



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs potentiels de la voie de signalisation de la sérine / thréonine kinase akt à visée anticancéreuse

Romain Lucas

► **To cite this version:**

Romain Lucas. Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs potentiels de la voie de signalisation de la sérine / thréonine kinase akt à visée anticancéreuse. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01235521

HAL Id: dumas-01235521

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01235521>

Submitted on 30 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE de BORDEAUX
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
Année 2015 - N° : 112

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR en PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par LUCAS, Romain
Né le 02/01/1985 à Nantes (44)

Le 11 septembre 2015 à Bordeaux

Titre de la thèse
Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs potentiels de la voie de
signalisation de la sérine/thréonine kinase Akt à visée anticancéreuse

Directeur de thèse :
Pr. Jean Guillon
Professeur en Chimie Bio-organique

Jury :

Jean Guillon	-	Professeur	Président
Vanessa Desplat	-	Maitre de Conférence	Examinatrice
Stéphane Moreau	-	Maitre de Conférence	Examineur
Sandra Rubio	-	Docteur	Examinatrice

Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu Jean GUILLON et Vanessa DESPLAT pour m'avoir encadré, soutenu, accueilli dans leur équipe et fait confiance durant le stage de Master 2. Je les remercie de m'avoir permis de travailler à leur côté et de m'avoir fait partager leur savoir-faire scientifique.

Je voudrais adresser mes remerciements à Stéphane MOREAU et Sandra RUBIO qui me font l'honneur d'être dans mon jury.

Je remercie également remercier toute l'équipe de Pharmacochimie de m'avoir accueilli durant les divers stages que j'ai effectués lors de mon cursus et pour m'avoir donné le goût de la recherche.

De façon plus personnelle, mes remerciements vont à ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu, écouté et qui ont cru en moi.

Sommaire :

I. Introduction	6
II. La protéine Akt en cancérologie	7
A. La protéine Kinase B (PKB ou Akt)	7
1. Structure	7
2. Activité	8
3. Rôle	9
4. Dérégulation	9
B. Les inhibiteurs d'Akt	10
1. Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP	10
a) Isoquinoline-5-sulfonamides	11
b) Balanol et dérivés azepanes	11
c) Dérivés de type indazole-pyrazole-pyridine	12
d) Analogues de phénylpurines et pyrrolopyrimidines	12
e) Autres inhibiteurs compétitifs d'ATP	13
2. Les inhibiteurs peptidomimétiques	14
3. Les inhibiteurs ciblant la boucle T-loop	15
4. Les inhibiteurs allostériques (PH Domain-Dependent)	15
a) Périfosine	15
b) Analogues de Phosphatidylinositols	16
c) Dérivés de type diphenylquinoxaline	17
C. Conclusion	18
III. Travaux de recherche	18
A. Partie Chimie	18
B. Partie Biologie	21
IV. Résultats et Discussion	22
A. Synthèse chimique	22
B. Evaluation biologique	28
1. Effet des inhibiteurs sur la prolifération des cellules mononucléées sanguines (CMN) et des lignées leucémiques HL60, Jurkat, K562, U266 et U937	29
2. Etude de la phosphorylation de la protéine Akt par cytométrie en flux	32
C. Etudes préliminaires de Relations Structure-Activité	35

V. Matériel et méthodes	36
A. Synthèse chimique	36
B. Evaluation biologique	59
a) Culture cellulaire des lignées hématopoïétiques humaines HL60, Jurkat, K562, U266 et U937	59
b) Isolement des cellules mononucléées sanguines (CMN)	59
c) Tests de prolifération sur les lignées hématopoïétiques et sur les CMN	60
d) Marquage intracytoplasmique de la protéine Akt phosphorylée par cytométrie en flux	61
VI. Conclusion	62
VII. Références bibliographiques	63
SERMENT DE GALIEN	66

I. Introduction

Chaque année le nombre de nouveaux cas de cancers ne cesse d'augmenter et aujourd'hui encore plus de la moitié de ces cas sont mortels. D'après l'OMS et le centre international de recherche contre le cancer, en 2012, dans le monde il est estimé à plus de 14.1 millions du nombre de nouveau cas (355 000 en France) et près de 8.2 millions de décès (148 000 en France). Les mécanismes causant la maladie sont multiples et complexes, rendant le développement de nouveaux médicaments très difficiles. Dans de nombreux cancers, la cause est souvent liée à une ou plusieurs dérégulations de protéines kinases.

En 1995, S. HANKS et T. HUNTER ont fait la découverte d'une nouvelle famille de protéines, les protéines kinase.^[1] Aujourd'hui ce sont 478 gènes codants pour ces protéines kinases eucaryotes qui ont été identifiés. Ces enzymes ont pour rôle de catalyser les réactions de phosphorylation sur leurs substrats. La phosphorylation est le transfert d'un groupement γ -phosphate d'un ATP sur un substrat possédant un groupement hydroxyle libre, se sont généralement d'autre protéines.

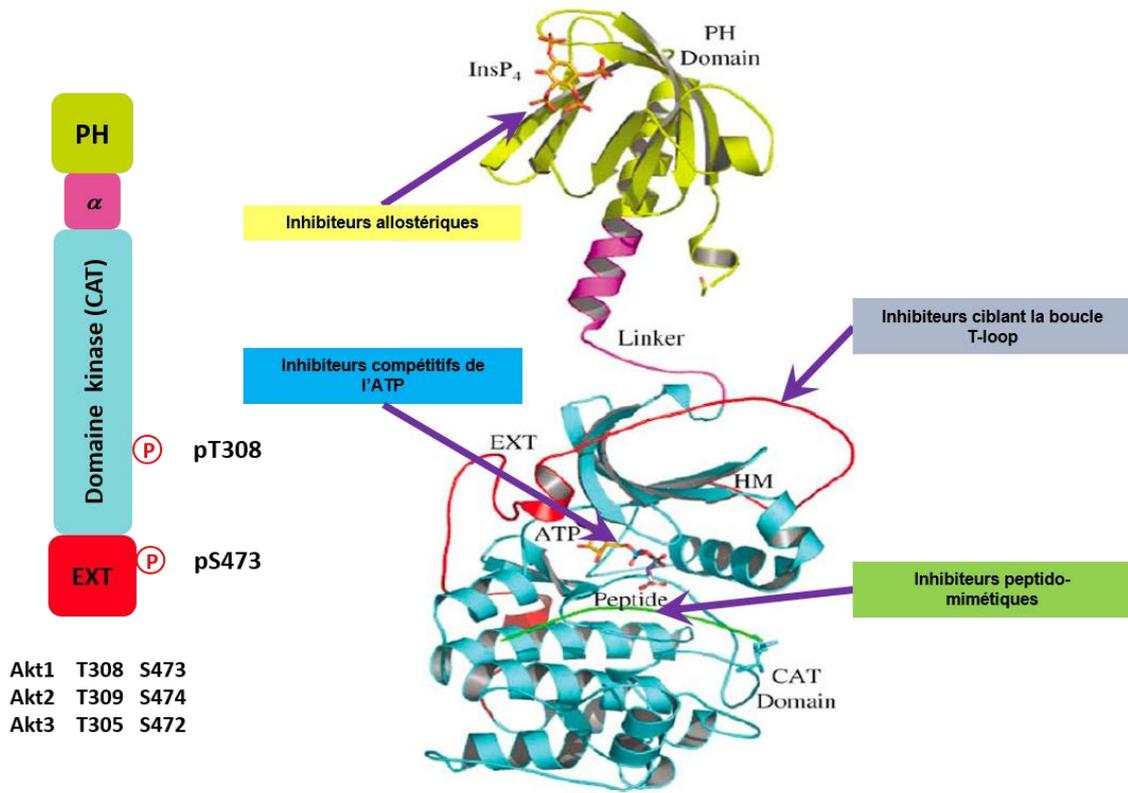
Depuis une quinzaine d'années, la protéine Akt (protéine kinase B/PKB) a retenu une attention particulière en thérapie anticancéreuse comme cible moléculaire potentielle due à son rôle critique de régulateur de la machinerie apoptotique cellulaire et sa dérégulation se trouve de ce fait souvent associée à la progression de plusieurs cancers.^[2,3]

Durant mon cursus, j'ai eu l'opportunité d'intégrer l'équipe de pharmacochimie pour divers stages sous la direction du Pr. J. GUILLON. De ce fait, en vue de l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie, j'ai effectué une thèse expérimentale.

II. La protéine Akt en cancérologie

A. La protéine Kinase B (PKB ou Akt)

1. Structure



Structure schématisique d' Akt

Structure 3D d' Akt

Figure 1 : Représentation schématisique et structure 3D de la protéine kinase Akt.^[4,5]

Akt est une sérine/thréonine kinase qui existe sous trois isoformes: Akt1/PKB α (ubiquitaire), Akt2/PKB β (tissus insulino-dépendants) et Akt3/PKB γ (tissus cérébraux), qui joue un rôle majeur dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire. Ces isoformes sont constitués de trois domaines (**Figure 1**) :

- Un domaine PH (Pleckstrin Homology) en N-terminal qui interagit avec les phospholipides membranaires tels que le phosphatidylinositol (3,4,5) phosphate (PIP3). Ce domaine est relié au domaine CAT par une hélice α .
- Un domaine CAT (Kinase Domain) formant la boucle catalytique de la protéine. C'est dans ce domaine que nous retrouvons un résidu thréonine (T308/Akt1 - T309/Akt2 - T305/Akt3) dont la phosphorylation active partiellement Akt.
- Un domaine EXT (C-terminal extension) en C-terminal hydrophobe. C'est dans ce domaine que nous retrouvons un résidu sérine (S473/Akt1 - S474/Akt2 - S472/Akt3) dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activation complète de la protéine.

2. Activité

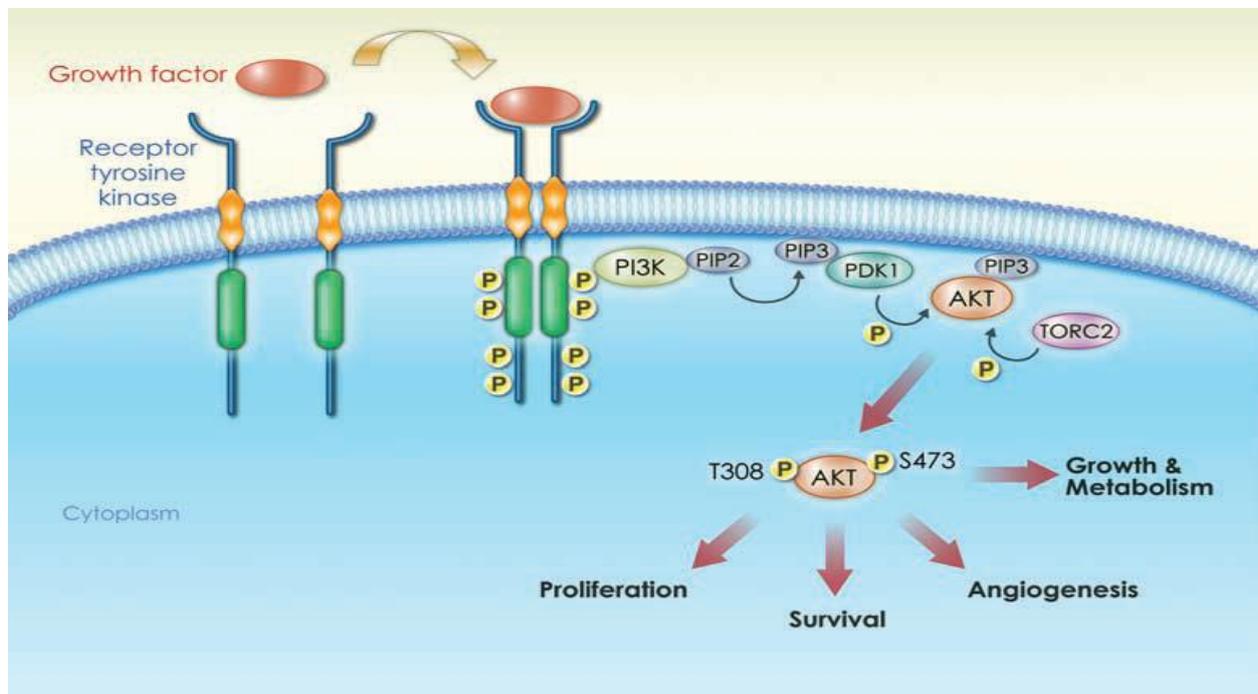


Figure 2 : modèle d'activation de la voie PI3K/Akt.^[6]

L'activation de la protéine Akt se fait via la stimulation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK). Il y a alors, formation d'un complexe « RTK/PI3K ». ^[7] La sous-unité p110 de la PI3K permet la phosphorylation du phosphatidylinositol (4,5) phosphate (PIP2) pour donner le phosphatidylinositol (3,4,5) phosphate (PIP3). Celui-ci sert de second messenger et va venir se fixer sur le domaine pleckstrin homology (PH) de la protéine Akt

(Figure 2). Il en résulte alors une translocation d'Akt à proximité de la membrane plasmique où elle est alors phosphorylée par la PDK1 (protein dependent kinase) sur la thréonine 308 située dans la boucle catalytique, et par mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) sur la sérine 473 de l'extension C terminale. Cette double phosphorylation permet ainsi une activité totale de la kinase, qui peut alors agir par phosphorylation sur ses substrats se trouvant soit dans le cytosol, soit au niveau du noyau.^[6]

3. Rôle

L'activation d'Akt est une étape importante dans le développement et le maintien du processus cancéreux. Cette protéine joue un rôle majeur dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire, c'est un effecteur critique de multiples facteurs de croissance (TNF: tumor necrosis factor, FGF2 : fibroblast growth factor 2, PDGF: platelet derived growth factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, NGF: nerve growth factor...) et de récepteurs aux facteurs de croissance impliqués dans la tumorigenèse. Une surproduction, une surexpression ou des mutations activatrices affectant ces facteurs de croissance ainsi que leurs récepteurs sont fréquemment observées. La dérégulation de la voie de signalisation PI3K/Akt intervient dans la pathogenèse de nombreuses tumeurs (cancers du sein, gastrique, du colon, cérébral) et certaines hémopathies malignes.^[8,9]

4. Dérégulation

Les mécanismes de cette dérégulation sont multiples : surexpression ou suractivation des RTK, mutations de la PI3K, mutations/amplifications d'Akt, altération de l'expression de PTEN, régulateur négatif de la voie PI3K/Akt qui déphosphoryle PIP3 en PIP2.^[10]

Les isoformes Akt1 et Akt2 sont communément surexprimées ou constitutivement actives dans un vaste nombre de cancers et leur activation est corrélée à la progression des maladies.^[9] La surexpression d'Akt a aussi été liée à une résistance aux traitements par chimiothérapie, et cette résistance diminue quand Akt est régulée négativement par des inhibiteurs de la PI3K.^[9] Le rôle central de la protéine Akt dans l'apoptose, ainsi que ses dérégulations fréquentes ont suscité un intérêt significatif en thérapie anticancéreuse, en bloquant cette protéine par des inhibiteurs. Cependant, le développement

d'inhibiteurs de la protéine Akt a été retardé par le manque d'inhibiteurs d'Akt spécifiques et sélectifs des différentes isoenzymes et reste encore peu exploré.^[11] Obtenir des inhibiteurs sélectifs des isoenzymes et spécifiques tout en respectant le kinome s'avère être un challenge du fait de la forte similarité structurale des domaines fixant l'ATP des protéines kinases. Outre la poche liant l'ATP ultra conservée, quelques éléments de structure de la protéine Akt peuvent être ciblés avec plus de spécificité. Ceux-ci incluent le domaine PH, la poche hydrophobe située au niveau N-terminal du domaine kinase.^[12] Dès lors, deux types d'inhibiteurs ont été proposés: les inhibiteurs compétitifs d'ATP se fixant sur son site de liaison, et les inhibiteurs allostériques se fixant sur le domaine PH.^[11] Depuis une dizaine d'années, seulement quelques molécules ont été décrites en tant qu'inhibiteurs d'Akt. Les premiers inhibiteurs décrits étaient des inhibiteurs compétitifs d'ATP tels que le balanol et ses analogues structuraux, la staurosporine, les composés H-89 et B-11-1 de type indazole ainsi que des composés de type isoquinoline.^[12-15] Cependant, leur manque de spécificité pour la PKB a conduit les chercheurs à envisager la conception de nouveaux inhibiteurs allostériques.^[14,15] Cette classe d'inhibiteurs est spécifique pour Akt et non compétitive avec l'ATP. Le domaine PH est moins conservé que le domaine kinase. Il contrôle la localisation d'Akt, et il aide à maintenir le domaine kinase sous forme inactive en l'absence de stimuli extracellulaires.^[3] Il fournit donc une cible pour les inhibiteurs allostériques avec une sélectivité d'isoforme.

B. Les inhibiteurs d'Akt

Le rôle central de la protéine Akt dans l'apoptose, ainsi que ses dérégulations fréquentes ont suscité un intérêt significatif en thérapie anticancéreuse par la recherche d'inhibiteurs de cette protéine. Selon la structure et la cascade enzymatique de la protéine Akt, différents types d'inhibiteurs ont été envisagés et synthétisés. Nous présenterons ici les principaux inhibiteurs étant définis comme références dans la littérature.^[12,15]

1. Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP

Ce sont des inhibiteurs qui se substituent à l'ATP au niveau de son site de liaison sur la protéine Akt. C'est par sa structure tertiaire que la protéine définit véritablement une « poche de liaison à l'ATP »; la kinase, ainsi privée d'ATP, perd son activité.^[12,15]

a) **Isoquinoline-5-sulfonamides**

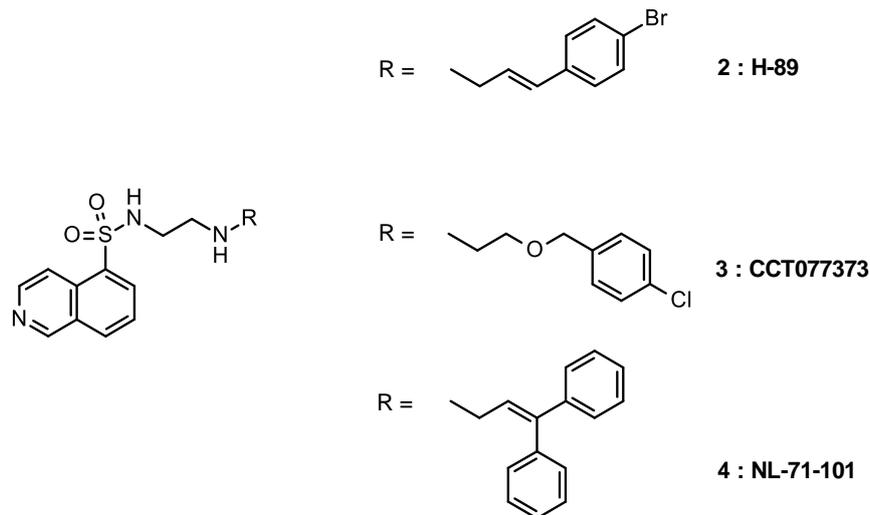


Figure 3 : Structure des composés 1-3 de type isoquinoline-5-sulfonamide.

Les isoquinoline-5-sulfonamides ont été décrits comme les premiers inhibiteurs PKB.^[12,15] C'est à partir de la découverte du composé H-89 (**2**), PKA sélectif, que de nouvelles pharmacomodulations ont été envisagées et ont abouti à la conception des composés CCT077373 (**3**), composé non sélectif PKA/PKB et NL-71-101 (**4**), considéré comme étant le plus sélectif vis-à-vis de PKB (**Figure 3**).

b) **Balanol et dérivés azepanes**

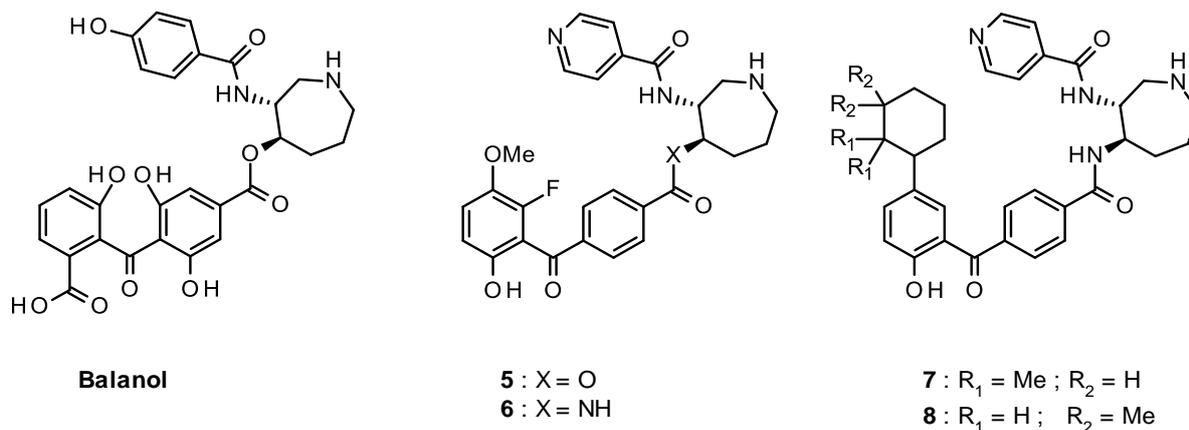


Figure 4 : Structure du balanol et de ses analogues structuraux 4-7.

Suite à la découverte d'un dérivé naturel, le balanol, comme inhibiteur sélectif PKC, divers travaux ont permis le développement selon une approche de relations structure-activité d'une nouvelle série de type azépane (composés 5-8) (Figure 4).^[12,15]

c) Dérivés de type indazole-pyrazole-pyridine

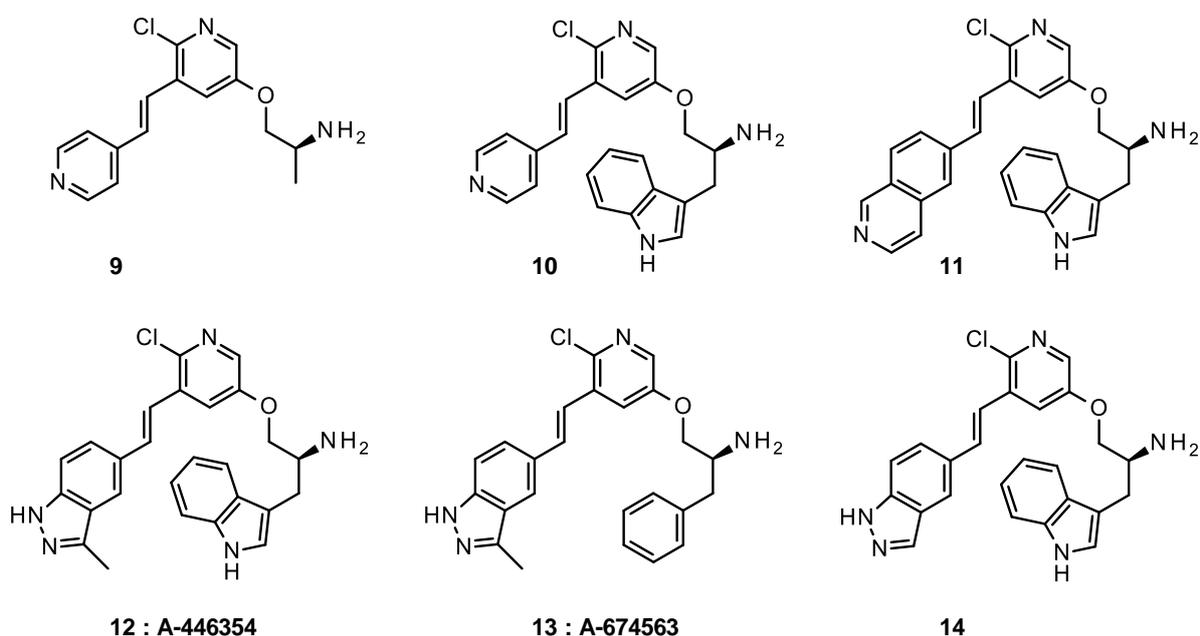


Figure 5 : Structure des pyridines 3,5-disubstituées 9-14.

Une réalisation importante dans le domaine des inhibiteurs compétitifs de l'ATP concerne la découverte du composé 9 par un criblage haut-débit. Des travaux complémentaires basés sur ce pharmacophore 9 ont conduit à la série des pyridines 3,5-disubstituées 10-14, porteuses de groupements indazole et/ou pyrazole (Figure 5).^[12,15]

d) Analogues de phénylpurines et pyrrolopyrimidines

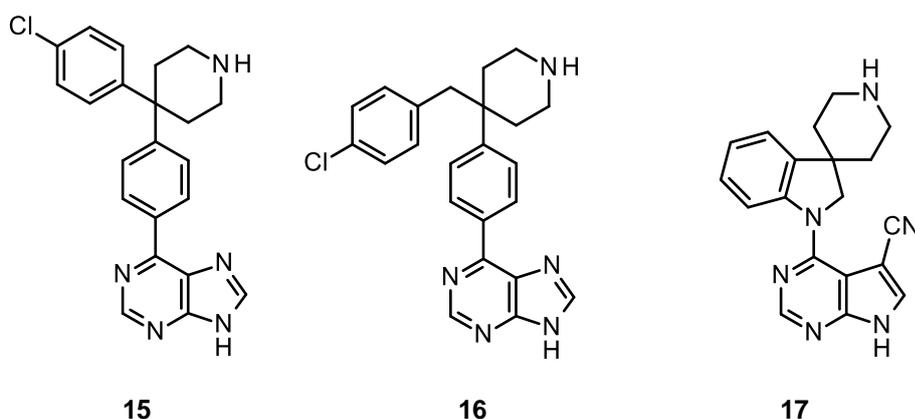


Figure 6 : Structure des phénylpyrines et pyrrolopyrimidines **15-17**.

Les composés **15-17** ont été décrits comme étant des inhibiteurs d'Akt compétitifs de l'ATP avec une faible IC_{50} (**Figure 6**).^[12,15] Cependant aux vues de l'homologie structurale du site de liaison de l'ATP avec d'autres protéines kinases, ces hétérocycles substitués **15-17** ne présentent pas de sélectivité pour la protéine Akt.

e) **Autres inhibiteurs compétitifs d'ATP**

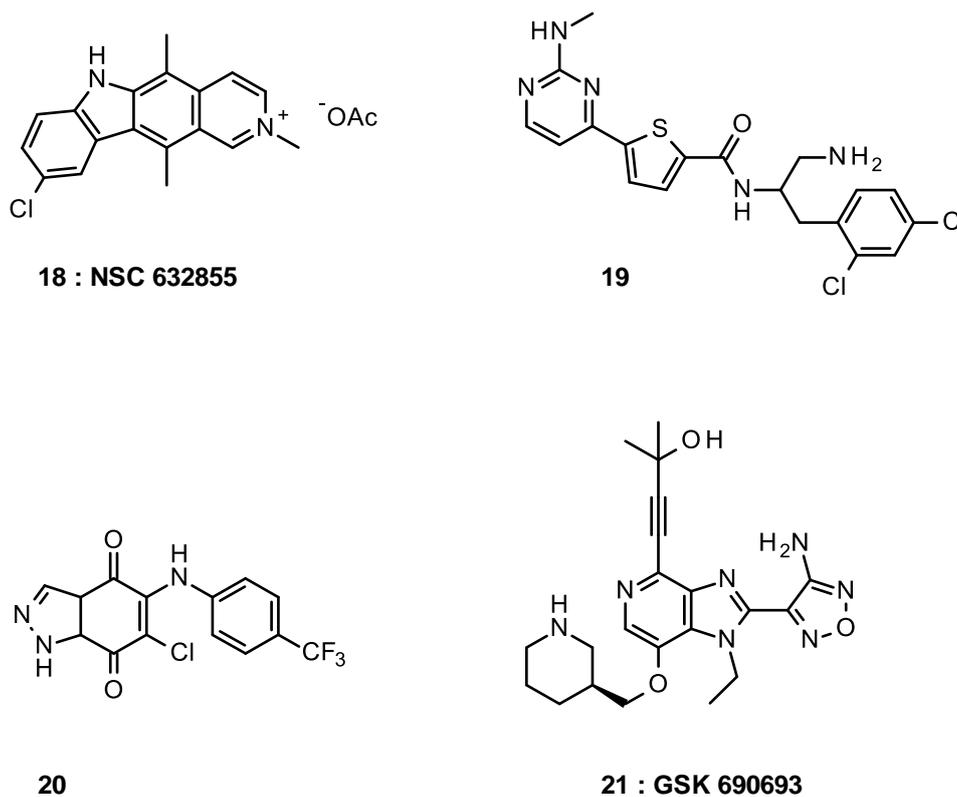


Figure 7 : Structure des autres inhibiteurs compétitifs d'ATP **18-21**.

Dans le but de concevoir des inhibiteurs plus sélectifs vis-à-vis d'Akt, de nouveaux criblages haut-débit effectués en parallèle sur diverses kinases, dont PKB, ont permis d'identifier les composés **18** à **21** comme inhibiteurs sélectifs d'Akt (**Figure 7**),^[12,15] et plus particulièrement le GSK690693 (composé **21**) actuellement en essai clinique de phase I.^[15,16]

2. Les inhibiteurs peptidomimétiques

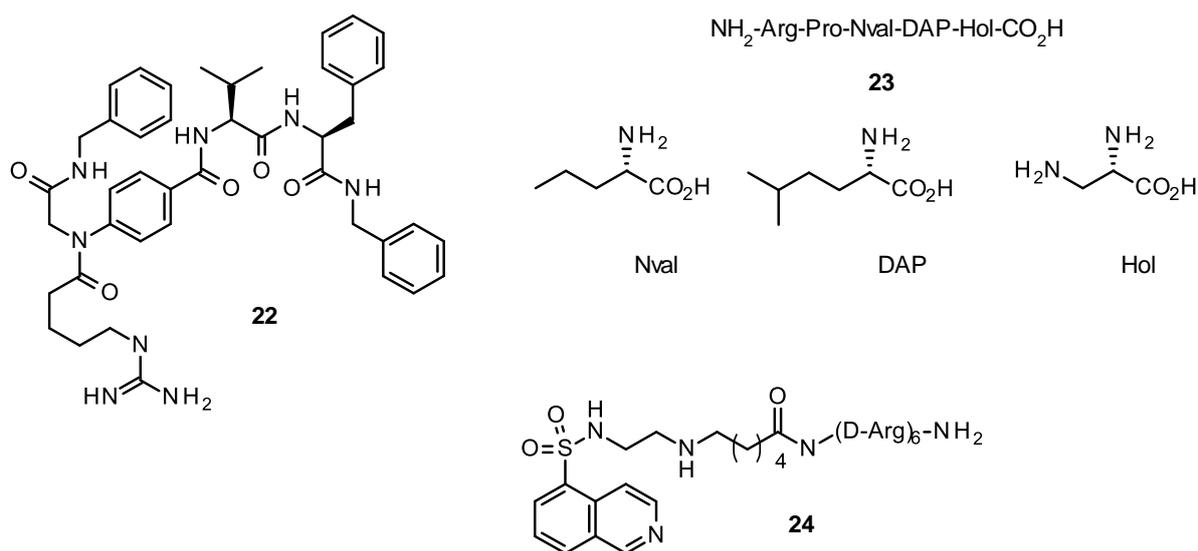
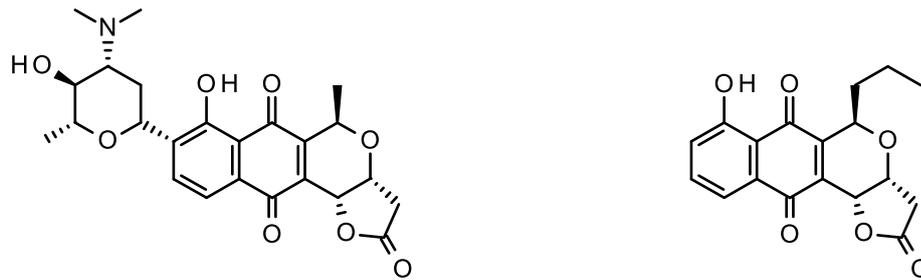


Figure 8 : Structure des substrats peptidomimétiques **22-24**.

Ces inhibiteurs **22-24**, de structure peptidomimétique, ciblent le site de liaison peptidique, ce qui permet une approche alternative pour une inhibition sélective de la voie de signalisation Akt (**Figure 8**).^[15] La synthèse d'inhibiteurs agissant sur ce site peptidique constitue un véritable challenge du fait de la conformation du site de liaison; cette voie semble idéale pour une stratégie en chimie combinatoire.

3. Les inhibiteurs ciblant la boucle T-loop



25 : Lactoquinomycine

26 : Frenolicine B

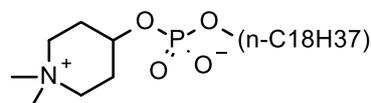
Figure 9 : Structure de la lactoquinomycine **25** et de la frénolicine B **26**.

La détermination de la structure de la protéine Akt a permis de mettre en évidence un T-loop possédant deux résidus cystéines (C296 et C310) adjacent au résidu thréonine (T308). Deux composés naturels découverts, la lactoquinomycine **25** et de la frénolicine B **26**, présentent une activité inhibitrice de la PKB (**Figure 9**). Ces molécules inhibent de façon irréversible l'activité de la kinase Akt par un nouveau mécanisme allostérique au niveau de la caractéristique structurale la protéine,^[15] la fixation irréversible de ces composés s'effectue alors sur les deux cystéines. Cependant ces inhibiteurs ne perturbent pas la phosphorylation du résidu T308, mais la protéine ne peut plus jouer son rôle de kinase.

4. Les inhibiteurs allostériques (PH Domain-Dependent)

Les inhibiteurs allostériques ont pour cible le domaine PH de la protéine Akt.^[12,15] Ce domaine présente 80% de similitudes entre chacun des isoformes mais seulement 30% par rapport aux autres protéines kinases, ce qui en fait une cible très spécifique vis-à-vis des inhibiteurs.

a) Pérfosine



27 : Perfosine (D-21266)

Figure 10 : Structure de la périfosine 27.

La Périfosine 27 est une pipéridine substituée par un groupement alkylphosphocholine (**Figure 10**).^[15] Le rôle de cette molécule, actuellement en essai clinique de phase II,^[17] est de perturber la localisation membranaire d'Akt induisant une diminution de la phosphorylation du résidu thréonine.

b) Analogues de Phosphatidylinositols

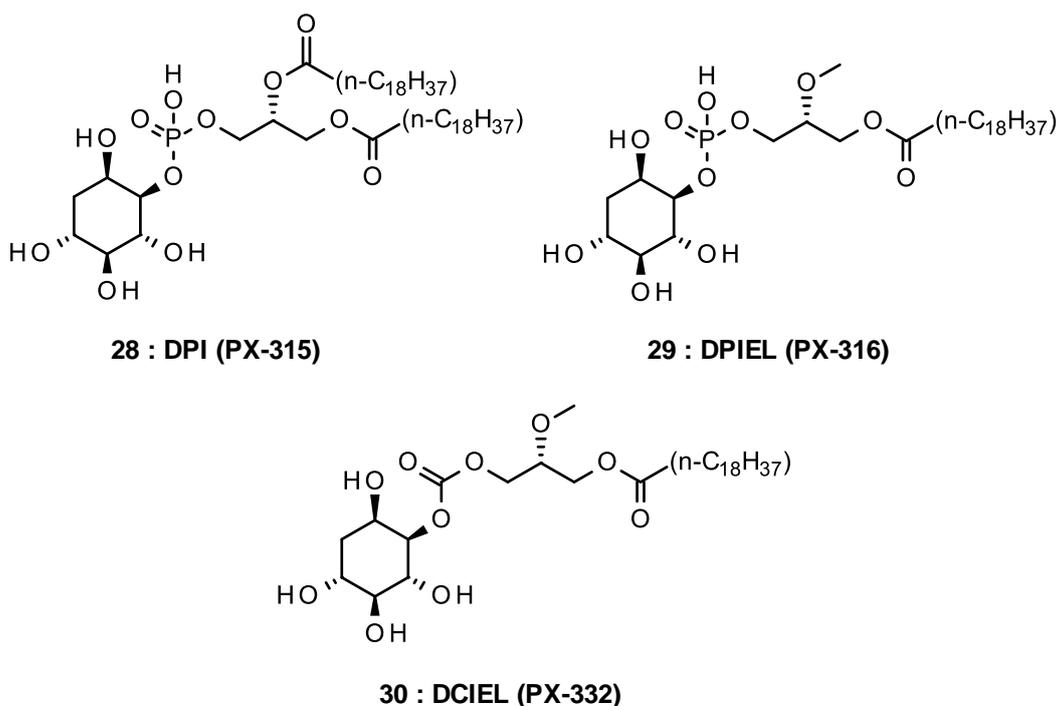


Figure 11 : Structure des analogues phosphatidylinositols 28-30.

Une approche d'inhibition de l'activité d'Akt en visant le domaine PH a également été envisagée par modification de la structure de PIP3 aboutissant à la conception et la synthèse des phosphatidylinositols 28-30 (**Figure 11**).^[15]

c) Dérivés de type diphénylquinoxaline

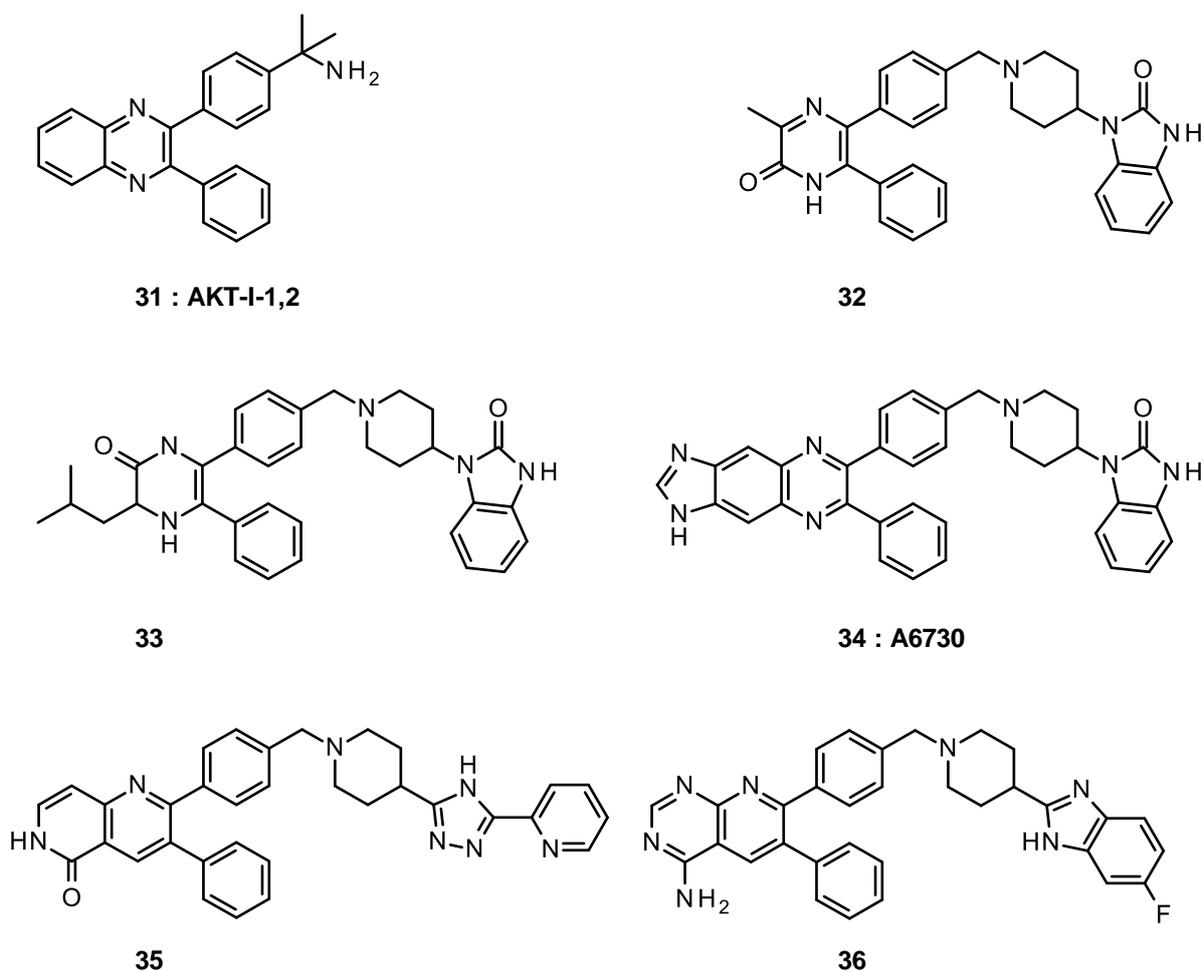


Figure 12 : Structure des inhibiteurs de type diphénylquinoxaline 31-36.

Les laboratoires Merck ont entrepris, il y a quelques années, le développement de nouveaux inhibiteurs des trois isoenzymes d'Akt^[12,14,15,18]. Par un large criblage, un nouveau « lead compound » de type 2,3-diphénylquinoxaline **31** s'est révélé actif sur les trois isoenzymes d'Akt en tant que inhibiteur allostérique. Cependant, les valeurs trop élevées des IC₅₀ de ce composé **31** ont amené à le modifier par de nouvelles pharmacomodulations conduisant aux pyrazinones, quinoxalines, pyrimidines et pyridines actives **32-36** substituées de groupements communs de type phényle et 4-(2-cétobenzimidazolin-1-yl)pipéridinylbenzyle, 4-(5-fluorobenzimidazolin-2-yl)pipéridinylbenzyle ou 2-(3-piperidin-4-yl-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)pyridinylbenzyle (**Figure 12**).^[14,15,18-21] Ces nouveaux composés **32-36** se sont alors révélés être plus sélectifs que l'inhibiteur de référence **31**.

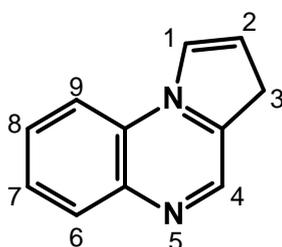
C. Conclusion

La protéine kinase B (PKB) jouant un rôle important dans la régulation de l'apoptose, la recherche d'inhibiteurs d'Akt s'est révélée être une voie intéressante en chimiothérapie anticancéreuse. Il existe dans la littérature quelques inhibiteurs d'Akt, mais de nombreux travaux restent encore à réaliser afin de diminuer leur toxicité et d'améliorer leur pouvoir inhibiteur ainsi que leur perméabilité cellulaire. Ainsi, au cours de ce travail de recherche, nous envisagerons la conception et la synthèse de nouvelles molécules dont nous testerons l'activité inhibitrice au moyen de tests fonctionnels.

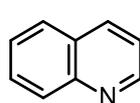
III. Travaux de recherche

A. Partie Chimie

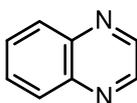
Afin d'obtenir une réponse apoptotique optimale, une inhibition simultanée d'Akt1 et d'Akt2 est requise.^[18] Par conséquent, les recherches actuelles se basent davantage sur la conception de ce type d'inhibiteurs qui sembleraient beaucoup plus efficaces que les inhibiteurs compétitifs d'ATP.



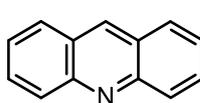
Synthon pyrrolo[1,2-a]quinoxaline



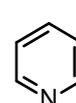
quinoline



quinoxaline



acridine



pyridine

Figure 13 : Bio-isostérie du noyau pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline.

L'approche classique du "drug design" passe par l'identification d'une structure de base pouvant par des modulations chimiques conduire à de nouveaux composés à potentialité thérapeutique. Cette stratégie, basée sur l'analyse des données de la littérature et sur la faisabilité de la synthèse chimique, repose aussi sur des études de Relation Structure-Activité pouvant aider à prévoir des améliorations en termes d'activité biologique. Dans le cadre de nos recherches, la stratégie de notre programme s'est déclinée à partir de molécules issues de la biochimie des pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines,^[22-24] composés bio-isostères des noyaux quinoléine, quinoxaline, acridine et pyridine, qui constituent de bons pharmacophores capables de fournir des composés actifs dans différents domaines de la pharmacologie (**Figure 13**). Nous avons donc articulé notre démarche de synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels d'Akt autour de cette plateforme moléculaire (définie comme notre synthon hétérocyclique de base) de structure proche de celle des inhibiteurs de références, le composé **34** (A6730) et ses analogues structuraux.

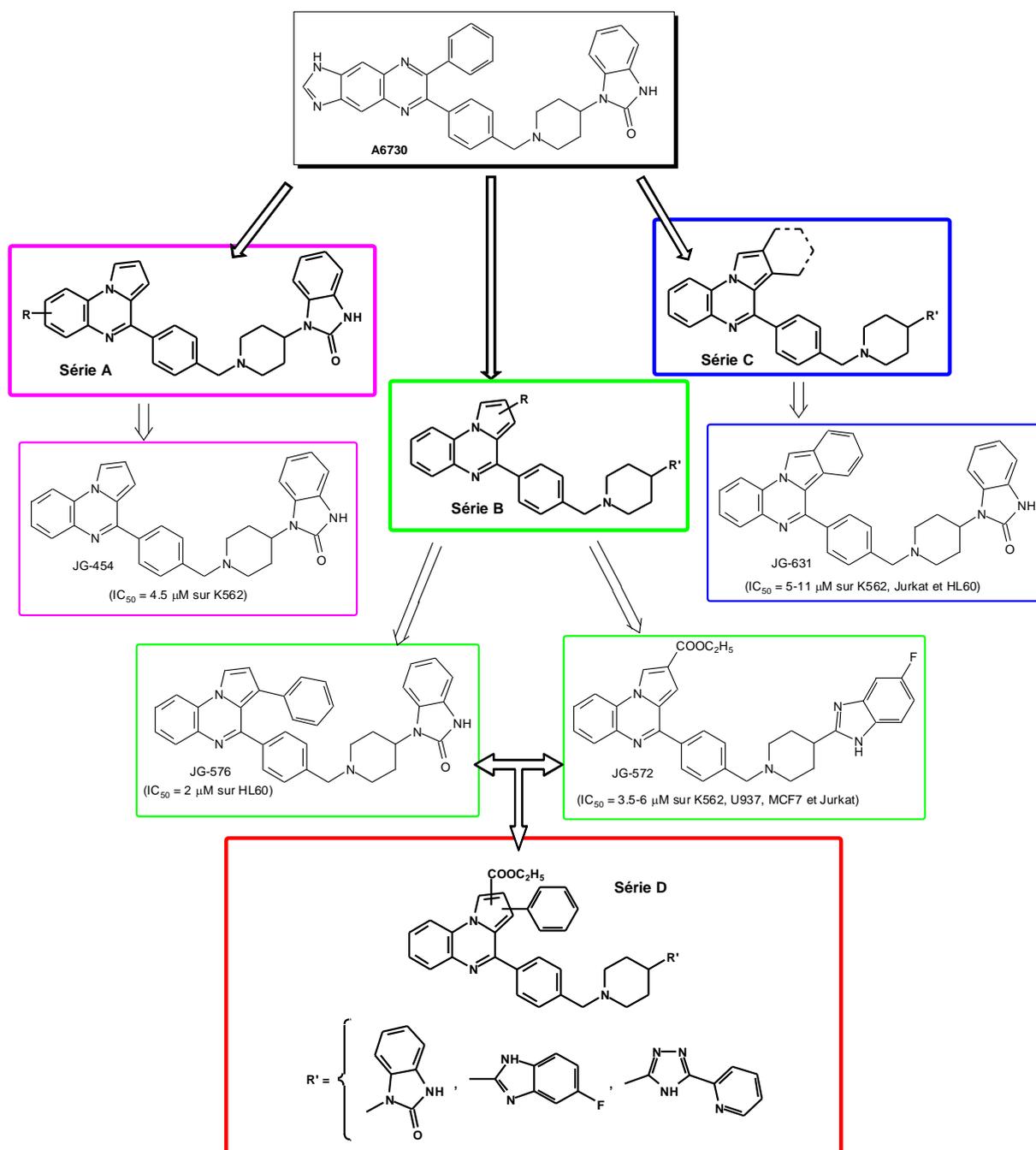


Figure 14 : Structures chimiques des séries A-D.

Dans un programme de recherche antérieur réalisé au sein de l'équipe « Pharmacochimie », nous avons envisagé la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs potentiels d'Akt (série A), analogues structuraux du composé A6730 (34). Ces travaux ont montré que le composé "1,3-dihydro-1-{1-[4-(pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-4-yl)benzyl]piperidin-4-yl}-2*H*-benzimidazol-2-one" JG-454 s'avérait être un pharmacophore très intéressant pour l'accès à de nouvelles molécules

biologiquement actives (**Figure 14**).^[25] Ainsi, par de nouvelles fonctionnalisations, l'équipe du laboratoire a montré que l'introduction d'un phényl ou d'une fonction ester éthylique sur le pharmacophore de base avait abouti à deux dérivés antiprolifératifs JG-572 et JG-576 particulièrement prometteurs (série B).^[26] Une 3^{ème} série (série C) a ensuite été envisagée et a conduit à des analogues à conformation restreinte de la molécule de référence **34**.^[27]

L'ensemble de ces résultats nous ont alors amené à effectuer de nouvelles pharmacomodulations sur le noyau pyrrole de notre synthon de base. En nous basant plus particulièrement sur les résultats biologiques obtenus pour nos composés JG-572 et JG-576 issus de la série B, nous avons donc décidé de concevoir et synthétiser, dans une 4^{ème} série (série D), de nouvelles pyrrolo[1,2-a]quinoxalines **1a-l** via la fonctionnalisation du système pyrrolique de façon simultanée par des groupements ester éthylique et phényle (**Figure 14**). Puis dans un second temps, nous avons testé nos nouveaux inhibiteurs sur différentes lignées cellulaires leucémiques afin de mesurer leur potentiel thérapeutique.

B. Partie Biologie

La voie PI3K/Akt joue un rôle dans le développement de nombreuses tumeurs solides mais aussi dans un certain nombre d'hémopathies malignes.

Afin d'évaluer l'activité, la spécificité et la sélectivité de nos composés synthétisés (Série D), ceux-ci ont été testés principalement sur des lignées leucémiques humaines qui nous ont servi de modèle d'étude ; à savoir :

- La lignée HL60 (lignée humaine immortalisée de leucémie aiguë promyélocytaire [LAP ou LAM3]).^[28]
- La lignée Jurkat (lignée immortalisée à partir d'une leucémie aiguë lymphoblastique de type T [LAL-T]).^[29]
- La lignée K562 (lignée humaine immortalisée de leucémie myéloïde chronique [LMC]).^[30]
- La lignée U266 (lignée humaine immortalisée de myélome multiple).^[31]
- La lignée U937 (lignée humaine immortalisée à partir d'une leucémie monocyttaire).^[32]

Dans un premier temps, des tests de prolifération cellulaire, qui utilise une méthode colorimétrique à l'aide d'un composé tétrazolé, ont été effectués. Ces tests ont

permis alors d'évaluer la toxicité de nos inhibiteurs. Les effets de nos composés à différentes concentrations ont été testés sur des cellules mononucléées sanguines isolées à partir de sang total et sur nos lignées cancéreuses.

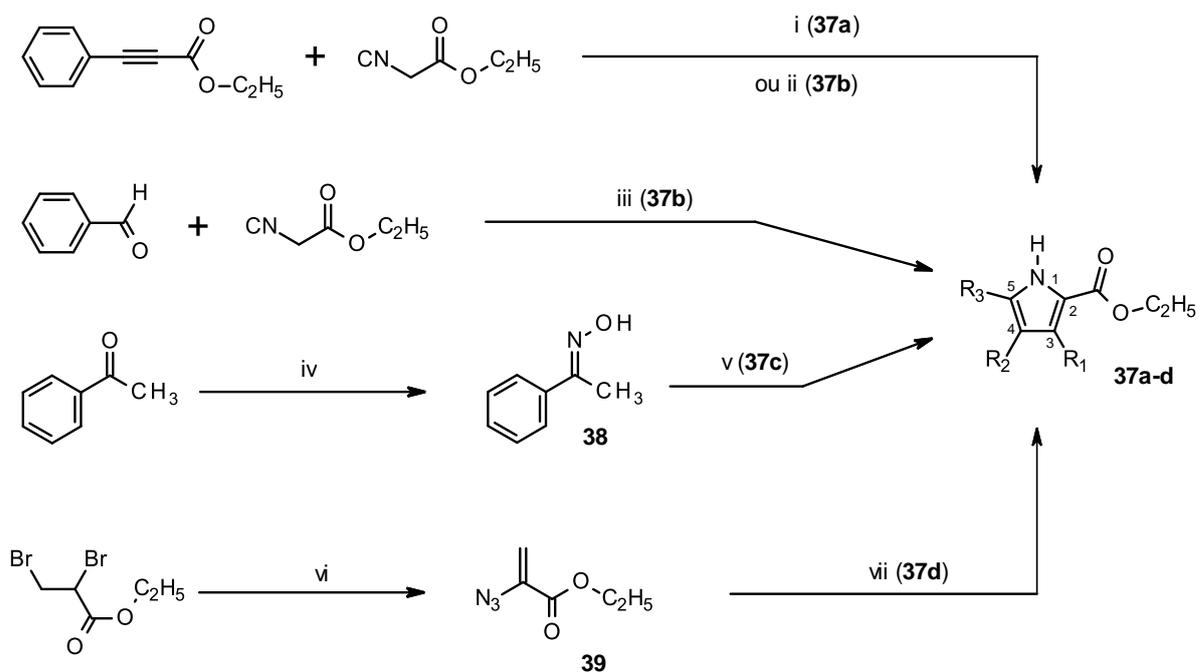
Le pouvoir inhibiteur de nos composés a ensuite été comparé à l'inhibiteur de référence **34** (A6730).

Dans un second temps, nous avons étudié à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-phospho-Akt la phosphorylation/déphosphorylation d'Akt en présence ou en l'absence d'inhibiteurs par cytométrie en flux.

IV. Résultats et Discussion

A. Synthèse chimique

La synthèse de ces nouvelles pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1a-l** a été réalisée en six ou sept étapes à partir des matières premières commerciales correspondantes selon les séquences réactionnelles suivantes (**Schémas 1 et 2**).



	R₁	R₂	R₃
37a			-H
37b			-H
37c		-H	
37d	-H		

Schéma 1: Réactifs et conditions : (i) dppp, dioxane, 100°C ; (ii) Cu₂O, phénanthroline, dioxane, 100°C ; (iii) C₆H₅-CHO, DBU, THF, 50°C ; (iv) H₂NOH, EtOH, Δ ; (v) 1/ H₅C₂OOC-C≡C-COOC₂H₅, DABCO, toluène, 80°C, micro-ondes, 5 min, 800 W, 2/ 170°C, P, 15 h ; (vi) NaN₃, DMF, 65°C ; (vii) C₆H₅-CO-CH₂-COOC₂H₅, Mn(OAc)₃, 2H₂O, 40°C.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la préparation des dérivés esters pyrroliques **37a-d** selon différentes stratégies de synthèse de façon à envisager la substitution des groupements esters éthyliques et phényles sur différentes positions du noyau hétérocyclique (**Schéma 1**). Le pyrrole **37a**, porteurs des deux fonctions esters sur les positions 2 et 3 et du phényle en 4, est synthétisé par action de l'isocynoacétate d'éthyle sur le phénylpropiolate d'éthyle en présence de 1,3-bis(diphénylphosphino)propane (dppp) selon une cyclo-addition [3+2].^[33,34] Le ligand phosphoré permet alors d'orienter la fonctionnalisation des différents substituants sur le noyau pyrrolique. L'utilisation de Cu₂O comme catalyseur dans des conditions expérimentales similaires à cette même réaction conduit au dérivé pyrrole trisubstitué **37b**.^[33,34] De même, nous avons montré qu'il était possible de préparer ce composé **37b** par l'emploi de deux équivalents d'isocynoacétate d'éthyle sur le benzaldéhyde en utilisant du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) comme base.^[35,36] La synthèse du pyrrole **37c** s'effectue en deux étapes à partir de l'acétophénone *via* l'oxime **38**. Cet oxime **38**, formé par action d'hydroxylamine sur l'acétophénone,^[37] est alors engagé avec l'acétylène-dicarboxylate d'éthyle en présence de DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) dans une réaction de type Trofimov pour former le pyrrole **37c** *via* un réarrangement thermique.^[37,38] La synthèse du dernier dérivé pyrrolique **37d** passait au préalable par le traitement du 2,3-dibromopropanoate d'éthyle avec un excès d'azoture de sodium (NaN₃) pour mener à l'ester vinylique **39**.^[39,40] L'étape suivante consistait en la formation du pyrrole **37d** en faisant réagir cet azido-ester vinylique **39** sur un α -céto-ester, ici le 3-oxo-3-phénylpropanoate d'éthyle, en présence d'un catalyseur au manganèse (Mn(OAc)₃.2H₂O).^[39]

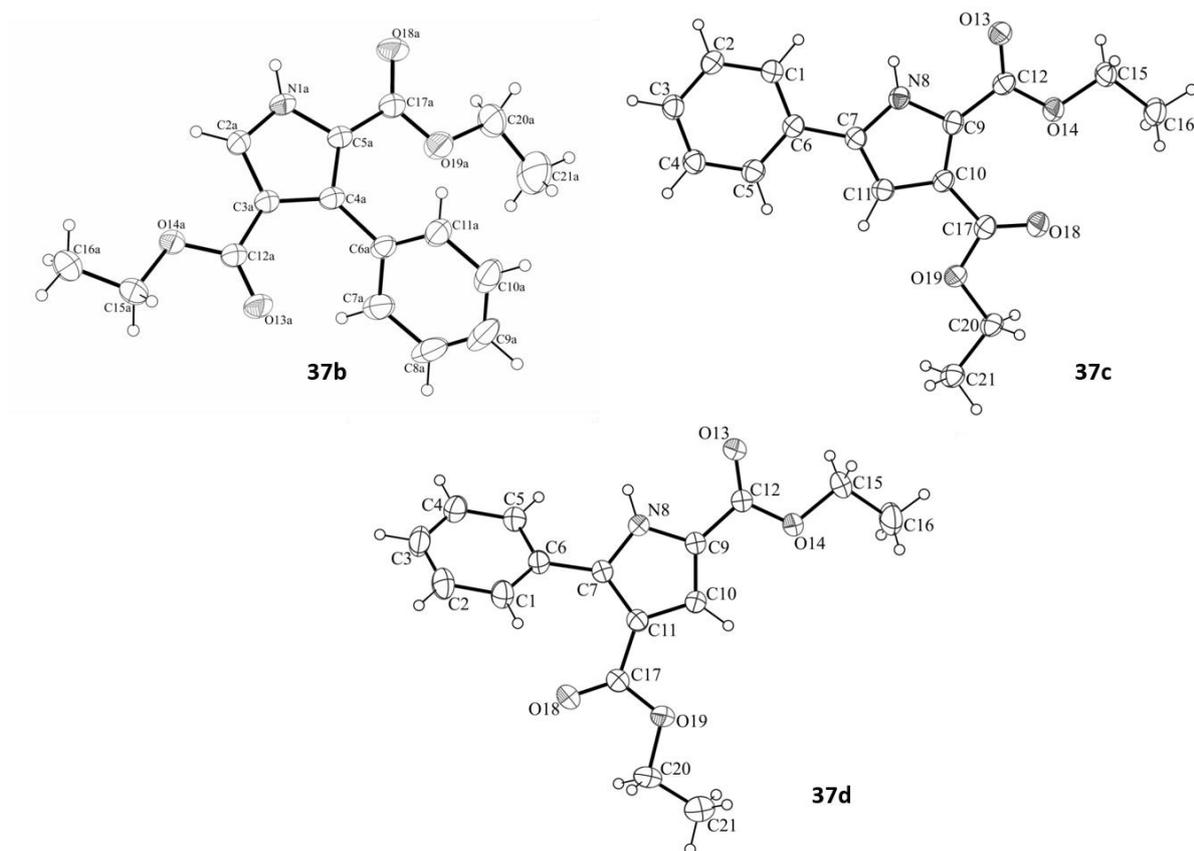
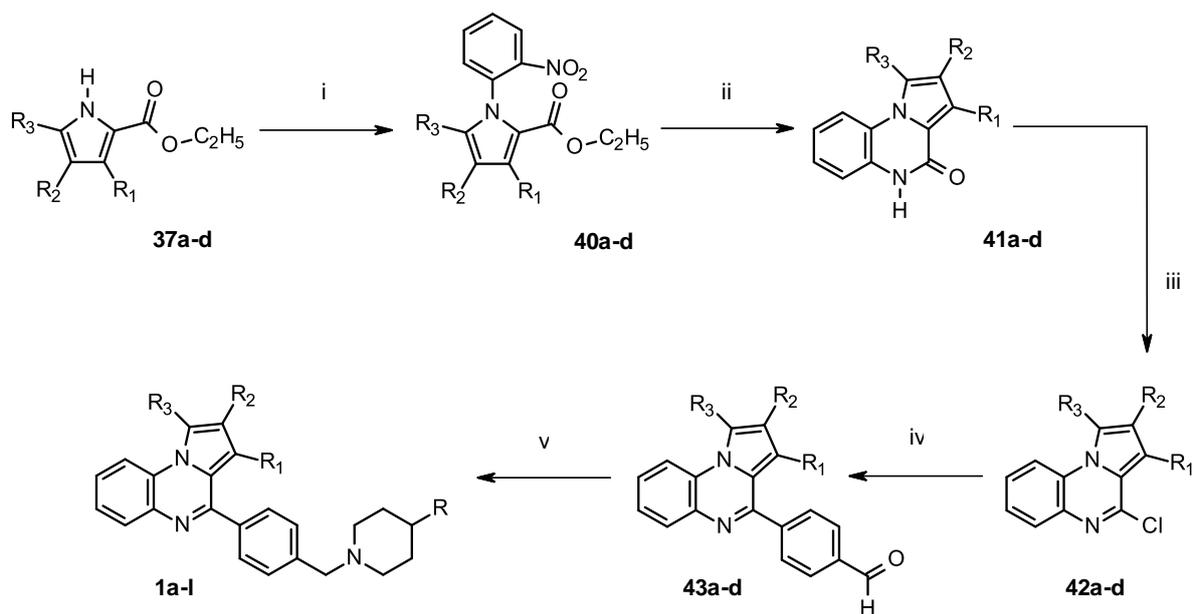


Figure 15 : Représentations ORTEP des composés **37b**, **37c** et **37d**.

La préparation des composés **37b-d** a permis d'isoler des cristaux qui ont conduit à une étude radiocristallographique. La résolution par RX de ces structures ont permis de confirmer de façon non-ambiguë les résultats obtenus préalablement par analyses IR, RMN ^1H et ^{13}C (**Figure 15**).



	R ₁	R ₂	R ₃
40a-43a, 1a-c			-H
40b-43b, 1d-f			-H
40c-43c, 1g-i		-H	
40d-43d, 1j-l	-H		

R		
1a, d, g, j	1b, e, h, k	1c, f, i, l

Schéma 2 : Réactifs et conditions : (i) 2-fluoro-nitrobenzène, Cs₂CO₃, DMF, Δ ; (ii) Fe, CH₃COOH, Δ ; (iii) POCl₃, Δ ; (iv) OHC-C₆H₄-B(OH)₂, Pd[P(C₆H₅)₃]₄, K₂CO₃, toluene, EtOH, Δ ; (v) 4-(2-ketobenzimidazolin-1-yl)piperidine ou 4-(5-fluorobenzimidazolin-2-yl)piperidine ou 2-(3-piperidin-4-yl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)pyridine, NaBH₃CN, MeOH, Δ.

Les pyrroles **37a-d** sont alors traités avec le 1-fluoro-2-nitrobenzène lors d'une réaction de substitution nucléophile pour former les composés **40a-d (Schéma 2)**.^[26,27] Cette réaction de substitution s'effectue en présence d'une base, ici le carbonate de césium. La réduction du groupement nitro en fonction amine au moyen d'un traitement fer/acide acétique mène à la formation des lactames **41a-d** après cyclisation intramoléculaire. Soumis à l'oxychlorure de phosphore, ces lactames **41a-d** se prêtent alors à une chlorodéshydroxylation, formant les dérivés 4-chloropyrroloquinoxaline **42a-d**. Ces dérivés chlorés **42a-d** sont ensuite soumis à un couplage métallo-catalysé ($\text{Pd}^{(0)}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$) *via* une réaction de Suzuki-Miyaura en présence de l'acide 4-formylphénylboronique à chaud dans le toluène pour permettre l'accès aux aldéhydes **43a-d**.^[26,27]

La suite de la synthèse passe par une condensation réductrice d'une amine secondaire, la 4-(2-cétobenzimidazolin-1-yl)pipéridine, la 4-(5-fluorobenzimidazolin-2-yl)pipéridine ou la 2-(3-piperidin-4-yl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)pyridine, sur les aldéhydes **43a-d** au moyen d'un traitement au cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) en solution méthanolique pour conduire aux pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines **1a-l**.^[26,27]

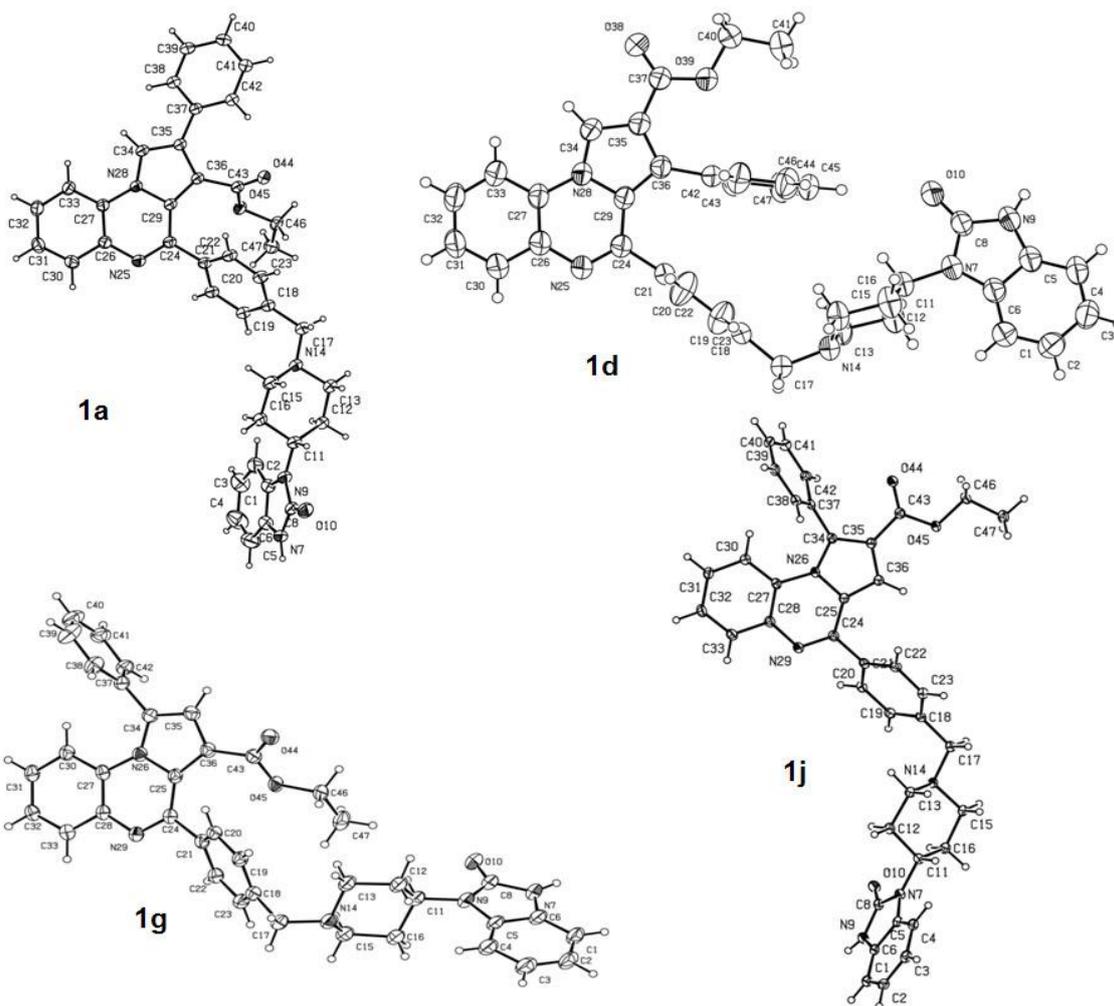


Figure 16 : Représentations ORTEP des composés **1a**, **1d**, **1g** et **1j**.

La résolution de la structure des quatre pyrroloquinoxalines **1a**, **1d**, **1g** et **1j** par des études radiocristallographiques a également permis de confirmer de façon non-ambiguë les résultats obtenus préalablement par analyses IR, RMN ^1H et ^{13}C (**Figure 16**).

B. Evaluation biologique

Les douze composés finaux synthétisés **1a-l** ainsi que l'inhibiteur de référence **34** (A6730) ont été testés afin de déterminer leur hématotoxicité éventuelle, et leur potentiel d'inhibition sur la prolifération des lignées leucémiques humaines HL60, Jurkat, K562, U266 et U937, ainsi que leurs effets sur la phosphorylation d'Akt.

1. Effet des inhibiteurs sur la prolifération des cellules mononucléées sanguines (CMN) et des lignées leucémiques HL60, Jurkat, K562, U266 et U937

Composés	HL60 (en μM)	Jurkat (en μM)	K562 (en μM)	U266 (en μM)	U937 (en μM)	CMN (en μM)	CMN+PHA (en μM)
1a	>50	41	4	>50	>50	>50	>50
1b	19	5	3	3,5	21	>50	14
1c	12	5	14	>50	7	>50	16
1d	3,5	4	9	10	>50	>50	41,3
1e	10	5	3	18	ND	+++	+++
1f	5	2	7	5	7	>50	8
1g	6	4	8	9	9	>50	>50
1h	8	6	7	4	4	>50	50
1i	24	5	12	8	11	>50	50
1j	ND	6,5	8,5	>50	>50	>50	>50
1k	ND	3,5	3	3	3	>50	13
1l	ND	3	3,5	3	8	>50	12
A6730(34)	ND	3,5	26	ND	6	>50	>50

Tableau 1 : IC₅₀ des composés **1a-l** sur les CMN +/- PHA et les lignées HL60, Jurkat, K562, U266 et U937. Les IC₅₀ sont exprimées en μM .

L'hématotoxicité de nos composés et du composé de référence A6730 a été déterminée sur des CMN sanguines activées ou non par la PHA avec des concentrations croissantes d'inhibiteurs allant de 0 à 50 μM . Ces résultats permettent de calculer les concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la prolifération (IC₅₀) répertoriées dans le **tableau 1**. Les composés n'ayant pas d'effet sur la prolifération des CMN activées par la PHA sont considérés comme non hématotoxiques (IC₅₀ \geq 50 μM). Parmi les douze inhibiteurs testés, cinq sont non hématotoxiques (**1a**, **1g**, **1h**, **1i** et **1j**) comme le composé **34**, alors que les composés **1b**, **1c**, **1d**, **1f**, **1k** et **1l** sont considérés comme hématotoxiques. La **Figure 17** montre les résultats obtenus pour le composé **1h** qui inhibe la prolifération cellulaire de nos trois lignées leucémiques Jurkat, K562 et U937 avec des IC₅₀ respectives de 6, 7 et 4 μM . Nos douze composés présentent une activité antiproliférative sur la lignée Jurkat avec des IC₅₀ variant de 2 à 41 μM , et sur la lignée K562 avec des IC₅₀ variant de 3 à 14 μM (**Tableau 1**). Pour la lignée U937, les composés **1a**, **1d** et **1j** ne présentent pas d'activité antiproliférative avec des IC₅₀ > 50 μM , pour la lignée U266, se sont les composés

1a, 1c et **1j** qui ne présentent pas d'activité antiproliférative. Pour la lignée HL60, seul le composé **1a** possède une $IC_{50} > 50 \mu M$ mais les tests antiprolifératifs en présence des molécules **1j-l** n'ont pas encore été effectués.

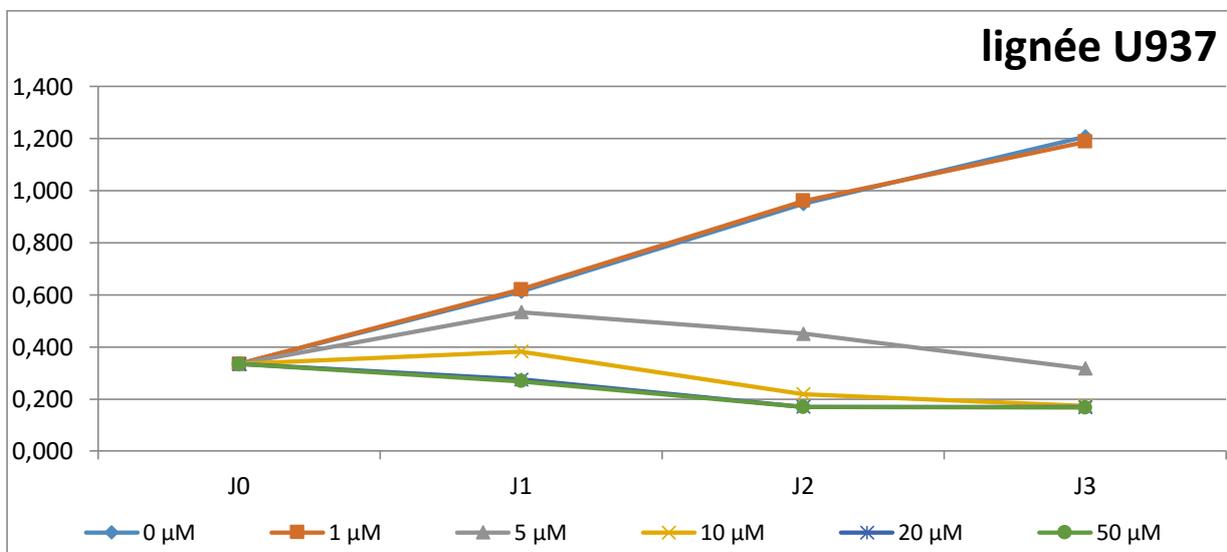
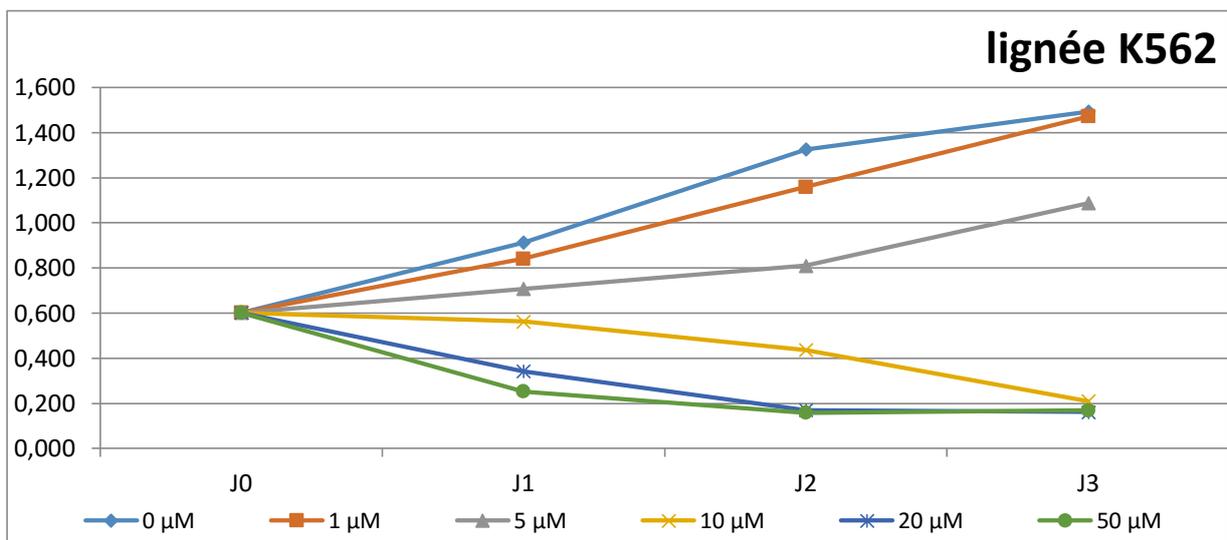
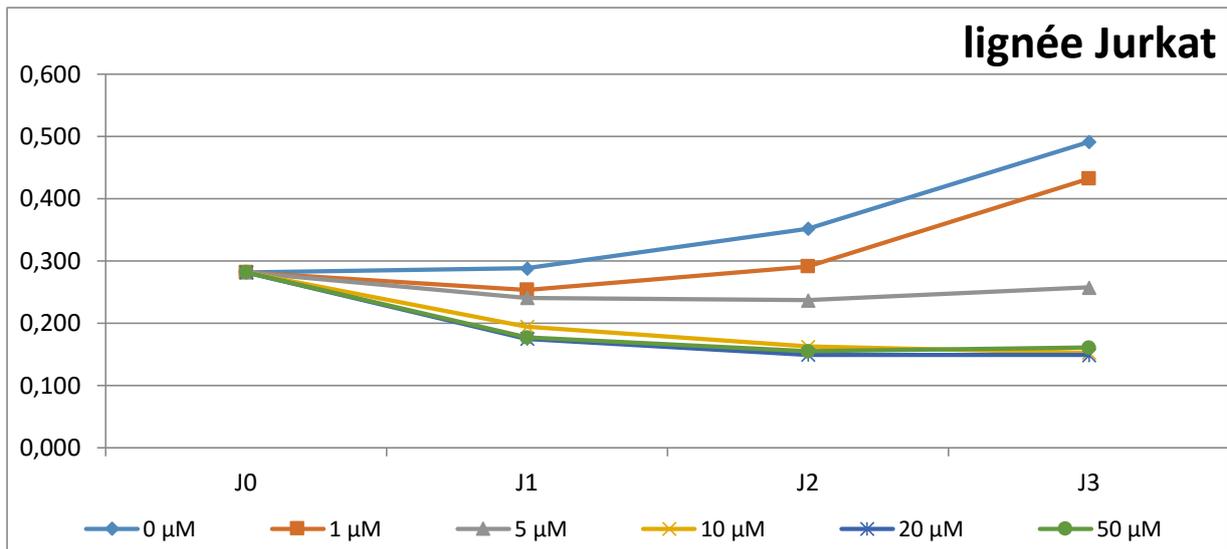


Figure 17 : Prolifération des lignées Jurkat, K562 et U937 en présence du composé **1h** à des concentrations croissantes sur 3 jours.

2. Etude de la phosphorylation de la protéine Akt par cytométrie en flux

Comme nous l'avons décrit précédemment, la protéine Akt est active lorsqu'elle est phosphorylée, ainsi nous avons étudié son taux de phosphorylation sur la S473 en présence de l'inhibiteur de référence A6730 (**34**) ou de notre composé **1h** à différentes concentrations variant de 0 à 50 μM pendant 2 heures.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la phosphorylation basale des différentes lignées hématopoïétiques. Ces résultats nous ont permis de montrer que les lignées Jurkat, K562 et U937 présentent toutes une activité de phosphorylation du résidu S473. La lignée Jurkat présente le niveau de phosphorylation le plus important (MFI = $0,7 \pm 0,2$), puis la lignée U937 (MFI = $0,4 \pm 0,2$) et enfin la lignée K562 présente le niveau de phosphorylation le plus faible (MFI = $0,3 \pm 0,1$).

L'inhibiteur A6730 diminue la phosphorylation d'Akt de manière dose-dépendante dès 0,5 μM (MFI = 0,5 vs 1) pour la lignée Jurkat, ainsi que pour la lignée U937 (MFI = 0,5 vs 0,7) (**Figure 18**). La lignée K562 présente également une diminution de la phosphorylation d'Akt mais ayant un taux de phosphorylation basale moins marqué que les deux lignées précédentes, nous avons choisi de ne pas présenter les résultats.

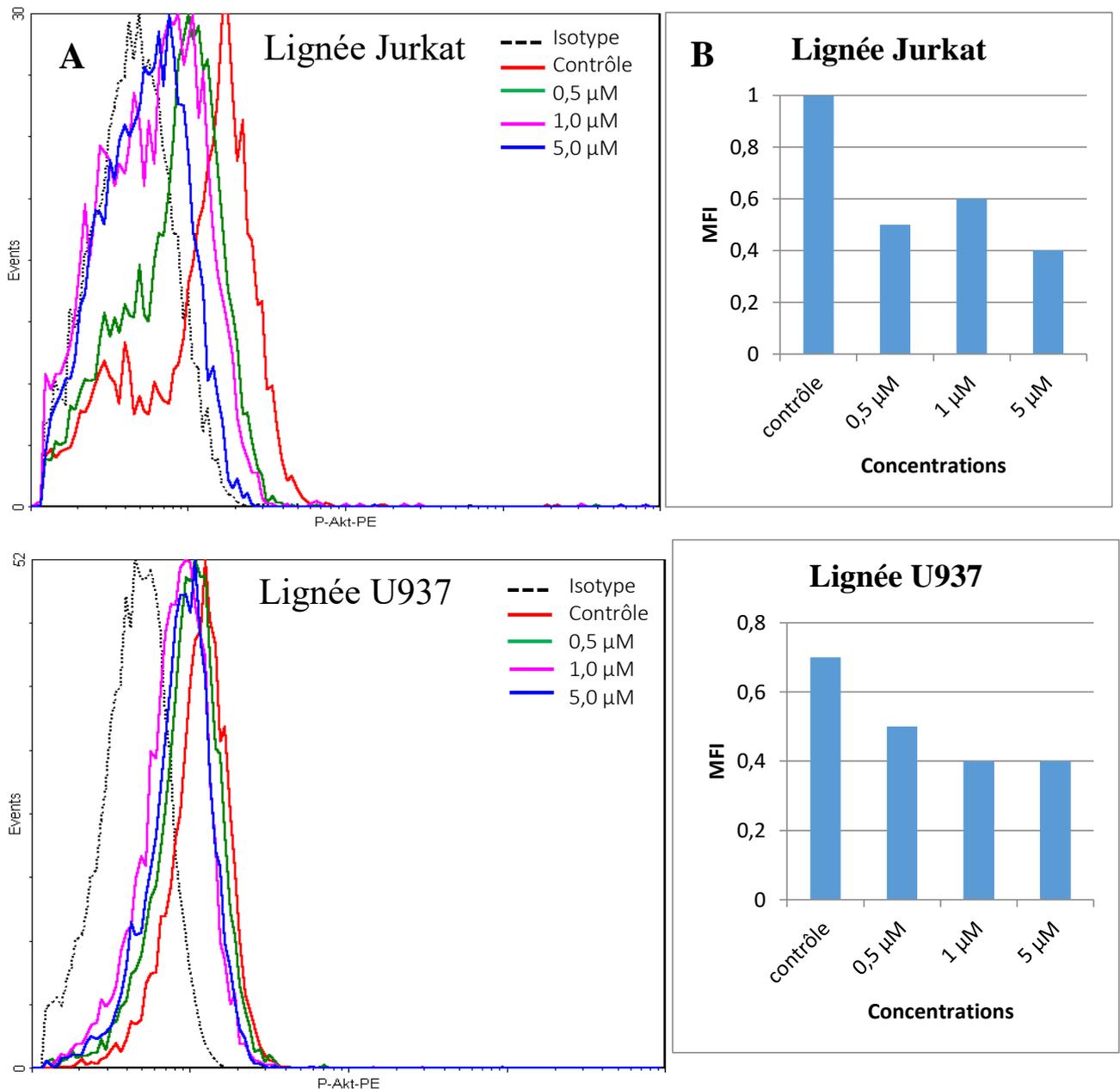


Figure 18 : A. Graphes monoparamétriques montrant le taux de phosphorylation des lignées Jurkat et U937 après 2h d'incubation avec le composé **A6730** (Une expérience représentative parmi 2). B : Histogrammes représentant les MFI.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'un de nos inhibiteurs potentiellement intéressant, le composé **1h** sur la phosphorylation d'Akt, afin de mettre en évidence une éventuelle spécificité de cet inhibiteur sur Akt.

Le composé **1h** inhibe la phosphorylation d'Akt dans la lignée Jurkat dès 0,5 μM et de manière dose-dépendante (**Figure 19**). En revanche, il ne montre pas d'effet sur la phosphorylation d'Akt pour la lignée U937 et K562.

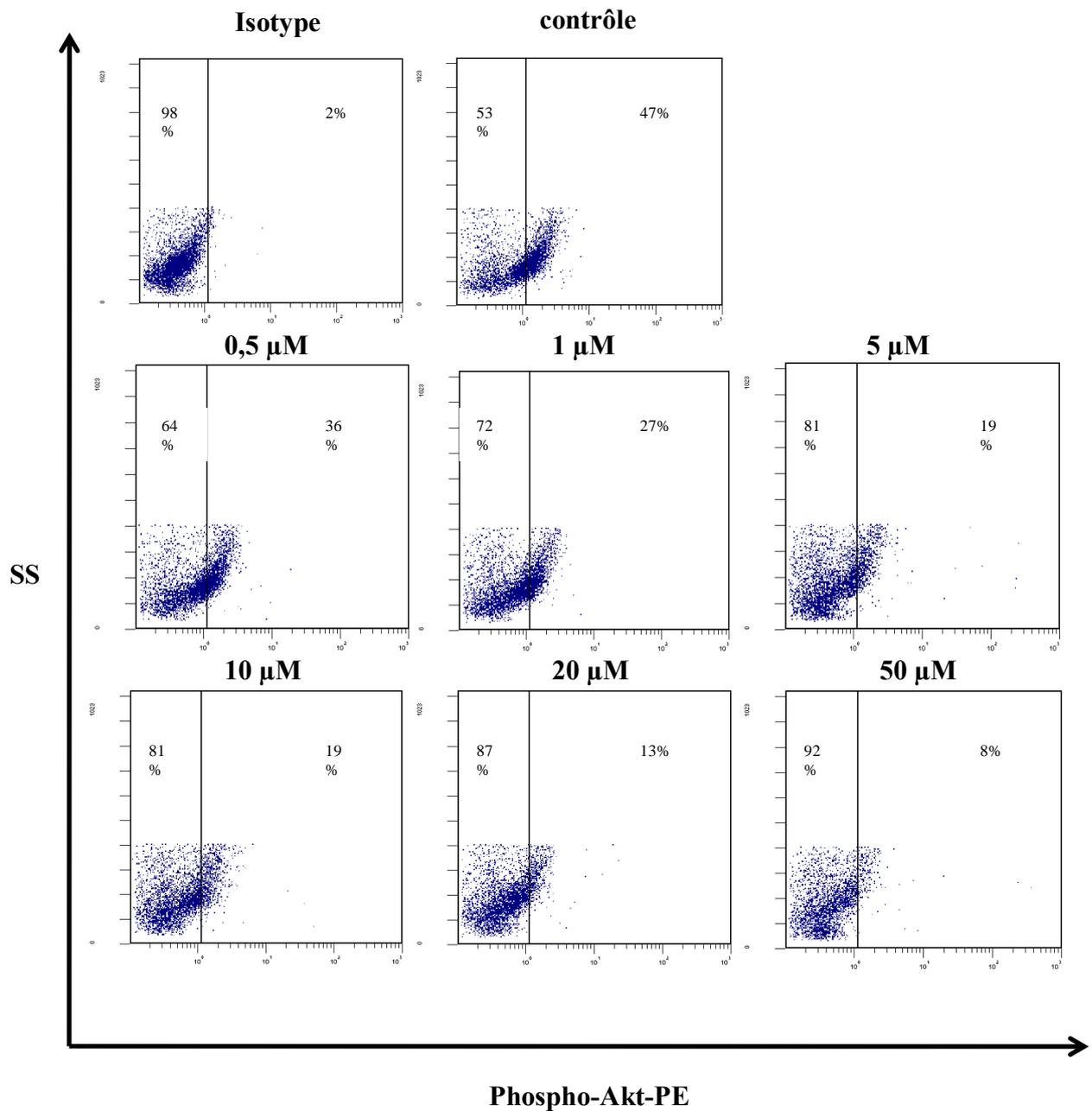


Figure 19 : Graphes montrant le niveau de phosphorylation de la lignée Jurkat après 2h d'incubation avec le composé **1h**.

C. Etudes préliminaires de Relations Structure-Activité

Les premiers résultats biologiques ont montré une activité antiproliférative pour une grande majorité de nos composés **1** testés.

Sur la lignée Jurkat, tous nos composés **1** présentent une activité à une dose comprise entre 2 et 6,5 μM , comparable à celle de la molécule de référence **34**, le composé A6730. Malgré les différentes pipéridines, tous les composés présentent une bonne activité antiproliférative ce qui laisse supposer que les interactions protéines-molécules se font au niveau du squelette de ces molécules, cependant seul le dérivé **1a** présente une très faible activité avec une IC_{50} de 41 μM . Il en est plus ou moins de même que la lignée HL60, le composé **1a** étant encore moins actif avec une IC_{50} supérieure à 50 μM , pour ce qui est des composés **1j** à **1l**, les tests antiprolifératifs n'ont pas encore été effectués.

Sur la lignée K562, l'ensemble de ces pyrroloquinoxalines **1** testées exercent une inhibition sur la prolifération cellulaire avec des IC_{50} allant de 3 à 14 μM , ce qui est bien meilleur que le composé de référence **34** qui lui possède une activité antileucémique avec une IC_{50} de 26 μM .

Ces différentes molécules, sur la lignée U266, présentent une plus grande disparité en termes d'inhibition avec des IC_{50} comprises entre 3 et 18 μM pour les composés actifs, les composés **1a**, **1c** et **1j** étant inactifs. Cette absence d'activité ne peut pas être expliquée par le choix des différentes pipéridines, les composés **1a** et **1j** ayant le même groupement de type 4-(2-cétobenzimidazolin-1-yl)piperidinylbenzyle que les composés **1d** et **1g** qui eux présentent une bonne activité inhibitrice.

En ce qui concerne la lignée U937, les résultats biologiques montrent également une plus grande variation au niveau activité avec des IC_{50} comprises entre 3 et 21 μM pour les composés les plus actifs. Cependant, il est possible de constater que les dérivés **1a**, **1d** et **1j** possédant un groupement de type 4-(2-cétobenzimidazolin-1-yl)piperidinylbenzyle sur notre synthon de base ne présentent pas d'activité antiproliférative à l'exception du composé **1g** avec une IC_{50} de 9 μM . Ce même type de profil biologique est observé concernant les résultats sur les CMN (cellules mononucléées) sanguines activées par la PHA, puisque les pyrroloquinoxalines **1a**, **1d**, **1g** et **1j** semblent peu hématotoxiques avec de IC_{50} supérieures à 41,3 μM . Par ailleurs, les composés **1g** à **1i** substitués par les fonctions

phényle et ester éthylique respectivement sur les positions 1 et 3 ne montrent pas d'effet significatif à des concentrations supérieures ou égales à 50 μM sur les CMN activées par PHA. Ces composés ne sont également pas cytotoxiques à ces concentrations.

De ces premiers résultats biologiques, il est à noter que ces nouveaux composés **1a-l** présentent des activités antiprolifératives supérieures voire égales à celles du composé de référence A6730. De plus, certains composés nous semblent prometteurs puisqu'ils présentent un index de sélectivité ($\text{IC}_{50} \text{CMN+PHA} / \text{IC}_{50} \text{lignée leucémique}$) similaire, voire meilleur, à la quinoxaline A6730 **34**. L'intégralité des résultats biologiques de nos composés devrait ensuite nous permettre d'envisager des études de relations structure-activité plus complètes et plus approfondies. Par ailleurs il sera également nécessaire d'approfondir le mécanisme d'action de nos composés les plus actifs par des tests fonctionnels mais également par des études de « docking » ce qui permettra d'optimiser la synthèse de nouveaux composés de cette série des pyrroloquinoxalines. Les tests préliminaires de cytométrie en flux effectués avec le composé **1h** montre en effet, que ce dernier pourrait inhiber la phosphorylation d'Akt et par conséquent la transduction du signal de cette voie.

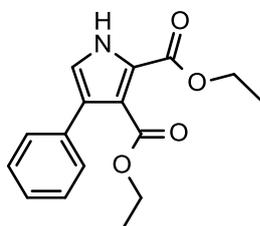
V. Matériel et méthodes

A. Synthèse chimique

Les points de fusions ont été mesurés à l'aide d'une platine chauffante de type SM LUX POL (Leitz®) et n'ont pas été corrigés. Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Brüker® IFS-25, après compression des produits solides en mélange avec du KBr (Bromure de Potassium) pour former une pastille. Les spectres R.M.N. (^1H) ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker® AVANCE-300 après solubilisation dans le DMSO- d_6 (Diméthylsulfoxyde- d_6) ou dans du CDCl_3 . Les valeurs de déplacements chimiques ont été exprimées en parties par million (δ ou ppm) par rapport au tétraméthylsilane (référence interne). Les constantes de couplage J ont été données en Hertz (Hz). Les multiplicités des signaux ont été indiquées à l'aide des abréviations suivantes : s, singulet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet de doublet; ddd, doublet de doublet de doublet ; m, multiplet; sl, singulet large. Les manipulations sous

rayonnement micro-ondes ont été réalisées dans un réacteur MILESTONE® *Microwave Laboratory Systems Start S*.

4-Phénylpyrrole-2,3-dicarboxylate d'éthyle 37a

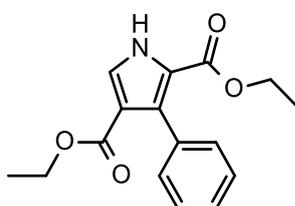


MM : 387.31 g.mol⁻¹

Formule : C₁₆H₁₇NO₄

A une solution de 0,75 mmol de 1,3-bis(diphénylphosphino)propane (dppp) dans 10 mL de dioxane sous atmosphère inerte sont ajoutés 6,2 mmol d'isocynoacétate d'éthyle et 5,17 mmol de phénylpropionate d'éthyle. Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 2 h. Le mélange est ensuite refroidi, filtré sur papier puis évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est alors purifié sur colonne chromatographique de silice (éluant : cyclohexane / acétate d'éthyle – 9/1 puis 8/2) pour conduire au composé **2a**. Rdt: 87%, Huile jaune.

3-Phénylpyrrole-2,4-dicarboxylate d'éthyle 37b



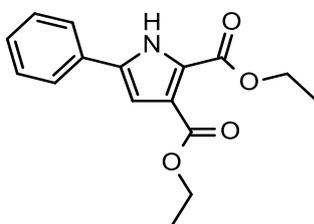
MM : 387.31 g.mol⁻¹

Formule : C₁₆H₁₇NO₄

Méthode A: A une solution de 0,221 mmol d'oxyde de cuivre (I) (Cu₂O) et 0,442 mmol de phénanthroline dans 10 mL de dioxane sous atmosphère inerte sont ajoutés 4,42 mmol d'isocynoacétate d'éthyle et 5,3 mmol de phénylpropionate d'éthyle. Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 2 h. Le mélange est ensuite refroidi, filtré sur papier puis évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est alors purifié sur colonne chromatographique de silice (éluant : cyclohexane / acétate d'éthyle – 9/1 puis 7/3) pour conduire au composé **2b**. Rdt: 58%, Cristaux blancs.

Méthode B : A une solution de 20 mmol de 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) et 20 mmol d'isocyanoacétate d'éthyle dans 30 mL de tétrahydrofurane sont ajoutés goutte à goutte en 15 min 10 mmol de benzaldéhyde en solution dans 10 mL de tétrahydrofurane. Le mélange réactionnel est alors chauffé à 50°C pendant 5 h, puis refroidi et neutralisé avec de l'acide acétique. Le mélange est ensuite évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl diluée puis à l'eau, séchée sur sulfate de sodium, décolorée au noir de carbone, filtrée et évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de silice (éluant : cyclohexane / acétate d'éthyle – 7/3) pour conduire au composé **2b**. Rdt = 21%, Cristaux blancs.

5-Phénylpyrrole-2,3-dicarboxylate d'éthyle **37c**

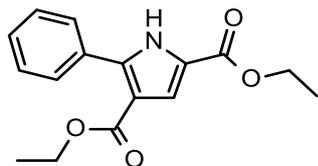


MM : 387.31 g.mol⁻¹

Formule : C₁₆H₁₇NO₄

A 0,74 mmol de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) et 7,4 mmol de l'oxime **3** en solution dans 20 mL de toluène anhydre sont ajoutés 7,4 mmol de H₅C₂O-C≡C-COOC₂H₅. Le mélange réactionnel est chauffé à 80°C pendant 5 min au microondes (P=800 W) puis transféré dans une enceinte métallique. Il est alors chauffé à 170°C sous pression pendant 2 h puis laissé refroidir pendant 15 h. Le mélange est ensuite évaporé à sec sous pression réduite après avoir filtré sur Célite. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de silice (éluant : éther de pétrole / acétate d'éthyle –8/2) pour conduire au composé **2c** après recristallisation dans l'éther de pétrole. Rdt = 28%, Cristaux rosés.

5-Phénylpyrrole-2,4-dicarboxylate d'éthyle 37d



MM : 387.31 g.mol⁻¹

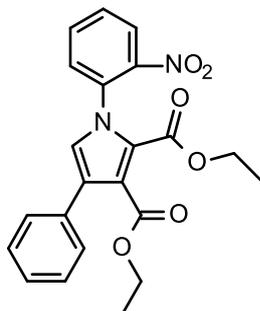
Formule : C₁₆H₁₇NO₄

Un mélange composé de 3,54 mmol de composé **4**, 5,32 mmol de 3-oxo-3-phénylpropanoate d'éthyle, 30 mL de méthanol, 7,1 mmol d'acide acétique et 1,42 mmol d'acétate de manganèse (III) est chauffé à 40°C pendant 2 h. Le mélange réactionnel est alors refroidi, neutralisé à pH = 6 avec une solution tampon (solution aqueuse 0,1 M d'hydroxyde d'ammonium et d'acétate d'ammonium à pH=9), puis extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur sulfate de sodium, décolorée au noir de carbone, filtrée et évaporé à sec sous pression réduite. Après refroidissement dans la glace, le résidu est ensuite repris et trituré dans l'éther éthylique jusqu'à cristallisation. Les cristaux formés sont alors filtrés sur fritté, lavés légèrement à l'éther éthylique puis à l'éther de pétrole pour conduire au composé **2d**. Rdt = 42%, Cristaux blancs.

Méthode générale pour la préparation du 1-(2-nitrophényl)-pyrrole-dicarboxylate d'éthyle **40a-d**

A 2,75 mmol de pyrrole **37a-d** solubilisé dans 11 mL de diméthylformamide (DMF) sont ajoutés 4,12 mmol de 2-fluoro-nitrobenzene et 3,3 mmol de carbonate de césium (Cs₂CO₃). L'ensemble est chauffé au reflux pendant 1 h15. Le mélange est refroidi puis dilué avec 35 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec 2 x 30 mL d'eau puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (NaCl), séchée sur sulfate de sodium, décolorée au noir de carbone, filtrée et évaporée à sec. Le résidu est refroidi puis repris dans de l'éther de pétrole puis on laisse décanter. L'opération est renouvelée puis on sèche sous pression réduite pour conduire au composé **37a-d**.

1-(2-Nitrophényl)-4-phényl-pyrrole-2,3-dicarboxylate d'éthyle 40a

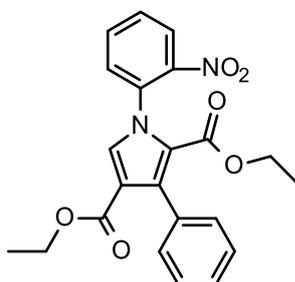


MM : 408.40 g.mol⁻¹

Formule : C₂₂H₂₀N₂O₆

Rdt = 85%, Huile orangée.

1-(2-Nitrophényl)-3-phényl-pyrrole-2,4-dicarboxylate d'éthyle 40b

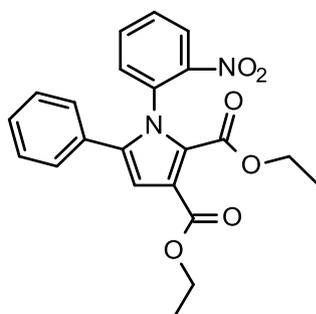


MM : 408.40 g.mol⁻¹

Formule : C₂₂H₂₀N₂O₆

Rdt = 89%, Huile jaune.

1-(2-Nitrophényl)-5-phényl-pyrrole-2,3-dicarboxylate d'éthyle 40c

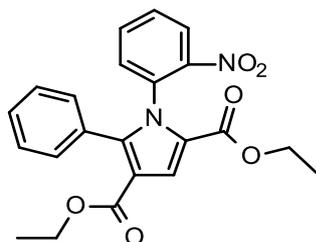


MM : 408.40 g.mol⁻¹

Formule : C₂₂H₂₀N₂O₆

Rdt = 65%, Huile jaune.

1-(2-Nitrophényl)-5-phényl-pyrrole-2,4-dicarboxylate d'éthyle 40d



MM : 408.40 g.mol⁻¹

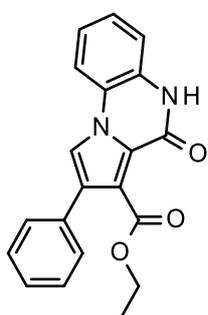
Formule : C₂₂H₂₀N₂O₆

Rdt = 28%, Huile jaune.

Méthode générale pour la préparation du 4,5-Dihydro-4-oxo-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-carboxylate d'éthyle 41a-d

A 0,78 g (0.00259 mol) de pyrrole **40a-d** solubilisé dans 11 mL d'acide acétique sont ajoutés 0,52 g (0.0094 mol) de fer en poudre. Le milieu est porté au reflux pendant 1 h 30. On refroidit le mélange à température ambiante puis on le verse sur 20 mL d'acide chlorhydrique (HCl_{aq}) à 1M, l'ensemble est mis sous agitation pendant 10 min. L'ensemble est filtré sur fritté et lavé avec 10 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl_{aq}) à 1 M puis à l'eau, puis à l'éther éthylique. Le produit est séché sous pression réduite pour conduire au composé **41a-d**.

4,5-Dihydro-4-oxo-2-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 41a

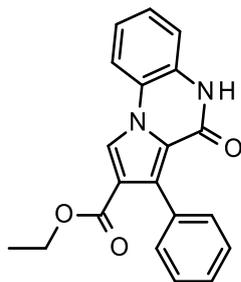


MM : 332.35 g.mol⁻¹

Formule : C₂₀H₁₆N₂O₃

Rdt = 69%, Cristaux crèmes, T_f = 240°C.

4,5-Dihydro-4-oxo-3-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 41b

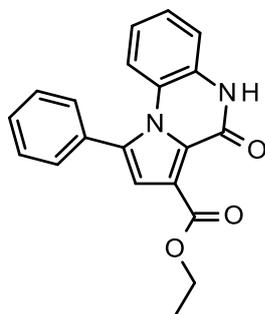


MM : 332.35 g.mol⁻¹

Formule : C₂₀H₁₆N₂O₃

Rdt = 88%, Cristaux crèmes, Tf > 310°C.

4,5-Dihydro-4-oxo-1-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 41c

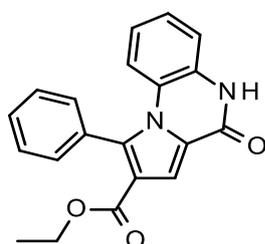


MM : 332.35 g.mol⁻¹

Formule : C₂₀H₁₆N₂O₃

Rdt = 58%, Cristaux blancs, Tf = 219°C.

4,5-Dihydro-4-oxo-1-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 41d



MM : 332.35 g.mol⁻¹

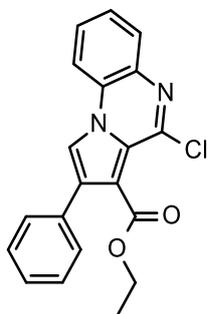
Formule : C₂₀H₁₆N₂O₃

Rdt = 84%, Cristaux blancs, Tf = 230°C.

Méthode générale pour la préparation du 4-chloro-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylate d'éthyle 42a-d

A 0,34 g (0.0013 mol) du lactame **41a-d** sont ajoutés 3,7 mL de oxychlorure de phosphore (POCl_3), l'ensemble est chauffé au reflux pendant 2 h. Le mélange est évaporé à sec puis refroidi. De l'eau/glace y est ajouté goutte à goutte et le milieu est alcalinisé avec du carbonate de sodium (Na_2CO_3). Le précipité formé est filtré sur fritté et lavé à l'eau puis solubilisé dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, décolorée au noir de carbone, filtrée et évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de silice (éluant : dichlorométhane) pour conduire au composé **42a-d**.

4-Chloro-2-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 42a

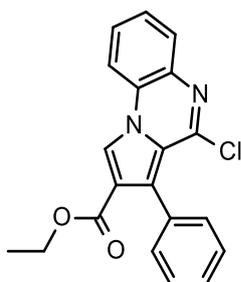


MM : 350.80 g.mol⁻¹

Formule : C₂₀H₁₅ClN₂O₂

Rdt = 77%, Cristaux blancs, T_f = 110°C.

4-Chloro-3-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 42b

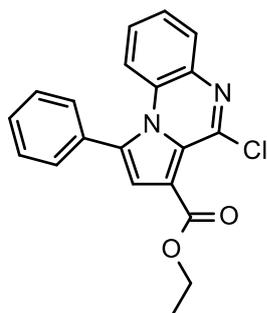


MM : 350.80 g.mol⁻¹

Formule : C₂₀H₁₅ClN₂O₂

Rdt = 96%, Cristaux beiges, T_f = 145°C.

4-Chloro-1-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 42c

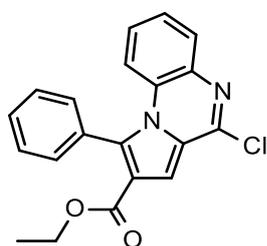


MM : 350.80 g.mol⁻¹

Formule : C₂₀H₁₅ClN₂O₂

Rdt = 94%, Cristaux Crèmes, T_f = 109°C.

4-Chloro-1-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 42d



MM : 350.80 g.mol⁻¹

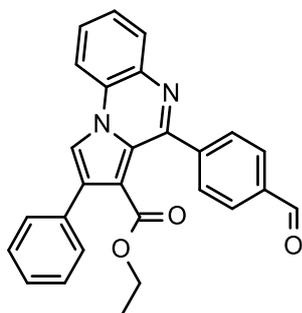
Formule : C₂₀H₁₅ClN₂O₂

Rdt = 90%, Cristaux oranges, T_f = 178°C.

Méthode générale pour la préparation du 4-(4-formylphényl)-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylate d'éthyle 43a-d

A une suspension de dérivé chloré **42a-d** (4.64 mmol.) et Pd(PPh₃)₄ (0.232 mmol.) dans un mélange toluène/EtOH (75/4.1 mL) sous azote sont ajoutés K₂CO₃ (5.1 mmol.) et de l'acide 4-formylphénylboronique (5.1 mmol.). Le mélange réactionnel est chauffé au reflux pendant 24 h, puis la suspension est ensuite refroidie et extraite avec du CH₂Cl₂ (3 x 80 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée sur Na₂SO₄, décolorée au noir de carbone et évaporée sous pression réduite. Le résidu est trituré dans l'éthanol puis filtré avant purification sur colonne chromatographique de silice (éluant : CH₂Cl₂) pour conduire aux dérivés **43a-d**.

4-(4-Formylphényl)-2-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle
43a

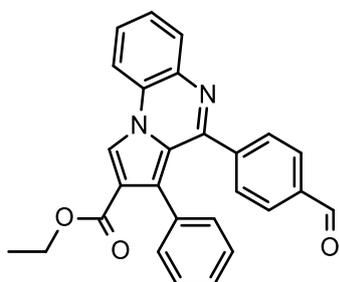


MM : 420.46 g.mol⁻¹

Formule : C₂₇H₂₀N₂O₃

Rdt = 83%, Cristaux jaunes, T_f = 77°C.

4-(4-Formylphényl)-3-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle
43b

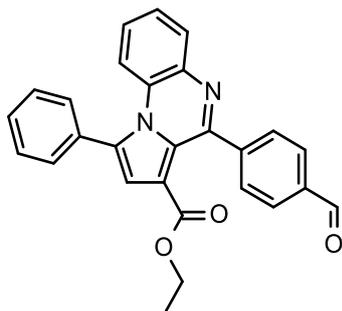


MM : 420.46 g.mol⁻¹

Formule : C₂₇H₂₀N₂O₃

Rdt = 60%, Cristaux jaunes, T_f = 161°C.

4-(4-Formylphényl)-1-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle
43c

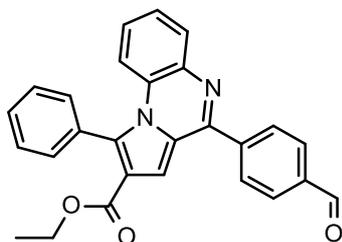


MM : 420.46 g.mol⁻¹

Formule : C₂₇H₂₀N₂O₃

Rdt = 79%, Cristaux jaune-pâle, T_f = 179°C.

4-(4-Formylphényl)-1-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle
43d



MM : 420.46 g.mol⁻¹

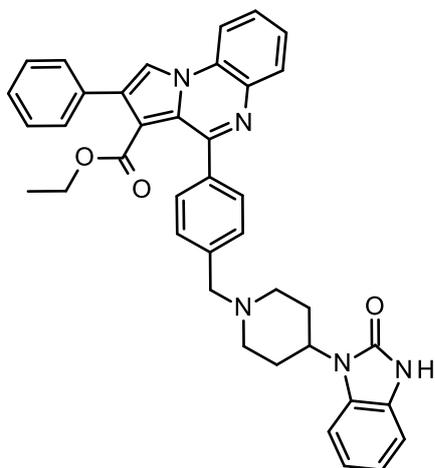
Formule : C₂₇H₂₀N₂O₃

Rdt = 89%, Cristaux jaunes, T_f = 183°C.

Méthode générale pour la préparation du 4-{4-[(4-(2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylate d'éthyle , 4-{4-[(4-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylate d'éthyle et 4-{4-[(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-triazol-5-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-phénylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylate d'éthyle 1a-l

A 0,784 mmol d'aldéhyde **8a-d** en solution dans 15 mL de méthanol sont ajoutés 0,941 mmol (1,2 éq.) de pipéridine substituée, de l'acide acétique (AcOH) en goutte à goutte jusqu'à pH = 6 (4 gouttes) puis 2,15 mol (2,75 éq.) de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN). Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 5 h puis évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau puis extrait au dichlorométhane (CH₂Cl₂). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, décolorée au noir de carbone, filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice (éluant 1 : acétate d'éthyle/cyclohexane - 5/5 ; éluant 2 : chloroforme/méthanol - 9/1) puis repris dans de l'éther éthylique, filtré sur fritté, lavé à l'éther éthylique et séché sous pression réduite pour conduire aux composés **1a-l**.

4-{4-[(4-(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-2-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 1a



MM : 621.73 g.mol⁻¹

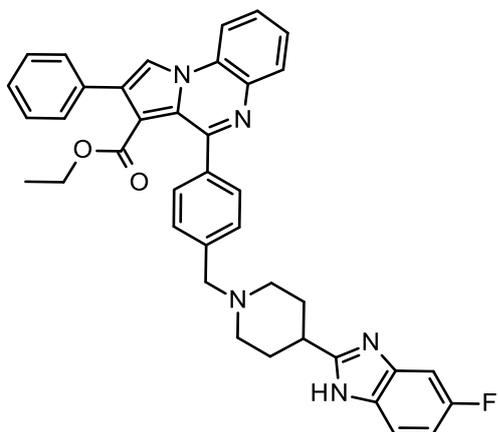
Formule : C₃₉H₃₅N₅O₃

Rdt = 53%, Cristaux blancs, T_f = 186°C.

¹H (CDCl₃) δ: 10.08 (s, 1H, NH), 8.11 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-9), 8.09 (s, 1H, H-1), 7.97 (d, J_{H,H} = 7.60 Hz, 1H, H-6), 7.79 (d, J_{H,H} = 7.60 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.64-7.54 (m, 4H, H-7, H-8, H-3' and H-5'), 7.46-7.37 (m, 5H, H-4 benzimid., H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-5 phenyl and H-6 phenyl), 7.12-7.05 (m, 4H, H-4 phenyl, H-5 benzimid., H-6 benzimid. and H-7 benzimid.), 4.46-4.43 (m, 1H, CH pip.), 3.68 (q, J_{H,H} = 6.90 Hz, 2H, OCH₂), 3.50 (s, 2H, CH₂N), 3.14-3.09 (m, 2H, NCH₂ pip.), 2.53-2.24 (m, 4H, CH₂ pip. and NCH₂ pip.), 1.88-1.84 (m, 2H, CH₂ pip.), 0.94 (t, J_{H,H} = 6.90 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.52 (C=O), 157.82 (C-4), 154.95 (C=O benzimid.), 140.15 (C-4'), 138.42 (C-1 phenyl, C-1' and C-5a), 136.42 (C-3a), 133.31 (C-6 and C-3a benzimid.), 130.42 (C-2', C-6' and C-7a benzimid.), 129.81 (C-7), 129.26 (C-3' and C-5'), 128.95 (C-8), 128.45 (C-3 phenyl, C-4 phenyl and C-5 phenyl), 127.99 (C-2 phenyl and C-6 phenyl), 127.64 (C-9a), 125.81 (C-2), 123.69 (C-3, C-5 benzimid. and C-6 benzimid.), 121.10 (C-1), 113.76 (C-9), 109.66 (C-4 benzimid. and C-7 benzimid.), 64.88 (CH₂N), 61.04 (OCH₂), 53.15 (NCH₂ pip.), 50.71 (CH pip.), 29.23 (CH₂ pip.), 13.68 (CH₃).

4-{4-[(4-(5-Fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-2-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 1b



MM : 623.72 g.mol⁻¹

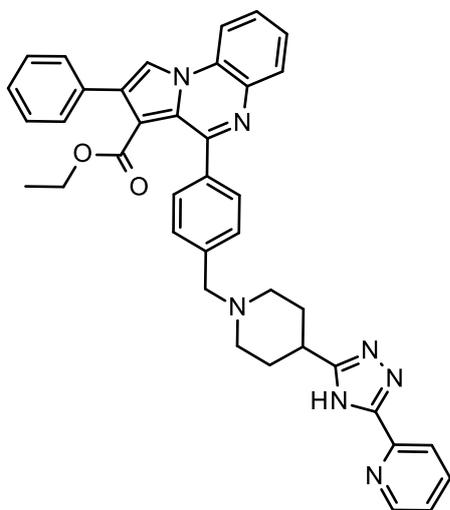
Formule : C₃₉H₃₄FN₅O₂

Rdt = 61%, Cristaux crèmes, T_f = 163°C.

¹H (CDCl₃) δ: 8.08 (s, 1H, H-1), 8.04 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-9), 7.96 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-6), 7.70 (d, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.59 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 1H, H-7), 7.55-7.47 (m, 3H, H-3', H-5' and H-8), 7.44-7.33 (m, 7H, H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-5 phenyl, H-6 phenyl, H-4 benzimid., H-6 benzimid. and H-7 benzimid.), 6.93 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 1H, H-4 phenyl), 3.61 (q, J_{H,H} = 7.00 Hz, 2H, OCH₂), 3.54 (s, 2H, CH₂N), 2.91 (d, 2H, J_{H,H} = 10.20 Hz, NCH₂ pip.), 2.84 (t, J_{H,H} = 11.40 Hz, 1H, CH pip.), 2.05 (t, J_{H,H} = 10.80 Hz, 2H, CH₂ pip.), 1.99 (d, J_{H,H} = 11.40 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 1.94-1.85 (m, 2H, CH₂ pip.), 0.87 (t, J_{H,H} = 7.00 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.68 (C=O), 160.05 (C-5 benzimid.), 158.46 (C-4), 139.78 (C-4'), 138.14 (C-1 phenyl, C-1', C-2 benzimid., C-5a and C-3a benzimid.), 135.91 (C-3a and C-5a), 133.21 (C-6 and C-7a benzimid.), 130.55 (C-2' and C-6'), 129.99 (C-3' and C-5'), 129.23 (C-7), 128.91 (C-8), 128.51 (C-4 phenyl), 127.95 (C-2 phenyl, C-3 phenyl, C-5 phenyl and C-6 phenyl), 127.73 (C-9a), 125.85 (C-2), 123.62 (C-3), 113.95 (C-9), 113.48 (C-1 and C-7 benzimid.), 113.24 (C-4 benzimid. and C-6 benzimid.), 64.88 (CH₂N), 61.04 (OCH₂), 53.15 (NCH₂ pip.), 50.71 (CH pip.), 29.23 (CH₂ pip.), 13.68 (CH₃).

4-{4-[4-(3-(Pyridin-2-yl)-1,2,4-triazol-5-yl)piperidin-1-yl]benzyl}-2-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 1c



MM : 633.74 g.mol⁻¹

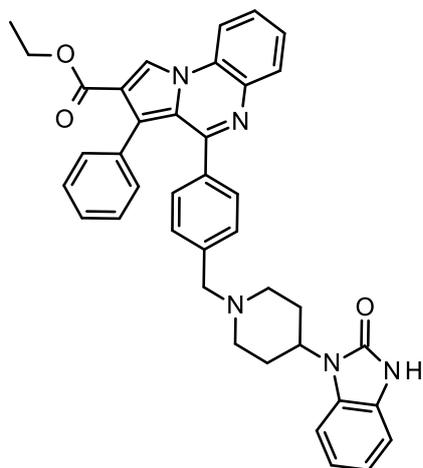
Formule : C₃₉H₃₅N₇O₂

Rdt = 56%, Cristaux blancs, T_f = 143°C.

¹H (CDCl₃) δ: 8.73 (d, J_{H,H} = 3.00 Hz, 1H, H-6 pyr.), 8.22 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-5 pyr.), 8.08 (d, J_{H,H} = 8.40 Hz, 1H, H-6), 8.06 (s, 1H, H-1), 7.94 (d, J_{H,H} = 8.40 Hz, 1H, H-9), 7.84 (t, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-4 pyr.), 7.74 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.58 (t, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-7), 7.56-7.49 (m, 4H, H-3', H-5', H-2 phenyl and H-6 phenyl), 7.44-7.40 (m, 2H, H-3 phenyl and H-5 phenyl), 7.38-7.34 (m, 2H, H-4 phenyl and H-3 pyr.), 7.28 (m, 1H, H-8), 3.65 (s, 2H, CH₂N), 3.64 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.06 (d, 2H, J_{H,H} = 10.80 Hz, NCH₂ pip.), 2.97-2.89 (m, 1H, CH pip.), 2.23 (t, J_{H,H} = 10.20 Hz, 2H, CH₂ pip.), 2.12 (d, J_{H,H} = 12.00 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 2.10-2.00 (m, 2H, CH₂ pip.), 0.91 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.56 (C=O), 154.36 (C-4, C-3 Triazole and C-2 pyr.), 149.50 (C-6 pyr.), 147.15 (C-5 Triazole), 138.36 (C-4' and C-4 pyr.), 137.48 (C-1 phenyl, C-1' and C-5a), 136.04 (C-3a), 133.31 (C-6), 130.40 (C-2' and C-6'), 129.41 (C-3', C-5' and C-7), 128.97 (C-8), 128.47 (C-4 phenyl), 128.31 (C-2 phenyl and C-6 phenyl), 127.95 (C-3 phenyl and C-5 phenyl), 127.62 (C-9a), 125.83 (C-2), 124.60 (C-3 pyr.), 123.69 (C-3), 121.79 (C-5 pyr.), 113.78 (C-9), 113.32 (C-1), 63.02 (CH₂N), 61.19 (OCH₂), 53.39 (CH pip. and NCH₂), 30.74 (CH₂ pip.), 13.68 (CH₃).

4-{4-[(4-(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-3-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 1d



MM : 621.73 g.mol⁻¹

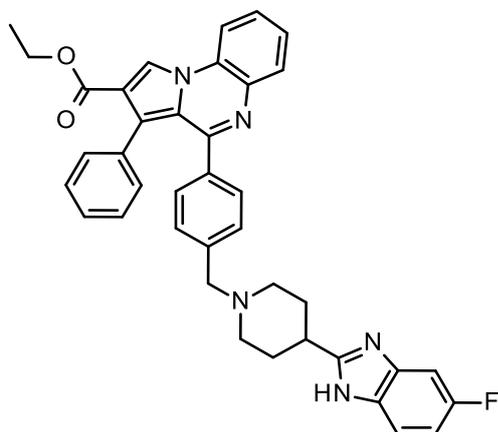
Formule : C₃₉H₃₅N₅O₃

Rdt = 60%, Cristaux blancs, T_f = 260°C.

¹H (CDCl₃) δ: 9.95 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, H-1), 8.07 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-6), 8.03 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-9), 7.61 (t, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-7), 7.55 (t, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-8), 7.34 (d, J_{H,H} = 7.20 Hz, 1H, H-4 benzimid.), 7.23 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.15-7.07 (m, 3H, H-5 benzimid., H-6 benzimid., H-7 benzimid.), 7.06-6.96 (m, 7H, H-3', C-5', H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl and H-6 phenyl), 4.45 (m, 1H, CH pip.), 4.23 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.46 (s, 2H, CH₂N), 3.00 (d, J_{H,H} = 10.20 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 2.52 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, CH₂ pip.), 2.15 (t, J_{H,H} = 11.40 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 1.88 (d, J_{H,H} = 10.80 Hz, 2H, CH₂ pip.), 1.19 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.54 (C=O), 158.05 (C-4), 156.58 (C=O benzimid.), 140.33 (C-4'), 137.93 (C-1'), 137.56 (C-3a and C-5a), 135.22 (C-1 phenyl), 132.62 (C-3a benzimid., C-3 phenyl, C-4 phenyl and C-5 phenyl), 131.80 (C-6), 130.70 (C-7a benzimid.), 130.06 (2' and C-6'), 129.54 (C-7, C-3' and C-5'), 128.20 (C-2 phenyl and C-6 phenyl), 127.80 (C-8), 126.81 (C-9a), 124.41 (C-2), 122.61 (C-5 benzimid.), 122.52 (C-6 benzimid.), 120.66 (C-3), 119.65 (C-1), 115.21 (C-9) 111.25 (C-7 benzimid.), 111.17 (C-4 benzimid.), 64.03 (CH₂N), 61.79 (OCH₂), 54.50 (NCH₂ pip.), 52.37 (CH pip.), 30.81 (CH₂ pip.), 15.53 (CH₃).

4-{4-[(4-(5-Fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-3-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 1e



MM : 623.72 g.mol⁻¹

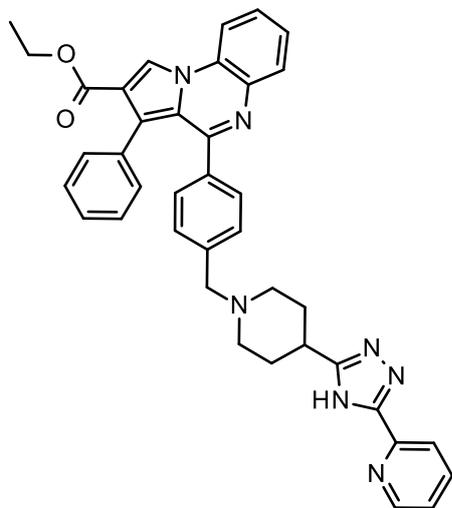
Formule : C₃₉H₃₄FN₅O₂

Rdt = 78%, Cristaux blancs, T_f = 246°C.

¹H (CDCl₃) δ: 9.87 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, H-1), 8.04 (d, J_{H,H} = 7.00 Hz, 1H, H-9), 8.03 (t, J_{H,H} = 7.00 Hz, 1H, H-6), 7.61 (t, J_{H,H} = 7.00 Hz, 1H, H-7), 7.54 (t, J_{H,H} = 7.00 Hz, 1H, H-8), 7.18 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.06-6.96 (m, 7H, H-3', H-5', H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl, H-6 phenyl, H-4 benzimid., H-6 benzimid. and H-7 benzimid.), 4.23 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.41 (s, 2H, CH₂N), 2.97-2.86 (m, 3H, NCH₂ pip. and CH pip.), 2.11 (d, J_{H,H} = 11.60 Hz, 2H, CH₂ pip.), 2.08 (t, J_{H,H} = 11.60 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 1.93 (m, 2H, CH₂ pip.), 1.20 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.56 (C=O), 162.10 (C-5 benzimid.), 158.21 (C-4), 140.16 (C-4'), 138.00 (C-1 phenyl, C-1', C-2 benzimid. and C-3a benzimid.), 137.57 (C-3a and C-5a), 135.19 (C-7a benzimid.), 131.62 (C-6), 130.11 (C-2' and C-6'), 129.64 (3' and C-5'), 129.54 (C-7), 128.19 (C-8), 128.04 (C-2 phenyl, C-3 phenyl, C-4 phenyl, C-5 phenyl and C-6 phenyl), 127.77 (9a), 124.44 (C-2), 120.69 (C-3), 119.69 (C-1), 115.31 (C-9 and C-7 benzimid.), 111.90 (C-4 benzimid. and C-6 benzimid.), 64.24 (CH₂N), 61.92 (OCH₂), 54.66 (NCH₂ pip.), 38.34 (CH pip.), 32.34 (CH₂ pip.), 15.60 (CH₃).

4-{4-[4-(3-(Pyridin-2-yl)-1,2,4-triazol-5-yl)piperidin-1-yl]benzyl}-3-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 1f



MM : 633.74 g.mol⁻¹

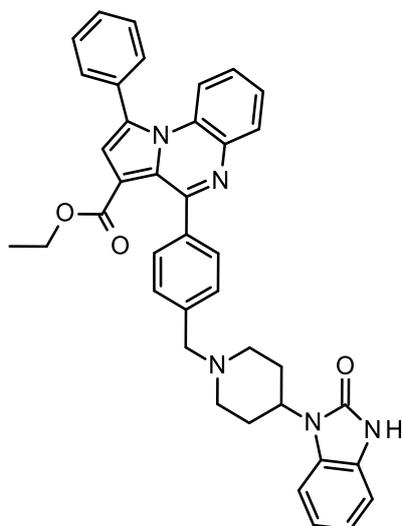
Formule : C₃₉H₃₅N₇O₂

Rdt = 53%, Cristaux jaune-pâle, T_f = 139°C.

¹H (CDCl₃) δ: 8.73 (d, J_{H,H} = 3.00 Hz, 1H, H-6 pyr.), 8.64 (s, 1H, H-1), 8.23 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-5 pyr.), 8.02 (d, J_{H,H} = 8.40 Hz, 1H, H-9), 7.99 (d, J_{H,H} = 8.40 Hz, 1H, H-6), 7.84 (t, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-4 pyr.), 7.56 (t, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-7), 7.50 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 1H, H-8), 7.36 (t, J_{H,H} = 6.00 Hz, 1H, H-3 pyr.), 7.17 (d, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.06-7.02 (m, 1H, H-4 phenyl), 7.01-6.94 (m, 6H, H-3', H-5', H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-5 phenyl, and H-6 phenyl), 4.20 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.49 (s, 2H, CH₂N), 3.01-2.93 (m, 3H, NCH₂ pip. and CH pip.), 2.23-2.13 (m, 4H, NCH₂ pip. and CH₂ pip.), 2.12-2.03 (m, 2H, CH₂ pip.), 1.17 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 164.07 (C=O), 156.45 (C-4, C-3 Triazole and C-2 pyr.), 149.47 (C-6 pyr.), 147.36 (C-5 Triazole), 138.47 (C-4' and C-4 pyr.), 136.63 (C-1 phenyl and C-1'), 135.97 (C-5a), 133.63 (C-3a), 130.21 (C-6), 128.64 (C-2' and C-6'), 128.48 (C-3' and C-5'), 128.09 (C-7), 126.77 (C-8), 126.49 (C-3 phenyl, C-4 phenyl and C-5 phenyl), 126.42 (C-2 phenyl and C-6 phenyl), 126.31 (9a), 125.41 (C-3 pyr.), 122.87 (C-2), 121.87 (C-5 pyr.), 119.12 (C-3), 118.26 (C-9), 113.76 (C-1), 62.64 (CH₂N), 60.34 (OCH₂), 53.03 (NCH₂ pip.), 35.19 (CH pip.), 30.41 (CH₂ pip.), 14.07 (CH₃).

4-{4-[(4-(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-1-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 1g



MM : 621.73 g.mol⁻¹

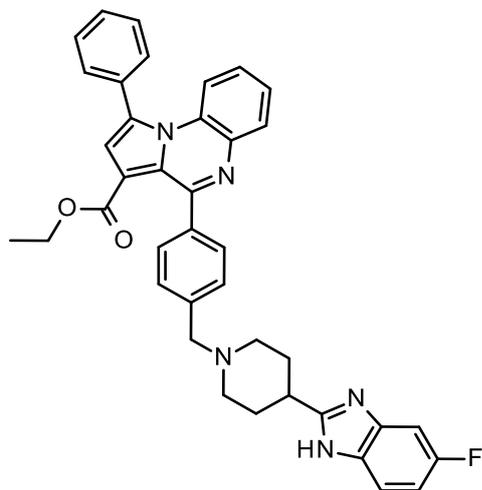
Formule : C₃₉H₃₅N₅O₃

Rdt = 66%, Cristaux jaune-pâle, T_f = 168°C.

¹H (CDCl₃) δ: 10.52 (s, 1H, NH), 8.10 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-6), 7.82 (d, J_{H,H} = 7.60 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.62-7.53 (m, 8H, H-4 benzimid., H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl, H-6 phenyl, H-3' and H-5'), 7.44 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-9), 7.43 (t, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-7), 7.33 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-5 benzimid.), 7.21-7.02 (m, 4H, H-2, H-8, H-6 benzimid. and C-7 benzimid.), 4.52-4.36 (m, 1H, CH pip.), 3.79 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.69 (s, 2H, CH₂N), 3.13 (d, J_{H,H} = 10.80 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 2.62-2.48 (m, 2H, CH₂ pip.), 2.27 (t, J_{H,H} = 10.80 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 1.86 (d, J_{H,H} = 14.80 Hz, 2H, CH₂ pip.), 0.98 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 166.54 (C=O), 156.74 (C=O benzimid.), 155.97 (C-4), 141.21 (C-3a and C-4'), 140.77 (C-5a), 134.78 (C-1'), 133.44 (C-1 phenyl and C-3a benzimid.), 131.68 (C-6), 131.12 (C-3' and C-5'), 130.56 (C-7a benzimid.), 130.37 (C-2 phenyl, C-3 phenyl, C-4 phenyl, C-5 phenyl and C-6 phenyl), 129.64 (C-2' and C-6'), 129.46 (C-7), 128.66 (C-8), 127.22 (C-9a), 122.56 (C-1, C-3 and C-5 benzimid.), 120.22 (C-2 and C-6 benzimid.), 118.10 (C-9), 111.22 (C-7 benzimid.), 111.19 (C-4 benzimid.), 64.09 (CH₂N), 62.27 (OCH₂), 54.60 (NCH₂ pip.), 52.18 (CH pip.), 30.69 (CH₂ pip.), 15.27 (CH₃).

4-{4-[(4-(5-Fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-1-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle 1h



MM : 623.72 g.mol⁻¹

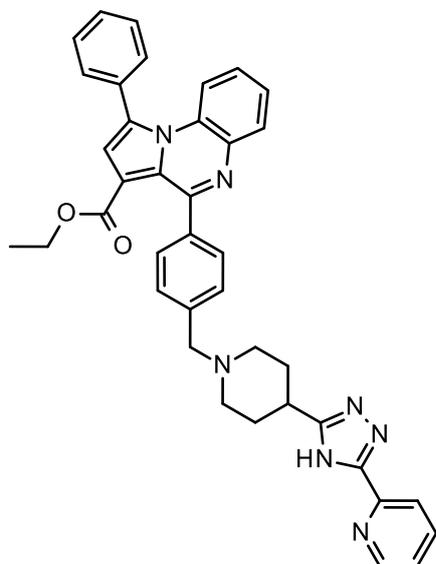
Formule : C₃₉H₃₄FN₅O

Rdt = 60%, Cristaux jaune-pâle, T_f = 157°C.

¹H (CDCl₃) δ: 11.40 (s, 1H, NH), 8.02 (d, J_{H,H} = 7.60 Hz, 1H, H-6), 7.74 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.61-7.52 (m, 5H, H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl and H-6 phenyl), 7.46 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-9), 7.44-7.37 (m, 3H, H-7, H-3' and H-5'), 7.21-7.15 (m, 4H, H-2, H-8, H-4 benzimid. and H-7 benzimid.), 6.96 (td, J_{H,H} = 9.20 Hz and 1.60 Hz, 1H, H-6 benzimid.), 3.72 (q, J_{H,H} = 7.20, 2H, OCH₂), 3.55 (s, 2H, CH₂N), 2.98-2.84 (m, 3H, NCH₂ pip. and CH pip.), 2.13-1.98 (m, 4H, NCH₂ pip. and CH₂ pip.), 1.96-1.81 (m, 2H, CH₂ pip.), 0.92 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 166.61 (C=O), 159.53 (C-5 benzimid.), 156.16 (C-4), 141.49 (C-4'), 140.40 (C-3a and C-5a), 138.66 (C-2 benzimid. and C-3a benzimid.), 134.65 (C-1 phenyl), 133.67 (C-7a benzimid.), 131.22 (C-3' and C-5'), 131.11 (C-3 phenyl, C-4 phenyl and C-5 phenyl), 130.63 (C-6, C-2 phenyl and C-6 phenyl), 130.39 (C-7), 129.35 (C-2' and C-6'), 128.72 (C-8), 128.54 (C-9a), 127.38 (C-1, C-3 and C-7 benzimid.), 120.33 (C-6 benzimid.), 118.21 (C-9), 111.50 (C-4 benzimid.), 64.19 (CH₂N), 62.32 (OCH₂), 54.70 (NCH₂ pip.), 38.34 (CH pip.), 32.34 (CH₂ pip.), 15.21 (CH₃).

**4-{4-[4-(3-(Pyridin-2-yl)-1,2,4-triazol-5-yl)piperidin-1-yl]benzyl}-1-
phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-3-carboxylate d'éthyle **1i****



MM : 633.74 g.mol⁻¹

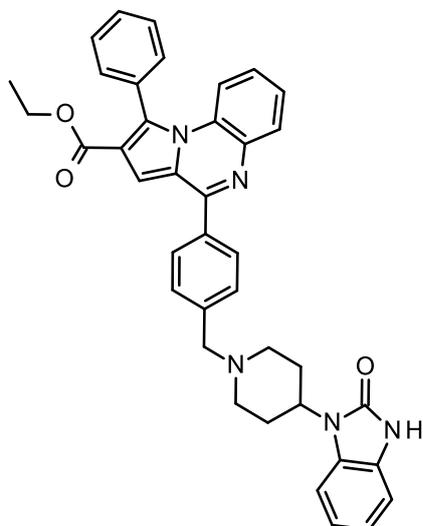
Formule : C₃₉H₃₅N₇O₂

Rdt = 69%, Cristaux jaune-pâle, T_f = 146°C.

¹H (CDCl₃) δ: 9.12 (s, 1H, NH), 8.66 (d, J_{H,H} = 4.00 Hz, 1H, H-6 pyr.), 8.19 (d, J_{H,H} = 8.00 Hz, 1H, H-5 pyr.), 8.07 (dd, J_{H,H} = 8.20 and 1.60 Hz, 1H, H-6), 7.86 (td, J_{H,H} = 7.60 and 1.60 Hz, 1H, H-4 pyr.), 7.79 (d, J_{H,H} = 7.40 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.58-7.55 (m, 5H, H-2 phenyl, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl and H-6 phenyl), 7.53 (d, J_{H,H} = 7.40 Hz, 2H, H-3' and H-5'), 7.45 (d, J_{H,H} = 8.20 Hz, 1H, H-9), 7.43 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 1H, H-7), 7.40 (dd, J_{H,H} = 6.40 and 1.20 Hz, 1H, H-9), 7.37 (d, J_{H,H} = 7.20 Hz, 1H, H-3 pyr.), 7.18 (td, J_{H,H} = 7.20 Hz and 1.60 Hz, 1H, H-8), 7.17 (sl, 1H, H-2), 3.78 (q, J_{H,H} = 7.20, 2H, OCH₂), 3.71 (s, 2H, CH₂N), 3.10 (d, J_{H,H} = 11.20 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 3.05-2.88 (m, 1H, CH pip.), 2.19 (t, J_{H,H} = 8.00 Hz, 2H, CH₂ pip.), 0.97 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 156.67 (C-4 and C-2 pyr.), 152.37 (C-3 Triazole), 151.01 (C-6 pyr.), 147.10 (C-5 Triazole), 142.04 (C-1'), 141.03 (C-4'), 138.80 (C-4 pyr.), 134.91 (C-1 phenyl), 133.39 (C-5a), 131.80 (C-6), 130.85 (C-3' and C-5'), 130.59 (C-2 phenyl, C-3 phenyl, C-4 phenyl, C-5 phenyl and C-6 phenyl), 129.91 (C-9a, C-2' and C-6'), 128.43 (C-8), 127.27 (C-7 and C-3 pyr.), 126.22 (C-1 and C-3), 122.91 (C-5 pyr.), 120.27 (C-2), 118.17 (C-9), 62.30 (CH₂N), 61.18 (OCH₂), 56.03 (CH pip.), 55.73 (NCH₂ pip.), 32.27 (CH₂ pip.), 15.36 (CH₃).

4-{4-[(4-(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-1-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 1j



MM : 621.73 g.mol⁻¹

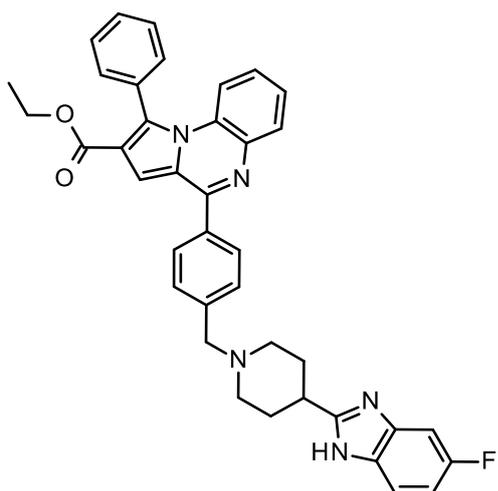
Formule : C₃₉H₃₅N₅O₃

Rdt = 70%, Cristaux blancs, T_f = 166°C.

¹H (CDCl₃) δ: 10.19 (s, 1H, NH), 8.03 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-6), 8.02 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.67-7.57 (m, 6H, H-7, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl, H-3' and H-5'), 7.55 (s, 1H, H-3), 7.54-7.51 (m, 2H, H-2 phenyl and H-6 phenyl), 7.41-7.33 (m, 2H, H-9 and H-4 benzimid.), 7.14-7.05 (m, 4H, H-8, H-5 benzimid., H-6 benzimid., H-7 benzimid.), 4.47 (t, J_{H,H} = 12.00 Hz, 1H, CH pip.), 4.17 (q, J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.73 (s, 2H, CH₂N), 3.23-3.08 (m, 2H, NCH₂ pip.), 2.65-2.50 (m, 2H, CH₂ pip.), 2.37-2.23 (m, 2H, NCH₂ pip.), 1.89 (d, J_{H,H} = 10.20 Hz, 2H, CH₂ pip.), 1.13 (t, J_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.59 (C=O), 156.75 (C-4), 156.60 (C=O benzimid.), 139.29 (C-5a and C-3a benzimid.), 138.22 (C-1'), 136.20 (C-3a and C-1 phenyl), 131.88 (C-6), 131.85 (C-2 phenyl and C-6 phenyl), 130.85 (C-7a benzimid.), 130.80 (C-4 phenyl), 130.51 (C-3' and C-5'), 130.24 (C-7), 130.12 (C-3 phenyl and C-5 phenyl), 129.67 (C-2' and C-6'), 128.19 (C-8), 127.34 (C-9), 126.61 (C-2), 120.81 (C-1), 118.12 (C-5 benzimid. and C-6 benzimid.), 111.94 (C-3 and C-4 benzimid.), 111.20 (C-7 benzimid.), 64.01 (CH₂N), 61.61 (OCH₂), 54.61 (NCH₂ pip.), 52.15 (CH pip.), 30.67 (CH₂ pip.), 15.42 (CH₃).

4-{4-[(4-(5-Fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-1-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 1k



MM : 623.72 g.mol⁻¹

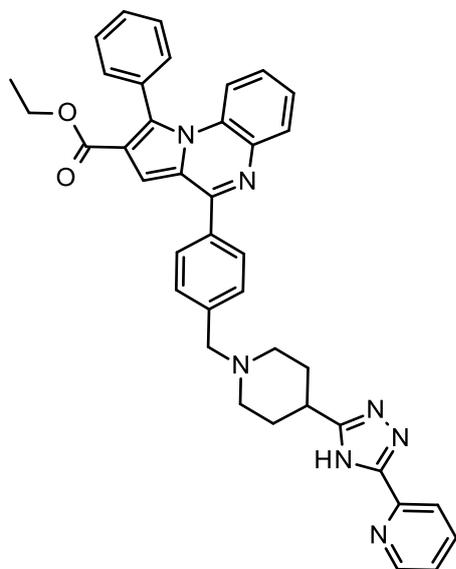
Formule : C₃₉H₃₄FN₅O₂

Rdt = 46%, Cristaux blancs, T_f = 196°C.

¹H (CDCl₃) δ: 7.97 (d, *J*_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-6), 7.93 (d, *J*_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.64-7.56 (m, 3H, H-7, H-9 and H-4 phenyl), 7.55-7.47 (m, 6H, H-3, H-3 phenyl, H-5 phenyl, H-3', H-5' and H-4 benzimid.), 7.36 (t, *J*_{H,H} = 6.60 Hz, 2H, H-2 phenyl and H-6 phenyl), 7.09 (d, *J*_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-8), 7.08 (d, *J*_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-7 benzimid.), 6.98 (t, *J*_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-6 benzimid.), 4.16 (q, *J*_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, OCH₂), 3.62 (s, 2H, CH₂N), 2.99 (d, *J*_{H,H} = 11.40 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 2.94 (t, *J*_{H,H} = 12.00 Hz, 1H, CH pip.), 2.15 (t, *J*_{H,H} = 11.40 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 2.06 (d, *J*_{H,H} = 11.40 Hz, 2H, CH₂ pip.), 1.98-1.89 (m, 2H, CH₂ pip.), 1.11 (t, *J*_{H,H} = 7.20 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.75 (C=O), 161.57 (C-5 benzimid.), 156.90 (C-4), 142.10 (C-4'), 139.21 (C-5a), 137.97 (C-1'), 136.42 (C-2 benzimid. and C-3a benzimid.), 134.60 (C-1 phenyl), 132.51 (C-9a), 131.90 (C-3' and C-5'), 131.52 (C-3a), 130.91 (C-6), 130.84 (C-3 phenyl and C-5 phenyl), 130.32 (C-7a benzimid.), 130.05 (C-7, C-9 and C-4 phenyl.), 129.58 (C-2' and C-6'), 128.37 (C-8), 127.52 (C-2 phenyl and C-6 phenyl), 120.93 (C-1 and C-2), 118.28 (C-7 benzimid.), 111.82 (C-3 and C-6 benzimid.), 111.64 (C-4 benzimid.), 64.24 (CH₂N), 61.79 (OCH₂), 54.74 (NCH₂ pip.), 38.31 (CH pip.), 32.35 (CH₂ pip.), 15.41 (CH₃).

4-{4-[4-(3-(Pyridin-2-yl)-1,2,4-triazol-5-yl)piperidin-1-yl]benzyl}-1-phénylpyrrolo[1,2-a]quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 11



MM : 633.74 g.mol⁻¹

Formule : C₃₉H₃₅N₇O₂

Rdt = 42%, Cristaux blancs, T_f = 145°C.

¹H (CDCl₃) δ: 8.69 (d, J_{H,H} = 4.60 Hz, 1H, H-6 pyr.), 8.19 (d, J_{H,H} = 7.80 Hz, 1H, H-5 pyr.), 7.99 (d, J_{H,H} = 7.00 Hz, 1H, H-6), 7.94 (d, J_{H,H} = 7.00 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.83 (td, J_{H,H} = 7.60 and 1.60 Hz, 1H, H-4 pyr.), 7.62-7.45 (m, 8H, H-3, H-7, H-9, H-3 phenyl, H-4 phenyl, H-5 phenyl, H-3' and H-5'), 7.40-7.29 (m, 3H, H-2 phenyl, H-6 phenyl and H-3 pyr.), 7.04 (d, J_{H,H} = 7.00 Hz, 1H, H-8), 4.14 (q, J_{H,H} = 7.10 Hz, 2H, OCH₂), 3.67 (s, 2H, CH₂N), 3.07 (d, J_{H,H} = 11.00 Hz, 2H, NCH₂ pip.), 2.99-2.79 (m, 1H, CH pip.), 2.34-1.90 (m, 6H, NCH₂ pip. and 2 x CH₂ pip.), 1.10 (t, J_{H,H} = 7.10 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (CDCl₃) δ: 165.65 (C=O), 156.79 (C-4 and C-2 pyr.), 150.99 (C-3 Triazole and C-6 pyr.), 148.41 (C-5 Triazole), 139.39 (C-4'), 138.86 (C-5a and C-4 pyr.), 138.18 (C-1'), 134.72 (C-1 phenyl), 131.94 (C-3a, C-3' and C-5'), 130.98 (C-6), 130.86 (C-3 phenyl and C-5 phenyl), 130.11 (C-7, C-9 and C-4 phenyl), 129.56 (C-2' and C-6'), 128.22 (C-8), 127.37 (C-3 pyr., C-2 phenyl and C-6 phenyl), 123.11 (C-2, C-9a and C-5 pyr.), 120.84 (C-1), 112.01 (C-3), 64.51 (CH₂N), 61.68 (OCH₂), 55.03 (NCH₂ pip.), 32.32 (CH₂ pip. and CH pip.), 15.49 (CH₃).

B. Evaluation biologique

a) Culture cellulaire des lignées hématopoïétiques humaines HL60, Jurkat, K562, U266 et U937

La lignée HL60 est une lignée de type leucémie aiguë promyélocytaire. La lignée Jurkat est une lignée de type leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T). La lignée K562 est une lignée de type leucémie myéloïde chronique (LMC). La lignée U266 est une lignée de type myelome multiple. La lignée U937 est une lignée de type leucémie monocytaire.

Conditions de culture : La conservation des cellules se fait dans une cuve à azote liquide (-196°C) dans une solution de SVF (Sérum de Veau Fœtal)/DMSO (diméthylsulfoxyde) 10%. Dans un premier temps, les cellules sont décongelées rapidement au bain marie à 37°C puis du SVF est ajouté pour les protéger du DMSO présent dans la suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en PBS (Phosphate Buffer Saline) (280 g, 10 min) puis comptées au Bleu Trypan (qui colore en bleu les cellules mortes) sur lame de Malassez avec un microscope photonique (objectif x10) de façon à obtenir une concentration cellulaire de 250 000 cellules/mL. Les cellules sont cultivées et amplifiées dans un milieu approprié puis incubées sous atmosphère humide à 37°C, 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute formulation 1640 supplémenté en SVF 10 %, en antibiotiques : Pénicilline (100 UI/mL) et Streptomycine (100 µg/mL) et en acides aminés : Glutamine (2 mM).

Congélation : Environ 5 à 10x10⁶ cellules sont rapidement remises en suspension dans 1 mL de SVF contenant 10% de DMSO dans des ampoules de congélation puis stockées à -80°C dans une boîte de congélation contenant de l'isopropanol, durant 12 heures puis transférées dans une cuve d'azote liquide à -196°C.

b) Isolement des cellules mononucléées sanguines (CMN)

Les CMN sont isolées à partir d'un filtre sanguin provenant de l'EFS (Etablissement Français du Sang). Tout d'abord, 60 mL de PBS sont injectés dans le sens inverse du filtre afin de récupérer le sang dans la poche. On prépare 2 tubes (type Falcon) et pour chaque tube, 25 mL de sang sont déposés sur 15 mL de Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes, densité = 1,077) de façon délicate pour éviter qu'une émulsion ne se forme

au niveau de l'interface. Les tubes sont centrifugés à 380 g pendant 30 min sans frein afin d'éviter le mélange des phases. A l'issue de cette étape, trois phases sont obtenues. La phase intermédiaire correspondant à un anneau blanc contenant les CMN, est prélevé puis mis en présence d'un tampon de lyse (contenant du chlorure d'ammonium, de l'acide éthylènediamine tétraacétique disodique et de l'hydrogénocarbonate de potassium) pour lyser les globules rouges restant. Les CMN sont ensuite lavées 3 fois en PBS (380 g, 10 min) puis mis en suspension dans 20 mL de milieu de culture. Les cellules sont comptées puis soumises à des tests de prolifération avec ou sans phytohémagglutinine (PHA à 5 µg/mL) qui stimulera la mise en cycle des CMN.

c) Tests de prolifération sur les lignées hématopoïétiques et sur les CMN

Les tests de prolifération sont réalisés par une méthode colorimétrique à l'aide d'un réactif, le MTS (ou 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium) associé à un réactif de couplage, le PES (phenazine ethosulfate), vendu en tant que Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Ce composé tétrazolé, de couleur jaune, s'incorpore dans les mitochondries des cellules vivantes. Il est réduit par le NADH et par le NADPH en un produit de couleur brune, le Formazan. Après lavage en PBS (10 min, 280 g), et comptage au Bleu Trypan, les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture et implantées dans des plaques 96 puits (10 000 cellules/puits/100 µL pour les lignées cellulaires et 100 000 cellules/puits/100 µL pour les CMN) en présence ou en absence de concentrations croissantes d'inhibiteurs avec 4 puits par condition (quadruplicates). Les études réalisées évaluent la cytotoxicité des inhibiteurs sur les CMN sur 2 jours et la prolifération des lignées leucémiques sur 3 jours. Les 12 inhibiteurs **1a-l** ont été testés aux concentrations de 0, 1, 5, 10, 20 et 50 µM. Chaque jour, 20 µL de MTS sont ajoutés dans chaque puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C, les plaques sont lues à l'aide d'un spectromètre UV Multiskan EX (Thermo, Electron Corporation) à une longueur d'onde de 490 nm. Les résultats sont ensuite analysés et exprimés sous forme d'une moyenne des densités optiques pour chaque condition (Microsoft Excel). Les IC₅₀ ont été calculées en utilisant l'équation de la courbe de tendance à l'aide d'un tableur (Microsoft Excel). Une IC₅₀ correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire.

d) Marquage intracytoplasmique de la protéine Akt phosphorylée par cytométrie en flux

Tout d'abord, 500 000 cellules/ml sont incubées en présence ou en absence de concentrations croissantes d'inhibiteurs (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 et 50 μM) pendant 2 h à 37°C, 5% CO_2 . A ces conditions, s'ajoute une condition contrôle, l'isotype qui permet de visualiser la fluorescence naturelle des cellules et doit être couplé au même fluorochrome que l'anticorps d'intérêt. Le marquage consiste en :

- **Une étape de fixation** : Après lavage des cellules en PBS (5 min, 280 g), chaque culot cellulaire est remis en suspension avec 400 μL de paraformaldéhyde (PFA) à 4%, et incubé 10 min à 4°C.

- **Une étape de perméabilisation** : Les cellules sont lavées à nouveau en PBS puis resuspendues dans 95 μL d'un tampon PBS/Saponine 0,3% auxquels sont ajoutés 5 μL d'anticorps anti-phosphoAkt (Ser473) couplé à un fluorochrome, la phycoérythrine (PE) pour le contrôle et les 5 conditions d'inhibiteurs, ou 5 μL d'anticorps anti-IgG1-PE pour l'isotype. Les tubes sont ensuite incubés 1h à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées en PBS/Saponine 0,3% (5 min, 280 g) puis remises en suspension dans 400 μL de PBS avant d'être analysées par le cytomètre en flux (Epix XL, Beckman-Coulter). La PE est détectée à une longueur d'onde de 575 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne de fluorescence ou MFI (Mean Fluorescence Intensity) et calculés par la méthode suivante :

MFI = Moyenne de Fluorescence du Contrôle – Moyenne de Fluorescence de l'Isotype.

VI. Conclusion

Durant ce travail, douze composés ont été conçus, synthétisés puis évalués biologiquement par des tests de prolifération sur les lignées leucémiques Jurkat, K562, HL60, U266 et U937 ainsi que sur des CMN normales sanguines. Les résultats préliminaires ont montré que nos composés présentaient une activité antiproliférative intéressante sur les différents types cellulaires étudiés. Un premier test fonctionnel par cytométrie en flux a pu être envisagé avec le composé **1h** pour étudier la phosphorylation de la protéine Akt dans les différentes lignées hématopoïétiques. Nous avons montré que ce composé inhibe la phosphorylation d'Akt seulement dans la lignée Jurkat alors que la molécule A6730 **34** l'inhibe dans les trois lignées. Il nous faut maintenant réaliser ce test sur l'ensemble de nos inhibiteurs potentiellement actifs. De plus, de nombreux tests fonctionnels sont encore à réaliser afin de déterminer la spécificité de nos inhibiteurs : des Western blot pour étudier l'expression de certains effecteurs d'Akt ; étude de l'apoptose par cytométrie en flux via l'expression de l'annexine V qui est un marqueur précoce de l'apoptose ; analyse des effets de nos composés sur l'activité enzymatique d'Akt (Immuno assay).

A partir de cette série, il nous sera possible d'envisager de nouvelles pharmacomodulations de façon à obtenir de nouveaux composés plus actifs et moins toxiques. Nous pourrions envisager également une voie d'approche de thérapie ciblée par le biais d'un couplage peptidique de façon à cibler les zones angiogéniques tumorales.

VII. Références bibliographiques

- [1] S. Hanks, T. Hunter, *FASEB J.* **1995**, *9*, 576–596.
- [2] M. Falasca, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1410–1416.
- [3] M. Hanada, J. Feng, B. A. Hemmings, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1697*, 3–16.
- [4] C. C. Kumar, V. Madison, *Oncogene* **2005**, *24*, 7493–7501.
- [5] X. Huang, M. Begley, K. A. Morgenstern, Y. Gu, P. Rose, H. Zhao, X. Zhu, *Structure* **2003**, *11*, 21–30.
- [6] C. Garcia-Echeverria, W. R. Sellers, *Oncogene* **2008**, *27*, 5511–5526.
- [7] D. P. Brazil, B. A. Hemmings, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 657–664.
- [8] K. M. Nicholson, N. G. Anderson, *Cell. Signal.* **2002**, *14*, 381–395.
- [9] K. Liang, W. Jin, C. Knuefermann, M. Schmidt, G. B. Mills, K. K. Ang, L. Milas, Z. Fan, *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 353–360.
- [10] I. Vivanco, C. L. Sawyers, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 489–501.
- [11] J. Yun, *Cancer Biol. Ther.* **2014**, *9*, 504–506.
- [12] S. Barnett, M. Bilodeau, C. Lindsley, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 109–125.
- [13] G.-D. Zhu, J. Gong, V. B. Gandhi, K. Woods, Y. Luo, X. Liu, R. Guan, V. Klinghofer, E. F. Johnson, V. S. Stoll, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2441–2452.
- [14] C. Lindsley, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 458–477.
- [15] I. Collins, *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 32–50.
- [16] D. S. Levy, J. A. Kahana, R. Kumar, *Blood* **2009**, *113*, 1723–1729.
- [17] I. M. Ghobrial, A. Roccaro, F. Hong, E. Weller, N. Rubin, R. Leduc, M. Rourke, S. Chuma, A. Sacco, X. Jia, et al., *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1033–41.
- [18] S. Barnett, D. Defeo-Jones, S. Fu, P. Hancock, K. Haskell, R. Jones, J. Kahana, K. A. L. K. L. L., et al., *Biochem. J.* **2005**, *385*, 399–408.
- [19] C. W. Lindsley, Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, J. R. Huff, H. E. Huber, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 761–764.
- [20] Y. Li, J. Liang, T. Siu, E. Hu, M. A. Rossi, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, R. G. Robinson, K. Leander, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 834–836.
- [21] S. Shuttleworth, F. Silva, C. Tomassi, A. Cecil, T. Hill, H. Rogers, P. Townsend, *Progress in Medicinal Chemistry, Volume 48*, **2009**.

- [22] J. Guillon, P. Grellier, M. Labaied, P. Sonnet, J.-M. Léger, R. Déprez-Poulain, I. Forfar-Bares, P. Dallemagne, N. Lemaître, F. Péhourcq, et al., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997–2009.
- [23] J. Guillon, I. Forfar, M. Mamani-Matsuda, V. Desplat, M. Saliège, D. Thiolat, S. Massip, A. Tabourier, J.-M. Léger, B. Dufaure, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 194–210.
- [24] J. Guillon, E. Mouray, S. Moreau, C. Mullié, I. Forfar, V. Desplat, S. Belisle-Fabre, N. Pinaud, F. Ravello, A. Le-Naour, et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2310–2326.
- [25] V. Desplat, A. Geneste, M.-A. Begorre, S. B. Fabre, S. Brajot, S. Massip, D. Thiolat, D. Mossalayi, C. Jarry, J. Guillon, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 648–658.
- [26] V. Desplat, S. Moreau, A. Gay, S. B. Fabre, D. Thiolat, S. Massip, G. Macky, F. Godde, D. Mossalayi, C. Jarry, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 204–215.
- [27] V. Desplat, S. Moreau, S. Belisle-Fabre, D. Thiolat, J. Uranga, R. Lucas, L. de Moor, S. Massip, C. Jarry, D. M. Mossalayi, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 657–667.
- [28] G. D. Birnie, *Br. J. Cancer.* **1988**, *58 (Suppl. IX)*, 41–45.
- [29] U. Schneider, H. U. Schwenk, G. Bornkamm, *Int. J. Cancer* **1977**, *19*, 621–626.
- [30] E. Klein, F. Vánky, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, *Int. J. Cancer* **1976**, *18*, 421–431.
- [31] K. Nilsson, H. Bennich, S. G. Johansson, J. Pontén, *Clin. Exp. Immunol.* **1970**, *7*, 477–89.
- [32] R. Hass, M. Hirano, S. Kharbanda, E. Rubin, G. Meinhardt, D. Kufe, *Cell growth Differ.* **1993**, *4*, 657–663.
- [33] S. Kamijo, C. Kanazawa, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9260–9266.
- [34] A. V Gulevich, A. G. Zhdanko, R. V. A. Orru, V. G. Nenajdenko, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5235–5331.
- [35] M. Suzuki, M. Miyoshi, K. Matsumoto, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1980–1980.
- [36] J. Guillon, H. Dumoulin, P. Dallemagne, R. Reynolds, S. Rault, *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1998**, *4*, 33–38.
- [37] S. Ngwerume, J. E. Camp, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6271–6274.
- [38] B. A. Trofimov, *Adv. Heterocycl. Chem.* **1990**, *51*, 177–301.
- [39] J. F. Bickley, *Arkivoc* **2002**, *vi*, 192–204.
- [40] T. L. Gilchrist, R. Mendonça, *Synlett* **2000**, *2000*, 1843–1845.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Titre de la thèse :

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs potentiels de la voie de signalisation de la sérine/thréonine kinase Akt à visée anticancéreuse

Résumé : L'inhibition des protéines kinases par de petites molécules présente un grand intérêt dans le cadre du développement de nouveaux composés anticancéreux. La protéine sérine/thréonine kinase Akt, également connu sous le nom de protéine kinase B (PKB), est une cible pour une éventuelle action thérapeutique. Les récents efforts dans le développement et l'évaluation biologique de petites molécules inhibitrices d'Akt ont conduit à l'identification de nouveaux composés hétérocyclique. En se basant sur les récents résultats d'activités antiprolifératives de composés de type pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, une nouvelle série a été élaborée et obtenue par des synthèses multi-étapes à partir d'esters substitués de type « phenyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylique acid alkyl ». Ces nouveaux composés ont été biologiquement évalués « *in vitro* » pour leur caractère antiprolifératif sur les lignées cellulaires leucémiques humaines. Les premiers résultats biologiques des nouveaux pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines ont montré une activité antiprolifératives sur les différentes lignées testées. Ces résultats préliminaires ont montré l'importance de la substitution des pyrroloquinoxalines ainsi que la fonctionnalisation du noyau pyrrole.

Title:

Synthesis and biological evaluations of Serine/Threonine Akt kinase inhibitors in cancer.

Summary: Attenuation of protein kinases by selective inhibitors is an extremely active field of activity in anticancer drug development. Therefore, Akt, a serine/threonine protein kinase, also known as protein kinase B (PKB), represents an attractive potential target for therapeutic intervention. Recent efforts in the development and biological evaluation of small molecule inhibitors of Akt have led to the identification of novel inhibitors with various heterocycle scaffolds. Based on previous results obtained on the antiproliferative activities of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, a novel series was designed and synthesized from various substituted phenyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid alkyl esters *via* multistep heterocyclization process. These new compounds were tested for their *in vitro* ability to inhibit the proliferation of the human leukemic cell lines HL60, Jurkat, K562, U266 and U937. The first biological evaluation of our new substituted pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines showed antiproliferative activity against the tested cell lines. These preliminary biological results enlightened the importance of the substitution of the pyrroloquinoxaline scaffold and the functionalisation on the pyrrole ring.

Mots clefs : Chimie ; Thérapeutique ; Inhibiteur ; Kinase ; Akt ; PKB ; Cancer ; Quinoxaline.

Laboratoire ARNA, UFR des Sciences pharmaceutiques, INSERM U869
Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex - France

Adresse mail : rmn.lcs@gmail.com