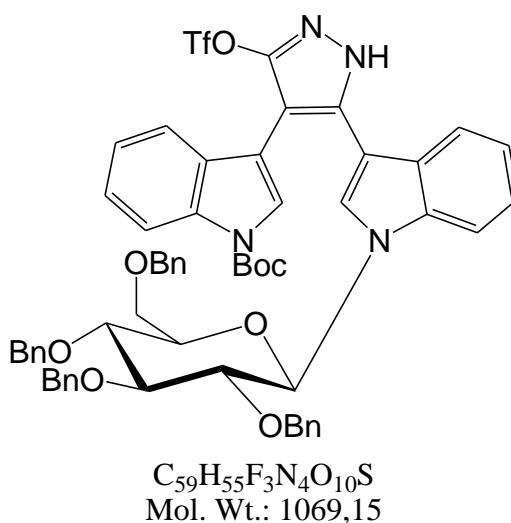
mg, TLC $R_f = 0.55$ (AcOEt/Cyclohexane 2:8) sous forme d'une huile incolore. Le produit brut a été utilisé dans l'étape suivante sans autres purifications.

2^{ème} étape :



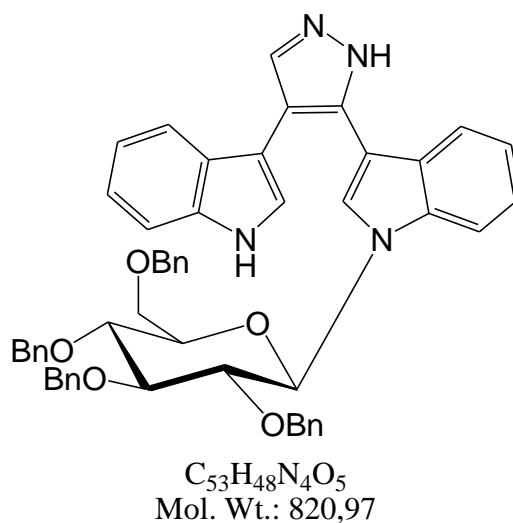
Dans un tube scellé, une solution de l'intermédiaire β -glucosylé de la 1^{ère} étape (574 mg) et de l'hydrazine monohydrate (1.34 mL, 27.6 mmol) dans un mélange 1:1 v/v EtOH/AcOH (6 mL) est chauffé 110 °C (bain d'huile) pendant 24 h. de l'eau est ajoutée et le mélange est extrait avec AcOEt, les phases organiques combinées, lavées à l'eau, avec du brine puis séchées par $MgSO_4$ après évaporation, l'huile marron obtenu est dissoute dans un minimum d'acétone avant la précipitation du produit par addition de cyclohexane. Après évaporation sous pression réduite, l'intermédiaire pyrazolone (523 mg) a été obtenu sous la forme d'une gomme beige utilisée sans autres purifications.

3^{ème} étape:



A une solution de la pyrazolone intermédiaire de la 2^{ème} étape (517 mg) et PhNTf₂ (355 mg, 0.99 mmol) dans CH₂Cl₂ (8 mL), à 0 °C sous argon, est ajouté Et₃N (0.9 mL, 6.5 mmol) et le mélange est laissé revenir à température ambiante. Après 1h d'agitation, le solvant est évaporé sous pression réduite. AcOEt est ajouté et le mélange est lavé à l'eau, avec du brine puis séché avec MgSO₄, après évaporation le résidu est purifié sur colonne (AcOEt/Cyclo: 5/95) pour obtenir l'intermédiaire triflate (380 mg, TLC R_f = 0.39 AcOEt/cyclohexane 2:8, HRMS (ESI⁺) calculé pour C₅₄H₄₈F₃N₄O₈S (M+H)⁺ 969.3139, trouvé 969.3139) sous forme d'une huile jaune pâle.

4^{ème} étape :



Dans un tube scellé, un mélange du pyrazolyl triflate de la 3^{ème} étape (380 mg), Pd(OAc)₂ (22 mg, 0.098 mmol), dppf (54 mg, 0.098 mmol) et HCO₂NH₄ (249 mg, 3.95 mmol) dans DMF (14 mL) est chauffé à 90 °C pendant 2 h. Après refroidissement, de l'AcOEt est ajouté et le mélange est filtré sur de la Celite®. Le filtrat est lavé à l'eau, séché sur MgSO₄ et évaporé sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 7:3) donnant le composé **9** (122 mg, 0.148 mol) sous forme d'une huile incolore.

Rdt : 15% (à partir du composé **8**)

R_f : 0.3 (AcOEt/cyclohexane 4:6).

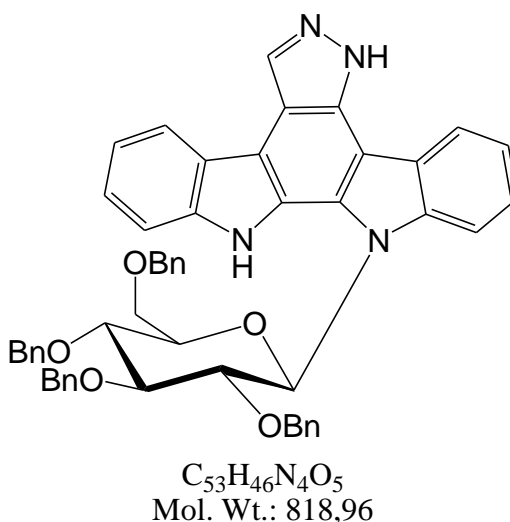
IR (ATR, ν cm⁻¹): 3418, 1455, 1361, 1068.

RMN ¹H (500 MHz, CD₃CN) δ ppm : 3.47 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 3.62–3.80 (6H, m), 4.10 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.45 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.50 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.61 (1H, d, *J* = 10.9 Hz), 4.79–4.85 (3H, m), 5.48 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.62–6.65 (2H, m), 6.88 (1H, ddd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 7.1 Hz, *J*₃ = 1.0 Hz), 7.00–7.13 (6H, m), 7.19 (1H, ddd, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 7.1 Hz, *J*₃ = 1.1 Hz), 7.22–7.34 (15H, m), 7.39 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.43 (1H, s), 7.57 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.80 (1H, br s), 9.19 (1H, br s), le NH de la pyrazole n'a pas été observé.

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3CN) δ ppm : 69.8, 73.8, 75.0, 75.6, 76.0 (CH_2), 78.2, 78.6, 82.0, 85.6, 85.9 (CH), 111.8, 112.4, 120.31, 120.34, 121.5, 122.3, 122.6, 123.4, 124.2, 125.6, 128.44, 128.46, 128.47, 128.6, 128.69, 128.74, 128.90, 128.92, 128.96, 129.2, 129.3, 134.6^a (CH_{arom}), 109.0, 110.2, 113.3^b, 128.0, 128.1, 137.17, 137.22, 138.5, 139.38, 139.39, 139.8, 140.9^b (C_{arom}), entre 128.4 et 129.3 ppm, un pic de CH_{arom} benzylique n'a pas pu être observé; ^adéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HSQC ^1H - ^{13}C , ^bdéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HMBC ^1H - ^{13}C .

HRMS (ESI+) calculé pour $\text{C}_{53}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 821.3675, trouvé 821.3701.

V. 2. 1. 8. 13-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (10)



Une solution du composé **9** (122 mg, 0.149 mmol) dans du CH_3CN (130 mL) fraîchement distillé dans un réacteur photochimique en Pyrex est dégazée avec de l'argon pendant 30 minutes et de l'iode (84 mg, 0.33 mmol) est ajouté. La solution est dégazée encore pendant 15 minutes et est irradiée pendant 45 minutes avec une lampe au mercure moyenne pression de 400 W. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissout dans l'AcOEt et la solution est lavée avec une solution aqueuse à 1% de métabisulfite de sodium, de l'eau et séchée sur MgSO_4 . Le résidu a été purifié par Chromatographie sur colonne (CH_2Cl_2 / AcOEt 9: 1) pour donner le composé **10** (73 mg, 0,089 mmol) sous la forme d'un solide jaune pâle.

Rdt : 60%.

R_f : 0.4 (EtOAc/Cyclohexane 4:6).

T_{fus} : 115°C.

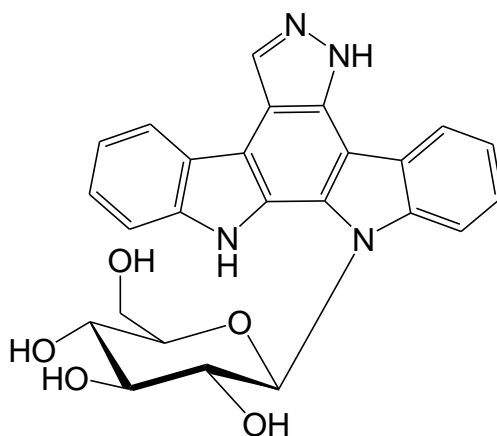
IR (ATR, ν cm^{-1}): 3350, 1455, 1329, 1067.

RMN ¹H (500 MHz, CD₃CN) δ ppm : 2.78 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 3.65 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 3.84 (1H, dd, *J*₁ = 10.4 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz), 3.97–4.02 (3H, m), 4.10–4.14 (1H, m), 4.32–4.39 (1H, m), 4.71 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 4.74 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 4.76 (1H, d, *J* = 10.8 Hz), 4.81 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.83 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.95 (1H, d, *J* = 10.8 Hz), 6.02–6.05 (2H, m), 6.23–6.28 (1H, m), 6.76–6.81 (2H, m), 6.91–6.95 (1H, m), 7.19–7.29 (10H, m), 7.31–7.39 (7H, m), 7.48–7.55 (3H, m), 7.82 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.34–8.37 (1H, m), 8.49–8.52 (1H, m), 8.70 (1H, s), 10.64 (1H, br s), le NH de la pyrazole n'a pas été observé.

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃CN) δ ppm : 67.8, 74.3, 74.9, 75.8, 76.0 (CH₂) 77.2, 77.9, 82.0, 85.2, 85.8 (CH) 112.0, 113.0, 120.8, 121.6, 121.7, 122.1, 125.5 (2C), 128.3, 128.4, 128.56, 128.57, 128.7, 128.9, 129.0, 129.14, 129.16, 129.3, 129.5, 129.6, 131.5 (CH_{arom}), 108.0, 113.7, 113.8, 123.5, 124.2, 124.8, 127.3, 133.9, 137.6, 138.4, 139.3, 139.6, 140.1, 140.6 (C_{arom}).

HRMS (ESI+) calculé pour C₅₃H₄₇N₄O₅ (M+H)⁺ 819.3541, trouvé 819.3541.

V. 2. 1. 9. 13-(1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (11)



C₂₅H₂₂N₄O₅
Mol. Wt.: 458,47

A une solution du composé **10** (73 mg, 0.089 mmol) dans CH₂Cl₂ (30 mL) à –78 °C est ajouté BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 1.07 mL, 1.07 mmol). Après 15 min d'agitation à –78 °C, de l'eau est ajoutée et le mélange est laissé revenir à température ambiante. Après extraction avec AcOEt, les phases organiques sont combinées, séchées par MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite, Le résidu est purifié par Chromatographie sur colonne (de AcOEt à AcOEt/MeOH 9:1). Pour donner le composé **11** (31 mg, 0,068 mmol) sous la forme d'un solide beige verdâtre.

Rdt : 76%.

R_f : 0.53 (AcOEt/MeOH 9:1).

Tfus : 246 °C.

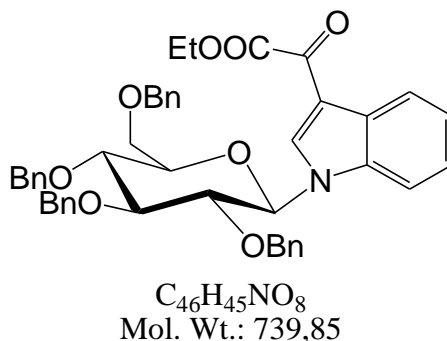
IR (ATR, ν cm^{-1}): 3700–3000, 1460, 1328.

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm : 3.55–3.61 (1H, m), 3.64–3.70 (1H, m), 3.80–3.85 (1H, m), 3.91–3.95 (1H, m), 4.02–4.13 (2H, m), 4.83 (1H, d, $J = 5.5$ Hz), 5.11 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 5.35 (1H, d, $J = 5.2$ Hz), 5.88 (1H, t, $J = 4.1$ Hz), 6.21 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.27 (1H, ddd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, $J_3 = 1.0$ Hz), 7.34 (1H, ddd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, $J_3 = 0.7$ Hz), 7.39 (1H, ddd, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz), 7.44 (1H, ddd, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz), 7.64 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.91 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 8.39 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.64 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 8.79 (1H, s), 11.28 (1H, s), 13.66 (1H, br s).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm : 58.4 (CH_2), 67.6, 73.0, 76.9, 78.5, 84.6 (CH), 111.52, 112.05, 119.2, 120.1, 120.60, 120.63, 123.7 (2C), 131.5^a (CH_{arom}), 106.6^b, 111.47, 111.99, 121.7, 123.0, 123.2, 125.7, 131.3^b, 138.7, 139.8 (C_{arom}), ^adéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HSQC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, ^bdéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$.

HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 459.1663, found 459.1671.

V. 2. 1. 10. Ethyl 2-(1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate (**12**)



Le chlorure d'oxalyle (0.84mL, 9.78mmol, 2eq) est ajouté à une solution du composé **5** (3.13g, 4.89mmol, 1eq) dans Et_2O (75mL) à 0°C et le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 8h, le solvant est ensuite évaporé et le résidu qui se forme est dissout dans EtOH (40mL) et Et_3N (0.7mL, 4.89mmol, 1eq) est ajouté et le mélange est agité à température ambiante toute la nuit, le solvant est évaporé et le produit est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 85/15) pour obtenir le composé **12** (3g, 4.06mmol) sous forme d'une huile marron clair.

Rdt : 83%.

R_f : 0.49 (cyclohexane/ EtOAc 8:2).

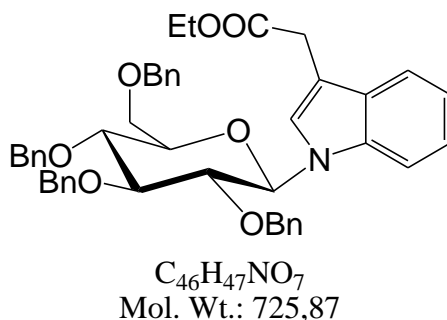
IR (ATR, ν cm^{-1}): 1726, 1649, 1455.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 1.32 (3H, t, *J* = 7 Hz), 3.69–3.76 (3H, m), 3.84 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.91–3.96 (1H, m), 3.92 (1H, t, *J* = 9 Hz), 4.18 (1H, t, *J* = 9 Hz), 4.34–4.40 (3H, m), 4.48 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.53 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.63 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.81 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.86 (2H, s), 5.95 (1H, d, *J* = 9 Hz), 6.67 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.03 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.11 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.21–7.40 (17H, m), 7.83–7.88 (1H, m), 8.20–8.26 (1H, m), 8.65 (1H, s).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 13.9 (CH₃), 61.8, 68.4, 72.2, 73.8, 74.2, 74.6 (CH₂), 76.7, 77.3, 79.7, 84.6 (2C) (CH), 112.63, 121.5, 123.7, 124.3, 127.46, 127.54, 127.59, 127.61, 127.68, 127.70, 127.86, 127.92, 128.2, 128.26, 128.28, 138.5 (CH_{arom}), 112.65, 126.0, 136.2, 137.0, 138.0, 138.1, 138.4 (C_{arom}), 163.1, 179.4 (C=O), entre 127.4 et 128.3 ppm, un pic de CH_{arom} benzylique n'a pas pu être observé.

HRMS (ESI+) calculé pour C₄₆H₄₆NO₈ (M+H)⁺ 740.3218, trouvé 740.3224.

V. 2. 1. 11. *Ethyl 2-(1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)acetate (13)*



A une solution du composé **12** (540mg, 0.73mmol, 1eq) dans CH₂Cl₂ (8mL) est ajouté Et₃SiH (0.69mL, 4.05mmol, 6eq) et TFA (2.13mL, 27.03mmol, 40eq) et le mélange est agité à température ambiante pendant 36h. Une solution saturée de NaHCO₃ est ajoutée au milieu et le mélange est extrait par AcOEt, la phase organique est séchée par MgSO₄ puis évaporée, le produit est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 85/15) pour obtenir le composé **13** (230mg, 0.32mmol) sous forme d'une huile marron claire.

Rdt : 43%.

R_f : 0.43 (cyclohexane/EtOAc 8/2).

IR (ATR, ν cm⁻¹): 1731, 1461, 1363, 1071.

RMN ¹H (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ ppm : 1.15 (3H, t, *J* = 7 Hz), 3.66 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 3.77–3.81 (1H, m), 3.80 (2H, s), 3.84–3.93 (4H, m), 4.01–4.08 (1H, m), 4.08 (2H, q, *J* = 7 Hz), 4.20 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.53 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.61 (1H, d, *J* = 12 Hz), 4.74 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.91 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.93 (1H, d, *J* = 11 Hz), 4.96 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 5.67 (1H, d, *J* = 9 Hz), 6.77 (2H,

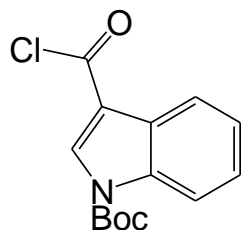
d, $J = 7$ Hz), 7.07 (2H, t, $J = 7$ Hz), 7.10–7.22 (3H, m), 7.23–7.40 (15H, m), 7.51 (1H, s), 7.65 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.69 (1H, d, $J = 8$ Hz).

RMN ^{13}C (101 MHz, Acetone- d_6) δ ppm : 14.5 (CH_3), 31.7, 60.9, 69.8, 73.8, 74.7, 75.5, 75.9 (CH_2), 78.3, 78.7, 81.9, 86.1, 86.2 (CH), 112.1, 120.0, 120.7, 122.8, 125.8, 128.18, 128.21, 128.3, 128.41, 128.44, 128.68, 128.69, 129.03, 129.06, 129.09 (CH_{arom}); 110.1, 129.5, 137.3, 138.6, 139.5, 139.6, 139.9 (C_{arom}), 171.9 (C=O), entre 128.1 et 129.1 ppm, deux pics de CH_{arom} benzylique n'ont pas pu être observés.

HRMS (ESI+) calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{NO}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 726.3425, trouvé 726.3440.

V. 2. 1. 12. *tert*-Butyl 3-(4-(1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrazol-5-yl)-1H-indole-1-carboxylate (16)

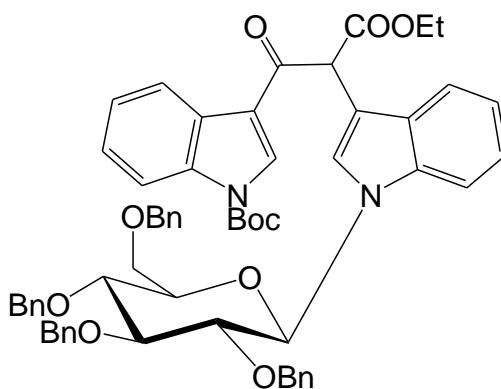
Préparation de l'acide carboxylique activé :



$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$
Mol. Wt.: 279,72

Du chlorure d'oxalyle (0.33mL, 3.8mmol, 2eq) est ajouté goutte à goutte a une solution du composé **3** (0.5g, 1.91mmol, 1eq), de pyridine (0.93mL, 11.6mmol, 6eq) et de DMF (7 μ L) dans CH_2Cl_2 (6mL) sous argon et le mélange est agité à température ambiante pendant 15h, le solvant est évaporé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne (Cyclo/AcOEt : 8/2) et l'acide carboxylique activé est obtenu sous forme de solide blanc (436mg).

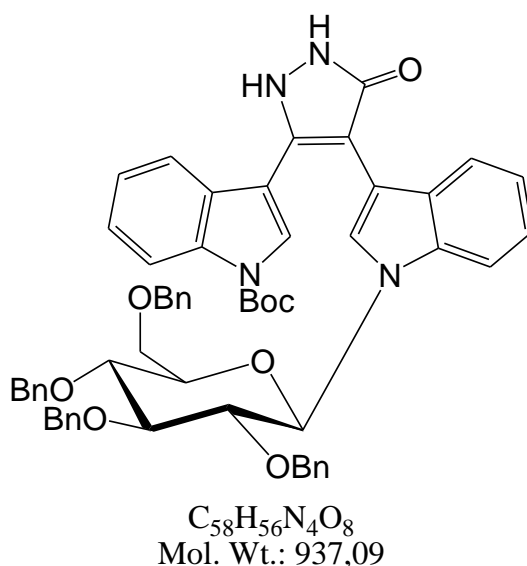
1^{ère} étape :



$\text{C}_{60}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{10}$
Mol. Wt.: 969,13

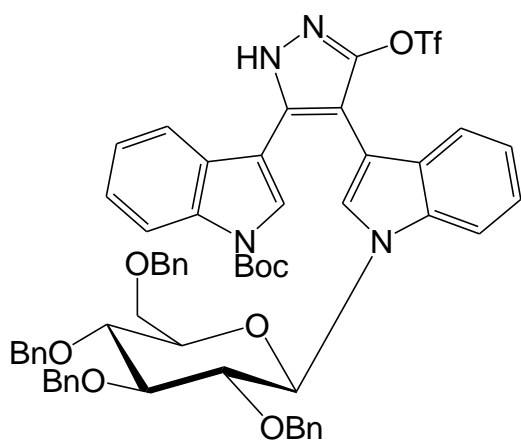
BuLi(2.5 M dans de l'hexanes, 0.62mL, 1.52mmol, 2.2eq) est ajouté à une solution de diisoprylamine (0.26mL, 1.73mmol, 2.5eq) dans THF anhydre(4mL) à 0°C, après 30min d'agitation le mélange est refroidit à -78°C et une solution du composé **13** (500mg, 0.69mmol, 1eq) dans THF (2mL) est ajouté, le mélange est agité à -78°C pendant 1h puis une solution de l'acide carboxylique activé (210mg, 0.71mmol, 1.05eq) dans THF(4mL) est ajouté peu à peu, le mélange est ensuite laissé revenir à température ambiante et est agité pendant 2h. Après évaporation du solvant, le résidu qui se forme est dissout dans AcOEt, lavé par NaHCO₃ (8%), séché par MgSO₄ puis évaporé, le produit est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 9/1) pour donner le cétoester intermédiaire **14** sous forme d'un mélange de diastéréoisomères (465 mg) sous forme d'un solide marron clair qui est utilisé directement pour l'étape suivante.

2^{ème} étape :

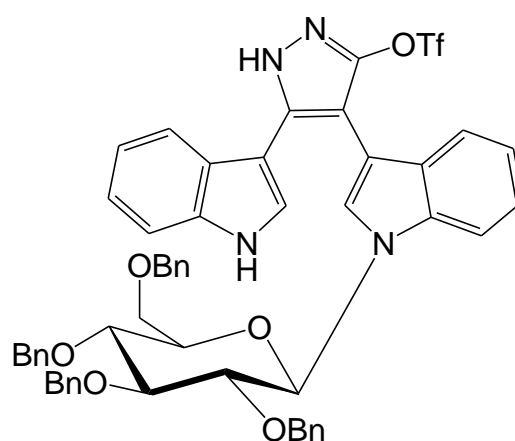


Dans un tube scellé, une solution du cétoester intermédiaire de la 1^{ère} étape (400 mg) et de l'hydrazine monohydrate (0,93 mL, 19 mmol) dans un mélange EtOH / AcOH 1: 1 v/v (4 mL) est chauffée à 110°C (bain d'huile) pendant 45 min. Après refroidissement, de l'eau est ajoutée et le mélange est extrait avec de l'AcOEt, les phases organiques assemblées sont lavées avec une solution aqueuse de HCl 1 M, avec du brine, et séchées sur du MgSO₄. Après évaporation, l'huile brune obtenu est dissoute dans un minimum d'acétone avant la précipitation par addition de cyclohexane. Après évaporation sous pression réduite, la pyrazolone intermédiaire (360 mg) a été obtenu sous la forme d'une mousse brune et a été utilisée directement pour l'étape suivante.

3^{ème} étape :



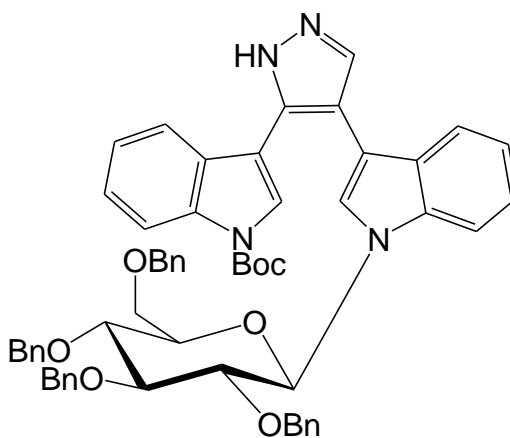
$C_{59}H_{55}F_3N_4O_{10}S$
Mol. Wt.: 1069,15



$C_{54}H_{47}F_3N_4O_8S$
Mol. Wt.: 969,03

A une solution de la pyrazolone intermédiaire de la 2^{ème} étape (360 mg) et $PhNTf_2$ (247 mg, 0,69 mmol) dans CH_2Cl_2 (5 mL), à 0°C sous argon, est ajouté EtN_3 (0,58 mL, 4,16 mmol). Le mélange est laissé revenir à température ambiante. Après 1 heure d'agitation, le solvant est évaporé sous pression réduite. De l'AcOEt est ajouté et le mélange est lavé avec de l'eau, du brine et séché sur $MgSO_4$. Après évaporation, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane / EtOAc 7: 3) pour donner le triflate de pyrazolyne **15a** comme produit principal (384 mg, CCM *Rf*: 0,83 dans du cyclohexane / AcOEt 6/4, huile brun clair, HRMS (ESI+ Calculé pour $C_{59}H_{56}F_3N_4O_{10}S$ (M+H)⁺ 1069.3664, trouvé 1069.3671) et son analogue **15b** déprotégé Boc (67 mg, CCM *Rf* 0,53 dans cyclohexane / EtOAc 6: 4, huile beige, HRMS (ESI+) calculé pour $C_{54}H_{48}F_3N_4O_8S$ (M+H)⁺ 969.3140, trouvé 969.3139), qui ont été utilisés sans autre purification pour l'étape suivante.

4^{ème} étape :



$C_{58}H_{56}N_4O_7$
Mol. Wt.: 921,09

Dans un tube scellé, un mélange de pyrazolyle de triflate **15a** (210 mg), Pd(OAc)₂ (4.8 mg, 0.022 mmol), dppf (11.95 mg, 0.022 mmol) et HCO₂NH₄ (71 mg, 1.12 mmol) dans du DMF (2.5 mL) est chauffé à 90 ° C pendant 2 h. Après refroidissement, du AcOEt est ajouté et le mélange est filtré de la Celite®. Le filtrat est lavé avec de l'eau, séché sur MgSO₄ puis évaporé sous pression réduite. , le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane / AcOEt 7:3) pour donner le composé **16** (116 mg, 0.126 mmol,) sous forme d'un solide beige.

Rdt : 39% (à partir du composé **13**).

R_f : 0.61 (cyclohexane/EtOAc 6:4).

T_{fus} : 88 °C.

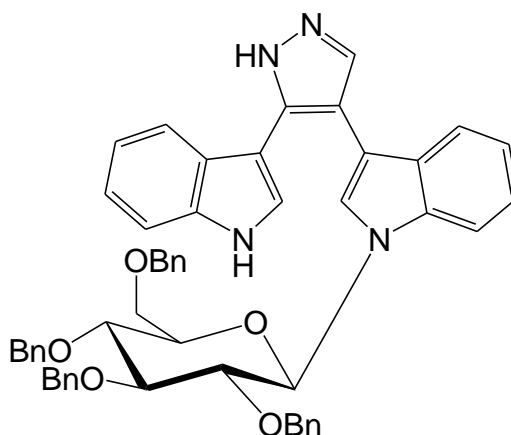
IR (ATR, ν cm⁻¹): 3500–3000, 1732, 1453, 1367, 1153, 1054.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) δ ppm : 1.38 (9H, s), 3.58 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 3.70–3.86 (5H, m), 3.96 (1H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.16 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.48 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.53 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.65 (1H, d, *J* = 10.9 Hz), 4.82–4.89 (3H, m), 5.54 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 6.64–6.67 (2H, m), 6.90–6.95 (2H, m), 7.01–7.06 (1H, m), 7.09 (1H, ddd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 7.1 Hz, *J*₃ = 0.9 Hz), 7.14 (1H, ddd, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, *J*₃ = 1.0 Hz), 7.20–7.34 (17H, m), 7.39 (1H, s), 7.39–7.42 (1H, m), 7.48 (1H, s), 7.65 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.76 (1H, s), 8.01 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 8.05 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 10.60–11.90 (1H, br s).

RMN ¹³C (101 MHz, CD₃CN) δ ppm : 28.1 (CH₃), 69.9, 73.8, 75.0, 75.6, 76.1 (CH₂), 78.2, 78.7, 81.8, 86.05, 86.14 (CH), 84.6 (C), 112.3, 115.8, 121.2, 121.4, 122.7, 123.4, 123.8, 125.46, 125.50, 125.6, 128.4, 128.5, 128.6, 128.72, 128.73, 128.8, 128.96, 128.97, 129.24, 129.25, 129.29, 132.9 (CH), 110.1, 113.0, 114.1, 129.4, 130.1, 136.1, 137.3, 138.6, 139.4, 139.5, 139.8, 143.3 (C), 150.2 (C=O), entre 128.4 et 129.3 ppm, un pic de CH_{arom} benzylique n'a pas pu être observé.

HRMS (ESI+) calculé pour C₅₈H₅₇N₄O₇ (M+H)⁺ 921.4222, trouvé 921.4230.

V. 2. 1. 13. 3-(5-(1H-Indol-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (17)



$C_{53}H_{48}N_4O_5$
Mol. Wt.: 820,97

A une solution du composé **16** (138mg, 0.15mmol, 1eq) dans un mélange 3 :1 V/V MeOH/H₂O (16mL) est ajouté K₂CO₃ (77mg, 0.56mmol, 3.73eq) et le mélange est chauffé a reflux pendant 3h, une solution saturée de NH₄Cl est ajoutée puis du AcOEt, le produit est extrait a pH 7-8, la phase organique est séchée par MgSO₄ puis évaporée et le produit est purifié sur colonne (Cyclo/AcOEt : 6/4) pour obtenir le composé **17** (110mg, 0.134mmol) sous forme de solide beige.

Rdt : 89%.

R_f : 0.24 (cyclohexane/AcOEt 6:4).

Tfus : 82 °C.

IR (ATR, ν cm⁻¹): 3416, 1455.

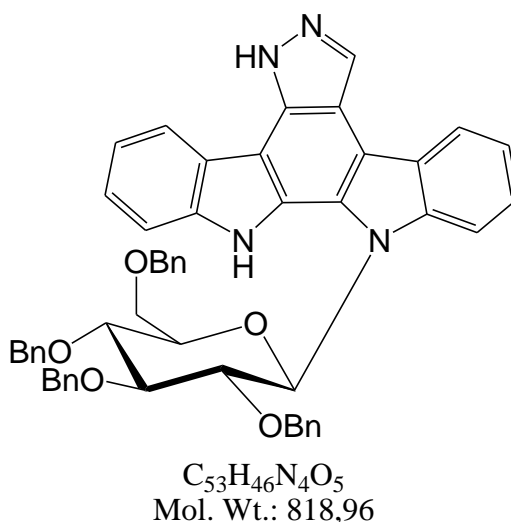
RMN ¹H (500 MHz, CD₃CN) δ ppm : 3.59 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.69–3.79 (4H, m), 3.82 (1H, t, J = 9 Hz), 3.90 (1H, t, J = 9 Hz), 4.18 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.47 (1H, d, J = 12 Hz), 4.52 (1H, d, J = 12 Hz), 4.63 (1H, d, J = 11 Hz), 4.82–4.85 (2H, m), 4.86 (1H, d, J = 11.5 Hz), 5.54 (1H, d, J = 9 Hz), 6.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 6.91 (1H, ddd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 7 Hz, J_3 = 1 Hz), 7.01 (1H, ddd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 7 Hz, J_3 = 1 Hz), 7.02–7.06 (2H, m), 7.08 (1H, ddd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 7 Hz, J_3 = 1 Hz), 7.10–7.14 (2H, m), 7.18 (1H, ddd, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 7 Hz, J_3 = 1 Hz), 7.23–7.37 (17H, m), 7.38 (1H, s), 7.59 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.71 (1H, d, J = 8 Hz), 7.75 (1H, s), 9.20 (1H, s), 9.6–12.6 (1H, br s).

RMN ¹³C (126 MHz, CD₃CN) δ 69.9, 73.9, 75.0, 75.6, 76.1 (CH₂), 78.2, 78.8, 82.0, 85.8, 86.1 (CH), 111.9, 112.42, 120.7, 121.1, 121.2, 121.4, 122.9, 123.2, 124.9, 125.1, 128.51, 128.53, 128.54, 128.7, 128.80, 128.83, 128.9, 128.977, 128.982, 129.28, 129.31, 129.32, 135.8^a (CH_{arom}), 108.3, 110.9, 112.45, 127.1, 129.01, 137.1, 137.4, 138.7, 139.43, 139.47, 139.8, 140.7^b (C_{arom}), ^adéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HSQC ¹H-¹³C, ^bdéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HMBC ¹H-¹³C.

HRMS (ESI+) calculé pour C₅₃H₄₉N₄O₅ (M+H)⁺ 821.3698, trouvé 821.3706.

Le composé **17** peut également être préparé directement à partir de l'intermédiaire **15b** de pyrazolyle de triflate déprotégé par Boc (minoritaire). Dans un tube scellé, un mélange de **15b** (126 mg), Pd(OAc)₂ (7,3 mg, 0,0325 mmol), dppf (18 mg, 0,032 mmol) et HCO₂NH₄ (82 mg, 1,3 mmol) dans du DMF (6 mL) est chauffé à 90 °C pendant 2 heures. Après refroidissement, du AcOEt est ajouté et le mélange sur Celite®. Le filtrat a été lavé avec de l'eau, séché sur MgSO₄ et évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par Chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 7: 3) pour donner le composé **17** (70 mg, 0,085 mmol, 8% à partir du composé **13**) sous forme d'un solide beige.

V. 2. 1. 14. 12-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (18)



Une solution de **17** (110mg, 0.134mmol, 1eq) dans du CH₃CN fraîchement distillé (120mL) dans un réacteur photochimique en Pyrex est dégazée avec de l'argon pendant 30min, de l'iode est ensuite ajouté (76mg, 0.297mmol, 2.22eq) et la solution est dégazée encore pendant 15min puis irradié par une lampe au mercure moyenne pression de 400 W. Le solvant est évaporé et le résidu qui se forme est dissout dans AcOEt, lavé par une solution de meta-bisulfite de sodium (1%) puis à l'eau, séché par MgSO₄ puis évaporé. Le résidu est purifié par Chromatographie sur colonne (Cyclo/AcOEt : 6/4) pour obtenir **18** (71mg, 0.087mmol) sous forme de solide beige.

Rdt : 65%.

R_f : 0.5 (cyclohexane/AcOEt 1:1).

T_{fus} : 215 °C.

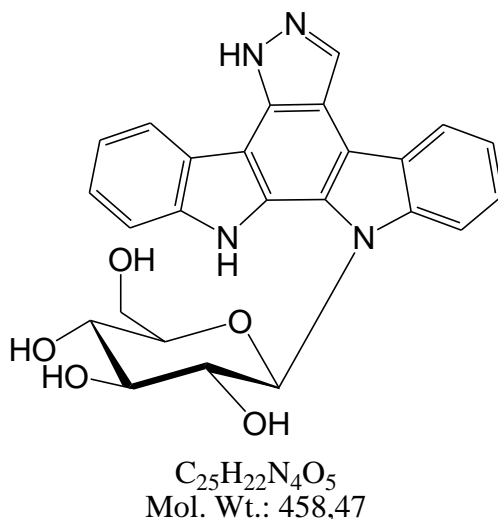
IR (ATR, ν cm⁻¹): 3337, 1454, 1240, 1070.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) δ ppm : 2.70 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 3.58 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 3.77 (1H, dd, *J*₁ = 10.4 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz), 3.88–3.97 (3H, m), 4.03–4.08 (1H, m), 4.27–4.35 (1H, m), 4.64 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 4.69 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 4.72 (1H, d, *J* = 10.9 Hz), 4.76 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.79 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.91 (1H, d, *J* = 10.9 Hz), 5.99–6.04 (2H, m), 6.16–6.23 (1H, m), 6.75–6.80 (2H, m), 6.89–6.95 (1H, m), 7.15–7.55 (20H, m), 7.78 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 8.39 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 8.43–8.48 (1H, m), 8.72 (1H, s), 10.84 (1H, s), le NH de la pyrazole n'a pas été observé.

RMN ¹³C (101 MHz, CD₃CN) δ ppm : 67.9, 74.4, 74.8, 75.8, 76.0 (CH₂), 77.2, 77.9, 82.1, 85.4, 85.8 (CH), 112.1, 112.9, 121.3, 121.5, 121.7, 121.9, 125.4, 125.8, 128.34, 128.38, 128.55, 128.59, 128.7, 128.96, 129.04, 129.14, 129.16, 129.3, 129.5, 129.6, 132.4 (CH_{arom}), 106.9, 112.6, 114.8, 123.55, 123.62, 124.8, 128.1, 134.4, 137.7, 138.4, 139.3, 139.57, 139.64, 141.1 (C_{arom}).

HRMS (ESI+) calcd for C₅₃H₄₇N₄O₅ (M+H)⁺ 819.3541, found 819.3547.

V. 2. 1. 15. 12-(1-Deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (19)



A une solution du composé **18** (54mg, 0.066mmol, 1eq) dans CH₂Cl₂ (22mL) à -78°C est ajouté BBr₃ (1M dans CH₂Cl₂, 0.79mL, 0.79mmol, 12eq), après 15min d'agitation à -78°C le mélange réactionnel est hydrolysé et ramené à température ambiante puis extrait plusieurs fois avec AcOEt, la phase organique est séchée par MgSO₄, après évaporation du solvant le produit est purifié sur colonne (de AcOEt à AcOEt/MeOH : 9/1) pour obtenir le composé **19** (21mg, 0.0458mmol,) sous forme de solide beige verdâtre.

Rdt : 69%.

R_f : 0.45 (EtOAc/MeOH 9:1).

T_{fus} : 251 °C.

IR (ATR, ν cm^{-1}): 3700–3000, 1458, 1329, 1239.

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm : 3.55–3.63 (2H, m), 3.84 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 3.93 (1H, dd, $J_1 = 9.8$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz), 4.03 (1H, t, $J = 9.1$ Hz), 4.09 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), 4.79 (1H, br s), 5.09 (1H, br s), 5.34 (1H, br s), 5.92 (1H, br s), 6.18 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.28–7.34 (2H, m), 7.41 (1H, ddd, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz), 7.43 (1H, ddd, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, $J_3 = 1.2$ Hz), 7.67 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 8.39 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.64 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.80 (1H, s), 11.48 (1H, s), 13.69 (1H, br s).

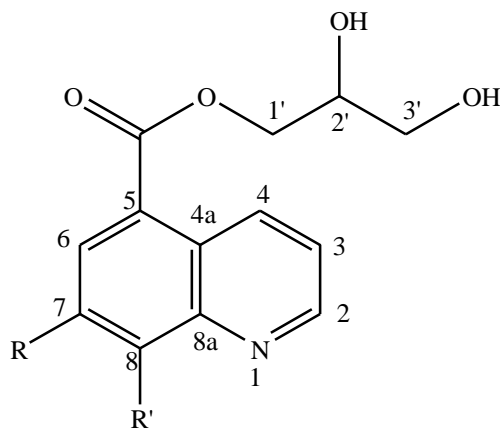
RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm : 58.5 (CH_2), 67.6, 73.1, 77.0, 78.4, 84.6 (CH), 111.7, 111.9, 119.71, 119.74, 120.6, 120.7, 123.7, 123.9, 131.8^a (CH_{arom}), 104.8^b, 111.2, 113.4, 122.0, 122.1, 122.9, 126.8, 132.1^b, 138.2, 140.3 (C_{arom}); ^adéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HSQC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, ^bdéplacement chimique mesuré à partir d'une expérience HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$.

HRMS (ESI+) calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 459.1663, trouvé 459.1665.

V. 3. Deuxième partie : Synthèse des dérivés de quinoléine par de légères modifications autour de la réaction standard de Skraup

V. 3. 1. Procédure de synthèse générale des composés 20-23

A un mélange du dérivé d'acide aminobenzoïque (3,31 mmoles), du glycérol (4,89 g, 3,87 ml, $5,29 \cdot 10^{-2}$ mol, 16 éq.) Et I_2 (0,015 g, 0,06 mmole, 0,018 éq.) est ajouté, sous agitation, goutte à goutte de l'acide sulfurique concentré (0,5ml, 9mmol, 2,72eq), le mélange est ensuite progressivement chauffé à 110 ° C, cette température est maintenue pendant une heure puis à 170 ° C pendant une (01) heure supplémentaire. Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'eau et le mélange est basifié par addition de NaOH (2M) (pH: 12), le produit est extrait par AcOEt (5x15 ml), la phase organique est séchée avec du $MgSO_4$ anhydre puis évaporée pour donner une huile sombre. Le produit est ensuite purifié sur colonne de gel de silice (Eluant: AcOEt / cyclohexane: 30/70)



Dérivés de 2,3-dihydroxypropyl quinoline-5-carboxylate

V. 3. 1. 1. 2,3-dihydroxypropyl-8-méthylquinoléine-5-carboxylate (20)

Solide blanc, (**Rdt** : 60%), **Rf** : (AcOEt)= 0.69, **T_{fus}** : 113°C, **IR** (KBr, cm^{-1}): 3432 (OH), 2962 (CH), 1715 (C=O), 1510 (C=C). **RMN¹H** (DMSO- d_6 , 400MHz) (δ /ppm) : 2.78 (3H, S, CH₃), 3.39-3.58 (m, 2H, H_{3'a}, H_{3'b}); 3.77-3.89 (m, 1H, H_{2'}); 4.26 (dd, 1H, J= 8Hz, H_{1'a}); 4.41 (dd, 1H, J=4Hz, H_{1'b}), 4.77 (s, 1H, OH_{3'}), 5.11 (s, 1H, OH_{2'}), 7.66 (dd; 1H; J=4Hz, H₃), 7.73 (d, 1H, J=8Hz, H₇), 8.24 (d, 1H, J=8H, H₆); 8.99 (d, 1H, J=4Hz, H₂), 9.24 (d, 1H, J=8Hz, H₄). **RMN¹³C** (DMSO- d_6 , 100MHz)(δ /ppm): 18.53 (CH₃); 62.71 (C_{3'}), 66.66 (C_{1'}), 69.44 (C_{2'}), 122.78 (C₃), 124.81 (C₅) 126.04 (C_{4a}), 128.51 (C₇), 130.67 (C₆), 134.02 (C₄), 142.87 (C₈), 146.49(C_{8a}), 149.87 (C₂), 166.09 (C=O). **HRMS** (ESI+) calculé pour C₁₄H₁₆NO₄ (M+H)⁺ 262.10738, trouvé 262.1075.

V. 3. 1. 2. *2,3-dihydroxypropyl-8-methoxyquinoléine-5-carboxylate (21)*

Solide beige, (**Rdt**: 63%), **Rf** : (AcOEt)= 0.19, **T_{fus}** : 181°C, **IR** (KBr, cm⁻¹): 3387 (OH), 3117 (CH), 2930 (CH), 1706 (C=O), 1571 (C=N), 1509 (C=C), 1237 (C-O), 1107 (C-O-C), 770.32 (CH). **RMN** ¹H (DMSO-d₆ ;400MHz) : 3.38-3.56 (m, 2H, H_{3'a}, H_{3'b}), 3.75-3.94 (m, 1H, H_{2'}), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 4.24 (dd, 1H, J=6.4Hz, H_{1'a}) ; 4.38(dd; 1H, J=4Hz, H_{1'b}); 4.76 (s, 1H, J=5.6Hz, OH_{3'}), 5.09 (s,1H, J=5.2Hz, OH_{2'}), 7.28 (d, 1H, J=8.4Hz, H₇),7.67 (dd, 1H, J=8.4HZ, H₃), 8.34 (d, 1H, J=8.4Hz, H₆), 8.90 (dd, J=4Hz, H₂), 9.31 (d, 1H, J=8.8HZ, H₄).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): 56.17 (OCH₃), 62.75 (C_{3'}), 66.38 (C_{1'}), 69.40 (C_{2'}), 107.04 (C₇), 117.57 (C₅), 123.26 (C₃), 127.63 (C_{4a}), 132.77 (C₆), 133.65 (C₄), 139.36 (C_{8a}), 149.09 (C₂), 159.14 (C₈), 165,83 (C=O). **HRMS** (ESI+) calculé pour C₁₄H₁₆NO₅ (M +H)⁺ 278.1023, trouvé 278.1015.

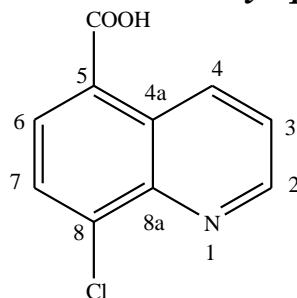
V. 3. 1. 3. *2,3-dihydroxypropyl-7-methoxyquinoléine-5-carboxylate (22)*

(gomme), (**Rdt**: 63%), **Rf** : (AcOEt)= 0.32, **IR** (KBr, cm-1): 3450 (OH), 2948 (CH), 1719 (C=O). **RMN**¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 3.37-3.54 (m, 2H, H_{3'a}, H_{3'b}), 3.75-3.97 (m, 1H, H_{2'}), 3,97 (s, 3H, OCH₃), 4.27 (dd, 1H, J = 6.4Hz, H_{1'a}), 4.39 (dd, 1H, J = 5.6Hz, H_{1'b}), 4.77 (s, 1H, J = 5.6Hz, OH_{3'}), 5.14 (s, 1H, J=5.6Hz, OH_{2'}), 7.50 (dd, 1H, J = 4Hz, H₃), 7.65 (d, 1H, J = 2.4Hz, H₇), 7.90 (d, 1H, J=2.8Hz, H₅), 8.89 (d, 1H, J = 2.8Hz, H₂), 9.05 (d, 1H, J = 8Hz, H₄). **RMN** ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) : 55.87 (OCH₃), 62.64 (C_{3'}), 67.02 (C_{1'}), 69.22 (C_{2'}), 112.34 (C₈), 120.50 (C₃), 121.04 (C_{4a}), 123.00 (C₆), 128.29 (C₅), 133.50 (C₄), 149.65 (C_{8a}), 151.08 (C₂), 158.54 (C₇), 165.55 (C=O). **HRMS** (ESI+) calculé pour C₁₄H₁₆NO₅ (M+H)⁺ 278.1023, trouvé 278.1026.

V. 3. 1. 4. *2,3-dihydroxypropyl quinoléine-5-carboxylate (23)*

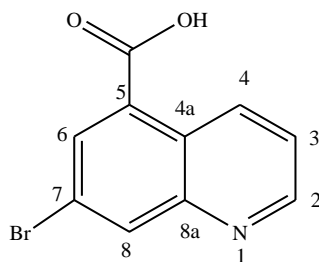
Solide beige, (**Rdt**: 57%), **Rf** : (AcOEt) = 0.62, **T_{fus}** : 209°C, **IR** (KBr, cm⁻¹): 3425 (OH), 2933 (CH), 1719 (C=O), 1508 (C=C), 1284 (C-O), 1136 (C-O-C), 805 (C-H). **RMN** ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): 3.41-3.53 (m, 2H, H_{3'a}, H_{3'b}), 3.78-3.99 (m, 1H, H_{2'}), 4.30 (dd, 1H, J=6.4Hz, H_{1'a}), 4.43 (dd, 1H, J=5.6Hz, H_{1'b}), 7.66 (dd,1H, J=4Hz, H₃), 7.86 (d, 1H, J=8Hz, H₇), 8.97 (d, 1H, H₂), 9.19 (d, 1H, J=8Hz, H₄). **RMN** ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz) : 62.73 (C_{3'}), 66.88 (C_{1'}), 69.35 (C_{2'}), 122.84 (C₃), 126.09 (C₅), 127.16 (C_{4a}), 128.48 (C₇), 130.56 (C₆), 133.70 (C₈), 134.39 (C₄), 147.72 (C_{8a}), 150.92 (C₂), 166.10 (C=O). **HRMS** (ESI+) calculé pour C₁₃H₁₄NO₄ (M+H)⁺ 248.09173, trouvé 278.0916.

V. 3. 1. 5. Acide 8-chloroquinoléine-5-carboxylique (24)



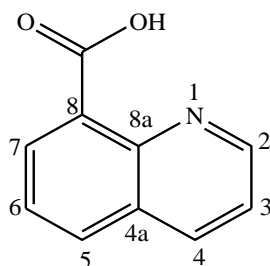
Solide marron, (**Rdt**: 43%), **Rf** : (AcOEt/ MeOH 98/2)= 0.40, **T_{fus}** >280°C décomposition, **IR** (cm⁻¹): 3411(OH), 2922(CH), 1719(C=O), 1503(C=C), 1262(C-O), 823(C-H), 758(C-Cl). **RMN¹H** (DMSO-d₆, 400MHz): 7.76 (dd, 1H, J₁=J₂=8Hz, H₃), 8.04 (d, 1H, J=8Hz, H₇), 8.21 (d, 1H, J=8Hz, H₆), 9.07 (dd, 1H, J₁=8Hz, J₂=1.6Hz, H₂), 9.36 (dd, 1H, J₁=8Hz, J₂=1.6Hz, H₄), 13.4 (s, 1H, COOH). **RMN¹³C** (DMSO-d₆, 100MHz) : 123.51(C₃), 127.14 (C₅), 127.64 (C_{4a}), 128.68 (C₇), 130.44 (C₆), 134.65 (C₄), 137.53 (C₈), 143.51 (C_{8a}), 151.26 (C₂), 167.14 (C=O). **HRMS** (ESI⁺) calculé pour C₁₀H₇NO₂ (M+H)⁺ 208.01598, trouvé 208.0159.

V. 3. 1. 6. Acide 7-bromoquinoléine-5-carboxylique (25)



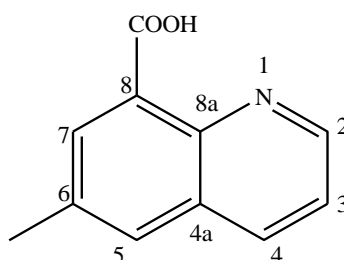
Solide marron, (**Rdt**: 21%), **Rf** : (AcOEt)= 0.22, **T_{fus}** : 216°C, **IR** (cm⁻¹): 3422(OH), 2923(CHar), 1678(C=O), 763(C-H), 614(C-Br). **RMN¹H** (DMSO-d₆, 400MHz): 7.82 (dd, 1H, J₁=J₂=8Hz, H₃), 8.31 (s, 1H, J=8Hz, H₆), 8.55 (d, 1H, J=8Hz, H₂), 8.57 (s, 1H, H₈), 9.09 (m, 1H, H₄), 13.61 (s, 1H, COOH). **HRMS** (ESI⁺) calculé pour C₁₀H₇NO₂Br (M+H)⁺ 251.96547, trouvé 251.9659.

V. 3. 1. 7. Acide 8-quinoléinecarboxylique (26)



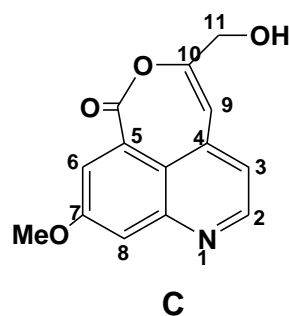
Solide blanc, (**Rdt** : 91%), **Rf** : (AcOEt)= 0.62, **T_{fus}** : 186°C, **IR** (KBr, cm⁻¹): 3418(OH), 2926(CH), 1719(C=O), 1579(C=C). **RMN¹H** (DMSO-d₆, 400Mz) : 7.83 (m, 2H, H₃, H₆), 8.36 (d, 1H, J=8Hz, H₅), 8.56 (d, 1H, J=8Hz, H₄), 8.72 (d, 1H, J=8Hz, H₇), 9.09 (d, 1H, J=4Hz, H₂). **RMN¹³C** (DMSO-d₆, 100MHz) : 122.40 (C₃), 124.01 (C₈), 127.21 (C₆), 128.02 (C_{4a}), 133.71 (C₅), 134.24 (C₇), 139.38 (C₄), 144.29 (C_{8a}), 149.66 (C₂), 166.33 (C=O). **HRMS** (ESI+) calculé pour C₁₀H₈NO₂ (M+H)⁺ 174.05496, trouvé 174.0745.

V. 3. 1. 8. Acide 6-méthylquinoléine-8-carboxylique (27)



Solide beige, (**Rdt**: 52%), **Rf** : (AcOEt)= 0.8, **T_{fus}** : 143°C, **IR** (cm-1): 3370(OH), 2921(CH), 1705(C=O), 1505(C=O), 1284(C-O), 795(C-H). **RMN¹H** (DMSO-d₆, 400MHz): 2.55 (s, 3H, CH₃), 7.75 (dd, 1H, J₁=J₂=8Hz, H₃), 8.08 (s, 1H, H₅), 8.38 (s, 1H, H₇), 8.58 (d, 1H, J=8Hz, H₄), 9.00 (dd, 1H, J=8Hz, H₃), 12.36 (s, 1H, COOH). **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 100MHz) : 20.96(CH₃), 122.37 (C₃), 123.51 (C₈), 126.11 (C_{4a}), 132.23(C₅), 136.13(C₇), 137.05 (C₆), 138.58(C₄), 142.86(C_{8a}), 148.63 (C₂), 166.31 (C=O). **HRMS** (ESI+) calculé pour C₁₁H₁₀NO₂ (M+H)⁺ 188.07061, trouvé 188.0706.

V. 3. 1. 9. (Z)-5-(hydroxyméthyl)-9-méthoxy-7H-oxepino [5,4,3-de]quinolin-7-one C



Solide marron, (**Rdt** : traces), **Rf** : (AcOEt/MeOH 20/80) = 0.49, **T_{fus}** > 300 °C. **IR** (cm⁻¹): 3428, 1640, 1550, 1140. **RMN¹H** (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm : 8.31 (s, 1H, H₆), 8.00 (d, 1H, H₂), 7.37 (s, 1H, H₈), 7.29 (d, 1H, H₃), 5.61 (s, 1H, H₉), 4.63 (s, 2H, H₁₁), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.30 (s, 1H, OH).

V. 4. Protocole expérimentale des tests biologiques

V. 4. 1. Tests d'activités antiprolifératives :

La lignée cellulaire de carcinome du côlon humain HCT116 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) a été propagée dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco enrichi avec 5% de sérum fœtal de veau, 2 mM de *L*-glutamine, 100 unités / mL de pénicilline et 100 µg / mL de streptomycine à 37°C, 5% de CO₂ dans une atmosphère humidifiée. Les cellules en phase de croissance logarithmique ont été utilisées dans les expériences. Les composés **10**, **11**, **18** et **19** ont été dissous dans du DMSO sous la forme d'une solution mère à 10 mM suivie de dilutions en série dans l'eau immédiatement avant les expériences. La cytotoxicité a été déterminée dans un essai de conversion au Formazan (test MTT). Brièvement, des cellules (5×10^3 dans 190 µL de milieu de culture) ont été étalées dans une plaque de 96 puits (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) et traitées avec 0,1% de DMSO (témoin) ou avec **10**, **11**, **18** et **19** (0.1-50 µM, chaque concentration en double) pendant 72 h. Après l'achèvement de l'exposition au médicament, 50 µg de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ont été ajoutés dans chaque puits pendant 2h supplémentaires. Le Formazan a été dissous dans du DMSO et l'absorbance à 540 nm a été mesurée. La viabilité cellulaire à une concentration médicamenteuse donnée (% de conversion MTT) a été calculée comme le pourcentage d'absorbance dans les puits avec des cellules traitées par médicament à celle des cellules témoins du véhicule (100%).

V. 4. 2. Tests d'inhibition des kinases Pim-1 et PKCα :

Les procédures pour les dosages de protéines kinases *in vitro* ont été décrites précédemment (Bain J. 2007). Toutes les protéines kinases complètes étaient d'origine humaine. Toutes les protéines ont été exprimées sous forme de protéines de fusion GST (glutathion transférase) dans *Escherichia coli* ou sous forme de protéines marquées à l'hexahistidine (His₆) dans des cellules d'insecte Sf21 (*Spodoptera frugiperda* 21). Les protéines de fusion GST ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur glutathion-Sepharose, et les protéines marquées His₆ sur nickel / nitrilotriacétate-agarose. Les dosages (25.5 µL de volume) ont été effectués par robot à température ambiante (21°C) et étaient linéaires en fonction du temps et de la concentration enzymatique dans les conditions utilisées. Les dosages ont été effectués pendant 30 min en utilisant des distributeurs de réactifs Multidrop Micro (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, États-Unis) dans un format de 96 puits. La concentration d'acétate de magnésium dans les dosages était de 10 mM; De l'ATP (γ -³³P) (800 c.p.m./pmol) a été utilisé à 20 µM pour Pim-1 et PKCα, afin d'être égal ou inférieur au *K_m* de l'ATP pour chaque enzyme. Les analyses ont été initiées avec MgATP,

arrêtées par l'addition de 5 μ L d'acide orthophosphorique 0.5 M et déposées sur des plaques filtrantes P81 en utilisant un récolteur unifiltre (PerkinElmer, Boston, MA). Les substrats de kinase étaient RSRHSSYPAGT (300 μ M) pour Pim-1 ou l'histone H1 (0.1 mg/mL) pour PKC α . Pim-1 a été dilué dans un tampon contenant 50 mM de Tris/HCl, pH 7.5, EGTA 0.1 mM, 1 mg/mL de BSA et 0.1% de 2-mercaptoéthanol et dosé dans un tampon comprenant 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA et 0.1% de 2-mercaptoéthanol. La PKC α a été diluée dans HEPES 20 mM (pH 7.4) / 0.03% Triton X-100 et dosée dans le même tampon complété avec 0.1 mg/ml de phosphatidylsérine, 10 μ g/mL de diacylglycérol et 0.1 mM de CaCl₂. Le profil inhibiteur des composés testés a été exprimé comme le pourcentage d'activité kinase résiduelle pour la concentration d'inhibiteur de 10 μ M. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm écart-type pour les déterminations en double.

V. 4. 3. Tests d'interaction avec l'ADN double brin :

Enfin, comme les composés étudiés représentaient des systèmes hétéroaromatiques planaires, nous avons évalué leur capacité à interagir avec l'ADN double brin in vitro.

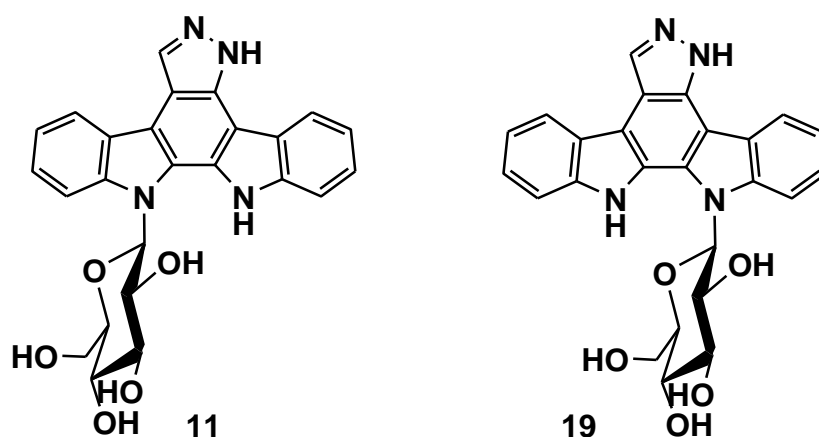
La liaison des composés à l'ADN a été déterminée dans 100 mM de NaCl, 10 mM d'une solution tampon de phosphate de Na tampon et pH 6.5 à 25 ° C. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec un spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse (Varian Inc., USA); La concentration de l'ADN du thymus de veau (ADNct) en moles de paires de bases a été déterminée dans une solution tampon de phosphate de sodium à 20°C en utilisant le coefficient d'extinction molaire ϵ [ctDNA] = 13200 M (pb)⁻¹ cm⁻¹. Les constantes de liaison ont été déterminées par approximation linéaire du rapport [L]·[ADN]/(F₀-F) où [L] et [ADN] sont des concentrations du composé et de l'ADNct, respectivement; F₀ et F sont des intensités de fluorescence du composé en l'absence ou en présence d'ADN, respectivement. La valeur d'erreur a été calculée comme écart-type des constantes de liaison déterminées par fluorescence à trois longueurs d'onde (410, 435, 460 nm pour **10** et **18** et 375, 395, 410 nm pour **11** et **19**) (Scott R. **1956**, Nadysev GY. **2018**).

Conclusion générale

Conclusion générale

Le projet de thèse de doctorat en science présenté dans ce mémoire intitulé : **Conception et Synthèse de Nouveaux Hétérocycles, Evaluations Biologique et Etude Théorique** comprend deux parties qui s'intéressent tous deux au développement de nouveaux noyaux hétéroaromatiques.

La première partie a été consacrée à la synthèse d'indolocarbazoles originaux ayant des propriétés antitumorales, nous avons synthétisé 2 nouveaux régioisomères analogues de pyrazole glycosylés de la staurosporine aglycone K252c avec la mise au point d'une voie de synthèse pour accéder aux indolocarbazoles **10**, **11**, **18** et **19**.



IC_{50} (HCT116)= 12 mM

IC_{50} (HCT116) =11 mM

Figure 38 : Composés 11 et 19 et leurs propriétés antiproliférative.

Cette première partie débute par une étude bibliographique afin de décrire les protéine kinases et les inhibiteurs de kinases ainsi qu'un aperçu général sur les méthodes de synthèse des dérivés d'indolo[2,3-a]carbazoles.

D'après une série de tests biologiques réalisés sur les composés synthétisés **10**, **11**, **18** et **19** notamment l'activité inhibitrice des kinases (Pim-1 et PKC α), la capacité en tant qu'agent d'intercalation de l'ADN et activité antiproliférative vis-à-vis de la lignée cellulaire de carcinome du colon HCT116. Les composés les plus actifs **11** et **19** présentaient des

activités antiprolifératives similaires à celles des cellules HCT116 avec des valeurs de CI50 autour de 10 μM (Figure 38).

Concernant l'inhibition de la kinase, seulement le composé **11** présentait une activité modérée vis-à-vis de la PKC α (30% d'inhibition à une concentration de 10 μM) et présente donc un intérêt en tant qu'inhibiteur potentiel de kinases.

Ces nouveaux chemotypes constituent une « plateforme » et offre un large panel de fonctionnalisations possibles dont la première envisagée est la substitution sur les deux cycles benzénique par des groupements F, Cl ou OH afin d'obtenir un dérivé proche de la Rébeccamycine. Au final, ces résultats ont indiqué que l'identification de la (des) cible (s) biologique (s) impliquée (s) dans les activités antiprolifératives et inhibitrices de ces composés nécessite des expériences supplémentaires qui sont actuellement à l'étude.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Tetrahedron* (Douara *et al.* 2018).

La deuxième partie a été consacrée à l'étude du rôle du glycérol dans la synthèse des quinoléines à structure complexes, la préparation d'une nouvelle série d'acides quinoléiques estérifiés par le glycérol suite à une modification autour de la réaction de Skraup (excès de glycérol), une série d'acides aminobenzoïque différemment substitués a été utilisé comme produit de départ, l'obtention de ces quinoléines estérifiées au glycérol en une seule étape ainsi que d'un troisième isomère (même en traces) valide l'idée de départ.

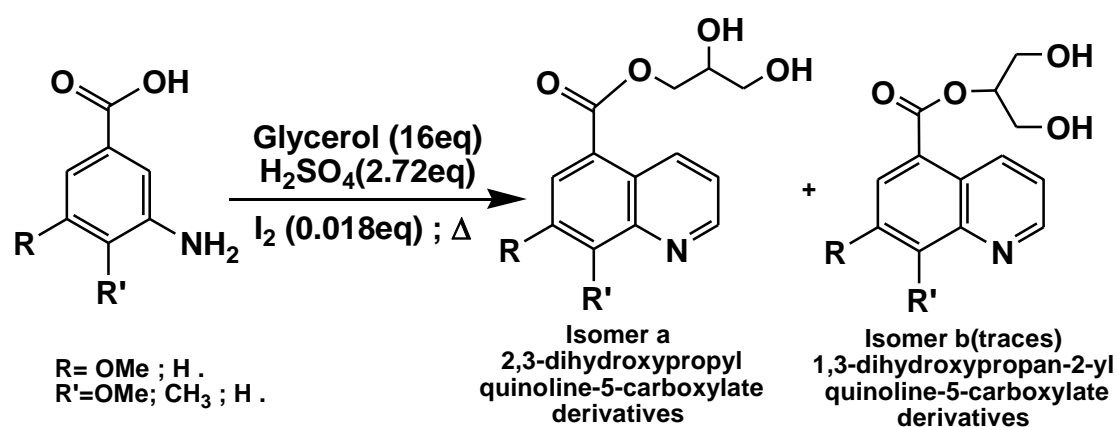


Schéma 74 : Nouveaux dérivés de la quinoléine estérifiée par le glycérol.

Une étude théorique (DFT) a été réalisée pour confronter les résultats expérimentaux aux celles théoriques. Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats expérimentaux.

Pour aborder cette première partie nous avons exposé un rappel historique sur la découverte et l'intérêt biologique des dérivés de la quinoléine ainsi qu'un plan général sur les voies de synthèse de ces dérivés par des méthodes classiques, ou par l'utilisation de nouvelles techniques (micro-ondes, ultrasons, photocatalyse et bio-catalyse)

Les structures de tous les composés préparés ont été élucidées par les méthodes spectroscopiques usuelles (T_{fus} , IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN 2D), et par la spectroscopie de masse à haute résolution (HRMS) pour toutes les molécules originales.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Adams R., Wirth W. V., and French H. E., Oxalyl chloride as a reagent in organic chemistry. II. Preparation of aromatic acid anhydrides; reaction with alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 424-431.
- Adams J. A., Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271-2290.
- Advani RH, Hurwitz HI, Gordon MS, Ebbinghaus SW, Mendelson DS, Wakelee HA., Voreloxin, a first-in-class anticancer quinolone derivative, in relapsed/refractory solid tumors: a report on two dosing schedules. *Clin Cancer Res.* **2010** Apr 1; *16*(7): 2167-75.
- Ahmed N., Brahmhatt K. G., Sabde S., Mitra D., Singh I. P., Bhutani K. K., *Synthesis and anti-HIV activity of alkylated quinoline 2,4-diols. Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18* (8). 2872-2879.
- Amaresh, R. R.; Perumal, P. T. *Ind. J. Chem.*, **1997**, *16B*, 541.
- Anizon F, Shtil AA, Danilenko VN, Moreau P. *Curr. Med. Chem.* **2010**; *17*:4114.
- Anshua Ghosh, Karl Peter Giese. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer's disease. *Molecular Brain* **2015**, *8*:78.

B

- Baeyer A., Drewsen V., *Ber.*, **1882**, *15*, 2682.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie J, McLauchlan H, Klervernic I, Arthur SC, Alessi DR, Cohen P. *Biochem. J.* **2007**; *408*:297.
- Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE *et al.* Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J.* **2005**. *385*: 399–408.
- Batalha PN, Vieira de Souza MC, Peña-Cabrera E, Cruz DC, da Costa Santos Boechat F. Quinolones in the Search for New Anticancer Agents. *Curr Pharm Des.* 2016; *22* (39): 6009-6020.
- Baures P. W., *Org. Lett.*, **1991**, *1*(2), 249.
- Bergman J., Pelcman B., Coupling of indoleacetic acid trianion or methyl indoleacetic acid dianion. A biomimetic approach to indolocarbazole alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (38), 4441- 4444.

- Bererhi L., Flamant M., Martinez F., Karras A., Thervet E., Legendre C., Rapamycin-induced oligospermia. *Transplantation*. **2003**; 76: 885–886.
- Bergman, J.; Pelcman, B. Synthesis of indolo[2,3- a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles by double Fischer indolizations. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 824.
- Bhatt, H. G.; Agrawal, Y. K.; Patel, M. J. Amino- and Fluoro-Substituted Quinoline-4-Carboxylic Acid Derivatives: MWI Synthesis, Cytotoxic Activity, Apoptotic DNA Fragmentation and Molecular Docking Studies. *Med. Chem. Res.* **2015**, 24 (4), 1662–1671.
- Bhide, G. V.; Tikotkar, N. L.; Tilak, B. D. *Chem. Ind.* **1957**, 363.
- Blay JY, Le Cesne A, Alberti L, Ray-Coquart I. Targeted cancer therapies. *Bull Cancer*. **2005** Feb;92(2):E13-8.
- Blume-Jensen P, Hunter T . Oncogenic kinase signalling. *Nature*. **2001**, 411: 355–365.
- Borrero, N. V.; DeRatt L. G.; Abboud, K. A.; Aponick, A. Tandem Gold-Catalyzed Dehydrative Cyclization/Diels–Alder Reactions: Facile Access to Indolocarbazole Alkaloids. *Org. Lett.*, **2015**, 17,1754.
- Borsche, W., Ried, W. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1943**, 554, 269.
- Braña M.F., Gradillas A., Ovalles AG., López B., Acero N., Llinares F., Muñoz Mingarro D., Synthesis and biological activity of N,N-dialkylaminoalkyl-substituted bisindolyl and diphenyl pyrazolone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 9-16.
- Bruning J, Hache T, Winterfeld E. The First regioselective synthesis of a monosubstituted staurosporine precursor. *Synthesis*. **1994**; 25-27.
- Brunton, R. J.; Drayson, F. K.; Plant, S. G. P.; Tomlinson, M. L. Experiments on the preparation of indolocarbazoles. Part IX. The preparation of 9-methylindolo(2' : 3'-1 : 2)carbazole *J. Chem.Soc.* **1956**, 4783.
- Burkhard S, Winterfeld E. Reactions with indole derivatives, XLVIII. A simple synthesis of the staurosporine aglycon. *Heterocycles*. **1983**; 20: 469-476.

C

- Campbell S. F., Hardstone J. D., Palmer M. J., *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 1031.
- Camps R., *Chem. Ber.*, **1899**, 32, 3228-3234.
- Chabukswar A. R.; Kuchekar B. S.; Jagdale S. C.; Lokhande P. D.; Chabukswar V. V.; Shisodia S. U.; Mahabal R. H.; Londhe A. M.; Ojha N. S., Synthesis and evaluation of analgesic, anti-asthmatic activity of (E)-1-(8-hydroxyquinolin-7-yl)-3-phenylprop-2-en-1 ones. *Arabian Journal of Chemistry*, **2016**, 9 (5), 704-712.

- Chen LS, Redkar S, Taverna P, Cortes JE, Gandhi V. *Blood* **2011**; 118:693.
- Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med.* **2007**, 13: 433-42.
- Clyde, D.F. *World Health Org.*, **1981**, 59, 391.
- Cohen P . The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem.* **2001**, 268: 5001–5010.
- Combes, A. *Bull. Chim. Soc. France.* **1888**. 49: 89.
- Conrad, M.; Limpach, L. synthesen von Chinolinderivaten mittelst Acetessigester. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 944-948
- Cowan-Jacob SW. Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol Life Sci.* **2006**, 63: 2608–2625.
- Cowan-Jacob SW, Jahnke W, Knapp S. Novel approaches for targeting kinases: allosteric inhibition, allosteric activation and pseudokinases. *Future Med Chem.* **2014**; 6: 541–561.
- Cox KJ, Shomin CD, Ghosh I. Tinkering outside the kinase ATP box: allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases. *Future Med. Chem.* **2011**; 3, 29–43
- Cure P, Pileggi A, Froud T, *et al.* Alterations of the female reproductive system in recipients of islet grafts. *Transplantation.* **2004**; 78 : 1576–1581.

D

- Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP. Comprehensive Analysis of Kinase Inhibitor Selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29 (11), 1046-1051.
- Deborah T. *Biochim Biophys Acta.* **2007** Aug; 1773(8): 1196–1212.
- Delarue-Cochin S, McCort-Tranchepain I. *Org. Biomol. Chem.* **2009**; 7:706.
- Dewar, *Chem. News*, **1871**, 23, 38.
- Dhalla NS, Müller AL. Protein Kinases as Drug Development Targets for Heart Disease Therapy. *Pharmaceuticals (Basel).* **2010** Jul; 3(7): 2111–2145.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* **2007** May 14; 26(22) : 3279-90.
- Doebner, O., *Ann.*, **1887**, 242, 265.
- Doebner O., Miller W,., Ueber eine dem Chinolin homologe Base. *Ber.*, **1881**, 14, 2812.
- Duong-Ly KC, Peterson JR. The human kinome and kinase inhibition as a therapeutic strategy. *Curr Protoc Pharmacol.* **2013** Mar; Chapter 2: Unit2.9.

E

- Esvan YJ, Giraud F, Pereira E, Suchaud V, Nauton L, Théry V, Dezhenkova LG, Kaluzhny DN, Mazov VN, Shtil AA, Anizon F, Moreau P. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**; 24:3116.

F

- Faul M. M., Winneroski L. L. et Krumrich C. A. A New, Efficient Method for the Synthesis of Bisindolylmaleimides. *Org. Chem.*, **1998**, 63(17), 6053-6058

- Fischer EH, Krebs EG. Conversion of phosphorylase *b* to phosphorylase *a* in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* **1955**, 216, 121-132.

- Fischer EH., Graves DJ., Crittenden ER., Krebs EG., Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase *b* to *a* reaction. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 1698-1704.

- Fischer D.F. and Sarpong R. Total Synthesis of (+)-Complanadine A Using an Iridium-Catalyzed Pyridine C-H Functionalization. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5926-5927.

- Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA, Fingar DC. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem.* **2010**; 285: 80–94.

- Fox J. C., Gilligan R. E., Pitts A. K., Bennett H. R. and Gaunt M. J., The total synthesis of K-252c (staurosporinone) via a sequential C–H functionalisation strategy. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (4), 2706-2710.

- Friedländer, P., Ueber o-Amidobenzaldehyd. *Chemische Berichte.* **1882**, 15 (2): 2572–2575

- Funato N. , Takayanagi H., Konda Y., Toda Y., Harigaya Y., Iwai Y., Omura S., Absolute Configuration of Staurosporine By X-Ray Analysis. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (8), 1251-1254.

- furusaki, A.; N. Hashiba, T. Matsumoto, A. Hirano, Y. Iwai & S. Omura: X-ray crystal structure of staurosporine: a new alkaloid from a *Streptomyces* strain. *J. Chem. Soc, Chem. Commun.* **1978**: 800-801, 1978

G

- Gani OABSM, Engh RA. *Nat. Prod. Rep.* **2010**; 27:489.

- Gavara L., Saugues E., Alves G., Debiton E., Anizon F., Moreau P., Synthesis and biological activities of pyrazolo[3,4-*g*]quinoxaline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45 (11), 5520-5526.

- Giraud F., Akué-Gédu R., Nauton L., Candelon N., Debiton E., Théry V., Anizon F., Moreau P., Synthesis and biological activities of 4-substituted pyrrolo[2,3-*a*]carbazole Pim kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *56*, 225-236.
- Giraud F., Anizon F., Moreau P., Advances in the synthesis and Kinase inhibitory potencies of non-fused indazole derivatives. *Targets Heterocycl. Syst.* **2014**, *18*, 1-28.
- Gribble, G. W.; Berthel, S. J. Synthetic Approaches to Indolo[2,3-*a*]carbazole alkaloids. Syntheses of arcyriaflavin A and AT2433-B aglycone. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 8869.
- Gould, R. G. ; Jacobs, W. A. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1939**. *61*, 2890.

H

- Halberkann J., *Ber.*, **1921**, *54*, 3090.
- Hanks, S. K., and Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, *9*, 576–596.
- Harris, W.; Hill, C. H.; Keech, E.; Malsher, P. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8361.
- Hénon H., Messaoudi S., Hugon B., Anizon F., Pfeiffer B. Prudhomme M., Synthesis of granulatimide bis-imide analogues. *Tetrahedron* **2005**, *61* (23), 5599-5614.
- Horton PA, Longley RE, McConnell OJ, Ballas LM. *Experientia* **1994**; *50*:843.
- Hu Y.Q., Gao C., Zhang S., Xu L., Xu Z., Feng L.S., Wu X., Zhao F., *Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities. Eur J Med Chem.* **2017** Oct 20; *139*: 22-47.
- Hughes I, Raphael RA. Synthesis of arcyriaflavin B. *Tetrahedron Lett.* **1983**; *24*: 1441-1444.

J

- Jacobs, M. D.; Black, J.; Futer, O.; Swenson, L.; Hare, B.; Fleming, M.; Saxena, K. J. *Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13728.
- J.E. Mc Murry, *Acc.Chem.Res.*, **1974**, *1*, 281.
- Jiang, H.; An, X.; Tong, K.; Zheng, T.; Zhang, Y.; Yu, S. Visible-Light-Promoted Iminyl-Radical Formation from Acyl Oximes: A Unified Approach to Pyridines, Quinolines, and Phenanthridines. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (13), 4055–4059.
- Joyce R. P., Gainor J. A. and Weinreb S. M. Synthesis of the aromatic and monosaccharide moieties of staurosporine. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (7), 1177-1185.

K

- Kaneko T, Wong H, Okamoto KT, Clardy J. Two synthetic approaches to rebeccamycin. *Tetrahedron Lett.* **1985**; 26: 4015-4018.
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT, Faraoni R, Floyd M, Hunt JP, Lockhart DJ, Milanov ZV, Morrison MJ, Pallares G, Patel HK, Pritchard S, Wodicka LM, Zarrinkar PP. *Nature Biotechnology* **2008**; 26:127.
- Kayukova L. A., Pramyav K. D., *Khim.-Farm. Zh.*, **2000**, 34, No. 1, 15.
- Khan K. M., Saify Z. S., Khan Z. A., Ahmed M., Saeed M., Schick M., Kohlbaun H. J., Voelter W., Syntheses and Cytotoxic, Antimicrobial, Antifungal and Cardiovascular Activity of New Quinoline Derivatives. *Arzneimittelforschung*, **2000**; 50(10): 915-924.
- Kirkland LO, McInnes C. Non-ATP competitive protein kinase inhibitors as anti-tumor therapeutics. *Biochem Pharmacol.* **2009**; 77(10):1561-71.
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lör J, Stö M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal.* **2005**, 17, 675-89.
- Knölker HJ, Reddy KR. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem Rev.* **2002** ;102(11):4303-4427.
- Knorr L., Synthetische Versuche mit dem Acetessigester. *Liebigs Ann. Chem.* **1886**, 236, 69
- Knusel, B.; Hefti, F. *J. Neurochem.* **1992**, 59, 1987.
- Krebs E. G., Kent A. B., and Fischer E. H. The muscle phosphorylase *b* kinase reaction. *J. Biol. Chem.* **1958**, 231, 73-84.
- Kumar H., Devaraji V., Joshi R., Jadhao M., Ahirkar P., Prasath R., Bhavana P., Antihypertensive activity of a quinoline appended chalcone derivative and its site specific binding interaction with a relevant target carrier protein. *RSC Advances.* **2015**, 5 (80), 65496-65513.
- Kumar, S.; Bawa, S.; Gupta, H. Biological Activities of Quinoline Derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, 9 (14), 1648–1654.
- Kusama, H.; Yamashita, Y.; Narasaka, K. Synthesis of Quinolines via Intramolecular Cyclization of Benzylacetone Oxime Derivatives Catalyzed with Tetrabutylammonium Perrhenate(VII) and Trifluoromethanesulfonic Acid. *Chem. Lett.* **1995**, 5.

L

- Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease : interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet.* **2010**, 11: 60–74.

- Lamba, V.; Ghosh, I. New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing Upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2936-2945.
- Le Z., Liang M., Chen Z., Zhang S., Xie Z. Ionic Liquid as an Efficient Medium for the Synthesis of Quinoline Derivatives via α -Chymotrypsin-Catalyzed Friedländer Condensation. *Molecules.* **2017**, *22*, 762.
- Lefoix M., Coudert G., Routier S., Pfeiffer B., Caignard DH., Hickman J., Pierré A., Golsteyn RM., Léonce S., Bossard C., Mérour JY., Novel 5-azaindolocarbazoles as cytotoxic agents and Chk1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5303-5321.
- Lindsley CW, Zhao Z, Leister WH, Robinson RG, Barnett SF, Defeo-Jones D *et al.* Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**.15: 761–764.
- Link J. T., Raghavan S., Gallant M., Danishefsky S. J., Chou T. C., and Ballas L. M., Staurosporine and *ent*-Staurosporine: The First Total Syntheses, Prospects for a Regioselective Approach, and Activity Profiles¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (12), 2825-2842.
- Liu, R.; Zhu, T.; Li, D.; Gu, J.; Xia, W.; Fang, Y.; Liu, H.; Zhu, W.; Gu, Q. Two indolocarbazole alkaloids with apoptosis activity from a marine-derived actinomycete Z₂039-2. *Arch Pharm. Res.* **2007**, *30*, 270-274.
- Liu Y, Gray NS. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol.* **2006** Jul; 2(7): 358-64.
- Luchi, R. J.; Conn, H. L.; Helwig, J. Cardiovascular Effects of a Quinidine-Related Compound, 4-Hydroxymethyl-6-methoxyquinoline. *Am. J. Cardiol.* **1962**, *10* (2), 252–260.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* **1990** Mar 2; 247(4946):1079-82.

M

- Magnus, P. D., Exon, C., and Sear, N. L., Indole-2, 3-quinodimethanes: Synthesis of indolocarbazoles for the synthesis of the fused dimeric indole alkaloid staurosporinone. *Tetrahedron.* 1983; 39, 3725.
- Magoulas G. and D. Papaioannou. Synthetic studies towards the development of a novel class of acitretin-type retinoids. *ARKIVOC.* **2003**, *6*, 213-227.

- Mahanty, J. S.; De, M.; Das, P.; Kundu, N. G. Palladium-catalyzed Heteroannulation with Acetylenic Carbinols as Synthons~Synthesis of Quinolines and 2, 3-Dihydro-4(IH)-quinolones. *Tetrahedron*. **1997**, *53*, 13397.
- Mann F. G., Willcox T. J., The synthesis of indolo(2' : 3'-1 : 2)- and indolo(3' : 2'-1 : 2)-carbazole. *J. Chem. Soc.*, **1958**, 0, 1525-1529 .
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912-1934.
- Markwalder, J. A.; Arnone, M. R.; Benfield, P. A.; Boisclair, M.; Burton, C. R.; Chang, C.-H.; Cox, S. S.; Czerniak, P. M.; Dean, C. L.; Doleniak, D.; Grafstrom, R.; Harrison, B. A.; Kaltenbach, R. F.; Nugiel, D. A.; Rossi, K. A.; Sherk, S. R.; Sisk, L. M.; Stouten, P. Trainor, G. L.; Worland, P.; Seitz, S. P. Synthesis and biological evaluation of 1-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one inhibitors of cyclin-dependant kinases. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5894-5911.
- Masliah, E.; Cole, G. M.; Hansen, L. A.; Mallory, M.; Albright, T.; Terry, R. D.; Saitoh, T. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 2759.
- Meksuriyen, D.; Cordell, G. A. Biosynthesis of staurosporine , 2. Incorporation of tryptophan. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 893.
- Messaoudi S, Sancelme M, Polard-Housset V, Aboab B, Moreau P, Prudhomme M. Synthesis and biological evaluation of oxindoles and benzimidazolinones derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**; *39*:453.
- Meth-Cohn, O.; Narine, B.; Tarnowski, B., A versatile new synthesis of quinolines and related fused pyridines, Part 5. The synthesis of 2-chloroquinoline-3-carbaldehydes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, 1520.
- Miyachi H., Kiyota H. and Segawa M., Novel imidazole derivatives with subtype-selective antimuscarinic activity (2). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *18*, 2163.
- Mohan J., Kumar A., Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic systems: Facile synthesis and antimicrobial activity of imidazo [2, 1-b]-1, 3, 4-thiadiazoles. *Indian J. Heterocycl. Chem.*, **2002**, *12*, 41.
- Moldenhausser, W.; Simon, H. Transformation products of the Osazone cyclohexanedione series. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 1198.
- Moloi S., Maddila S., Jonnalagadda S. B., Microwave-irradiated one-pot synthesis of quinoline derivatives catalyzed by triethylamine. *Res Chem Intermed.* **2017**. *43*:6233–6243
- Moreau P., Anizon F., Giraud F., Esvan Y.J., Heteroaromatic Pim kinase inhibitors containing a pyrazole moiety. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **2016**, *11*(3), 309-321.

- Moody CJ, Rahimtoola KF. Synthesis of the staurosporine aglycone. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**; 1667-1668.
- Moody CJ, Rahimtoola KF, Porter B, Ross BC. Synthesis of the staurosporine aglycon. *J. Org. Chem.* **1992**; 2105-2114.
- Muruganatham, N.; Sivakumar, R.; Anbalagan, N.; Gunasekaran, V.; Leonard, J. T. Synthesis, Anticonvulsant and Antihypertensive Activities of 8-Substituted Quinoline Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27 (10), 1683–1687.

N

- Nadysev GY, Tikhomirov AS, Lin M-H, Yang Y-T, Dezhenkova LG, Chen H-Y, Kaluzhny DN, Schols D, Shtil AA, Shchekotikhin AE, Chueh PJ. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**; 143:1553.
- Nagaoka Y., Maeda T., Kawai ., Nakashima D., Oikawa T., Shimoke K., Ikeuchi T., Kuwajima H., Uesato S., Synthesis and cancer antiproliferative activity of new histone deacetylase inhibitors: hydrophilic hydroxamates and 2-aminobenzamide-containing derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2006, 41, 697-708.
- Nakano H, Omura S. Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. *J Antibiot.* **2009** ;62(1):17-26.
- Nemoto T, Ohashi K, Akashi T, Johnson JD, Hirokawa K. Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology.* **1997**; 65(4):195-203.
- Nevin, R. L. Idiosyncratic Quinoline Central Nervous System Toxicity: Historical Insights into the Chronic Neurological Sequelae of Mefloquine. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, 4 (2), 118–125.
- Niementowski, S. v., Synthesen der Chinolinderivate. *Chemische Berichte.* **1894**, 27(2): 1394–1403.
- Noble M. E., Endicott J. A., Johnson L. N., Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science.* **2004**. 303, 1800–1805
- Nolen B, Taylor S, Ghosh G . Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell.* **2004**, 15: 661–675.

O

- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R., A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot.* **1977**, 30 (4), 275-282.

- Omura S., Sasaki Y., Iwai Y., Takeshima H., Staurosporine, a Potentially Important Gift from a Microorganism. *J. Antibiot.*, **1995**, 48(7), 535-548

P

- Pagadala R., Maddila S., Jonnalagadda S. B., Ultrasonic-mediated catalyst-free rapid protocol for the multicomponent synthesis of dihydroquinoline derivatives in aqueous media. *Green Chem. Lett. Rev.* **2014**, 7, 131.

- Park, K.; Kwon, T. Environmentally Benign Synthesis of Symmetrically Substituted Oligoquinolines under Solvent-Free Microwave Irradiation. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2015**, 36, 180–182.

- Parkinson Study Group PRECEPT Investigators. *Neurology*. **2007** Oct 9; 69(15):1480-90.

- Patterson J. M., Sparrow J. T., Smith W. T., Synthesis of 3-Chloroquinolines from Indoles and Thermally Generated Dichlorocarbenes. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37 (11), pp 1849–1850.

- Pearce, C. P.; Doyle, T. W.;Forenza, S.; Lam, K. S.; Schroeder, D. R. The biosynthetic origins of rebeccamycin. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 937.

- Pedras M.S., Montaut S., Suchy M., Phytoalexins from the Crucifer Rutabaga : Structures, Syntheses, Biosyntheses, and Antifungal Activity. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4471-4476.

- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605.

- Pfitzinger W., Chinolinderivate aus Isatinsäure. *J. prakt. Chem.*, **1886**, 33, 100.

- Pimpalshende, D. M.; Dhoble, S. J. Synthesis and Characterization of Diphenyl Quinoline and Bromine-Activated Diphenyl Quinoline Organic Phosphors. *Luminescence* **2014**, 29 (5), 451–455.

- Povarov, L. S.; Mikhailov, B. M. *Izv. Akad. Nauk SSR, Ser. Khim.* **1963**, 953–956.

- Prudhomme M. Biological targets of antitumor indolocarbazoles bearing a sugar moiety. *Curr. Med. Chem - Anti-Cancer Agents.* **2004**; 4:509-521.

R

- Raadt A., Griengl H., Petsch M., *Tetrahedron: Asymmetry.* **1996**, 7, 473.

- Raimundo B. C., Oslob J. D., Braisted A. C., Hyde J., McDowell R. S., Randal M., Waal N. D., Wilkinson J., Yu C. H., Arkin M. R., Integrating Fragment Assembly and Biophysical Methods in the Chemical Advancement of Small-Molecule Antagonists of IL-2 : An Approach for Inhibiting Protein - Protein Interactions. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3111-3130.

- Raju P., Rajeshwaran G. G., Mohanakrishnan A. K., Synthetic studies on indolocarbazoles: A facile synthesis of staurosporinone analogues. *European J. Org. Chem.* **2015**, 2015 (32), 7131-7145.
- Renukadevi P., Biradar J. S., Hiremath S. P. and Manjunath S. Y., *Indian J. Heterocycl. Chem.*, **1997**, 6, 277.
- Ridley R.G., Hudson A. T., Quinoline antimalarials. *Exp. Opin. Ther. Patents.* **1998**, 8(2):121-136.
- Riehm P., Engler c., Ber., 18, 2245 (1885).
- Rodrigues-Pereira E, Belin L, Sancelme M, Prudhomme M, Ollier M, Rapp M., Servère D, Riou JF, Fabbro D and Meyer T, Structure-activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: Topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties. *J Med Chem.*, **1996**, 39, 4471–. 4477.
- Rokhlin OW, Taghiyev AF, Bayer KU, Bumcrot D, Koteliansk VE, Glover RA, Cohen MB. Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival. *Cancer Biol Ther.* **2007** May; 6(5):732-42.

S

- Sánchez, C.; Butovich, I. A.; Braña, A. F.; Rohr, J.; Méndez, C.; Salas, J. A. The Biosynthetic Gene Cluster for the Antitumor Rebeccamycin: Characterization and Generation of Indolocarbazole Derivatives. *Chem. Biol.* **2002**, 9, 519–531.
- Sánchez C, Salas AP, Braña AF, Palomino M, Pineda-Lucena A, Carbjo RJ, Méndez C, Moris F, Salas JA. *Chem. Commun.* **2009**; 4118.
- Sanchez-Martinez C., Shih C., Zhu G., Li T., Brooks H. B., Patel B. K. R., Schultz R. M., DeHahn T. B., Spencer C. D., Watkins S. A., Ogg C. A., Considine E., Dempsey J. A., Zhang F., Studies on cyclin-dependent kinase inhibitors: indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazoles versus bis-indolylmaleimides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3841-3846.
- Sato S., Shibuya M., Kanoh N. and Iwabuchi Y., Highly enantioselective intramolecular aza-spiroannulation onto indoles using chiral rhodium catalysis: asymmetric entry to the spiro-beta-lactam core of chartellines. *Chem. Commun.* **2009**, 41, 6264-6266.
- Saulnier, M. G.; Frennesson, D. B.; Deshpande, M. S.; Vyas, D. M. Synthesis of a rebeccamycin-related indolo[2,3-*a*]carbazole by palladium(0)catalyzed polyannulation. *Tetrahedron Lett.* **1996**. 43, 7841 - 7844.
- Savarino A., Lucia M. B., Heine R. T., Rastrelli E., Rutella S., Majori G., Huitema A., Boelaert J. R., Cauda R., Quinoline antimalarials as investigational drugs for HIV-1/AIDS: in

vitro effects on HIV-1 replication, HIV-1 response to antiretroviral drugs, and intracellular antiretroviral drug concentrations, *Drug development research*, **2006**, 67, 10, 806-817.

- Schramm HJ, de Rosny E, Reboud-Ravaux M, Buttner J, Dick A, Schramm W, *Biol. Chem.* **1999**, 380, 593-6.

- Scott R. *Rec. Trav. Chim.* **1956**; 75:787.

- Sharpe T. R., Cherkovsky S. C., Hewes W. E., *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 1188.

- Shealy Y. E., Montgomery J. A. and Loster W. R., *J. Biochem. Pharmacol.*, **1962**, 11, 674.

- shri M., Reenakalsi, Renusah, Dixit K. S., Nath C and Barthwal J P, *Indian J. Chem.*, **1990**, 29B, 85.

- Singh I. and Kumar A., Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Quinoline Derivatives. *Int J Pharm Sci Res.* **2016**; 7(6): 2563-67

- Sircar I., Duell B. L., Bristol A., Weishaar R. E. and Evans D. B., *J. Med. Chem.*, **1987**, 30, 1023.

- Skraup Z. H., Eine Synthese des Chinolins. *Ber.*, **1880**, 13, 2086.

- Skrypek J, Krause W. Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment. *Andrologia.* **2007**; 39 : 198–199.

- Speck K., Magauer T., The Chemistry of Isoindole Natural Products. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2048–2078.

- Steglich, W. Slime moulds (Myxomycetes) as a source of new biologically active metabolites. *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61 (3), 281-288.

- Suchaud V., Gavara L., Saugues E., Nauton L., Théry V., Anizon F., Moreau P.. Identification of 1,6-dihydropyrazolo[4,3-*c*]carbazoles and 3,6-dihydropyrazolo[3,4-*c*]carbazoles as new Pim kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 4102-4111.

T

- Tamaoki T., Nomoto H., Takahashi I., Kato Y., Morimoto M. & Tomita F., Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 135: 397-402.

- Taylor SS, Kornev AP . Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* **2011**, 36: 65–77.

- Terpko M. O., Heck R. F., Rearrangement in the palladium-catalyzed cyclization of alpha-substituted N-acryloyl-o-bromoanilines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101 (18), 5281–5283.

- Toker A. The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol.* **1998** Apr;10(2):254-61.

U

- Ubersax J. A., Ferrell J. E. Jr., Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8 (7), 530-541.

V

- Venkanna, P.; Rajanna, K. C.; Satish Kumar, M.; Bismillah Ansari, M.; Moazzam Ali, M. 2,4,6-Trichloro-1,3,5-Triazine and *N,N'*-Dimethylformamide as an Effective Vilsmeier–Haack Reagent for the Synthesis of 2-Chloro-3-Formylquinolines from Acetanilides. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56 (37), 5164–5167.

W

- Wagey RT, Krieger C. Abnormalities of protein kinases in neurodegenerative diseases. *Prog Drug Res.* **1998**; 51:133-83.

- Wall M.E., Wani M.C., Cook C.E., Palmer K.H., McPhail A.I., Sim G.A., Plant antitumor agents. I. the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**. 88, 3888-3890.

- Walther. *Ber.*, **1908**, 41, 87-90.

- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr . Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2005**, 44: 7342–7372.

- Wang X, Sun SY. Enhancing mTOR-targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* **2009**. 13: 1193–1203.

- Wei C.X. , Deng X.Q., Chai K.Y., Sun Z.G., Quan Z.S., Synthesis and anticonvulsant activity of 1-formamide-triazolo[4,3-a]quinoline derivatives. *Arch Pharm Res.* **2010** May;33(5):655-62.

- Weirauch U, Beckmann N, Thomas M, Grünweller A, Huber K, Bracher F, Hartmann RK, Aigner A. *Neoplasia* **2013**; 15:783.

- Wood , J. L. ; Stoltz , B. M. Design and implementation of an efficient synthetic approach to furanosylated indolocarbazoles: Total synthesis of (+)- and (-)-K252a . *J. Am. Chem. Soc.* **1997** , 119 ,9641 – 9651 .

- Woodward RB, Doering WE. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 849.

- Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *TiPS.* **2015**; 36 : 422-39.

- Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov Today.* **2016** Jan; 21(1):5-10.

Y

- Yamashita Y., Fujii N., Murakata C., Ashizawa T., Okabe M., Nakano H., Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. *Biochemistry*. **1992**, 31, 12069–12075.
- Yamauchi T. Neuronal Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II—Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory. *Biol Pharm Bull*. **2005**; 28(8): 1342-54.
- Yang JC. A selective ALK inhibitor in ALK-rearranged patients. *Lancet Oncol*. **2013**. 14: 564–565.
- Yang, S.W., Cordell G. A., Biosynthesis of Staurosporine: Incorporation of Glucose. *J. Nat. Prod*. **1996**, 59, 828-833.
- Yang, X.; Xue, L.; Luo, J. Preparation method of dihydroindene amide compounds their pharmaceutical compositions containing compounds thereof and use as protein kinases inhibitor. EP2385035A1 (**2010**).
- Yang XH, Hand RA, Livasy CA, Cance WG, Craven RJ. Overexpression of the receptor tyrosine kinase Tie-1 intracellular domain in breast cancer. *Tumour Biol*. **2003** Mar-Apr; 24(2):61-9.

Z

- Zajdel P., Marciniec K., Maslankiewicz A., Grychowska K., Satala G., Duszyńska B., Lenda T., Siwek A., Nowak G., Partyka A., Wróbel D., Wiesek M. J., Bojarski A. J., Wesolowska A., Pawlowski M., Antidepressant and antipsychotic activity of new quinoline- and isoquinolinesulfonamide analogs of aripiprazole targeting serotonin 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and dopamine D₂/D₃ receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, 60, 42-50.
- Zhang WW, Cortes JE, Yao H, Zhang L, Reddy NG, Jabbour E, Kantarjian HM, Jones D. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J Clin Oncol*. **2009**; 27(22):3642-9.
- Zhang, Z.; Shi, Y.; Pan, Y.; Cheng, X.; Zhang, L.; Chen, J.; Li, M.-J.; Yi, C. Quinoline Derivative-Functionalized Carbon Dots as a Fluorescent Nanosensor for Sensing and Intracellular Imaging of Zn^{2+} . *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2 (31), 5020.
- Zhao Z, Xie L, Xie L, Bourne PE. Delineation of Polypharmacology across the Human Structural Kinome Using a Functional Site Interaction Fingerprint Approach. *J Med Chem*. **2016** May 12; 59(9):4326-41.

- Zhou H, Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010; 11: 409–424.
- Zhou L., Sujiang Tu, Daqin Shi and Guiyuan Dai,. Facile and Efficient Synthesis of 2-Aminoquinoline-3-carboxylic Acid Derivatives via Reductive Cyclization of Nitro and Cyano Groups Induced by Low-valent Titanium. *J. Chem. Research (S)*, **1998**, 398.
- Zhou X. F., Sun Y. Y., Dai J. J., Xu J., Xu H. J., Photoinduced synthesis of quinoline derivatives catalyzed by organic photocatalyst at room temperature. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* **2018**, 355, 186-193.
- Zuccotto F., Ardini E., Casale E., Angiolini M., Through the ‘gatekeeper door’: exploiting the active kinase conformation. *J Med Chem.* **2010**; 53: 2681–2694.

Annexe



Synthesis and antiproliferative evaluation of glucosylated pyrazole analogs of K252c

Bachir Douara^{a, b, 1}, Yannick J. Esvan^{a, 1}, Elisabeth Pereira^a, Francis Giraud^a, Yulia L. Volodina^c, Dmitry N. Kaluzhny^d, Alexander A. Shtil^{c, e}, Fabrice Anizon^{a, **}, Pascale Moreau^{a, *}

^a Université Clermont Auvergne, CNRS, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^b Laboratoire de Phytochimie et de Pharmacologie, Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes et Informatique, Université Mohamed Seddik Ben Yahia, 18000 Jijel, Algeria

^c Blokhin National Medical Center of Oncology, 115478 Moscow, Russian Federation

^d Engelhardt Institute of Molecular Biology, 119991 Moscow, Russian Federation

^e ITMO University, 197101 Saint-Petersburg, Russian Federation

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2017

Received in revised form

8 January 2018

Accepted 9 January 2018

Available online 11 January 2018

Keywords:

Indolocarbazole

K252c analogs

Glucosylated derivatives

Antiproliferative activity

ABSTRACT

Pyrazole analogs of the staurosporine aglycon K252c were recently described as potent inhibitors of the three Pim protein kinase isoforms. To evaluate the impact of the introduction of a sugar moiety on the biological activities of this heterocyclic scaffold, four new glucosylated pyrazole analogs of K252c were synthesized. Their biological evaluation demonstrated that most active compounds **11** and **19** substituted by a β -D-glucosyl moiety at N12 or N13 positions exhibited antiproliferative activities toward HCT116 cells.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A wide range of natural or synthetic indolocarbazole derivatives demonstrated important biological activities such as antibiotic and antitumor properties.¹ Staurosporine (Fig. 1A) was the first indolocarbazole to be isolated in 1977 from *Streptomyces staurosporeus*.² It was found to be a highly potent, broad spectrum protein kinase inhibitor,³ and is now frequently used as a positive control research tool. However, due to this large range of protein kinase inhibition, staurosporine is far too toxic to be used as a drug. Therefore numerous structure-activity relationship studies including the modification of the heteroaromatic part and/or the sugar moiety were undertaken to improve the inhibitory/pharmacological profile of new staurosporine analogs. This approach was successful for

Midostaurin (PKC412, Fig. 1A) which is a multi-targeting protein kinase inhibitor that recently reached the market for treatment of acute myeloid leukemia with FLT3 mutation in combination with other antitumor drugs. Midostaurin (RYDAPT[®]) was also approved for treatment of aggressive systemic mastocytosis, systemic mastocytosis with associated hematological neoplasm, or mast cell leukemia.⁴

As part of our research program dedicated to the discovery of new heteroaromatic derivatives with biological potential, we recently reported the synthesis and activities of pyrazol(on)e analogs of the staurosporine aglycon K252c (Fig. 1A).⁵ The most active compound in that series was **A** (Fig. 1B) that inhibited the three Pim (proviral integration site for Moloney murine leukemia virus) protein kinase isoforms in the submicromolar range; IC₅₀ values were 0.15 μ M, 0.59 μ M and 22 nM for Pim-1, Pim-2 and Pim-3, respectively. Whereas protein kinase C family enzymes (PKCs) are known targets of K252c, these results demonstrated that the modification of the upper ring changed the kinase inhibition profile leading to a Pim inhibitor without activity toward PKCs.⁶ As Pim kinases are involved in cell cycle progression and apoptosis

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: fabrice.anizon@uca.fr (F. Anizon), pascale.moreau@uca.fr (P. Moreau).

¹ Both authors (BD, YJE) equally contributed to this work.

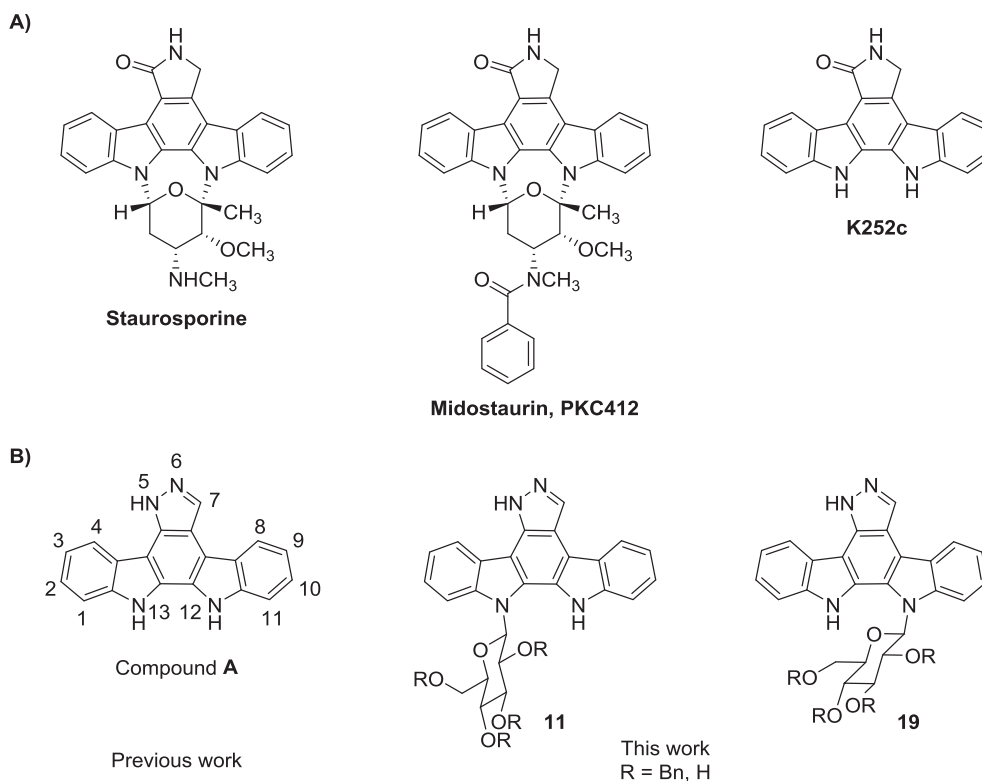


Fig. 1. A) Chemical structures of staurosporine, midostaurin and K252c. B) Previous work and this work.

inhibition⁷ and are activated in human cancers such as acute myeloid leukemia and colon carcinoma,^{8,9} the antiproliferative activity of compound **A** was evaluated toward leukemia K562 and colon carcinoma HCT116 cell lines. Micromolar potencies were determined for both cell lines. The comparison of K252c (K562 IC_{50} = 7.8 μ M, HCT116 IC_{50} = 1.72 μ M) and staurosporine (K562 IC_{50} = 0.071 μ M, HCT116 IC_{50} = 0.006 μ M) demonstrated that the presence of a sugar moiety enhanced the potency by > 100- to 250-fold^{10–13} due to a better cellular penetration and kinase inhibition. The nature of the sugar residue introduced on the heteroaromatic aglycon of staurosporin analogs affects considerably the related biological activities.¹⁴ Numerous studies reported the preparation of new glycosylated analogs of indolocarbazoles either by chemical synthesis (e.g. aza-analogs of staurosporin)¹⁵ or by combinatorial biosynthesis.¹⁶ To start this study, in order to improve the cellular potencies of compound **A**, we prepared glycosylated analogs bearing a β -D-glucosyl unit on the 12- or 13-position of the indolocarbazole moiety (Fig. 1B). Four new synthesized compounds, with sugar hydroxyl groups protected or not, were evaluated in regard to their antiproliferative activity.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

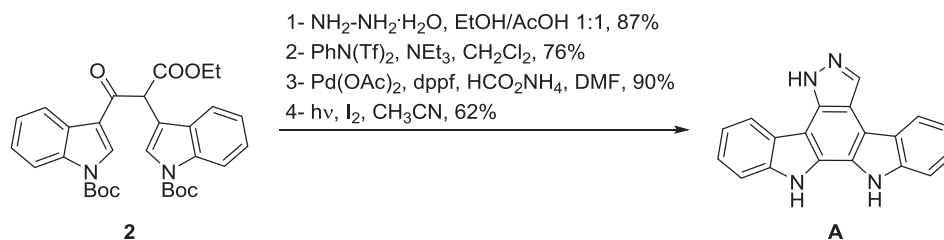
As reported for the synthesis of compound **A** (Scheme 1), a pyrazolone moiety was first synthesized from racemic ketoester **2** in the presence of hydrazine and acetic acid, with concomitant cleavage of the Boc protecting groups.⁵ The pyrazole nucleus was then obtained in two steps (triflation and reduction) before a photo-induced cyclization/oxidation in the presence of iodine to give compound **A**.

The ketoester **2** was prepared from carboxylic acid **3** and ester **4** (Scheme 2). In order to prepare the two regioisomeric glycosylated

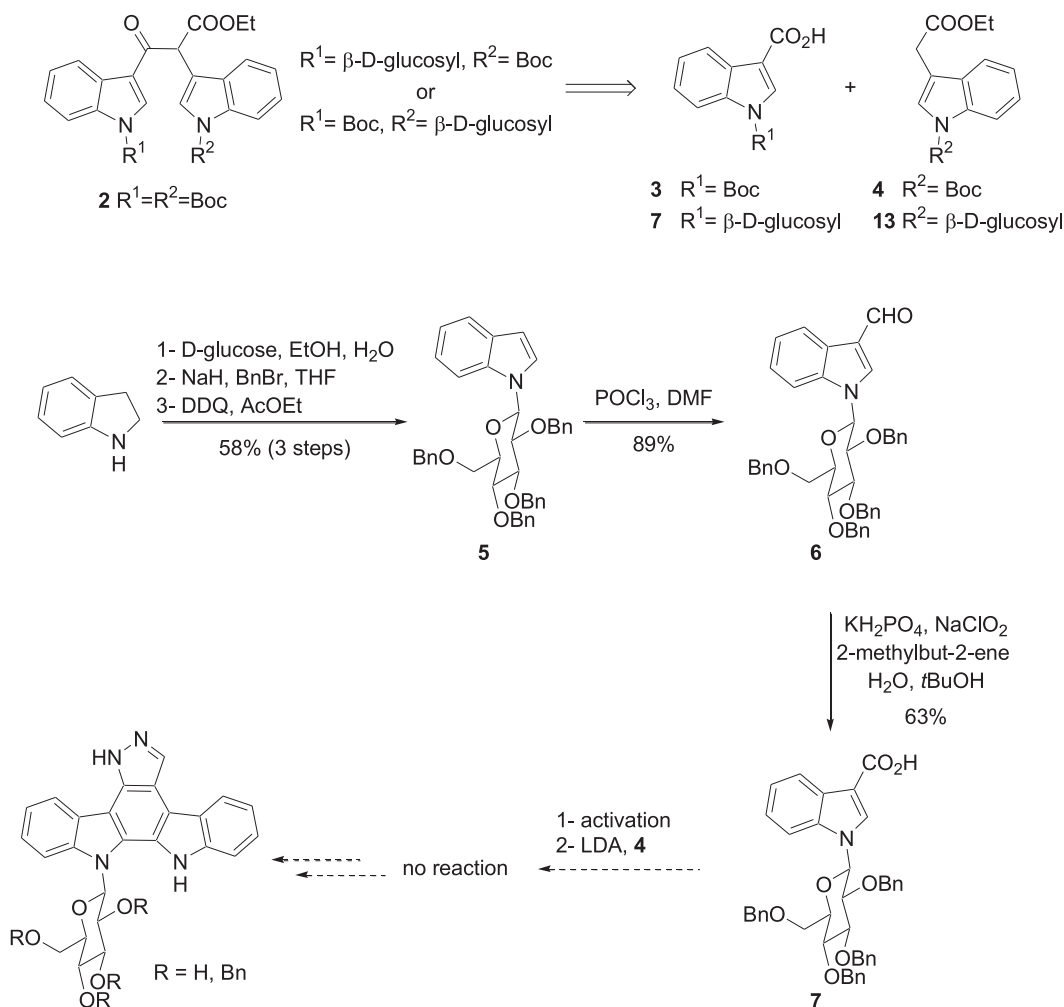
analogs of compound **A**, we firstly foresaw that this coupling reaction could also be performed from glucosylated analogs of **3** or **4** (compounds **7** and **13**, respectively, Scheme 2). Therefore, for the first regioisomer, we prepared compound **7** in two steps from benzylated β -D-glucopyranosyl-1H-indole **5**, whose synthesis was also optimized based on our previously described procedure.¹⁷ Unfortunately, the activated carboxylic acid prepared from **7** by reaction with oxalyl chloride or the corresponding methyl ester showed no reactivity with the enolate prepared from ester **4**.

Therefore another synthetic pathway was examined. Initially, for the synthesis of compound **A** from **2** and during our attempts to carry out the pyrazolone formation with hydrazine, we applied a method reported by Braña et al. using hydrazine hydrate in the presence of camphoric acid.¹⁸ Under these conditions pyrazolone was not formed but the cleavage of a single Boc protecting group was achieved leading to ketoester **8** (Scheme 3). The structure of **8** was confirmed by 2D NMR experiments, showing that the deprotected indole was the one attached at the C3 position to the ketone function. This mono-deprotection was an opportunity to perform a regioselective glycosylation. Accordingly, the NH being more acidic due to the presence of the carbonyl group at the C3 position, a Mitsunobu reaction could be performed between **8** and 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glucopyranose to obtain a mixture of two diastereoisomers. Then, as for compound **A**, the pyrazole derivative **9** was synthesized after pyrazolone formation in the presence of hydrazine and acetic acid, then triflation and reduction to pyrazole in two steps. The indolocarbazole was then obtained after photo-induced cyclization/oxidation in the presence of iodine, leading to compound **10** in 60% yield. Finally, debenzylation using boron tribromide was achieved in 76% yield to produce glycosylated indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole **11**.

For the synthesis of the regioisomer **19** glucosylated at N12 position, we used a similar strategy as in Scheme 2: glycosylated indole-3-acetate **13** was first prepared in two steps from compound



Scheme 1. Synthesis of compound A.



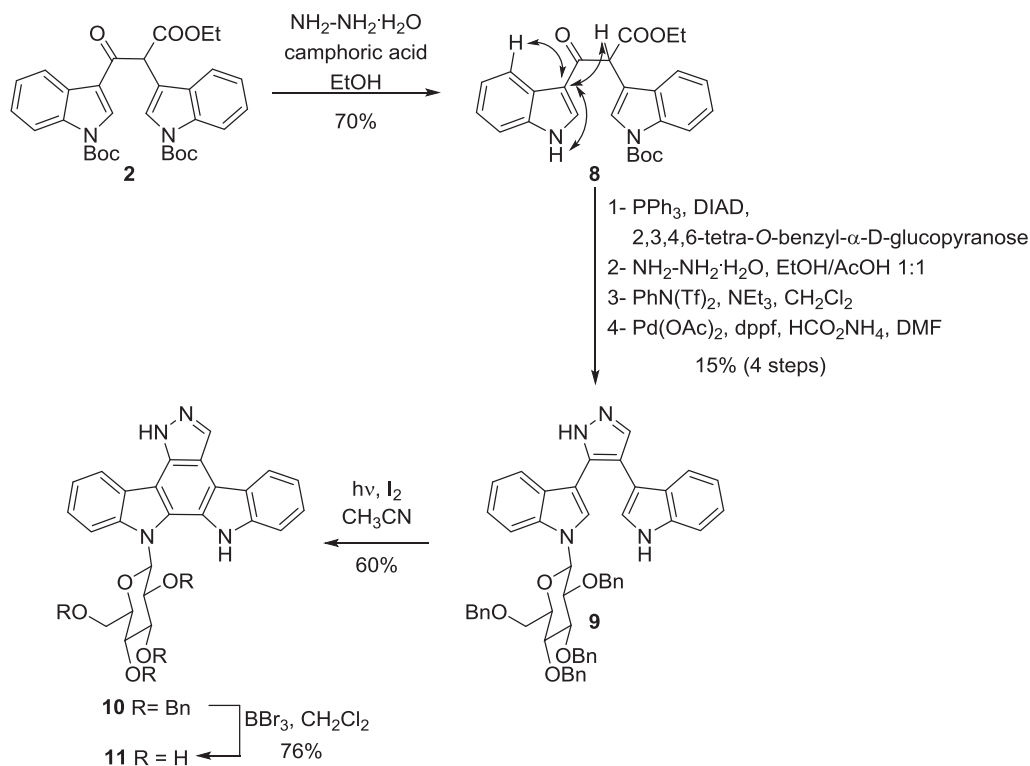
Scheme 2. First synthetic pathway to prepare glucosylated derivatives.

5 (Scheme 4). First, the ethyl oxoacetate **12** was synthesized in 83% yield before reduction with triethylsilane to give compound **13** in 43% yield. The lithium enolate of this ester was prepared and reacted with activated carboxylic acid synthesized from **3** to give ketoester **14** as a mixture of diastereoisomers. Pyrazole formation was then performed from keto-ester **14** as presented above. However, with the conditions used for the pyrazolone/pyrazole formation, the Boc protecting group was only partially cleaved. This led to a mixture of major Boc-protected and minor Boc-deprotected products (compounds **15a** and **15b**) that were separated before the palladium-catalyzed reduction of the triflate intermediates. The major product **15a** led to pyrazole **16** after reduction, and an additional Boc-deprotection step with $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ yielded compound **17**. Compound **17** can also be prepared from the minor Boc-deprotected triflate intermediate **15b**. To summarize, pyrazole

17 was obtained in 42% yield from starting material **13**. Finally, **17** was cyclized and then deprotected as described above for **9**, to give compound **19**.

2.2. Biological evaluations

Firstly, we evaluated the antiproliferative activities of compounds **10**, **11**, **18** and **19** toward HCT116 human colon carcinoma cell line. As indicated in Table 1, only compounds **11** and **19** bearing a deprotected $\beta\text{-D-glucosyl}$ moiety at N13 or N12 positions were found to be active with similar IC_{50} values of 12 μM and 11 μM , respectively. Compounds **10** and **18** bearing a benzylated sugar moiety were inactive with IC_{50} values $> 50 \mu\text{M}$, probably due to a too high lipophilicity and a poor cellular penetration ($\text{cLogP} > 5$). These results demonstrated that in this pyrazole series, the



Scheme 3. Synthesis of compounds **10** and **11**. For compound **8**, arrows indicate long range ¹H-¹³C coupling observed in 2D NMR HMBC experiment.

introduction of a β -D-glucosyl moiety on the heteroaromatic moiety did not enhance the antiproliferative potency.

Then we evaluated the activity of compounds **10**, **11**, **18** and **19** toward known cellular targets of indolocarbazoles (Pim-1, PKC α , DNA binding). Compared to the non-glycosylated analogue **A** (Fig. 1)⁵ we observed a significant decrease of activity toward Pim-1 indicating that the glycosylation was detrimental to Pim-1 inhibition. None of the compounds tested exhibited significant activities toward the targets evaluated. Therefore, the antiproliferative activity of compounds **11** and **19** is associated with the modulation of other cellular targets that have not been identified yet.

3. Conclusion

In our efforts to design original aza-heterocyclic compounds with antitumor properties, we synthesized new glucosylated pyrazole analogs of K252c. Most active compounds **11** and **19** were substituted by a deprotected glucosyl moiety at N12 or N13 positions. Compared to non-glycosylated analogue **A**, these compounds exhibited similar antiproliferative activities toward HCT116 cells with IC₅₀ values around 10 μ M. Altogether, these results indicated that the antiproliferative activities of these compounds are not correlated to the inhibition of Pim-1 and PKC α kinases or DNA binding. The synthesis of new analogs and the identification of the cellular targets involved in the antiproliferative activities of this series are currently under progress.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General

Starting materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. IR spectra were recorded on

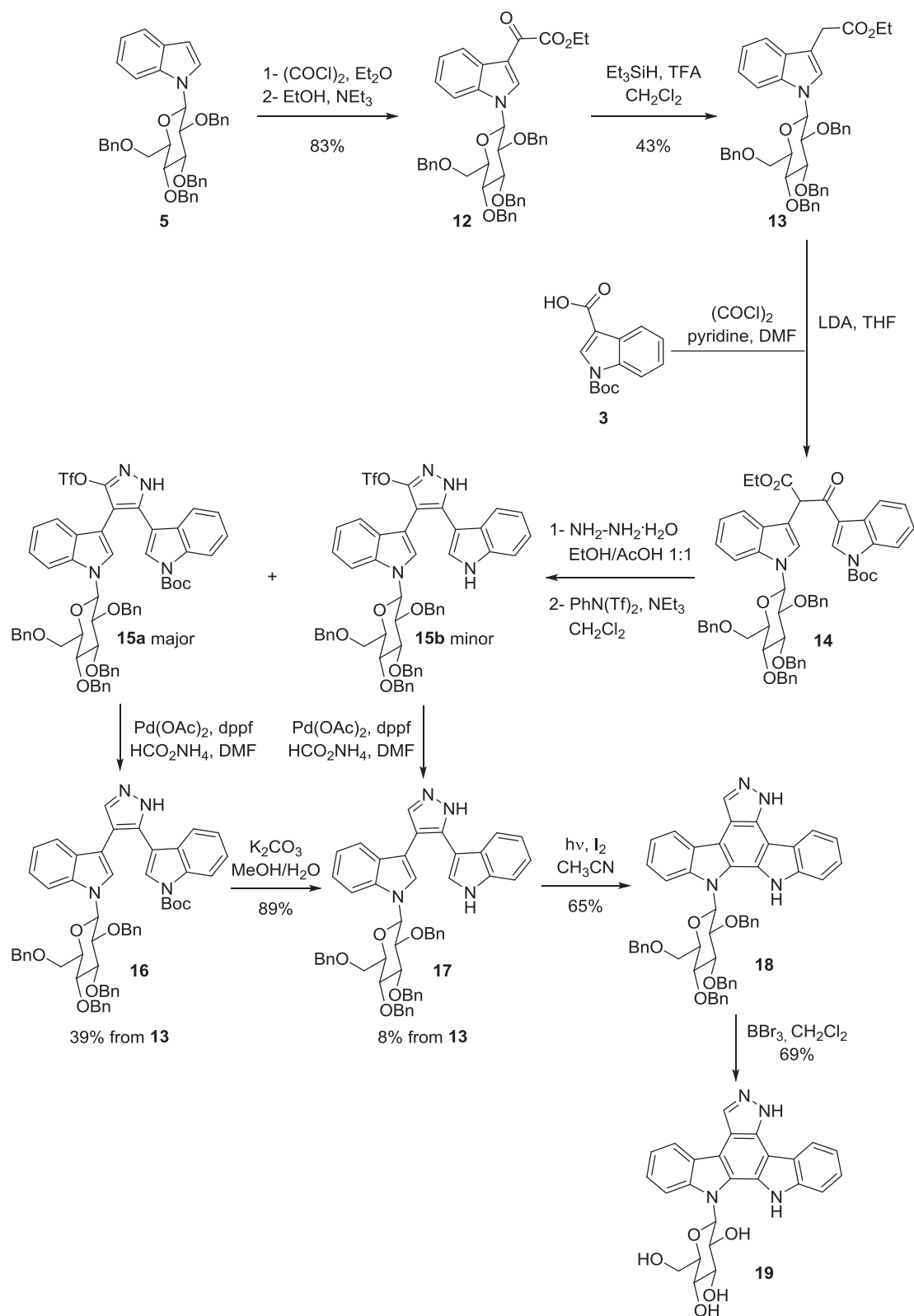
a Perkin-Elmer Spectrum 65 FT-IR spectrometer ($\bar{\nu}$ in cm⁻¹). NMR spectra, performed on a Bruker AVANCE 400 III HD (¹H: 400 MHz, ¹³C: 101 MHz), or a Bruker AVANCE III HD 500 (¹H: 500 MHz, ¹³C: 126 MHz), are reported in ppm using the solvent residual peak as an internal standard; the following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), doublet of doublets (dd), doublet of doublet of doublets (ddd), multiplet (m), broad signal (br s). High resolution mass spectra were determined on a high-resolution Waters Micro Q-ToF or Thermo Scientific Q Exactive Q-Orbitrap apparatus (UCA START, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France). Chromatographic purifications were performed by column chromatography using 40–63 μ m silica gel. Reactions were monitored by TLC using fluorescent silica gel plates (60 F254 from Merck). Melting points were measured on a Stuart SMP3 apparatus and are uncorrected.

4.1.2. 1-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (**5**)

Step 1. D-Glucose (7.05 g, 39 mmol) was added to a solution of indoline (9.4 mL, 84 mmol) in ethanol (200 mL) and water (10 mL). The mixture was refluxed for 24 h and the solvents were evaporated to give a brown oil (16.85 g). TLC R_f = 0.33 (EtOAc/MeOH 9:1).

Step 2. A solution of intermediate from step 1 (5 g) in anhydrous THF (120 mL) was cooled to 0 °C and NaH (60% dispersion in mineral oil, 5.52 g, 138 mmol) and then benzyl bromide (16.2 mL, 136 mmol) were added. The solution was refluxed for 17 h and the solvent was evaporated. EtOAc (250 mL) was added and the mixture was washed with water and dried over MgSO₄. TLC R_f = 0.26 (cyclohexane/EtOAc 9:1). The solution was directly used for step 3.

To characterize the indoline intermediate, a part of the crude from step 2 was also purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc) to give 1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-2,3-dihydro-1H-indole as a beige solid. mp 119 °C;



Scheme 4. Synthesis of compounds 18 and 19.

IR (ATR): 1606, 1491, 1454 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.83–3.01 (2H, m), 3.44–3.65 (5H, m), 3.66–3.72 (1H, m), 3.74 (1H, t, $J = 9$ Hz), 3.82 (1H, t, $J = 9$ Hz), 4.40 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4.47 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4.56 (1H, d, $J = 11$ Hz), 4.73–4.89 (5H, m), 5.07

(1H, d, $J = 9$ Hz), 6.66 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 6.77 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.02 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 7$ Hz), 7.17–7.34 (20H, m); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 27.7, 46.0, 68.6, 72.1, 73.1, 74.0, 74.6 (CH_2), 75.4, 78.0, 78.5, 84.4, 85.3 (CH), 108.1, 118.3, 124.5, 127.0, 127.339,

Table 1

cLogP calculated with Osiris DataWarrior.^{19,20} Antiproliferative activities of compounds **A**, **10**, **11**, **18** and **19**. Kinase inhibitory potencies are expressed as % of residual kinase activity at 10 μM compound concentration. DNA binding constants (K_b) determined by fluorescent titration.

Cpds	cLogP	HCT116 cell line (IC_{50} , μM)	% residual activity ($\pm\text{SD}$)		DNA K_b , 10^4 M^{-1}
			Pim-1	PKC α	
A	3.58	4.2	2 \pm 0	108 \pm 3	$\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}^5$
10	9.06	>50	118 \pm 5	118 \pm 3	4.6 \pm 0.4
11	1.68	12	101 \pm 2	70 \pm 2	1.92 \pm 0.03
18	9.06	>50	95 \pm 33	95 \pm 9	2.35 \pm 0.05
19	1.68	11	86 \pm 5	117 \pm 32	2.12 \pm 0.04

127.344, 127.41, 127.47, 127.49, 127.54, 127.6, 127.7, 128.08, 128.14, 128.20, 128.22 (CH_{arom}), 129.8, 138.2 (2C), 138.61, 138.64, 150.4 (C_{arom}); HRMS (ESI⁺) calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{NO}_5$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 642.3214, found 642.3217.

Step 3. DDQ (6 g, 26.4 mmol) was added by portions to the EtOAc solution from step 2. After addition, the mixture was stirred at room temperature for 45 min, washed with a 10% aqueous Na_2SO_3 solution and dried over MgSO_4 . After evaporation, the residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 9:1) to give **5** as a brown gum (4.33 g, 6.77 mmol, 58%). TLC $R_f = 0.21$ (cyclohexane/EtOAc 9:1). The ^1H NMR spectra of the product corresponds to that of 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1*H*-indole reported in the literature.¹⁷

4.1.3. 1-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1*H*-indole-3-carbaldehyde (**6**)

POCl_3 (0.43 mL, 4.6 mmol) was slowly added to anhydrous DMF (1.5 mL) at 0 °C under argon atmosphere. The solution was stirred at 0 °C for 40 min and a solution of **5** (2.66 g, 4.16 mmol) in DMF (1 mL) was added at 0 °C and stirred for 1 h and at 35 °C for an additional hour. Ice and an aqueous NaOH solution (1.85 g in 5 mL H_2O) were added. The mixture was heated at 100 °C for 30 min. After cooling and extraction with EtOAc, the combined organic phases were washed with water, brine and dried over MgSO_4 . The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 8:2) to give **6** (2.47 g, 3.7 mmol, 89%) as a beige gum. TLC $R_f = 0.47$ (cyclohexane/EtOAc 7:3); IR (ATR): 1662, 1535, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.67–3.74 (2H, m), 3.77 (1H, d, $J = 11$ Hz), 3.80 (1H, t, $J = 9.5$ Hz), 3.94–3.99 (1H, m), 3.95 (1H, t, $J = 9$ Hz), 4.14 (1H, t, $J = 9$ Hz), 4.36 (1H, d, $J = 11$ Hz), 4.47 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4.52 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4.63 (1H, d, $J = 11$ Hz), 4.81 (1H, d, $J = 11$ Hz), 4.86 (2H, s), 5.93 (1H, d, $J = 9$ Hz), 6.67 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.04 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.12 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.21–7.36 (17H, m), 7.78–7.84 (1H, m), 8.13–8.20 (1H, m), 8.56 (1H, s), 9.97 (1H, s); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 68.5, 72.3, 73.7, 74.2, 74.6 (CH_2), 76.5, 77.5, 80.0, 84.0, 84.5 (CH), 112.1, 121.2, 123.1, 124.0, 127.47, 127.54, 127.56, 127.59, 127.62, 127.65, 127.67, 127.8, 127.9, 128.23, 128.26, 128.28, 138.7 (CH_{arom}), 118.5, 124.6, 136.9, 137.1, 138.0, 138.1, 138.4 (C_{arom}), 185.3 (C=O); HRMS (ESI⁺) calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{NO}_6$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 668.3007, found 668.3010.

4.1.4. 1-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxylic acid (**7**)

A solution of KH_2PO_4 (3.76 g, 27.6 mmol) and NaClO_2 (80% unstabilized, 4.16 g, 36.8 mmol) in H_2O (15 mL) was added to a solution of **6** (2.46 g, 3.68 mmol) in *t*-butanol (20 mL) and 2-methylbut-2-ene (8 mL). The mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. The two layers were separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over MgSO_4 and evaporated. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 8:2) to give **7** (1.58 g, 2.31 mmol, 63%) as a beige solid. TLC $R_f = 0.48$ (cyclohexane/EtOAc 6:4); mp 70 °C; IR (ATR): 1662, 1537,

1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.65 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 3.68–3.74 (2H, m), 3.80 (1H, t, $J = 9.5$ Hz), 3.89–3.94 (1H, m), 3.91 (1H, t, $J = 9$ Hz), 4.16 (1H, d, $J = 9$ Hz), 4.30 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 4.47 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4.53 (1H, d, $J = 12$ Hz), 4.62 (1H, d, $J = 11$ Hz), 4.81 (1H, d, $J = 11$ Hz), 4.85 (2H, s), 5.88 (1H, d, $J = 9$ Hz), 6.68 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.06 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.10–7.15 (1H, m), 7.21–7.36 (17H, m), 7.76–7.81 (1H, m), 8.09–8.14 (1H, m), 8.30 (1H, s), 12.24 (1H, br s); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 68.6, 72.3, 73.6, 74.2, 74.5 (CH_2), 76.6, 77.4, 80.0, 84.1, 84.5 (CH), 112.0, 121.1, 122.0, 122.8, 127.46, 127.51, 127.56, 127.59, 127.64, 127.7, 127.8, 127.9, 128.23, 128.24, 128.3, 133.0 (CH_{arom}), 108.4, 126.5, 136.3, 137.2, 138.09, 138.11, 138.5 (C_{arom}), 165.5 (C=O), between 127.4 and 128.3 ppm, one benzylic CH_{arom} peak could not be observed; HRMS (ESI[−]) calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{40}\text{NO}_7$ ($\text{M}-\text{H}$)[−] 682.2799, found 682.2808.

4.1.5. *tert*-Butyl 3-(1-ethoxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-1,3-dioxopropan-2-yl)-1*H*-indole-1-carboxylate (**8**)

To a solution of compound **2** (330 mg, 0.6 mmol) and camphoric acid (120 mg, 0.6 mmol) in EtOH (6 mL) was added hydrazine monohydrate (30 μL , 0.6 mmol). After stirring for 2 h at room temperature, hydrazine monohydrate (0.3 mL) was additionally added and the mixture was stirred at reflux for 1 h. After concentration under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc, the solution was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution, brine, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 8:2) yielding compound **8** (188 mg, 0.42 mmol, 70%) as a yellowish foam. TLC $R_f = 0.3$ (cyclohexane/EtOAc 7:3); mp 179 °C; IR (ATR): 3193, 1740, 1724, 1619, 1147 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.17 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.62 (9H, s), 4.09–4.23 (2H, m), 6.11 (1H, s), 7.16–7.25 (3H, m), 7.30 (1H, ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, $J_3 = 1.4$ Hz), 7.44–7.50 (1H, m), 7.81 (1H, s), 7.82 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 8.14–8.17 (1H, m), 8.63 (1H, s), 12.11 (1H, br s); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 14.0, 27.7 (CH_3), 61.0 (CH_2), 52.0 (CH), 84.0 (C), 112.3, 114.6, 120.8, 121.3, 122.2, 122.5, 123.3, 124.4, 125.3, 135.5 (CH_{arom}), 114.9, 115.0, 125.6, 129.3, 134.6, 136.7 (C_{arom}), 148.9, 168.8, 187.6 (C=O); HRMS (ESI⁺) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 447.1915, found 447.1924.

4.1.6. 3-(4-(1*H*-Indol-3-yl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- β -D-glucopyranos-1-yl)-1*H*-indole (**9**)

Step 1. Diisopropyl azodicarboxylate (738 μL , 3.75 mmol) was added dropwise to a cooled solution (−78 °C) of **8** (405 mg, 0.91 mmol), triphenylphosphine (1.0 g, 3.81 mmol) and 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranose (2.02 g, 3.74 mmol) in THF (25 mL). The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 18 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was chromatographed on silica gel (gradient from pure cyclohexane to EtOAc/cyclohexane 1:9) yielding β -glucosylated product diastereoisomers (530 mg, TLC $R_f = 0.55$ (EtOAc/cyclohexane 2:8)) as a colorless oil. The crude product was used in the next step without further purifications.

Step 2. In a sealed reaction tube, a solution of the glucosylated

intermediate from step 1 (574 mg) and hydrazine monohydrate (1.34 mL, 27.6 mmol) in a 1:1 v/v EtOH/AcOH mixture (6 mL) was heated at 110 °C (oil bath) for 24 h. After cooling, water was added and the mixture was extracted with EtOAc, the assembled organic phases were washed with water, brine, and dried over MgSO₄. After evaporation, brown oil was obtained which was dissolved in a minimum of acetone before precipitation by addition of cyclohexane. After evaporation under reduced pressure, the pyrazolone intermediate (523 mg) was obtained as a beige gum used without further purifications.

Step 3. To a solution of the pyrazolone intermediate from step 2 (517 mg) and PhNTf₂ (355 mg, 0.99 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL), at 0 °C under argon, was added NEt₃ (0.9 mL, 6.5 mmol) and the mixture was allowed to reach room temperature. After 1 h of stirring, solvent was evaporated under reduced pressure. EtOAc was added and the mixture was washed with water, brine and dried over MgSO₄. After evaporation, the residue was chromatographed on silica gel (EtOAc/cyclohexane 5:95) yielding the triflate intermediate (380 mg, TLC R_f = 0.39 EtOAc/cyclohexane 2:8, HRMS (ESI⁺) calcd for C₅₄H₄₈F₃N₄O₈S (M + H)⁺ 969.3139, found 969.3139) as a pale yellow oil.

Step 4. In a sealed reaction tube, a mixture of pyrazolyl triflate from step 3 (380 mg), Pd(OAc)₂ (22 mg, 0.098 mmol), dppf (54 mg, 0.098 mmol) and HCO₂NH₄ (249 mg, 3.95 mmol) in DMF (14 mL) was heated at 90 °C for 2 h. After cooling, EtOAc was added and the mixture was filtered through a Celite[®] pad. The filtrate was washed with water, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 7:3) yielding compound **9** (122 mg, 0.148 mol, 15% from **8**) as a colorless oil. TLC R_f = 0.3 (EtOAc/cyclohexane 4:6); IR (ATR): 3418, 1455, 1361, 1068 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 3.47 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.62–3.80 (6H, m), 4.10 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.45 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.50 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.61 (1H, d, J = 10.9 Hz), 4.79–4.85 (3H, m), 5.48 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.62–6.65 (2H, m), 6.88 (1H, ddd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 1.0 Hz), 7.00–7.13 (6H, m), 7.19 (1H, ddd, J₁ = 8.3 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 1.1 Hz), 7.22–7.34 (15H, m), 7.39 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.41 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.43 (1H, s), 7.57 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.74 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.80 (1H, br s), 9.19 (1H, br s), the pyrazole NH was not observed; ¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN) δ 69.8, 73.8, 75.0, 75.6, 76.0 (CH₂), 78.2, 78.6, 82.0, 85.6, 85.9 (CH), 111.8, 112.4, 120.31, 120.34, 121.5, 122.3, 122.6, 123.4, 124.2, 125.6, 128.44, 128.46, 128.47, 128.6, 128.69, 128.74, 128.90, 128.92, 128.96, 129.2, 129.3, 134.6^a (CH_{arom}), 109.0, 110.2, 113.3^b, 128.0, 128.1, 137.17, 137.22, 138.5, 139.38, 139.39, 139.8, 140.9^b (C_{arom}), between 128.4 and 129.3 ppm, one benzylic CH_{arom} peak could not be observed; ^a chemical shift measured from a HSQC ¹H–¹³C experiment, ^b chemical shift measured from a HMBC ¹H–¹³C experiment; HRMS (ESI⁺) calcd for C₅₃H₄₉N₄O₅ (M + H)⁺ 821.3675, found 821.3701.

4.1.7. 13-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (**10**)

A solution of compound **9** (122 mg, 0.149 mmol) in freshly distilled CH₃CN (130 mL) in a Pyrex photochemical reactor was degassed with argon for 30 min, and iodine (84 mg, 0.33 mmol) was added. The solution was additionally degassed for 15 min and was irradiated for 45 min with a 400 W medium-pressure mercury lamp. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc and the solution was washed with a 1% aqueous sodium metabisulfite solution, water and dried over MgSO₄. The residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc 9:1) to give **10** (73 mg, 0.089 mmol, 60%) as a pale yellow solid. TLC R_f = 0.4 (EtOAc/Cyclohexane 4:6); mp 115 °C; IR (ATR): 3350, 1455, 1329, 1067 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 2.78 (1H, d, J = 10.0 Hz), 3.65 (1H, d, J = 10.0 Hz), 3.84 (1H, dd,

J₁ = 10.4 Hz, J₂ = 2.4 Hz), 3.97–4.02 (3H, m), 4.10–4.14 (1H, m), 4.32–4.39 (1H, m), 4.71 (1H, d, J = 12.6 Hz), 4.74 (1H, d, J = 12.6 Hz), 4.76 (1H, d, J = 10.8 Hz), 4.81 (1H, d, J = 11.4 Hz), 4.83 (1H, d, J = 11.4 Hz), 4.95 (1H, d, J = 10.8 Hz), 6.02–6.05 (2H, m), 6.23–6.28 (1H, m), 6.76–6.81 (2H, m), 6.91–6.95 (1H, m), 7.19–7.29 (10H, m), 7.31–7.39 (7H, m), 7.48–7.55 (3H, m), 7.82 (1H, d, J = 8.2 Hz), 8.34–8.37 (1H, m), 8.49–8.52 (1H, m), 8.70 (1H, s), 10.64 (1H, br s), the pyrazole NH was not observed; ¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN) δ 67.8, 74.3, 74.9, 75.8, 76.0 (CH₂) 77.2, 77.9, 82.0, 85.2, 85.8 (CH) 112.0, 113.0, 120.8, 121.6, 121.7, 122.1, 125.5 (2C), 128.3, 128.4, 128.56, 128.57, 128.7, 128.9, 129.0, 129.14, 129.16, 129.3, 129.5, 129.6, 131.5 (CH_{arom}), 108.0, 113.7, 113.8, 123.5, 124.2, 124.8, 127.3, 133.9, 137.6, 138.4, 139.3, 139.6, 140.1, 140.6 (C_{arom}); HRMS (ESI⁺) calcd for C₅₃H₄₇N₄O₅ (M + H)⁺ 819.3541, found 819.3541.

4.1.8. 13-(1-Deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (**11**)

To a solution of **10** (73 mg, 0.089 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) at –78 °C was added BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 1.07 mL, 1.07 mmol). After stirring 15 min at –78 °C, water was added and the mixture was allowed to reach room temperature. After extraction with EtOAc, the assembled organic phases were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (EtOAc to EtOAc/MeOH 9:1) to give **11** (31 mg, 0.068 mmol, 76%) as a greenish beige solid. TLC R_f = 0.53 (EtOAc/MeOH 9:1); mp 246 °C; IR (ATR): 3700–3000, 1460, 1328 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.55–3.61 (1H, m), 3.64–3.70 (1H, m), 3.80–3.85 (1H, m), 3.91–3.95 (1H, m), 4.02–4.13 (2H, m), 4.83 (1H, d, J = 5.5 Hz), 5.11 (1H, d, J = 5.4 Hz), 5.35 (1H, d, J = 5.2 Hz), 5.88 (1H, t, J = 4.1 Hz), 6.21 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.27 (1H, ddd, J₁ = 7.9 Hz, J₂ = 7.0 Hz, J₃ = 1.0 Hz), 7.34 (1H, ddd, J₁ = 7.8 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 0.7 Hz), 7.39 (1H, ddd, J₁ = 8.1 Hz, J₂ = 7.0 Hz, J₃ = 1.1 Hz), 7.44 (1H, ddd, J₁ = 8.2 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 1.1 Hz), 7.64 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.91 (1H, d, J = 8.6 Hz), 8.39 (1H, d, J = 7.8 Hz), 8.64 (1H, d, J = 7.6 Hz), 8.79 (1H, s), 11.28 (1H, s), 13.66 (1H, br s); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 58.4 (CH₂), 67.6, 73.0, 76.9, 78.5, 84.6 (CH), 111.52, 112.05, 119.2, 120.1, 120.60, 120.63, 123.7 (2C), 131.5^a (CH_{arom}), 106.6^b, 111.47, 111.99, 121.7, 123.0, 123.2, 125.7, 131.3^b, 138.7, 139.8 (C_{arom}), ^a chemical shift measured from a HSQC ¹H–¹³C experiment, ^b chemical shift measured from a HMBC ¹H–¹³C experiment; HRMS (ESI⁺) calcd for C₂₅H₂₃N₄O₅ (M + H)⁺ 459.1663, found 459.1671.

4.1.9. Ethyl 2-(1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate (**12**)

Oxalyl chloride (0.84 mL, 9.6 mmol) was added to a solution of **5** (3.13 g, 4.89 mmol) in Et₂O (75 mL) at 0 °C and the mixture was stirred at room temperature for 8 h. After evaporation, the residue was dissolved in EtOH (40 mL) and NEt₃ (0.7 mL, 5 mmol) was added. After stirring overnight, the solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 85:15) to give **12** (3 g, 4.05 mmol, 83%) as a light brown gum. TLC R_f = 0.49 (cyclohexane/EtOAc 8:2); IR (ATR): 1726, 1649, 1455 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.32 (3H, t, J = 7 Hz), 3.69–3.76 (3H, m), 3.84 (1H, t, J = 9.5 Hz), 3.91–3.96 (1H, m), 3.92 (1H, t, J = 9 Hz), 4.18 (1H, t, J = 9 Hz), 4.34–4.40 (3H, m), 4.48 (1H, d, J = 12 Hz), 4.53 (1H, d, J = 12 Hz), 4.63 (1H, d, J = 11 Hz), 4.81 (1H, d, J = 11 Hz), 4.86 (2H, s), 5.95 (1H, d, J = 9 Hz), 6.67 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.03 (2H, t, J = 7.5 Hz), 7.11 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.21–7.40 (17H, m), 7.83–7.88 (1H, m), 8.20–8.26 (1H, m), 8.65 (1H, s); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 13.9 (CH₃), 61.8, 68.4, 72.2, 73.8, 74.2, 74.6 (CH₂), 76.7, 77.3, 79.7, 84.6 (2C) (CH), 112.63, 121.5, 123.7, 124.3, 127.46, 127.54, 127.59, 127.61, 127.68, 127.70, 127.86, 127.92, 128.2, 128.26, 128.28, 138.5 (CH_{arom}), 112.65, 126.0, 136.2, 137.0, 138.0, 138.1, 138.4 (C_{arom}), 163.1, 179.4 (C=O), between 127.4 and

128.3 ppm, one benzylic CH_{arom} peak could not be observed; HRMS (ESI+) calcd for C₄₆H₄₆NO₈ (M + H)⁺ 740.3218, found 740.3224.

4.1.10. Ethyl 2-(1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)acetate (13)

Triethylsilane (0.69 mL, 4.3 mmol) and TFA (2.13 mL, 28 mmol) were added to a solution of **12** (540 mg, 0.73 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 36 h. After addition of a saturated aqueous NaHCO₃ solution, the mixture was extracted with EtOAc and the combined organic phases were dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 85:15) to give **13** (230 mg, 0.32 mmol, 43%) as a light brown gum. TLC R_f = 0.43 (cyclohexane/EtOAc 8/2); IR (ATR): 1731, 1461, 1363, 1071 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ 1.15 (3H, t, J = 7 Hz), 3.66 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.77–3.81 (1H, m), 3.80 (2H, s), 3.84–3.93 (4H, m), 4.01–4.08 (1H, m), 4.08 (2H, q, J = 7 Hz), 4.20 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.53 (1H, d, J = 12 Hz), 4.61 (1H, d, J = 12 Hz), 4.74 (1H, d, J = 11 Hz), 4.91 (1H, d, J = 11 Hz), 4.93 (1H, d, J = 11 Hz), 4.96 (1H, d, J = 11.5 Hz), 5.67 (1H, d, J = 9 Hz), 6.77 (2H, d, J = 7 Hz), 7.07 (2H, t, J = 7 Hz), 7.10–7.22 (3H, m), 7.23–7.40 (15H, m), 7.51 (1H, s), 7.65 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.69 (1H, d, J = 8 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, Acetone-d₆) δ 14.5 (CH₃), 31.7, 60.9, 69.8, 73.8, 74.7, 75.5, 75.9 (CH₂), 78.3, 78.7, 81.9, 86.1, 86.2 (CH), 112.1, 120.0, 120.7, 122.8, 125.8, 128.18, 128.21, 128.3, 128.41, 128.44, 128.68, 128.69, 129.03, 129.06, 129.09 (CH_{arom}); 110.1, 129.5, 137.3, 138.6, 139.5, 139.6, 139.9 (C_{arom}), 171.9 (C=O), between 128.1 and 129.1 ppm, two benzylic CH_{arom} peaks could not be observed; HRMS (ESI+) calcd for C₄₆H₄₈NO₇ (M + H)⁺ 726.3425, found 726.3440.

4.1.11. tert-Butyl 3-(4-(1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrazol-5-yl)-1H-indole-1-carboxylate (16)

Preparation of the activated carboxylic acid. Oxalyl chloride (0.33 mL, 3.8 mmol) was added dropwise to a solution of **3** (0.5 g, 1.9 mmol), pyridine (0.93 mL, 11.5 mmol) and DMF (7 μL) in CH₂Cl₂ (6 mL) under argon. The mixture was stirred at room temperature for 15 h and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane, 2:8) to give activated carboxylic acid as a white solid (436 mg).

Step 1. BuLi (2.5 M in hexanes, 0.62 mL, 1.55 mmol) was added to a solution of diisopropylamine (0.26 mL, 1.84 mmol) in anhydrous THF (4 mL) at 0 °C. After 30 min, the mixture was cooled to –78 °C and a solution of **13** (500 mg, 0.69 mmol) in THF (2 mL) was added. The mixture was stirred at –78 °C for 1 h and a solution of activated carboxylic acid (210 mg) in THF (4 mL) was added dropwise. The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 2 h. After evaporation, EtOAc was added and the mixture was washed with an 8% aqueous NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/AcOEt 9:1) to give the ketoester intermediate **14** as a mixture of diastereoisomers (465 mg) as a light brown solid which was used directly for the next step.

Step 2. In a sealed reaction tube, a solution of the ketoester intermediate from step 1 (400 mg) and hydrazine monohydrate (0.93 mL, 19 mmol) in a 1:1 v/v EtOH/AcOH mixture (4 mL) was heated at 110 °C (oil bath) for 45 min. After cooling, water was added and the mixture was extracted with EtOAc, the assembled organic phases were washed with a 1 M aqueous HCl solution, brine, and dried over MgSO₄. After evaporation, a brown oil was obtained which was dissolved in a minimum of acetone before precipitation by addition of cyclohexane. After evaporation under reduced pressure, the pyrazolone intermediate (360 mg) was obtained as a brown foam which was used directly for the next step.

Step 3. To a solution of the pyrazolone intermediate from step 2 (360 mg) and PhNTf₂ (247 mg, 0.69 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL), at 0 °C under argon, was added NEt₃ (0.58 mL, 4.16 mmol) and the mixture was allowed to reach room temperature. After 1 h of stirring, solvent was evaporated under reduced pressure. EtOAc was added and the mixture was washed with water, brine and dried over MgSO₄. After evaporation, the residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3) to give the pyrazolyl triflate **15a** as a major product (384 mg), TLC R_f 0.83 in cyclohexane/EtOAc 6:4, light brown oil, HRMS (ESI+) calcd for C₅₉H₅₆F₃N₄O₁₀S (M + H)⁺ 1069.3664, found 1069.3671 and its Boc deprotected analogue **15b** (67 mg), TLC R_f 0.53 in cyclohexane/EtOAc 6:4, beige oil, HRMS (ESI+) calcd for C₅₄H₄₈F₃N₄O₈S (M + H)⁺ 969.3140, found 969.3139, which were used without further purification for the next step.

Step 4. In a sealed reaction tube, a mixture of pyrazolyl triflate **15a** (210 mg), Pd(OAc)₂ (4.8 mg, 0.022 mmol), dppf (11.95 mg, 0.022 mmol) and HCO₂NH₄ (71 mg, 1.12 mmol) in DMF (2.5 mL) was heated at 90 °C for 2 h. After cooling, EtOAc was added and the mixture was filtered through a Celite[®] pad. The filtrate was washed with water, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 7:3) to give **16** (116 mg, 0.126 mmol, 39% from **13**) as a beige solid. TLC R_f = 0.61 (cyclohexane/EtOAc 6:4); mp 88 °C; IR (ATR): 3500–3000, 1732, 1453, 1367, 1153, 1054 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 1.38 (9H, s), 3.58 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.70–3.86 (5H, m), 3.96 (1H, t, J = 8.8 Hz), 4.16 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.48 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.53 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.65 (1H, d, J = 10.9 Hz), 4.82–4.89 (3H, m), 5.54 (1H, d, J = 8.9 Hz), 6.64–6.67 (2H, m), 6.90–6.95 (2H, m), 7.01–7.06 (1H, m), 7.09 (1H, ddd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 0.9 Hz), 7.14 (1H, ddd, J₁ = 8.1 Hz, J₂ = 7.6 Hz, J₃ = 1.0 Hz), 7.20–7.34 (17H, m), 7.39 (1H, s), 7.39–7.42 (1H, m), 7.48 (1H, s), 7.65 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.76 (1H, s), 8.01 (1H, d, J = 7.9 Hz), 8.05 (1H, d, J = 8.3 Hz), 10.60–11.90 (1H, br s); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 28.1 (CH₃), 69.9, 73.8, 75.0, 75.6, 76.1 (CH₂), 78.2, 78.7, 81.8, 86.05, 86.14 (CH), 84.6 (C), 112.3, 115.8, 121.2, 121.4, 122.7, 123.4, 123.8, 125.46, 125.50, 125.6, 128.4, 128.5, 128.6, 128.72, 128.73, 128.8, 128.96, 128.97, 129.24, 129.25, 129.29, 132.9 (CH), 110.1, 113.0, 114.1, 129.4, 130.1, 136.1, 137.3, 138.6, 139.4, 139.5, 139.8, 143.3 (C), 150.2 (C=O), between 128.4 and 129.3 ppm, one benzylic CH_{arom} peak could not be observed; HRMS (ESI+) calcd for C₅₈H₅₇N₄O₇ (M + H)⁺ 921.4222, found 921.4230.

4.1.12. 3-(5-(1H-Indol-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-1H-indole (17)

To a solution of **16** (138 mg, 0.15 mmol) in 3:1 v/v MeOH/H₂O (16 mL) was added K₂CO₃ (77 mg, 0.56 mmol) and the mixture was refluxed for 3 h. After cooling, a saturated aqueous NH₄Cl solution was added. After extraction with EtOAc, drying over MgSO₄ and evaporation, the residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 6:4) to give **17** (110 mg, 0.134 mmol, 89%) as a beige solid. TLC R_f = 0.24 (cyclohexane/EtOAc 6:4); mp 82 °C; IR (ATR): 3416, 1455 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 3.59 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.69–3.79 (4H, m), 3.82 (1H, t, J = 9 Hz), 3.90 (1H, t, J = 9 Hz), 4.18 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.47 (1H, d, J = 12 Hz), 4.52 (1H, d, J = 12 Hz), 4.63 (1H, d, J = 11 Hz), 4.82–4.85 (2H, m), 4.86 (1H, d, J = 11.5 Hz), 5.54 (1H, d, J = 9 Hz), 6.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 6.91 (1H, ddd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 7 Hz, J₃ = 1 Hz), 7.01 (1H, ddd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 7 Hz, J₃ = 1 Hz), 7.02–7.06 (2H, m), 7.08 (1H, ddd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 7 Hz, J₃ = 1 Hz), 7.10–7.14 (2H, m), 7.18 (1H, ddd, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 7 Hz, J₃ = 1 Hz), 7.23–7.37 (17H, m), 7.38 (1H, s), 7.59 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.71 (1H, d, J = 8 Hz), 7.75 (1H, s), 9.20 (1H, s), 9.6–12.6 (1H, br s); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN) δ 69.9, 73.9, 75.0, 75.6, 76.1 (CH₂), 78.2, 78.8, 82.0, 85.8, 86.1 (CH), 111.9, 112.42, 120.7, 121.1, 121.2, 121.4, 122.9, 123.2, 124.9, 125.1, 128.51, 128.53, 128.54, 128.7, 128.80,

128.83, 128.9, 128.977, 128.982, 129.28, 129.31, 129.32, 135.8^a (CH_{arom}), 108.3, 110.9, 112.45, 127.1, 129.01, 137.1, 137.4, 138.7, 139.43, 139.47, 139.8, 140.7^b (C_{arom}). ^achemical shift measured from a HSQC ¹H–¹³C experiment, ^bchemical shift measured from a HMBC ¹H–¹³C experiment; HRMS (ESI+) calcd for C₅₃H₄₉N₄O₅ (M + H)⁺ 821.3698, found 821.3706.

Compound **17** can also be directly prepared from the minor Boc-protected pyrazolyl triflate intermediate **15b**. In a sealed reaction tube, a mixture of **15b** (126 mg), Pd(OAc)₂ (7.3 mg, 0.0325 mmol), dppf (18 mg, 0.032 mmol) and HCO₂NH₄ (82 mg, 1.3 mmol) in DMF (6 mL) was heated at 90 °C for 2 h. After cooling, EtOAc was added and the mixture was filtered through a Celite[®] pad. The filtrate was washed with water, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 7:3) to give **17** (70 mg, 0.085 mmol, 8% from **13**) as a beige solid.

4.1.13. 12-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (**18**)

A solution of **17** (110 mg, 0.134 mmol) in freshly distilled CH₃CN (120 mL) in a Pyrex photochemical reactor was degassed with argon for 30 min, and iodine (76 mg, 0.30 mmol) was added. The solution was additionally degassed for 15 min and was irradiated for 15 min with a 400 W medium-pressure mercury lamp. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc and the solution was washed with a 1% aqueous sodium metabisulfite solution, water and dried over MgSO₄. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 6:4) to give **18** (71 mg, 0.087 mmol, 65%) as a beige solid. TLC R_f = 0.5 (cyclohexane/EtOAc 1:1); mp 215 °C; IR (ATR): 3337, 1454, 1240, 1070 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 2.70 (1H, d, J = 9.9 Hz), 3.58 (1H, d, J = 9.9 Hz), 3.77 (1H, dd, J₁ = 10.4 Hz, J₂ = 2.3 Hz), 3.88–3.97 (3H, m), 4.03–4.08 (1H, m), 4.27–4.35 (1H, m), 4.64 (1H, d, J = 12.6 Hz), 4.69 (1H, d, J = 12.6 Hz), 4.72 (1H, d, J = 10.9 Hz), 4.76 (1H, d, J = 11.4 Hz), 4.79 (1H, d, J = 11.4 Hz), 4.91 (1H, d, J = 10.9 Hz), 5.99–6.04 (2H, m), 6.16–6.23 (1H, m), 6.75–6.80 (2H, m), 6.89–6.95 (1H, m), 7.15–7.55 (20H, m), 7.78 (1H, d, J = 8.3 Hz), 8.39 (1H, d, J = 7.7 Hz), 8.43–8.48 (1H, m), 8.72 (1H, s), 10.84 (1H, s), the pyrazole NH was not observed; ¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 67.9, 74.4, 74.8, 75.8, 76.0 (CH₂), 77.2, 77.9, 82.1, 85.4, 85.8 (CH), 112.1, 112.9, 121.3, 121.5, 121.7, 121.9, 125.4, 125.8, 128.34, 128.38, 128.55, 128.59, 128.7, 128.96, 129.04, 129.14, 129.16, 129.3, 129.5, 129.6, 132.4 (CH_{arom}), 106.9, 112.6, 114.8, 123.55, 123.62, 124.8, 128.1, 134.4, 137.7, 138.4, 139.3, 139.57, 139.64, 141.1 (C_{arom}); HRMS (ESI+) calcd for C₅₃H₄₇N₄O₅ (M + H)⁺ 819.3541, found 819.3547.

4.1.14. 12-(1-Deoxy-β-D-glucopyranos-1-yl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrazolo[3,4-c]carbazole (**19**)

To a solution of **18** (54 mg, 0.066 mmol) in CH₂Cl₂ (22 mL) at –78 °C was added BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂, 0.79 mL, 0.79 mmol). After stirring 15 min at –78 °C, water was added and the mixture was allowed to reach room temperature. After extraction with EtOAc, the assembled organic phases were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (EtOAc to EtOAc/MeOH 9:1) to give **19** (21 mg, 0.046 mmol, 69%) as a greenish beige solid. TLC R_f = 0.45 (EtOAc/MeOH 9:1); Mp = 251 °C; IR (ATR): 3700–3000, 1458, 1329, 1239 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.55–3.63 (2H, m), 3.84 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.93 (1H, dd, J₁ = 9.8 Hz, J₂ = 1.9 Hz), 4.03 (1H, t, J = 9.1 Hz), 4.09 (1H, d, J = 10.8 Hz), 4.79 (1H, br s), 5.09 (1H, br s), 5.34 (1H, br s), 5.92 (1H, br s), 6.18 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.28–7.34 (2H, m), 7.41 (1H, ddd, J₁ = 8.2 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 1.1 Hz), 7.43 (1H, ddd, J₁ = 8.3 Hz, J₂ = 7.1 Hz, J₃ = 1.2 Hz), 7.67 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.89 (1H, d,

J = 8.6 Hz), 8.39 (1H, d, J = 7.7 Hz), 8.64 (1H, d, J = 7.7 Hz), 8.80 (1H, s), 11.48 (1H, s), 13.69 (1H, br s); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 58.5 (CH₂), 67.6, 73.1, 77.0, 78.4, 84.6 (CH), 111.7, 111.9, 119.71, 119.74, 120.6, 120.7, 123.7, 123.9, 131.8^a (CH_{arom}), 104.8^b, 111.2, 113.4, 122.0, 122.1, 122.9, 126.8, 132.1^b, 138.2, 140.3 (C_{arom}); ^achemical shift measured from a HSQC ¹H–¹³C experiment, ^bchemical shift measured from a HMBC ¹H–¹³C experiment; HRMS (ESI+) calcd for C₂₅H₂₃N₄O₅ (M + H)⁺ 459.1663, found 459.1665.

4.2. Biological studies

4.2.1. Cell culture and cytotoxicity assays

The human colon carcinoma HCT116 cell line (American Type Culture Collection; Manassas, VA) was propagated in Dulbecco modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C, 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Cells in logarithmic phase of growth were used in the experiments. Compounds **10**, **11**, **18** and **19** were dissolved in DMSO as 10 mM stock solution followed by serial dilutions in water immediately before experiments. The cytotoxicity was determined in a formazan conversion assay (MTT-test).²¹ Briefly, cells (5 × 10³ in 190 µL of culture medium) were plated into a 96-well plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and treated with 0.1% DMSO (vehicle control) or with **10**, **11**, **18** and **19** (0.1–50 µM; each concentration in duplicate) for 72 h. After the completion of drug exposure, 50 µg of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide were added into each well for an additional 2 h. Formazan was dissolved in DMSO, and the absorbance at 540 nm was measured. Cell viability at a given drug concentration (% MTT conversion) was calculated as the percentage of absorbance in wells with drug-treated cells to that of vehicle control cells (100%).

4.2.2. In vitro kinase inhibition assays

The procedures for *in vitro* protein kinase assays have been described previously.²² All full length protein kinases were of human origin. All proteins were either expressed as GST (glutathione transferase) fusion proteins in *Escherichia coli* or as hexahistidine (His₆)-tagged proteins in Sf21 (*Spodoptera frugiperda* 21) insect cells. GST fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose, and His₆-tagged proteins on nickel/nitrilotriacetate-agarose. The assays (25.5 µL volume) were carried out robotically at room temperature (21 °C) and were linear with respect to time and enzyme concentration under the conditions used. Assays were performed for 30 min using Multidrop Micro reagent dispensers (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, U.S.A.) in a 96-well format. The concentration of magnesium acetate in the assays was 10 mM; [γ-³³P]ATP (800 c.p.m./pmol) was used at 20 µM for Pim-1 and PKCα, in order to be at or below the K_m for ATP for each enzyme. The assays were initiated with MgATP, stopped by the addition of 5 µL of 0.5 M orthophosphoric acid and spotted on P81 filter plates using a unifier harvester (PerkinElmer, Boston, MA). Kinase substrates were RSRHSSYPAGT (300 µM) for Pim-1 or histone H1 (0.1 mg/mL) for PKCα. Pim-1 was diluted in a buffer containing 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 1 mg/mL BSA and 0.1% 2-mercaptoethanol and assayed in a buffer comprising 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA and 0.1% 2-mercaptoethanol. PKCα was diluted in 20 mM HEPES (pH 7.4)/0.03% Triton X-100 and assayed in the same buffer supplemented with 0.1 mg/mL phosphatidylserine, 10 µg/mL diacylglycerol and 0.1 mM CaCl₂. The inhibitory profile of tested compounds was expressed as the percentage of residual kinase activity for the inhibitor concentration of 10 µM. The results are shown as the mean ± standard deviation for duplicate determinations.

4.2.3. Interaction with double stranded DNA

The binding of compounds to DNA was determined in 100 mM NaCl, 10 mM Na phosphate buffer, pH 6.5 at 25 °C. Fluorescence spectra were recorded with Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian Inc., USA); excitation was 360 nm for **10** and **18** and 305 nm for **11** and **19**. The concentration of calf thymus DNA (ctDNA) in moles of base pairs was determined in a sodium phosphate buffered solution at 20 °C using the molar extinction coefficient $\epsilon[\text{ctDNA}] = 13200 \text{ M (bp)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Binding constants were determined by linear approximation of the ratio $[L] \cdot [\text{DNA}] / (F_0 - F)$ where $[L]$ and $[\text{DNA}]$ are concentrations of the compound and ctDNA, respectively; F_0 and F are fluorescence intensities of the compound in the absence or presence of DNA, respectively. Error value was calculated as standard deviation of binding constants determined by fluorescence at three wavelengths (410, 435, 460 nm for **10** and **18**; and 375, 395, 410 nm for **11** and **19**).^{23,24}

Acknowledgements

The French Ministry of Higher Education and Research is acknowledged for Y. J. E. PhD fellowship, and the University Mohamed Seddik Ben Yahia (Jijel, Algeria) for B. D. doctoral mobility fellowship.

References

1. Prudhomme M. *Curr Med Chem Anti Canc Agents*. 2004;4:509.
2. Omura S, Iwai Y, Hirano A, et al. *J Antibiot*. 1977;30:275.
3. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, et al. *Nat Biotechnol*. 2008;26:127.
4. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm555756.htm> (accessed November 13, 2017).
5. Esvan YJ, Giraud F, Pereira E, et al. *Bioorg Med Chem*. 2016;24:3116.
6. Horton PA, Longley RE, McConnell OJ, Ballas LM. *Experientia*. 1994;50:843.
7. Anizon F, Shtil AA, Danilenko VN, Moreau P. *Curr Med Chem*. 2010;17:4114.
8. Chen LS, Redkar S, Taverna P, Cortes JE, Gandhi V. *Blood*. 2011;118:693.
9. Weirauch U, Beckmann N, Thomas M, et al. *Neoplasia*. 2013;15:783.
10. Liu R, Zhu T, Li D, et al. *Arch Pharm Res (Seoul)*. 2007;30:270.
11. Sanchez-Martinez C, Shih C, Zhu G, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:3841.
12. Yang X, Xue L, Luo J. Patent EP2385035A1; *Chem Abstr*. 2010; 153:115916.
13. Markwalder JA, Arnone MR, Benfield PA, et al. *J Med Chem*. 2004;47:5894.
14. Gani OABSM, Engh RA. *Nat Prod Rep*. 2010;27:489.
15. Delarue-Cochin S, McCort-Tranchepain I. *Org Biomol Chem*. 2009;7:706.
16. Sánchez C, Salas AP, Braña AF, et al. *Chem Commun*. 2009:4118.
17. Messaoudi S, Sancelme M, Polard-Housset V, Aboab B, Moreau P, Prudhomme M. *Eur J Med Chem*. 2004;39:453.
18. Braña MF, Gradillas A, Ovalles AG, et al. *Bioorg Med Chem*. 2006;14:9.
19. Sander T, Freyss J, von Korff M, Rufener C. *J Chem Inf Model*. 2015;55:460.
20. <http://www.openmolecules.org> (accessed November 13, 2017).
21. Mosmann T. *J Immunol Meth*. 1983;65:55.
22. Bain J, Plater L, Elliott M, et al. *Biochem J*. 2007;408:297.
23. Scott R. *Rec Trav Chim*. 1956;75:787.
24. Nadysev GY, Tikhomirov AS, Lin M-H, et al. *Eur J Med Chem*. 2018;143:1553.

ملخص

منذ اكتشاف وجود الحلقات غير متجانسة في المنتجات الطبيعية وغالبية الجزيئات النشطة بيولوجيا لعبت هذه العائلة من الجزيئات دورا هاما في علاج الأمراض المختلفة بما في ذلك السرطان. نحن مهتمون في هذه الأطروحة بتحضير فئتين مختلفتين من الحلقات غير المتجانسة. في هذه الأطروحة، سيتم تقديم مشروعين بحثيين. يعرض المشروع الأول تطوير مشتقات غلوكوزيل جديدة من مادة الستوروسبورين اللاسكري (K252c) حيث تم استبدال جزء اللاكتام بنواة البيرازول. تم تحضير أربعة إندولوبيرازولوكاربازول جديدة مماثلة. تم تقييم أنشطتها المضادة للانقسام تجاه خلية سرطان خط HCT116 القولون والنشاط المثبط لبروتينات الكيناز (ببم-1 و PKC α) وقدرتها على التفاعل مع الحمض النووي. أظهرت معظم المركبات النشطة 11 و 19 المستبدلة بمجموعة بيتا-D-غلوكوزيل في المناصب N12 أو N13 أنشطة مضادة للتكاثر تجاه الخلايا HCT116 مع القيم IC50 في حوالي 10 μ M. هذه النظائر الجديدة يمكن أن تكون مثبطات بروتين كيناز واعدة. الخطوط العريضة للمشروع الثاني هي تركيب كينولين جديد ماستر بالغلوسرين بأجراء تغييرات حول تفاعل Skraup باستخدام مشتقات حمض أمينوبنزويك مستبدلة بشكل مختلف وزيادة من الجلوسرين. الهدف هو دراسة دور الغليسرين في اعطاء كينولينات ذات بنية معقدة و قد تم الحصول على ثلاثة مماكبات وتم تنفيذ دراسة نظرية (DFT) والنتائج التي تم الحصول عليها متفقة مع النتائج التجريبية.

الكلمات المفتاحية: الكينولين ، دراسة نظرية(DFT)، إندولوكاربازول ، نشاط مضاد الانقسام.

Abstract

Since the discovery of the existence of heterocycles in natural products and the majority of biologically active molecules this family of molecule has been assigned a role in the treatment of various pathologies including cancer. We are interested in this thesis in the synthesis of two distinct classes of heterocyclic compounds.

In this thesis, two research projects are presented. The first project presents the development of new glucosyl derivatives of staurosporin aglycone (K252c) in which the lactam part has been replaced by a pyrazole nucleus. Four new analogous indolopyrazolocarbazoles were synthesized. Their antiproliferative activities against the HCT116 colon carcinoma cell line as well as their kinase inhibitory activity (Pim-1 and PKC α) and their ability to interact with DNA were evaluated. Most active compounds 11 and 19 substituted by a beta-D-glucosyl group at the N12 or N13 positions exhibited antiproliferative activities against HCT116 cells with IC50 values of about 10 μ M. These new analogues could be promising kinase inhibitors.

The second project exposes the synthesis of new quinolines esterified with glycerol by modifications around the Skraup reaction using differently substituted aminobenzoic acid derivatives and a slight excess of glycerol. The aim is to explore the potential of glycerol to form complex quinoline structures, this idea is validated by the obtaining of three isomeric products. A theoretical study (DFT) was carried out and the results obtained are in agreement with the experimental results.

Key words: Quinolines, DFT, indolocarbazoles, antiproliferative activity.

Résumé

Depuis la mise en évidence de l'existence des hétérocycles dans les produits naturels et la majorité des molécules biologiquement actives cette famille de molécule s'est vu attribuer un rôle primordial dans le traitement de diverses pathologies notamment le cancer. Nous nous sommes intéressés dans cette thèse à la synthèse de deux classes distinctes de produits hétérocycliques.

*Dans ce mémoire deux projets de recherche seront présentés. Le premier projet présente le développement de nouveaux dérivés glucosylés de la staurosporine aglycone (K252c) dans lequel la partie lactame a été remplacée par un noyau pyrazole. Quatre nouveaux indolopyrazolocarbazoles analogues ont été synthétisés. Leurs activités antiprolifératives vis-à-vis de la lignée cellulaire de carcinome du colon HCT116 ainsi que leur activité inhibitrice des kinases (Pim-1 et PKC α) et leur capacité à interagir avec l'ADN ont été évaluées. La plupart des composés actifs **11** et **19** substitués par un groupement bêta-D-glucosyle aux positions N12 ou N13 présentaient des activités antiprolifératives vis-à-vis des cellules HCT116 avec des valeurs IC₅₀ d'environ 10 μ M. Ces nouveaux analogues pourraient être des inhibiteurs de kinases prometteurs.*

Le second projet expose la synthèse de nouvelles quinoléines estérifiées par le glycérol par modifications autour de la réaction de Skraup en utilisant des dérivés de l'acide aminobenzoïque différemment substitués et un léger excès de glycérol. Le but était d'explorer le potentiel du glycérol à former des structures complexes de quinoléines, cette idée a été validée par l'obtention de trois isomères. Une étude théorique (DFT) a été réalisée et les résultats obtenus sont en accord avec les résultats expérimentaux.

Mots clé : Quinoléines, DFT, indolocarbazoles, activité antiproliférative.

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات