



HAL
open science

Synthèse d'un antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline

Arthur Laurent

► **To cite this version:**

Arthur Laurent. Synthèse d'un antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02497130

HAL Id: dumas-02497130

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02497130>

Submitted on 3 Mar 2020

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.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse n°29

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par LAURENT, Arthur

Né le 07 novembre 1995 à Bordeaux

Le 23 Janvier 2020

**Synthèse d'un antagoniste fluorescent spécifique du
récepteur A de l'endothéline**

Sous la direction de : Stéphane MOREAU

Membres du jury :

M. GUILLON, Jean	Professeur, UFR des Sciences Pharmaceutiques	Président du jury
M. MOREAU, Stéphane	Maître de conférences, UFR des Sciences Pharmaceutiques	Directeur de thèse
Mme BERQUE-BESTEL, Isabelle	Professeur, UFR des Sciences Pharmaceutiques	Rapporteur
Mme SZLOSEK-PINAUD Magali	Maître de Conférences, UFR de Chimie	Rapporteur

Avant-propos

“Nous trouvons de tout dans notre mémoire. Elle est une espèce de pharmacie, de laboratoire de chimie, où on met au hasard la main tantôt sur une drogue calmante, tantôt sur un poison dangereux”

Marcel Proust

« - Mais avec vos machins modernes là vous avez les boules de feu, les pluies d’pierres, vous faites tomber la foudre ?

- Non. Mais y a des trucs supers ! la posologie par exemple, il faut pas s’planter dans les dosages sinon y a des effets secondaires c’est ultra précis. Des fois y a des malades qui se font soigner pour des tout p’tits trucs, eh ben ils meurent quand même, à cause de la posologie !

- Franchement moi j’s’rais vous, j’m me méfierais d’la mode. Un truc où il faut rester une semaine au plumard à chaque fois qu’on s’coupe, ça tiendra jamais la longueur.

- Vous croyez ?

- Mais non. Comment vous dites que ça s’appelle déjà ?

- La médecine »

Kaamelott, Livre I, Le Coup d’Epée

Remerciements

Au Pr. KELLAM du Centre for Biomolecular Sciences de l'Université de Nottingham que je remercie de m'avoir permis d'utiliser ces travaux de recherche comme sujet de thèse.

A Mr. Stéphane Moreau, directeur de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre accompagnement dans cette aventure qui représente une étape importante de ma vie et de mon avenir. J'aurai eu grand plaisir à échanger avec vous, que ce soit en discutant chimie ou rugby. J'espère pouvoir vous croiser au stade un de ces jours.

A Mr. Jean Guillon, président du jury. Je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury, vous qui avez été si présent durant l'ensemble de mon cursus. Si j'ai fini par ne pas détester la chimie c'est en partie grâce à vous.

A Mmes Berque-Bestel et Szlosek-Pinaud, membres du jury. Vous avez accepté de participer à ma soutenance de thèse et je vous en remercie.

To Sarah, thank you for your help during my internship in the lab.

To my labmates, Foteini, Pauline, Quentin & Bianca. My work in the lab wouldn't have been the same without you and without our friendship. I hope we will see each other as much as we can.

A mes amis de toujours, Ronan, Adrien, Guillaume & Adrien. Voilà plusieurs années que l'on se connaît et même si le monde autour de nous a bien changé nous avons su rester les mêmes.

A ma Team de cœur, Marion, Audrey, Maxime, Nellie, Charlotte, Maëlle, Camille, Baptiste & Juliette. Ces études n'auraient pas été les mêmes sans vous, sans votre soutien, nos discussions, nos soirées.... Même la distance et les épreuves n'ont pas su nous éloigner alors j'espère que rien n'entravera cette amitié, si chère à mes yeux, pour qu'un jour peut-être nous puissions devenir la Team EHPAD.

A Camille, ma partenaire de recherche. La voie que nous avons choisie n'a pas toujours été facile alors heureusement qu'on était là pour rire de nos galères et trouver des solutions pas toujours évidentes. Il nous reste encore beaucoup de chemin à faire mais j'espère qu'un jour tous nos efforts seront récompensés.

A mes camarades d'amphi, Emile, Thomas, Julien, Morgane & Mirane. Je suis heureux d'avoir pu partager ces moments avec vous.

A Jeanine, la meilleure colocataire. Ces deux années d'études n'auraient pas été les mêmes sans notre cohabitation.

A Gilles, mon grand-père qui m'a appris l'importance du travail bien fait et de la reconnaissance qu'il apporte.

A Claire, qui m'a permis de m'évader le temps de nombreuses heures et qui a été la première à me forcer à vulgariser la science.

A mon oncle Jean, qui m'a fait découvrir les plaisirs de la plage dès mon enfance.

A tous les amis et les membres de ma famille qui m'ont accompagné et m'accompagneront tout au long de ma vie.

A mon frère, Etienne. Tu es et tu seras toujours mon meilleur pote avec qui je peux parler de tout. Je suis fier d'avoir pu grandir à tes côtés.

A mes parents, qui m'ont vu grandir et qui m'ont enseigné tout ce que je sais. Merci de m'avoir soutenu et supporté tout au long des épreuves que j'ai pu traverser. Je vous dois tout ce que je suis aujourd'hui et j'espère vous avoir rendu fier. Je vous aime fort.

Table des matières

Avant-propos.....	2
Remerciements	3
Table des matières	5
Table des illustrations.....	8
Liste des abréviations	12
Introduction.....	17
Chapitre 1. L'hypertension artérielle pulmonaire ^{[1], [2]}	21
1.1 Définition.....	21
1.2 Epidémiologie ^[3]	21
1.3 Diagnostic	21
1.3.1 Détection et confirmation de l'HTAP	22
1.3.2 Classification.....	22
1.3.3 Evaluation de la sévérité et de l'impact sur la vie du patient	24
1.4 Prise en charge thérapeutique	24
1.4.1 Objectifs.....	24
1.4.2 Règles hygiéno-diététiques	24
1.4.3 Traitement médicamenteux.....	25
1.4.4 Traitement non médicamenteux.....	26
Chapitre 2. L'endothéline et ses récepteurs	27
2.1 L'endothéline ^{[4], [5]}	27
2.1.1 Biosynthèse	27
2.1.2 Structure (<i>Figure 2.</i>)	28

2.1.3	Rôles	28
2.2	Les récepteurs à l'endothéline ^{[6], [7]}	30
2.2.1	Le récepteur A de l'endothéline	31
2.2.2	Le récepteur B de l'endothéline	31
2.2.3	Distribution des récepteurs	31
2.2.4	Rôles des récepteurs au niveau vasculaire	33
Chapitre 3.	Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ^[8]	37
3.1	Les récepteurs	38
3.1.1	Structure	38
3.1.2	Classification	39
3.1.3	Activation	39
3.2	Les protéines G	40
3.2.1	Structure (<i>Figure 9.</i>)	41
3.2.2	Classification	41
3.2.3	Activation (<i>Figure 11.</i>)	42
3.3	Voies de signalisation	43
3.3.1	Adénylate cyclase	44
3.3.2	Phospholipase C	44
3.3.3	Phosphodiesterase	44
3.3.4	Petites protéines G ^{[11], [12]}	44
Chapitre 4.	Antagonistes des récepteurs à l'endothéline	45
4.1	Généralités sur le développement chimique de nouveaux composés à visée thérapeutique ^[13]	45
4.2	Les antagonistes du récepteur A de l'endothéline ^{[4], [14]}	47
4.3	Développement d'analogues des sulfonamides comme antagonistes sélectifs de ET _A ^{[15], [16]}	49

Chapitre 5.	Fonctionnalisation de la molécule par un fluorophore ^{[22], [23]}	59
5.1	Lumière.....	59
5.2	Fluorescence.....	60
5.3	Spectre de fluorescence	63
5.3.1	Excitation/émission	63
5.3.2	Déplacement de Stokes.....	65
5.3.3	Luminosité du fluorophore.....	65
5.4	Ligand fluorescent ^{[16], [24]}	66
Chapitre 6.	Travail de recherche	69
6.1	Stratégie de synthèse	69
6.1.1	Thiophène isoxazole	71
6.1.2	Aniline.....	71
6.1.3	Linker	73
6.1.4	Fluorophore.....	74
6.2	Chimie.....	75
6.2.1	Thiophène isoxazole	75
6.2.2	Aniline.....	77
6.2.3	Linker	82
6.3	Perspectives.....	83
Conclusion	87
Experimental section	89
Références bibliographiques	119

Table des illustrations

Figure 1. Synthèse de l'endothéline	27
Figure 2. Isoformes de l'endothéline ^[2]	28
Figure 3. Rôles de l'endothéline.....	29
Figure 4. Expression de l'ARNm de ET _A (A) et de ET _B (B) dans le corps humain ^[6]	32
Figure 5. Répartition d'ET _A et ET _B dans les différents organes ^[6]	33
Figure 6. Structure du récepteur couplé à une protéine G.....	38
Figure 7. Site de liaison du ligand (en rouge) ^[9]	39
Figure 8. Activation des RCPG	40
Figure 9. Structure des protéines G	41
Figure 10. Homologie de séquence des sous unités α ^[10]	42
Figure 11. Cycle d'activation d'un RCPG.....	43
Figure 12. Développement d'un médicament	45
Figure 13. Processus de développement d'un médicament	46
Figure 14. Sitaxentan.....	49
Figure 15. Thiophène sulfonamide ^[19]	52
Figure 16. Analogues du Mesitylcarboxamide thiophène sulfonamide ^[16]	52
Figure 17. Biodisponibilité orale du Sitaxentan et d'analogues du Mesitylcarboxamide thiophène sulfonamide ^[16]	53
Figure 18. Comparaison de 3a et 7z	56
Figure 19. Composé 7q	57
Figure 20. Spectre électromagnétique	60
Figure 21. Processus d'excitation et de retour à l'état fondamental.....	62
Figure 22. Exemples de fluorophores	63
Figure 23. Spectre d'excitation/émission.....	63
Figure 24. Intensité du maximum d'émission.....	64

Figure 25. Spectre d'excitation/émission de molécules possédant plusieurs fluorophores	64
Figure 26. Déplacement de Stokes (Δ)	65
Figure 27. Interactions entre 7z et ET _A ^[16]	67
Figure 28. Résumé des interactions entre 7z et ET _A ^[16]	68
Figure 29. Antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline	69
Figure 30. Rétrosynthèse	70
Figure 31. Synthèse du thiophène isoxazole	71
Figure 32. Rétrosynthèse de l'aniline	72
Figure 33. Stratégie de synthèse de l'aniline	72
Figure 34. Formation de la liaison amide	72
Figure 35. Linker PEG	73
Figure 36. Préparation du linker	73
Figure 37. Fonctionnalisation du composé avec le linker	74
Figure 38. BODIPY 630/650	74
Figure 39. Halogénéation de l'isoxazole	75
Figure 40. Addition du thiophène	75
Figure 41. Protection au MOM	76
Figure 42. Hydrolyse de l'ester	76
Figure 43. Formation du chlorure d'acide	77
Figure 44. Benzylation du phénol	79
Figure 45. Synthèse du 2,5-diméthyl-4-nitrophényloxybenzyle	80
Figure 46. Réduction du 2,5-diméthyl-4-nitrophényloxybenzyle	80
Figure 47. Chromatographie sur Couche Mince	81
Figure 48. Acylation de la p-anisidine	82
Figure 49. p-acétanide	82
Figure 50. Protection du linker avec un CBz	82
Figure 51. Addition du p-toluènesulfonyle	83
Figure 52. Analogues de l'antagoniste	83

Figure 53. Analogue méta-hydroxyle.....	84
Figure 54. 2,5-diméthylbromobenzène.....	84
Figure 55. Alternatives à la protection de l'hydroxyle	85

Tableau 1. Classification des protéines G.....	42
Tableau 2. Kd de ET _A /ET _B de différentes classes d'antagonistes sélectifs d'ET _A	48
Tableau 3. Screening de HIT de la collection BMS ^[15]	49
Tableau 4. Modifications de la fonction sulfonamide et analogues de l'isoxazole ^[15]	50
Tableau 5. Effets d'une substitution en ortho sur l'affinité et la sélectivité pour ET _A ^[16]	53
Tableau 6. Ortho analogues de la cétone 3a ^[16]	54
Tableau 7. Modifications de la cétone 3a ^[16]	54
Tableau 8. Analogues Ortho du système triméthylphényle ^[16]	55
Tableau 9. Cinétique de quelques analogues du composé 3a ^[16]	56
Tableau 10. Biodisponibilité orale ^[16]	56

Liste des abréviations

HTAP	Hypertension Artérielle Pulmonaire
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
ET _{A/B}	Récepteur A/B de l'endothéline
NO	Monoxyde d'azote
mmHg	millimètres de Mercure
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ETT	Echographie Trans Thoracique
BMPR2	Récepteur Morphogénétique Osseux de type II
PAPm	Pression Artérielle Pulmonaire moyenne
PAPO	Pression Artérielle Pulmonaire d'Occlusion
RAP	Résistance Artérielle Pulmonaire
BNP	Brain Natriuretic Peptide
PaO ₂	Pression partielle en oxygène
NYHA	New York Heart Association
ET	Endothéline
ARNm	Acide Ribo Nucléique messenger
nM	nanoMolaire
GABA	Acide gamma amino butyrique
GTP	Guanosine Tri Phosphate

GDP	Guanosine Di Phosphate
kDa	kiloDalton
GTPasique	Hydrolyse du GTP en GDP
AC	Adénylate Cyclase
PDE	PhosphoDiEstérase
GMPc	Génrayl MonoPhosphate cyclique
PLC-β	PhosphoLipase – C β
AMPc	Adényl MonoPhosphate cyclique
DAG	DiAcyl Glycérol
IP ₃	Inositol Tri Phosphate
€	Euros
μM	microMolaire
BMS	Bristol-Myers-Squibb
pKa	pKa = -log(Ka) (Ka : constante d'acidité)
V	Vitesse
T	Période
v	Fréquence
λ	Longueur d'onde
h	Constante de Planck
c	Vitesse de la lumière dans le vide
eV	Electrons Volts

HOMO	Orbitale Moléculaire Occupée de plus Haute énergie
LUMO	Orbitale Moléculaire Inoccupée de plus Basse énergie
nm	Nanomètres
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
MOM	Méthyle-O-Méthyle
PEG	PolyEthylène Glycol
CBz	CarboxyBenzyle
NCS	<i>N</i> -Chlorosuccinimide
DCM	DiChloroMéthane
°C	Degrés Celsius
NaH	Hydrure de sodium
THF	TétraHydroFurane
(iPr) ₂ Net	DilsoPropylEthylAmine
NaOH	Hydroxyde de sodium
HNO ₃	Acide nitrique
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
Pd/C	Palladium sur Charbon
H ₂	DiHydrogène
BCl ₃	TriChlorure de Bore
MeCN	Acétonitrile
HCl	Acide Chlorhydrique

H ₂ O	Eau
MeOH	Méthanol
TsCl	Chlorure de Tosyle
Cs ₂ CO ₃	Carbonate de Césium
DMF	DiMéthyle Formamide
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
pH	potentiel Hydrogène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
M	Molaire
K ₂ CO ₃	Carbonate de Potassium
h	Heures
R _f	Rapport frontal
AcOEt	Acétate d'Ethyle
NaNO ₂	Nitrite de sodium
Zn	Zinc
NH ₄ Cl	Chlorure d'amonium
mg	Milligrammes
AlCl ₃	Tri Chlorure d'Aluminium
Et ₃ N	TriEthylAmine

Introduction

La chimie est une science qui existe depuis des millénaires. Elle est née avec l'Univers et sera encore là quand nous ne le serons plus. Elle est présente avec nous chaque jour dans notre environnement, nos muscles, nos os, notre cerveau. Elle est l'air que nous respirons ainsi que les murs de nos maisons. C'est elle qui fait de nous des êtres conscients doués d'intelligence et qui nous permet d'interagir avec notre environnement.

Tout en parcourant ces lignes, le lecteur met en jeu un ensemble de neurones présents dans son cerveau qui lui permettent d'enregistrer et de comprendre ce qu'il est en train de lire. Cette information sera véhiculée à travers le système nerveux via diverses molécules chimiques appelées neurotransmetteurs. Il s'agit là d'un exemple de l'implication de la chimie dans le domaine du vivant.

Les sciences chimiques peuvent être utilisées de diverses façons pour répondre aux questions biologiques que les chercheurs se posent encore aujourd'hui.

La première, et la plus évidente de toutes, consiste à concevoir des outils thérapeutiques, c'est la chimie médicinale. Il s'agit de molécules chimiques bien spécifiques qui, une fois transformées en médicaments, permettront de prévenir ou traiter bon nombre de pathologies diverses et variées.

L'autre, moins connue, reste tout aussi importante. Il s'agit de ce que l'on appelle la chimie biologique. Son but est de construire et d'utiliser des outils chimiques de manière à comprendre certains processus encore inexplorés du vivant. Tout cela dans l'objectif d'améliorer notre connaissance et de développer de nouveaux outils thérapeutiques plus efficaces, notamment dans le domaine des maladies cardiovasculaires.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une des nombreuses pathologies impliquant le système cardiovasculaire. Elle se traduit par une augmentation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires.

Certains médicaments utilisés dans le traitement de l'HTAP ciblent le système de l'endothéline. C'est le cas pour l'Ambrisentan (VOLIBRIS®) et le Bosentan (TRACLEER®).

L'endothéline, un peptide de 21 acides aminés produit par les cellules endothéliales, est impliquée dans de nombreux processus biologiques et particulièrement au niveau du système cardiovasculaire. Son rôle dans la vasoconstriction/vasodilatation en a fait une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des maladies cardiovasculaires et tout particulièrement l'HTAP.

Le peptide agit via son interaction avec deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) localisés dans différentes régions du système vasculaire.

Le récepteur A de l'endothéline (ET_A) est majoritairement exprimé au niveau des cellules musculaires lisses et son activation entraîne une réponse contractile. Au contraire, le récepteur B de l'endothéline (ET_B) est localisé sur les cellules endothéliales et l'action d'un agoniste sur ce récepteur induit une libération d'agents vasodilatateurs (NO, prostaglandines...). Il participe également à l'élimination de l'endothéline présente dans la circulation sanguine grâce à l'internalisation du complexe ligand-récepteur.

Un certain nombre d'études sur ces récepteurs ont été effectuées et notamment sur le développement de molécules agonistes/antagonistes.

Le but de ce projet de recherche est de synthétiser un antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline pouvant être utilisé lors de tests cellulaires de manière à étudier (*in vitro* et *in vivo*) la localisation de ET_A au niveau du système vasculaire.

Dans une première partie, nous commencerons par définir l'hypertension artérielle pulmonaire, son diagnostic et ses traitements pour ensuite parler plus en détail de l'endothéline et de ses récepteurs couplés aux protéines G.

Dans une seconde partie, nous évoquerons les travaux de recherche qui ont déjà été effectués concernant les antagonistes du récepteur A de l'endothéline, dont certains sont déjà disponibles sur le marché.

Nous introduirons dans une troisième partie le principe de fluorescence afin d'étudier la fonctionnalisation du ligand à l'aide du fluorophore adéquat.

Enfin nous aborderons le travail de synthèse chimique effectué dans le cadre d'un stage de Master 2 sous la direction du Pr. Barrie KELLAM et sous l'encadrement de Sarah MITSRY au Centre for Biomolecular Sciences à l'Université de Nottingham en Angleterre.

Chapitre 1. L'hypertension artérielle pulmonaire ^{[1], [2]}

1.1 Définition

L'hypertension artérielle pulmonaire est une affection de longue durée touchant le système cardiovasculaire et caractérisée par une augmentation anormale de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires et se compliquant généralement par une insuffisance cardiaque.

Cette pathologie est définie par une valeur de pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'effort.

Elle peut apparaître sans cause connue (HTAP idiopathique), dans un contexte familial (HTAP familiale), comme complication d'une autre pathologie (cardiopathie congénitale, VIH...) ou à la suite d'un comportement à risque (prise d'anorexigènes).

1.2 Epidémiologie ^[3]

L'hypertension artérielle pulmonaire touche les personnes entre 30 et 50 ans et majoritairement les femmes. En France, 6 personnes sur 1 million sont atteintes d'HTAP idiopathique contre 15 sur 1 million pour les HTAP associées.

1.3 Diagnostic

Le diagnostic de l'hypertension artérielle pulmonaire se compose de trois étapes :

- Détecter et confirmer l'HTAP
- La classer et rechercher d'éventuelles pathologies associées
- Evaluer sa sévérité et son impact sur les aspects socioprofessionnels de la vie du patient

1.3.1 Détection et confirmation de l'HTAP

Pour pouvoir détecter une quelconque élévation de la pression artérielle pulmonaire on utilise une échographie cardiaque transthoracique couplée au Doppler (ETT) qui peut être réalisée lorsque l'on suspecte une hypertension artérielle pulmonaire ou lors d'un dépistage chez des patients à haut risque (mutation BMPR2 connue, parents au premier degré d'un patient atteint d'HTAP familiale, sclérodermie, cardiopathie congénitale avec shunt gauche-droit, hypertension portale au moment du bilan pré-greffe hépatique).

Si l'HTAP est détectée lors de l'échographie cardiaque il faudra alors la confirmer par cathétérisme cardiaque afin d'affirmer l'atteinte pré-capillaire.

Au final, le diagnostic est établi sur la mise en évidence :

- D'une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos ou 30 mmHg à l'effort
- D'une pression d'occlusion (PAPO) inférieure à 15 mmHg
- Des résistances artérielles pulmonaires (RAP) supérieures 3 Unités Wood.

1.3.2 Classification

Une fois la pathologie diagnostiquée, il convient de la classer en réalisant différents examens dont le but est de déterminer la cause de l'HTAP. Cette classification permet ainsi d'adapter la prise en charge du malade.

Groupe 1 : hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

- Idiopathique
- Familiale
- Associée à une condition sous-jacente :
 - o Connectivite
 - o Cardiopathie congénitale avec shunt
 - o Hypertension portale

- Infection au VIH
- Prise d'anorexigènes et de drogues
- Autres (dysthyroïdie, maladie de Gaucher, hémoglobinopathies, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie, télangiectasie héréditaire)
- Associée à une atteinte veineuse/capillaire :
 - Maladie veino-occlusive
 - Hémangiomatose capillaire
- Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

Groupe 2 : hypertension pulmonaire associée à une cardiopathie gauche

- Cardiopathie auriculaire ou ventriculaire gauche.
- Valvulopathie gauche

Groupe 3 : hypertension pulmonaire associée aux maladies respiratoires et/ou à l'hypoxie

- Bronchopathie chronique obstructive
- Maladie interstitielle pulmonaire chronique
- Pathologies respiratoires du sommeil
- Hypoventilation alvéolaire
- Exposition chronique à l'altitude
- Anomalies du développement

Groupe 4 : hypertension pulmonaire liée à une maladie thromboembolique chronique

- Obstruction thromboembolique proximale
- Obstruction thromboembolique distale
- Obstruction non thrombotique (emboles métastatiques, parasites, matériel étranger)

Groupe 5 : autres

- Sarcoïdose
- histiocytose X

- lymphangiomyomatose
- compression vasculaire pulmonaire (adénopathies, tumeurs, fibrose médiastinale)

1.3.3 Evaluation de la sévérité et de l'impact sur la vie du patient

Il s'agit d'analyser la répercussion fonctionnelle de la maladie sur le quotidien du malade tout en collectant des informations ayant une valeur pronostique sur l'évolution possible de sa pathologie.

Cette évaluation comprend notamment :

- Un interrogatoire du patient pour connaître ses antécédents
- Un test de tolérance à l'effort
- Des données hémodynamiques
- Une évaluation de la fonction ventriculaire droite
- Un dosage plasmatique de certaines substances
 - o Brain Natriuretic Peptide (BNP)
 - o Troponine T

1.4 Prise en charge thérapeutique

1.4.1 Objectifs

- Amélioration de la survie et de la qualité de vie
- Amélioration des symptômes, des capacités à l'effort et de l'hémodynamique
- Education du patient
- Dépistage et traitement des complications possibles (insuffisance cardiaque)
- Prise en charge psychologique

1.4.2 Règles hygiéno-diététiques

Ces règles sont une première approche au traitement de la maladie et elles mettent le patient à contribution.

La première étape de cette éducation thérapeutique consiste à ce que le malade soit familiarisé avec sa pathologie et les traitements qui lui sont associés. Cela aura pour conséquence une meilleure observance de la part du patient qui sera à même de comprendre l'intérêt des traitements qui lui seront prescrits.

A cela s'ajoute un ensemble de règles et de consignes :

- Limiter les apports en sels
- Limiter les efforts
- Pratiquer une activité physique régulière adaptée à la sévérité des symptômes
- Favoriser la sociabilisation
- Eviter les situations pouvant majorer l'hypoxie (ex : séjour en haute altitude)
- Eviter les anesthésies générales
- Contre-indiquer une grossesse

Pour les aider dans ces démarches, les malades peuvent faire appel à une des associations de patients spécifiques de l'HTAP.

1.4.3 Traitement médicamenteux

Hormis pour l'HTAP de classe III et IV (classification de la NYHA) il n'existe à ce jour aucune recommandation de traitement. C'est pourquoi les personnes nécessitant un traitement sont dirigées vers un spécialiste qui, après avoir initié un traitement en fonction de l'état du patient, l'adaptera suivant sa réponse aux différents traitements proposés.

Les médicaments prescrits sont des vasodilatateurs ayant uniquement un effet symptomatique ; ils permettent une diminution de la pression artérielle en dilatant les vaisseaux sanguins.

Le traitement ayant montré la meilleure efficacité à ce jour est la prostacycline (époprosténol), administrée en perfusion continue via une pompe connectée à un cathéter tunnelisé sous-clavier. La première administration de ce produit a lieu en milieu hospitalier du fait de la

complexité du dispositif d'administration et de la surveillance constante du débit d'administration.

D'autres vasodilatateurs plus « classiques » sont également employés tels que des inhibiteurs des canaux calciques, des analogues de la prostacycline (iloprost en aérosol et téprostnil en sous-cutané), des antagonistes des récepteurs de l'endothéline (bosentan, ambrisentan) ou des inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 (sildénafil).

A ces vasodilatateurs sont généralement associés :

- Un traitement anticoagulant (anti vitamine K) pour diminuer le risque de thrombose
- Un traitement diurétique pour diminuer la surcharge ventriculaire droite
- De digitaliques en cas de fibrillation auriculaire permanente ou paroxystique
- Des contraceptifs oraux

1.4.4 Traitement non médicamenteux

Des traitements non médicamenteux peuvent également être utilisés :

- Oxygénothérapie au long cours en cas d'hypoxémie importante ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$)
- Traitement chirurgical :
 - Atrioseptostomie (ouverture du septum inter-auriculaire par voie endovasculaire pour diminuer les pressions à droite et ainsi améliorer le débit cardiaque) pour les HTAP sévères mais elle n'est pas communément utilisée en France
 - Transplantation cardiopulmonaire en ultime recours dans les cas d'HTAP sévères réfractaires aux traitements

Chapitre 2. L'endothéline et ses récepteurs

2.1 L'endothéline [4], [5]

L'endothéline (ET) a été identifiée comme étant un agent vasoactif à longue durée d'action impliqué, en plus de ces fonctions biologiques normales, dans quelques pathologies humaines et notamment cardiovasculaires.

2.1.1 Biosynthèse

Les peptides endogènes de 21 acides aminés qui constituent la famille de l'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3) sont produits par les cellules endothéliales sous forme d'un long précurseur de 212 acides aminés, la pré-proendothéline. Ce peptide est ensuite clivé au niveau des sites dibasiques par une protéase de type furin-like pour donner la big-ET, aussi appelée pro-ET, une molécule biologiquement inactive de 37 à 41 acides aminés. Ce précurseur est finalement clivé par l'enzyme de conversion de l'endothéline pour donner le peptide de 21 acides aminés (*Figure 1.*). Une fois synthétisés, ces peptides peuvent être sécrétés ou conservés dans des granules intracellulaires dans l'attente d'être libérés en réponse à un stimulus.

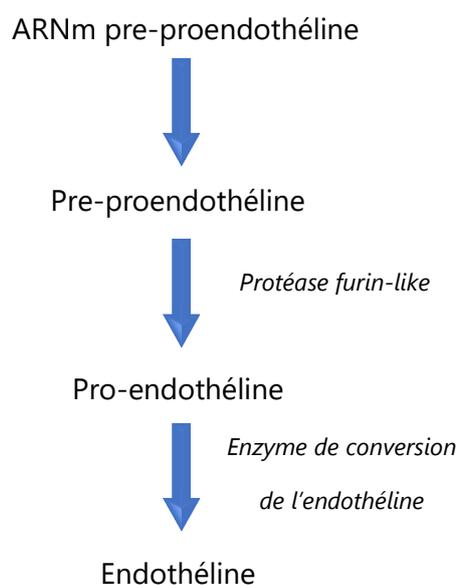


Figure 1. Synthèse de l'endothéline

Même si la majeure partie de l'endothéline-1 est synthétisée au niveau cardiovasculaire, certains de ces peptides sont aussi exprimés par les leucocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales respiratoires, les fibroblastes, les myocytes cardiaques, les neurones cérébraux ou encore les îlots pancréatiques.

L'endothéline 2, quant à elle, est retrouvée au niveau des ovaires et des cellules épithéliales intestinales alors que l'endothéline-3 est exprimée par les cellules endothéliales, les neurones cérébraux, les cellules épithéliales tubulaires rénales ainsi que les cellules épithéliales intestinales.

2.1.2 Structure (Figure 2.)

Ces molécules sont caractérisées par une simple hélice α , deux ponts disulfures et six résidus d'acides aminés conservés dans la région C-terminale.

Les isoformes 2 et 3 de l'endothéline ne diffèrent de l'ET-1 que par, respectivement, deux et six acides aminés.

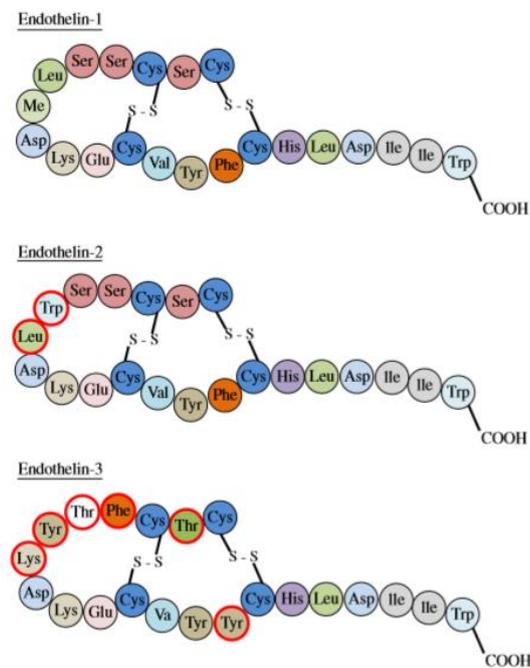


Figure 2. Isoformes de l'endothéline [2]

2.1.3 Rôles

Il a été observé que l'endothéline est 100 fois plus active que la noradrénaline.

Au niveau vasculaire, l'endothéline induit une vasoconstriction basale et participe au développement de certaines pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou l'hypertension. Au niveau du cœur elle induit un effet inotrope et chronotrope positifs. Elle entraîne également l'apparition d'arythmies ainsi que le remodelage cardiaque faisant suite à une attaque cardiaque.

Au niveau du poumon, elle participe à la régulation du tonus bronchique et à la croissance des petits vaisseaux sanguins. Elle est également impliquée dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Également présente au niveau rénal, l'endothéline contribue à l'excrétion de l'eau et du sodium ainsi qu'à la balance acido-basique dans les conditions physiologiques. Elle accélère également le développement de gloméruloscléroses.

Au niveau cérébral, l'endothéline est impliquée dans le contrôle des centres cardiorespiratoires.

Au-delà de ces fonctions, l'endothéline possède d'autres rôles au niveau du système immunitaire, du foie, des muscles, des os, de la peau, du tissu adipeux et même dans la reproduction.

La présence de ces peptides à tous ces niveaux de l'organisme traduit bien ses effets pléiotropiques (*Figure 3.*).

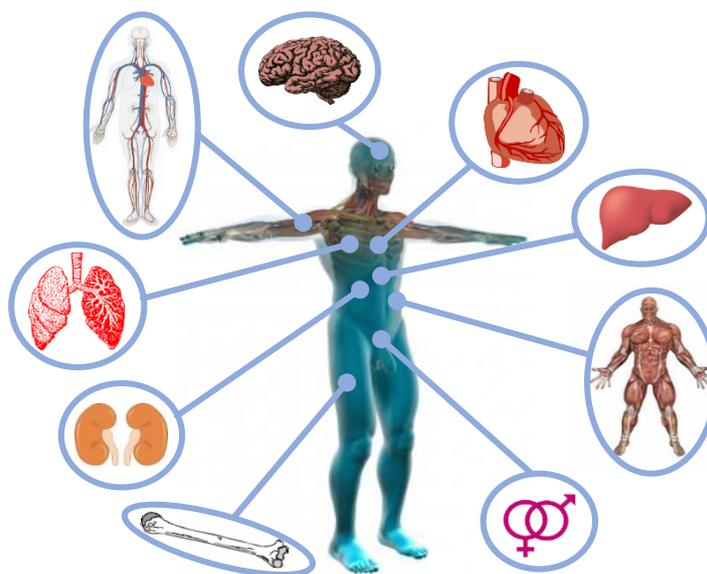


Figure 3. Rôles de l'endothéline

L'endothéline 1 (ET-1), le plus étudié et le plus représentatif des peptides de cette famille, régule le tonus vasculaire via son interaction avec deux récepteurs ; les récepteurs de l'endothéline A (ET_A) présents sur les cellules musculaires lisses et les récepteurs de l'endothéline B (ET_B) présents sur les cellules endothéliales.

2.2 Les récepteurs à l'endothéline ^{[6], [7]}

Les récepteurs à l'endothéline sont des récepteurs couplés aux protéines G de classe A identifiés en 1990, soit 2 ans après la découverte de leur ligand peptidique.

Ils partagent une voie de signalisation commune via l'hydrolyse du phosphatidylinositol qui génère, après mise en jeu de divers seconds messagers, une augmentation de la concentration de calcium cytosolique. En plus de cette cascade de signalisation, ils sont capables de stimuler d'autres effecteurs, comme des kinases ou des phospholipases, ce qui permet d'expliquer les effets pléiotropiques de l'endothéline dans le corps humain.

Ces récepteurs ont été retrouvés chez de nombreuses espèces et notamment des espèces invertébrées ce qui suggère, de par leur conservation au sein des espèces, que ces récepteurs ont eu une place importante dans l'évolution de la cellule eucaryote.

Cependant, les gènes codant pour les peptides de l'endothéline n'ont pu être identifiés que chez les vertébrés. Cela met ainsi en évidence le fait que le système de l'endothéline est une évolution propre aux vertébrés et vraisemblablement associée au développement du système vasculaire.

A ce jour, deux récepteurs de l'endothéline ont pu être clairement identifiés, le récepteur A (ET_A) et le récepteur B (ET_B). Sur une séquence de 420 résidus, ET_A présente 63% d'homologie de séquence avec ET_B.

Il existe d'autres récepteurs minoritaires et n'étant que peu impliqués dans le système de l'endothéline mais nous ne savons pas encore s'il s'agit d'un autre type de récepteur ou seulement des sous-types de ceux déjà décrits.

2.2.1 Le récepteur A de l'endothéline

La séquence d'acides aminés du récepteur A de l'endothéline est similaire entre l'Homme et l'animal. Les seules différences observées se situent au niveau de la partie *N*-terminale. Au contraire, il y a une forte similarité structurale du domaine de liaison entre différentes espèces, ce qui permet d'expliquer la conservation de la structure de l'endothéline 1 entre ces mêmes espèces.

Contrairement à ET_B où la liaison du ligand entraîne une phosphorylation du récepteur aboutissant à sa désensibilisation et donc une perte d'activité dans les cinq minutes suivant la fixation, le récepteur A ne subit aucune phosphorylation induite par la fixation de son ligand entraînant ainsi une persistance du signal associée à une vasoconstriction de longue durée.

2.2.2 Le récepteur B de l'endothéline

Une des particularités de ET_B est son extrémité *N*-terminale pouvant être clivée par une métalloprotéase sans pour autant empêcher la fixation de l'endothéline sur le récepteur.

Il a été suggéré que les domaines transmembranaires numéros 1, 2, 3 et 7 seraient impliqués dans la liaison du ligand avec sa cible.

2.2.3 Distribution des récepteurs

L'ARN messager (ARNm) issu des gènes codants pour les récepteurs de l'endothéline ont pu être identifiés dans les tissus et organes du corps humain recevant des apports sanguins traduisant ainsi leur expression ubiquitaire (*Figure 4.*).

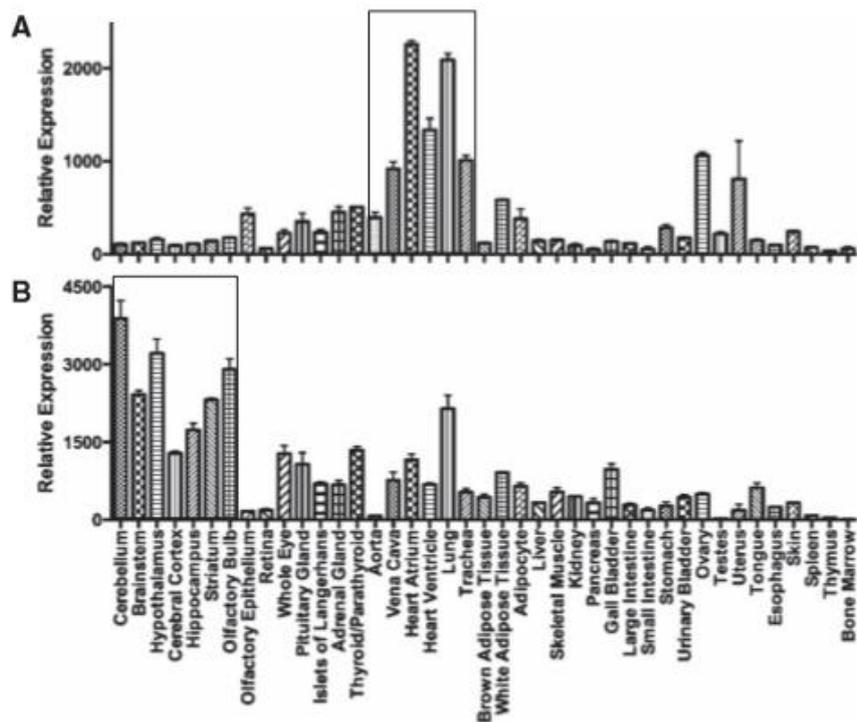


Figure 4. Expression de l'ARNm de ET_A (A) et de ET_B (B) dans le corps humain [6]

Au niveau vasculaire, ET_A est situé sur les cellules musculaires lisses alors que ET_B est majoritairement exprimé au niveau des cellules endothéliales.

Le récepteur A est retrouvé en grand nombre au niveau du cœur et des poumons mais en proportion moindre dans le système nerveux central (Figure 4.). En effet, le cerveau contient une forte densité de récepteurs à l'endothéline où 90% des récepteurs exprimés au niveau du cortex cérébral sont de type B (Figure 5.).

Au niveau périphérique, les poumons présentent la plus forte densité de récepteurs à l'endothéline (Figure 4.). C'est ET_A qui prédomine au niveau des muscles lisses des artères pulmonaires et des résistances vasculaires (Figure 5.) où il serait impliqué dans la vasoconstriction. ET_B, lui, est retrouvé en grande majorité au niveau de l'endothélium mais il est également localisé sur les muscles lisses des voies respiratoires où il participerait à la bronchoconstriction. Une implication de ET_B au niveau des résistances vasculaires pulmonaires a également été suggérée.

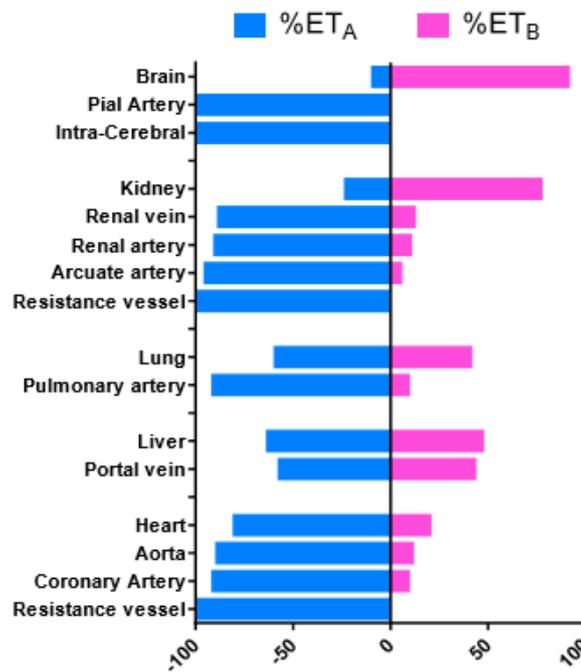


Figure 5. Répartition d'ET_A et ET_B dans les différents organes [6]

Dans le cœur humain, les deux types de récepteurs se retrouvent exprimés au niveau de l'atrium et des ventricules. 90% des récepteurs présents dans les myocytes cardiaques se trouvent être des récepteurs A alors que les récepteurs de type B sont majoritairement exprimés au niveau du système conducteur atrioventriculaire.

Si l'on compare le cœur d'un patient atteint d'HTAP avec celui d'un patient sain, nous pouvons observer une augmentation non négligeable du ratio ET_A/ET_B au niveau du ventricule droit chez le patient souffrant d'HTAP. Cela fait suite à l'adaptation du corps permettant d'augmenter le débit cardiaque en cas d'insuffisance cardiaque.

Cette augmentation est également retrouvée au niveau de la media des petites artères pulmonaires chez les patients atteints d'HTAP.

2.2.4 Rôles des récepteurs au niveau vasculaire

L'action de l'endothéline sur ses récepteurs permet une régulation de la fonction vasculaire et du flux sanguin dans la plupart des organes du corps humain.

L'endothéline 1, l'isoforme la plus abondante au niveau vasculaire entraîne une vasoconstriction principalement via sa liaison à ET_A qui se trouve être le récepteur le plus abondant au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins.

La liaison de l'endothéline 1 au récepteur de type A est très forte et, comme il n'y a pas de mécanisme de désensibilisation du récepteur, cela nous permet d'en déduire que l'endothéline est un vasoconstricteur à longue durée d'action.

Etant donné qu'en conditions physiologiques, le peptide est libéré continuellement par l'endothélium cela impliquerait une vasoconstriction quasi continue des vaisseaux sanguins. Or ce n'est pas le cas. Cela s'explique par l'action de l'endothéline sur le récepteur de type B présent au niveau de l'endothélium vasculaire. En effet, l'endothéline une fois libérée par l'endothélium pourra agir de manière autocrine sur les ET_B et ainsi entraîner la libération d'agents vasodilatateurs permettant de réguler le tonus basal des vaisseaux sanguins.

Un certain nombre de vasodilatateurs ont été testés expérimentalement et seul le monoxyde d'azote (NO) a entraîné une réversion complète de la vasoconstriction induite par l'endothéline.

En conditions pathologiques, les cellules endothéliales deviennent dysfonctionnelles ce qui conduit à une diminution de la libération d'agents vasodilatateurs et donc une potentialisation de la vasoconstriction et des autres effets pathologiques induits par l'endothéline.

Lorsque la concentration en endothéline dans les vaisseaux sanguins est faible ($< 1\text{nM}$) une réponse contractile bloquée par un antagoniste de ET_B est observée. Cependant, à des concentrations plus importantes la contraction n'est bloquée que par un antagoniste de ET_A , signe qu'en conditions pathologiques où la concentration en endothéline est augmentée, la réponse contractile est seulement médiée par ET_A .

Cette affirmation est renforcée par le fait que, chez un patient atteint d'HTAP, la population de l'ensemble des récepteurs de l'endothéline est augmentée par rapport à un patient sain mais la proportion ET_A/ET_B reste inchangée. Les récepteurs de type A sont donc toujours majoritaires

sur les cellules musculaires lisses vasculaires et il y a peu de chances que la réponse contractile soit médiée par ET_B.

Le récepteur B de l'endothéline participe également à l'élimination de l'endothéline de la circulation sanguine, principalement au niveau des poumons, du foie et des reins, grâce à l'internalisation du complexe ligand-ET_B.

Grâce à une population non négligeable de récepteurs localisés sur l'ensemble du système vasculaire ainsi qu'un équilibre vasoconstriction/vasodilatation, le système de l'endothéline est donc capable de médier le tonus vasculaire.

Chapitre 3. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ^[8]

Au jour d'aujourd'hui, les RCPG sont une cible majeure des médicaments disponibles sur le marché.

Le grand nombre de médicaments agissant sur ces récepteurs s'explique par la grande diversité des récepteurs de la famille des RCPG et par la multitude de gènes codant pour ces récepteurs. De plus tous les RCPG ne sont pas identifiés à l'heure actuelle et même si certains sont caractérisés, on ne connaît pas encore leur structure exacte. Seulement 370 gènes sont connus sur les 600 à 2000 gènes codant pour ces récepteurs ce qui correspond à environ 2% de l'ensemble des protéines de notre organisme. Parmi eux, 250 récepteurs ont été caractérisés et leurs ligands identifiés alors que 120 sont dit « orphelins », car nous savons qu'ils appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G mais leurs ligands et leurs fonctions ne sont pas encore connus.

A cette diversité s'ajoute le fait que 99% des cellules de l'organisme expriment au moins un RCPG qui, même s'ils ont des similarités structurales, peuvent lier des médiateurs de structures très diverses (peptides, neuromédiateurs, hormones...).

Ces cibles sont constituées de trois composants essentiels pour une activité adéquate :

- Un récepteur possédant une structure particulière et permettant la liaison avec un ou des médiateurs précis
- Une protéine G, activée via son interaction avec le récepteur suite à la liaison du médiateur
- Une voie de signalisation dépendante des 2 éléments précédents

3.1 Les récepteurs

3.1.1 Structure

Les récepteurs couplés aux protéines G sont des glycoprotéines retrouvées uniquement au niveau de la membrane cellulaire. La fixation d'un ligand permet d'activer une protéine G qui, à son tour, entraînera l'activation d'une voie de signalisation endogène.

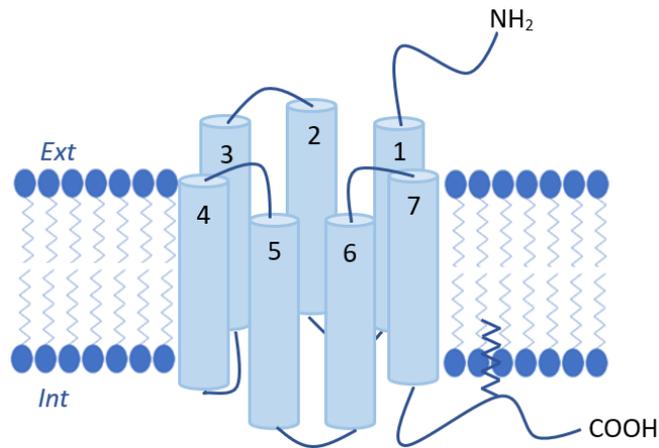


Figure 6. Structure du récepteur couplé à une protéine G

Leur structure quasi unique se compose de différents éléments (Figure 6.) :

- Une extrémité N-terminale pouvant participer à la liaison du ligand
- 7 hélices transmembranaires de 20 à 22 acides aminés hydrophobes reliées entre elles par des
 - o Ponts extracellulaires généralement disulfures parfois impliqués dans la liaison du médiateur
 - o Ponts intracellulaires dont les deux premiers ont un rôle de maintien alors que le 3e interagit avec la protéine G ce qui explique sa grande variabilité de séquence entre les différents récepteurs
- Une extrémité C-terminale impliquée dans la liaison avec la protéine G
- Une pseudo 4e boucle permettant de rattacher la partie C-terminale à la membrane plasmique grâce à une interaction avec des phospholipides de la membrane

La structure de ces récepteurs varie en fonction de leur rôle et de leur localisation dans l'organisme. Cependant, il existe quelques résidus communs dont certains permettent la liaison avec le ligand.

Au travers de la membrane cellulaire, les domaines transmembranaires du récepteur adoptent une structure tubulaire permettant la fixation d'un ligand qui pourra interagir avec les domaines du récepteur pour modifier sa conformation et ainsi l'activer.

3.1.2 Classification

En fonction du ligand avec lequel ils interagissent, les récepteurs sont regroupés en trois grandes classes, chacune ayant un mode de liaison du ligand différent (*Figure 7.*) :

- Classe A : la plus importante, comportant trois sous-types
 - a : récepteurs des ligands de petite taille (ex : noradrénaline, sérotonine)
 - b : récepteurs des neuropeptides, des hormones peptidiques et des cytokines.
 - c : récepteurs des ligands de grosse taille (hormones protéiques)
- Classe B : Récepteurs liant des hormones (parathormone, calcitonine)
- Classe C : Récepteurs liant des espèces chargées (Calcium, GABA, Glutamate)

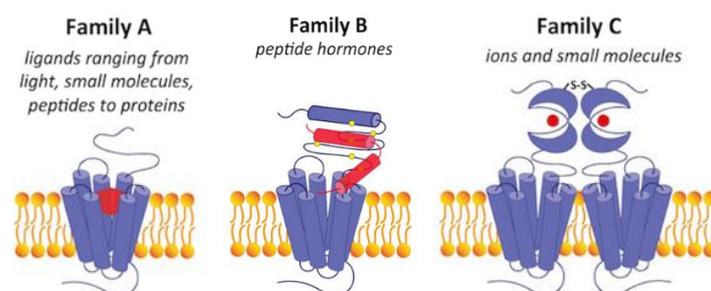


Figure 7. Site de liaison du ligand (en rouge) [9]

3.1.3 Activation

Il y a deux types d'activation pour les RCPG. Celle « classique » où le récepteur est inactif lorsque aucun ligand n'est fixé au récepteur et où la liaison à un agoniste entraîne un changement de conformation du récepteur et de sa partie C-terminale conduisant à son interaction avec la protéine G (*Figure 8.*).

Dans le second type, le récepteur peut être sous sa forme active même sans agoniste ; ces récepteurs sont alors dits « constitutivement actifs » et ils interagissent en permanence avec la protéine G. Ces récepteurs interviennent dans les fonctions de base de l'organisme et la fixation de ligands, appelés agonistes inverses, entraîne l'inactivation de ces récepteurs (Figure 7).

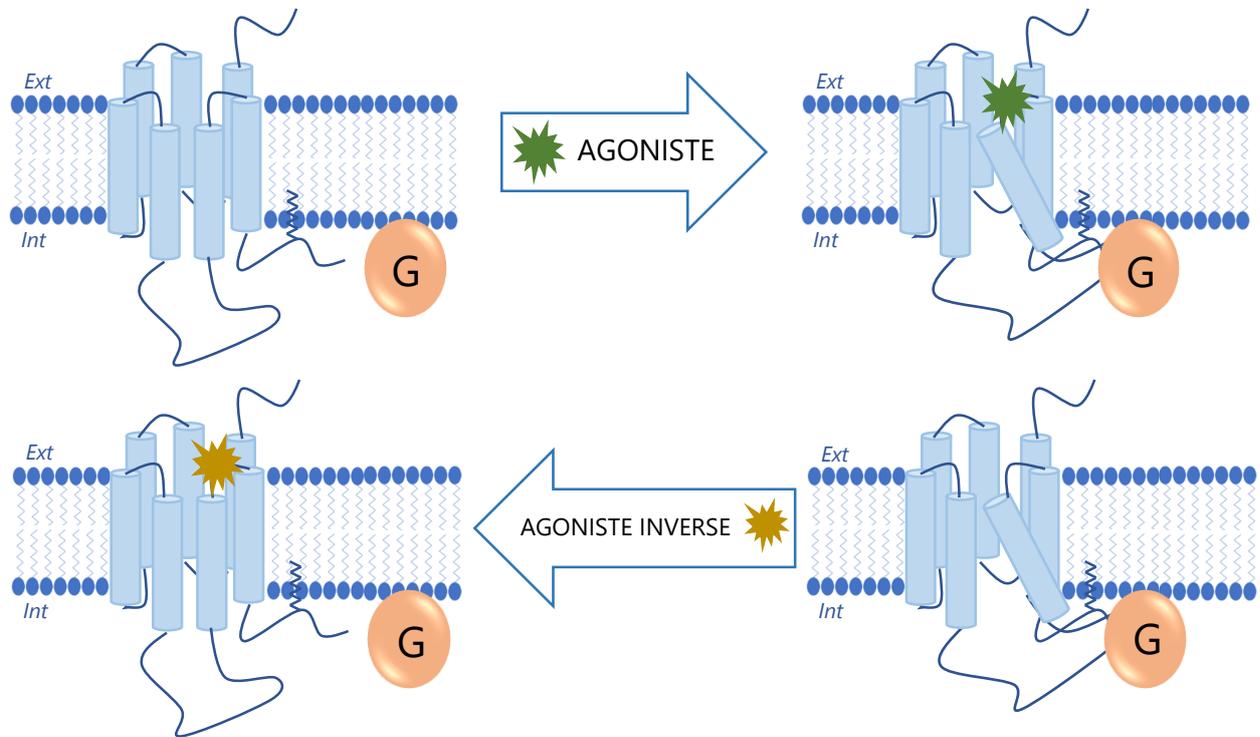


Figure 8. Activation des RCPG

La plupart des RCPG fonctionnent sous forme de monomères mais il en existe quelques-uns qui peuvent agir sous forme de dimères. Pour un même ligand, la voie de signalisation d'un dimère peut être différente de la sous unité monomérique et il arrive même parfois que plusieurs ligands différents puissent se fixer sur les dimères, entraînant ainsi une multitude de réponses différentes.

3.2 Les protéines G

Ce sont de protéines hétérotrimériques composées de trois sous unités α , β et γ ayant chacune un rôle différent. Elles sont appelées « G » en raison de leur liaison au GTP et au GDP responsable de leur activité.

3.2.1 Structure (Figure 9.)

La sous unité α (39-52 kDa) permet au GTP de se lier à la protéine. Elle possède une activité GTPasique, l'hydrolyse du GTP en GDP entraîne ainsi l'activation de la protéine qui est fixée à la membrane via cette sous unité. A ce jour, plus de 20 différents types de sous unité α ont pu être identifiés et sont à l'origine de la classification des protéines G.

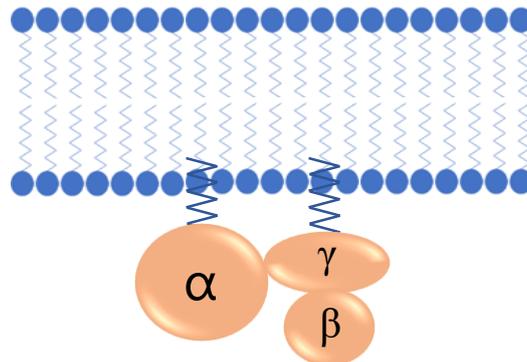


Figure 9. Structure des protéines G

Les sous unités β (36 kDa) et γ (7-8 kDa) forment le complexe bêta-gamma, ancré à la membrane. Les différentes associations possibles des 5 types de sous unités β et 13 sous unités γ expliquent la localisation et la fonction associées à ces protéines G.

Ces protéines G présentes au niveau des récepteurs sont à distinguer des petites protéines G qui sont quant à elles monomériques et intracellulaires. Elles possèdent également une activité GTPasique et sont souvent impliquées dans les voies de signalisation des récepteurs à activité enzymatiques.

3.2.2 Classification

Il existe une multitude de variants de la sous unité α . Leur séquençage et leur regroupement en fonction de leur homologie de séquence ont mis en évidence quatre familles qui ont permis d'établir la classification des protéines G (Figure 10.) où chaque famille active ou inhibe un effecteur bien précis (Tableau 1.) :

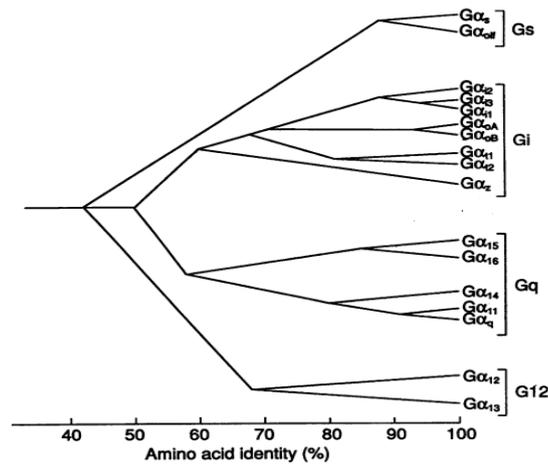


Figure 10. Homologie de séquence des sous unités α ^[10]

Famille	Famille	Gs	Gi/o	Gq/11	G12/13	
Effecteur	Activation	AC		PDE	PLC- β	Petites protéines G
	Inhibition		AC			

Tableau 1. Classification des protéines G

3.2.3 Activation (Figure 11.)

Au repos, la protéine G n'interagit pas avec le récepteur mais une fois le récepteur activé, ce dernier change de conformation ce qui entraîne son interaction avec la protéine G. Cette interaction permet l'activation de la protéine qui se traduit alors par le remplacement du GDP lié par une molécule de GTP. La sous unité α va alors se séparer du reste de la protéine pour induire l'activation de seconds messagers.

Les sous unités β et γ vont rester associées entre elles pour former le complexe $\beta\gamma$ qui va pouvoir agir comme un second messenger et interagir avec d'autres effecteurs cellulaires et ainsi entraîner une cascade de signalisation.

Une fois que le ligand se dissocie du récepteur ou que le récepteur est désensibilisé ou encore que les voies de signalisation intracellulaires sont stoppées, le GTP présent sur la sous unité α est alors hydrolysé en GDP ce qui entraîne une inactivation de la protéine G avec une réassociation de ses sous unités pour revenir à l'état de base du RCPG.

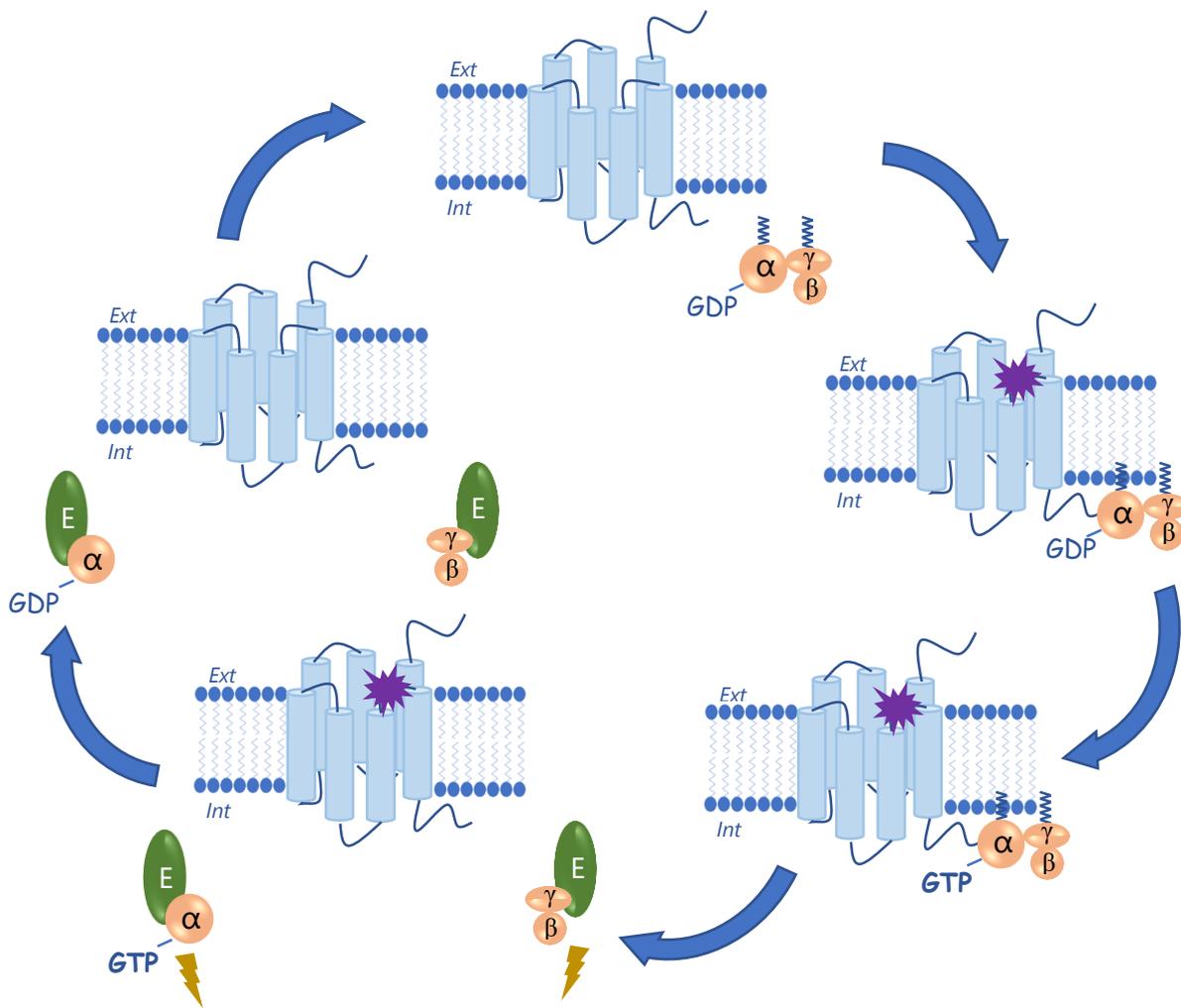


Figure 11. Cycle d'activation d'un RCPG

3.3 Voies de signalisation

Les protéines G sont classées en différentes familles en fonction des effecteurs sur lesquels elles agissent. En effet, une fois activées, ces protéines G vont permettre d'activer certains composés comme des cyclases, des phospholipases, des phosphodiésterases et des petites protéines G qui entraîneront à leur tour une cascade de signalisation intracellulaire via des seconds messagers et conduisant à une réponse cellulaire.

Ces voies de signalisation sont donc elles même fonction des effecteurs mis en jeu.

3.3.1 Adénylate cyclase

L'adénylate cyclase est une enzyme transmembranaire, activée par une protéine de type G_s . Une fois activée, elle permet la synthèse d'AMPc, un second messenger qui conduit à l'activation d'une protéine kinase A qui peut alors phosphoryler certaines protéines pour moduler leur activité.

3.3.2 Phospholipase C

En présence d'une protéine de type G_q , l'activation du RCPG entraîne le recrutement d'une phospholipase C au niveau de la membrane plasmique qui permet la formation de deux seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol tri-phosphate (IP_3). Ces deux composés conduisent à leur tour à l'activation d'une protéine kinase C aboutissant généralement à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire.

3.3.3 Phosphodiesterase

Si le RCPG est couplé à une protéine de type $G_{i/o}$, l'activation du récepteur entraîne le recrutement d'une phosphodiesterase qui pourra alors activer aussi bien l'AMPc que le GMPc qui activeront à leur tour différents effecteurs conduisant ainsi à différentes réponses cellulaires.

3.3.4 Petites protéines G ^{[11], [12]}

Comme celles couplées au récepteur, les petites protéines G activées par une protéine de type $G_{12/13}$ possèdent une activité GTPasique qui permettent la conversion du GDP en GTP et inversement en fonction de l'effecteur impliqué. Ce GDP/GTP pourra alors se lier à différents seconds messagers conduisant à différentes sortes de réponses cellulaires.

Chapitre 4. Antagonistes des récepteurs à l'endothéline

4.1 Généralités sur le développement chimique de nouveaux composés à visée thérapeutique ^[13]

Depuis plusieurs années et encore aujourd'hui, le développement d'un médicament est un processus long et coûteux qui commence de la découverte de la molécule jusqu'à la commercialisation du médicament (Figure 12.).

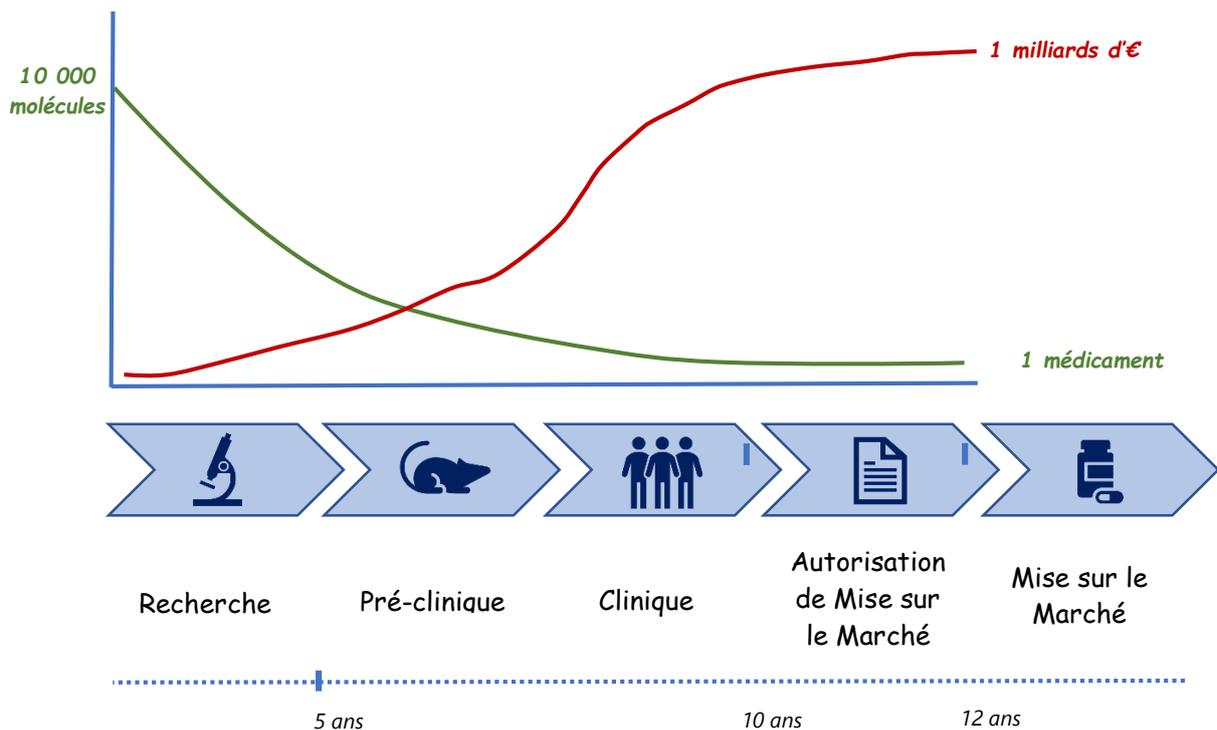


Figure 12. Développement d'un médicament

Actuellement, la découverte de composés avec un intérêt thérapeutique potentiel est quasi exclusivement issue d'un raisonnement rationnel divisé en trois étapes clés (Figure 13.).

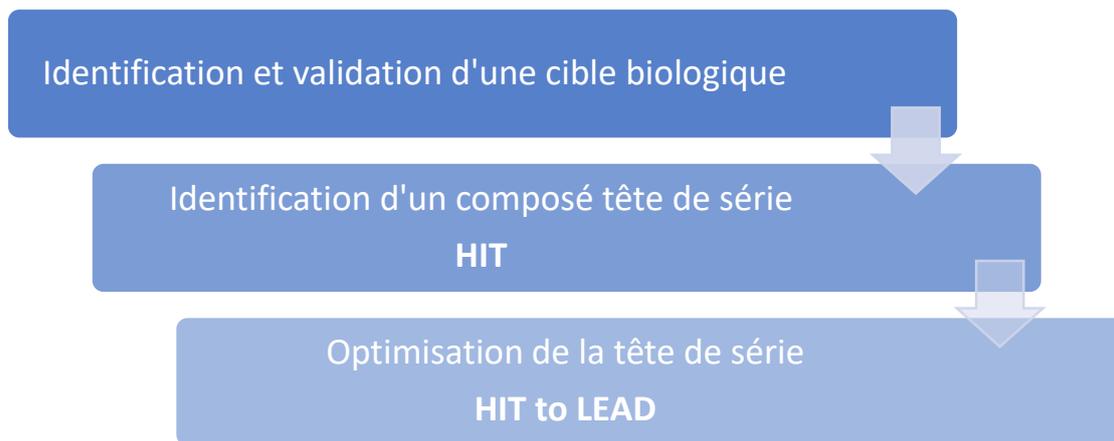


Figure 13. Processus de développement d'un médicament

Le composé tête de série, aussi appelé « HIT », peut être obtenu via différentes stratégies de conception et synthèse chimique :

- A partir d'une source naturelle par :
 - Extraction de composés contenus dans la faune/flore
 - Hémisynthèse qui consiste à synthétiser un composé organique en utilisant une matière première naturelle
 - Synthèse totale d'une molécule naturelle à l'aide de composés commerciaux
- Selon une méthode chimique par :
 - Synthèse d'analogues structuraux de molécules naturelles ou de composés connus. Suivie d'un screening, souvent large, qui consiste à tester tout un panel de composés pour ne sélectionner que ceux qui possèdent l'activité biologique
- Selon une méthode rationnelle par
 - Etude de la cible biologique (récepteur, enzyme...) et de son interaction avec son(ses) ligand(s) et/ou effecteurs via des techniques de modélisation moléculaire et/ou cristallographie

Après identification du HIT, l'étape suivante consiste à l'optimiser en procédant à différentes pharmacomodulations afin d'obtenir un candidat médicament, le LEAD.

Pour cela il faut déterminer les parties de la molécule responsables de l'activité biologique ; elles constituent le pharmacophore.

Une fois le ou les pharmacophores identifiés, les pharmacomodulations de ces motifs sont effectuées pour améliorer l'activité du composé en tenant compte des contraintes inhérentes à l'utilisation future du produit (toxicité, tolérance, solubilité...).

Les tests biologiques (pré-cliniques) de ces composés sont généralement réalisés en parallèle et les résultats obtenus permettent d'orienter les stratégies de modification.

A la suite de ces modifications, le composé le plus prometteur, c'est-à-dire celui présentant la meilleure balance bénéfice/risque, est testé sur l'Homme durant les phases cliniques de son développement avant d'être mis sur le marché.

4.2 Les antagonistes du récepteur A de l'endothéline [4], [14]

Plusieurs groupes de recherche ont développé de nombreux antagonistes des récepteurs à l'endothéline appartenant à la famille des « *sentan* ». En fonction de leur sélectivité, deux types de molécules avec un intérêt clinique potentiel ont été développés, les antagonistes sélectifs du récepteur A et les antagonistes ET_A/ET_B non sélectifs. Dans le cadre de notre projet, nous sommes focalisés sur la première catégorie.

Actuellement, il existe quatre classes d'antagonistes du récepteur de l'endothéline : les peptides, les sulfonamides, les composés possédant une fonction acide carboxylique et les dérivés de l'acide mycérique.

Une comparaison d'affinité et de sélectivité de quatre antagonistes spécifiques d'ET_A (BMS 182874, Sitaxentan, Ambrisentan, FR 139317) a été effectuée en utilisant un test de liaison par compétition (*Tableau 2*). Différents tissus cardiovasculaires ont été incubés avec une concentration fixe d'endothéline-1 marquée à l'iode 125 afin de saturer les récepteurs avec le ligand radiomarqué. Ces mêmes tissus sont ensuite mis en présence de concentrations croissantes d'antagonistes et en fonction de ces concentrations, certains antagonistes seront plus ou moins capables de se lier aux récepteurs à la place de l'endothéline qui se retrouvera alors libre. C'est en mesurant la quantité de ligands radiomarqués non liés qu'il est possible de

déduire la quantité d'antagonistes fixés aux récepteurs pour ainsi déterminer une constante de dissociation qui définira l'affinité de l'antagoniste pour le récepteur.

			Ventricule Gauche (60% ET _A , 40% ET _B)	Veine Saphène (85% ET _A)	
Sulfonamide	BMS 182874	ET _A	590 +/- 100 nM		
		ET _B	Non détectable		
	Sitaxentan	ET _A	1,65 +/- 0,8 nM		
		ET _B	327 +/- 134 µM		
Acide Carboxylique	Ambrisentan	ET _A	0,28 +/- 0,23 nM		
		ET _B	0,25 +/- 0,05 µM		
Acide Mycerique	S97-139	ET _A	45,3 +/- 25 nM		
		ET _B	47,6 +/- 9,9 µM		
Peptide	FR 139317	ET _A			0,56 +/- 0,01 nM
		ET _B			Non détectable

Tableau 2. Kd de ET_A/ET_B de différentes classes d'antagonistes sélectifs d'ET_A

Des antagonistes de l'endothéline sont déjà sur le marché et sont utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. C'est notamment le cas de l'Ambrisentan (VOLIBRIS®) et du Bosentan (TRACLEER®). Certains d'entre eux comme le Sitaxentan (Thelin®) ont montré une toxicité hépatique importante ; en inhibant la pompe d'export des sels biliaires, ils entraînent une augmentation des enzymes hépatiques. Cette toxicité hépatique a été responsable de décès et a donc entraîné le retrait de la vente des molécules concernées.

Les tests biologiques dans lesquels il est prévu d'utiliser le ligand fluorescent ne concerneront que des cellules cardiovasculaires. C'est pourquoi la toxicité hépatique des molécules n'a pas besoin d'être prise en compte ici car elle n'aura aucun impact sur les essais cellulaires. Il en est de même pour les effets secondaires, la biodisponibilité orale ainsi que les aspects pharmacocinétiques.

Nous avons retenu le Sitaxentan (*Figure 14.*), un antagoniste du récepteur A de la classe des sulfonamides en raison de son activité puissante (1.65 +/- 0.8 nM) et de sa grande sélectivité (6000 fois) (*Tableau 2.*).

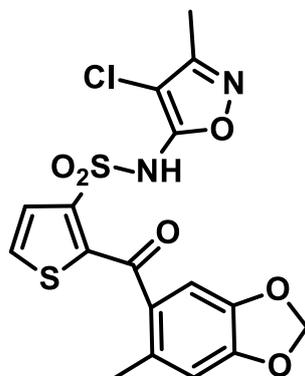
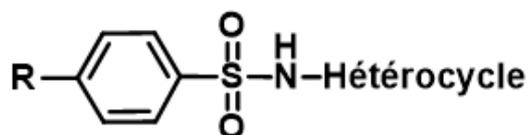


Figure 14. Sitaxentan

4.3 Développement d'analogues des sulfonamides comme antagonistes sélectifs de ET_A ^{[15], [16]}

De nombreux antagonistes sélectifs du récepteur A ayant des structures diverses ont été décrits, notamment des peptides cycliques/acycliques ainsi que des dérivés de l'acide mycérique.

Dans le but de découvrir de nouveaux antagonistes, une équipe de Bristol-Myers Squibb a testé la capacité de certains composés de la collection BMS (sélectionnés sans tenir compte de la structure chimique) d'inhiber la liaison de l'endothéline 1 marquée à l'iode 125 au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. L'ensemble de ces résultats est résumé ci-dessous (*Tableau 3.*).

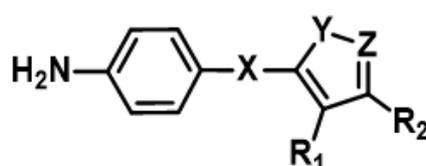


Compd	R	Heterocycle	IC ₅₀ , μM (n)
1	NH ₂	3,4-dimethyl-5-isoxazolyl	0.78 ± 0.06 (3)
2	NH ₂	5-methyl-3-isoxazolyl	4.0 (1)
3	NHCOCH ₂ NH ₂	3,4-dimethyl-5-isoxazolyl	6.5 (1)
4	NHCOCH ₃	3,4-dimethyl-5-isoxazolyl	13 (1)
5	OH	2-thiazolyl	30 (1)
6	NH ₂	1,3,4-thiazadol-2-yl	57 (1)
7	NH ₂	2-thiazolyl	69 ± 6 (3)

Tableau 3. Screening de HIT de la collection BMS ^[15]

Un premier screening a permis d'identifier le sulfathiazole **7** qui présentait une affinité faible mais reproductible. Un deuxième screening a été réalisé sur des composés sélectionnés (sur la base de la molécule **7**) dans le but d'obtenir une première analyse de la relation structure-activité. Les seules molécules ayant montré une liaison reproductible à une concentration de 10 μM étaient les composés **2** et **5**, suggérant ainsi que la structure de base impliquée dans la liaison aux récepteurs ET_A contient probablement un aminohétérocycle à cinq chaînons. Enfin, un autre screening, effectué pour supporter cette conclusion, a permis d'identifier différents analogues avec des activités variables dont le *N*-isoxazolybenzènesulfonamide **1** qui était le plus actif ($\text{IC}_{50} = 780 \text{ nM}$).

Différents analogues de **1** ont été synthétisés pour étudier l'importance des différents pharmacophores (*Tableau 4.*).



Compd	X	Y	Z	R ₁	R ₂	Binding IC_{50} , μM (n)	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ IC_{50} , μM	mp, °C	Recrystn solvent
1	SO_2NH	O	N	CH_3	CH_3	0.78 ± 0.06 (3)	40 ± 3		
2	SO_2NH	N	O	H	CH_3	4 (1)			
8	SO_2NCH_3	O	N	CH_3	CH_3	> 32 (1)		175-176	EtOH
9	$\text{SO}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	O	N	CH_3	CH_3	> 32 (1)		202-205	EtOH
10	CONH	O	N	CH_3	CH_3	> 32 (1)		180-181	EtOH/ H_2O
11	SO_2NH	O	N	H	CH_3	28 (1)		164-165	H_2O
12	SO_2NH	N	O	CH_3	CH_3	0.26 (1)	40 ± 5	192-193	EtOH
13	SO_2NH	N	O	H	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	> 32 (1)		172-174	benzène
14	SO_2NH	N	O	H	C_6H_5	> 32 (1)		150-152	MeOH
15	SO_2NH	N	O	$-(\text{CH}_2)_4-$		32 (1)		151-152	EtOH/ H_2O

Tableau 4. Modifications de la fonction sulfonamide et analogues de l'isoxazole ^[15]

Premièrement des modifications de la fonction sulfonamide ont été effectuées (*Tableau 4.*). La faible activité des composés **8** et **9** démontre la nécessité de la présence d'un hydrogène sur l'azote de la fonction sulfonamide et les valeurs similaires pour l'analogue amidé **10** suggèrent que le sulfonamide a un rôle plus important que celui de simple donneur de liaison hydrogène.

Les valeurs de pKa de quelques benzènesulfonamides *N*-substitués ont été déterminées pour mieux comprendre le rôle du substituant sur l'azote. Il a été démontré que l'analogue *N*-isoxazolyle **11** (*Tableau 4.*) était parmi les plus acides, avec un pKa de 4.2, très proche de celui de l'acide benzoïque. Ces résultats, ajoutés au fait qu'une fonction acide carboxylique est présente au niveau des peptides de l'endothéline et de certaines autres classes d'antagonistes, permettent de relier la présence d'une fonction acide à cette activité thérapeutique.

Pour approfondir cette observation, des analogues contenant des groupements phényles ou des hétérocycles à cinq chaînons attachés à l'azote du sulfonamide ont été synthétisés. La pauvre affinité observée pour ces composés a permis de supposer que l'acidification du sulfonamide par un substituant sur l'azote était nécessaire mais pas suffisante pour une liaison au récepteur ET_A.

Certains analogues du cycle isoxazole ont été synthétisés et leur affinité évaluée afin de compléter l'étude de la relation structure-activité et d'aider à la compréhension des caractéristiques importantes pour la liaison (*Tableau 4.*).

En comparant les composés **1** avec **11** et **2** avec **12**, nous avons remarqué qu'un groupement méthyle en R₁ est nécessaire pour une liaison efficace. Le remplacement du méthyle en R₂ par des substituants présentant un plus gros encombrement stérique (*ter*-butyle, phényle) entraîne une perte d'affinité qui suggère que ces substituants ne sont pas adaptés à un potentiel espace de liaison dans le récepteur.

D'autres études ayant pour but d'améliorer la série des sulfonamides^[17] ont abouti à la modification du cycle benzénique ; son remplacement bio-isostère par un thiophène conduit à une activité similaire^[18] qui est même augmentée après l'insertion d'un groupement fonctionnel carboxyle entre le thiophène et l'aryle^[19] (*Figure 15.*).

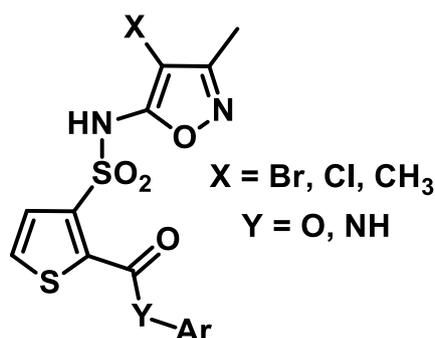


Figure 15. Thiophène sulfonamide ^[19]

Finalement, une autre amélioration a conduit à la découverte du Sitaxentan (Figure 14.) qui contient un groupement acétyle entre le thiophène et l'aryle^[20]. Il s'agit du premier antagoniste de l'endothéline qui a été évalué en essais cliniques mais il a été retiré du marché en 2011 suite à de sérieux effets secondaires hépatiques responsables de décès.

Toutefois, le même groupe de recherche a essayé d'améliorer l'activité, la cinétique et la biodisponibilité orale du Sitaxentan via différentes modifications. Ils ont observé qu'un remplacement du groupement benzodioxolylacétyle par un cycle 2,4,6-triméthylphényle avec un substituant additionnel en position 3 augmente l'activité et la sélectivité de 10 fois (Figure 16.).

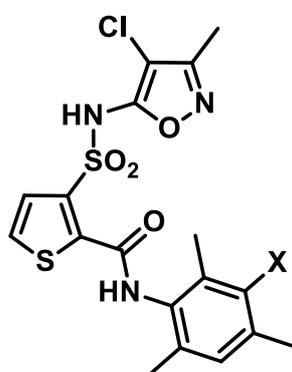


Figure 16. Analogues du Mesitylcarboxamide thiophène sulfonamide ^[16]

Dans le but d'améliorer la biodisponibilité de ce composé (Figure 16.), un groupement polaire semblait nécessaire et c'est pourquoi différentes fonctions ont été testées en position 3 (Figure 17.).

	1	C_{max} (µg/mL)
		122.8 ± 61.2 (5)
	2a X = H	35.9 ± 24.9 (7)
	2b X = CH ₂ OH	2.4 ± 0.9 (2)
	2c X = CH ₂ OAc	3.8 ± 1.4 (2)
	2d X = OCH ₃	4.0 ± 1.4 (3)
	2e X = OCH ₂ (cyclo-Pr)	6.1 ± 6.6 (4)
	2f X = N(CH ₃) ₂	3.2 ± 0.1 (2)
	2g X = NHSO ₂ CH ₃	2.8 ± 0.4 (3)
	2h X = SO ₂ NH ₂	2.9 ± 1.8 (3)
	2i X = CN	17.3 ± 15.8 (3)
	2j X = CH ₂ CN	42.0 ± 55.1 (6)
	2k X = OH	48.2 ± 61.6 (12)

Figure 17. Biodisponibilité orale du Sitaxentan et d'analogues du Mesitylcarboxamide thiophène sulfonamide ^[16]

Même si les composés **2a**, **2j** et **2k** ont montré une biodisponibilité convenable (Figure 17.), elle n'était toutefois pas meilleure que celle du Sitaxentan (**1**).

Les recherches se sont donc orientées vers une modification de cette partie aryle amine en conservant les méthyles qui ont permis d'augmenter l'affinité et la sélectivité, tout en essayant de rajouter un groupement polaire dans le but de se rapprocher de la biodisponibilité orale du Sitaxentan. C'est dans cette optique que plusieurs composés ont été synthétisés et testés (Tableau 5. & 6.).

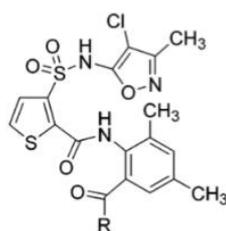
	7a-7j		7k
--	--------------	--	-----------

entry	X	IC ₅₀ ET _A (nM) (n)	selectivity for ET _A
1		1.4 ± 0.5 (5)	6500
2a	CH ₃	0.15 (1)	7000
7a	Cl	0.09 (1)	165600
7b	C ₆ H ₅	1.47 ± 0 (3)	1900
7c	CO ₂ H	2.62 (1)	600
7d	CONH ₂	0.14 (1)	8100
7e	CON(CH ₃) ₂	0.07 (1)	12300
7f	CONCH ₃ (neopentyl)	0.68 (1)	15900
7g	SO ₂ CH ₃	0.03 (1)	325000
7h	SO ₂ - <i>m</i> -Pr	0.06 (1)	6100
7i	SO ₂ - <i>i</i> -Pr	0.05 (1)	8800
7j	oxazol-2-yl	0.08 (1)	118900
7k	see structure	1.27 (1)	1900
3a	COCH ₃	0.04 ± 0 (5)	442000

Tableau 5. Effets d'une substitution en ortho sur l'affinité et la sélectivité pour ET_A ^[16]

L'introduction d'un groupement acétyle en position 2 sur le cycle anilide (composé **3a**) entraîne une amélioration de la biodisponibilité orale et une meilleure sélectivité pour le récepteur ET_A (environ 400 000 fois) (Tableau 5).

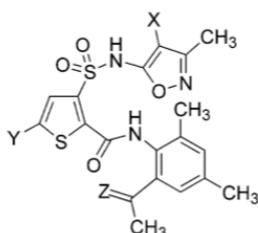
Grâce à l'effet attracteur d'électrons de la partie acétyle du composé **3a**, l'amide devient un mime d'acide carboxylique et joue le rôle du groupement polaire nécessaire pour améliorer le profil pharmacocinétique. Les meilleurs résultats sont observés lorsque le groupement R est un méthyle, tout encombrement stérique plus important qu'un méthyle entraîne une perte d'affinité et de sélectivité (Tableau 6).



entry	R	IC ₅₀ ET _A (nM) (n)	selectivity for ET _A
3a	Me	0.04 ± 0 (5)	442000
7l	Et	0.06 (1)	214000
3b	<i>i</i> -Pr	0.11 (1)	144000
7m	<i>cyclo</i> -Pr	0.03 (1)	331400
7n	<i>cyclo</i> -Hex	1.37 (1)	13000
7o	Ph	0.39 (1)	46000
7p	CH ₂ SO ₂ CH ₃	0.10 (1)	66500

Tableau 6. Ortho analogues de la cétone **3a** [16]

Des dérivatizations de la cétone en position 2 de l'aryle, une substitution du cycle thiophène par un méthyle ainsi qu'un switch méthyle/chlore en position 4 du cycle isoxazole ont ensuite été effectués et étudiés à partir du composé **3a** (Tableau 7).

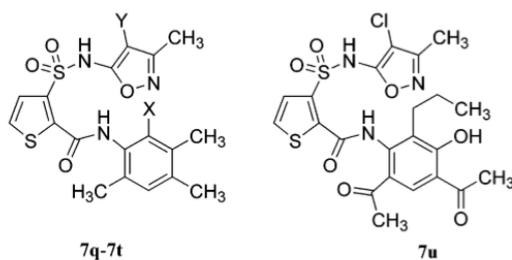


entry	X	Y	Z	IC ₅₀ ET _A (nM) (n)	selectivity for ET _A
3a	Cl	H	=O	0.04 ± 0 (5)	442000
7v	Cl	H	OH, H	0.04 (1)	42000
7w	Cl	H	=NOH	0.02 (1)	24500
7x	Cl	H	=NOCH ₃	0.04 (1)	56000
7y	Cl	CH ₃	=O	0.21 ± 0.09 (2)	4500
7z	CH ₃	H	=O	0.08 ± 0.02 (4)	441000

Tableau 7. Modifications de la cétone **3a** [16]

Les modulations de la cétone (**7v**, **7w** & **7x**) ont permis d'obtenir des composés ayant une affinité similaire mais une sélectivité réduite. La substitution du cycle thiophène par un méthyle (**7y**) entraîne une diminution de l'activité (5 fois) et de la sélectivité (100 fois). Lorsque le chlore en position 4 du cycle isoxazole est remplacé par un méthyle, l'affinité et la sélectivité sont similaires au composé **3a**.

Des dérivés 3,4,6-triméthylanilide avec une fonction cétone ou nitrile en position 2 ont également été étudiés (*Tableau 8*).



entry	X	Y	IC ₅₀ ET _A (nM) (<i>n</i>)	selectivity for ET _A
3a			0.04 ± 0 (5)	442000
7q	COCH ₃	Cl	0.02 (1)	1180000
7r	COCH ₂ CH ₃	Cl	0.03 (1)	215700
7s	CN	Cl	0.05 ± 0.02 (2)	608400
7t	CN	CH ₃	0.08 (1)	328000
7u			12.36 (1)	1000

Tableau 8. Analogues Ortho du système triméthylphényle [16]

Les analogues acétylés, propionylés et cyanés ont montré une affinité similaire à la cétone **3a** avec une sélectivité pour ET_A intéressante. Le composé **7q** avait la plus grande affinité et sélectivité pour ET_A parmi les sulfonamides antagonistes du récepteur A (1 million de fois plus sélectif pour ET_A par rapport à ET_B avec une IC₅₀ de 0.02 nM). Le composé **7u** a été synthétisé en raison de la disponibilité commerciale de la partie aniline mais une importante diminution de l'activité et de la sélectivité a été observée.

Quelques essais de cinétique ont été effectués sur les analogues de **3a** les plus prometteurs (*Tableau 9*) et il a été conclu que l'analogue méthyle isoxazole **7z** présentait la meilleure cinétique.

entry	AUC _{0-∞} (h·μg/mL)	C _{max} (μg/mL)	t _{1/2} (h)
7a	172.3 ± 75.0 (4)	47.5 ± 28.1	2.6 ± 0.9
7e	27.2 ± 10.03 (4)	10.9 ± 4.14	1.19 ± 0.02
7g	28.2 ± 10.5 (4)	10.3 ± 2.1	1.7 ± 0.4
7h	5.9 ± 3.04 (4)	2.9 ± 0.92	1.3 ± 0.26
7j	362.5 ± 58 (4)	66.0 ± 9.0	5.3 ± 1.2
7m	364.6 ± 95.9 (3)	53.4 ± 5.4	5.4 ± 0.4
7o	141.46 ± 8.7 (3)	33.42 ± 14.4	3.95 ± 0.3
7p	636.0 ± 160.0 (4)	37.3 ± 12.8	12.2 ± 3.2
7q	53.8 ± 21.47 (3)	10.8 ± 2.91	1.68 ± 0.29
7r	24.3 ± 14.70 (4)	13.0 ± 12.78	1.47 ± 0.38
7s	373.4 ± 48.40 (4)	45.7 ± 15.24	5.11 ± 0.46
7t	667.1 ± 206.1 (3)	85.8 ± 16.1	5.3 ± 0.4
7w	39.46 ± 14.79 (3)	6.92 ± 2.21	5.20 ± 2.77
7x	33.5 ± 9.30 (3)	13.8 ± 3.12	1.20 ± 0.59
7y	327 ± 84.27 (6)	68.90 ± 26.88	2.7 ± 0.31
7z	1309.6 ± 80.31(4)	179.5 ± 68.0	5.3 ± 0.9

Tableau 9. Cinétique de quelques analogues du composé **3a** [16]

Les composés **3a** et **7z** (Figure 18.) ne diffèrent que par le substituant en position 4 du cycle isoxazole qui est un chlore pour le composé **3a** alors qu'il s'agit d'un méthyle pour le composé **7z**. Lorsqu'on les compare, on constate que **3a** a une meilleure affinité que **7z** (0.04 nM vs 0.08 nM) avec une sélectivité similaire et de bonnes propriétés pharmacocinétiques.

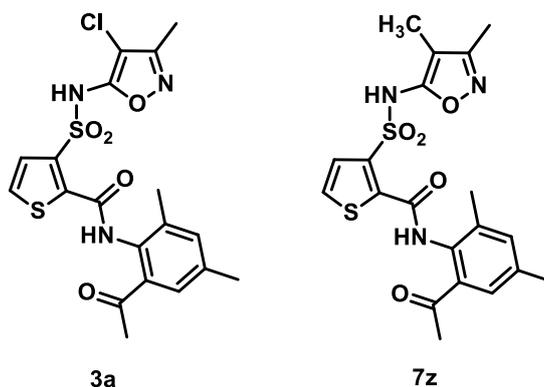


Figure 18. Comparaison de **3a** et **7z**

Mais la différence la plus importante se situe au niveau de la biodisponibilité orale (Tableau 10.).

entry	oral bioavailability in rats (%)
1	60
3a	25
7p	16
7s	
7t	
7y	49
7z	~100

Tableau 10. Biodisponibilité orale [16]

En effet, le dérivé 4-chloro-3-méthylisoxazole (**3a**) a une biodisponibilité orale de 25% contrairement à son analogue 3,4-diméthylisoxazole (**7z**) qui montre une biodisponibilité orale de 100%. A la lumière de cette grande différence, le composé **7z** a été choisi pour approfondir les études.

Pour notre projet nous nous sommes focalisés sur une étude pharmacochimique intégrant les résultats pharmacologiques ; les paramètres cinétiques et la biodisponibilité orale étant considérés plus tard. C'est pourquoi nous avons décidé de choisir l'antagoniste ET_A le plus sélectif de la série, à savoir le composé **7q** (1 million de fois plus sélectif pour ET_A par rapport à ET_B) (*Figure 19*).

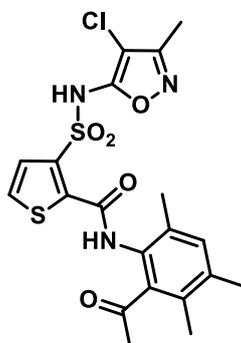


Figure 19. Composé 7q

Chapitre 5. Fonctionnalisation de la molécule par un fluorophore [22], [23]

Lorsque l'on souhaite analyser l'affinité d'un ligand pour son RCPG, on a principalement recours à des méthodes utilisant des molécules radiomarquées. Ici nous voulons juste étudier la localisation des récepteurs A de l'endothéline au niveau des cellules vasculaires et nous ne pouvons pas utiliser de matériel radioactif. C'est pourquoi la fluorescence est une bonne alternative.

5.1 Lumière

La lumière est une onde électromagnétique (propagation d'un champ électrique et d'un champ magnétique perpendiculaires entre eux et à la direction de propagation) caractérisée par une vitesse V , une période T , une fréquence ν et une longueur d'onde λ . Ces différents paramètres sont reliés entre eux par la relation :

$$\lambda = VT \text{ et sachant que } \nu = 1/T \text{ alors } \nu = V/\lambda$$

Selon la théorie corpusculaire, la lumière est un flux de particules de masse nulle appelées photons. A chaque onde électromagnétique de fréquence ν est associée un photon d'énergie $E = h \nu = hc / \lambda$ (h = constante de Planck et c = célérité de la lumière dans le vide).

Un rayonnement électromagnétique est donc un faisceau de photons dont le spectre correspond à la caractérisation quantitative et qualitative de ces photons.

Le rayonnement est dit monochromatique lorsqu'il n'est composé que d'une seule longueur d'onde et que tous les photons composant ce rayonnement ont la même énergie. L'onde polychromatique contient, elle, plusieurs longueurs d'ondes correspondant à des photons d'énergies différentes.

Un spectre de raies (ou discontinu) est composé de photons ayant un nombre fini de fréquences alors que celles des photons d'un spectre continu oscillent de manière continue entre une énergie minimale et maximale.

Le spectre électromagnétique regroupe l'ensemble des ondes électromagnétiques en les classant selon leur gamme de fréquence allant de 10^{-12} eV à 10^{12} eV (Figure 20.).

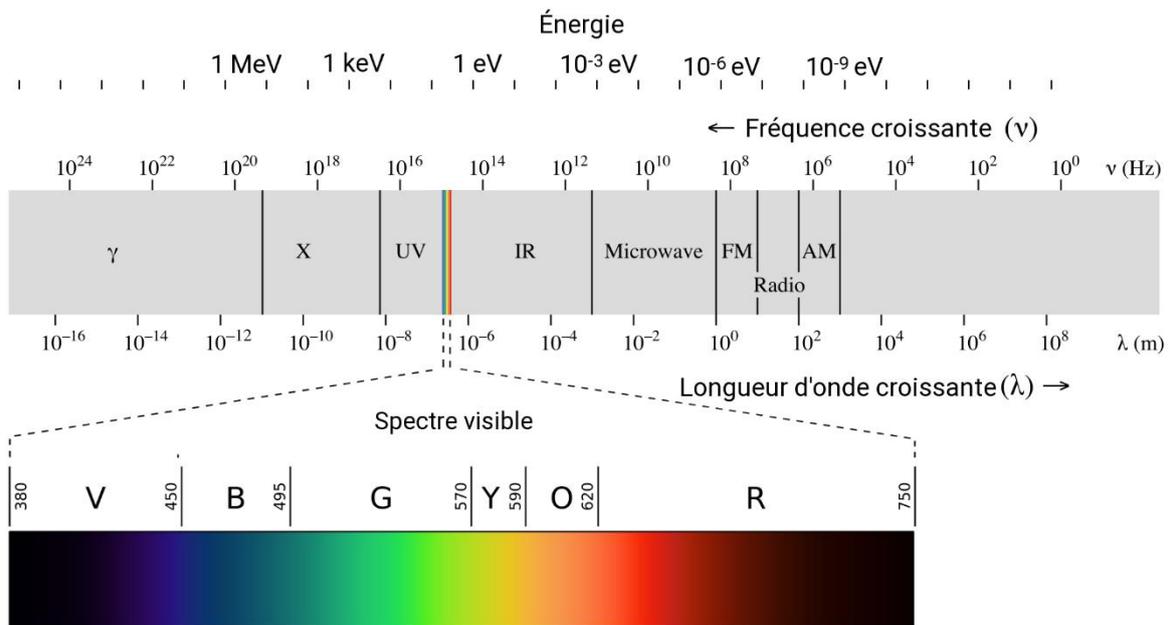


Figure 20. Spectre électromagnétique

Les premiers composés fluorescents utilisés émettaient dans la lumière visible qui correspond aux longueurs d'ondes associées aux couleurs perçues par le cerveau humain. Ce choix a été fait notamment grâce à la facilité de détection mais les technologies récentes de plus en plus avancées ont permis d'élargir la gamme de détection des fluorophores à l'ultraviolet et à l'infrarouge.

5.2 Fluorescence

Il est établi que les couleurs que nous percevons tous les jours sont dues à un phénomène physico-chimique d'absorption de la lumière. En effet, en absorbant seulement une partie des longueurs d'ondes de la lumière qu'elles reçoivent, les molécules de notre environnement vont nous retransmettre ces longueurs d'ondes non absorbées qui se traduisent par la couleur.

Certaines molécules peuvent être excitées grâce à l'absorption de la lumière. Elles passent alors à un état d'énergie supérieur, appelé état excité. Cet état d'énergie ne pouvant être maintenu, la molécule retourne à son état fondamental en émettant de la lumière. C'est la fluorescence.

Dans une molécule, les électrons se répartissent de manière précise et suivant certaines règles sur les différentes orbitales moléculaires. La dernière orbitale remplie de plus haute énergie est appelée HOMO alors que celle inoccupée de plus basse énergie est appelée LUMO.

Lorsque la molécule se trouve dans un système isolé de toute interférence environnementale (lumière, température...) elle est alors définie par un état énergétique stable, communément appelé « état fondamental ».

La plupart des molécules présentes dans l'environnement possèdent des motifs absorbants contenant généralement un système de doubles liaisons conjuguées. Ces motifs sont appelés chromophores. La présence de ces groupements au sein de la molécule lui permet d'absorber un photon de fréquence (et donc de longueur d'onde) définie. Cette absorption entraîne une modification de la répartition électronique de la molécule qui passe alors de l'état fondamental à un état excité.

Cet état électronique étant instable, la molécule cherche à revenir à l'état fondamental en éliminant le trop plein d'énergie reçu via différents processus (*Figure 21.*) :

- Non radiatif
 - Conversion interne : avant de retourner à l'état fondamental, la molécule passe par un état intermédiaire par le biais de rotations/vibrations au sein de la molécule
 - Conversion inter-système : l'énergie est dissipée grâce aux collisions des molécules entre elles
- Radiatif
 - Fluorescence : pour retourner à l'état fondamental la molécule libère un photon qui, la plupart du temps, possède une énergie inférieure à celle du photon

absorbé et donc une longueur d'onde différente. Cette différence d'énergie s'explique par le fait que les différents processus de dissipation de l'énergie se déroulent simultanément. On aura donc une perte d'énergie initiale qui pourra être due à l'absorption ou à l'un des différents procédés de retour à l'état fondamental

- Phosphorescence : elle suit le même principe que la fluorescence. La différence réside dans l'état électronique de la molécule, les longueurs d'ondes des photons et leur durée de vie

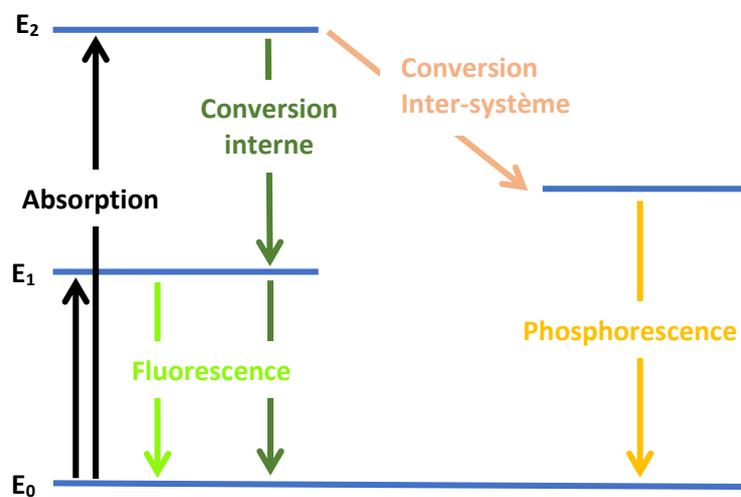


Figure 21. Processus d'excitation et de retour à l'état fondamental

Le photon émis peut être différencié de celui absorbé du fait de leur longueurs d'ondes différentes. La longueur d'onde détectée caractérise la fluorescence du composé.

Une fois revenue à l'état fondamental, la molécule est de nouveau capable de capter un photon. Il s'agit là d'un processus cyclique qui ne prend fin que lorsque le groupement chromophore de la molécule a subi des dommages irréversibles qui l'empêchent d'absorber un autre photon.

Les molécules impliquées dans ces processus de fluorescence sont appelées fluorophores.

5.3 Spectre de fluorescence

5.3.1 Excitation/émission

Les différentes molécules de notre environnement n'absorbent qu'une certaine partie de la lumière pour nous en retransmettre le reste. Suivant ce constat, il est possible de définir, pour les fluorophores, des longueurs d'ondes d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) qui sont caractéristiques du motif chimique (Figure 22.).

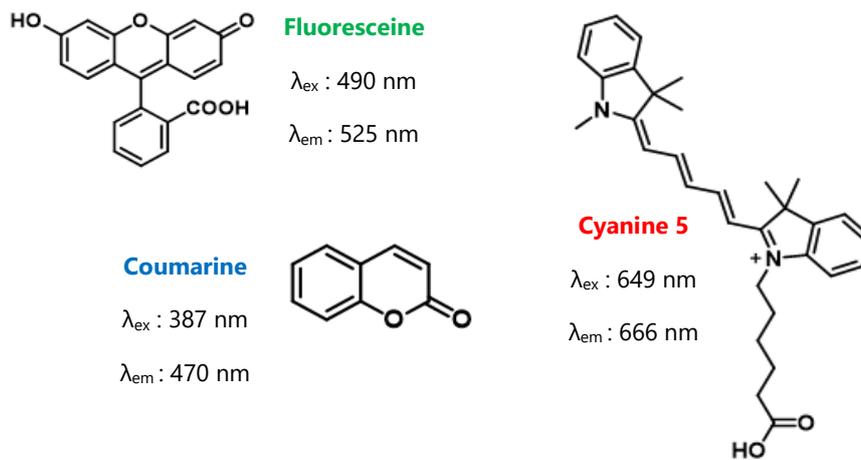


Figure 22. Exemples de fluorophores

Etant donné leur complexité, les molécules n'absorbent généralement pas qu'un photon ayant une certaine longueur d'onde. En effet, l'excitation/émission d'un fluorophore est comprise dans un intervalle avec une intensité plus ou moins importante en fonction de la longueur d'onde du photon absorbé et un maximum qui est généralement la longueur d'onde d'excitation/émission spécifiée. On peut alors définir le spectre d'excitation et d'émission du fluorophore (Figure 23.).

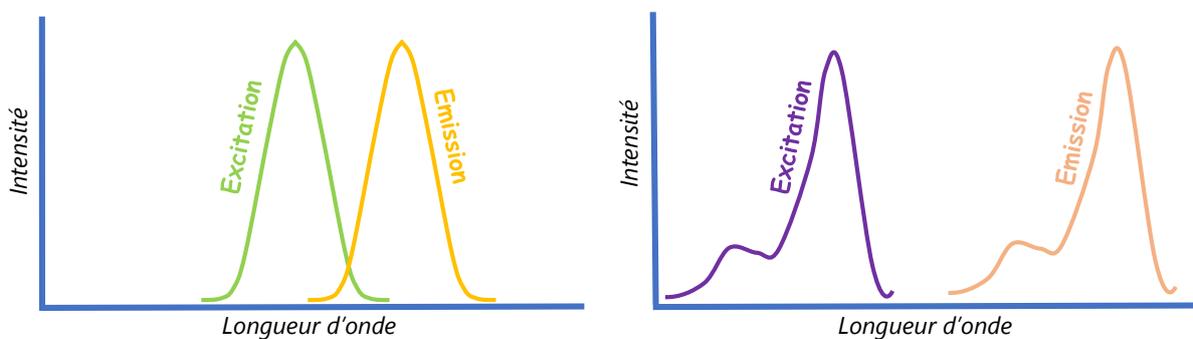


Figure 23. Spectre d'excitation/émission

La longueur d'onde du photon émis est indépendante de celle du photon absorbé par la molécule. Par contre la longueur d'onde de ce photon incident et donc l'intensité de l'excitation qu'il entraîne sur la molécule conditionne l'intensité de l'énergie du photon émis. La molécule ne peut pas créer de l'énergie, c'est pourquoi le maximum d'intensité d'émission correspond à l'intensité d'excitation (Figure 24.).

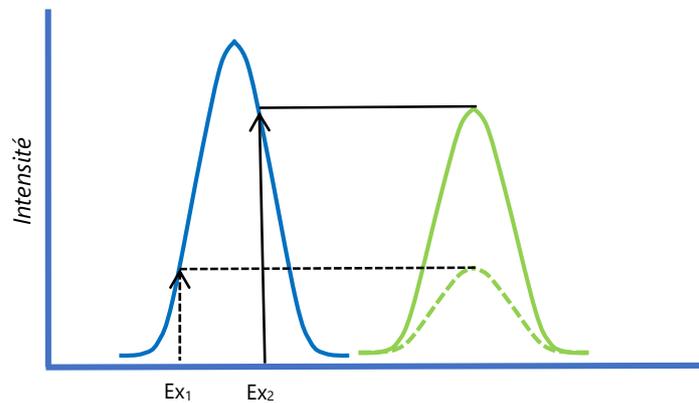


Figure 24. Intensité du maximum d'émission

Il faut également savoir qu'une molécule peut être composée de différents fluorophores et donc avoir plusieurs spectres d'excitation/émission. Il peut alors arriver qu'un ou plusieurs spectres d'émissions se superposent avec le spectre d'excitation d'un autre fluorophore. Le photon alors émis par le premier fluorophore entraînera l'excitation du second (Figure 25.).

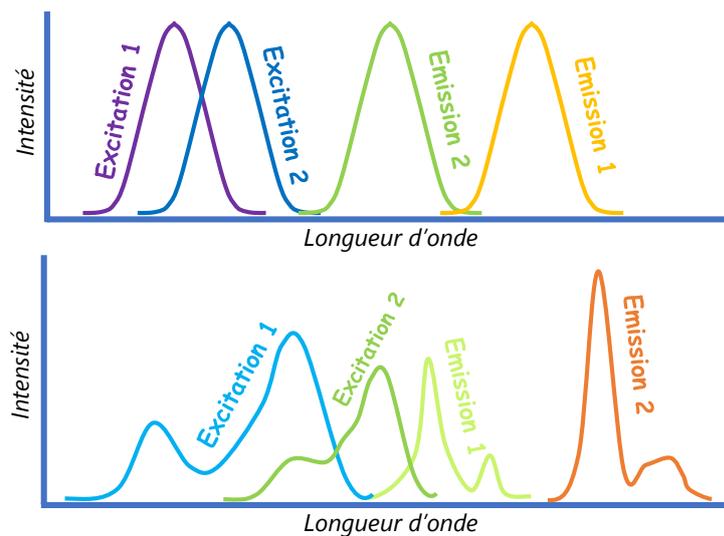


Figure 25. Spectre d'excitation/émission de molécules possédant plusieurs fluorophores

5.3.2 Déplacement de Stokes

Un fluorophore possède des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission différentes et indépendantes. La différence entre ces longueurs d'ondes est caractéristique de chaque fluorophore, c'est le déplacement de Stokes (Δ) (Figure 26.).

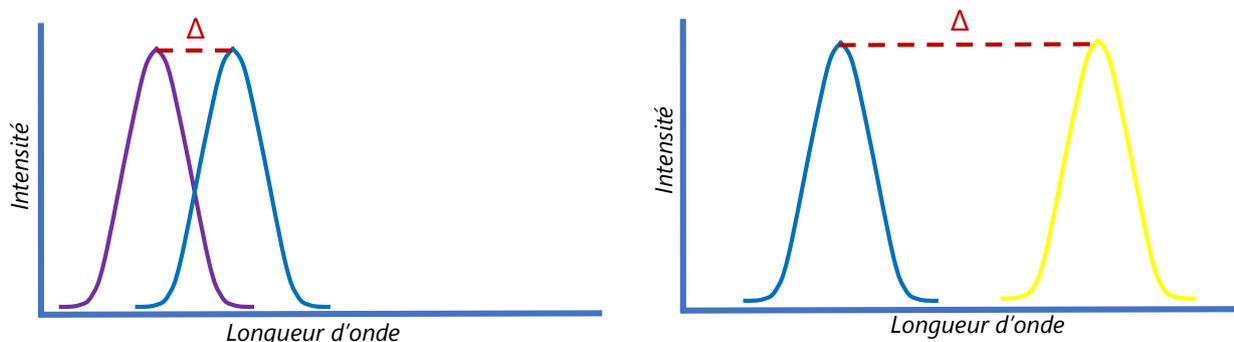


Figure 26. Déplacement de Stokes (Δ)

Il s'agit d'un paramètre crucial à prendre en compte suivant l'utilisation que l'on veut faire du fluorophore. Si la différence entre la longueur d'onde d'excitation et d'émission est faible on risque de ne pas pouvoir distinguer la fluorescence de la lumière d'excitation et au contraire, une différence importante entraîne un risque de superposition avec un autre spectre d'émission.

5.3.3 Luminosité du fluorophore

La luminosité d'un fluorophore est définie par le produit de son coefficient d'extinction molaire et de son rendement quantique qui sont des valeurs propres à chaque fluorophore.

Le coefficient d'extinction molaire correspond à la quantité de lumière pouvant être absorbée à une longueur d'onde donnée. Il est mesuré en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Le rendement quantique est déterminé par le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons émis. Il permet de définir l'efficacité du fluorophore.

5.4 Ligand fluorescent ^{[16], [24]}

Un ligand fluorescent est composé de 3 parties indépendantes :

- Pharmacophore
- Fluorophore
- Linker

Une fois le ligand synthétisé, il est considéré comme une nouvelle entité pharmacologique et c'est la raison pour laquelle son affinité, son efficacité et sa sélectivité doivent être déterminées. Il est nécessaire de toujours garder à l'esprit qu'un fluorophore peut modifier la pharmacologie du composé auquel il est lié.

Pour synthétiser un ligand fluorescent, nous devons prendre en considération plusieurs facteurs. Premièrement, nous devons penser à la relation structure-activité entre le ligand et son récepteur de manière à déterminer la position idéale dans la molécule où fixer le fluorophore. Ce choix est influencé par le degré de substitution toléré au niveau de cette position ainsi que les outils chimiques disponibles pour effectuer cette fonctionnalisation.

Le paramètre suivant à prendre en compte est le type de fluorophore en fonction de ses propriétés photochimiques (excitation/émission, durée de fluorescence, rendement quantique...). Ici, comme nous allons travailler sur des cellules humaines, nous avons dû prendre en considération d'une part la toxicité cellulaire de ce fluorophore, tout impact potentiel d'une autofluorescence des cellules vasculaires (qui peut être minimisée en utilisant une longueur d'onde d'excitation/émission élevée) et d'autre part le fait que la fluorescence du composé peut être quenchée dans un environnement aqueux. Les facteurs physico-chimiques sont également importants, spécialement la balance hydrophile/lipophile.

Après cela, nous devons déterminer la longueur du linker qui peut varier en fonction du type de fluorophore (s'il est hydrophobe, des linkers courts sont tolérés). Une fois la longueur déterminée, nous pouvons modifier la composition chimique de ce linker pour améliorer la pharmacologie.

Lors de la synthèse, le moment idéal pour ajouter la sonde fluorescente se situe durant la dernière étape lorsque nous obtenons le produit final afin d'éviter des problèmes de dégradation.

Pour terminer, le composé obtenu doit être purifié par HPLC pour éviter la présence de ligand non fluorescent pouvant conduire à des résultats erronés.

Après avoir sélectionné le composé **7z**, une étude de relation structure-activité a été effectuée par modélisation moléculaire.

Etant donné que la structure de ET_A n'était pas disponible, elle a dû être résolue suivant le principe d'homologie de séquence à l'aide d'une rhodopsine de type bovine comme modèle. La structure du récepteur de l'endothéline a ensuite été optimisée via la minimisation d'énergie et la dynamique moléculaire.

Cette expérience a démontré que le composé **7z** se lie au même endroit que ET-1 au niveau du récepteur.

Le détail des interactions est décrit (*Figure 27.*) et résumé (*Figure 28.*).

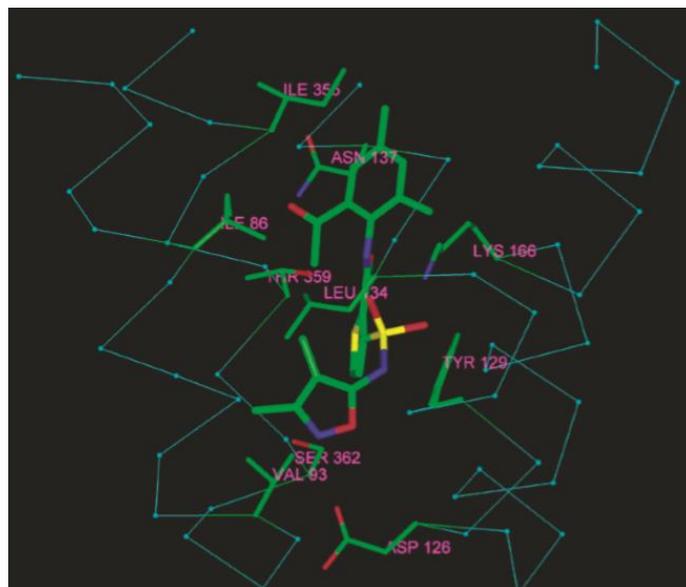


Figure 27. Interactions entre **7z** et ET_A^[16]

Le méthyle en position 4 de l'aniline semble être une bonne position pour une possible fonctionnalisation étant donné qu'il « pointe » vers l'extérieur du récepteur (*Figure 27.*).

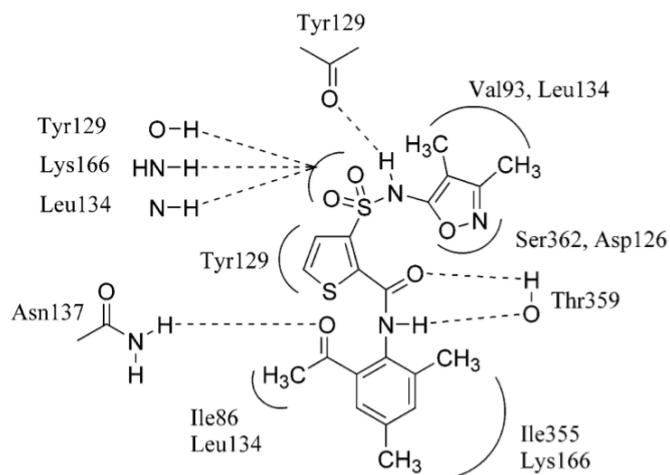


Figure 28. Résumé des interactions entre **7z** et ET_A ^[16]

Nous pouvons utiliser ce modèle car le composé **7q** sélectionné est très similaire à **7z** ; la seule différence est la présence d'un méthyle en position 3 sur **7q** et nous pensons que cela ne changera pas la conformation de la molécule et plus particulièrement la position du méthyle en 4.

En outre, les données d'interactions (Figure 28.) montrent que le méthyle en position 4 est seulement impliqué dans une interaction hydrophobe qui n'est pas identifiée comme une interaction critique pour la liaison. Nous avons donc envisagé une addition de la sonde fluorescente sur cette position 4 du cycle benzénique.

Chapitre 6. Travail de recherche

Ces travaux ont été effectués dans le cadre d'un stage de Master 2 sous la direction du Pr. Barrie KELLAM et sous l'encadrement de Sarah MITSRY au Centre for Biomolecular Sciences à l'Université de Nottingham en Angleterre.

Après avoir analysé la littérature, nous avons décidé de synthétiser un analogue du composé **7q** fonctionnalisé par un linker et un fluorophore de manière à obtenir un antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline (Figure 29.)

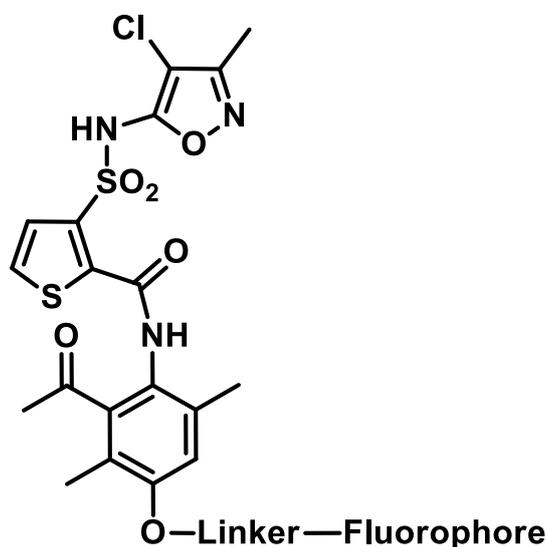


Figure 29. Antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline

6.1 Stratégie de synthèse

Toutes les étapes ont été conçues en utilisant des réactions précédemment développées dans la littérature et en fonction de la disponibilité des composés ainsi que de la complexité des réactions de manière à trouver la stratégie la plus simple, efficace et économique.

Toutes les réactions ont également été testées sur de petites quantités avant un scale-up.

Le schéma de rétrosynthèse envisagé nécessite la formation de deux synthons (Figure 30.) que nous pouvons obtenir via différentes réactions.

La partie thiophène isoxazole est identique aux molécules précédemment décrites et l'aniline bien que légèrement différente, s'inspire également d'analogues de la classe des sulfonamides déjà synthétisés (Figure 19.).

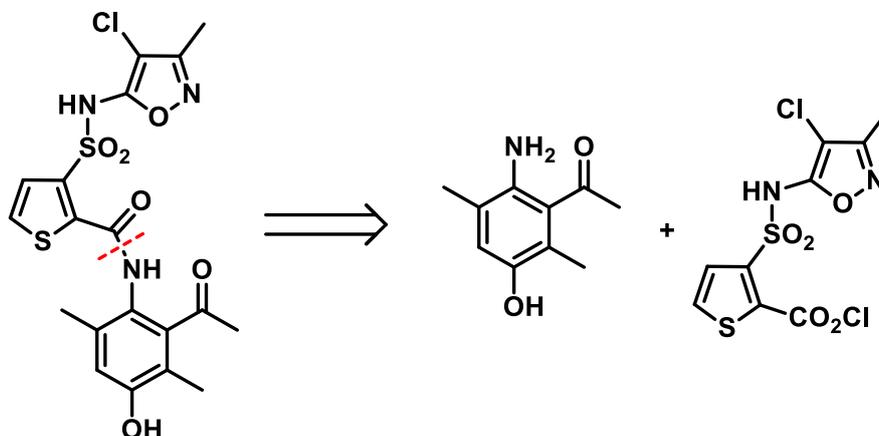


Figure 30. Rétrosynthèse

La molécule envisagée, comparée avec le composé **7q** présente une fonction hydroxyle en position 4 ; cette modification a été opérée pour nous permettre d'ajouter la sonde fluorescente sur notre antagoniste par une simple addition du linker sur cet hydroxyle.

Nous nous attendons à ce que cet -OH n'ait qu'un impact mineur, voire même aucun impact sur la liaison de notre composé sur son récepteur ET_A. Comme nous pouvons le voir sur les données de modélisation moléculaire que nous avons analysées (Figure 27. & 28.), le méthyle n'est pas impliqué dans une interaction essentielle pour la liaison et il n'y a pas d'acide aminé capable d'interagir avec cet hydroxyle autre que la Lysine, mais son amine est déjà impliquée dans une liaison hydrogène avec l'oxygène du sulfonamide.

6.1.1 Thiophène isoxazole

Pour la synthèse de la partie thiophène isoxazole nous avons choisi d'utiliser la synthèse décrite par Chengde Wu & al^[17] (Figure 31.)

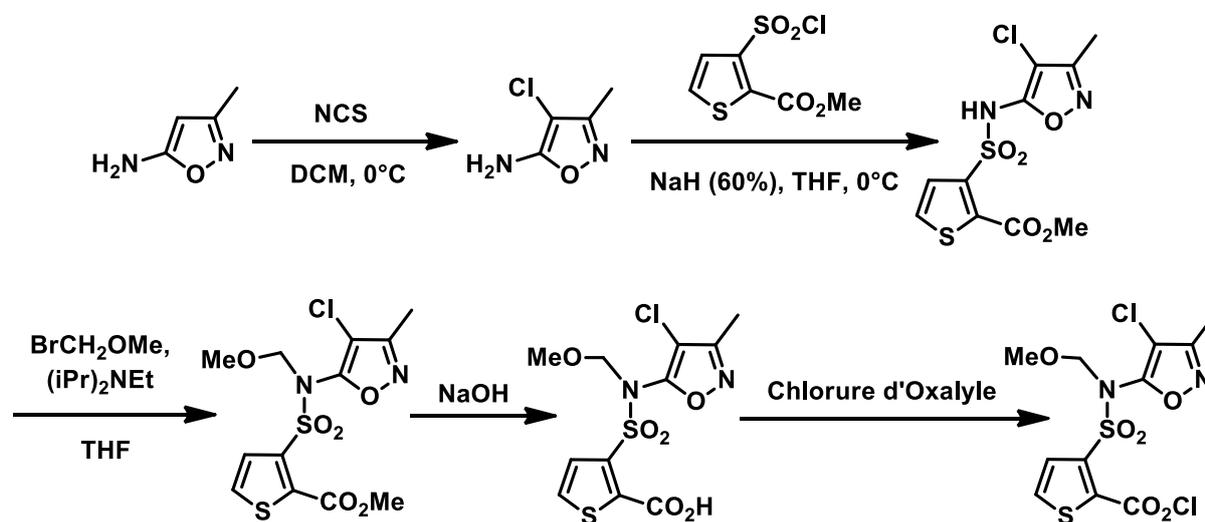


Figure 31. Synthèse du thiophène isoxazole

Comme le chlorure d'acide peut interagir avec l'azote de la fonction sulfonamide (cyclisation intramoléculaire), nous avons décidé d'inclure une protection de cette amine par un groupement MOM^[21] de manière à éviter les réactions secondaires durant la formation de la liaison amide (Figure 31.).

6.1.2 Aniline

Ce type d'aniline, avec un groupe hydroxyle, n'a jamais été synthétisé dans les précédentes séries d'antagonistes de type sulfonamide.

Après des recherches exhaustives sur cette aniline, nous avons décidé de démarrer la synthèse avec le 2,5-diméthylphénol étant donné qu'il était le moins cher des composés de départ identifiés (Figure 32.).

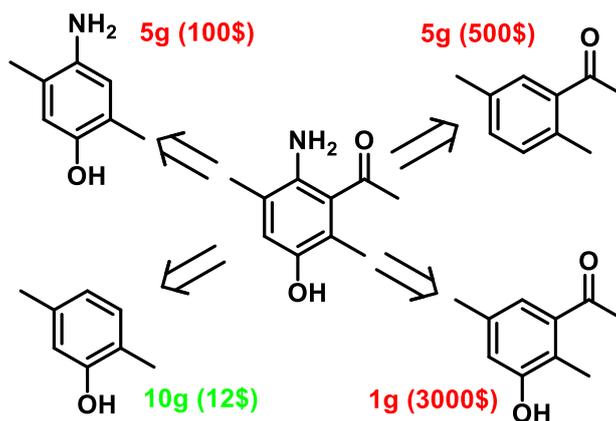


Figure 32. Rétrosynthèse de l'aniline

Partant du 2,5-diméthylphénol, nous avons pensé à une simple nitration du cycle benzénique à l'aide d'acide nitrique suivie d'une réduction au dihydrogène de la fonction nitrée en aniline (Figure 33.).

Une fois complétée, nous pourrions ajouter le groupement acétyle via les mêmes conditions de réaction utilisées pour le composé **7q**^[16] (Figure 33.).

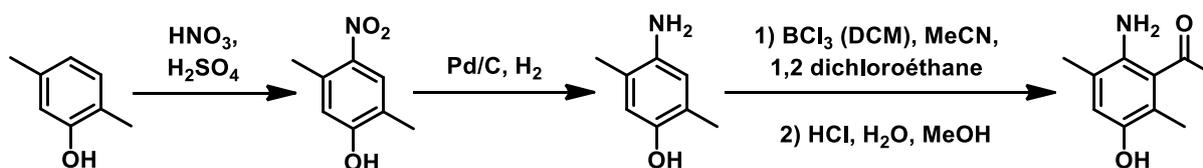


Figure 33. Stratégie de synthèse de l'aniline

Finalement, pour assembler nos deux synthons, nous avons prévu de réaliser une simple formation de liaison amide comme décrit dans les précédents articles (Figure 34.)^[16].

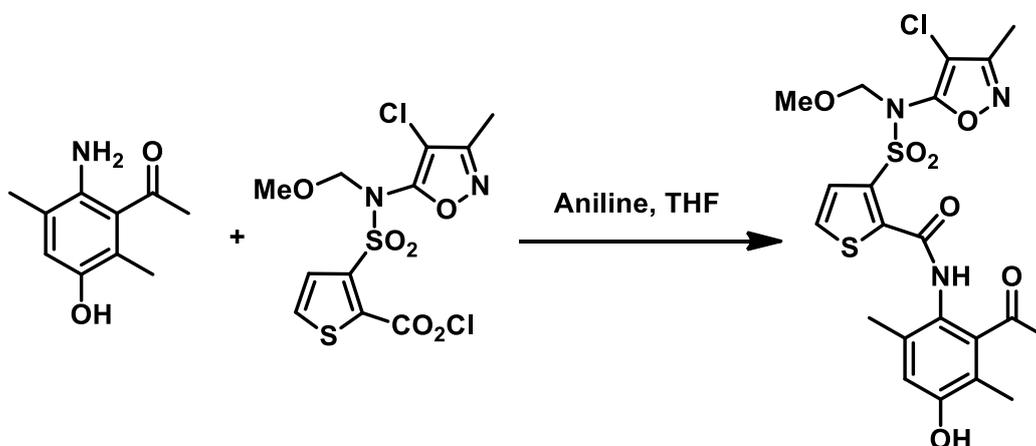


Figure 34. Formation de la liaison amide

6.1.3 Linker

La fonction hydroxyle a été introduite sur notre composé pour permettre la fonctionnalisation avec un linker.

Conformément aux études de modélisation moléculaire, la meilleure position pour le linker est sur le carbone numéro 4 du cycle benzénique, qui est localisé dans la partie extracellulaire et « pointe » vers l'extérieur du RCPG. Un long linker n'étant pas nécessaire, nous avons choisi un linker court de type PEG car il présente d'excellentes propriétés (biologiquement compatible, non immunogène et furtif). Ce linker possède une amine terminale de façon à pouvoir ajouter le fluorophore (*Figure 35.*).

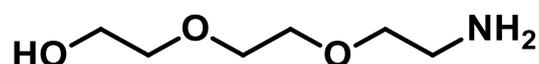


Figure 35. Linker PEG

Avant son addition, nous avons dû modifier le polyéthylène glycol. Une réaction de tosylation a permis de protéger l'alcool terminal, après avoir protégé l'amine avec un carboxybenzyle (CBz) pour limiter sa réactivité (*Figure 36.*).

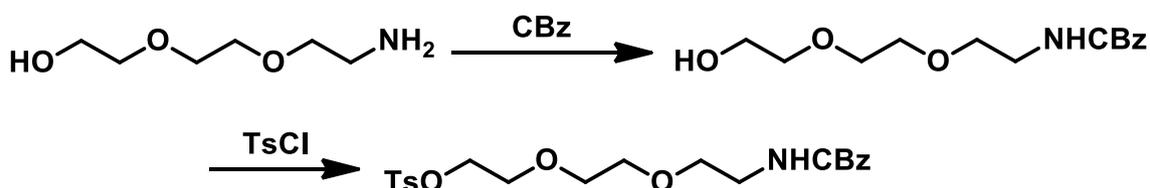


Figure 36. Préparation du linker

Nous avons ensuite fait réagir notre linker protégé sur notre composé sulfonamide (*Figure 37.*), suivi par une déprotection des groupements MOM et carboxybenzyle pour permettre le couplage supplémentaire avec le fluorophore.

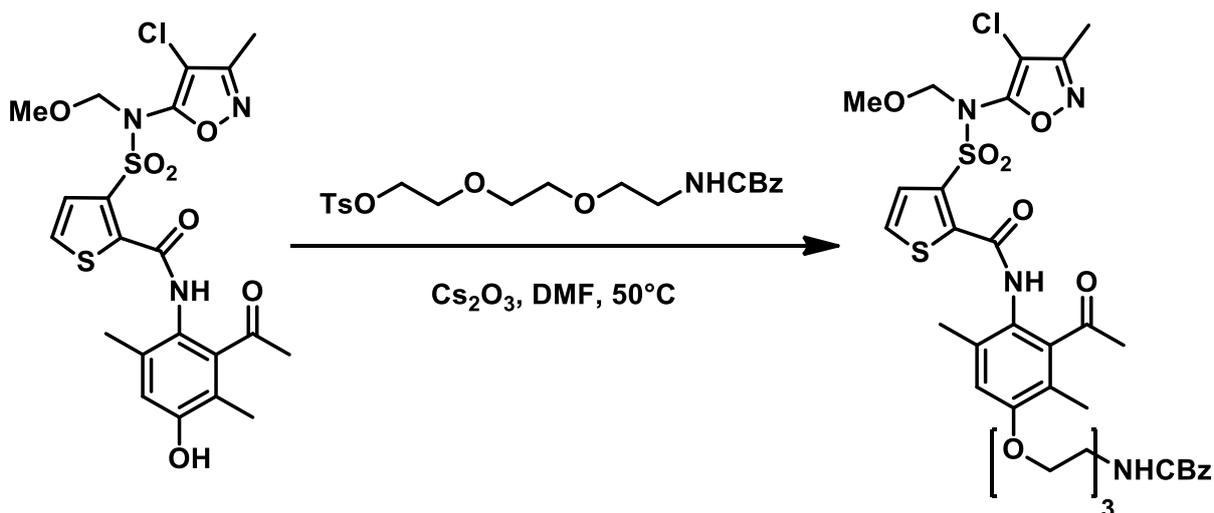


Figure 37. Fonctionnalisation du composé avec le linker

6.1.4 Fluorophore

Nous avons choisi le BODIPY 630/650 à excitation/émission dans le rouge (Figure 38.) car ce fluorophore est connu pour avoir des propriétés photophysiques adaptées pour des études cellulaires^[25]. Son spectre d'excitation/émission dans l'intervalle « rouge » de la longueur d'onde (620-700 nm) évite l'utilisation des UV qui peuvent causer des dommages aux cellules et évite aussi l'autofluorescence des cellules qui pourrait interférer avec la fluorescence du ligand. Les fluorophores absorbant dans le rouge sont également connus pour avoir un bon rendement quantique.

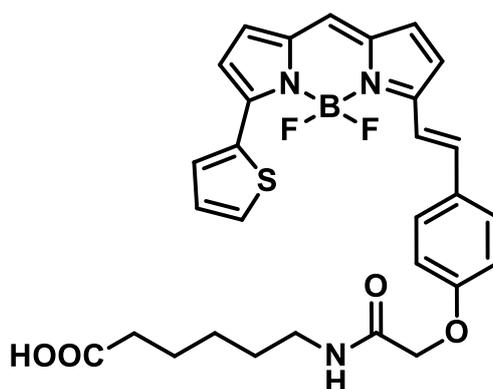


Figure 38. BODIPY 630/650

Le BODIPY 630/650 est un fluorophore hydrophobe qui est quenché en milieu aqueux mais lorsqu'il est lié au récepteur, la fluorescence augmente du fait de l'environnement lipidique de la membrane cellulaire^[26]. Cette caractéristique nous permettra de distinguer le ligand lié par rapport au ligand libre.

Nous présumons aussi que ce fluorophore sera pharmacologiquement inactif envers le récepteur ET_A.

6.2 Chimie

6.2.1 Thiophène isoxazole

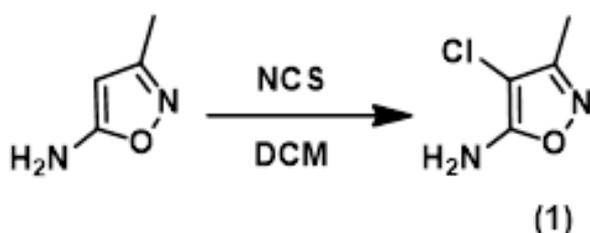


Figure 39. Halogénéation de l'isoxazole

Le 5-amino-3-méthylisoxazole disponible commercialement réagit avec le *N*-chlorosuccinimide dans le dichlorométhane à 0°C pour donner le 5-amino-4-chloro-3-méthylisoxazole (Figure 39.). Le mélange réactionnel a ensuite été agité avec de l'hexane de façon à faire précipiter le produit désiré, récupéré par filtration sous vide (58%). Malheureusement, il y avait toujours du produit final dans la solution d'hexane (vérifié par CCM) et c'est pourquoi une purification par colonne chromatographique de cette fraction a été nécessaire pour obtenir la totalité du produit.

L'haloisoxazole est ensuite traité avec de l'hydrure de sodium dans du THF anhydre à 0°C pour déprotoner l'amine et ainsi permettre la formation du sulfonamide grâce à l'addition du 3-chlorosulfonyl-2-thiophénecarboxylate de méthyle (Figure 40.).

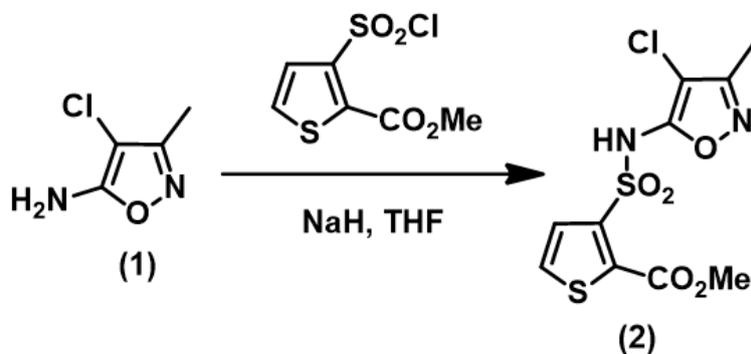


Figure 40. Addition du thiophène

Pour cette étape, nous avons commencé par utiliser le NaH en solution dans l'huile à 60% mais la réaction était trop longue et incomplète. Nous avons alors changé pour du NaH à 95% afin d'augmenter la déprotonation de l'amine et favoriser la réaction (51%).

Nous avons également remarqué qu'après traitement, le produit restait en phase aqueuse qui se trouvait être légèrement basique (pH = 8). Après acidification du milieu par ajout d'HCl, le produit a pu être extrait dans la phase organique.

La présence du produit en phase aqueuse est probablement due aux propriétés acides de la fonction sulfonamide. Cette théorie a été renforcée à l'aide de l'étape suivante de la synthèse.

En effet, lorsque nous protégeons la fonction sulfonamide par un groupement protecteur MOM (70%) (Figure 41.), le produit se répartit facilement dans la phase organique. Cette protection a été réalisée en utilisant du brométhylméthyl éther avec de la diisopropyléthylamine dans du THF anhydre. La base utilisée dans cette réaction permet la déprotonation du sulfonamide. Le bromure présent dans le mélange réactionnel a été quenché par la morpholine qui a ensuite été éliminée via un lavage à l'HCl.

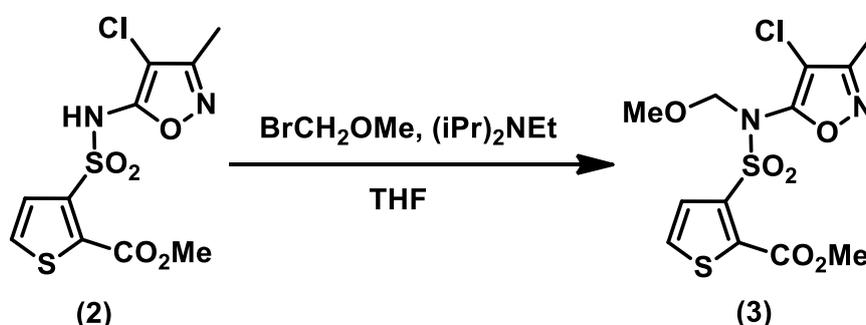


Figure 41. Protection au MOM

Une fois la fonction sulfonamide protégée, nous avons dû hydrolyser l'ester afin d'obtenir l'acide (Figure 42.).

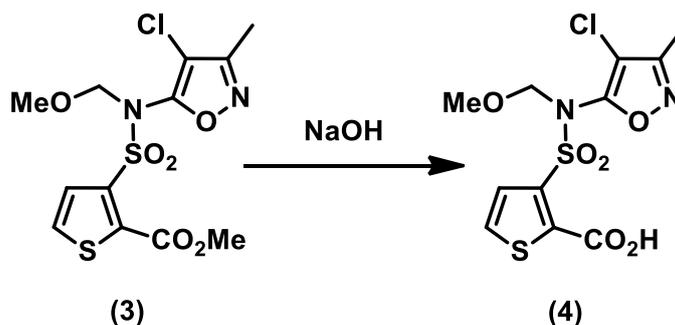


Figure 42. Hydrolyse de l'ester

Pour cela, nous avons effectué une simple hydrolyse alcaline à l'aide de soude (NaOH 2M) dans le THF pendant 3h. Afin de neutraliser la soude, nous avons utilisé de l'acide chlorhydrique (HCl 1M) mais après récupération du composé et analyse RMN, nous nous sommes rendu compte que le traitement acide trop fort a éliminé la protection MOM sur l'amine.

Nous avons donc relancé l'hydrolyse mais, cette fois, nous avons ajouté l'acide chlorhydrique progressivement jusqu'à atteindre un pH de 5 afin de pouvoir faire passer notre composé sous sa forme acide non ionisée et le récupérer en phase organique sans éliminer le groupement MOM.

L'acide sans la protection méthyle-O-méthyle a toutefois pu être récupéré, et après avoir reprotégé l'amine ainsi que l'acide avec 2 équivalents de MOM nous avons pu renouveler l'hydrolyse de l'ester.

La partie suivante de la synthèse est la formation du chlorure d'acide (*Figure 43.*) qui est un composé assez instable. Cette instabilité, additionnée au fait que le chlorure d'acide est facile à obtenir, nous avons décidé de réaliser cette réaction une fois que la partie aniline serait prête de manière à utiliser le chlorure d'acide directement après sa synthèse pour former la liaison amide.

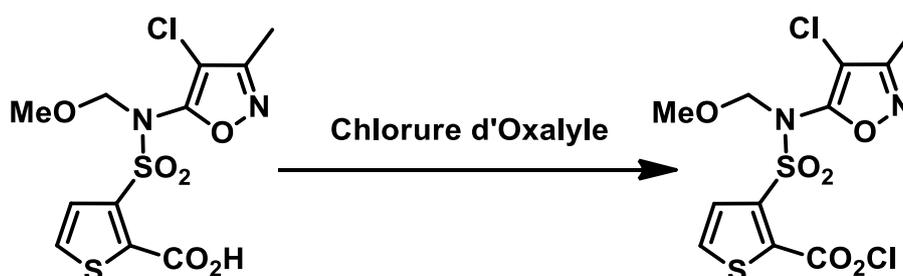


Figure 43. Formation du chlorure d'acide

6.2.2 Aniline

Concernant la synthèse de la partie aniline, pour fonctionnaliser le cycle benzénique avec un groupement nitré nous voulions utiliser une simple réaction de nitration avec de l'acide nitrique et sulfurique. Nous avons choisi d'utiliser une des conditions de nitration décrites par Chengde Wu & al^[16].

Dans cette réaction, ils utilisaient 6 équivalents d'acide nitrique dans l'acide acétique comme solvant mais, selon certaines références, il est préférable d'utiliser seulement 1 équivalent d' HNO_3 afin d'éviter les nitrations multiples.

A la fin de la réaction notre composé ne précipite pas dans l'eau glacée, nous avons alors dû l'extraire avec de l'acétate d'éthyle. Après séparation et analyse des composés présents dans le mélange réactionnel, aucun ne correspondait au produit espéré. Nous avons donc décidé d'essayer la même réaction avec 6 équivalents d'acide nitrique mais sans chauffer la réaction à 80°C car, dans la littérature, ils utilisaient de l'acide benzoïque qui est moins réactif que le phénol que nous avons utilisé. Malheureusement, nous avons obtenu l'*ortho*-nitrophénol et le dinitrophénol (*ortho*- et *para*-). Nous avons alors utilisé une méthode de nitration plus douce^[27] en utilisant de l'acide nitrique avec du méthanol mais le résultat a été similaire aux deux expériences précédentes.

Bien que ces différentes réactions de nitration ne nous aient pas permis d'accéder au produit *para*-nitré, nous avons pu accéder à la formation de deux composés nitrés ; l'*ortho* et l'*ortho-para* dinitro. Ces deux entités montraient que la nitration avait fonctionné même si ce n'était pas sur la position espérée. Nous avons donc émis l'hypothèse que notre composé phénolique est trop réactif pour nous donner le composé nitré en *para*.

Dans le but de réduire la réactivité du phénol, nous avons décidé de masquer l'hydroxyle responsable de la trop grande réactivité sous forme d'un benzyle éther. Protéger le phénol évite également toute réaction secondaire durant la formation de la liaison amide.

Après avoir analysé la littérature, nous avons sélectionné une stratégie de benzylation du 2,5-diméthylphénol^[28] (*Figure 44.*) en utilisant du bromure de benzyle et du carbonate de potassium comme base pour déprotoner le phénol et favoriser la substitution dans l'acétone. Le mélange réactionnel a été mis à reflux pendant 12h.

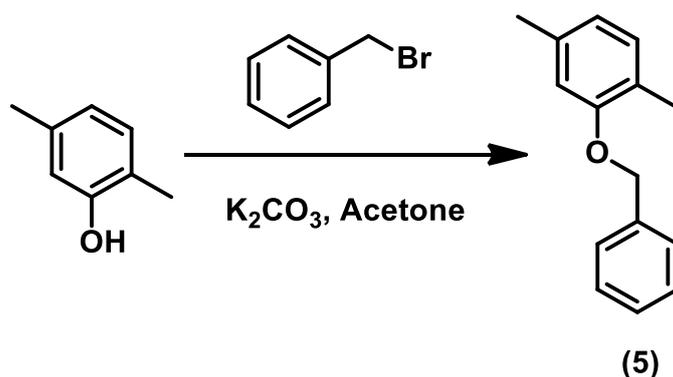


Figure 44. Benzylation du phénol

Une fois les 12h terminées nous avons vérifié la fin de la réaction par CCM. Nous avons noté la présence de deux spots avec le même Rf que le produit de départ et le bromure de benzyle, nous faisant craindre un échec de la réaction. Toutefois, après quelques minutes, le spot du bromure de benzyle disparaît sur la CCM tandis que le spot du mélange réactionnel au même Rf reste présent. Nous en avons donc conclu que ce spot pouvait être le produit désiré. Nous avons effectué une autre CCM en utilisant les conditions d'élution décrites dans la référence (Cyclohexane/AcOEt, 10:1) et nous avons trouvé un Rf très similaire (0.81). Nous avons donc décidé de stopper la réaction et de la traiter. Le traitement et la purification nous ont permis d'obtenir un produit propre avec un rendement de 100%.

Une fois notre phénol protégé, nous avons pu tenter la nitration. Nous avons tout d'abord essayé les conditions utilisées précédemment, avec le méthanol comme solvant. Malheureusement, ces réactions n'ont pas marché même lorsque nous avons laissé la réaction toute la nuit à 50°C. Nous avons donc décidé de changer pour une autre approche avec de plus fortes conditions utilisant de l'acide nitrique comme solvant et du nitrate de sodium comme réactif clé et dans ces conditions nous avons obtenu le produit nitré (49%) (Figure 45.).

Nous avons également pu obtenir le même produit via une benzylation du 2,5-diméthylnitrophénol avec les mêmes conditions utilisées précédemment (95%) (Figure 45.).

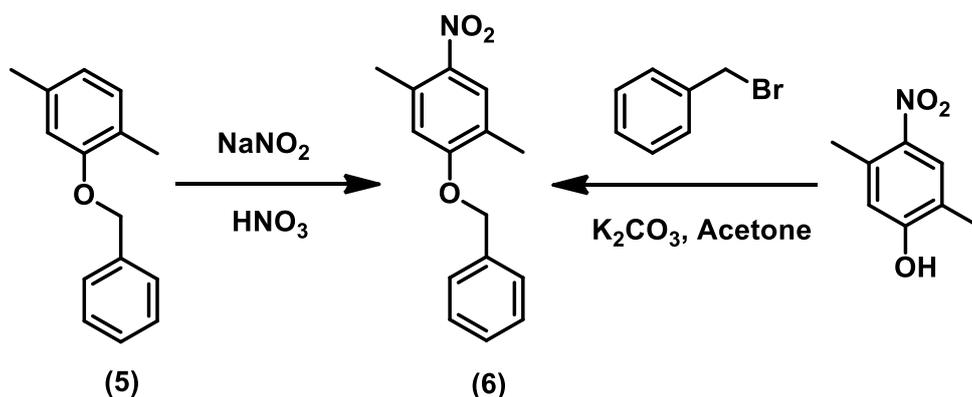


Figure 45. Synthèse du 2,5-diméthyl-4-nitrophényloxybenzyle

Etant donné que le groupement benzyle que nous avons utilisé pour protéger le phénol est sensible au palladium, nous ne pouvons pas l'utiliser pour réduire la fonction nitrée. Nous avons donc dû explorer d'autres conditions de réduction.

Dans plusieurs articles, ils utilisaient également de l'étain pour réduire le groupement nitro mais, à cause de sa trop grande toxicité, nous avons décidé de ne l'essayer qu'en dernier recours.

Nous avons tout d'abord essayé les conditions de réduction précédemment utilisées par Chengde Wu & al.^[16] pour synthétiser leur aniline (Figure 46.). Une solution de chlorure d'ammonium dans l'eau et du Zinc en poudre ont été séquentiellement ajoutés à un mélange de 2,5-diméthyl-4-nitrophényloxybenzyle dans le méthanol puis le mélange réactionnel a été agité à température ambiante.

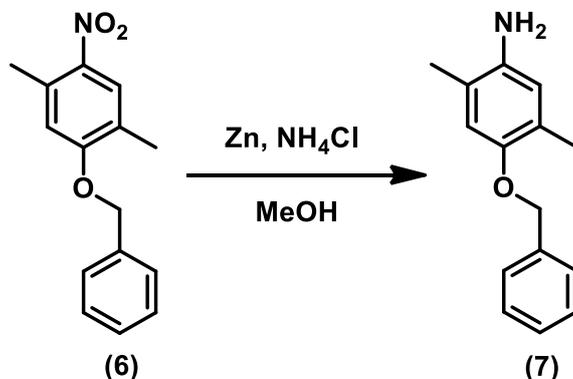


Figure 46. Réduction du 2,5-diméthyl-4-nitrophényloxybenzyle

Après purification via une colonne chromatographique, l'analyse RMN a montré que notre produit n'était pas seul bien qu'il n'y ait qu'un seul spot sur la CCM. Pour mettre en lumière cette impureté sur la plaque de silice nous avons essayé différents éluants et utilisé de la ninhydrine pour révéler l'aniline grâce à son interaction avec l'amine. Finalement, nous avons été capables d'identifier deux produits distincts avec une amine libre que l'on ne pouvait pas bien séparer sur la CCM (Figure 47.).

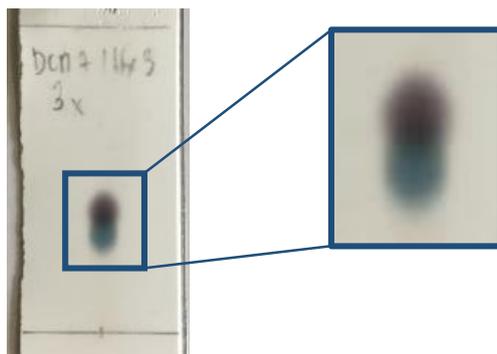


Figure 47. Chromatographie sur Couche Mince

Etant donné que la première réduction au Zinc a permis d'obtenir moins de 50 mg de mélange réactionnel, nous avons pu utiliser une chromatographie préparative sur plaque de silice pour séparer correctement les deux produits avec DCM:hexane (7:3) comme éluant et en faisant migrer trois fois de suite pour améliorer la séparation. Grâce à cette méthode nous avons pu récupérer l'aniline pure (39%).

Dans le but d'éviter ou de limiter la formation de cette impureté nous avons testé un autre type de réduction utilisant du Fer^[29]. Durant la précédente réaction nous avons également noté que le produit de départ ne se dissolvait pas bien dans le méthanol et, selon l'article, cette méthode est utilisée pour les composés insolubles dans le méthanol.

Nous avons commencé par laisser la réaction à température ambiante et après seulement 1h de réaction nous avons observé l'apparition du produit. Comme le produit de départ était toujours présent après 2h à température ambiante, nous avons chauffé la réaction à reflux (70°C) et, malheureusement, l'impureté (bleue sur la CCM) est apparue après 2h de chauffage.

Comme nous ne disposons pas d'une grande quantité de produit (**7**) pour tester la réaction d'acylation, nous avons effectué un test initial sur la *p*-anisidine. Nous avons pour cela utilisé une acylation de Sugasawa (*Figure 48. Méthode A*)^[30] et une acylation de Friedel Craft classique (*Figure 48. Méthode B*)^[31].

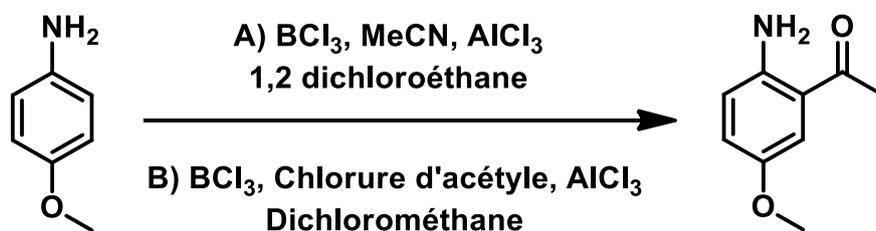


Figure 48. Acylation de la p-anisidine

Malheureusement, nous avons seulement pu récupérer le produit de départ en ce qui concerne l'acylation de Sugasawa.

Pour l'acylation de Friedel Craft, le chlorure d'acétyle est tellement réactif qu'il vient se fixer sur l'amine libre pour former l'amide correspondante (*Figure 49.*).

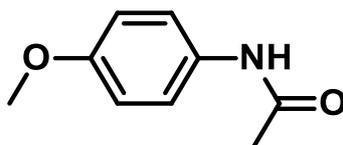


Figure 49. p-acetanilide

6.2.3 Linker

Nous avons commencé par ajouter un groupe protecteur Carboxybenzyle sur l'amine^[32] pour éviter toute réaction secondaire avant le couplage du fluorophore.

Le 2-[2-(2-Aminoéthoxy)éthoxy]éthanol (disponible commercialement) a été mélangé avec la triéthylamine et du chloroformate de benzyle dans le méthanol puis agité durant 20h pour donner le linker protégé par un groupement CBz (84%) (*Figure 50.*).

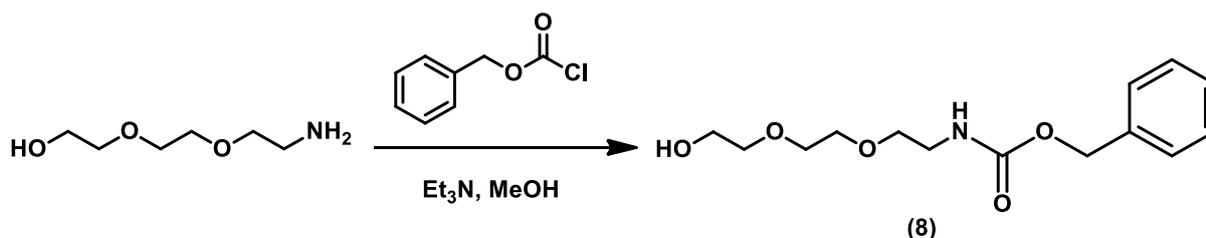


Figure 50. Protection du linker avec un CBz

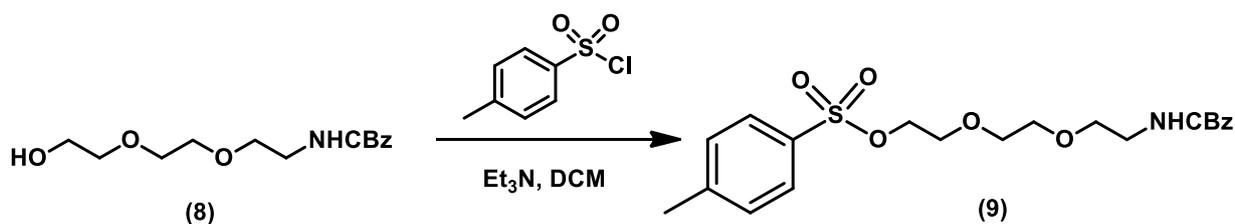


Figure 51. Addition du *p*-toluènesulfonyle

Pour permettre l'addition du linker sur notre composé, nous avons ajouté un groupement tosyle sur l'alcool terminal du PEG en utilisant de la triéthylamine et du chlorure de *p*-toluènesulfonyle^[33] (38%) (Figure 51.).

6.3 Perspectives

Dans le cadre d'une étude de relation structure-activité et en raison de l'impact du fluorophore sur l'affinité et la sélectivité pour ET_A nous avons prévu de synthétiser différents analogues de notre composé, majoritairement basés sur les antagonistes du récepteur A de type sulfonamide qui ont déjà été étudiés.

De manière à étudier l'importance des substituants sur le cycle aniline et, par la même occasion, de tester les réactions de formation de la liaison amide, nous avons décidé d'utiliser le 4-aminophénol et la 2-amino-5-hydroxyacétophénone comme analogues de la partie amine (Figure 52.).

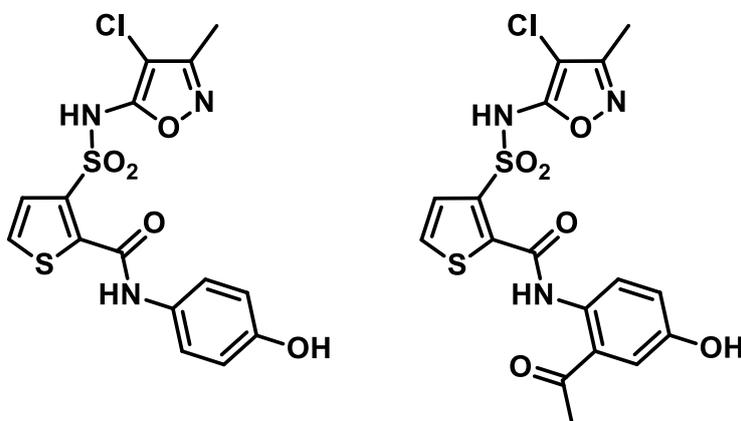


Figure 52. Analogues de l'antagoniste

Nous avons vu précédemment que les réactions d'acylation que nous avons tentées n'ont pas fonctionné. Pour générer notre aniline acétylée, nous avons donc prévu d'utiliser la 2-amino-4-méthoxyacétophénone qui est disponible sur le marché et présente l'avantage d'être déjà acétylée. Cela nous permettra également d'obtenir un autre analogue de notre composé (Figure 53.).

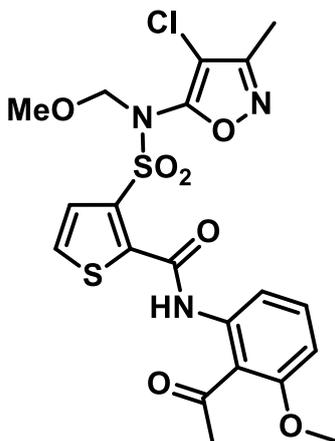


Figure 53. Analogue méta-hydroxyle

La position *mé*ta du groupe hydroxyle nous permettra de déterminer si le linker doit absolument se situer en position *para* par rapport à l'amine ou si une autre position est tolérée.

Nous avons également cherché à développer une autre stratégie pour faciliter la synthèse de l'aniline.

Lorsque nous avons recherché des réactions de benzylation, nous avons essayé de trouver une alternative pour éviter la trop grande réactivité du phénol. C'est pourquoi nous avons suggéré de remplacer l'hydroxyle par un atome d'halogène (Figure 54.) qui permettrait l'addition du linker PEG via une réaction de substitution. Cela semble être une bonne option car les halogènes réduisent la réactivité du benzène grâce à leur effet attracteur d'électrons tout en favorisant la substitution en position *ortho* et *para*.

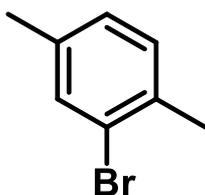


Figure 54. 2,5-diméthylbromobenzène

Comme il y a un risque d'acylation sur le groupement protecteur benzyle, nous avons pensé à modifier la protection du groupement hydroxyle (*Figure 55*).

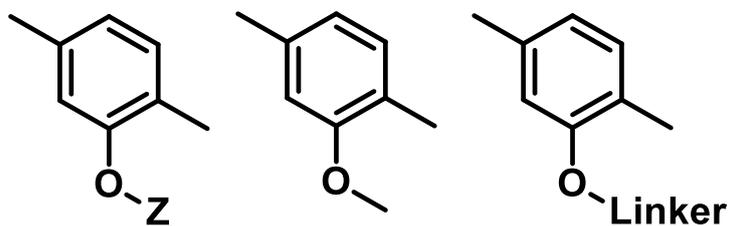


Figure 55. Alternatives à la protection de l'hydroxyle

Pour éviter une addition sur le benzène nous envisageons la synthèse d'éthers avec une chaîne alkyle (Z) à la place du cycle aromatique ou un groupement MOM, comme sur l'amine du sulfonamide. Nous avons également suggéré le fait que l'addition du linker durant la première partie de la synthèse pourrait réduire la réactivité du cycle benzénique.

Conclusion

Les maladies cardiovasculaires sont encore aujourd'hui l'une des principales causes de décès en France et dans le monde.

Une des plus connues du grand public reste l'hypertension artérielle. Comme son nom l'indique, elle correspond à une pression anormalement élevée dans les vaisseaux sanguins et lorsqu'elle touche les artères pulmonaires elle est qualifiée d'hypertension artérielle pulmonaire.

Il s'agit d'une affection de longue durée ayant des causes diverses (contexte familial, complication d'une autre pathologie...). C'est pourquoi le traitement proposé n'est généralement que symptomatique car pour soigner l'HTAP il faudrait, dans la mesure du possible, traiter la cause sous-jacente qui est rarement identifiée.

L'utilisation de vasodilatateurs permet de diminuer la tension au niveau des vaisseaux et ainsi d'éviter que la maladie n'entraîne certaines complications dont la plus fréquente est l'insuffisance cardiaque. Malheureusement il n'existe, à l'heure actuelle, pas de traitement spécifique. En effet le traitement est initié en fonction de l'état de santé du patient et est ensuite adapté suivant sa réponse au traitement.

Parmi les nombreux médicaments utilisés dans l'HTAP, certains ciblent le système de l'endothéline.

L'endothéline, un peptide naturel synthétisé par les cellules endothéliales, est un vasoconstricteur puissant à longue durée d'action dont la concentration plasmatique se trouve augmentée en cas d'hypertension artérielle pulmonaire.

Ce peptide agit via son interaction avec deux récepteurs couplés aux protéines G, ET_A et ET_B dont les proportions au niveau vasculaire sont fortement altérées chez les patients atteints d'HTAP.

C'est dans le but d'étudier la localisation vasculaire des récepteurs A de l'endothéline que nous souhaitons synthétiser un antagoniste fluorescent spécifique de ET_A, utilisable lors de tests cellulaires.

L'ensemble de ce travail de synthèse chimique a été effectué dans le cadre d'un stage de Master 2 sous la direction du Pr. Barrie KELLAM et sous l'encadrement de Sarah MITSRY au Centre for Biomolecular Sciences à l'Université de Nottingham en Angleterre.

Grâce à une analyse de la littérature sur les antagonistes connus de ET_A et leurs différentes relations structure-activité, nous avons été capables de choisir le plus sélectif (**7q**) comme structure de départ pour développer notre composé.

Après l'introduction d'un groupement hydroxyle sur la molécule pour pouvoir la fonctionnaliser avec un fluorophore (BODIPY 630/650) via un linker PEG, nous avons trouvé deux synthons pour la synthèse de notre composé : un thiophène isoxazole et une aniline. Nous avons développé des voies de synthèses pour ces molécules en nous basant sur les différentes synthèses d'analogues sulfonamides des antagonistes de ET_A précédemment décrites dans la littérature.

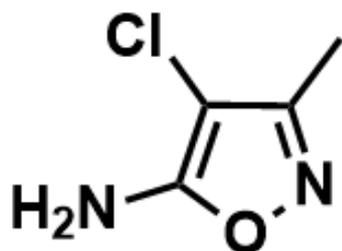
Nous avons facilement pu obtenir le thiophène isoxazole mais quelques problèmes sur la synthèse de la région aniline nous ont conduits à explorer certaines modifications de la voie de synthèse originale. Nous avons également considéré certains analogues avec quelques variations sur l'aniline dans le but d'améliorer la synthèse et d'analyser l'impact de ces substituants sur la pharmacologie du composé fluorescent.

Pour continuer notre travail, la synthèse de la partie aniline devra être terminée et améliorée afin d'obtenir le composé final ainsi que certains analogues qui pourront être fonctionnalisés afin d'obtenir un ligand fluorescent adapté aux essais biologiques.

Experimental section

General Chemicals and solvents of analytical and HPLC grade were purchased from commercial suppliers and used without further purification. BODIPY-630/650-X-SE was purchased from Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific). All reactions were carried out at ambient temperature unless otherwise stated. Reactions were monitored by thin-layer chromatography on commercially available silica pre-coated aluminium-backed plates (Merck Kieselgel 60 F254). Visualisation was under UV light (254 nm and 366 nm), followed by staining with ninhydrin or KMnO₄ dips. Flash column chromatography was performed using silica gel 60, 230-400 mesh particle size (Sigma Aldrich). NMR spectra were recorded on a Bruker-AV 400. ¹H spectra were recorded at 400.13 Hz and ¹³C NMR spectra at 101.62 Hz. All ¹³C NMR are ¹H broadband decoupled. Solvents used for NMR analysis (reference peaks listed) were CDCl₃ supplied by Cambridge Isotope Laboratories Inc., (δH = 7.26 ppm, δC = 77.16). Chemical shifts (δ) are recorded in parts per million (ppm) and coupling constants are recorded in Hz. The following abbreviations are used to describe signal shapes and multiplicities; singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), broad (br), dd (doublet of doublets), td (triplet of doublets), tt (triplet of triplets) and multiplet (m). Processing of the NMR data was carried out using the NMR software MestReNova-12.0.4-22023. LC-MS spectra were recorded on a Shimadzu UFLCXR system coupled to an Applied Biosystems API2000 and visualised at 254 nm (channel 1) and 220 nm (channel 2). LC-MS was carried out using a Phenomenex Gemini-NX C18 110A, column (50 mm × 2 mm × 3 μm) at a flow rate 0.5 mL/min over a 5 min period (Method A). Melting point were determined using a Gallenkamp melting point Apparatus.

5-Amino-4-chloro-3-methylisoxazole (1):



Chemical formula : C₄H₅ClN₂O

Molecular weight : 132.55 g/mol

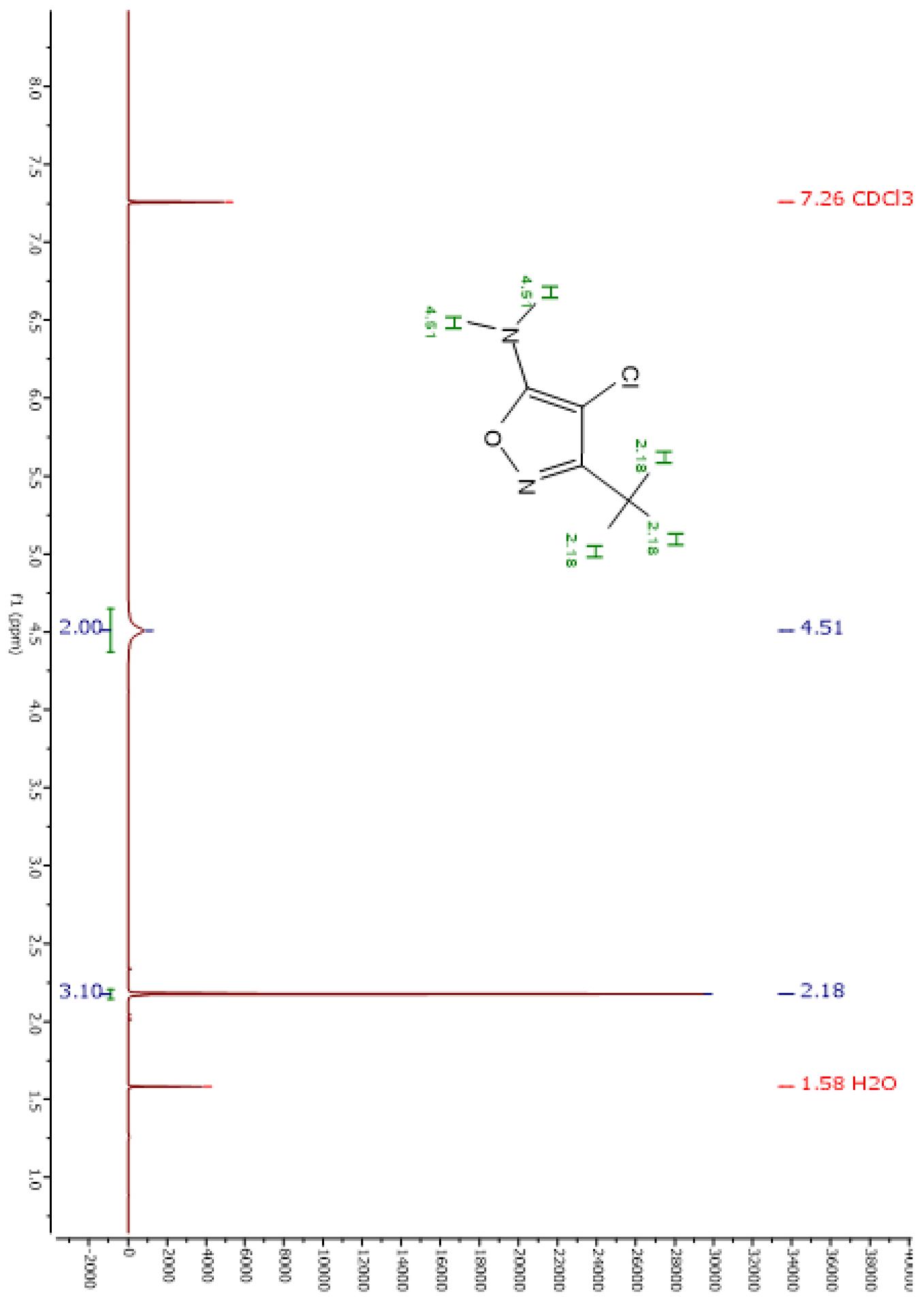
Synthesis protocol :

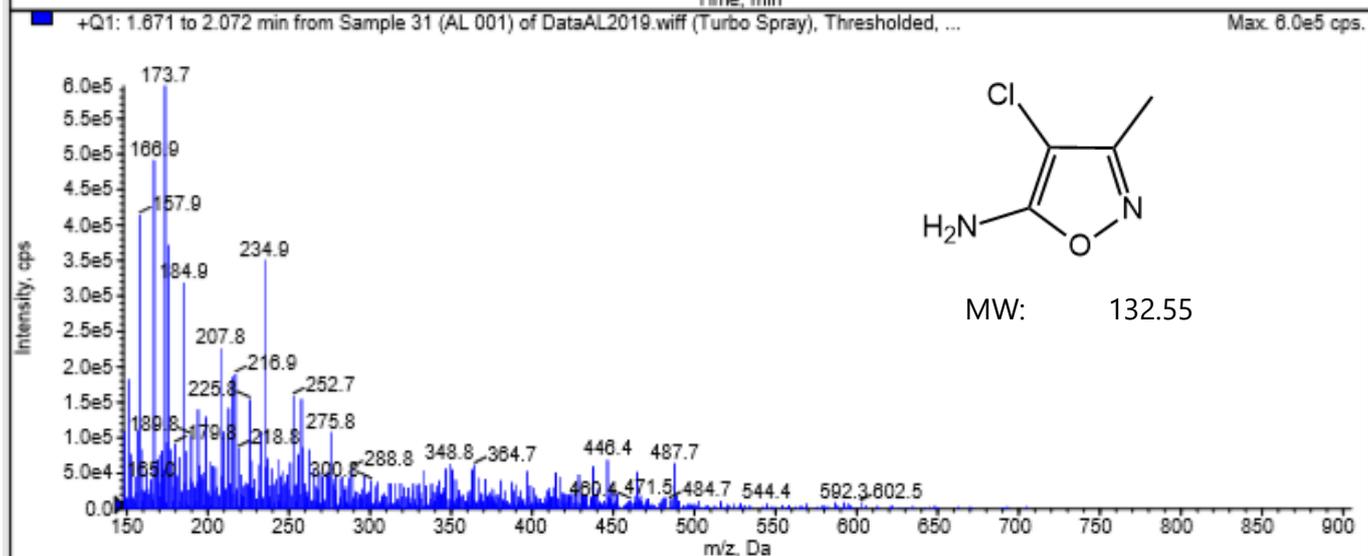
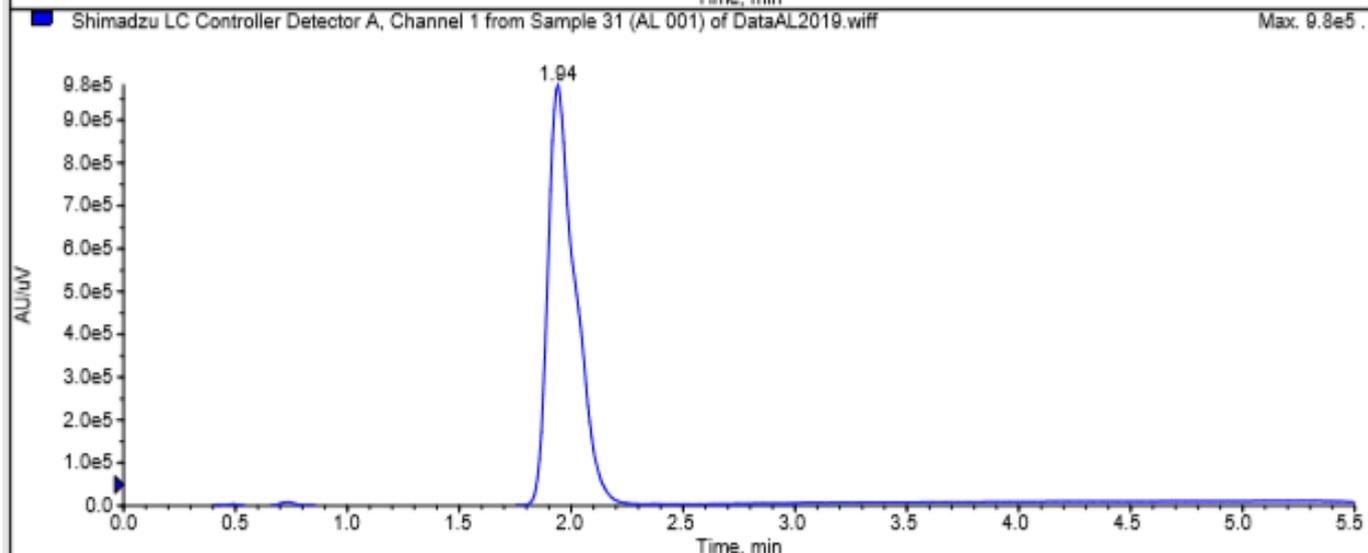
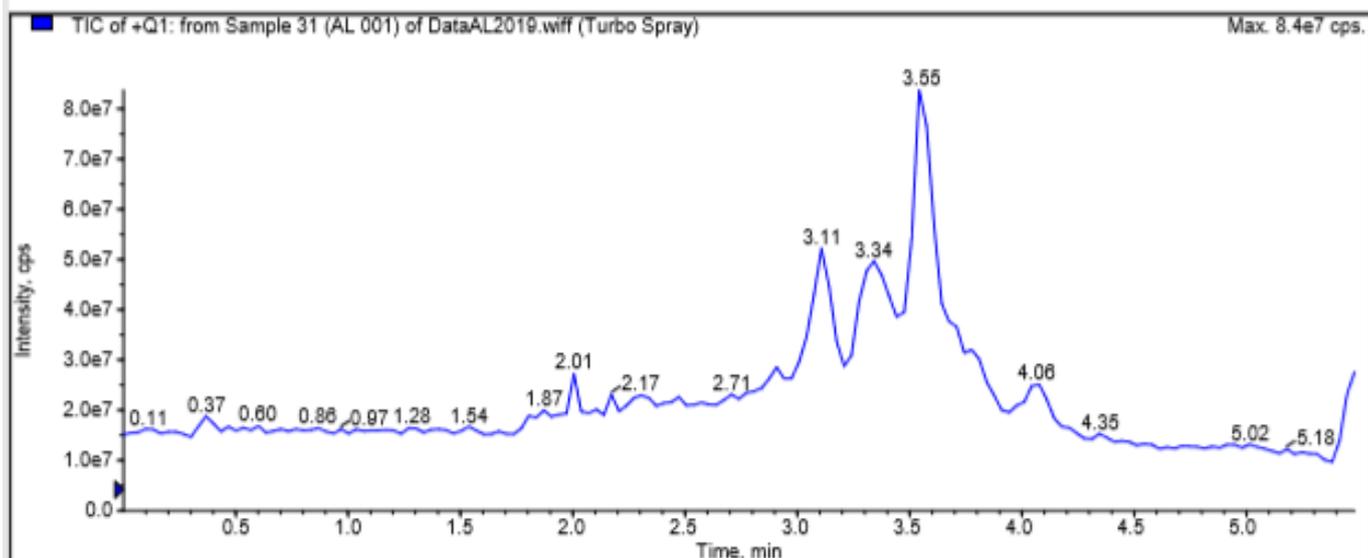
To a solution of 5-amino-3-methylisoxazole (2 g, 20.40 mmol) in dichloromethane (16 mL) at 0 °C was slowly added *N*-chlorosuccinimide (2.72 g, 20.40 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and an additional 2 h at room temperature. To work up, the solution was washed with 1 N NaOH then the organic layer was dried using MgSO₄ and concentrated by evaporation. The residue was shaken with hexane (20 mL), and the white precipitate was filtered to give a white solid (1.74 g, 63%).

Mp: 62-65°C.

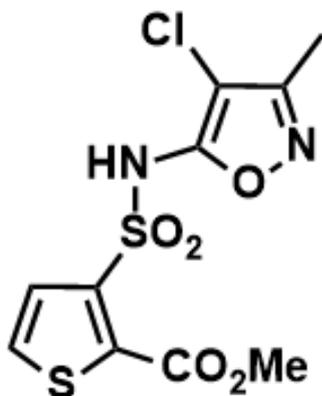
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4.53 (m = br.s, I = 2H) ; 2.18 (m = s, I = 3H).

LC-MS t_R = 1.94 min.





Methyl-3-[(4-Chloro-3-methyl-5-isoxazolyl)sulfamoyl]-2-thiophenecarboxylate (2):



Chemical formula : C₁₀H₉ClN₂O₅S₂

Molecular weight : 336.76 g/mol

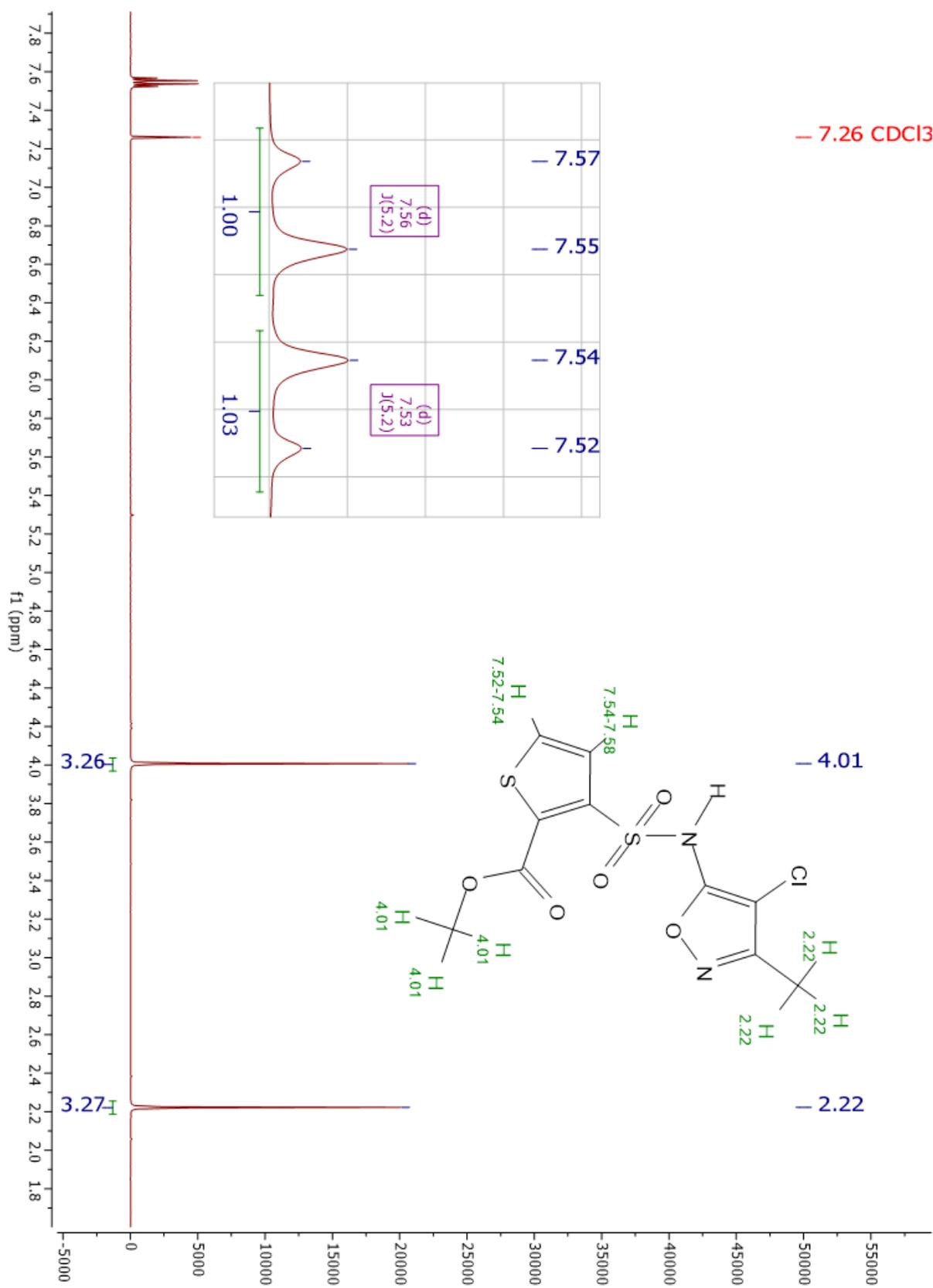
Synthesis protocol :

To a solution of **(1)** (500 mg, 3.74 mmol) in anhydrous THF (16.5 ml) at 0 °C was added NaH (95% ; 114 mg, 7.89 mmol). The reaction was stirred for 30 min before the slow addition of methyl 3-chlorosulfonyl-2-thiophenecarboxylate (631 mg, 2.62 mmol). The mixture was stirred for 1h at 0°C and then 4h at room temperature. After evaporation of the THF under rotavapor, DCM was added to the resulting mixture which was washed with water. The product was then purified with a chromatographic column (DCM:MeOH, 9.5:0.5) to give a yellow solid (451 mg, 50%).

Mp: 110-115°C.

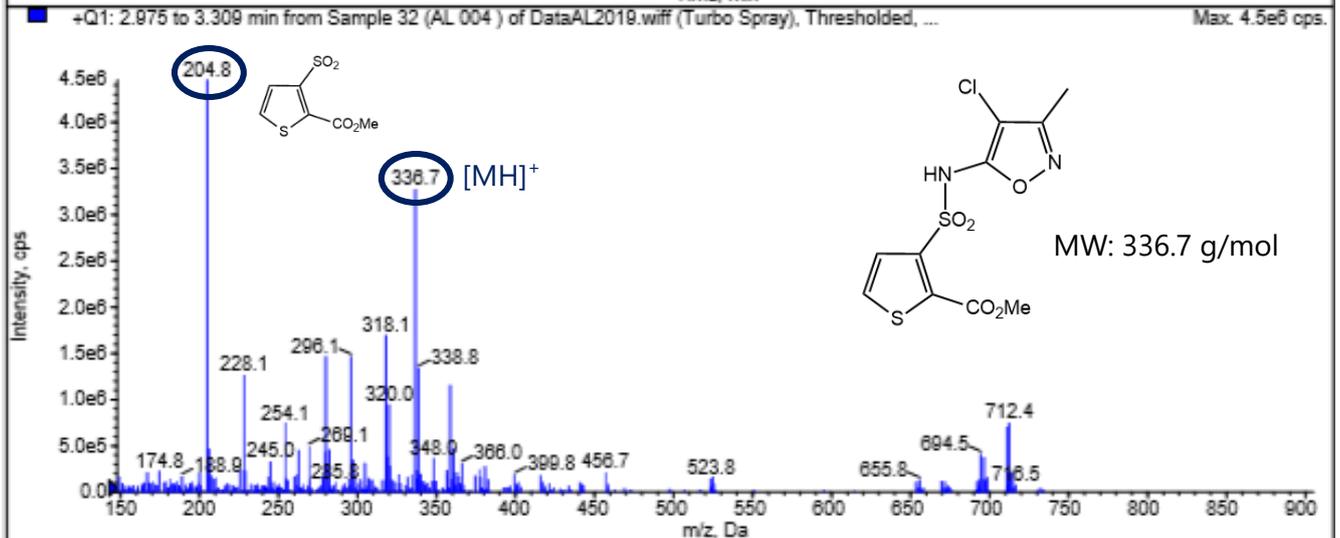
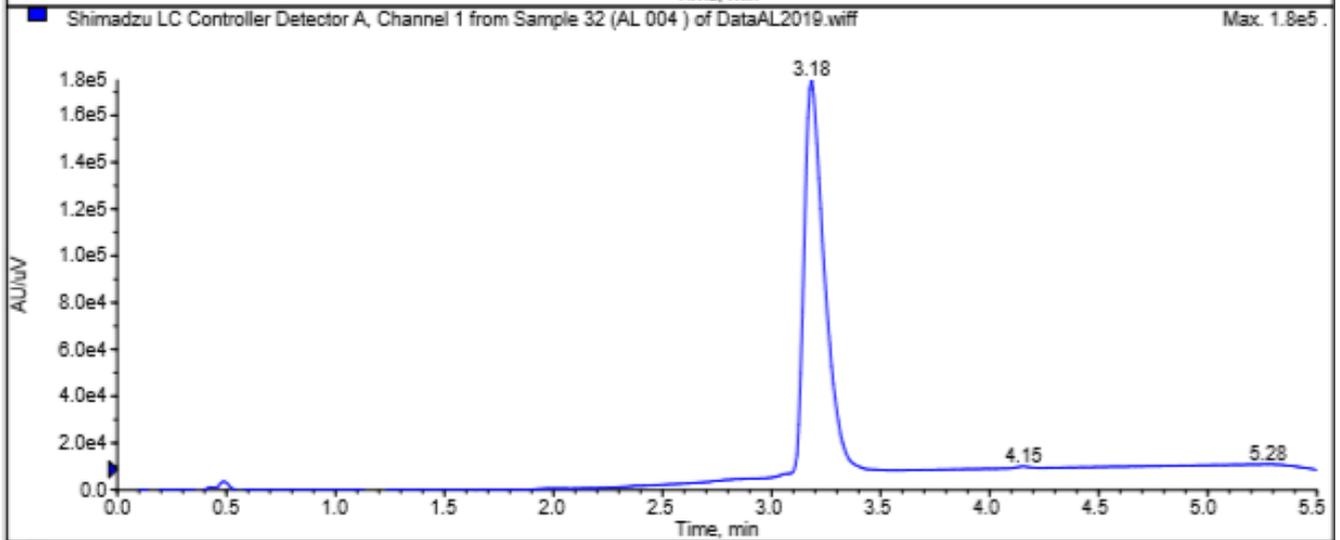
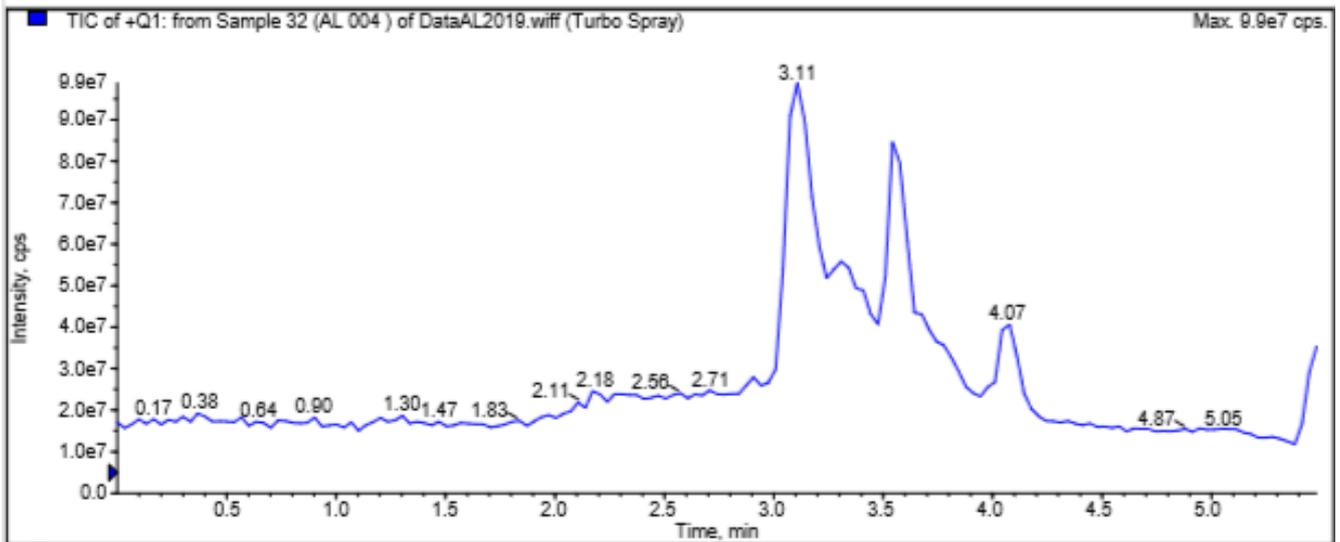
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.56 (m = d, J = 7.5 Hz, I = 1H) ; 7.53 (m = d, J = 7.5 Hz, I = 1H) ; 4.01 (m = s, I = 3H) ; 2.22 (m = s, I = 3H).

LC-MS m/z calc. for C₁₀H₉ClN₂O₅S₂ [MH]⁺: 337.7, found: 336.7 t_R = 3.18 min

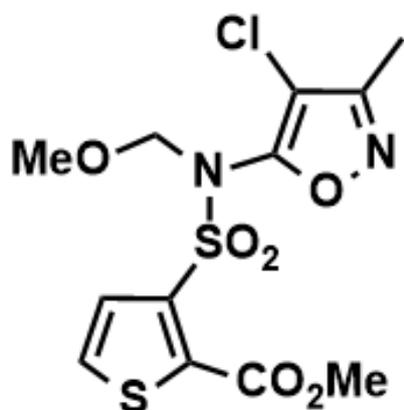


Acq. File: DataAL2019.wiff

Sample Name: AL 004
Sample Number: X/A



Methyl-3-[[N-(4-Chloro-3-methyl-5-isoxazolyl)-N-(methoxymethyl)amino]sulfonyl]-2-thiophenecarboxylate (3):



Chemical formula : C₁₂H₁₃ClN₂O₆S₂

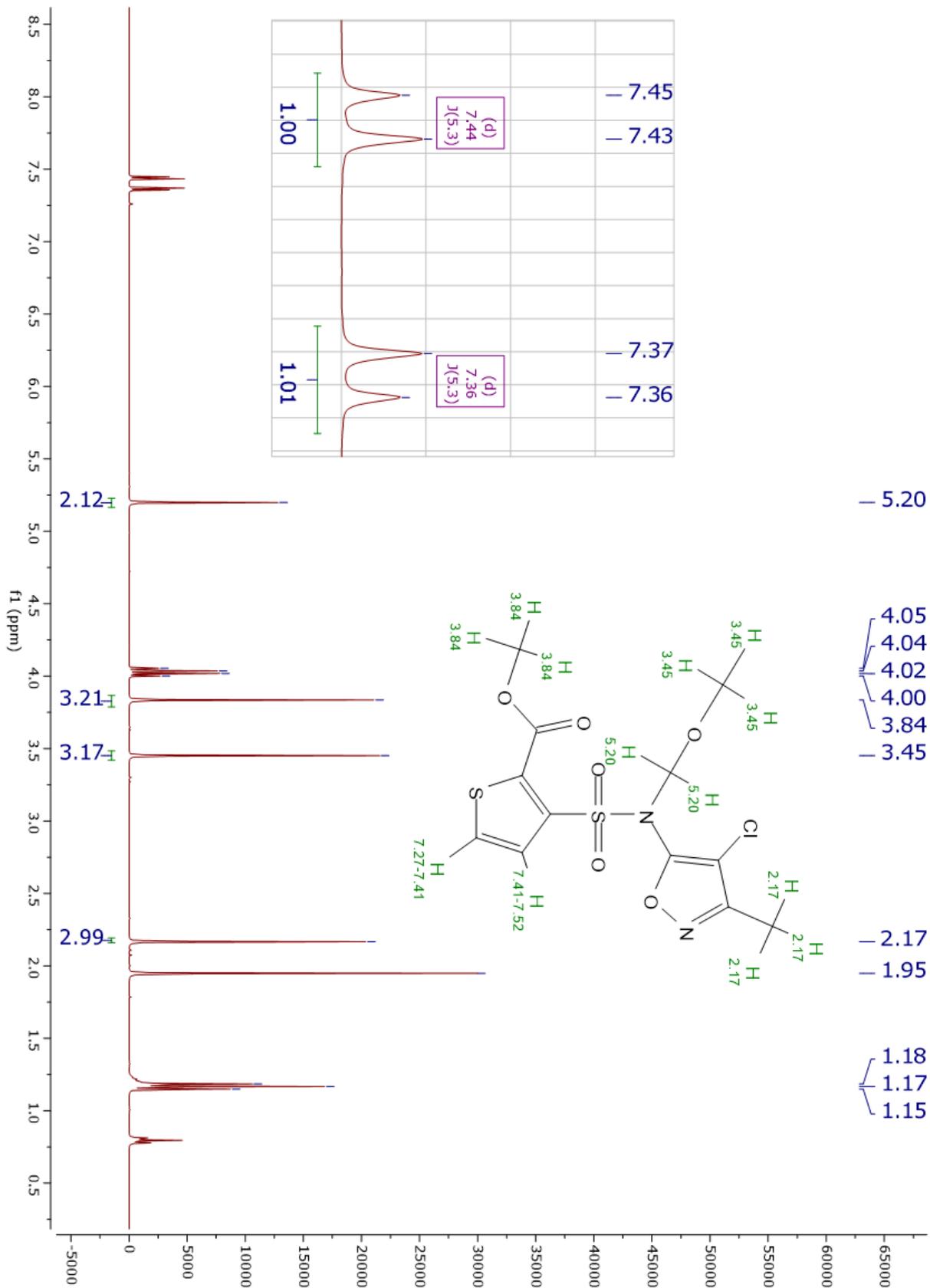
Molecular weight : 380.81 g/mol

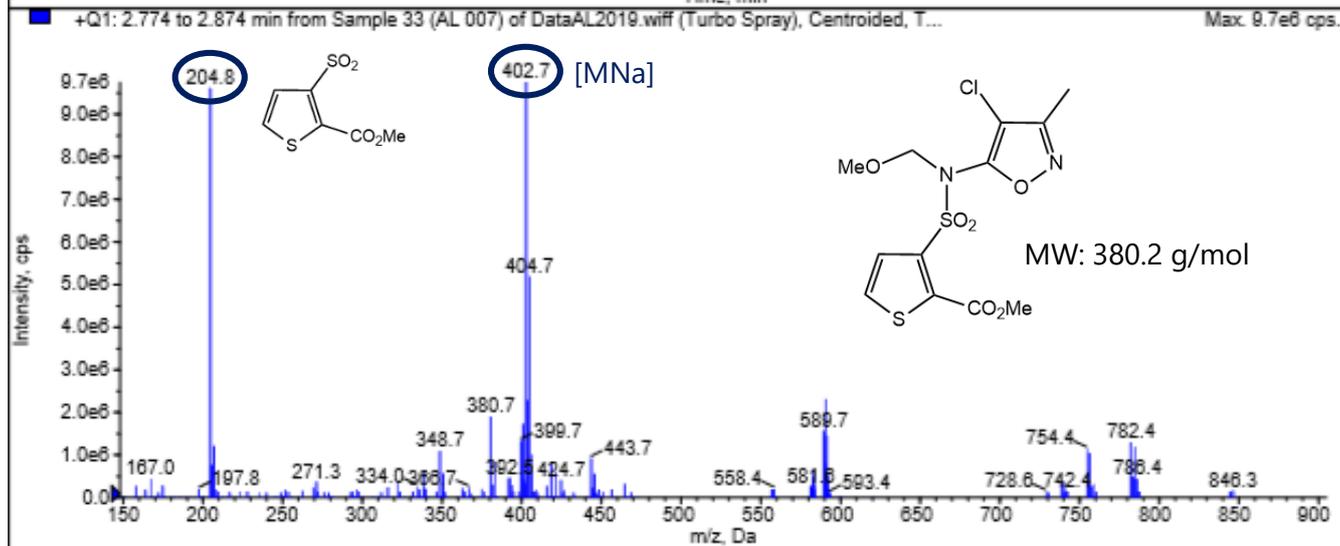
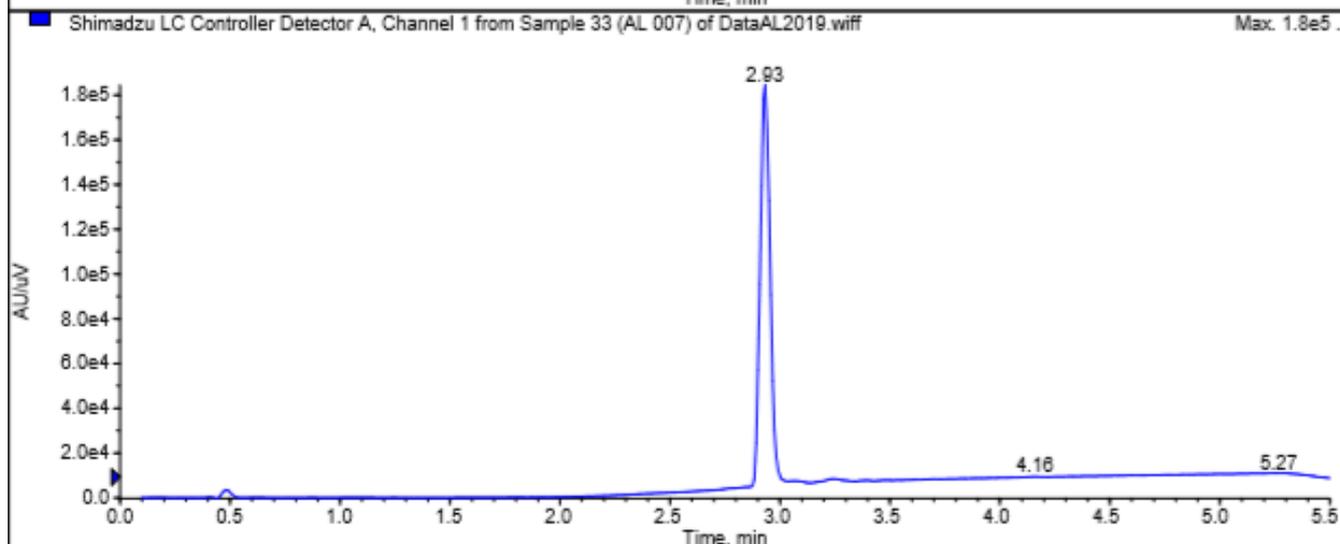
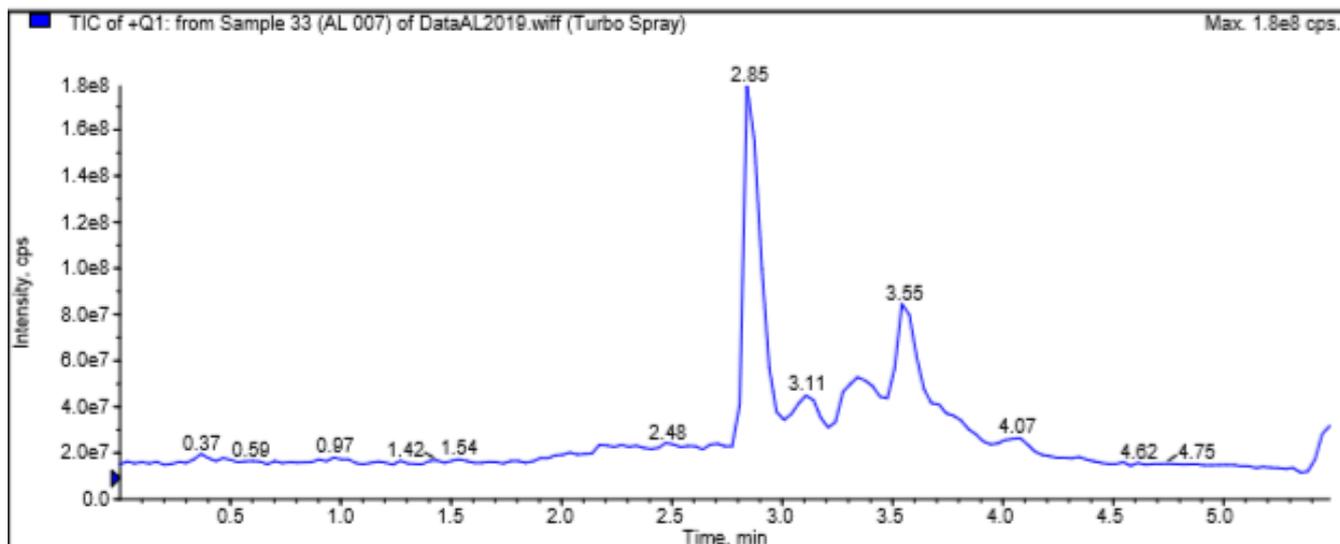
Synthesis protocol : To a solution of **(2)** (300 mg, 0.89 mmol) in anhydrous THF (5 mL) at 0 °C were sequentially added N,N-diisopropylethylamine (226 µL, 1.33 mmol) and bromomethyl methyl ether (96.1 µL, 1.71 mmol). The reaction was stirred for 2 h at 0 °C and 3 h at room temperature before the addition of morpholine (85 µL, 0.89 mmol) to scavenge the excess and toxic bromomethyl methyl ether. After being stirred at room temperature for another hour, the mixture was concentrated, and the residue was dissolved in ethyl acetate (10 mL) and washed with 1 N HCl (2 × 40 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and concentrated before a purification by chromatographic column (hexane:ethyl acetate, 6:4) to give a brownish oil (342 mg, 70%).

Mp: 62-66°C.

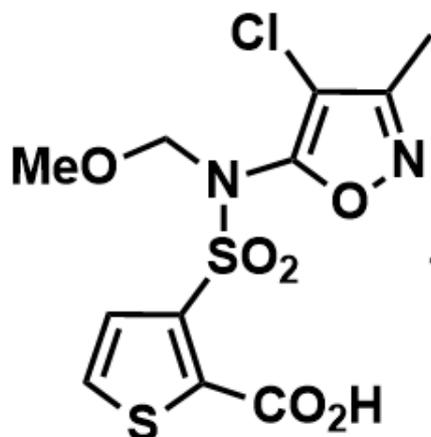
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7.44 (m = d, J = 7.4 Hz, I = 1H) ; 7.36 (m = d, J = 7.3 Hz, I = 1H) ; 5.20 (m = s, I = 2H) ; 3.84 (m = s, I = 3H) ; 3.45 (m = s, I = 3H) ; 2.17 (m = s, I = 3H).

LC-MS *m/z* calc. for C₁₂H₁₃ClN₂O₆S₂ [M-H+Na]⁺: 402.2, found: 402.7, *t_R* = 2.93 min





Methyl-3-[[N-(4-Chloro-3-methyl-5-isoxazolyl)-N-(methoxymethyl)amino]sulfonyl]-2-thiophene carboxylic acid (4):



Chemical formula : C₁₁H₁₁ClN₂O₆S₂

Molecular weight : 366.80 g/mol

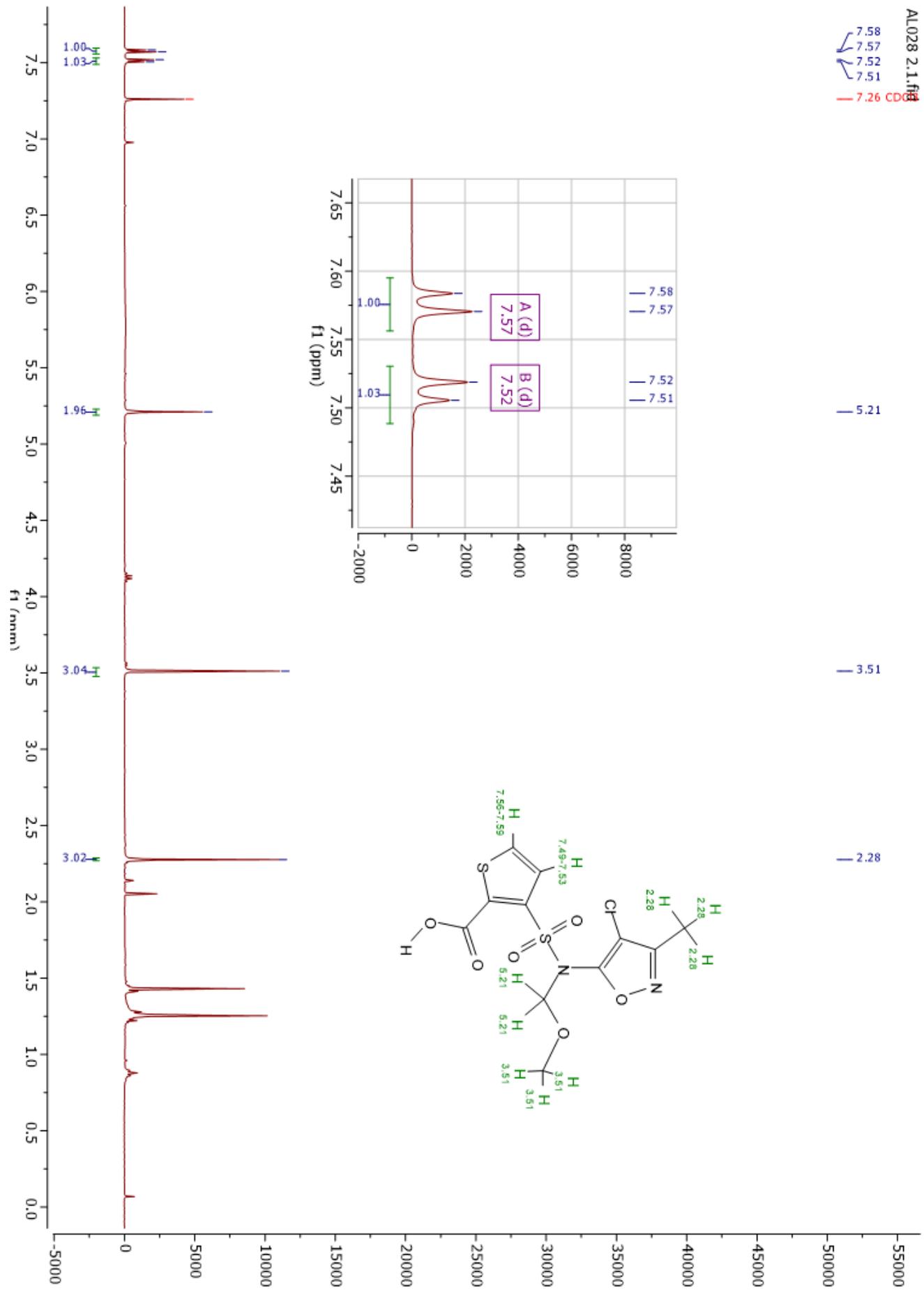
Synthesis protocol : To a solution of **(3)** in THF (5 mL) was added 2M NaOH (6 mL) and the resulting mixture was stirred during 3h at room temperature. 1M HCl was then added to reach pH 5 and the product was extracted using Ethyl acetate (20ml). The organic layer was dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum to give an oil (193 mg, 100%).

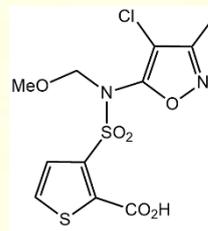
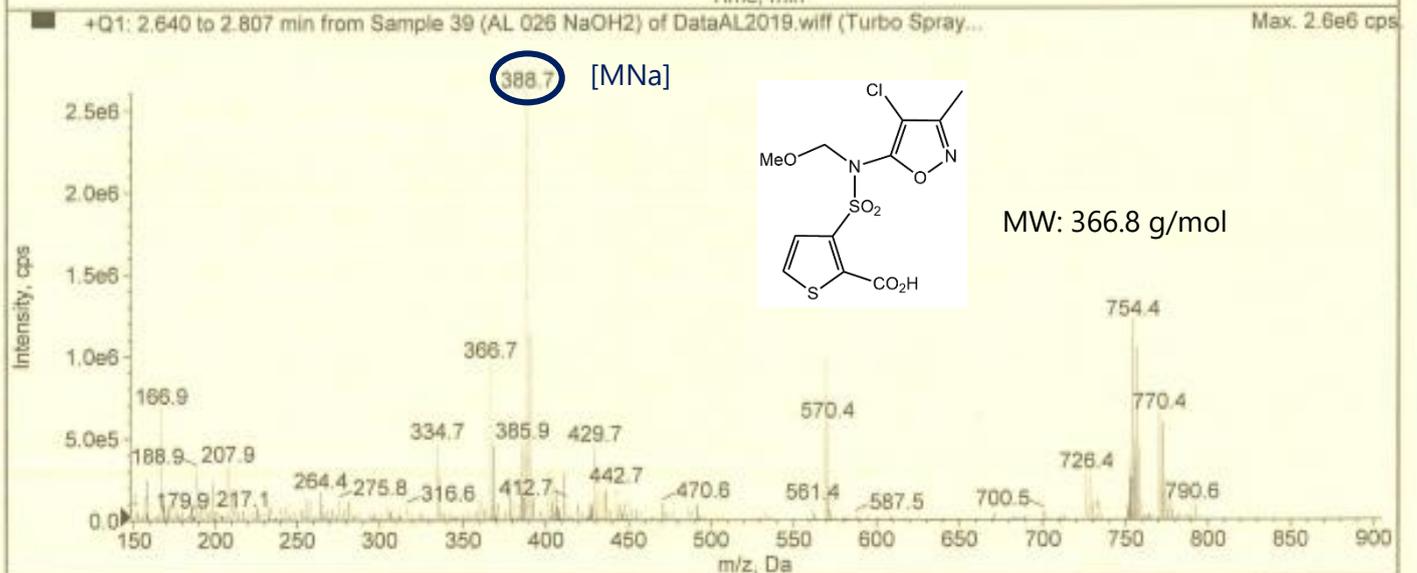
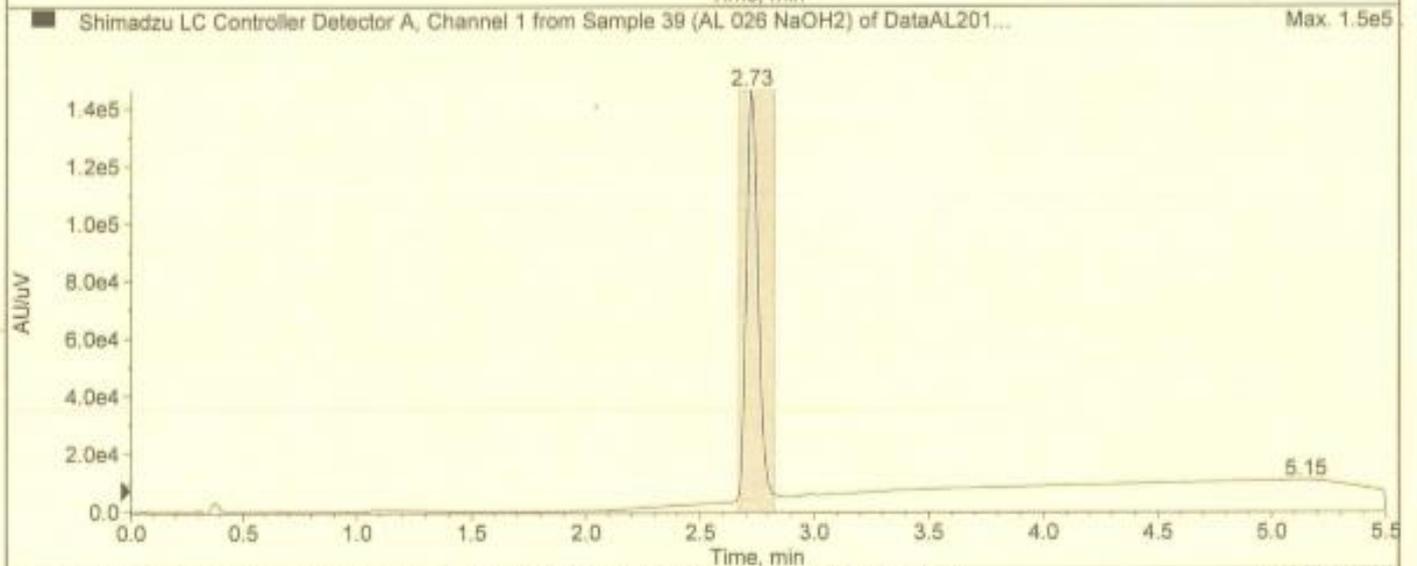
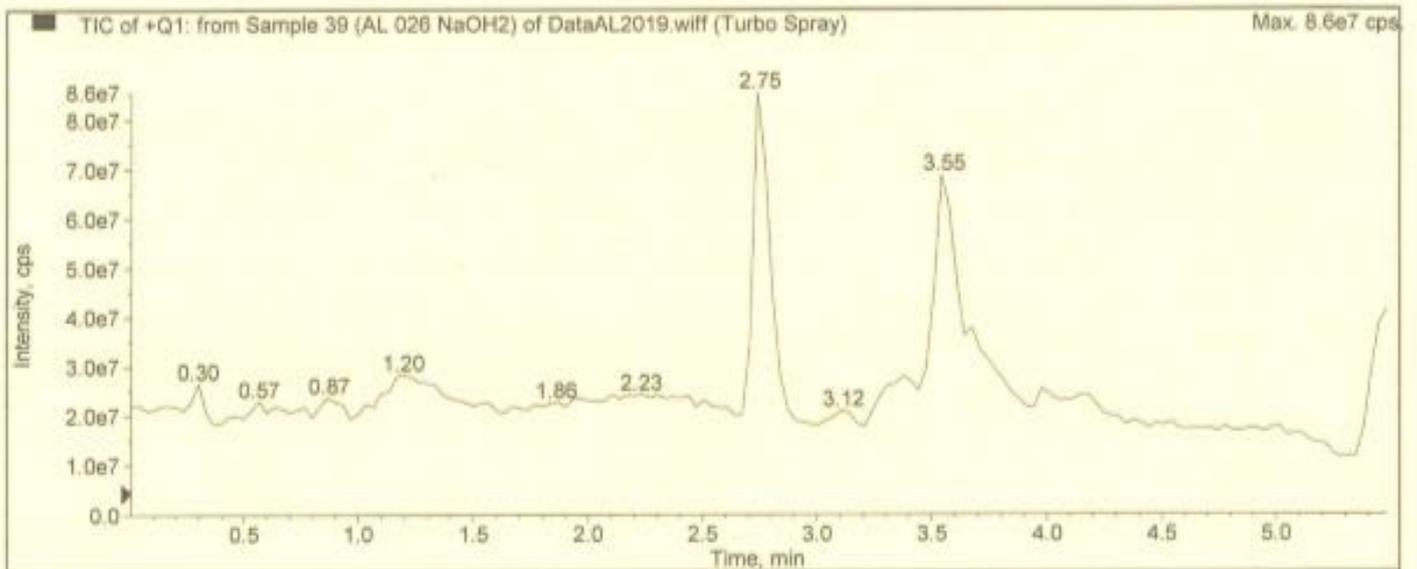
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7.57 (m = d, J = 7.5 Hz, I = 1H) ; 7.51 (m = d, J = 7.5 Hz, I = 1H) ; 5.21 (m = s, I = 2H) ; 3.51 (m = s, I = 3H) ; 2.28 (m = s, I = 3H).

LC-MS *m/z* calc. for C₁₁H₁₁ClN₂O₆S₂ [M-H+Na]⁺: 388.7, found: 402.7, *t_R* = 2.73 min

AL028 2.1.fid

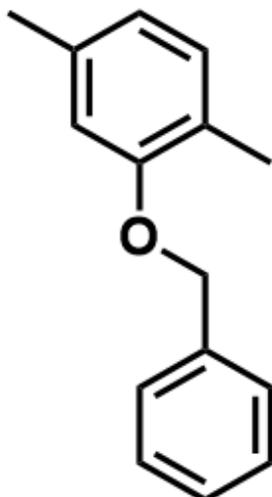
7.58
7.57
7.52
7.51
7.26 CDCl₃





Collected by: APII000\hplc_user
 Electronic Signature: no
 Operator: hplc_user

2,5-dimethylphenyloxybenzyle (5):



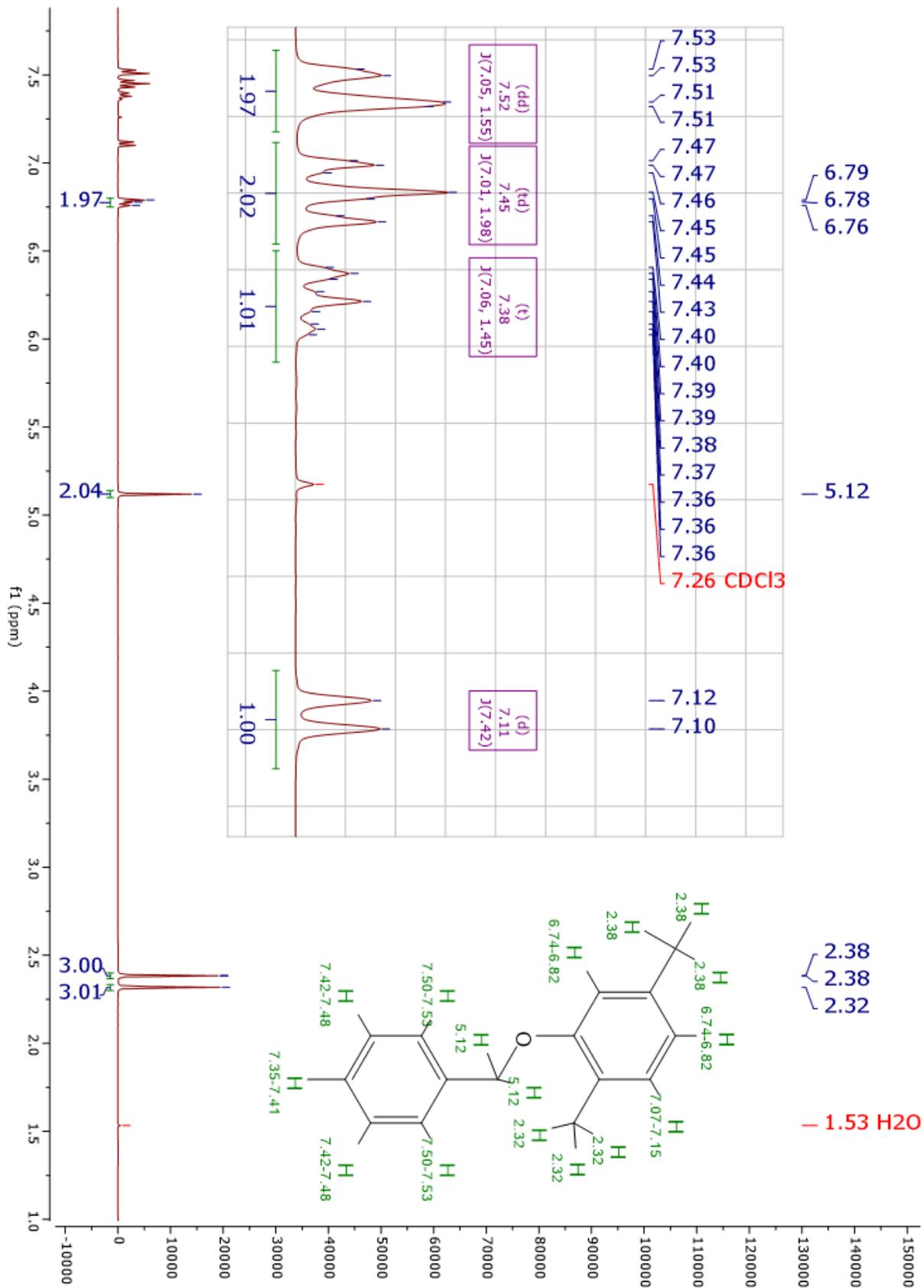
Chemical formula : C₁₅H₁₆O

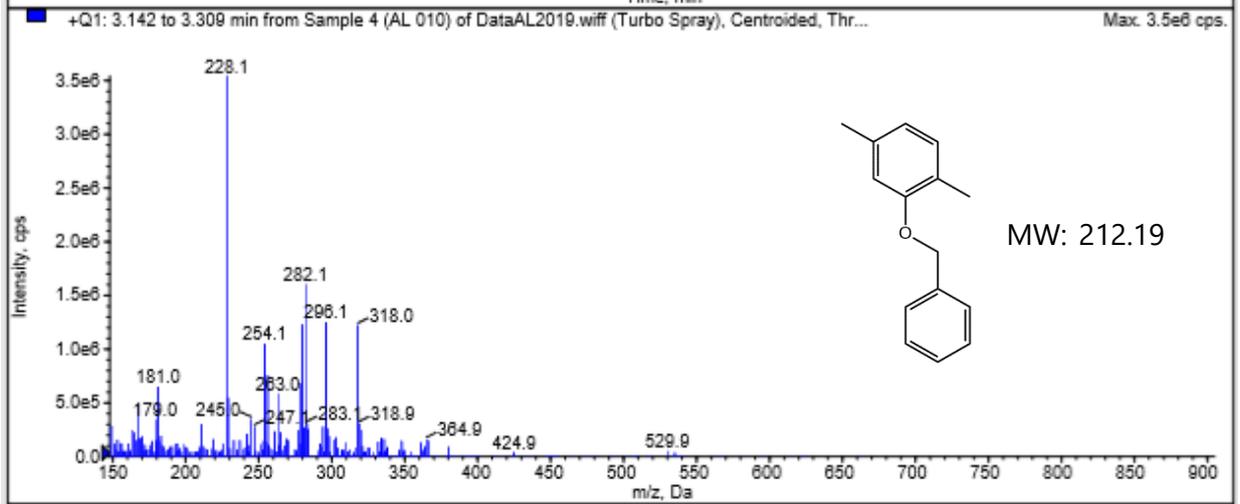
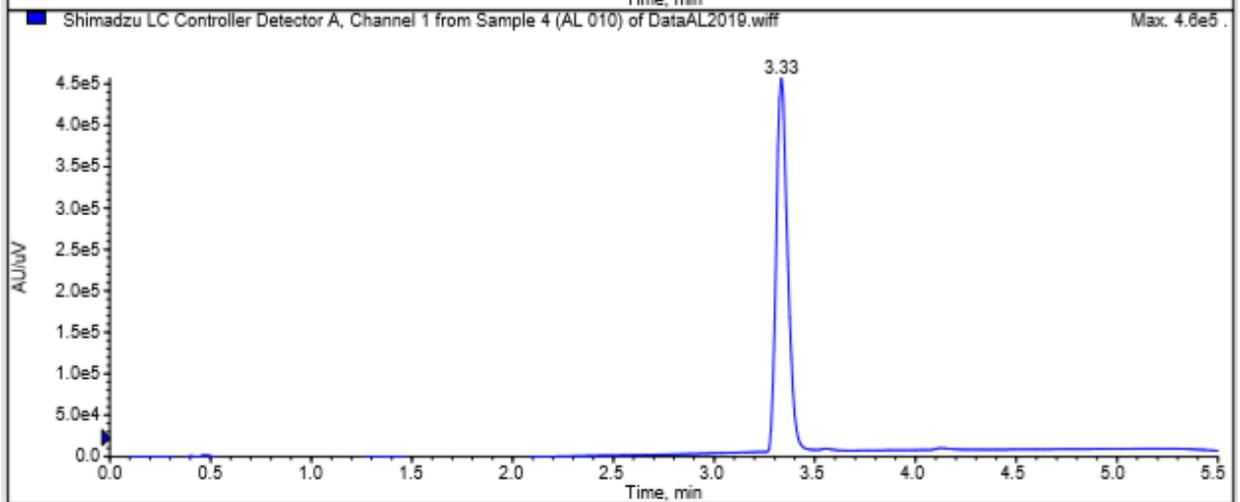
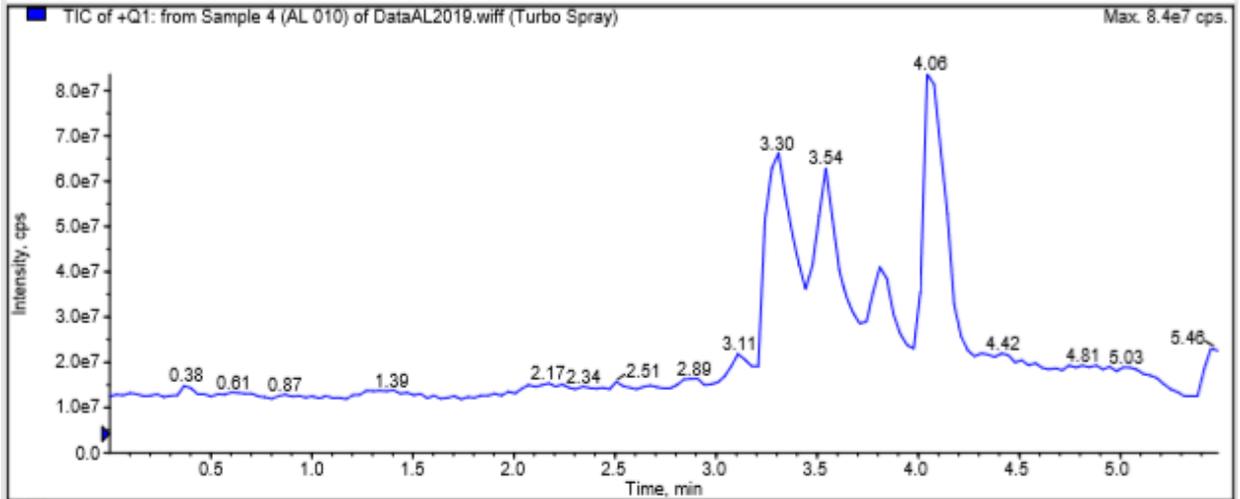
Moleculr weight : 212.29 g/mol

Synthesis protocol : To a solution of 1,4 Dimethylphenol (500 mg, 4.09 mmol, 1.5 eq) with benzylbromide (0.325 ml, 2.73 mmol, 1eq) in acetone (20 ml), 2 equivalent of potassium carbonate were added (755 mg, 5.46 mmol). The preparation was refluxed (70°C) overnight. The resulting mixture was cooling at room temperature then filtrated and evaporated. The product was purified using chromatographic column (hexane:ethyle acetate, 9:1) to give a transparent oil (580 mg, 100%).

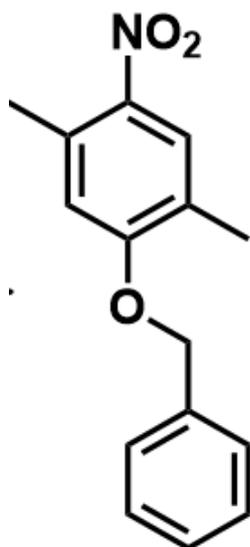
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) [7.53-7.51] (m = dd, J₀ = 7 Hz, J₁ = 1.5 Hz, I = 2H) ; [7.47-7.43] (m = td, J₀ = 7 Hz, J = 1.9 Hz I = 2H) ; [7.40-7.36] (m = tt, J = 7 Hz, J₁ = 1.4 Hz , I = 1H) ; 7.11 (m = d, J = , I = 1H) ; [6.79-6.76] (m = m, J = , I = 2H) ; 5.12 (m = s, I = 2H) ; 2.38 (m = s, I = 3H) ; 2.32 (m = s, I = 3H).

LC-MS, t_R = 3.33 min





2,5-dimethyl-4-nitrophenyloxybenzyle (6) :



Chemical formula : C₁₅H₁₅NO₃

Molecular weight : 257.28 g/mol

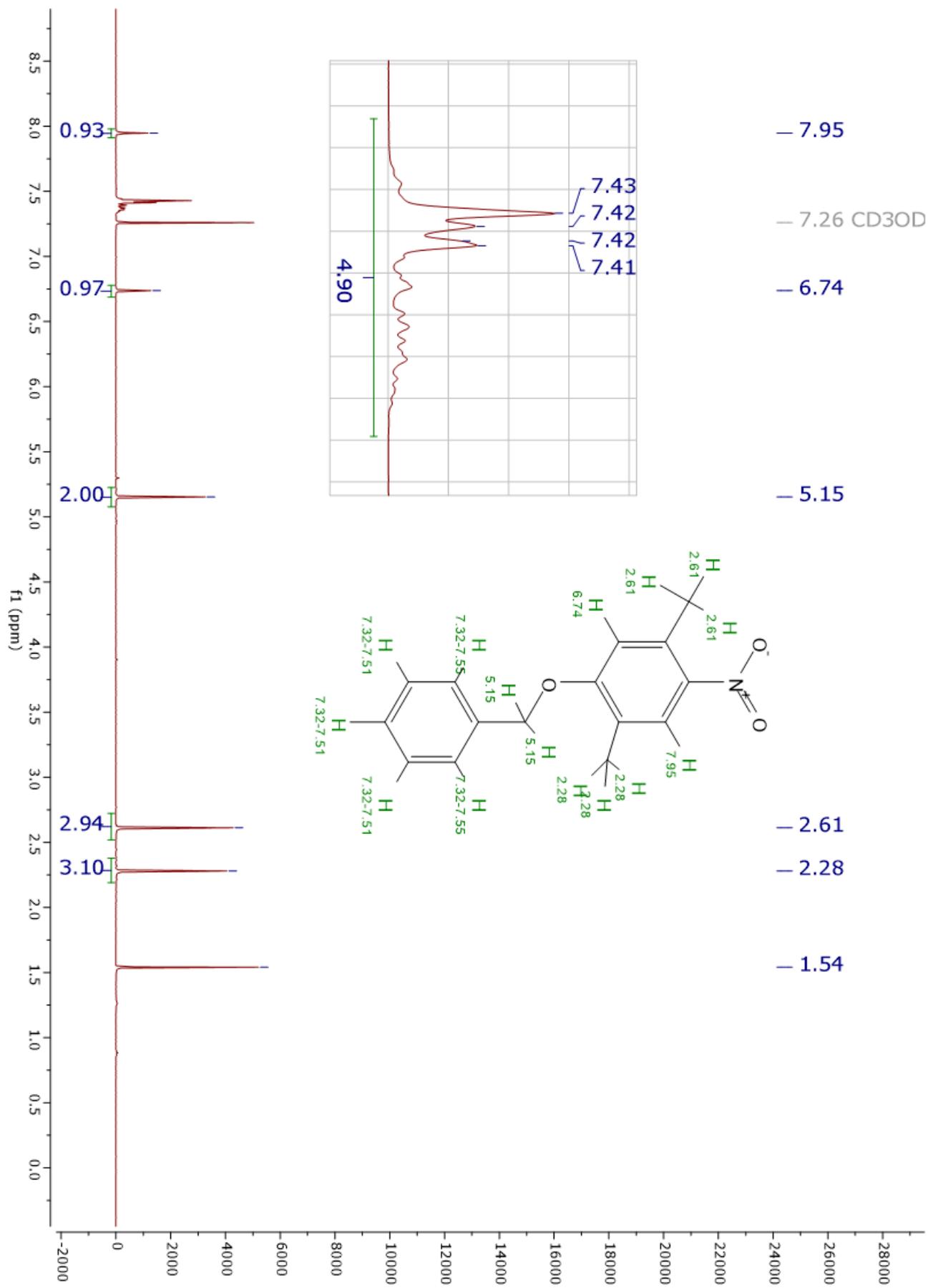
Synthesis protocol : A - To a solution of **(5)** (200 mg, 0.94 mmol) in HNO₃ (4 mL) at 0°C was added 3 equivalent of NaNO₂ (195 mg, 2.82 mmol) and the reaction was stirred for 1h30 at 0°C. The mixture was then washed with water and the solvent was removed from the organic layer by evaporation under vacuum. The product was purified using chromatographic column (hexane:dichloromethane, 7:3) to give a beige solid (202mg, 49%).

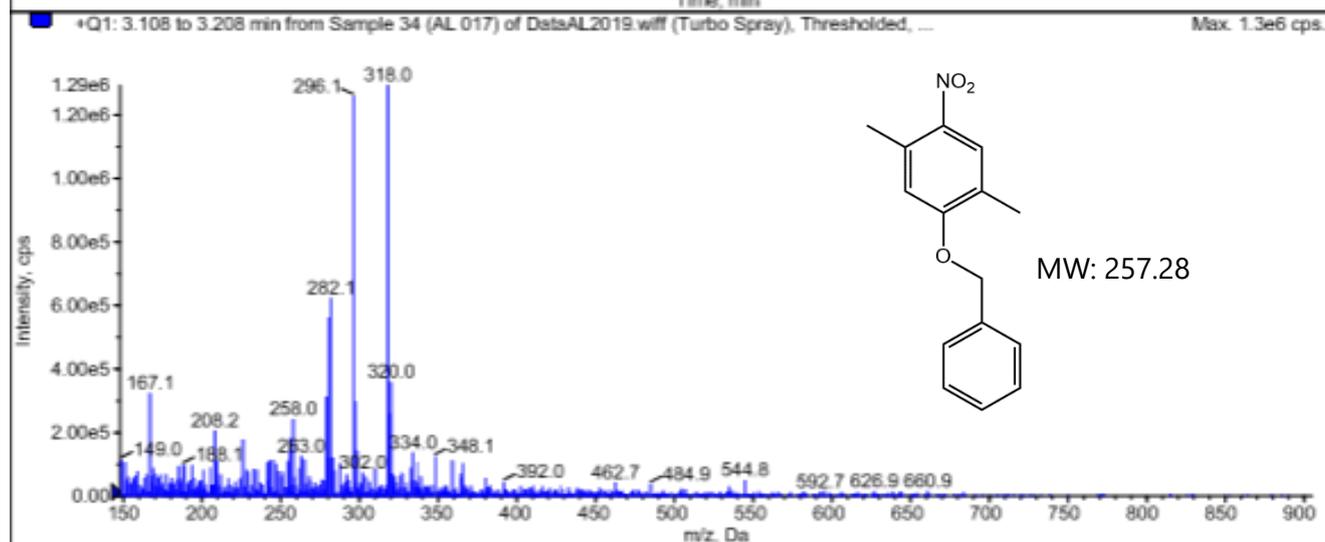
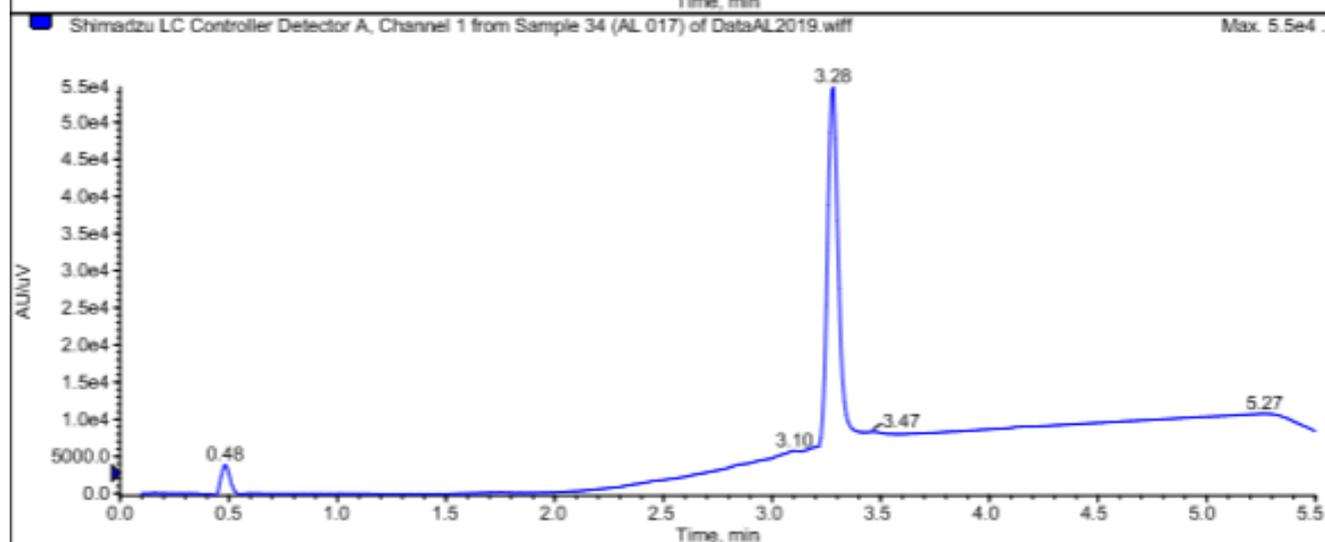
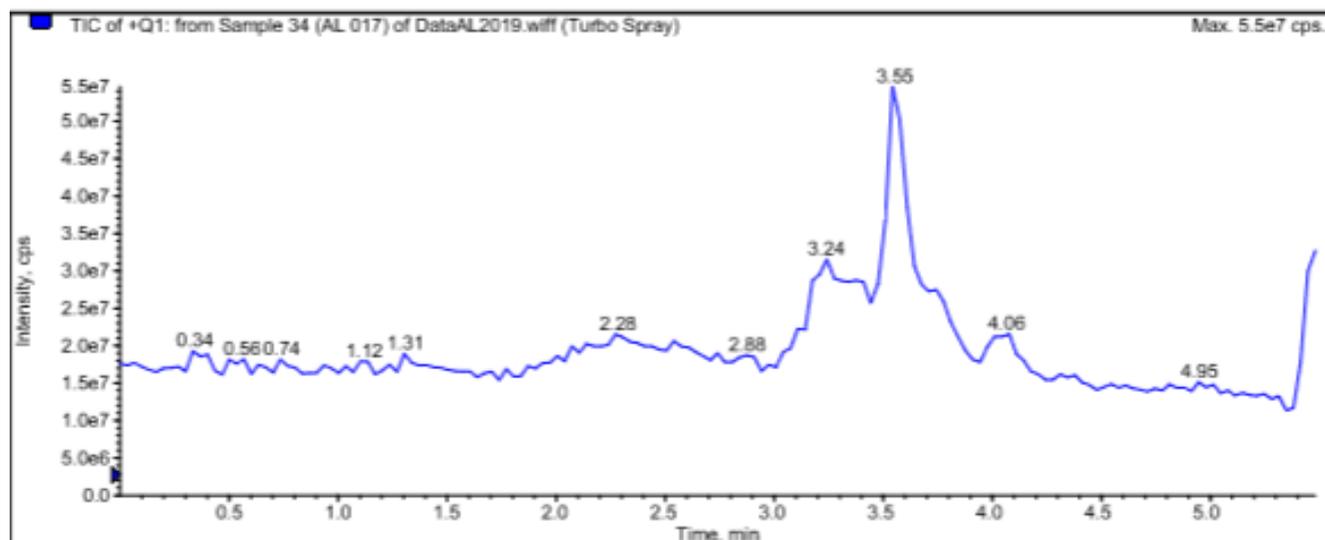
B- To a solution of 2,5-dimethylnitrophenol (1 g, 5.98 mmol) with benzylbromide (0.71 mL, 5.98 mmol) in acetone (40 mL) was added potassium carbonate (1.10 g, 7.98 mmol). The reaction was refluxed (70°C) during 3h. After it was cooled to room temperature, the mixture was filtrated and evaporated. Ethyl acetate was then added and the product has been recovered by chromatographic column (hexane:dichloromethane, 9:1) to give a beige solid (1.46 g, 95%).

Mp: 77-80°C.

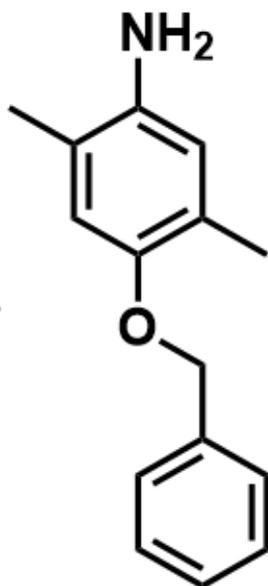
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7.95 (m = s, l = 1H) ; [7.45-7.33] (m = m, l = 5H) ; 6.74 (m = s, l = 1H) ; 5.15 (m = s, l = 2H) ; ; 2.61 (m = s, l = 3H) ; 2.28 (m = s, l = 3H).

LC-MS, t_R = 3.28 min





4-Benzoyloxy-2,5-dimethylaniline (7):



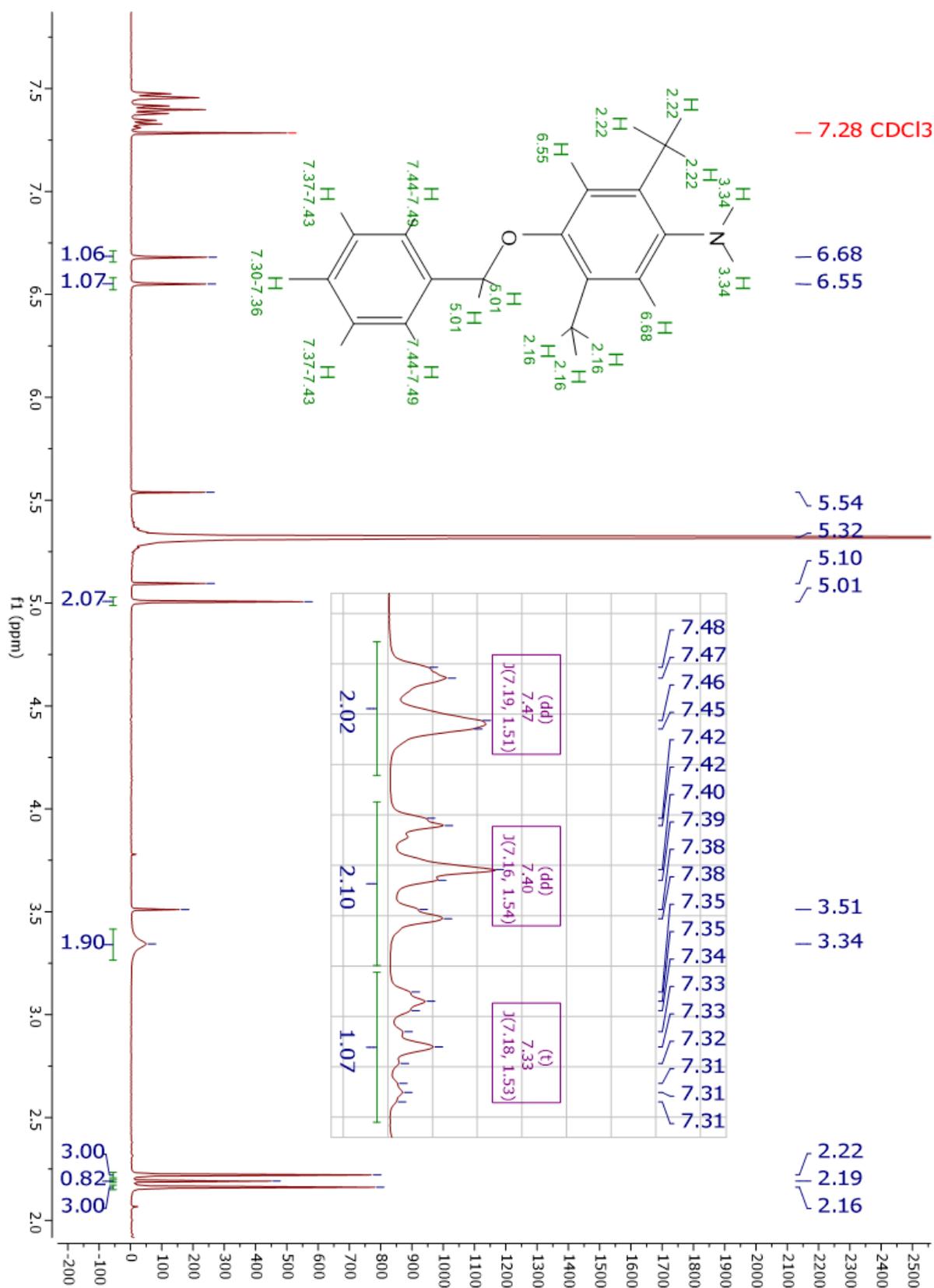
Chemical formula : C₁₅H₁₇NO

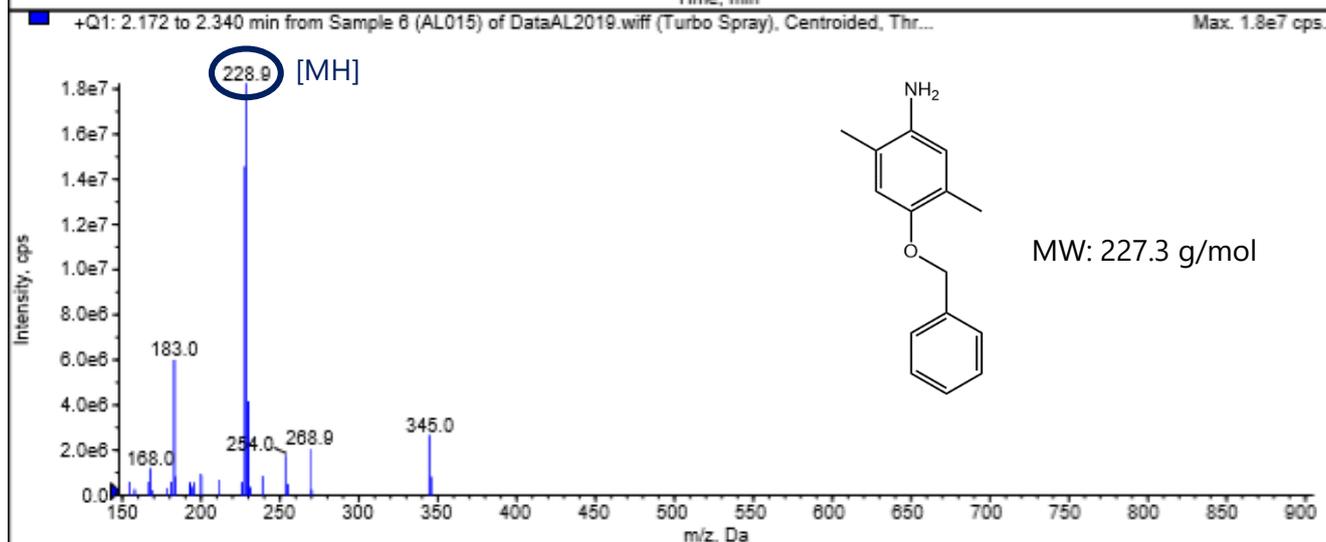
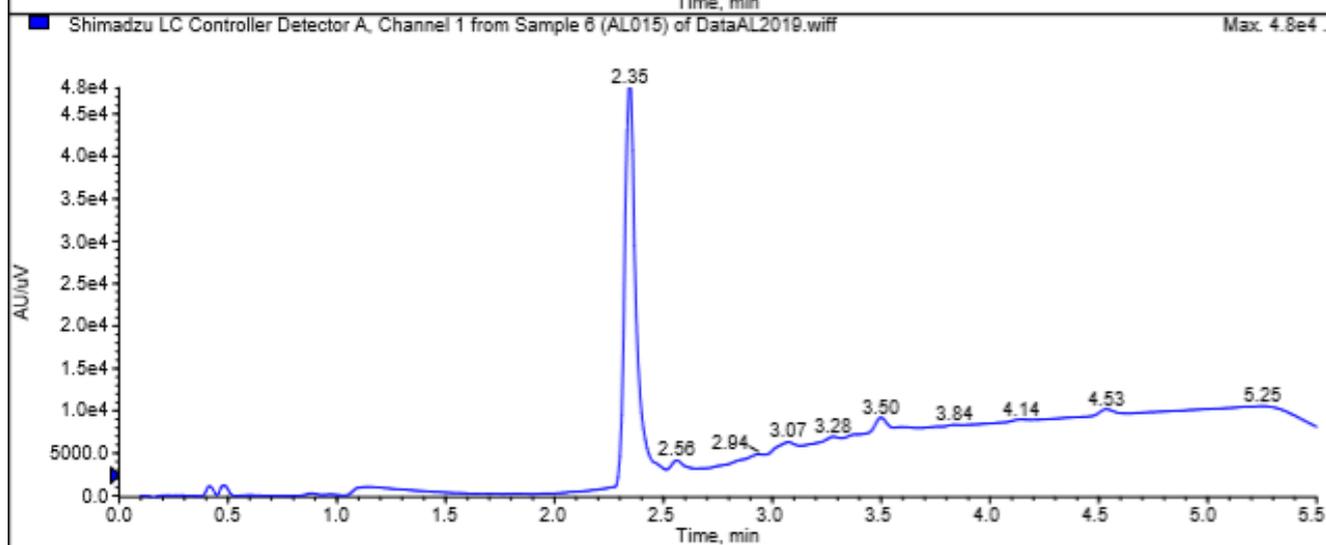
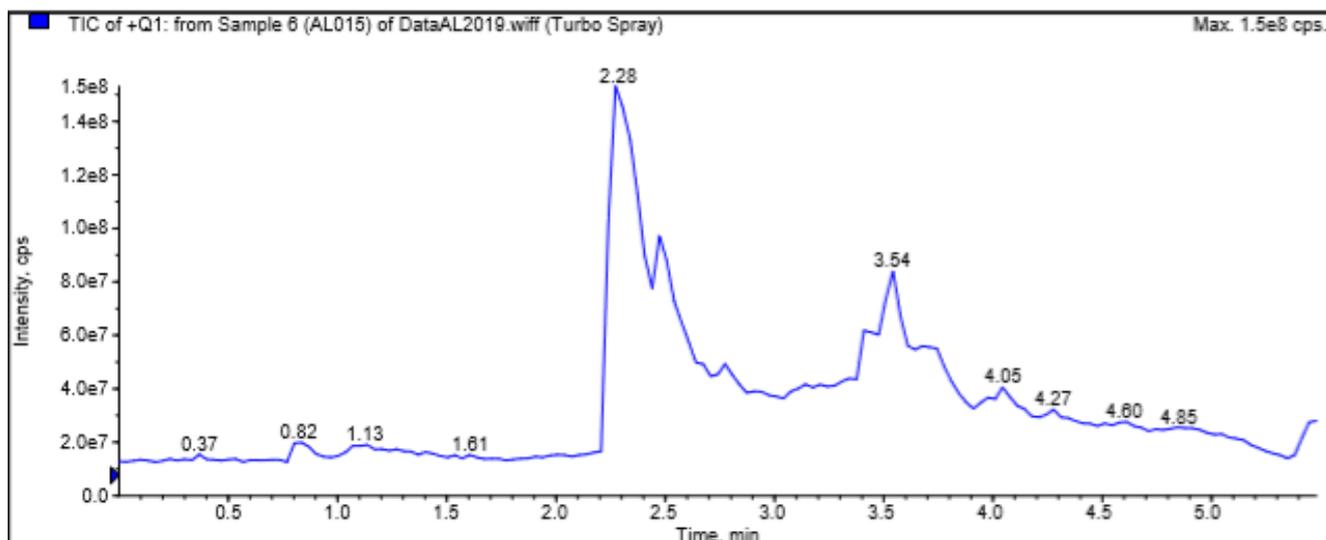
Molecular weight : 227.30 g/mol

Synthesis protocol : To a solution of **(6)** (50 mg, 0.19 mmol) in methanol (3 mL) were added a solution NH₄Cl (64 mg, 1.2 mmol) in 1 mL of water and, in portions, Zinc dust (69 mg, 1.05 mmol). This preparation was stirred vigorously during 1 night at room temperature. The resulting mixture was filtrated and wash with methanol. The MeOH was removed under reduced pressure and after an addition of ethyl acetate the solution was washed with NaOH. The organic layer was then dried using MgSO₄, filtrated and concentrated under high vacuum. The purple oil (17 mg, 39%) was obtained using a preparative TLC (hexane:dichloromethane 3/7 ; 3 migration).

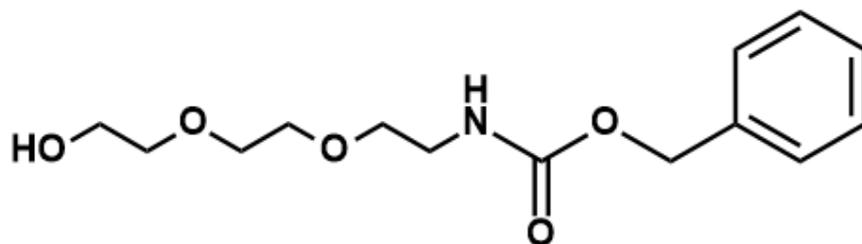
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) [7.48-7.45] (m = dd, J₀ = 7.1 Hz, J₁ = 1.5 Hz, I = 2H) ; [7.42-7.38] (m = td, J = 7.1 Hz, J = 1.5 Hz, I = 2H) ; [7.35-7.31] (m = tt, J₂ = 7.1 Hz, J₁ = 1.5 Hz, I = 1H) ; 6.68 (m = s, I = 1H) ; 6.55 (m = s, I = 1H) ; 5.15 (m = s, I = 2H) ; 3.34 (m = br s, I = 2H) ; 2.22 (m = s, I = 3H) ; 2.16 (m = s, I = 3H).

LC-MS *m/z* calc. for C₁₅H₁₇NO [MH]⁺: 228.3, found: 228.9, t_R = 2.35 min





Benzyl N-[2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl]carbamate (8):



Chemical formula : C₁₄H₂₁NO₅

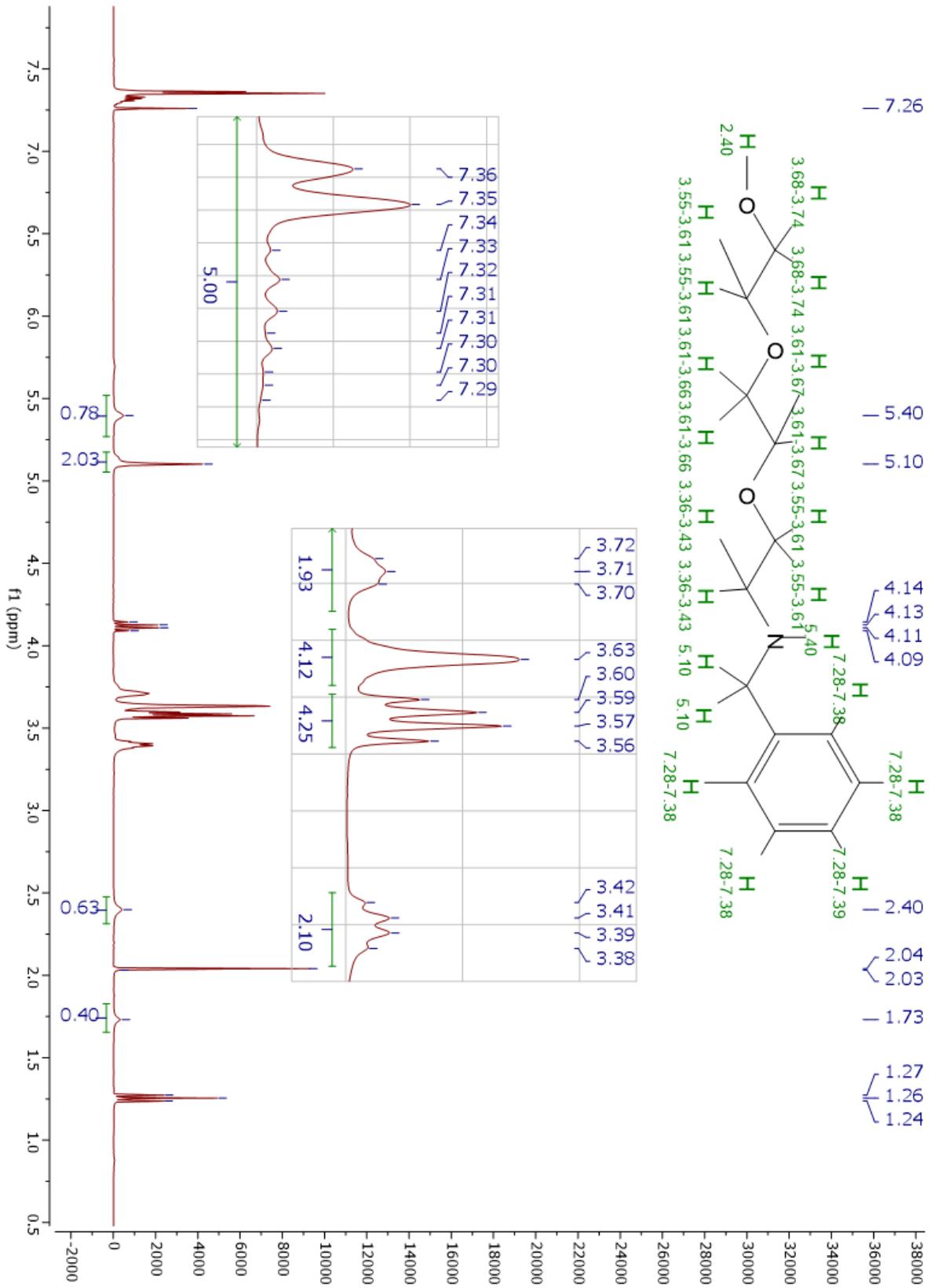
Molecular weight : 283.32 g/mol

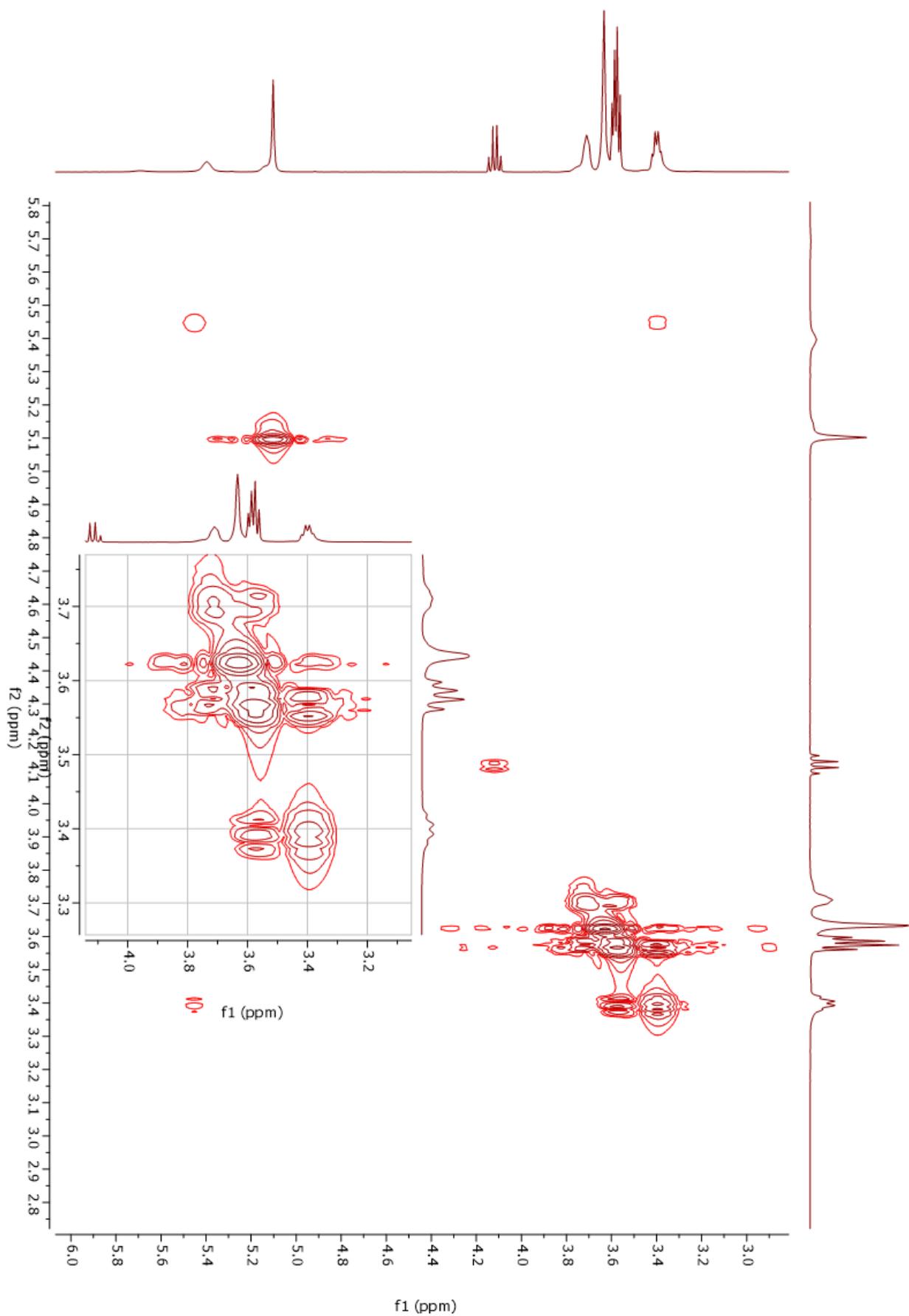
Synthesis protocol :

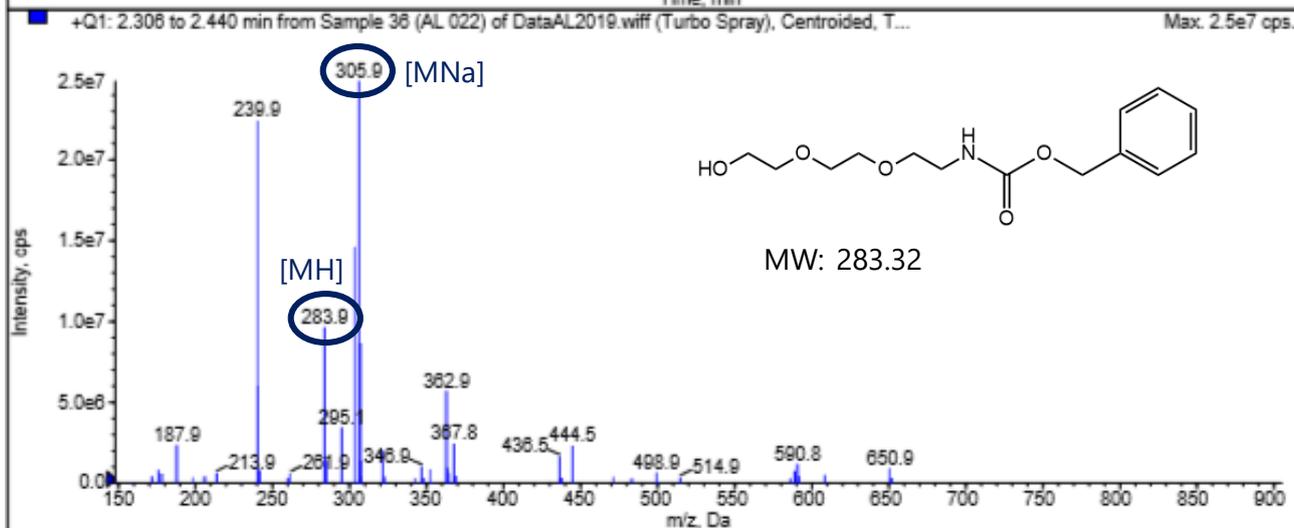
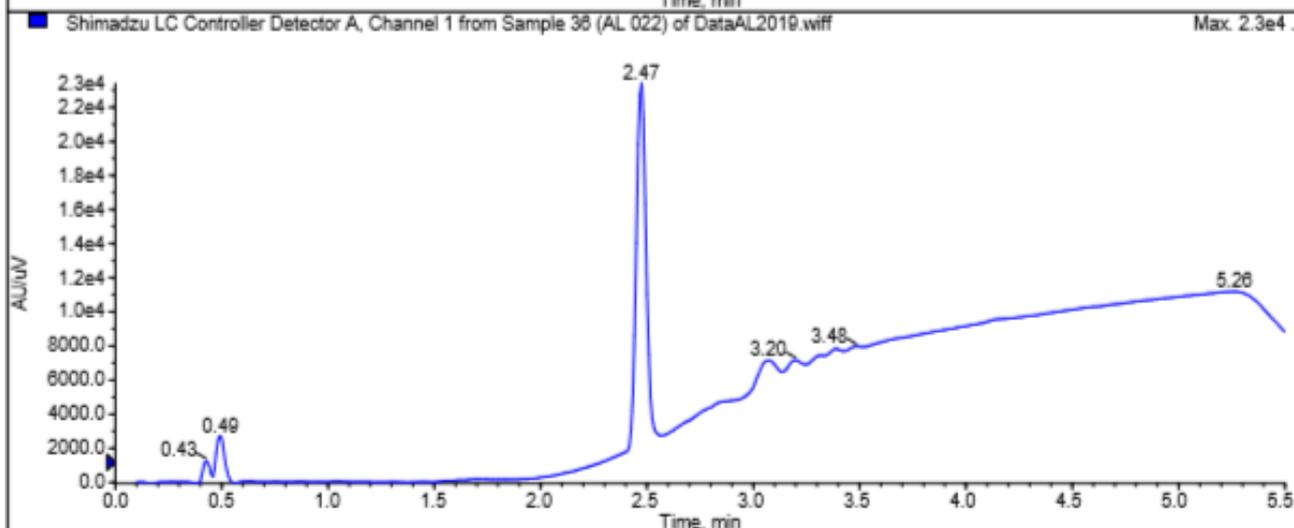
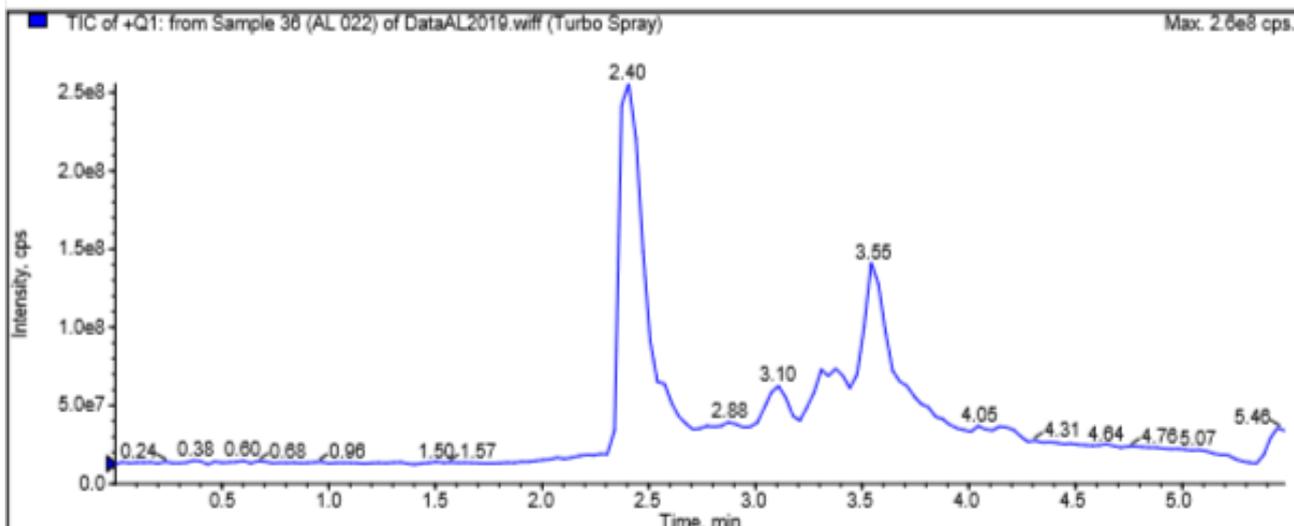
To a solution of 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanol (200 mg, 1.34 mmol) in 5 mL methanol was added triethylamine (0.4 mL, 3.08 mmol) followed by a dropwise addition of a solution of Benzyl chloroformate (0.2 mL, 1.47 mmol) in methanol (2 mL). The reaction mixture was then stirred 20 h under nitrogen at room temperature. Once the reaction was completed, the solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the resulting oil was dissolved in dichloromethane (10 mL). This solution was washed with a 5% aqueous solution of KHSO₄ (2x) and water (2x). The organic layer was then dried with MgSO₄ and concentrated under high vacuum. A chromatographic column (100 % EtOAc) was used to purify the product and give a transparent oil (322 mg, 84%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) [7.36-7.29] (m = m, I = 5H) ; 5.40 (m = br s, I = 1H) ; 5.10 (m = s, I = 2H) ; [3.75-3.38] (m = m, I = 12H).

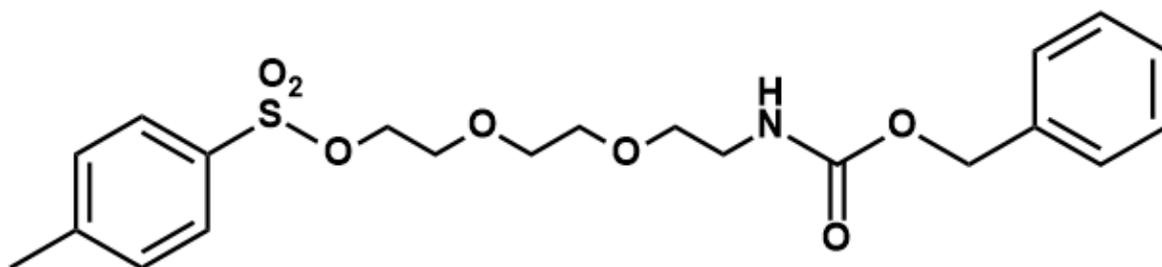
LC-MS *m/z* calc. for C₁₄H₂₁NO₅ [MH]⁺: 284.3, [MNa]⁺: 306.3, found: [MH]⁺: 283.9, [MNa]⁺: 305.9, t_R = 2.47 min







Benzyl N-[2-[2-[2-[[4-methylphenyl)sulfonyl]oxy]ethoxy]ethoxy]ethyl]carbamate (9):



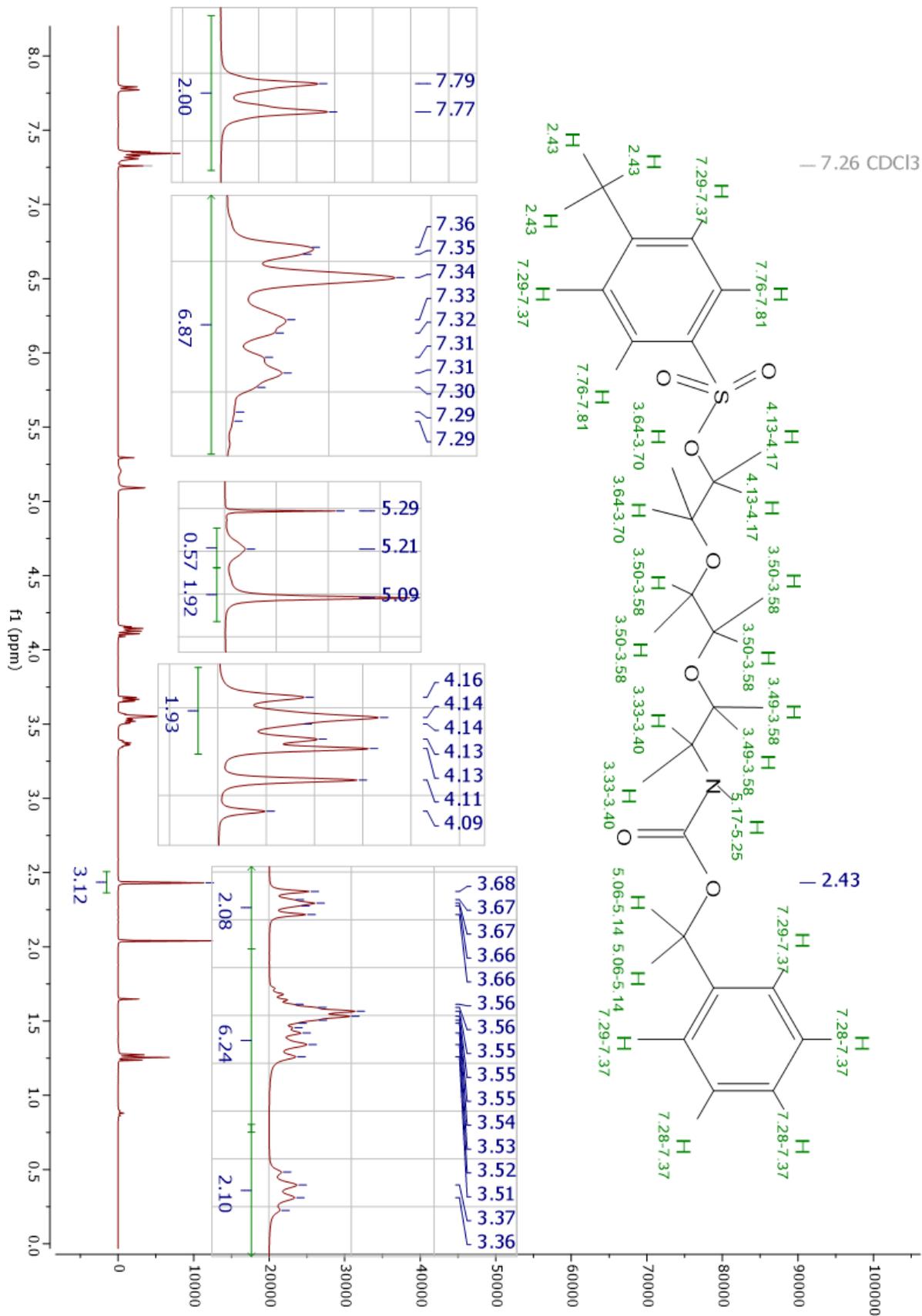
Chemical formula : C₂₁H₂₇NO₇S

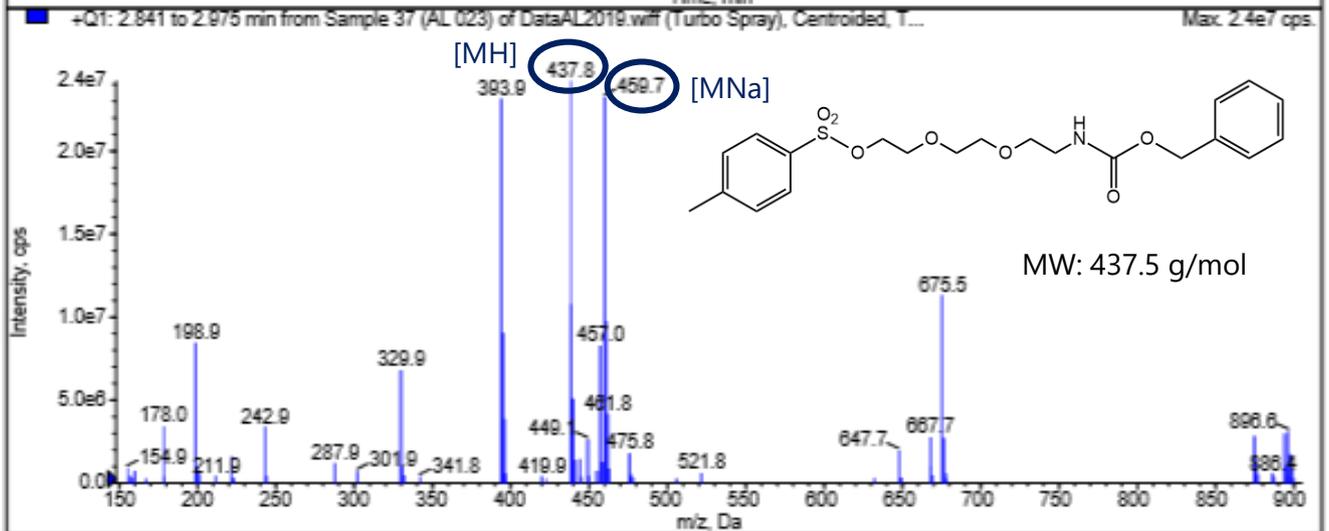
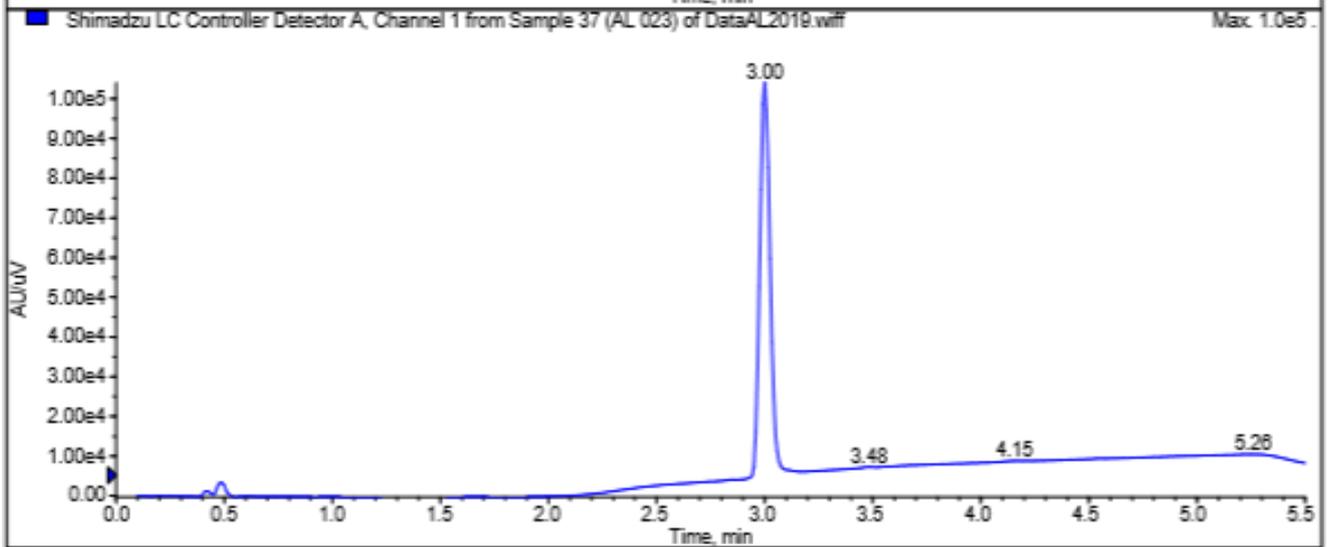
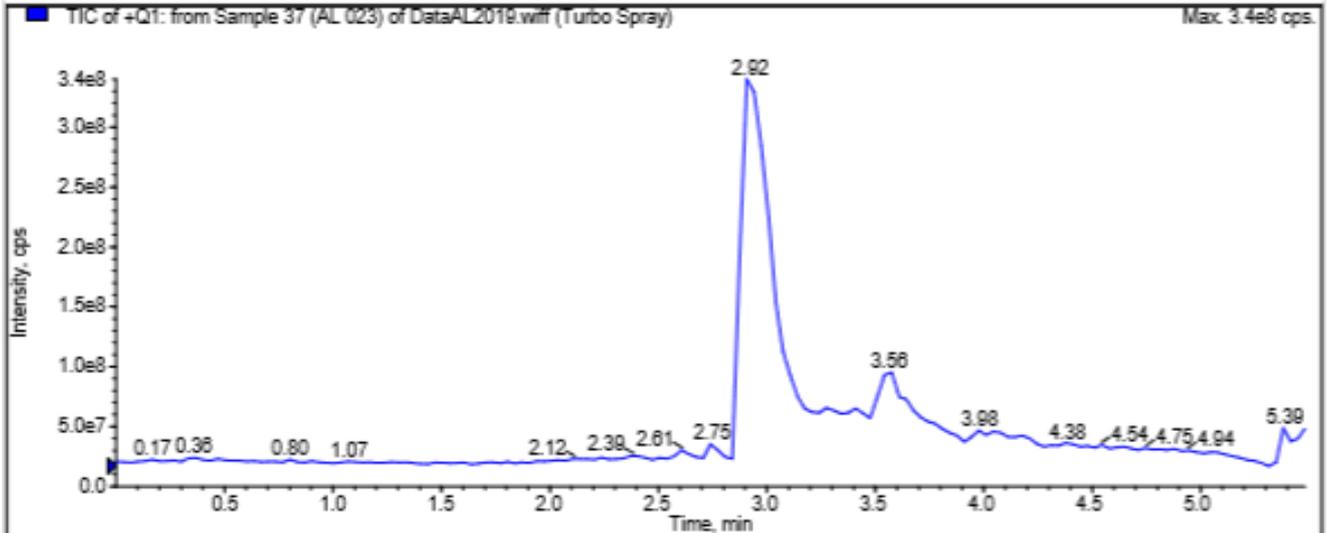
Molecular weight : 437.51 g/mol

Synthesis protocol : To a solution of **(8)** (250 mg, 0.88 mmol) in DCM (5 mL) were sequentially added triethylamine (0.16 mL, 1.14 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (185 mg, 0.97 mmol). This preparation was stirred overnight at room temperature under N₂. The resulting mixture was then diluted with water and extracted with DCM (3x). The organic layer was dried using MgSO₄ and concentrated under high vacuum. The product was finally purified by chromatographic column (hexane:EtOAc 5/5) to give a transparent oil (133 mg, 38%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) [7.78] (m = d, I = 2H, J = 8 MHz) ; [7.36-7.26] (m = m, I = 7H) ; 5.21 (m = br s, I = 1H) ; 5.09 (m = s, I = 2H) ; [4.16-4.09] (m = m, I = 2H) ; [3.68-3.35] (m = m, I = 10H) ; 2.43 (m = s, I = 3H).

LC-MS *m/z* calc. for C₂₁H₂₇NO₇S [MH]⁺: 437.5, [MNa]⁺: 460.5, found: [MH]⁺: 437.8, [MNa]⁺: 459.7, t_R = 3.00 min





Références bibliographiques

- [1] Haute Autorité de Santé. Hypertension artérielle pulmonaire : Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Nov 2007. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/pnds_htap_decembre_2007_vu_doc.pdf
- [2] Vidal. (page consultée le 09/01/2020). Base de données d'informations médicales, [en ligne]. https://www.vidal.fr/recommandations/2756/maladies_rares/hypertension_arterielle_pulmonaire_primitive_htap/
- [3] Orphanet. (page consultée le 09/01/2020). Base de données sur les maladies rares et les médicaments orphelins, [en ligne]. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=422
- [4] Aubert JD & Juillerat-Jeanneret L. *Endothelin-Receptor Antagonists beyond Pulmonary Arterial Hypertension: Cancer and Fibrosis*. Journal of Medicinal Chemistry. 2016;59(18):8168-8188.
- [5] Chester AH & Yacoub MH. *The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension*. Glob Cardiol Sci Pract. 2014;2014(2):62-78.
- [6] Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS & al. *Endothelin*. Pharmacol Rev. 2016;68:357–418.
- [7] Maguire JJ, Davenport AP. *Endothelin Receptor and Their Antagonists*. Semin Nephrol. 2015;35(2):125–136.
- [8] Michel V. 2014. *Les Récepteurs Couplés aux Protéines G*. Sciences Pharmacologiques. Université de Bordeaux.
- [9] Culhane KJ, Liu Y, Cai Y and Yan ECY. *Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors*. Front. Pharmacol. 2015;6:264.

- [10] Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. *Diversity of G Protein in Signal Transduction*. Science. 1991;252(5007):802-8.
- [11] Siyang S, Wenshu C, Shurong Z, Yujie S, Wenbing D, Hua Z & al. *Small GTPases : Structure, biological function and its interaction with nanoparticles*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019;14(1):30-39.
- [12] Aspenström P. *Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium*. Biochimica et Biophysica Acta. 2004;1742:51 – 58.
- [13] Guillon J. 2015. Innovation Thérapeutique 2 : Drug Design. *Hémisynthèse et Synthèse Totale de Produits Naturels à Visée Anticancéreuse*. Université de Bordeaux
- [14] Maguire JJ., Kuc RE, Davenport AP. *Defining the affinity and receptor sub-type selectivity of four classes of endothelin antagonists in clinically relevant human cardiovascular tissues*. Life Sciences. 2012;91(13–14):681-686.
- [15] Stein PD, Floyd DM, Bisaha S, Dickey J, Girotra RN, Gougoutas JZ, Kozlowski M, Lee VG & al. *Discovery and Structure-Activity Relationships of Sulfonamide ETA-Selective Antagonists*. Journal of Medicinal Chemistry. 1995;38(8):1344-1354.
- [16] Wu C, Decker ER, Blok N, Bui H, You TJ, Wang J & al. *Discovery, Modelling, and Human Pharmacokinetics of N-(2-Acetyl-4,6-dimethylphenyl)-3-(3,4-dimethylisoxazol-5-ylsulfamoyl)thiophene-2-carboxamide (TBC3711), a Second Generation, ETA Selective, and Orally Bioavailable Endothelin Antagonist*. Journal of Medicinal Chemistry. 2004;47(8):1969-1986.
- [17] Wu C, Chan MF, Stavros F, Raju B, Okun I, and Castillo RS. *Structure–Activity Relationships of N 2-Aryl-3-(isoxazolylsulfamoyl)-2-thiophenecarboxamides as Selective Endothelin Receptor-A Antagonists*. Journal of Medicinal Chemistry. 1997;40(11):1682-1689.
- [18] Raju B, Wu C, Kois A, Verner E, Okun I, Stavros F & al. *Thiophenesulfonamides as endothelin receptor antagonists*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1996;6(22):2651-2656.

- [19] Raju B, Wu C, Castillo RS, Okun I, Stavros F, Chan MF. *2-Aryloxycarbonylthiophene-3-sulfonamides: Highly potent and ET_A selective endothelin receptor antagonists*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1997;7(16):2093-2098.
- [20] Wu C, Chan MF, Stavros F, Raju B, Okun I, Mong S & al. *Discovery of TBC11251, a Potent, Long Acting, Orally Active Endothelin Receptor-A Selective Antagonist*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;40(11):1690-1697.
- [21] Wu C, Decker ER, Blok N, Bui H, Chen Q, Raju B & al. *Endothelin Antagonists: Substituted Mesitylcarboxamides with High Potency and Selectivity for ET_A Receptors*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999;42(22):485-4499.
- [22] Coelho C. *Fluorescence et propriétés photochimiques des matières organiques naturelles*. *Chimie organique : Clermont-Ferrand : 2009 ; 21986*.
- [23] ThermoFischer Scientific. (page consultée le 09/01/2020). Site de l'entreprise ThermoFischer Scientific, [en ligne]. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>
- [24] Briddon SJ, Kellam B, Hill SJ. *Design and Use of Fluorescent Ligands to Study Ligand-Receptor Interactions in Single Living Cells*. In : Willars G., Challiss R. (eds) *Receptor Signal Transduction Protocols*. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2011, vol 746. Humana Press, Totowa, NJ
- [25] Buschmann V, Weston KD, and Sauer M. *Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes*. *Bioconjugate Chem*. 2003;14:195-204.
- [26] Baker GJ, Middleton R, Adams L, May LT, Briddon SJ, Kellam B & al. *Influence of fluorophore and linker composition on the pharmacology of fluorescent adenosine A1 receptor ligands*, *British Journal of Pharmacology*. 2010;159:772-786.

- [27] Dey J, Saha M, Kumar Pal A and Ismail K. *Regioselective nitration of aromatic compounds in an aqueous sodium dodecylsulfate and nitric acid medium*. RSC Advances. 2013;3:18609.
- [28] Bering L, Jeyakumar K and Antonchick AP. *Metal-Free C–O Bond Functionalization: Catalytic Intramolecular and Intermolecular Benzoylation of Arenes*. Organic Letters. 2018;20(13):3911-3914.
- [29] Xiao ZP, Wang YC, Du GY, Wu J, Luo T & Yi SF. *Efficient Reducing System Based on Iron for Conversion of Nitroarenes to Anilines*. Synthetic Communications. 2010;40(5):661-665.
- [30] Wu C, Biediger RJ & Kogan TP. *A Highly Practical Route to 7-Hydroxy-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one from p-Anisidine*. Synthetic Communications. 1999;29(20):3509-3516.
- [31] TAIGEN BIOTECHNOLOGY CO. LTD.; WO2008/95058; (2008); A1 English
- [32] Sissi C, Dovigo L, Greco ML, Ciancetta A, Moro S, Trzciński JW & al. *Conjugates between minor groove binders and Zn(II)-tach complexes: Synthesis, characterization, and interaction with plasmid DNA*. Tetrahedron. 2017;73(21):3014-3024.
- [33] LEGOCHEM BIOSCIENCES, INC.; Zu KY, Soo OY, Jeiwook C, Young SH, Chul-wong C, Hee PY & al, In; (272 pag.); WO2017/89890; (2017); (A1) English

Titre : Synthèse d'un antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline

Résumé : L'endothéline est un peptide produit par les cellules endothéliales interagissant avec deux récepteurs couplés aux protéines G, ET_A et ET_B. Il est impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques, principalement au niveau vasculaire.

Son rôle dans la régulation du tonus vasculaire en a fait une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de maladies cardiovasculaires et notamment l'hypertension artérielle pulmonaire. Un certain nombre de molécules thérapeutiques ont été développées dont certaines sont déjà sur le marché.

Nous nous proposons ici de synthétiser un antagoniste fluorescent spécifique du récepteur A de l'endothéline pour étudier la localisation vasculaire de ce récepteur lors de tests biologiques cellulaires.

Mots clés : Endothéline, Fluorescence, Chimie médicinale, Hypertension artérielle pulmonaire

Title : Synthesis of a fluorescent endothelin A receptor antagonist

Abstract : Endothelin is a peptide product by endothelial cells which interacts with two G protein coupled receptors, ET_A et ET_B. It's involved in a numerous of pathophysiological processes, especially into the vascular system.

Its role in vascular tone regulation has made it a prime target for the development of new therapeutic strategies for the treatment of cardiovascular diseases, particularly for pulmonary arterial hypertension. Numerous of therapeutics molecules have been developed and some of them are already on the market.

Our goal here was to synthesize a fluorescent endothelin A receptor antagonist to study the vascular localisation of this receptor with biological assays.

Keywords : Endothelin, Fluorescence, Medicinal chemistry, Pulmonary arterial hypertension
